

ACÚMULO DE PUTRESCINA E INTERRUPÇÃO DA SÍNTESE
PROTÉICA EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*, L.)
DEFICIENTE EM POTÁSSIO

EDVALDO ALBERTO ZAGO

Eng.º-Agr.º

Orientador: Prof. Luiz Carlos Basso

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro, 1978

Aos meus pais

Alberto e Julieta

eternamente grato

OFEREÇO.

À minha esposa

Marta

e à minha filha

Juliana

DEDICO.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo por nos ter iniciado nos caminhos árduos, mas fascinante da pesquisa científica, dando nos sempre o seu apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso pelo muito que fez para que este trabalho pudesse ser desenvolvido, pelo incentivo, amizade e orientação.

A G R A D E C I M E N T O S

Aos senhores Lineu Domingos Mazzone Delfini, Carlos Dorelli e Romeu Rocha, funcionários do Departamento de Bioquímica de Plantas, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Admar Cervellini.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal em nome de seu Diretor, Prof. Dr. Marcos Gianoni.

Ao Prof. Dr. Vanderlei José de Mello, Chefe do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

A todos que direta ou indiretamente cooperaram para que este trabalho pudesse ser realizado.

C O N T E Ú D O

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Material	13
4.2. Métodos	15
4.2.1. Ensaíos	15
4.2.1.1. Efeitos da deficiência dos macronutrien- tes nos teores das amins putrescina, espermina e espermidina em folhas de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L. cultivar Carioca)	15
4.2.1.2. Efeito da deficiência de potássio nos teores das amins putrescina, espermina e espermidina durante o desenvolvimento de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.; cultivar Carioca)	15

4.2.1.4. Efeito da absorção de aminoácidos e aminas por folhas destacadas de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.; cultivar Carioca) sobre o teor das aminas putrescina, espermina e espermidina	16
4.2.1.5. Incorporação de P^{32} ($Na_2H^{32}PO_4$) nos ácidos nucleicos de folhas de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.; cultivar Carioca), cultivados em solução nutritiva completa e deficiente em potássio e em folhas que absorveram as aminas putrescina e espermidina.....	18
4.2.1.6. Incorporação de leucina- C^{14} nas proteínas de folhas de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.; cultivar Carioca) que absorveram Actinomicina D...	19
4.2.1.7. Efeito da deficiência de potássio no teor de aminoácidos livres.....	19
4.2.1.7.1. Extração dos aminoácidos livres.....	20
4.2.1.7.2. Análise quantitativa dos aminoácidos.....	20
4.2.2. Métodos de determinação e síntese.....	21
4.2.2.1. Síntese e purificação de N-carbamilputrescina (SMITH e GARRAWAY, 1964).	21
4.2.2.2. Determinação de putrescina, espermina e espermidina.....	21

	Página
4.2.2.3. Determinação dos teores de proteína...	23
4.2.2.4. Determinação da radioatividade nas proteínas.....	24
4.2.2.5. Extração dos ácidos nucleicos.....	25
4.2.2.6. Determinação dos ácidos nucleicos.....	26
4.2.2.7. Determinação da radioatividade nos áci- dos nucleicos.....	27
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Efeito da deficiência dos macronutrientes no teor de putrescina, espermidina e espermina em folhas de fei- joeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.; cultivar Carioca).....	28
5.2. Possíveis precursores de putrescina em feijoeiro.....	30
5.3. Efeito fisiológico das poliaminas nos processos de biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos.....	32
 6. CONCLUSÕES	36
 7. SUMMARY	38
 8. LITERATURA CITADA	41

1. RESUMO

O presente trabalho objetivou buscar algumas informações sobre o efeito fisiológico causado pelo acúmulo de poliaminas em plantas deficientes em potássio no tocante à síntese de proteínas e ácidos nucleicos.

Plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) foram cultivadas em soluções nutritivas deficientes em macronutrientes e analisadas quanto ao teor das poliaminas espermina, espermidina e putrescina, quando os sintomas da respectiva deficiência já eram evidentes.

Nas plantas do tratamento completo e deficiente em potássio o teor dessas poliaminas foram analisadas periodicamente durante todo o ciclo de desenvolvimento.

Com a finalidade de verificar os possíveis precursores na formação dessas poliaminas em feijoeiro, folhas destacadas dessa planta foram colocadas a absorver os

aminoácidos arginina, citrulina, lisina, ornitina e as aminas agmatina e N-carbamilputrescina e também água destilada (controle). Após 24 horas de metabolização foram analisados quanto aos teores de putrescina, espermina e espermidina.

Também o efeito fisiológico dessas aminas no processo de biossíntese de proteína e ácidos nucleicos foi verificado e para tanto, folhas destacadas de feijoeiro provenientes do tratamento completo e deficiente em potássio foram colocadas a absorver leucina- C^{14} . Uma parte das folhas de plantas provenientes do tratamento completo, após a absorção de leucina- C^{14} , absorveu também putrescina e espermidina. Após 24 horas de metabolização, foram analisadas quanto ao teor de proteína e quanto à radioatividade incorporada.

Ensaio semelhante foi realizado para verificar o efeito da paralização da síntese de proteína nessas poliaminas. Folhas destacadas de feijoeiro cultivado em solução nutritiva completa foram colocados a absorver diferentes doses de Actinomicina-D e após um período de metabolização foram analisadas quanto ao teor de proteína e as poliaminas putrescina, espermina e espermidina.

Também as plantas cultivadas em solução nutritiva completa e deficiente em potássio, foram analisadas quanto ao teor de aminoácidos livres.

Pelos dados obtidos, foi concluído que na deficiência de magnésio e especialmente potássio, resulta em acúmulo de putrescina. Tal diamina tem como principal precursor o aminoácido arginina, o qual se apresenta em teor bastante elevado por ocasião da deficiência de potássio. A via metabólica preferencial parece ser por intermédio da descarboxilação de arginina originando agmatina e posteriormente N-carbamilputrescina como precursor imediato.

O elevado teor de arginina resultante da interrupção na síntese de proteína parece ser o responsável pelo acúmulo de putrescina. Resulta, pois, um aumento na relação molar putrescina/espermidina a qual bloqueia a síntese dos ácidos nucleicos afetando ainda mais a síntese de proteína.

Esses resultados vêm reforçar a suposição de que as poliaminas exibem uma atividade fisiológica marcante, sendo responsáveis pelo menos em parte, pela redução no crescimento das plantas em condições de deficiência em potássio.

2. INTRODUÇÃO

A importância do potássio para o desenvolvimento e produção das plantas tem sido evidenciado por inúmeros autores, entretanto, poucos são aqueles que demonstram as implicações desse íonio, a nível metabólico.

Com a descoberta feita por RICHARDS e COLEMAN (1952) que as plantas de cevada, acumulavam a diamina putrescina quando crescidas em deficiência de potássio intensificou-se o desenvolvimento dos estudos sobre as vias metabólicas em que tal elemento podia estar diretamente envolvido.

Na deficiência de potássio algumas enzimas da glicólise, como por exemplo a quinase pirúvica, tem sua atividade diminuída, havendo acúmulo de carboidratos solúveis. Também o teor de amido sofre alteração, diminuindo na deficiência desse íonio, pois o potássio está implicado no suprimento de energia através da fosforilação oxidativa, fotofosforilação

e síntese de adenina (EVANS e SORGER, 1966).

Também o metabolismo nitrogenado é alterado na deficiência de potássio. Ocorre acúmulo de aminoácidos, amidas e outros compostos nitrogenados solúveis e diminuição do teor proteína (NITSOS e EVANS, 1966).

Modificações na qualidade e teor de compostos fenólicos foram encontradas em folhas de feijoeiro quando cultivados em solução nutritiva completa e deficiência em potássio (ZAGO e AMORIM, 1977).

KASTORI e GRUJIC (1975) encontraram decréscimo significativo no conteúdo de ácidos nucleicos quando plântulas de milho foram crescidas em deficiência de potássio. A adição de potássio no meio restaurou o conteúdo dessas macromoléculas, sendo que o ácido ribonucleico foi mais facilmente restaurado que o desoxiribonucleico.

O aumento no conteúdo de putrescina tem sido explicado por uma desordem no metabolismo nitrogenado alterando o equilíbrio catiônico-aniônico resultante de um aumento de acidez, com aumento da formação de enzimas que catalizam a síntese de aminas básicas para restabelecer o pH a um valor adequado (COLEMAN e RICHARDS, 1956).

Putrescina também se acumula na deficiência de magnésio em diversas plantas. Sendo tanto o Mg como o K necessários à síntese proteica acredita-se que o acúmulo de pu-

treoscina seja atribuído a um efeito de massa provocado pelo alto teor de aminoácidos não utilizados na biossíntese de proteínas (BASSO, 1974).

* Por outro lado, putrescina é precursora imediata das poliaminas espermina e espermidina, amins essas de grande importância fisiológica (COHEN, 1971). Inúmeros trabalhos têm mostrado existir uma relação íntima entre essas amins e o metabolismo de proteínas e dos ácidos nucleicos (STEVENS, 1970; BYUS e HERBEST, 1976; CALDARERA *et alii*, 1975; RAMAKRISHNA e ADIGA, 1975).

