

CLAUDIA APARECIDA PONTES

INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS α -GALACTOSIDASE E POLIGALACTURONASE
NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra* (Leguminosae-
Papilionoidea)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P814i
2008

Pontes, Claudia Aparecida, 1973-
Influência das enzimas α -galactosidase e poligalac-
turosane na germinação de sementes de *Dalbergia nigra*
(Leguminosae - Papilonoidea) / Claudia Aparecida
Pontes. – Viçosa, MG, 2008.
ix, 55f.: il. ; 29cm.

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Dalbergia nigra* - Semente. 2. Germinação.
3. Sementes. 4. Enzimas. 5. Bioquímica. 6. Fisiologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDO adapt CDD 634.9181525

CLAUDIA APARECIDA PONTES

INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS α -GALACTOSIDASE E POLIGALACTURONASE
NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra* (Leguminosae-
Papilionoidea)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 07 de Março de 2008

Sebastião Tavares de Rezende
Co-Orientador

João Marcos de Araújo
Co-Orientador

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias

Edvaldo A. Amaral da Silva

Eduardo Euclides de Lima e Borges
Orientador

Aos meus pais, Marlene e João Carlos
Aos meus irmãos, Renato e Samuel
Ao meu esposo, Aderlan

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Engenharia Florestal, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, pela oportunidade, pela confiança em meu trabalho, pela amizade, pelo exemplo de profissional e pela contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Aderlan, pelo companheirismo, pelo carinho, pelo estímulo, pelas sugestões e pelo auxílio constante durante toda a realização do trabalho.

Aos meus pais, pelo amor, pela compreensão e pelo apoio constante.

Ao meu irmão Samuel, pelo carinho, pelo apoio e estímulo constante.

Ao meu irmão Renato, um agradecimento especial, pois sem o incentivo dele, eu não teria nem iniciado do curso de graduação.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pela confiança e por sua disponibilidade em orientar o trabalho com as enzimas.

Aos funcionários, Mauro, Leacir e Francisco, pelo apoio ao longo do trabalho, pelo carinho e pela amizade.

A todos os funcionários do Setor de Silvicultura, pelo apoio, companheirismo e incentivo.

Aos meus amigos, Rosalvo, Kida, Edivânia, Pablo, Climeni, Inês, Antonio Jorge, Lanna, Mariana, Viviana e Márcio pelo apoio e pelo companheirismo.

A Marquione, pelo carinho e pela paciência em atender a todos os pedidos.

À minha tia Sonia e as minhas queridas avós Hornélia e Maria, pelo apoio e pelo carinho de sempre.

A Deus, pela vida.

SUMÁRIO

Resumo	VI
Abstract.....	VII
1-Introdução geral	1
1.1- Espécie estudada	2
2-Referências bibliográficas	3
Artigo I	5
Caracterização de uma α -galactosidase presente nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes de <i>Dalbergia nigra</i>	
Resumo	5
Abstract	5
1-Introdução	6
2-Material e métodos	7
3-Resultados e discussão.....	9
4-Conclusões	13
5-Referências bibliográficas	13
Artigo II	22
Caracterização parcial de uma poligalacturonase presente nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes de <i>Dalbergia nigra</i>	
Resumo	22
Abstract	22
1-Introdução	23
2-Material e métodos	24
3-Resultados e discussão	26
4-Conclusões	28
5-Referências bibliográficas	29
Artigo III	35
Caracterização parcial de uma poligalacturonase e análise dos carboidratos presentes nos tegumentos de sementes de <i>Dalbergia nigra</i>	
Resumo	35

Abstract	35
1-Introdução	36
2-Material e métodos	37
3-Resultados e discussão	39
4-Conclusões	42
5-Referências bibliográficas	43
6-Conclusões	55

RESUMO

Pontes, Claudia Aparecida, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Março, 2008. Influência das enzimas α -galactosidase e poligalacturonase na germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Leguminosae-Papilionoidea). Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-orientadores: Sebastião Tavares de Rezende e João Marcos de Araújo.

Este trabalho teve como objetivos: i) quantificar e caracterizar as enzimas α -galactosidase e poligalacturonase (PG) em sementes de *D. nigra*, ii) verificar a composição e a alteração dos açúcares que compõem a parede celular e a fração péctica dos tegumentos das sementes durante a germinação. As sementes foram colocadas para embeber em água por 168 horas, sendo retiradas amostras para a caracterização bioquímica e cinética da enzima. A atividade da enzima α -galactosidase aumentou com a embebição nos dois compartimentos, embora não estivesse presente inicialmente no eixo embrionário de sementes secas. O pH de máxima atividade foi de 5,5 para ambos os compartimentos. A temperatura que mais estimulou a atividade nos cotilédones foi de 50 °C e de 50 a 60 °C no eixo embrionário. A enzima mostrou-se termotolerante, mas não foi possível determinar a meia-vida na temperatura de 40 °C, no período de 10 horas. A atividade da α -galactosidase foi inibida por β -mercaptoetanol e CuSO_4 em ambos os compartimentos. A lactose e o cloreto de sódio estimularam a atividade tanto nos cotilédones como no eixo embrionário. Os valores de K_M para o eixo embrionário e cotilédones foram de 0,239 e 0,228 mM, respectivamente. A enzima α -galactosidase está presente nas sementes de *Dalbergia nigra* e sua atividade específica aumenta durante o período de germinação. A atividade da PG foi detectada a partir do primeiro dia de embebição, tanto nos cotilédones como no eixo embrionário. A atividade máxima nos cotilédones foi detectada no segundo dia e, no eixo, no sexto dia de embebição. A variação no teor de proteínas foi significativa ao longo do tempo nos cotilédones e no eixo. A atividade de PG foi máxima nas temperaturas de 60°C nos cotilédones e de 55 a 60 °C no eixo embrionário. O pH 4,0 foi o de maior atividade da enzima para ambos os compartimentos. O K_M foi de 5,08 e de 4,39 mM para os cotilédones e o eixo, respectivamente. O V_{\max} foi de 0,026 mM min^{-1} para cotilédones e de 0,024 mM

min⁻¹ para eixo embrionário. Nos tegumentos, a atividade específica da PG foi máxima no terceiro dia. O teor de proteína se reduziu a partir da embebição. A atividade de PG foi máxima nas temperaturas de 40 a 50 °C. O pH de maior atividade da enzima ficou na faixa de 3 a 7. O K_M e o V_{max} foram de 1,34 mM e 0,012 μmol min⁻¹, respectivamente. Verificou-se que a galactose é o principal componente da pectina, seguida pela manose. Na parede celular, o principal componente foi a arabinose, seguida pela xilose. Com base nos resultados, conclui-se que as enzimas α-galactosidase e PG atuam durante a germinação das sementes de *Dalbergia nigra*.

ABSTRACT

Pontes, Claudia Aparecida, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2008. Influence of the enzymes α -galactosidase and poligalacturonase in the *Dalbergia nigra* seed germination (Leguminosae-Papilionoidea). Advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-Advisors: Sebastião Tavares de Rezende and João Marcos de Araújo.

This work aimed to study the enzymes α -galactosidase and polygalacturonase and to verify the composition and the alteration of the cell wall sugars and the pectic component in the teguments of *D. nigra* seeds during the germination. The seeds were submitted to water imbibition for 168 hours. Samples of seeds were taken for the biochemical and kinetic characterization of the enzymes. Activity of the enzyme α -galactosidase increased with the imbibition, although it was not present initially in the embryonic axis of dry seeds. The maximum activity was obtained at pH 5.5 to both compartments. In the cotyledon the activity of the enzyme was higher at temperature of 50°C, and in the embryonic axis it was between 50 and 60°C. The enzyme was tolerant to temperature, but it was not possible to determine its half-life at the temperature of 40 °C, in the period of 10 hours. The activity of the α -galactosidase was inhibited by β -mercaptoethanol and CuSO_4 in both compartments, the lactose and the sodium chloride stimulated the activity in the cotyledons and in the embryonic axis. The K_M values for the embryonic axis and cotyledons were respectively 0,239 and 0,228 mM. The α -galactosidase is present in the seeds of *Dalbergia nigra* and its specific activity increases during the germination period. Activity of PG was detected from the first day of imbibition, in the cotyledons and in the embryonic axis. Maximum activity in the cotyledons was detected in the second day and in the axis in the sixth day of soaking. The variation in the proteins content was significant along the time in the cotyledons and in the axis. The activity of PG was maximal at the temperature of 60°C in the cotyledons and in the embryonic axis the maximal activity was observed in a range of temperatures from 55 to 60 °C. The activity of the enzyme was higher at pH 4,0 to all compartments. The K_M was 5,08 and 4,39 mM for the cotyledons and axis, respectively. V_{max} was 0,026 mM

min⁻¹ in the cotyledon enzyme and 0,024 mM min⁻¹ for embryonic axis enzyme. In the teguments, activity of PG was maximal in the third day. The protein content reduced along the imbibition period. The activity of PG was maximal temperatures ranging from 40 to 50 °C. The pH of higher activity to this enzyme was obtained from pH 3 until pH 7,0. The K_M and V_{max} were 1,34 mM and 0,012 μmol min⁻¹, respectively. It was verified that the galactose is the main component of the pectin, followed by the mannose. Arabinose was the most abundant component in the cell wall, followed by xylose. Based on the results, we can conclude that the enzymes α-galactosidase and PG are acting during the germination of *Dalbergia nigra* seeds.

1- INTRODUÇÃO GERAL

A germinação se inicia com a embebição das sementes, estimulando a síntese de enzimas ou a ativação daquelas pré-existentes, resultando na mobilização de reservas e na digestão da parede celular, enfraquecendo-a e permitindo que a raiz primária rompa o tegumento (Baskin e Baskin, 1998; Borges e Rena, 1993).

Enzimas são proteínas altamente especializadas, fundamentais para qualquer processo biológico, com a função de catalisar as reações químicas. As enzimas são específicas para as reações que catalisam, ou seja, uma enzima catalisa somente determinada reação. Devido à sua natureza protéica, as enzimas são extremamente afetadas pelo ambiente (Nelson e Cox, 2002).

As enzimas que vão atuar durante a germinação das sementes dependem do tipo de reserva presente. Nas reservas de polissacarídeos da parede celular e nos oligossacarídeos da série refinósica, atuam enzimas como endo- β -mananase, β -manosidase e α -galactosidase (Buckeridge, 2004). Contudo, Bewley (1997) e Sitrit et al. (1999) relatam que outras hidrolases poderiam atuar durante o processo de germinação no amolecimento dos tecidos que envolvem o eixo embrionário. Toorop et al. (1996) e Sital e Bradford (1997) relatam que a enzima mananase sozinha seria insuficiente para promover a germinação de *Lycopersicon esculentum*. Trabalho posterior de Sitrit et al. (1999) mostrou a atuação da enzima poligalacturonase (PG) no endosperma e no embrião de sementes de *Lycopersicon esculentum* durante a germinação.

A enzima α -galactosidase é uma exoglicosidase que hidrolisa ligações α -1,6 de resíduos de galactosil em galacto-oligossacarídeos e galactomananas (Fujimoto et al., 2003). Essa enzima já vem sendo estudada em plantas e sementes durante a germinação e possui diferentes formas, tanto na atividade quanto na massa molecular (Lahuta et al., 2000). Em sementes de *Glycine max* e de *Lycopersicon esculentum* foi relatado aumento da atividade de α -galactosidase durante a germinação (Feurtado et al., 2001; Guimarães et al., 2001).

