

AMINA OXÍDASE EM PLANTAS.
II. ATIVIDADE DURANTE A GERMINAÇÃO
DE *Phaseolus vulgaris*

Luiz E. Gutierrez (1)
Luiz C. Basso (1)
Maria J. Brancalion (1)

INTRODUÇÃO

A amina oxidase (EÇ. 1.4.3.6.) catalisa a oxidação de aminas para aminoaldeido com liberação de amônia e peróxido de hidrogênio (DIXON & WEBB, 1971).

O ênzimo foi estudado em sementes de ervilha em germinação (SRIVASTAVA *et alii*, 1977), plântulas de soja (SUZUKI, 1973), parte aérea de milho (SUZUKI & HIRASAWA, 1973), folhas de cevada (SMITH, 1972).

KENTEN & MANN (1952) e WERLE *et alii* (1959) verificaram atividade a partir de 3 dias de germinação em cotilédones de ervilha, atingindo o máximo entre 6 a 12 dias, sendo que plantas adultas pouca atividade apresentaram. Enquanto que SUZUKI (1973) verificou aumento na atividade apenas nas raízes e hipocótilo de soja, não detectando atividade nos cotilédones.

A amina oxidase presente nos cotilédones de ervilha durante germinação é induzida por putrescina, espermidina e ornitina e auxinas inibiram a síntese do ênzimo nos cotilédones somente na presença de embrião (SRIVASTAVA *et alii*, 1977).

No presente trabalho são apresentados dados sobre a atividade do enzimo em cotilédones e epicótilo de feijão durante a germinação acompanhada pelas determinações de proteína total e matéria seca.

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação das sementes: sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Carioca foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,5% durante 10 minutos, lavadas com água destilada e colocadas para germinar, na presença e ausência de luz, a 25°C, em bandejas contendo sílica moída e irrigadas diariamente com água destilada.

Extração do enzimo: a extração nos cotilédones e epicótilo foi realizada com água gelada em almofariz com sílica finamente moída, na proporção de 10 ml por grama de tecido e em seguida o extrato foi filtrado em musseline.

Ensaio enzimático: foi realizado segundo SRIVASTAVA *et alii* (1977) com algumas modificações. O meio de reação continha 50 micromoles de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4), 5 micromoles de putrescina, 0,5 ml do extrato enzimático e o volume completado até 5 ml. Os tubos foram incubados a 35.°C durante 30 minutos. A atividade do enzimo foi acompanhada pela determinação do teor de amônia segundo FAWCETT & SCOTT (1960) e utilizada por GUTIERREZ *et alii* (1979). Após a incubação, 1 ml do meio de reação foi transferido para tubo de ensaio e foi adicionado 2 ml de fenato de sódio, 3 ml de nitroferrocianeto de sódio e 3 ml de hipoclorito de sódio. O teor de proteína do extrato foi determinado segundo LOWRY *et alii* (1951) depois de precipitado com ácido tricloroacético 10% e dissolvida em NaOH 0,4 N, adotando-se soroalbumina bovina como padrão.

Proteína total: cotilédones e epicótilo foram homogeneizados em almofariz com NaOH 0,1 N, a proteína foi precipitada com ácido tricloroacético 20% e redissolvida em NaOH. O teor foi obtido segundo LOWRY *et alii* (1951).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi detectada atividade em extratos de raízes em todos os estágios de desenvolvimento. Os resultados da atividade do enzimo são apresentados por miligrama de proteína e grama de matéria fresca.

QUADRO I - Atividade de amina oxidase de cotilédones de feijão durante a germinação na ausência e presença de luz.

Dias de germinação		$\mu\text{g NH}_3/\text{mg Prot./30'}$		$\mu\text{g NH}_3/\text{g/30'}$	
		Escuro	Luz	Escuro	Luz
PUTRESCINA	2	0,7	1,7	32	59
	4	6,9	12,1	194	327
	5	13,0	19,1	286	459
	6	16,9	—	339	—
	7	14,8	22,9	198	389
	9	23,2	50,6	139	387
	11	27,0	51,6	54	361
ESPERMIDINA	2	0,1	0,5	4	16
	4	3,8	7,5	106	204
	5	5,9	14,5	130	349
	6	8,4	—	168	—
	7	8,1	14,6	108	249
	9	12,7	33,6	76	235
	11	5,0	25,6	10	179

QUADRO II - Atividade de amina oxidase de epicótilo de feijão durante a germinação, na ausência e presença de luz.

Dias de germinação		$\mu\text{g NH}_3/\text{mg Prot./30'}$		$\mu\text{g NH}_3/\text{g/30'}$	
		Escuro	Luz	Escuro	Luz
PUTRESCINA	4	8,2	6,8	220	262
	5	13,6	6,9	434	275
	6	9,0	—	215	—
	7	6,8	5,6	176	282
	9	6,8	6,6	117	251
	11	4,3	5,4	77	218
	ESPERMIDINA	4	5,8	2,5	113
5		7,3	3,4	232	133
6		3,9	1,8	93	92
7		2,9	2,2	75	85
9		2,8	2,1	49	84
11		1,1	1,1	20	43

QUADRO III - Proteína total e matéria seca de cotilédones e epicótilo de feijão durante a germinação na ausência de luz.