O presente trabalho objetiva buscar algumas informações sobre o efeito fisiológico causado pelo acúmulo de poliaminas em plantas deficientes em potássio no tocante à síntese de proteínas e ácidos nucleicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A presença da diamina putrescina e das poliaminas espermina e espermidina tem sido constatada em microrganismos (DUBIN e ROSENTHAL, 1960; GUIRARD e SNELL, 1964; RAINA e COHEN, 1966; RAINA *et alii*, 1967; WITKIN e ROSENBERG, 1970), animais e insetos (DION e HERBET, 1970; SHIMIZU *et alii*, 1965) e vegetais (HERBEST e SNELL, 1948, 1949; SMITH, 1970a, 1970b; SMITH, 1975).

Com respeito às plantas, alguns trabalhos têm sido feitos procurando relacionar nutrição mineral e o metabolismo dessas aminas. Destaque tem sido dado ao acúmulo da diamina putrescina sob condições de extrema deficiência de potássio (RICHARDS e COLEMAN, 1952; COLEMAN e RICHARDS, 1956; SMITH, 1967; CROCOMO *et alii*, 1974; RUDULIER e GOAS, 1976).

O caminho biossintético para putrescina foi estudado em algumas plantas; enquanto que o aminoácido argini-

na constitui o precursor de putrescina em cevada (SMITH e RICHARDS, 1962) e cana-de-açúcar (MARETZKI *et alii*, 1969), citrulina foi preferencialmente transformada na diamina em plantas de gergelim (CROCOMO *et alii*, 1970; BASSO, 1974).

Em contraste com a via metabólica em microorganismos, na qual agmatina é hidrolisada diretamente para 1,4-diaminobutano (putrescina) por uma ureohidrolase, em plantas, a iminohidrolase de agmatina hidrolisa agmatina a NH_3 e N-carbamilputrescina (N-carbamil-1,4-diaminobutano) (SMITH e GARRAWAY, 1964; SMITH, 1969a).

A descarboxilase de arginina, transformando tal aminoácido em agmatina, está presente em folhas de cevada (SMITH, 1963), enquanto que a descarboxilase de ornitina parece não existir nesta planta (BASSO e SMITH, 1974) e nem em gergelim (BASSO, 1974).

SMITH (1965) relata que a N-carbamil-putrescina-amido-hidrolase, cuja atividade era maior em plantas deficientes em potássio do que naquelas que cresciam com teor normal do elemento.

MARETZKI *et alii* (1969) observaram a formação de N-carbamil putrescina- C^{14} a partir de arginina, em cultura de células de cana-de-açúcar crescidas em meio contendo arginina- C^{14} . Descobriram ainda que esta amina era mais rápida

mente formada a partir de citrulina. Entretanto, não foi detectada a amina agmatina e os autores aventaram a hipótese de que N-carbamil-putrescina pudesse ter sido formada a partir da descarboxilação de citrulina.

CROCOMO *et alii* (1970) relataram o aparecimento de N-carbamil-putrescina em plantas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) quando crescidas em solução nutritiva deficiente em potássio. Este foi o primeiro relato de ocorrência dessa amina em plantas superiores sem o uso de precursor bioquímico. Demonstraram ainda os autores a existência de uma descarboxilase, até então desconhecida, que transformava citrulina em N-carbamil-putrescina. Tal enzima era particularmente ativa em folhas de plantas deficientes em potássio.

As poliaminas espermina e espermidina são formadas a partir de putrescina, tanto em microrganismo (TABOR *et alii*, 1958) como em animais (PEGG e ASHMAN, 1969). Também em plantas de cevada, foi verificado haver incorporação de putrescina-C¹⁴ em espermina e espermidina (SMITH, 1970b; BASSO e SMITH, 1974).

BASSO e SMITH (1974) notaram que nas deficiências de potássio ou magnésio havia diminuição nos teores de espermina e espermidina em fava e cevada. No mesmo trabalho foi relatada uma menor incorporação de putrescina-C¹⁴ em espermina tanto em deficiência de potássio como em magnésio.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada à possibilidade que as poliaminas espermina e espermidina desempenhem um significativo papel na estrutura, função e biossíntese de macromoléculas como os ácidos nucleicos e proteínas nos sistemas biológicos, especialmente durante o crescimento e desenvolvimento (COHEN, 1971).

Em virtude de seu caráter básico as poliaminas se aderem fortemente às cadeias de DNA e RNA por meio de ligações eletrostáticas envolvendo o grupamento fosfórico do ácido nucleico e o grupamento amino ou imino das poliaminas. O exame ao raio-X tem sugerido diversas configurações possíveis para o complexo formado entre espermidina e a molécula de DNA. Desse modo as poliaminas estabilizam a dupla hélice do DNA bem como permitem que uma cadeia única de RNA se dobre em uma configuração mais compacta tornando-a menos susceptível à ação da ribonuclease (STEVENS, 1970; COHEN, 1971).

As poliaminas apresentam igualmente um efeito estimulante sobre a RNA polimerase. Desde que a cadeia dupla do DNA provavelmente se separe para a transcrição, a habilidade das poliaminas em restabelecer a forma de filamento duplo pode fornecer uma explicação para esse estímulo. Por outro lado, alterações nas estruturas secundárias do RNA, provocadas pelas poliaminas, facilitando a remoção do RNA recém-sintetizado da molécula do DNA também constitui em outra

possível explicação dos efeitos fisiológicos provocados pelas poliaminas (STEVENS, 1970).

Igualmente as poliaminas apresentam um efeito marcante no processo da síntese proteica em toda a sua extensão: elas são bastante efetivas em provocar a agregação das subunidades ribossômicas (30S ou 50S) para formar a partícula ativa (70S ou 80S) na síntese de proteínas bem como estabelecer a ligação entre o amino-ácil tRNA e o ribossoma (STEVENS, 1970; COHEN, 1971).

BARBIROLI *et alii* (1971) relatam que espermina e espermidina aceleram a síntese de RNA em embrião de galinha.

BYUS e HERBEST (1976) estudando o efeito de poliaminas na síntese de ácido ribonucleico em larvas de *Drosophila melanogaster* verificaram que espermidina foi específica entre várias poliaminas testadas, visto que somente espermidina e não putrescina, espermina, cadaverina ou etilenodiamina, aumentou a incorporação de H³-uridina em RNA.

BAGNI (1970) mostrou que durante o crescimento de plantas de *Phaseolus vulgaris* os conteúdos de espermidina e espermina decresceram nos cotilédones e simultaneamente aumentaram nas raízes em associação com semelhante alteração nos teores de RNA e proteína.

No crescimento de plântulas de ervilha-de-cheiro (*Lathyrus sativus* L.), os níveis de DNA e RNA e proteína marcadamente decresceram nos cotilédones e progressivamente aumentaram no caulículo. Nos cotilédones o conteúdo de espermina e espermidina foram substancialmente reduzidos, enquanto que os de agmatina e putrescina foram aumentados. Em contraste, o caulículo acumulou progressivamente, grandes quantidades de agmatina, homoagmatina, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina em paralelo com semelhantes alterações nos conteúdos de DNA, RNA e proteína (RAMAKRISHNA e ADIGA, 1975).

VAREBEKE, 1975, mostra a habilidade de putrescina, espermina e espermidina em substituir íons de Mg^{2+} na reação de transferência pelo RNA de *Phaseolus vulgaris* L., para 17 aminoácidos.

O íon potássio afeta tanto a produção dessas poliaminas em plantas (RICHARDS e COLEMAN, 1952; BASSO e SMITH, 1974) quanto a produção dos ácidos nucleicos (KASTORI e GRUJIC, 1975).

HIATT, 1965, reportou que a máxima atividade de tetraformilhidrofolato sintetase de espinafre foi obtida em alta concentração de potássio e especulou que em deficiência de potássio, a síntese de ácidos nucleicos pode ser afetada devido a um bloqueio na síntese de purina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

Sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) foram semeadas em vermiculita esterilizada e a germinação foi processada a 30°C.

Sete dias após a semeadura as plântulas foram transferidas para bandeja de polietileno, contendo solução nutritiva completa onde permaneceram mais quatro dias. Após esse tempo as plântulas foram divididas em vários lotes, continuando o crescimento em soluções nutritivas completas e deficientes, conforme o Quadro 1. As soluções eram trocadas semanalmente.

Todas as drogas químicas utilizadas, como os sais minerais das soluções nutritivas e reagentes para análises, tinham especificações de pureza "p.a.". Os aminoácidos

e aminas empregadas foram obtidas da Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland, USA), com exceção da amina N-Carbamil-putrescina, que foi sintetizada e purificada segundo a técnica de SMITH e GARRAWAY (1964).