A poligalacturonase catalisa a clivagem de ligações glicosídicas α -1,4 do ácido péctico (Lazan e Ali, 1993). A PG é responsável pelo amolecimento da parede celular que acompanha a solubilização de pectinas durante o amadurecimento de frutos (Huber, 1983).

Ainda há poucos trabalhos mostrando a atuação da enzima PG em sementes durante o processo de embebição. Segundo Sitrit et al. (1999), a enzima poligalacturonase está envolvida neste processo atuando no amolecimento da parede celular do endosperma micropilar em sementes de *Lycopersicon esculentum*, também constatado por Toorop et al. (2000), que relatam a participação da enzima PG na germinação de sementes de *Lycopersicon esculentum*. Segundo os mesmo autores, a enzima seria a responsável pelo enfraquecimento mecânico do endosperma micropilar.

Segundo Borges (2003), há poucos trabalhos disponíveis na literatura que tratam das alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de espécies nativas, como, por exemplo, as relações entre atividade enzimática nos diferentes compartimentos das sementes durante a germinação. Estudos desta natureza são importantes, principalmente como subsídios para o armazenamento, pois a inatividade de determinadas enzimas permitirá reduzir o ritmo metabólico da semente.

Diante deste contexto, estudou-se a participação das enzimas α -galactosidase e poligalacturonase no eixo embrionário, nos cotilédones e no tegumento de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação.

1.1- Espécie estudada

Dalbergia nigra (Leguminosae-Papilionoidae), popularmente conhecida com jacarandá-da-bahia, é uma árvore semicaducifólia a perenifólia comumente encontrada com 15 a 25 m de altura. Essa planta é adaptada a locais secos e indicada para o plantio misto em áreas degradadas de preservação permanente, possuindo caráter pioneiro. Possui tronco tortuoso e irregular, folhas compostas e alternadas. Essa é uma espécie secundária com características pioneiras, ocorrendo na floresta pluvial atlântica dos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Lorenzi, 1992).

O jacarandá-da-bahia apresenta um alto potencial para o manejo florestal sustentável. Entre suas características, destaca-se sua madeira, moderadamente pesada, decorativa e de longa durabilidade natural, sendo utilizada no mobiliário de luxo, na construção civil e no paisagismo em geral, características que contribuem para a facilidade de sua comercialização no mercado atual (Pinã-Rodrigues e Piratelli, 1993; Oliveira Filho, 1994). Sua exploração indiscriminada

em virtude de sua madeira de ótima qualidade, além da devastação do seu ambiente natural, ocasionou sua inclusão na lista da flora brasileira de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008). A necessidade de preservação da espécie bem como plantios de reflorestamento têm despertado interesse pela cultura e estudos por parte de técnicos e pesquisadores (Carvalho, 1994).

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baskin, C.C.; Baskin, J.M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998, 666p.

Bewley, J.D. Breaking down the walls – a role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy? **Trend in Plant Science**, v. 2, n. 12, p. 464-469, 1997.

Borges, E.E.L. **Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição**. São Carlos-SP: UFSCAR, 2003, 100p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade Federal de São Carlos.

Borges, E.E.L.; Rena, A.B. Germinação de sementes. In. **Sementes Florestais Tropicais**. AGUIAR. I.B.; Piña-Rodrigues, F.C.M.; Figliota, M.B. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes. Comitê Técnico de Sementes Florestais. Brasília-DF, 1993, 350p.

Buckeridge, M.S.; Santos, H.P.; Tiné, M.A.S.; Aidar, M.P.M. Mobilização de reservas. In **Germinação: do básico ao aplicado**. Org. Ferreira, A.G.; Borghetti, F. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2004, 323p.

Carvalho, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações, silviculturas, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília: Embrapa-SPI, p. 638p, 1994.

Feurtado, J.A.; Banik, M.; Bewley, J.D. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seed. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.359, p.1239-1249, 2001.

Fujimoto, Z.; Kaneko, S.; Monna, M.; Kobayashi, H.; Mizuno, H. Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 20313-20318, 2003.

Guimarães, V.M.; Rezende, S.T.; Moreira, M.A.; Barros, E.G.; Felix, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p. 67-73, 2001.

Huber, D.J. Polyuronides degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 108, p. 405-409, 1983.

IBAMA – Lista oficial de Flora ameaçada de extinção – acesso em 26 de janeiro de 2008. Disponível em: <http://www2.ibama.gov.br/flora/extinção.htm>

Lahuta, L.; Gorecki, R.J.; Michalczyk, D. ; Piotrowiczciślak, A.L.C. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Electronic Journal Polish Agricultural Universities**, v. 3, p. 1-10, 2000.

Lazan, H.; Ali, Z.M. Cell wall hidrolases an their potential in manipulation of ripening of tropical fruits. **Food Journal**, New York, v. 8, n. 2, p. 47-53, 1993.

Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Trad. SIMÕES, A.A.; LODI, W.R.N. -3ª Ed.- São Paulo: Savier, 2002, 975p.

Oliveira Filho, A. T. Estudos ecológicos da vegetação como subsídios para programa de revegetação com espécies nativas: uma proposta metodológica. **Revista Cerne**, v. 1, n. 1, p. 113-117, 1994.

Pinã-Rodrigues, F. C. M.; Piratelli, A. J. Aspectos ecológicos da produção de sementes. In: Aguiar, B. A.; Pina-Rodrigues, F.C.M.; Figliola, M. B. **Sementes florestais tropicais**. ABRATES, p. 47- 81, 1993.

Sitrit, Y.; Hadfield, K.A.; Bennett, A.B.; Bradford, K.J.; Downie, A.B. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. **Plant Physiology**, v. 121, p. 419-428, 1999.

Still, D.W.; Bradford, K.J. Endo-beta-mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation to germinatio rates. **Plant Physiology**, v. 113, p. 21-29, 1992.

Toorop, P.E.; Bewley, J.D.; Hilhorst, H.W.M. Endo- β -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion to the completion of germination. **Planta**, v. 200, p. 153-158, 1996.

Toorop, P.E.; Van Aelst, A.C.; Hilhorst, H.W.M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. **Jounal Exp.Botany**, v. 51, n.349, p.1371-1379, 2000.

Artigo I

Caracterização de uma α -galactosidase presente nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes de *Dalbergia nigra*

Claudia Aparecida Pontes, Eduardo Euclides de Lima e Borges, Sebastião Rezende de Tavares, Aderlan Gomes da Silva, Lanna Clicia Carrijo, Mariana Rocha Lopes

Resumo: Este trabalho teve como objetivo quantificar a atividade da enzima α -galactosidase e fazer sua caracterização no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Dalbergia nigra* durante sua germinação. As sementes foram colocadas para embeber em água por 168 horas, sendo retiradas amostras para a caracterização bioquímica e cinética da enzima. A atividade da enzima α -galactosidase aumenta com a embebição das sementes nos dois compartimentos, embora não esteja presente no eixo embrionário de sementes secas. A diferença na atividade da enzima entre os cotilédones e o eixo embrionário foi significativa. O pH 5,5 foi o de máxima atividade para ambos os compartimentos. Com o aumento da temperatura, houve aumento na atividade enzimática. A temperatura que mais estimulou a atividade da enzima nos cotilédones foi 50 °C e de 50 a 60 °C no eixo embrionário. A enzima mostrou-se termotolerante, mas não foi possível determinar sua meia-vida na temperatura de 40 °C, no período de 10 horas. A atividade da α -galactosidase foi inibida por β -mercaptoetanol e cobre em ambos os compartimentos, enquanto a lactose e o cloreto de sódio estimularam a atividade tanto nos cotilédones como no eixo embrionário. Os valores de K_M para o eixo embrionário e cotilédones foram de 0,239 e 0,228 mM, respectivamente. A enzima α -galactosidase está presente nas sementes de *Dalbergia nigra* e sua atividade aumenta durante o período de embebição das sementes.

Palavras-chave: α -galactosidase, sementes, *Dalbergia nigra*.

Abstract: This work aimed to quantify and characterize the α -galactosidase in the embryonic axis and in the cotyledons of *Dalbergia nigra* seeds during the imbibition period. The seeds were submitted to water imbibition during 168 hours. Biochemical and kinetic characterization of the enzyme were done from samples taken during the imbibition period. The activity of the α -galactosidase increased in

the two compartments with the soaking of the seeds, although, the enzyme activity was not detected in the embryonic axis of dry seeds. The difference in the activity of the enzyme between cotyledons and embryonic axis was significant. The pH of maximum activity was 5.5 to both compartments. The activity increased with the temperature. In the cotyledons the higher activity of the enzyme was obtained at 50 °C. In the embryonic axis the activity was higher at temperatures ranging from 50 until 60 °C. The enzyme was tolerant to high temperatures, but it was not possible to determine its half-life at the temperature of 40 °C, in the period of 10 hours of incubation. The activity of the α -galactosidase was inhibited by β -mercaptoethanol and CuSO_4 in both compartments, while the lactose and the sodium chloride stimulated the activity in the cotyledons and in the embryonic axis. The values K_M for the embryonic axis and cotyledons were respectively of 0,239 and 0,228 mM. The enzyme α -galactosidase is present in the seeds of *Dalbergia nigra* and its specific activity increases during the period of soaking of the seeds.

Key words: α -galactosidase, seeds, *Dalbergia nigra*

1- INTRODUÇÃO

O interesse no estudo da composição química das sementes está relacionado não só às suas propriedades nutricionais, mas também às possíveis aplicações na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (Buckeridge et al., 2004a). Juntamente com as substâncias de reservas, as enzimas têm despertado o interesse da indústria, principalmente, alimentícia, por apresentar potencial para diversas aplicações biotecnológicas (Oliveira et al., 2005; Guimarães et al., 2001). Segundo Guimarães et al. (2001), a enzima α -galactosidase tem potencial para ser utilizada na hidrólise de oligossacarídeos da série rafínosica do leite de soja.

A enzima α -galactosidase é uma exoglicosidase que hidrolisa ligações glicosídicas α -1,6 de resíduos de galactosil em oligossacarídeos da série rafínosica e em polissacarídeos de parede celular (Fujimoto et al., 2003; Lahuta et al., 2000). Segundo Borges et al. (2002), há carência de informações fisiológicas e bioquímicas em sementes de espécies florestais arbóreas durante a fase de germinação. Estudos da enzima α -galactosidase têm sido realizados em

sementes durante a germinação (Borges et al., 2004 e 2005; Oliveira et al., 2005; Guimarães et al., 2001). Essa mesma enzima vem sendo estudada em fungos (Saraswathy et al., 2007), em folhas (Chrost et al., 2007) e em raízes (Bom et al., 1998).

Os oligossacarídeos são fontes primárias de energia e substrato para a síntese de novos compostos durante a embebição e germinação das sementes (Edwards et al., 1992). A maioria das atividades enzimáticas, especialmente as da α -galactosidase, aumenta nesta fase (Kontos e Spyropoulos, 1996). Em sementes de *Sesbania marginata*, os oligossacarídeos da série rafínósica foram quebrados durante o processo de embebição, enquanto reservas de galactomanano foram mobilizadas durante o crescimento inicial das plântulas, tendo sido observado aumento na relação manose/galactose, sugerindo que a enzima α -galactosidase seja a hidrolase responsável pela degradação dessas reservas (Buckeridge e Dietrich, 1996).