Dias de germinação	Proteína (%MS)		Matéria Seca	
	Cotilédones	Epicótilo	Cotilédones	Epicótilo
2	15,78	— — —	39,09	— — —
4	10,82	15,20	27,90	12,40
6	3,00	15,76	25,80	14,55
8	2,93	15,97	17,04	15,82
10	1,80	14,81	17,33	13,96

As alterações na atividade da amina oxidase durante a germinação de feijão, na ausência e presença de luz, são apresentadas no quadro II. A atividade do enzimo, tanto expressa por miligrama de proteína extraída como por grama de tecido, foi máxima depois de 5 dias de germinação no epicótilo, decrescendo em seguida. Este fenômeno foi observado tanto na presença como na ausência de luz. A atividade foi maior nas plântulas cultivadas em ausência de luz e utilizando o substrato putrescina. Não foi encontrada atividade enzimática quando se empregou o substrato espermina.

No quadro I são apresentados os valores da atividade da amina oxidase nos cotilédones de feijão durante a germinação. A atividade encontrada nos cotilédones foi maior do que na parte aérea. Em soja, SUZUKI (1973) não detectou atividade nos cotilédones e sim nas raízes e hipocótilo. SUZUKI & YAMASAKI (1971), SRIVASTAVA *et alii* (1977) detectaram atividade em cotilédones de ervilha e McGOWAN & MUIR (1971) em epicótilo de ervilha. Este fato vem sugerir uma diferença entre as espécies das leguminosas em relação a presença e atividade da amina oxidase.

No quadro I pode-se observar que quando a atividade foi expressa em termos de miligrama de proteína extraída, o máximo de atividade é encontrada aos 11 dias (com putrescina) e 9 dias (com espermidina). Em relação a atividade expressa por grama de tecido, o máximo é alcançado em torno de 6 dias, decrescendo em seguida. Este fato poderia ser explicado pelo decréscimo de proteína total que o cotilédone apresenta durante a germi-

nação (quadro III), diminuindo a quantidade de proteína extraída, enquanto possivelmente a atividade enzimática permaneça constante ou seja reduzida em menor proporção do que a proteína.

Os dados apresentados no quadro I confirmam observações de HILL (1973) que trabalhando com *Trifolium pratense* encontrou atividade máxima nos cotilédones aos 7 dias.

A atividade da amina oxidase foi encontrada apenas em tecidos jovens e ausente nos cotilédones antes da germinação, não se tem ainda informações sobre a função em plantas.

RESUMO

A germinação de sementes de feijão é acompanhada por decréscimo no teor de proteína total e matéria seca e elevação da atividade de amina oxidase até 5 dias (epicótilo) e 6 dias (cotilédones). O extrato filtrado tanto de epicótilo como dos cotilédones foi capaz de oxidar putrescina e espermidina, não oxidando spermina. A luz parece ter um efeito inibitório sobre a atividade da amina oxidase no epicótilo, sendo a atividade menor na plântula cultivadas em presença de luz. Fenômeno contrário foi observado nos cotilédones, quando em presença de luz a atividade da amina oxidase foi maior.

SUMMARY

«AMINE OXIDASE IN PLANTS. II. ACTIVITY IN BEAN (*Phaseolus vulgaris*) SEEDLINGS DURING GERMINATION».

Germination of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds is followed by decrease in protein and dry matter contents and increase in amine oxidase activity reaching a maximum in 5 days (epicotyls) and 6 days (cotyledons). The filtrated extract from epicotyls and cotyledons was able to oxidize putrescine and spermidine but not spermine. Light showed a positive stimulus in amine oxidase activity in cotyledons but a negative effect in epicotyls.

LITERATURA CITADA

- DIXON, M. & E.C. WEBB, 1971. **Enzymes**, 2nd ed., Academic Press, New York, 950p.
- FAWCETT, J.K. & J.E. SCOTT, 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. **J. Clin. Path.** 13: 156-159.

- GUTIERREZ, L.E., L.C. BASSO, H. BOARETO JR. & F.P. ZAIA, 1979. Diamina oxidase em plantas. I. Método para a determinação da atividade. **Revista da Agricultura** 55: 21-24.
- HILL, J.M., 1973. The changes with age in the distribution of copper and some copper-containing oxidase in red clover (*Trifolium pratense* L. cv. Dorset Marigrass). **J. Exptl. Bot.** 24: 525-536.
- KENTEN, R.H. & P.J.G. MANN, 1952. The oxidation of amines by extracts of Pea seedlings. **Biochem. J.** 50: 360-369.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR & R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- McGOWAN, R.E. & R.M. MUIR, 1971. Purification and properties of amine oxidase from epicotyls of *Pisum sativum*. **Plant Physiol.**, 47: 644-648.
- SMITH, T.A., 1972. Purification and properties of the polyamine oxidase of barley plants. **Phytochemistry** 11: 899-910.
- SRIVASTAVA, S.K., V. PRAKASH & B.I. NAIK, 1977. Regulation of diamine oxidase activity in germinating pea seeds. **Phytochemistry** 16: 185-187.
- SUZUKI, Y. & K. YAMASAKI, 1971. Effects of some inhibitors of nucleic acid and protein synthesis on the development of amine oxidase in germinating pea cotyledons. **Physiol. Plant.** 24: 441-445.
- SUZUKI, Y., 1973. Some properties of the amine oxidase of soybean seedlings. **Plant and Cell Physiol.** 14: 413-417.
- SUZUKI, Y. & E. HIRASAWA, 1973. Polyamine oxidase from *Zea mays* shoots. **Phytochemistry** 12: 2863-2867.
- WERLE, E., G. BEAUCAMP & SCHIRREN, 1959. Über die Aminoxydase von Erbsenkeimlingen und ihre Bedeutung für die Keimung. **Plant** 53: 125-133.