Quadro 1 - Composição das soluções nutritivas (SARRUGE, 1975)

Solução	Estoque	ml/l de solução nutritiva						
		C	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-S
$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{M}$		1	1	-	-	1	1	1
KNO_3M		5	-	5	-	5	3	3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{M}$		5	-	5	5	-	4	4
MgSO_4		2	2	2	2	2	-	-
KCl		-	5	1	-	-	2	2
CaCl_2		-	5	-	-	-	1	1
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$		-	-	-	1	-	-	-
NH_4NO_3		-	-	-	2	5	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		-	-	-	-	-	-	2
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$		-	-	-	-	-	-	2
Microelementos		1	1	1	1	1	1	1
Fe EDTA		1	1	1	1	1	1	1

4.2. Métodos

4.2.1. Ensaíos

4.2.1.1. Efeito da deficiência dos macronutrientes nos teores das aminas putrescina, espermina e espermidina em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.; cultivar Carioca)

As plantas foram submetidas à deficiência dos macronutrientes e à influência de cada um deles sobre o teor das aminas foi verificada. As folhas das plantas foram coletadas para análise quando os sintomas de carência de elemento em questão eram constatados. Com exceção das plantas submetidas a deficiência de enxofre, todas as outras cultivadas em soluções deficientes apresentaram sintomas visuais de carência.

4.2.1.2. Efeito da deficiência de potássio nos teores das aminas putrescina, espermina e espermidina durante o desenvolvimento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.; cultivar Carioca).

As folhas das plantas submetidas ao tratamento completo e deficiente em potássio foram colhidas em vários períodos durante o desenvolvimento das plantas e analisadas quanto ao teor das aminas em questão.

4.2.1.3. Efeito da absorção de aminoácidos e aminas por folhas destacadas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.; cultivar Carioca), sobre o teor das aminas putrescina, espermina e espermidina

Tal ensaio foi conduzido com a finalidade de se estabelecer os precursores na formação de putrescina em feijoeiro. Para tal, folhas trifoliadas de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.; cultivar Carioca), com um mes de idade, cultivadas em solução nutritiva completa, foram cortadas da planta (sob água para não entrar ar nos vasos condutores) e colocadas para absorver 1 ml de solução 25 mM das seguintes substâncias: arginina, citrulina, agmatina, lisina, N-carbami] putrescina, ornitina e água destilada (controle).

A seguir as folhas foram deixadas com o pecíolo mergulhado em água durante 24 horas em casa de vegetação, procedendo-se então a colheita das mesmas que foram submetidas a análise das aminas putrescina, espermina e espermidina.

4.2.1.4. Incorporação de leucina- C^{14} em proteínas de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.; cultivar Carioca) cultivados em solução nutritiva completa e deficiente em potássio e em folhas normais que absorveram as aminas putrescina e espermidina

Com o intuito de estudar os efeitos da deficiência de potássio, bem como de uma alteração artificial nos

teores de poliaminas com respeito à biossíntese de proteínas, o seguinte experimento foi conduzido: folhas trifoliadas de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) cultivadas em solução nutritiva completa e deficiente em potássio foram cortadas sob água, e colocadas a absorver 2 μCi de leucina- C^{14} (26,4 mCi/mM).

Uma parte das plantas provenientes do tratamento completo, além de absorver primeiramente 2 μCi de leucina- C^{14} , foi colocada a absorver também as aminas putrescina e espermidina, cujas doses foram calculadas a partir do peso da folha trifoliada e idade da mesma (1 mes após transplante para solução nutritiva) procurando-se fornecer a essas folhas o mesmo teor dessas aminas encontradas em plantas de mesma idade cultivadas em solução nutritiva deficiente em potássio (2,2 μmoles de putrescina e 0,5 μmoles de espermidina por g de matéria fresca).

Após 24 horas de metabolização, essas folhas foram submetidas à análise determinando-se os teores de proteínas bem como a radioatividade incorporada.

4.2.1.5. Incorporação de $P^{32}(Na_2H^{32}PO_4)$ nos ácidos nucleicos de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca), cultivados em solução nutritiva completa e deficiente em potássio e em folhas que absorveram as aminas putrescina e espermidina

Igualmente, procurando-se observar tanto o efeito da deficiência de potássio, bem como de um teor de poliaminas artificialmente alterado na biossíntese de ácidos nucleicos, delineou-se o presente ensaio.

Folhas trifoliadas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca), cultivadas em solução nutritiva completa e deficiente em potássio, foram cortadas sob água e colocadas a absorver cada uma, a dose de 10 μCi de $Na_2H^{32}PO_4$, (livre de carregador) contida num volume de 0,1 ml.

Uma parte das plantas provenientes do tratamento completo, além de absorver 10 μCi de $Na_2H^{32}PO_4$, foi colocada a absorver também as aminas putrescina (2,2 μM de putrescina por g/mat. verde) e espermidina (0,5 μM de espermidina por g/mat. verde), cujas doses foram calculadas a partir do peso da folha trifoliada e idade da mesma, procurando-se aplicar a essas folhas, o mesmo teor dessas aminas encontrado em plantas de mesma idade (1 mes após o transplante para a solução nutritiva), cultivadas em solução nutritiva deficiente em potássio.

Após 24 horas de metabolização, essas folhas tiveram o teor de ácidos nucleicos determinados, e feita também a contagem da radioatividade de P^{32} incorporada nos ácidos nucleicos, pelo efeito de CERENKOV.

4.2.1.6. *Incorporação de leucina- C^{14} nas proteínas de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) que absorveram Actinomicina D*

Pretendendo-se verificar o efeito da interrupção da biossíntese de proteínas sobre os conteúdos das poliaminas, folhas trifoliadas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca), foram cortadas sob água, e colocadas a absorver 2 μ Ci de leucina- C^{14} (26,4 mCi/mM) e logo após 0,5 ml de Actinomicina-D nas doses de 20 e 40 μ g cada tratamento. Após 24 horas de metabolização essas folhas foram analisadas quanto aos teores de proteínas e de poliaminas. Foi feita também a contagem da radioatividade de leucina- C^{14} incorporada nessas proteínas, procurando-se aquilatar a eficiência da Actinomicina-D em paralisar a síntese proteica.

4.2.1.7. *Efeito da deficiência de potássio no teor de aminoácidos livres*

Folhas de plantas crescidas em solução nutritiva completa e deficiente em potássio foram analisadas quanto ao teor de aminoácidos livres.

4.2.1.7.1. *Extração dos aminoácidos livres*

Cinco gramas de folhas de cada amostra foram trituradas em 50 ml de etanol 80% a quente, em almofariz. Os pigmentos foram removidos com tetracloreto de carbono em funil de separação. O extrato livre de pigmentos foi passado por uma coluna Dowex-50-W-X-8(H⁺) (100-200 mesh) de 5 cm de altura. A seguir, 50 ml de etanol 80% foram passados pela mesma coluna e depois mais 50 ml de água destilada.

Para extrair os aminoácidos da coluna foram passados pela mesma, mais 30 ml de NH₄OH 0,4N.

As frações coletadas, foram evaporadas até resíduo seco em evaporador a vácuo a 35°C.

Os aminoácidos foram retomados em 2 ml de tampão citrato de sódio pH 2,2.

4.2.1.7.2. *Análise quantitativa dos aminoácidos*

A análise quantitativa dos aminoácidos foi feita em analisador automático de aminoácidos, Beckman, modelo 120 C.

4.2.2. Métodos de determinação e síntese

4.2.2.1. Síntese e purificação de N-carbamilputrescina (SMITH e GARRAWAY, 1964)

Putrescina dihidroclorídrica (3,2g) foi dissolvida em água (5,0 ml) e neutralizada com hidróxido de potássio 5N (4,0 ml). Cianato de potássio (2,0 g, excesso) em água (5,0 ml), foi adicionado e a solução aquecida em banho de água fervente. Após meia hora foi colocada uma pequena quantidade de carvão ativado para remover pigmentos e o aquecimento foi continuado por mais quinze minutos. A solução foi filtrada e deixada em repouso por uma noite. Os cristais (A) formados, foram filtrados, lavados com água e secados. O filtrado foi evaporado e o resíduo (B) deixado por 18 horas em dessecador, sobre cloreto de cálcio.

O produto (A) corresponde a N-N'-dicarbamilputrescina.

O resíduo (B) foi extraído com álcool absoluto (50 ml), a solução filtrada e evaporada até secar completamente. O resíduo foi redissolvido em álcool absoluto (25 ml), filtrado, sendo borbulhado vagarosamente dentro dessa solução hidrogênio clorídrico, sob banho de gelo. O precipitado branco produzido, foi filtrado, secado e o produto recristalizado com etanol 95% resultando em cristais incolores (N-Carbamil putres

cina). Esse produto foi cromatografado e foi detectada uma pequena contaminação com N-N'-dicarbamilputrescina.