A espécie *Dalbergia nigra*, também conhecida como jacaradá-da-bahia, é nativa da Mata Atlântica, encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Lorenzi, 1992). Devido à exploração de sua madeira e à falta de replantios, a espécie está classificada como vulnerável, conforme “Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção” (IBAMA, 2008). Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade e fazer a caracterização da enzima α -galactosidase no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. As sementes de *Dalbergia nigra* foram colhidas no estágio final de maturação em Viçosa MG e colocadas em placas de Petri com 9 cm de diâmetro sobre duas folhas de papel Germitest umedecidas com água destilada. Estas placas foram levadas para um germinador com temperatura constante de 25°C, proporcionada por quatro lâmpadas tipo fluorescente OSRAM, de 40W cada, tipo luz do dia especial, pelo período de 240 horas. Foram utilizadas cinco

repetições de 20 sementes para acompanhar a porcentagem de germinação. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão da radícula igual a 2 mm (Pontes et al., 2002). A cada 24 horas, foram retiradas amostras e as sementes foram dissecadas em cotilédone e eixo embrionário. A extração e a determinação da atividade da enzima foram feitas segundo metodologia descrita por Viana (2002). Foram utilizados 100 mg de amostra fresca para cada uma das três repetições, macerados separadamente em gral de porcelana com 1,5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e centrifugado a 24.000 x g por 20 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e da concentração de proteínas solúveis. Para a caracterização enzimática, o extrato foi preparado nas sementes com um dia de embebição.

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA).

O ensaio-padrão para detectar a atividade da enzima foi determinado utilizando-se 700 µL de tampão de extração, 250 µL p-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo (p-NPGAL) 2 mM e 50 µL de extrato enzimático. A reação foi conduzida por 15 minutos em banho-maria a 37 °C, sendo interrompida pela adição de 1 mL de solução de carbonato de sódio 0,5 M. A leitura da absorvância foi feita no comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorvância foram transformados em µmoles de p-nitrofenol. Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto.

A influência do pH na atividade da enzima foi avaliada na faixa de 3,0 a 8,0, com intervalos de 0,5 unidade, utilizando-se tampões McIlvaine (1921), mantendo-se as mesmas condições do ensaio-padrão.

Os ensaios de temperatura foram feitos a partir de 10 °C a 75 °C, com intervalos de 5 unidades, utilizando-se tampão McIlvaine pH 5,0, mantendo-se as mesmas condições do ensaio-padrão.

Para a determinação da estabilidade térmica da enzima, o extrato enzimático mais o tampão foram pré-incubados por vários tempos na temperatura de 40 °C, em pH 5,0. Após a pré-incubação, foi adicionado o substrato, e o ensaio conduzido mantendo-se as mesmas condições do ensaio-padrão.

Os efeitos dos íons, agentes redutores e açúcares foram avaliados utilizando-se 200 mL de soluções de 10 mM de MgCl₂, CaCl₂, KCl, CuSO₄, NaCl, β-mercaptoetanol, lactose, D-galactose, D-glicose, sacarose, rafinose, melibiose, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA). A mistura contendo tampão, enzima e efetores foi incubada por 15 minutos a 37 °C e, em seguida, foi acrescentado o substrato e a reação conduzida mantendo-se as mesmas condições do ensaio-padrão.

As constantes de Michaelis-Menten K_M e V_{max} foram determinadas utilizando as concentrações finais de 0,032, 0,064, 0,118, 0,192, 0,32, 0,64, 0,08, 1,28, 1,6 e 2,0 mM de p-NPGAL. Os valores de K_M e V_{max} foram calculados por meio da curva de velocidade, em função da concentração de substrato, curva de Michaelis-Menten (Lineweaver e Burke, 1934). Foi utilizado o programa Statistica versão 6 (SratSoft, 2001).

O experimento foi montado no delineamento inteiramente ao acaso. Foram utilizadas três repetições, e a leitura da atividade foi feita em triplicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância e à regressão. Os dados referentes aos efetores foram submetidos à análise de variância e ao teste de média. Nos casos em que não se encontrou modelo adequado para os dados, calculou-se o erro padrão da média para cada ponto. Todas as análises foram feitas a 5% de significância.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes de *D. nigra* apresentou aumento expressivo a partir do quinto dia de embebição, chegando a 90 % no nono dia (Figura 1). Borges et al. (1996) encontraram 64 % de germinação para a mesma espécie. Em outro trabalho, utilizando a mesma espécie, Andrade et al. (2006) encontraram 70 % de germinação ao final de 30 dias de análise.

As atividades da enzima α-galactosidase no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *D. nigra* durante o período analisado podem ser observadas na Figura 2. Não houve diferença significativa na atividade da enzima ao longo do tempo em qualquer dos compartimentos, mas a diferença foi significativa entre os cotilédones e o eixo embrionário, o que pode indicar que a

mesma enzima tenha formas diferentes. Resultado semelhante ao encontrado neste trabalho foi obtido por Borges et al. (2004), em sementes de *Platymiscium pubescens*. Não foi detectada atividade no eixo embrionário de sementes secas. A atividade da enzima nos eixos embrionários e nos cotilédones é maior com 24 horas de embebição, com redução em 48 horas. Contudo, nos cotilédones, a atividade da enzima permanece constante até 96 horas.

Em sementes de *Tachigali multijuga*, a atividade máxima de α -galactosidase foi detectada em 108 horas de embebição (Fialho, 2007). Por outro lado, em sementes de *Platymiscium pubescens*, a atividade de α -galactosidase foi detectada nas sementes secas, com aumento da atividade da enzima durante o período de embebição (Borges et al., 2004).

Nos cotilédones secos de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, não foi detectada queda na atividade da α -galactosidase durante o período analisado (Borges et al., 2005), como o observado nos cotilédones de sementes de *D. nigra*.

Observou-se que os teores de proteína presentes no eixo embrionário e cotilédones não diferiram significativamente ao longo do período analisado, ou seja, o tempo de embebição não influenciou o teor de proteína, porém houve diferença significativa entre o eixo e os cotilédones. O teor de proteína no eixo embrionário foi de 3,54 mg/ mL nas sementes secas e de 2,34 mg/ mL em 24 horas de embebição, permanecendo decrescente até o terceiro dia e voltando a aumentar no quarto dia da análise. A partir do quinto dia de embebição, o teor de proteína nos cotilédones aumentou alcançando valores maiores que os encontrados no eixo embrionário (Figura 3).

A mobilização de reservas de proteínas em sementes está relacionada com o processo de desenvolvimento da plântula (Buckeridge et al., 2004b). Assim, a partir da embebição, ocorrem hidrólise e mobilização dessas reservas dos cotilédones para o eixo em desenvolvimento. No entanto, nos cotilédones de sementes de *D. nigra*, observa-se que está ocorrendo acúmulo dessas reservas (Figura 3). Provavelmente, a proteína dos cotilédones não esteja sendo mobilizada para o eixo embrionário, pois seu teor nos eixos é suficiente para manter seu crescimento nessa fase da embebição. Resultado semelhante foi observado em sementes de *Apuleia leiocarpa* e *Caesalpinia peltophoroides*, em que os teores médios de proteínas no eixo embrionário não diferiram

significativamente durante o período de embebição, enquanto nos cotilédones houve significativo acúmulo (Pontes et al., 2002; Borges et al., 2005).

Em sementes de *Erythrina velutina* e de *Euphorbia heterophylla*, o conteúdo de proteína cotiledonar solúvel decresceu durante a germinação e o crescimento da plântula (Oliveira et al., 1998; Suda & Giorgini, 2000).

A Figura 4 mostra os resultados relativos à atividade da enzima em relação à variação do pH. Percebe-se que a faixa de maior atividade da enzima, tanto no eixo embrionário como nos cotilédones, foi com pH entre 5,0 e 6,0. A atividade no eixo embrionário foi significativamente maior nos cotilédones. O eixo embrionário é a região de intenso crescimento meristemático e isso pode explicar a maior atividade da α -galactosidase em relação aos cotilédones. Em sementes de *Platymiscium pubescens*, as atividades máximas das enzimas do eixo embrionário e dos cotilédones estiveram na faixa de pH entre 4,5 e 6,0 (Borges et al., 2004). Guimarães et al. (2001) demonstraram que a faixa de pH de maior atividade da mesma enzima foi entre 5,0 e 5,5 em sementes de soja, alcançando 6,0, conforme Viana (2002). Já em sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, o pH de maior atividade nos cotilédones foi na faixa de 4,0 a 5,0 e no eixo embrionário de 5,5 a 6,0 (Borges, et al., 2005). Em extrato enzimático purificado, o pH de máxima atividade da enzima α -galactosidase foi de 4,5 para uma fração e de 6,0 para a outra, em sementes de *Castanea sativa* (Dey, 1981).

O aumento da temperatura resultou no aumento na atividade da α -galactosidase até a temperatura de 50 °C a 60 °C para o eixo embrionário e de 50 °C cotilédones (Figura 5). Borges et al. (2004) observaram que com o aumento da temperatura houve aumento na atividade da α -galactosidase de eixo embrionário de sementes de *Platymiscium pubescens*, com maior atividade em 55 °C e, nos cotilédones a temperatura ficou na faixa de 50 a 55 °C. Viana (2002) e Guimarães et al. (2001) obtiveram as maiores atividades para α -galactosidase nas faixas de 45 a 50° e 40 a 55°C para as sementes de soja, variedades Doko e CAC-1, respectivamente.

Os valores de meia-vida da α -galactosidase do eixo embrionário e dos cotilédones encontram-se nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Não foi possível atingir a metade da atividade original durante o período analisado. Resultado semelhante foi observado por Borges et al. (2004) em sementes de *Platymiscium pubescens* que também não atingiu a metade da atividade original da enzima.

Segundo os autores, o resultado sugere alta termoestabilidade da enzima. Por outro lado, em sementes de soja, a meia-vida da enzima α -galactosidase foi determinada na temperatura de 30°C, em 253,95 min e 1,199 min para as duas formas distintas da enzima (Guimarães et al., 2001).

O efeito dos efetores na atividade da α -galactosidase no eixo embrionário pode ser observado na Figura 8. A atividade da enzima foi inibida significativamente por β -mercaptoetanol, CuSO_4 , galactose, EDTA e rafinose. Glicose e sacarose estimularam a atividade da enzima, porém não apresentaram diferenças significativas entre si. Os sais de cloreto de cálcio, de potássio e de magnésio também tiveram efeito positivo na atividade, formando um grupo distinto. A lactose foi a responsável pela maior atividade da enzima. Nos cotilédones, a atividade da enzima foi inibida por β -mercaptoetanol, CuSO_4 (Figura 9). Os demais efetores apresentaram atividade superior ao do substrato pNP- α -Gal. A inibição da atividade enzima α -galactosidase por íons nos eixos embrionários e nos cotilédones sugere reação que envolve grupos carboxílicos, ou grupo amino e imidazol da histidina no sítio ativo da enzima (Dey e Pridam, 1972).