A purificação foi feita dissolvendo o produto em água (2 ml), sendo essa solução aplicada em uma banda horizontal perto da base de cinco quadrados de papel cromatográfico Whatman nº 3 (20 x 20 cm). Os cromatogramas foram corridos com butanol, ácido acético, água (4:1:5) (v:v:v), sendo utilizada a parte superior. Após 4 horas, quando a frente do solvente atingiu o topo do papel, o cromatograma foi removido e seco. A N-carbamilputrescina foi localizada com reagente de p-dimetilamino benzaldeído, sobre tiras cortadas dos cromatogramas. As regiões dos cromatogramas contendo N-Carbamil putrescina foram repicadas e eluídas com água, usando três porções de 50 ml cada.

As soluções foram combinadas e a água removida usando um evaporador rotatório.

O resíduo foi colocado sobre cloreto de cálcio em dessecador a vácuo por 18 horas e recristalizado com etanol 95% no qual foi adicionada 1 gota de HCl concentrado. Os cristais obtidos corresponderam a N-Carbamil putrescina ($C_5H_{13}O_1N_3.HCl$).

4.2.2.2. Determinação de putrescina, espermina e espermidina

O método empregado consistia em uma adapta-

ção feita por SMITH (1973). O material vegetal foi extraído com ácido tricloroacético a 5% (8 ml/g de matéria fresca) pela maceração em homogeneizador Virtis durante um minuto. Após centrifugação a 5.600 x g durante 5 minutos o sobrenadante foi agitado durante uma hora em presença de 1 g de resina DOWEX 50 W x 8 (H⁺), 20 - 50 mesh. A seguir a resina foi lavada com 20 ml de água destilada, sendo as aminas (putrescina, espermina e espermidina) extraídas pela agitação da resina com 10 ml de ácido clorídrico 12N durante 2 horas. A fração contendo as aminas foi evaporada até resíduo seco, a 60°C sob vácuo e dissolvida em 1 ml de HCl 0,1 N. Desta solução alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para tubos de ensaio com tampa esmerilhada, de 5 ml de capacidade, juntamente com 50 mg de NaHCO₃ e 0,2 ml de solução de cloreto de 1-dimetilaminonaf taleno-5-sulfonila (300 mg em 10 ml de acetona). A reação se processou por 16 horas à temperatura ambiente quando então 15 mg de prolina dissolvidos em 0,1 ml de água destilada foram adicionados. Após 60 minutos os derivados fluorescentes das aminas eram extraídos em 2,5 ml de tolueno por agitação mecânica durante 15 segundos. Os tubos eram então centrifugados e alíquotas de 10 µl da camada tolueno eram submetidos à cromatografia em camada delgada.

Foram empregadas placas de 20x20 cm com camada de gel de sílica (250 µ de espessura) que haviam sido ativadas a 100°C por 2 horas. Como solventes cromatográficos

foram empregados as misturas ciclohexano : acetato de etila (3:2) para a separação de putrescina, espermina e espermidina.

Logo após a separação cromatográfica que era acompanhada mediante iluminação de placa com luz ultravioleta, as mesmas eram retiradas da câmara e pulverizadas com 25 ml de uma mistura de trietanolamina : isopropanol (1:4). Após evaporação do isopropanol as placas eram mantidas sob vácuo em presença de gel de sílica como desidratante durante 20 horas.

A seguir as placas eram submetidas à análise usando-se um densitômetro Vitraton TLD 100. Media-se assim a intensidade de fluorescência a 507 nm de cada derivado de amina pela ativação dos compostos com luz de 365 nm. Como padrões, 0,1 μ moles de cada amina eram submetidos à reação para a formação de derivados fluorescentes, e igualmente submetidos à cromatografia em camada delgada. Para se contornar o problema da desuniformidade das placas, juntamente com as amostras eram cromatografados os padrões.

4.2.2.3. Determinação dos teores de proteína

As folhas colhidas foram extraídas com solução, de NaOH 0,1N (10 ml/g mat. verde) pela trituração em almofariz e o homogeneizado obtido foi mantido em repouso uma noite. Depois de centrifugado a 5.600 x g durante 10 min

tos, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético 20% (1 ml para 3 ml de solução original). Separadas por centrifugação, as proteínas foram tratadas com acetona gelada, para retirada de pigmentos. Novamente, foi feita a centrifugação e o precipitado retomado em NaOH 0,1N (10 ml/g de peso verde original) e determinadas segundo LOWRY *et alii* (1951) obtendo-se a reta padrão com Albumina de Soro Bovina (BSA, da Sigma Chemical Company).

4.2.2.4. Determinação da radioatividade nas proteínas

As proteínas depois de extraídas, precipitadas e novamente solubilizadas em NaOH 0,1N, como descrito no item 4.2.2.3. foram novamente tratadas com ácido tricloroacético a 20% (1 ml/3 ml de solução original). A mistura foi aquecida em banho-maria a 100°C durante 10 minutos e filtrada em filtro "milipore" (Bedford, USA) o qual era introduzido dentro de um frasco cintilador contendo 10 ml de solução cintiladora (40 mg de PPO + 0,5 mg POPOP e 10 ml de Tolueno).

Para se contornar o problema da auto-absorção devido a camada de proteína depositada no filtro, fazia-se a precipitação de uma mesma quantidade de proteína para todas as amostras. Isto era possível conhecendo-se previamente o teor de proteína na solução e tomando-se volumes variáveis de cada amostra, mas que contivessem a mesma quantidade de proteínas.

4.2.2.5. Extração dos ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram extraídos segundo o método de BROUGHTON (1970).

Folhas foram colhidas e homogeneizadas com metanol a 0°C (1 g de folha para 10 ml de metanol). O homogeneizado foi transferido para tubos de centrifuga e centrifugado a 5.000 g a 2°C durante 10 minutos.

O precipitado foi ressuspendido novamente em 10 ml de metanol a 0°C e centrifugado durante 10 minutos.

O precipitado dessa centrifugação foi ressuspendido e centrifugado duas vezes com 10 ml de metanol contendo 0,05M de ácido fórmico. Essa fase reduz ao máximo a atividade das nucleases e remove a maioria dos pigmentos e também facilita a remoção dos componentes fosforados dos materiais não nucleicos.

Os homogeneizados resultantes das lavagens com metanol, foram extraídos 3 vezes com porções de 10 ml de ácido perclórico 0,2N a 2°C. Essa operação é necessária para remover o fósforo inorgânico.

O resíduo foi então, extraído com etanol saturado com acetato de sódio, imediatamente após a última lavagem com ácido, para a remoção de lipídeos.

Para assegurar a completa remoção de lipídeos, esta etapa foi seguida por duas extrações com etanol-clorofórmio (3:1), uma vez com etanol-éter (3:1) e finalmente com éter.

O resíduo proveniente da extração com éter foi seco pela evaporação do éter e armazenado a -20°C .

4.2.2.6. *Determinação dos ácidos nucleicos*

Primeiramente foi feita a separação do DNA e RNA pela hidrólise do RNA segundo BROUGHTON (1970).

Após a pesagem do resíduo seco obtido no item 4.2.2.5., foi adicionado a este, 15 ml de KOH 0,3N e deixado hidrolizar a 37°C durante 3 horas. Em seguida foi feita a acidificação com HClO_4 0,2N a 2°C . Esse material foi centrifugado a 2°C e o resíduo lavado duas vezes com HClO_4 0,2N a 2°C . Os sobrenadantes foram juntados e os volumes foram medidos (fração de RNA).

Em seguida os precipitados obtidos foram hidrolisados com HClO_4 0,2N a 90°C durante 15 minutos. Esse material foi centrifugado e o precipitado foi lavado duas vezes com HClO_4 0,2N. Os sobrenadantes foram juntados e os volumes foram medidos (fração de DNA).

O teor dos ácidos nucleicos foram medidos segundo o método de SPIRIN, 1958, que consiste em determinar a

absorbância dos sobrenadantes obtidos a 270 e a 290 nm e dividir a diferença entre as absorbâncias pelo fator 0,19, sendo obtidos os valores em microgramas de fósforo contido nos ácidos nucleicos, por ml de solução.

Os valores expressos em mg de DNA ou RNA, foram obtidos multiplicando os resultados acima por 10,1 e 10,5, respectivamente.

4.2:2:7. Determinação da radioatividade nos ácidos nucleicos

As frações de RNA e DNA obtida no item 4.2.2.6, tiveram sua radioatividade contada pelo efeito CERENKOV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito da deficiência dos macronutrientes no teor de putrescina, espermidina e espermina em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca)

O efeito das deficiências dos macronutrientes sobre os teores de putrescina, espermidina e espermina, foi estudado em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) e os dados estão dispostos na Tabela 1.

Os maiores teores de espermidina encontrados foram nas folhas das plantas deficientes em potássio e magnésio, enquanto o teor de espermina aumentou significativamente nas deficiências de nitrogênio e cálcio.

O teor de putrescina foi muito mais elevado na deficiência de potássio, sendo igualmente afetado pela deficiência de magnésio.

Todos os tratamentos apresentaram sintomas visuais característicos das respectivas deficiências, coincidindo com aqueles descritos em feijoeiro por COBRA NETO *et alii* (1971), com exceção do tratamento deficiente em enxofre, o qual no final do ciclo, tinha um aspecto semelhante ao controle.

Durante a evolução da deficiência de potássio o teor de putrescina se eleva abruptamente após o 20º dia de deficiência (Gráfico 1), coincidindo com um incremento nos teores de espermidina (Gráfico 2). Quanto à poliamina espermina, esta não exibiu uma alteração diferente do controle (Gráfico 3).

O acúmulo de putrescina em plantas em condições de deficiência de potássio está fartamente documentado na literatura (SMITH e RICHARDS, 1962; SINCLAIR, 1967; YOSHIDA, 1969; CROCOMO *et alii*, 1970; BASSO e SMITH, 1974). Dúbios, entretanto, se apresentam os mecanismos propostos para explicar o acúmulo de tal amina nesta condição de deficiência. Assim, embora o mecanismo baseado no desequilíbrio iônico, proposto por COLEMAN e RICHARDS (1956) possa explicar razoavelmente o acúmulo de putrescina em plantas deficientes em potássio, ocorre certa dificuldade em se conceber o acúmulo dessa diamina em condições de deficiência de magnésio. Isto porque a deficiência de magnésio não provoca diminuição no teor de potássio e ainda pelo fato do magnésio representar uma pequena proporção do total de cátions no suco celular (SMITH, 1973), a despeito

do elevado teor de putrescina nestas condições (BASSO e SMITH, 1974).

BASSO (1973) e BASSO (1974) propuseram um mecanismo segundo o qual putrescina tem seu teor aumentado, em condições de deficiências de potássio e magnésio, devido a uma diminuição na síntese proteica.

Tanto o potássio como o magnésio são necessários no processo de biossíntese de proteínas (EVANS e SORGER 1966; WEBSTER, 1961; BOULTER, 1970) e nas deficiências dos mesmos ocorre o acúmulo dos aminoácidos não incorporados nos peptídeos, acúmulo esse que por efeito de massa induz a formação das descarboxilases resultando num incremento no teor de putrescina (BASSO, 1973). No presente trabalho foi observado um acúmulo de diversos aminoácidos livres em folhas deficientes em potássio (Tabela 6).

Tanto pela Tabela 1, como pelas Gráficos 1 e 2, podemos observar um paralelismo nos teores de putrescina e espermidina. Como putrescina é precursor imediato da poliamina espermidina (TABOR *et alii*, 1958) um acúmulo daquele favorece a formação deste último.

5.2. Possíveis precursores de putrescina em feijoeiro

* Na Tabela 2 se encontram os resultados do efeito da absorção de aminoácidos e amins por folhas de fei-

joeiro nos teores de putrescina, espermidina e espermina.

Entre os compostos absorvidos pelas folhas, arginina, agmatina e N-Carbamilputrescina foram os que mais elevaram os teores das amins estudadas.

Esses dados sugerem que o precursor de putrescina na planta estudada seja arginina e o caminho biossintético para a produção dessa amina seria por intermédio de agmatina, N-carbamilputrescina e depois putrescina. Os resultados são semelhantes aos de MARETSKI *et alii* (1969), SMITH (1963) e SMITH (1970b), que identificaram arginina como precursor para a biossíntese de putrescina em plantas.

A descarboxilase de arginina em plantas transforma arginina para a forma de agmatina e CO_2 (SMITH, 1963). A iminohidrolase de agmatina, hidrolisa agmatina a N-carbamilputrescina e NH_3 (SMITH e GARRAWAY, 1964; SMITH, 1969a). N-carbamilputrescina é transformada em putrescina através da enzima N-carbamilamidohidrolase, cuja atividade é maior em plantas deficientes em potássio do que naquelas crescidas com o teor normal do elemento (SMITH, 1965; SMITH, 1967). Putrescina dará origem às poliaminas espermidina e espermina (TABOR *et alii*, 1958; COHEN, 1971; SMITH, 1970).

Os dados ainda mostram que quando as folhas absorveram ornitina e especialmente citrulina, houve também

uma elevação nos teores de putrescina, sugerindo então que tais aminoácidos foram transformados em arginina, mediante o ciclo ornitina-uréia, como já foi observado em gergelim (BAŞSO, 1974). Por outro lado, não está descartada a possibilidade de citrulina sofrer descarboxilação, originando a amina - N-carbamilputrescina. Entretanto, em feijoeiro, o caminho biossintético preferencial para a síntese das poliaminas parece ser a partir do aminoácido arginina, o qual tem o seu teor aumentado de 30 vezes por ocasião da deficiência de potássio (Tabela 6), colaborando sobremaneira para o acúmulo de putrescina.

5.3. Efeito fisiológico das poliaminas nos processos de biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos.

Recentemente grande atenção tem sido dada à possibilidade de que as poliaminas desempenhem papel significativo na estrutura, função e biossíntese de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos nos mais diversos sistemas biológicos, especialmente durante o crescimento e desenvolvimento (TABOR e TABOR, 1964; STEVENS, 1970; COHEN, 1971).

Assim, em tecidos animais de crescimento rápido, como embrião de galinha e fígado de rato em regeneração, observa-se um paralelismo entre o acúmulo de espermidina e a síntese de ácidos nucleicos (RAINA e JANNE, 1970; SNYDER e

RUSSEL, 1970). Tal fato igualmente é observado em tecidos vegetais onde foi demonstrado um sincronismo entre as variações nos teores de poliaminas (espermidina e espermina) com as alterações nos conteúdos de DNA, RNA e proteínas durante a germinação e desenvolvimento de plântulas de *Phaseolus* (BAGNI, 1970) e *Lathyrus* (RAMAKRISHINA e ADIGA, 1975).

O efeito prejudicial do elevado teor de putrescina em plantas deficientes em potássio é um fato já comprovado (COLEMAN e RICHARDS, 1956). O caráter competitivo entre putrescina e espermidina já foi observado em *E. coli*. Assim, aumento no teor de putrescina ocorre concomitantemente com paralização na síntese proteica (RUBENSTEIN *et alii*, 1972) bem como anula a ação estimulatória da espermidina na síntese de RNA (INOUE e PARDEE, 1970; RAINA e COHEN, 1966). Nesse contexto, BASSO (1977) observou que o crescimento das diversas partes (raiz, caule, folhas) de plântulas de feijoeiro era tanto mais intenso quanto menor era a relação molar putrescina/espermidina. O mesmo era válido para plantas deficientes em potássio ou magnésio, onde a citada relação resultava aumentada, sendo a síntese proteica e o crescimento bastante diminuídos.

Em consideração a tais evidências, procurou-se, no presente trabalho, verificar algum efeito fisiológico do elevado teor de putrescina em plantas. Assim, quando a relação molar putrescina/espermidina foi artificialmente aumentada, a um valor semelhante aquele observado em plantas defi-

cientes em potássio, constatou-se uma redução na síntese de proteínas (Tabela 3) e de ácidos nucleicos (DNA e RNA) (Tabela 5). Observa-se ainda pelas mesmas tabelas que os teores dessas macromoléculas são diminuídas por ocasião da deficiência de potássio.

Por outro lado, a interrupção da síntese de proteínas, mediante o emprego de Actinomicina D promoveu aumento substancial no conteúdo de putrescina (Tabela 4). Os dados demonstram que a paralização na síntese proteica em extensão semelhante àquela observada em plantas deficientes em potássio (Tabela 3) eleva a relação molar putrescina/espermidina.

Como na deficiência de potássio ocorre diminuição na síntese proteica (Tabela 3) ao mesmo tempo em que o conteúdo de putrescina é elevado, pode-se questionar se seria a ausência do iônio potássio o único e direto responsável pela dificuldade na biossíntese de proteínas.

Pode-se, pois, sugerir que a deficiência de potássio em plantas impeça inicialmente a síntese proteica, uma vez que tal elemento é requerido no processo de ativação dos aminoácidos. Em consequência resultaria um elevado conteúdo de aminoácidos livres, especialmente arginina, o qual resultaria em um incremento no teor de putrescina. A relação molar putrescina/espermidina se elevaria, manifestando uma

ação fisiológica prejudicial, afetando a síntese de ácidos nucleicos posteriormente das proteínas.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitem apresentar as observações e conclusões que se seguem.

As deficiências de magnésio e especialmente potássio resultam em acúmulo de putrescina. Tal diamina é sintetizada a partir do aminoácido arginina, o qual se apresenta em teor bastante elevado por ocasião da deficiência de potássio. A via metabólica preferencial parece ser por intermédio da descarboxilação desse aminoácido originando agmatina e posteriormente N-carbamilputrescina como precursor mais imediato.

Ao que parece o acúmulo de putrescina é consequência do elevado teor de arginina devido a uma interrupção na síntese de proteínas. O consequente aumento na relação molar putrescina/espermidina bloqueia a síntese dos ácidos nucleicos, afetando ainda mais a síntese de proteínas.

Os dados obtidos reforçam a suposição de que as poliaminas exibem uma atividade fisiológica marcante, sendo que tais compostos possam ser responsáveis, pelo menor em parte, pela redução no crescimento das plantas em condições de deficiência de potássio.