Atividade da α -galactosidase em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* foi inibida por SDS, CuSO_4 , galactose e melibiose em ambos os compartimentos da semente (Borges et al., 2005). O efeito dos efetores em sementes de *platymiscium pubescens* foi distinto entre cotilédones e eixo embrionário (Borges et al., 2004). Segundo Oliveira et al. (2005), o cobre inibiu fortemente a atividade da α -galactosidase C2 e totalmente a da C1 em sementes de *Platymiscium pubescens*, bem como em sementes de *Vicia sativa* e de *Prunus amygdalus* (Dey e Pridham, 1972).

Os valores de K_M do eixo embrionário e cotilédones foram de 0,239 mM e 0,228 mM, respectivamente (Tabela 1). O valor de K_M indica a afinidade da enzima pelo substrato: quanto menor o valor, maior sua afinidade. Em sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, os valores de K_M para eixo e cotilédones foram 1,74 e 2,64 mM, respectivamente. Segundo os autores, provavelmente são enzimas distintas (Borges et al., 2005). Os valores de K_M encontrados para os compartimentos de sementes de *D. nigra* foram bem próximos, o que pode indicar que as enzimas sejam as mesmas, diferentemente do encontrado no trabalho com sementes de *Caesalpinia peltophoroides* e *Platymiscium pubescens* em que

os valores de K_M foram diferentes entre o eixo e os cotilédones, indicando que as enzimas são distintas (Borges et al, 2004 e Borges et al., 2005).

4- CONCLUSÕES

A α -galactosidase está presente nos cotilédones de sementes secas e no eixo embrionário a enzima é detectada a partir da embebição, antes da protrusão da radícula.

A atividade específica da α -galactosidase em sementes de *Dalbergia nigra* aumenta com o início da embebição, tanto nos cotilédones como no eixo embrionário.

A atividade da α -galactosidase foi máxima na temperatura de 50 a 60 °C no eixo embrionário e 50 °C nos cotilédones.

O pH 5,5 foi o de máxima atividade para o eixo embrionário e os cotilédones.

O CuSO_4 e o β -mercaptoetanol inibiram a atividade da α -galactosidase em ambos os compartimentos da semente

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, A.C.S.; Pereira, T.S.; Fernandes, M.J.; Cruz, A.P.M.; Carvalho, A.S.R. Substrato, temperatura de germinação e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Dalbergia nigra*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 517-523, 2006.

Bom, I.; Wassenaar, V.D.; Boot, J. Hybrid affinity chromatography of α -galactosidase from *Verbascum thapsus* L. **Journal of Chromatography** v. 808, p. 133-139, 1998.

Borges, E.E.L.; Borges, R,C,G. Modificação fisiológica em sementes osmocondicionadas de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.).Fr. All). **Revista Árvore**, v. 20, n.2, p. 147-154, 1996.

Borges, E.E.L.; Perez, S.J.G.A.; Borges, R,C,G.; Rezende, S.T.; Garcia, S.R. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril-da-mata). **Revista Árvore**, v. 26, n.5, p. 603-613, 2002.

Borges, E.E.L.; Rezende, S.T.; Borges, R.C.G.; Perez, S.C.J.G.A. Caracterização de alfa-galactosidase e sua relação com a germinação das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinoideae), **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 525-533, 2005.

Borges, E.E.L.; Rezende, S.T.; Borges, R.C.G.; Perez, S.C.J.G.A. Caracterização de alfa-galactosidase em embriões e cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli, Var. pubescens (tamboril-da-mata), **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 82-90, 2004.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

Buckeridge, M.S.; Santos, H.P.; Tiné, M.A.; Aidar, M.P.M. Mobilização de reservas. In: **Germinação: do básico ao aplicado**. Org. Ferreira, A.G.; Borghetti, F. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2004b, 323p.

Buckeridge, M.S.; Aidar, M.P.M. Santos, H.P.; Tiné, M.A. Acúmulo de reservas. In: **Germinação: do básico ao aplicado**. Ferreira, A.G.; Borghetti, F. Org Porto Alegre: Ed. Artmed, 2004a, 323p.

Buckeridge, M.S.; Dietrich, S.M.C. Mobilization of the raffinose family oligosaccharides and galactomanannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae), **Plant Science**, v. 117, p. 33-43, 1996.

Chrost, B; Kolukisaogla, U; Schulz, B; Krupinska, K. An α -galactosidase with an essential function during leaf development. **Planta**, v. 225, n. 2, p. 311-320, 2007,

Dey, P.M. α -galactosidase from sweet chestnut seeds. **Phytochemistry**, v. 20, p. 1493-1496, 1981.

Dey, P.M.; Pridham, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. **Advanced Enzymology**, v. 36, p.91-130, 1972.

Edwards, M.; Scott, C.; Gidley, M.J.; Reid, J.S.G. Control of mannose/galactose ratio during galactomananna formation in developing legume seeds. **Planta**, v. 187, p. 67-74, 1992.

Fialho, L.S. **Purificação e caracterização de uma α -galactosidase em sementes de *Tachigali multijuga* e clonagem parcial do gene da estaquiose sintase de soja**. Viçosa: MG, 2007. 140p. (tese de mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.

Fujimoto, Z.; Kaneko, S.; Monna, M.; Kobayashi, H.; Mizuno, H. Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 20313-20318, 2003.

Guimarães, V.M.; Rezende, S.T.; Moreira, M.A.; Barros, E.G.; Felix, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p. 67-73, 2001.

IBAMA – Lista de flora ameaçada de extinção – acesso em 26 de janeiro de 2008. Site: <http://www.ibama.gov.br/flora/extinção.htm>

Kontos, F.; Spyropoulos, C.G. Seed coat inhibits the production of α -galactosidase and endo- β -mananase in the endosperm of developing carob seed. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 787-793, 1996.

Lahuta, L.; Gorecki, R.J.; Michalczyk, D. ; Piotrowiczslak, A.L.C. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Electronic Journal Polish Agricultural Universities.**, v. 3, p. 1-10, 2000.

Lineweaver, H.; Burke, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemistry Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992, 352p.

McIlvaine, T.C. A buffer solution for colorimetric comparasions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 185-186, 1921.

Oliveira, M.V.; Mota, D.M.; Teixeira, C.R.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Vasconcelos, I.M. Protein and lectin mobilization during *Erythrina velutina* Aurantiaca seed germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 1, p. 25-30, 1998.

Oliveira, G.; Guimarães, V.M.; Borges, E.E.L.; Fialho, L.S.; Oliveira, M.G.A.; Rezende, S.T. Purificação e caracterização de α -galactosidases de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p.535-543, 2005.

Pontes, A.C.; Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G.; Soares, C.P.B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v. 26, n.5, p. 593-601, 2002.

Saraswathy, N. Sadasivam, S. Subha, K.; Poorani, N. Purification and properties of alfa-galactosidase from white-rot fungus *Pleurotus florida*. **Indian Journal Biochemistry Biophysical**, v.44, n. 2, p. 76-81, 2007.

StatSoft, Inc. (2001), Statistic (data analysis sot ware system), Version 6. www. Stasolf.com

Suda, C.N.K.; Giorgini, J.F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n. 3, p. 226-245, 2000.

Viana, S.F. **Caracterização de α -galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose.** Viçosa: MG, 2002. 65p. (Dissertação de mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.

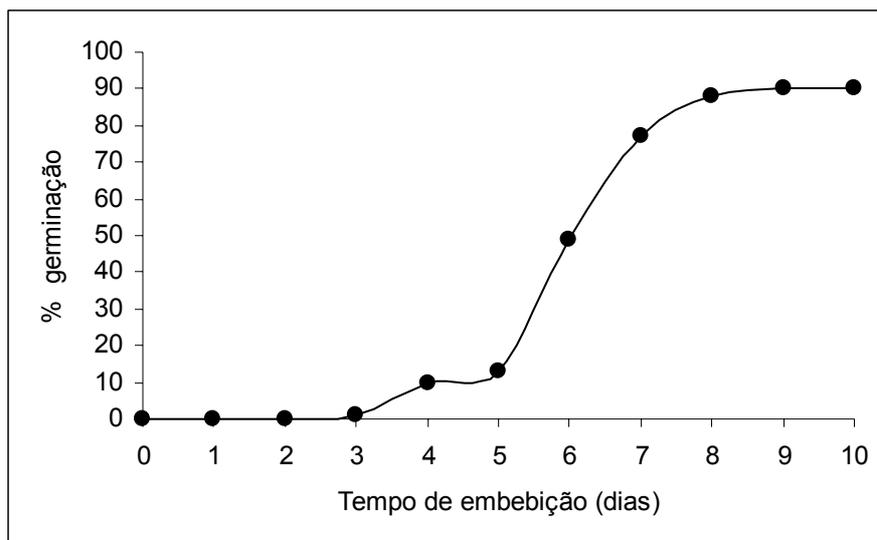


Figura 1 – Porcentagem de germinação cumulativa de sementes de *Dalbergia nigra* ao longo do tempo.

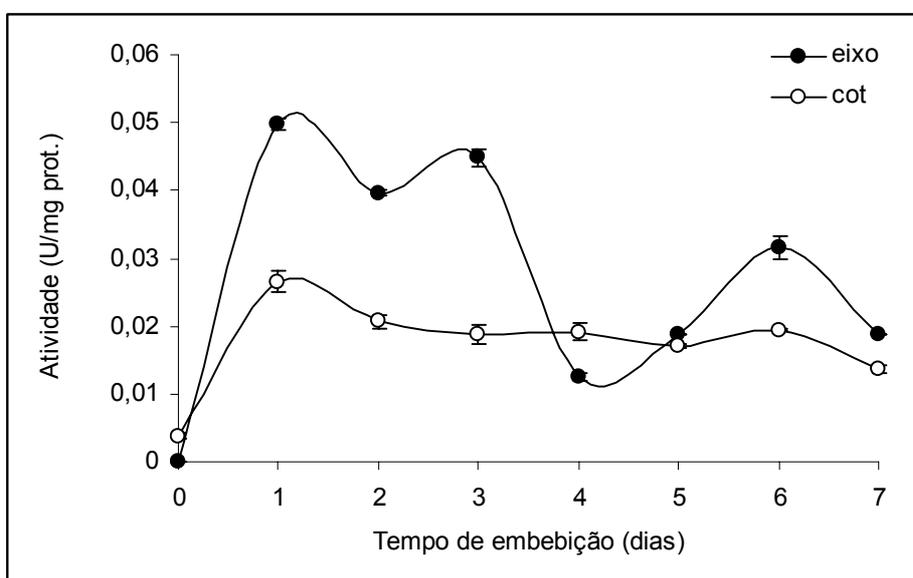


Figura 2- Atividade de α -galactosidase no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação. As barras em y indicam o erro padrão.

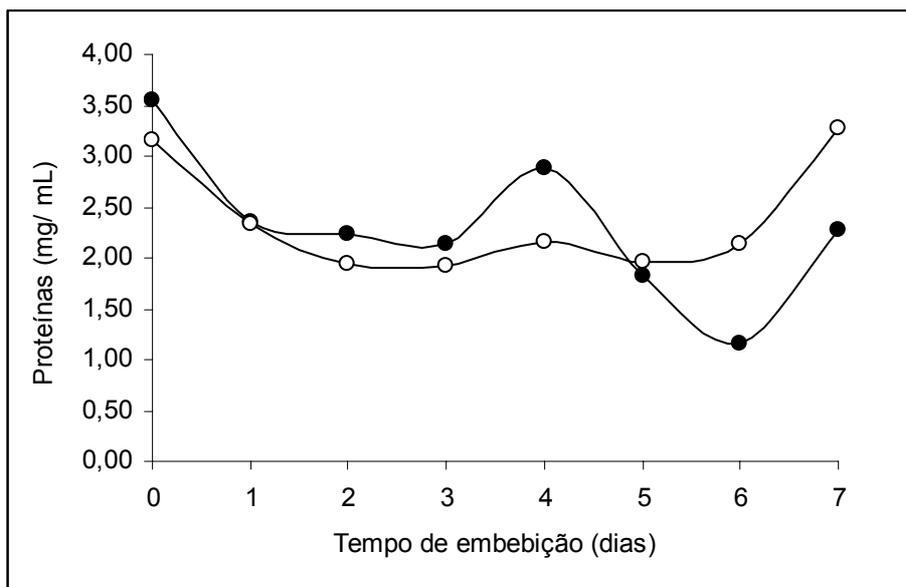


Figura 3 – Teor de proteína no eixo embrionário (●) e nos cotilédones (○) de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação.

(●) $y = -1,489 (-1,370 e^{-1,259x})$, $R^2 = 78,0$

(○) $y = 3,077 - 0,7192x + 0,103x^2$, $R^2 = 82,8$

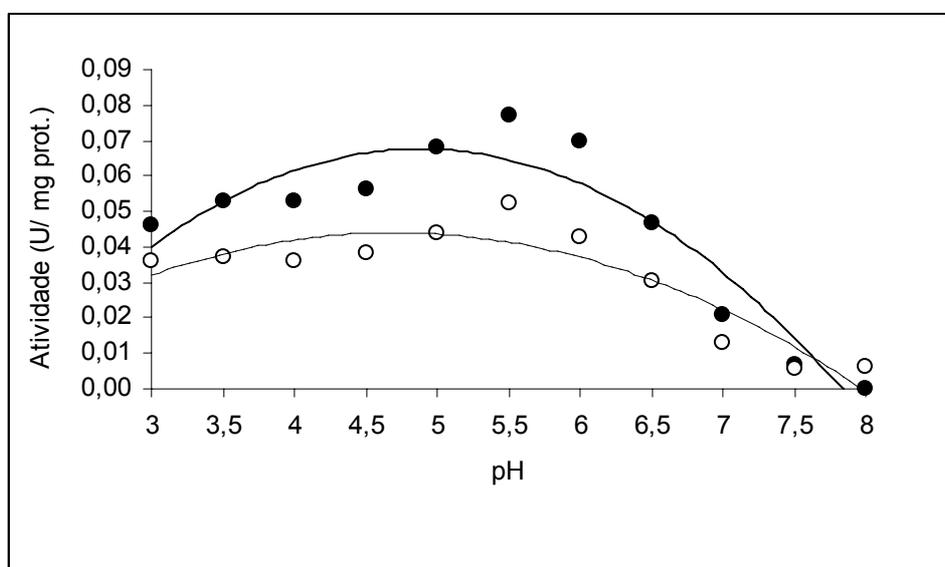


Figura 4 – Efeito do pH na atividade de α -galactosidase no eixo embrionário (●) e nos cotilédones (○) de sementes de *Dalbergia nigra*.

(●) $y = -0,0078x^2 + 0,0757x - 0,1172$, $R^2 = 88$;

(○) $y = -0,0041x^2 + 0,0385x - 0,0466$

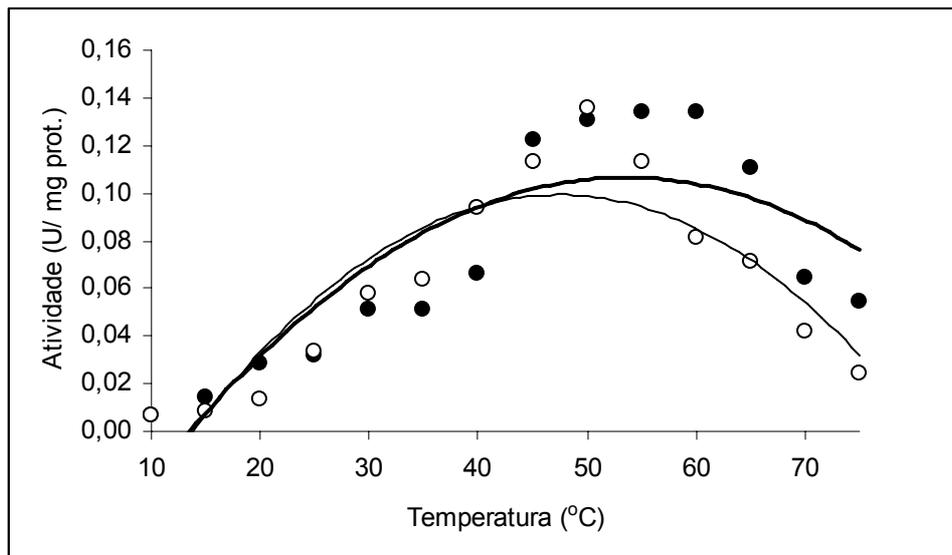


Figura 5 – Efeito da temperatura na atividade de α-galactosidase no eixo embrionário (●) e nos cotilédones (○) de sementes de *Dalbergia nigra*.
 (●) $y = -7E-05x^2 + 0,0071x - 0,0842$, $R^2 = 73,0$
 (○) $y = -9E-05x^2 + 0,0084x - 0,099$, $R^2 = 79,0$

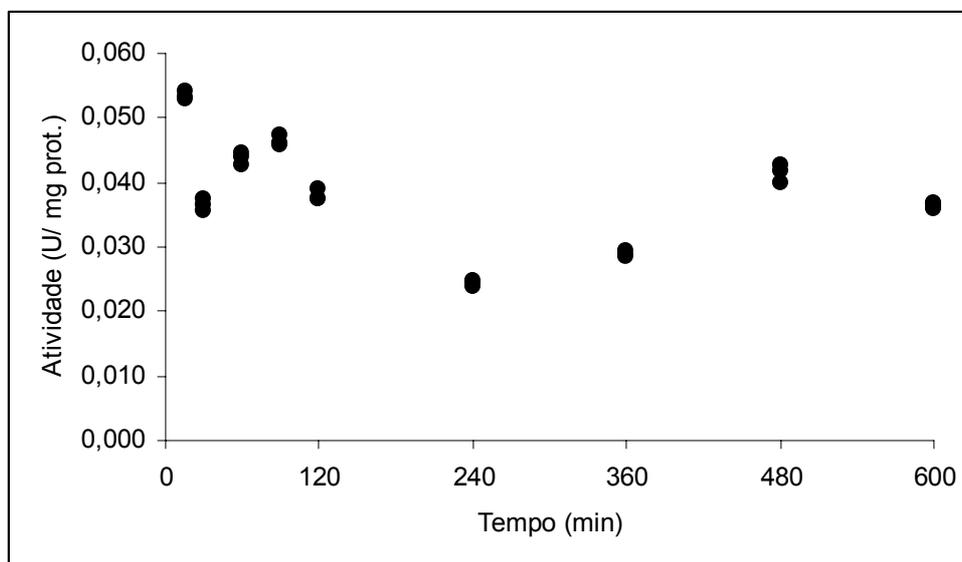


Figura 6 – Meia-vida de α-galactosidase do eixo embrionário de sementes de *Dalbergia nigra* na temperatura de 40 °C.
 $y = 0,0491 - 0,000112x + 0,000000163x^2$, $R = 70,0$

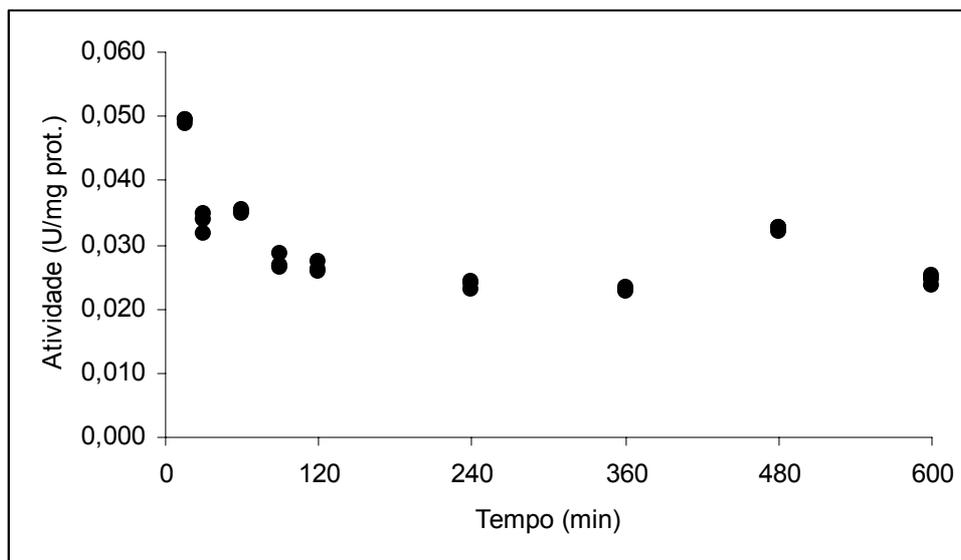


Figura 7 – Meia-vida de α -galactosidade nos cotilédones de sementes de *Dalbergia nigra* na temperatura de 40 °C.
 $y = -0,0383(-0,6883 - e^{(-0,0396x)})$, R= 89,0

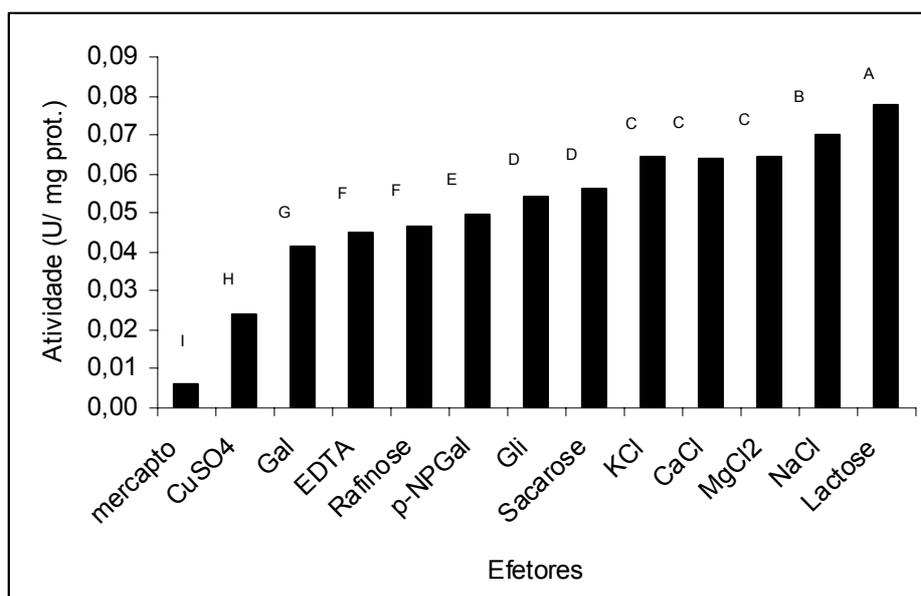


Figura 8 – Efeito de íons e agentes redutores na atividade de α -galactosidade no eixo embrionário de sementes de *Dalbergia nigra*. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de média a 5% de significância.