7. SUMMARY

The present work has the aim to find out some information about the physiological effects of the increased polyamines content in potassium deficient plants, mainly on protein and nucleic acids biosynthesis.

Phaseolus vulgaris were grown in a green house using nutrient solutions either complete or deficient in macronutrients and the leaves were analysed for the polyamines putrescine, spermine and spermidine, and for the aminoacids.

Some leaves of the normal plants were fed with possible precursors for putrescine synthesis. So, the leaves were allowed to absorb each one of the following amino acids and amines: lysine, arginine, citrulline, ornithine, agmatine and N-carbamylputrescine. After a 24 hours period of metabolization, putrescine, spermine and spermidine were measured.

The physiological effects of such polyamines was tested on protein and nucleic acids biosynthesis, using a radioisotopic method, by counting the radioactivity from leucine- C^{14} and $Na_2H^{32}PO_4$ incorporated into such biopolymers. In this experiment leaves of normal and potassium deficient plants were used, as well as normal leaves which absorbed polyamines (putrescine and spermidine) in order to change artificially the molar ratio putrescine/spermidine to the same value found in potassium deficient leaves.

Another experiment was performed trying to study the effect of protein synthesis interruption on the content of polyamines. For this, different doses of Actinomycin-D were applied to normal leaves and polyamines content were analysed.

Amino acids and polyamines were extracted from the leaves with 80% ethanol or 5% trichloroacetic acid, respectively, and separated on DOWEX-50W-X8 cationic exchange resin. The polyamines were determined fluorimetrically and the amino acids by automated liquid chromatography. Protein and nucleic acids were estimated colorimetrically and its radioactivity measured by Liquid Scintillation counting.

The data shows that magnesium and specially potassium deficiency increase of putrescine content. Such amine is formed mainly from arginine using agmatine and N-carbamyl-putrescine as metabolic intermediates. In potassium deficient

plants the content of free arginine is very high and should be responsible for the high level of putrescine. As a result, there is a increase in the molar ratio putrescine/spermidine, which can disrupt the synthesis of nucleic acids, impairing, one again, the protein synthesis.

The results increase evidences in what the polyamines exhibit a great physiological activity, beeing responsible, at least in part, for the reduced growth of potassium deficient plants.

8. LITERATURA CITADA

- BAGNI, N. 1970. Metabolic Changes of Polyamines during a germination of *Phaseolus vulgaris*. New Phytol. 69:159-164.
- BARBIROLI, B.; A. CORTI e C.M. CALDARERA. 1971. The Pattern of Synthesis of Ribonucleic Acid Species under the Action of Spermine in the Chick Embryo. Biochem. J. 123:123-124.
- BASSO, L.C. 1973. Significado Bioquímico da Deficiência de Potássio na Formação de Aminas em Gergelim (*Sesamum indicum* L.). Tese apresentada a Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu para obtenção do título de Doutor em Ciências. Botucatu - SP - Brasil.
- BASSO, L.C. 1974. Formação de di e poliaminas em plantas deficientes em potássio e magnésio. Dissertação apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP. Brasil.

- BASSO, L.C. e T.A. SMITH. 1974. Effect of mineral Deficiency on Amine Formation in Higher Plants. Phytochemistry, 13: 875-883.
- BASSO, L.C. 1977. Relações do potássio e do nitrogênio em plantas e poliaminas. Apostila do Curso Intensivo de Proteína Vegetal. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba-SP. 26-29.
- BOULTER, D. 1970. Protein Synthesis in Plants. Annual Review of Plant Physiology. 21:93-114.
- BROUGHTON, W.J. 1970. Determination of Total Nucleic Acids in Plant Tissue. Analytical Bioch. 1, 38:291-295.
- BYUS, C.V. e E.J. HERBEST. 1976. The Effect of Polyamines on the Synthesis of Ribonucleic Acid by *Drosophila melanogaster* Larvae. Biochem. J. 154:23-29.
- CALDARERA, C.M.; A. CASTI; C. GUARNIERI e C. MORUZZI. 1975. Regulation of Ribonucleic Acid Synthesis by Polyamines: Reversal by Spermine of Inhibition by methylglyoxal BIS (guanythydrazone) of Ribonucleic Acid Synthesis and Histone Acetylation in Rabbit Heart. Biochem. J. 152(1):91-98.
- COBRA NETTO, A.; W.R. ACCORSI e E. MALAVOLTA. 1971. Estudos sobre a nutrição mineral do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L. var. Roxinho). Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz", vol. XXVIII. Piracicaba- SP - Brasil.

- COHEN, S.S. 1971. Introduction to the Polyamines. Printice Hall Inc., Englewood Cliffs. N.S. 179 pp.
- COLEMAN, R.G. e F.S. RICHARDS. 1956. Physiological Studies in Plant Nutrition. XVIII. Some Aspects of Nitrogen Metabolism in Barley and other Plants in Relation to Potassium Deficiency. Annals of Botany, 20:393-409.
- CROCOMO, O.J.; O.G. BRASIL e L.C. BASSO. 1970. Formation of N-carbamylputrescine from Citruline in Sesamum. Phytochemistry, 9:1487-1489.
- CROCOMO, O.J.; M.A. CATTINI e E.A. ZAGO. 1974. Acúmulo de aminos e aminoácidos em relação ao nível de potássio em folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Arquivos de Biologia e Tecnologia. 17:93-102.
- DION, A.S. e E.S. HERBET. 1967. The Localization of Spermidine in Salivary Gland Cells of *Drosophila Melanogaster* and its Effect on H³-Uridine Incorporation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58:2367-2371.
- DUBIN, D.T. e S.M. ROSENTHAL. 1960. The Acetylation of Polyamines in *Escherichia coli*. J. Biol. Chemical, 235:776-782.
- EVANS, H.J. e G.J. SORGER. 1966. Role Mineral Elements with Emphasis on the Univalent Cations. Ann. Rev. Plant Physiol. 17:47-76.

- GUIRARD, B.M. e E.E. SNELL. 1964. Effect of Polyamine Structure on Growth Stimulation and Spermine and Spermidine Content of Lactic Acid Bacteria. J. Bacteriol. 88:72-80.
- HERBEST, E.J. e E.E. SNELL. 1948. Putrescine as a Growth Factor for *Hemophilus parainfluenzae*. J. Biol. Chem. 176: 989-990.
- HERBEST, E.J. e E.E. SNELL. 1949. Putrescine and Related Compounds as Growth Factors for *Hemophilus parainfluenzae* 7901. J. Biol. Chem. 181:47-54.
- HIAT, A.J. 1965. Formic Acid Activation in Plants. II. Activation of Formyltetrahydrofolate Synthetase by Magnesium, Potassium and other Univalent Cations. Plant Physiol. 40:189-193.
- INOUE, M. e A.B. PARDEE. 1970. Requirement of Polyamines for Bacterial Division. J. Bacteriol. 3, 101:770-776.
- KASTORI, R. e S. GRUJIC. 1975. Influence of Potassium on RNA and DNA Content in Maize Seedlings. Biochem. Physiol. Pflanz. 167, 1:109-112.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSEBROUGH; A.L. FAR e R.J. RANDALL. 1951. Protein Measurement with Folin-Phenol Reagent. The J. Biol. Chem. 193:265-275.

- MARETZKI, A.; M. THOM e L.G. NICKELL. 1969. Products of Arginine Catabolism in Growing Cells of Sugar Cane. Phytochemistry 8:811-818.
- NITSOS, R.E. e H.J. EVANS. 1966. Effects of Univalent Cations on the Inductive Formation of Nitrate Reductase. Plant Physiol. 41:1499-1504.
- PEGG, A.E. e H.G. WILLIAMS-ASHMAN. 1969. On the Role of S-adenosyl L-Methionine in the Biosynthesis of Spermidine by Rat. Prostate. Journ. Biol. Chem. 244:682-693.
- RAINA, A. e S.S. COHEN. 1966. Polyamines and RNA synthesis in a polyauxotrophic strain of *E. coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55:1587-1593.
- RAINA, A.; M. JANSEN e S.S. COHEN. 1967. Polyamines and Accumulation of Ribonucleic Acids in Some Polyauxotrophic Strains of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 94:1684-1696.
- RAINA, A. e J. JANNE. 1970. Polyamines and the Accumulation of RNA in Mammalian Systems. Fed. Proc. 29:1568-1574.
- RAMAKRISHNA, S. e P.R. ADIGA. 1975. Amine Levels in *Lathyrus Sativus* Seedlings during Development. Phytochemistry, 14: 63-68.
- RICHARDS, F.J. e R.G. COLEMAN. 1952. Occurrence of Putrescine in Potassium Deficient Barley. Nature, 170:460.

- RUBENSTEIN, K.E.; E. STREIBEL; S. MASSEY; L. LAPI e S.S. COHEN. 1972. Polyamine Metabolism in Potassium-Deficient Bacteria. J. Bacterial. 112:1213-1221.
- RUDULIER, D. e G. GOAS. 1976. Effect of Ammonium and Potassium Ions on the Accumulation of Putrescine in Young Plants of Soja Hispida Moench Deprived of their Cotyledons. Physiologie Vegetale, 13, 1:125-136.
- SARRUGE, J.R. 1975. Soluções Nutritivas. Summa Phytopathologica, 1:231-233 (nota técnica).
- SHIMIZU, H.; Y. KAKIMOTO e I. SANÔ. 1965. Changes in Concentration of Polyamines in the Developing Mouse Brain. Nature, 207:1196-1197.
- SINCLAIR, C. 1967. Relation Between Mineral Deficiency and Amine Synthesis in Barley. Nature, Lond. 213:214-215.
- SMITH, T.A. e F.J. RICHARDS. 1962. The Biosynthesis of Putrescine in Higher Plants and its Relation to Potassium Nutrition. Biochem. J. 84:292-294.
- SMITH, T.A. 1963. L-Arginine Carboxy-liase of Higher Plants and its Relation to Potassium Nutrition. Phytochemistry, 2: 241-252.
- SMITH, T.A. e J.L. GARRAWAY. 1964. N-carbamyl putrescine-an Intermediate in the Formation of Putrescine by Barley. Phytochemistry, 3:23-26.

- SMITH, T.A. 1965. N-carbamylputrescine Amidohydrolase of Higher Plants and its Relation to Potassium Nutrition. Phytochemistry 4:599-607.
- SMITH, T.A. 1967. The Biosynthesis of Putrescine in Higher Plants and its Relation to Potassium Nutrition. Potash Review Subject 3, 25th nuite.
- SMITH, T.A. 1969a. Agmatine Iminohydrolase in Maize. Phytochemistry 8:2111-2117.
- SMITH, T.A. 1969b. Putrescine, Spermidine and Spermine in Higher Plants. Phytochemistry 9: 1479-1486.
- SMITH, T.A. 1970a. Putrescine, Spermidine and Spermine in Higher Plants. Phytochemistry 9: 1479-1486.
- SMITH, T.A. 1970b. The Biosynthesis and Metabolism of Putrescine in Higher Plants. Annals of the New York Academy of Sciences, 171:988-1001.
- SMITH, T.A. 1973. Amine levels in Mineral Deficient *Hordeum vulgare* leaves. Phytochemistry, 12:2093-2100.
- SMITH, T.A. 1975. Distribution of Cadaverine and other Amines in Higher Plants. Phytochemistry, 14:2341-2346.
- SNYDER, S.H. e D.H. RUSSEL. 1970. Polyamine Synthesis in Rapidly Growing Tissues. Fed. Proc. 29:1575-1582.

- SPIRIN, A.S. 1958. Spectro Photometric Determination of Total Nucleic Acid Content. Biokhimiya 23:656-662.
- STEVENS, L. 1970. The Biochemical Role of Naturally Occuring Polyamines in Nucleic Acids Synthesis. Biol. Rev. 45:1-27.
- TABOR, H.; S.M. ROSENTHAL e C.W. TABOR. 1958. The Biosynthesis of Spermidine and Spermine from Putrescine and Methionine. Biol. Chem. 233:907-914.
- TABOR, H. e C.W. TABOR. 1964. Spermidine, Spermine and Related Amines. Pharmac. Rev. 16:245-300.
- VAREBEKE, P.L.J. de. 1975. Replacement of Mg^{2+} by Polyamines in the Aminocylation of tRNA from *Phaseolus*. Phytochemistry, 10:2153-2155.
- WEBSTER, G. 1961. Protein Synthesis. Annual Review of Plant Physiology, 12:113-132.
- WITKIN, S.S. e E. ROSEMBERG. 1970. Induction of Morphogenesis by Methionine Starvation in Myxococcus. J. Bacteriol. 103:641-649.
- YOSHIDA, D. 1969. Formation of Putrescine from Ornithine and Arginine in Tobacco Plants. Plant & Cell. Physiol., 10:393-397.
- ZAGO, E.A. e H.V. AMORIM. 1977. Efeito do potássio no metabolismo de plantas (1) Deficiência de potássio no teor de compostos fenólicos em feijoeiro. Revista Científica. 2, 5:180-185.

A P Ê N D I C E

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- AcMD = Actinomicina D
- C* = Folhas de plantas cultivadas em solução nutritiva completa e que absorveram as amins putrescina e espermidina
- C = Solução nutritiva completa
- Ca = Solução nutritiva deficiente em cálcio
- DNA = Ácido desoxiribonucleico
- K = Solução nutritiva deficiente em potássio
- Mg = Solução nutritiva deficiente em magnésio
- N = Solução nutritiva deficiente em nitrogênio
- P = Solução nutritiva deficiente em fósforo
- PUT = Putrescina
- RNA = Ácido Ribonucleico
- SPD = Espermidina
- SPN = Espermina

Tabela 1 - Teores das aminas putrescina, espermina e espermidina em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) cultivada em soluções nutritivas deficientes em macronutrientes

Tratamento	Íonio suprimido	Teor de amina SPN	(nmol/g SPD	de mat.verde) PUT
1	controle	23	63	-
2	nitrogênio	42	59	17
3	fósforo	27	75	27
4	potássio	23	160	361
5	cálcio	43	88	35
6	magnésio	27	117	42
7	enxôfre	25	83	-

DMS: 9,4 DMS: 97,84 DMS: 56,47

Tabela 2 - Efeito da absorção de aminoácidos e aminas por folhas destacadas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) no teor de di e poliaminas

Tratamento	Material absorvido (25 mM)	Teor de di e poliaminas (nmol/g de mat.verde)		
		SPM	SPD	PUT
1	Água (controle)	137	58	48
2	Arginina	259	132	179
3	Citrulina	164	91	132
4	Agmatina	259	190	123
5	Lisina	107	57	50
6	N-Carbamil Putrescina	183	146	472
7	Ornitina	111	56	72

DMS 5%: 144,1 DMS 5%: 88,28 DMS 5%: 155,1

Tabela 3 - Incorporação de Leucina C¹⁴ e teor de proteína em folhas de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca), cultivado em solução nutritiva completa e deficiente em potássio e em folhas que absorveram as aminas putrescina e espermidina

Tratamento	dpm/mg proteína/ μCi absorvido	mg de proteína/ g peso seco
C	3158	112
-K	2552	82
C*	2015	105

DMS 5%: 582,27

DMS 5%: 21,71

Tabela 4 - Incorporação de Leucina-C , teor de proteínas e teor de poliaminas em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca), que absorveram Actinomicina D

Tratamento	nmol de amina/g peso seco PUT	SPM	SPD	dpm/mg de proteína/ μ Ci absorvido	mg de proteína/ g de peso seco
Controle	27	107	60	3158,0	112,0
20 ug AcMD	94	116	101	2483,0	103,0
40 ug AcMD	98	114	83	1816,5	107,5

DMS: 25 F=N.S. DMS: 28,34 F=N.S. F=N.S.

Tabela 5 - Incorporação de P³² (Na₂HP³²O₄) e teor dos ácidos nucleicos em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca), cultivados em solução nutritiva completa e deficiente em potássio e em folhas que absorveram as aminas putrescina e espeřmidina

Tratamento	cpm/g peso seco/ μ Ci absorvido		mg Ac.Nucleicos/g mat. seca	
	DNA	RNA	DNA	RNA
+K	1932,0	233,0	3,25	20,4
-K	1597,0	236,5	2,45	9,2
+K*	1039,0	68,5	3,2	18,6

F = N.S. DMS: 97,9 DMS: 0,14 DMS: 5,3

Tabela 6 - Quantidade de aminoácidos livres em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.; cultivar Carioca), cultivados em solução nutritiva completa e deficiente em potássio

	Quantidade de aminoácidos em $\mu\text{moles/g}$ de peso verde		
	+K	-K	Teste F
Ac. Aspártico	1,21	0,45	S.
Ac. Glutâmico	1,64	0,90	S.
Glicina	0,095	0,30	S.
Alamina	0,735	0,515	N.S.
Isoleucina	0,045	0,335	S.
Leucina	0,05	0,285	S.
Tirosina	0,02	0,025	N.S.
Fenilalanina	0,055	0,25	S.
Lisina	0,045	0,135	S.
Histidina	0,055	-	
Arginina	0,095	2,915	N.S.
Amônia	1,195	1,67	N.S.