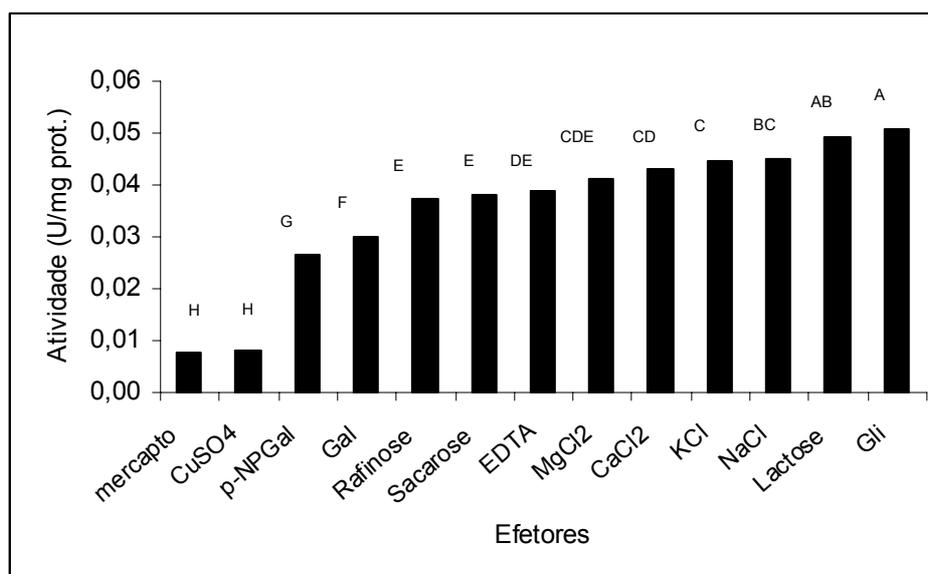


Figura 9 - Efeito de íons e agentes redutores na atividade de α -galactosidase nos cotilédones de sementes de *Dalbergia nigra*. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de média a 5% de significância.

Tabela 1 – Valores de K_M e V_{max} para hidrólise de p-NPGal pela α -galactosidase em sementes de *Dalbergia nigra*.

Fonte de α -galactosidase	K_M (mM)	V_{max} (mM. min ⁻¹)
Eixo embrionário	0,238	0,0053
cotilédones	0,228	0,0051

Artigo II

Caracterização parcial de uma poligalacturonase presente nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes de *Dalbergia nigra*

Claudia Aparecia Pontes, Eduardo Euclides de Lima e Borges, Sebastião Rezende de Tavares, Aderlan Gomes da Silva, Mariana Rocha Lopes, Lanna Clicia Carrijo

Resumo: Acredita-se que a enzima poligalacturonase (PG) esteja envolvida no processo de germinação atuando na camada de pectina. Este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade da enzima PG e fazer sua caracterização parcial nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes de *D. nigra* durante o processo de germinação. A atividade da PG foi detectada a partir do primeiro dia de embebição, tanto nos cotilédones como no eixo embrionário. A atividade máxima nos cotilédones foi detectada no segundo dia e, no eixo, no sexto dia de embebição. A variação no teor de proteínas foi significativa ao longo do tempo, tanto nos cotilédones como nos eixos. A atividade de PG foi máxima na temperatura de 60°C nos cotilédones e nos eixos embrionários a atividade máxima foi observada nas temperaturas de 55 a 60 °C. O pH 4,0 foi o de maior atividade da enzima para ambos os compartimentos. O K_M foi de 5,08 e de 4,39 mM para os cotilédones e eixo, respectivamente. O V_{max} foi de 0,026 mM min⁻¹ para cotilédones e de 0,024 mM min⁻¹ para o eixo embrionário. Com base nos resultados, conclui-se que a enzima PG atua durante a germinação das sementes de *Dalbergia nigra*.

Palavras-chave: *Dalbergia nigra*, poligalacturonase, sementes

Abstract: It is believed that the polygalacturonase (PG) enzyme is involved in the germination process acting in the pectin layer. This work aimed to evaluate the activity of the PG enzyme, to make its partial characterization in the cotyledons and in the embryonic axis of *D. nigra* seeds during the process of germination. The activity of PG was early detected, since the first day of imbibition, in the cotyledons and in the embryonic axis. The maximum activity in the cotyledons was detected at the second day and in the axis at the sixth day of imbibition. The variation in the protein content was significant along the time in the cotyledons and in the

embryonic axis. The activity of PG was maximal at the temperature of 60°C in the cotyledons and in the axis embryonic maximum activity was observed temperatures ranging from 55 to 60 °C. The higher activity of the enzyme was at pH 4.0 for both compartments. The K_M was 5.08 and 4.39 mM for the cotyledons and axis enzyme, respectively. V_{max} was 0,026 mM min⁻¹ for cotyledons and of 0,024 mM min⁻¹ for embryonic axis. Based on these results, we can conclude that the PG enzyme has an important role during the germination of *Dalbergia nigra* seeds.

Key words: *Dalbergia nigra*, polygalacturonase, seeds

1- INTRODUÇÃO

As substâncias pécticas são os principais polissacarídeos constituintes da lamela média da parede celular de plantas superiores (Ishii, 1971). Devido à grande diversidade de suas substâncias, é necessária grande variedade de enzimas para sua degradação (Bailey e Pessa, 1990).

A enzima poligalacturonase (PG) catalisa a clivagem de ligações glicosídicas α -1,4 do ácido péctico (Lazan e Ali, 1993). Ela tem sido caracterizada e purificada em várias espécies vegetais, principalmente em frutos, durante o amadurecimento e em microrganismos como o fungo *Penicillium viridicatum* (De Lorenzo et al., 1987; Silva et al., 2007). Esta enzima apresenta grande importância econômica, principalmente na indústria alimentícia na clarificação de sucos de frutas (Whitaker, 1984).

A PG é responsável pelo amolecimento da parede celular que acompanha a solubilização de pectinas durante o amadurecimento dos frutos (Huber, 1983). Trabalhando com *Lycopersicon esculentum*, Vilas Boas et al. (2000) mostraram aumento na atividade da PG durante o amadurecimento dos frutos.

Ainda há poucos trabalhos mostrando a atuação da enzima PG em sementes durante o processo de embebição. Segundo Sitrit et al. (1999), a enzima poligalacturonase (PG) está envolvida no processo de germinação atuando no amolecimento da parede celular do endosperma em sementes de *Lycopersicon esculentum*.

Embora existam trabalhos mostrando a atuação de enzimas durante o processo de embebição em sementes como *Platymiscium pubescens* (Borges et al, 2002, Oliveira et al. 2005), *Caesalpinia peltophoroides* (Borges et al, 2005) e em sementes de soja (Guimarães et al, 2001), não existem relatos na literatura sobre a PG nesta fase em sementes de *Dalbergia nigra*. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade e caracterizar parcialmente a enzima poligalacturonase presente nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes de *Dalbergia nigra* durante a embebição.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas sementes de *Dalbergia nigra* colhidas no Campus da UFV. Durante o beneficiamento, foram eliminados os frutos imaturos, deteriorados ou danificados. Após o beneficiamento, os frutos foram acondicionados em sacos de aniagem e armazenados em câmara fria a 20°C e umidade relativa de 62 %, até a realização do trabalho.

As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, forradas duplamente com papel tipo Germitest e umedecidas com água destilada. Essas placas foram mantidas em germinador em temperatura de 25°C constante e sob luz contínua, proporcionada por quatro lâmpadas fluorescentes de 40 Watts, tipo luz do dia, por um período de dez dias (Pontes et al., 2002). A contagem de sementes germinadas foi diária, sendo consideradas germinadas aquelas que apresentaram protrusão da radícula.

A extração da enzima foi feita utilizando três repetições de 100 mg de cotilédones ou eixo embrionário macerados separadamente em 1,5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, em gral de porcelana sob gelo. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 20 min, a 4°C e o sobrenadante, utilizado para a determinação da atividade enzimática e da concentração de proteínas solúveis. Para a caracterização enzimática, o extrato foi preparado nas sementes com um dia de embebição.

O ensaio-padrão para determinar a atividade da PG foi determinado pela dosagem de açúcar redutor produzido, segundo o método do DNS (3,5 dinitrossalicílico), descrito por Miller (1959), com modificações. Foi utilizado o ácido poligalacturônico de laranja 0,3 % como substrato na avaliação da atividade da enzima poligalacturonase. A mistura da reação constou de 1500 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 100 μ L do extrato enzimático e 350 μ L de substrato. Os tubos contendo a solução foram mantidos em banho-maria a 40 °C por 60 minutos, sendo interrompida a reação pela adição de 1,0 mL de solução de DNS (3,5 dinitrossalicílico) e colocado para ferver por cinco minutos, e, posteriormente, foram adicionados 2 mL de água destilada. A leitura de absorbância foi feita a 540 nm. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 μ mol de equivalente de glicose por minuto.

A determinação da atividade de PG em função da temperatura foi realizada incubando-se a mistura de reação em banho-maria por 60 minutos, com temperaturas variando de 20 °C a 70 °C com intervalos de 5 °C. A atividade enzimática foi determinada nas mesmas condições do ensaio-padrão.

O pH ótimo de ação da enzima PG foi determinado utilizando-se o tampão McIlvaine (Silva et al., 2007). Os valores de pH utilizados foram de 3,0 a 8,0 com intervalo de 1,0 unidade. A atividade enzimática foi determinada nas mesmas condições do ensaio-padrão.

Os valores de K_M e V_{max} foram determinados com base nas velocidades de reação em presença de 1,0, 1,3, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5 e 6,0 mg/mL do substrato ácido poligalacturônico, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A atividade enzimática foi determinada nas mesmas condições do ensaio-padrão.

A proteína foi extraída com tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0 e quantificado conforme método descrito por Bradford (1976).

O experimento foi montado no delineamento inteiramente ao acaso. Foram utilizadas três repetições, e a leitura da atividade foi feita em triplicatas. Na quantificação dos açúcares, foram utilizadas três repetições. Os dados foram submetidos à análise variância e à regressão. Nos casos em que não se encontrou modelo adequado de ajuste para os dados, calculou-se o erro padrão da média para cada ponto. Para comparar o efeito do pH, foi feita análise de

contrastes. Todas as análises foram feitas a 5% de significância. Utilizou-se o programa Statistica versão 6 (SratSoft, 2001).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra que a porcentagem final de germinação das sementes de *Dalbergia nigra* foi de 90 %. A germinação inicia-se no terceiro dia de embebição, com aumento expressivo a partir do quinto dia.

A atividade da poligalacturonase foi detectada nos cotilédones e no eixo embrionário a partir do primeiro dia de embebição (Figura 2). Nos cotilédones, a atividade da PG é semelhante à do eixo embrionário no primeiro dia. A atividade nos cotilédones decresce a partir do segundo dia de embebição, permanecendo com pequena variação até o sétimo dia, enquanto no eixo embrionário observam-se pequenas variações do primeiro ao quarto dia de embebição, alcançando atividade maior no sexto dia. No sétimo dia, foi observada uma redução na atividade enzimática para valores equivalentes à atividade do primeiro dia de embebição, tanto para o eixo embrionário como para os cotilédones.

A atividade da PG nos cotilédones e no eixo embrionário antecedeu a germinação em dois dias, pois a germinação teve início no terceiro dia de embebição (Figura 1). Contudo, ao longo do período de embebição, há aumento na porcentagem de germinação ao mesmo tempo em que ocorre aumento na atividade da PG no eixo embrionário. Nesta fase, o eixo embrionário está em fase de expansão, e, provavelmente, a enzima PG esteja atuando na perda de coesão entre as células, permitindo o crescimento do eixo. Segundo Lang e Dornenburg (2000) e Brownleader et al. (1999), a PG tem importante papel na dissolução da pectina *in vivo*, sendo uma das enzimas responsáveis pelo amolecimento dos frutos durante o amadurecimento. Esta enzima catalisa a hidrólise das ligações α -1 entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia de pectina (Fischer e Bennett, 1991). Batisse et al. (1994) relatam que a perda de firmeza dos frutos durante o amadurecimento é devida a alterações nos polissacarídeos da parede celular, cujos principais componentes são as substâncias pécticas. Sitrit et al. (1999) observaram que houve aumento da atividade da PG com o decorrer da germinação em sementes de *Lycopersicon esculentum* Mill. Em frutos de *Musa*

acuminata, foi observado aumento na atividade da enzima com o amadurecimento dos frutos (Pathak e Sanwal, 1998). Pimenta et al. (2000) verificaram que a atividade da PG em frutos secos de *Coffea arabica* foi alta, o que pode indicar deterioração nas paredes celulares dos grãos nesse estágio de maturação. Segundo Lima et al. (2006), a atividade da enzima varia entre as espécies.

Os teores médios de proteína nos cotilédones e nos eixos embrionários estão na Figura 3. A variação no teor de proteínas foi significativa ao longo do tempo, tanto nos cotilédones como nos eixos. Os teores de proteínas presentes nos eixos embrionários mostram redução até o terceiro dia de embebição, com aumento no quarto dia, voltando a cair no sexto dia. Segundo Bewley e Black (1994), as proteínas são mobilizadas durante a germinação e subsequente crescimento das plântulas. Resultados obtidos por Suda e Giorgini (2000) indicam que houve translocação de aminoácidos provenientes da degradação da proteína dos cotilédones para o embrião em sementes de *Euphorbia heterophylla*. Borges et al. (2005) relataram que o teor de proteína se mantém estável nos cotilédones da espécie *Caesalpinia peltophoroides* até 24 h de embebição e redução significativa no eixo embrionário. Por outro lado, em sementes de *Apuleia leiocarpa*, os teores de proteínas no eixo embrionário permaneceram constantes durante o período analisado, enquanto nos cotilédones houve acúmulo significativo (Pontes et al., 2002).

A Figura 4 mostra o efeito significativo da temperatura na atividade da PG nos cotilédones e no eixo embrionário. A atividade da PG é maior nos cotilédones na temperatura de 60 °C. No eixo embrionário, o estímulo foi observado na faixa de 55 e 60 °C.

Em frutos de *Mangifera indica*, a temperatura ótima de atividade foi de 40 °C para as três isoformas estudadas (Prasanna et al., 2006). Já em frutos de *Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus inda* e *Berchemia discolos*, a temperatura ótima de atividade está na faixa de 25 °C a 37 °C (Muchuweti et al., 2005). Em *Penicillium viridicatum*, a temperatura ótima de atividade foi de 60 °C (Silva et al., 2007).

A poligalacturonase apresentou atividade máxima no pH 4,0 para ambos os compartimentos analisados (Figura 5). Contudo, a atividade é maior nos cotilédones. A estabilidade de uma enzima é influenciada pelo pH e este varia de

acordo com o a espécie estudada (Muchuweti et al., 2005; Rombout e Pilnik 1978).

Em frutos de *Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus inda* e *Berchemia discolor*, o pH ótimo de atuação da enzima PG foi de 4,5 a 5,0, mostrando que o pH também varia de acordo com a espécie estudada (Muchuweti et al., 2005). Nos frutos de manga, o pH ótimo foi diferente nas três isoformas analisadas: de 3,2, 3,6 e 3,9 para PGI, PGII e PGIII, respectivamente (Prasanna et al., 2006).

Os dados referentes às concentrações do substrato ácido poligalacturônico versus a velocidade de sua hidrólise pela PG dos cotilédones e do eixo embrionário estão na Tabela 1. O K_M indica a afinidade da enzima pelo substrato, e quanto menor o valor de K_M , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. O valor do K_M foi de 5,08 e de 4,39 mM para cotilédones e eixo embrionário, respectivamente. A diferença entre ambos os valores indica que provavelmente as enzimas sejam diferentes. Já o valor de V_{max} foi de 0,026 mM min⁻¹ para os cotilédones e de 0,024 mM min⁻¹ para o eixo embrionário.

Em frutos de *Mangifera indica*, o valor de K_M foi de 0,25, 0,23 e 0,22 mg mL⁻¹ para as isoformas PGI, PGII e PG III, respectivamente; e o valor de V_{max} foi de 5,7, 3,6 e 4,4 μmol min⁻¹ para as três isoformas da enzima (Prasanna et al., 2006). A comparação entre o valor de K_M de sementes de *D. nigra* com o K_M de frutos de *Mangifera indica* mostra que a afinidade da enzima PG pelo substrato foi menor, sendo, portanto, enzimas distintas atuando em diferentes espécies e compartimentos.

4- CONCLUSÕES

Foi detectada atividade da enzima poligalacturonase nos cotilédones e no eixo embrionário das sementes de *D. nigra*, a partir do primeiro dia de embebição.

As temperaturas de maior atividade da enzima foram de 60 °C nos cotilédones e de 55 e 60 °C para o eixo embrionário.

O pH 4,0 foi o que mais estimulou a atividade da enzima para ambos os compartimentos.

O valor de K_M foi de 5,08 e de 4,39 mM para cotilédones e eixo embrionário, respectivamente.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bailey, M.J.; Pessa, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 12, p. 266-271, 1990.

Batisse, C.; Fils-Lycaon. B.; Buret, M. Pectin changes in ripening cherry fruit. **Journal of Food Science**, v. 59, n.2, p. 389-393, 1994.

Bewley, J.D.; Black, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2° ed. New York: Plenum, 1994, 445p.

Borges, E.E.L.; Perez, S.J.G.A.; Borges, R.C.G.; Rezende, S.T.; Garcia, S.R. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril-da-mata). **Revista Árvore**, v. 26, n.5, p. 603-613, 2002.

Borges, E.E.L.; Rezende, S.T.; Borges, R.C.G.; Perez, S.C.J.G.A. Caracterização de alfa-galactosidase e sua relação com a germinação das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinoideae), **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 525-533, 2005.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. New York, v. 72, p. 248-254, 1976

Brownleader, M.D.; Jackson, P.; Mobasher, A.; Pantelides, A.T.; Sumar, S.; Trevan, M.; Dey, P.M. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, p. 149-164, 1999.

De Lorenzo, G.; Silva, G.; Degra, L.; D'ovidio, R.; Cervone, F. Induction of extracellular polygalacturonase and its mRNA) in the phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme*, **Journal Gene Microbiological**, v. 133, p.3365-3373, 1987.

Fischer, R.L.; Bennett, A.B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review Physiology Plant Molecular Biology**. v. 42, p. 675-703, 1991.

Guimarães, V.M.; Rezende, S.T.; Moreira, M.A.; Barros, E.G.; Felix, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p. 67-73, 2001.

Huber, D.J. Polyuronides degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 108, p. 405-409, 1983.

Ishii, S.; Yokotsuka, T. Pectin trans-eliminase with fruit juice clarifying activity, **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 19, p. 958-961, 1971.

Lang, C.; Dornenbrung, H. Perspectives in the biological function and the technological application of poligalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 366-375, 2000.

Lazan, H.; Ali, Z.M. Cell wall hidrolases and their potential in manipulation of ripening of tropical fruits. **ASEAN Food Journal**, v. 8, n. 2, p. 47-53, 1993.

Lima, M.A.C.; Alves, R.E. Filgueiras, H.A.C. Mudanças relacionadas ao amadurecimento da graviola durante a maturação pós-colheita, **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.2, p. 1707-1713, 2006.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. V. 31, p. 426-428, 1959.

Muchuweti, M.; Moyo, E.; Mushipe, S. Some properties of the polygalacturonase from four Zimbabwean wild fruits (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus inda* and *Berchemia discolor* fruits). **Food Chemistry**, v. 90, p. 655-661, 2005.

Oliveira, G.; Guimarães, V.M.; Borges, E.E.L.; Fialho, L.S.; Oliveira, M.G.A.; Rezende, S.T. Purificação e caracterização de α -galactosidasas de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p.535-543, 2005.

Pathak, N.; Mishra, S.; Sanwal, G.G. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. **Phytochemistry**, v. 54, n. 2, p. 147-152, 1998.

Pimenta, C.J.; Chagas, S.J.R.; Costa, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica* L.) colhidos em quatro estádios em maturação. **Ciências agrotecnica**, v. 24, n. 4, p. 1079-1083, 2000.

Pontes, C. A; Borges, E.E.L; Borges, R.C.G.; Soares, C.P.B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v. 26, n. 5, p.593-601, 2002.

Prasanna, V.; Prabha, T.N.; Tharanathan, R.N. Multiples forms pf polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L. cv Alphonso) fruit. **Food Chemistry**, v. 95, p. 30-36, 2006.

Rombout, F.M.; Pilnik, W, Enzymes in fruit and vegetable juice technology. **Process Biochemistry**, p. 9-13, 1978.

Silva, D.; Martins, E. S.; Leite, R.S.R.; Silva, R.; Gomes, V.F.E. Purification and characterization of an exo-polygalacturosase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1237-1243, 2007.

Sitrit, Y.; Hadfield, K.A.; Bennett, A.B.; Bradford, K.J.; Downie, A.B. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. **Plant Physiology**, v. 121, p. 419-428, 1999.

StatSoft, Inc. (2001), Statistic (data analysis software system), Version 6. www.Stasolf.com

Suda, C.N.K.; Giorgini, J.F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n. 3, p. 226-245, 2000.

Vilas Boa, E.V.B.; Chitarra, A.B.; Maluf, W.R.; Chitarra, M.I.F. Modificações texturais de tomates heterozigotos no loco Alcobaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p. 1447-1453, 2000.

Whitaker, J. Pectic substances, pectic enzyme and haze formation in fruit juices, **Enzymology Microbiology Technology**, v. 6, p. 341-349, 1984.

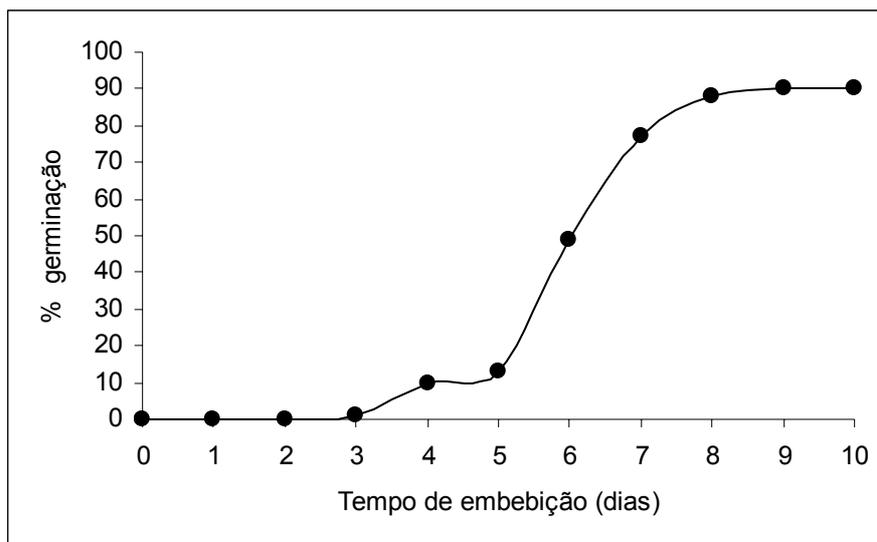


Figura 1 – Porcentagem de germinação cumulativa de sementes de *Dalbergia nigra* ao longo do tempo.