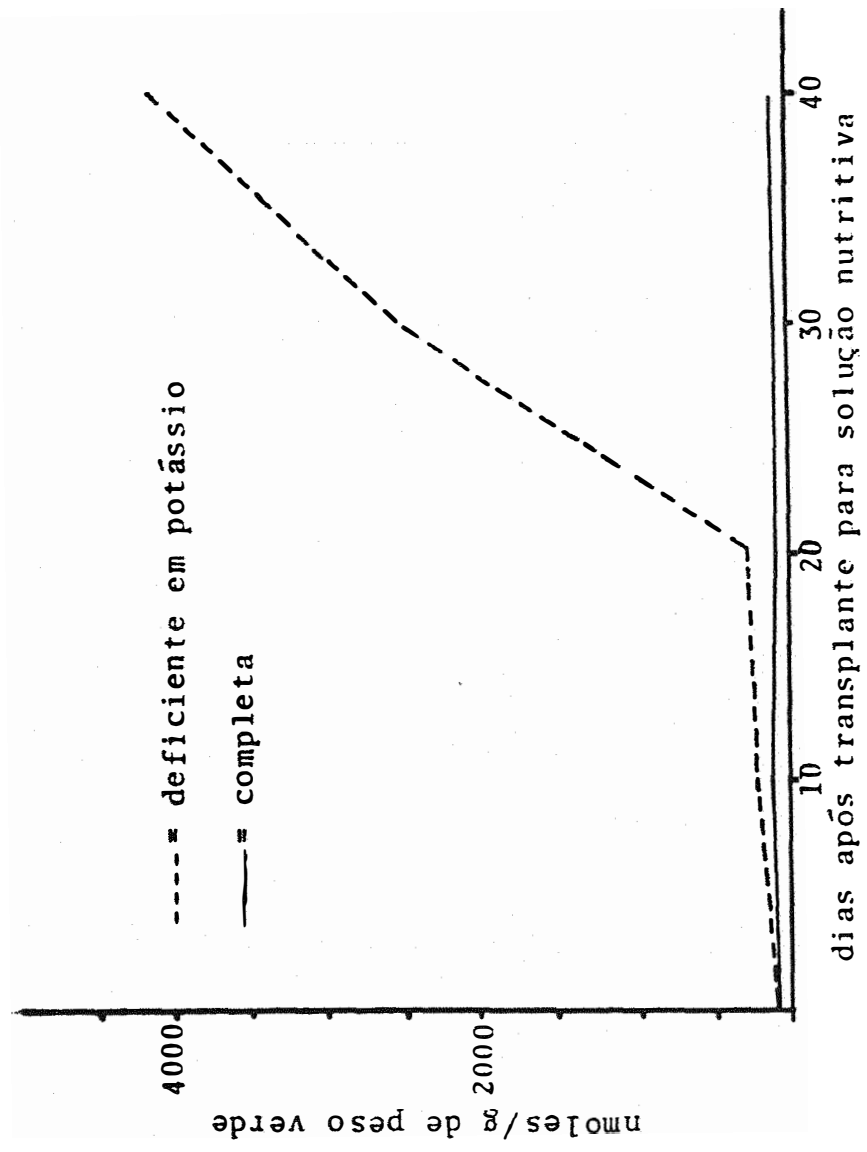
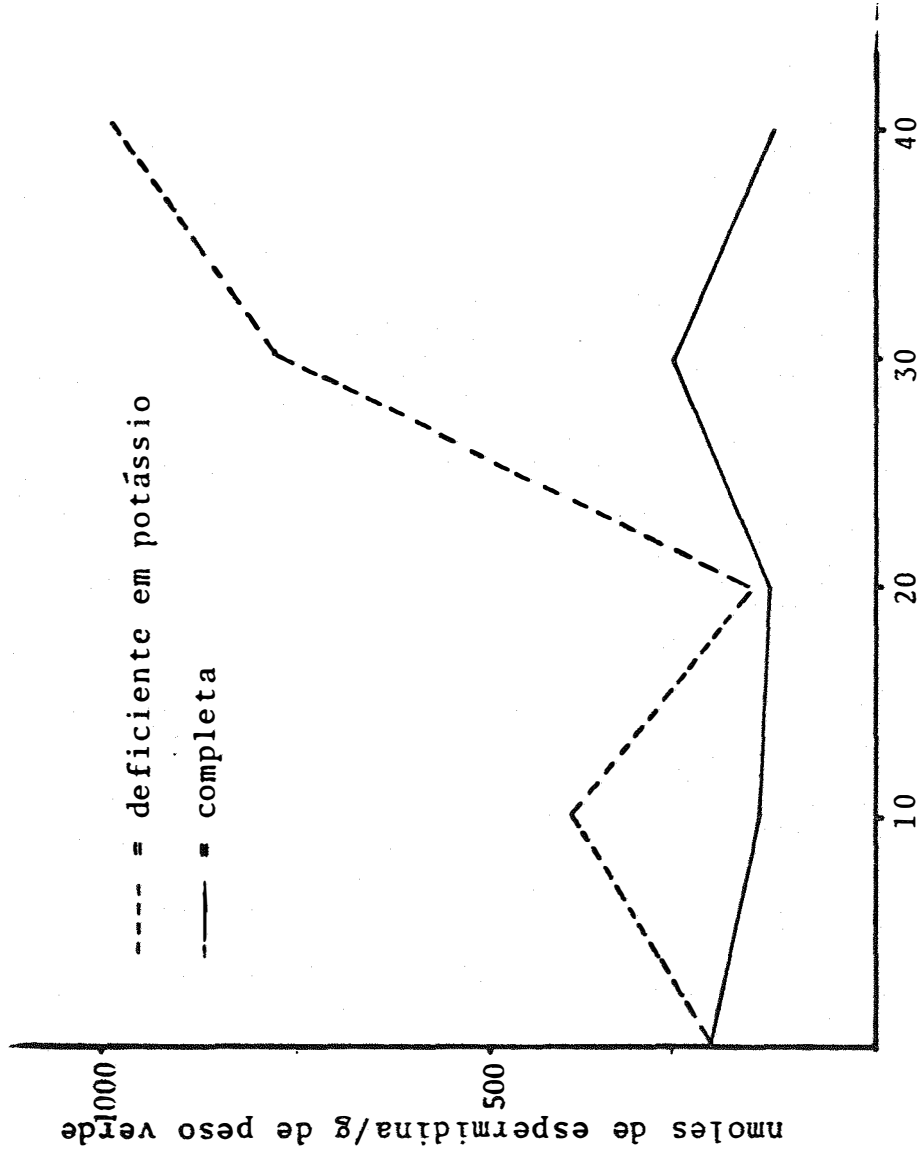
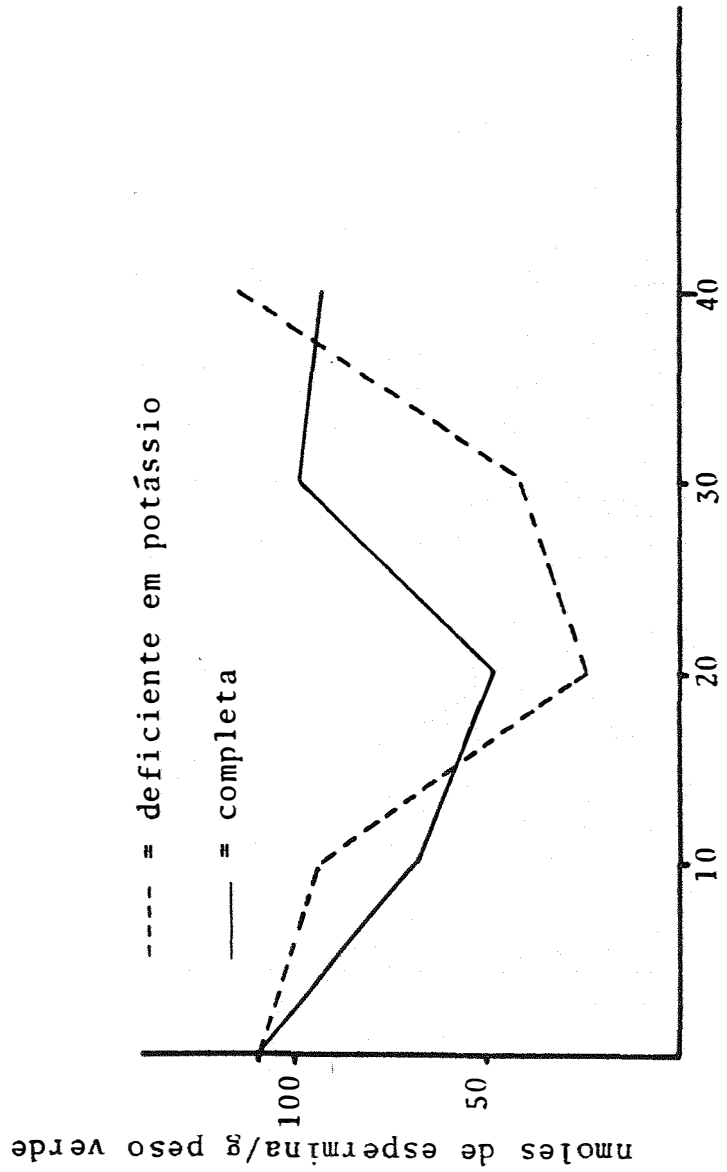


Gráfico 1: Variações nos teores de putrescina em folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) cultivado em soluções nutritivas completa e deficiente em potássio.



dias após o transplante para as soluções nutritivas

Gráfico 2: Variações nos teores de espermidina em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) cultivado em soluções nutritivas completa e deficiente em potássio.



dias após o transplante para solução nutritiva

Gráfico 3: Variação nos teores de espermina em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; cultivar Carioca) cultivado em solução nutritiva completa e deficiente em potássio.