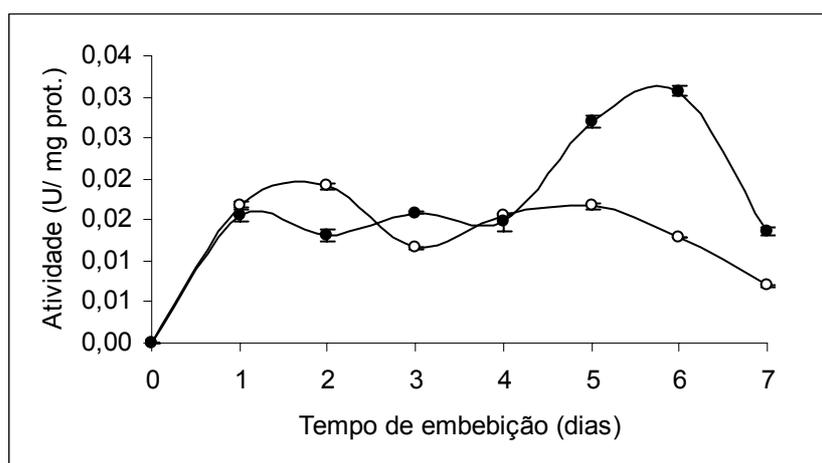


Figura 2 - Atividade de Poligalacturonase em sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação. (●) eixo embrionário, (○) cotilédones. As barras em y indicam o erro padrão

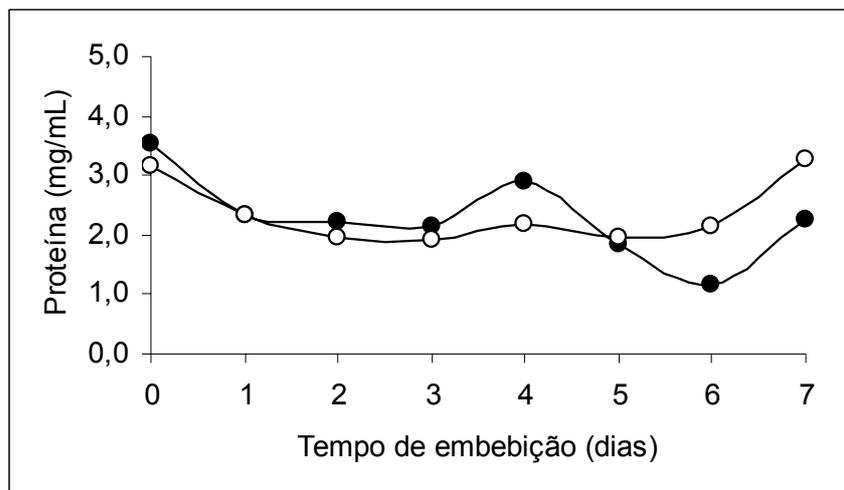


Figura 3 – Teor de proteína em sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação. (●) eixo embrionário, (○) cotilédones.

○ $y = 3,077 - 0,7192x + 0,103 x^2$ $R^2 = 77,8$
 ● $y = -1,489 (-1,370 e^{(-1,259x)})$ $R = 71,0$

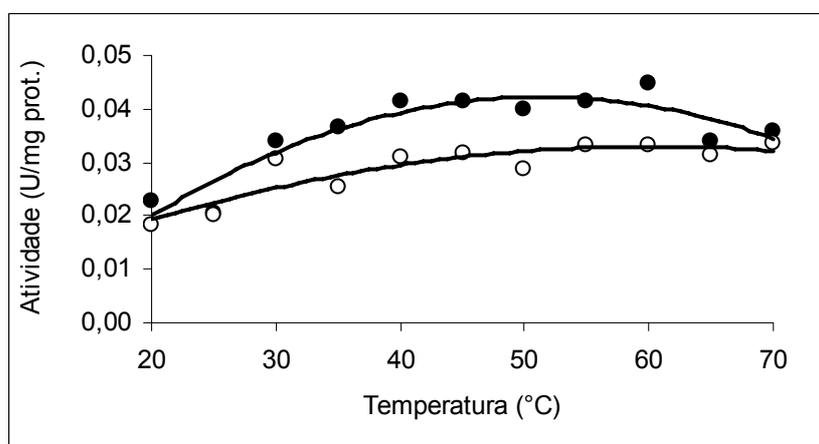


Figura 4 – Efeito da temperatura na atividade de poligalacturonase em sementes de *Dalbergia nigra*. (○) eixo embrionário, (●)Cotilédones

(●) $y = -0,0171 + 0,00231x - 0,0000224x^2$ $R^2 = 82,8$;
 (○) $y = 0,00229 + 0,00103x - 0,0000086x^2$ $R^2 = 78,0$

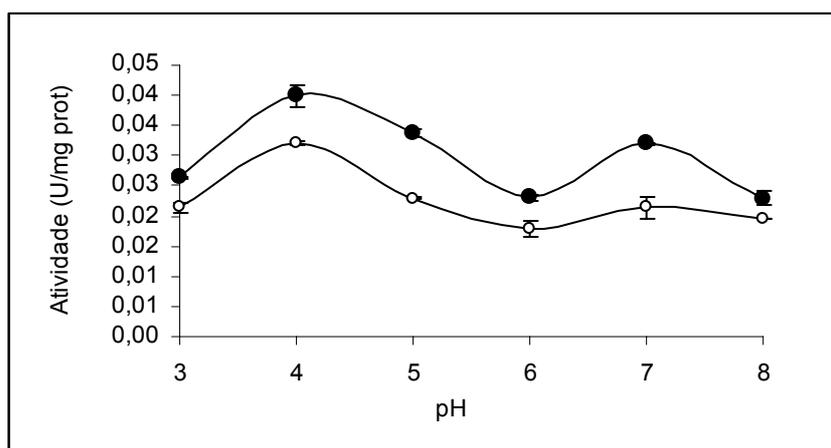


Figura 5 - Efeito do pH na atividade da poligalacturonase sementes de *Dalbergia nigra*. (●) cotilédones; (○) eixo embrionário. As barras em y indicam o erro padrão

Tabela 1 – Valores de K_M e V_{max} para hidrólise de ácido poligalacturônico pela poligalacturonase em sementes de *Dalbergia nigra*.

Fonte de poligalacturonase	K_M (mM)	V_{max} (mM. min ⁻¹)
Eixo embrionário	4,39	0,024
Cotilédones	5,07	0,026

Artigo III

Caracterização parcial de uma poligalacturonase e análise dos carboidratos presentes nos tegumentos de sementes de *Dalbergia nigra*

Claudia Aparecia Pontes, Eduardo Euclides de Lima e Borges, Sebastião Rezende de Tavares, Aderlan Gomes da Silva, Lanna Clicia Carrijo, Mariana Rocha Lopes.

Resumo: Para ocorrer a germinação é necessário o enfraquecimento dos tecidos que envolvem o eixo embrionário. Este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade e fazer a caracterização parcial da poligalacturonase (PG) e verificar a composição e a alteração dos açúcares que compõem a parede celular e a fração pectínica no tegumento de sementes de *D. nigra* durante o processo de embebição. A atividade específica da PG foi detectada a partir do primeiro dia de embebição, sendo máxima no terceiro dia. O teor de proteína foi de 2,9 mg mL⁻¹ nos tegumentos secos, reduzindo-se para 0,784 mg mL⁻¹ no sexto dia. A atividade de PG foi máxima nas temperaturas de 40 a 50 °C. O pH de maior atividade da enzima ficou na faixa de 3 a 7. O K_M e o V_{max} para hidrólise do ácido poligalacturônico foi de 1,34 mM e 0,012 μmol min⁻¹, respectivamente. Verificou-se que a galactose é o principal componente da pectina, seguido pela manose. Na parede celular, o principal componente foi a arabinose, seguida pela xilose. A PG atua durante a germinação em sementes de jacarandá contribuindo para o amolecimento da parede celular vegetal do tegumento, sendo importante para a germinação de sementes.

Palavras-chave: *Dalbergia nigra*, poligalacturonase, carboidratos, sementes.

Abstract: The loosening of embryonic axis tissues is necessary to seed germination. This work aimed to evaluate the activity and to do the partial characterization of the polygalacturonase (PG) enzyme and to verify the composition and the alteration of the sugars that compose the cell wall and the pectin portion in the teguments of seeds of *D. nigra* during the process of imbibition. The activity of PG was detected from the first day of imbibition, on getting its maximum in the third day. The protein content was 2,9 mg mL⁻¹ in the dry teguments reducing for 0,784 mg mL⁻¹ in the sixty day. The activity of PG was

higher at temperatures ranging from 40 to 50 °C. The higher activity of the enzyme was in the pH ranging from 3,0 to 7,0. The K_M and V_{max} for hydrolyze of the polygalacturonic acid were, respectively 1,34 mM and $0,012 \mu\text{mol min}^{-1}$. It was verified that the galactose is the most important component of the pectin, followed by mannose. In the cell wall the most important component was the arabinose, followed by xylose. PG acts during the germination in *D. nigra* seeds contributing the cell wall loosening of the tegument, being important for the germination the seeds.

Key words: *Dalbergia nigra*, polygalacturonase, carbohydrates, seeds.

1- INTRODUÇÃO

A germinação tem início com a embebição das sementes, estimulando a síntese de enzimas ou a ativação daquelas pré-existentes, resultando na mobilização de reservas e na digestão da parede celular, enfraquecendo-a e permitindo que a raiz primária rompa o tegumento (Borges e Rena, 1993). Bewley (1997) verificou que o processo de amolecimento do endosperma de sementes de *Lycopersicon esculentum* é acompanhado pelo incremento da atividade da endo-beta-1,4-mananase. Toorop et al. (1996) e Still e Bradford (1997) relataram que a enzima mananase não seria a responsável pelo amolecimento do endosperma, pois sua atividade é muito baixa em sementes de *Lycopersicon esculentum*. Sitrit et al. (1999) sugerem que a poligalacturonase (PG) esteja envolvida neste processo, atuando no amolecimento da parede celular do endosperma micropilar em sementes de *Lycopersicon esculentum* Mill.

As substâncias pécticas são os principais constituintes da lamela média da parede celular das plantas superiores (Taiz e Zinguer, 2004). Tem sido observada a atuação da enzima PG no processo de amadurecimento de frutos de *Lycopersicon esculentum*, de *Musa velutina*, no crescimento do tubo polínico, de raízes laterais, na abscisão de órgãos e na deiscência de sementes (Clarke e Gleeson, 1981; Peretto et al., 1992; Taylor et al., 1990). Toorop et al. (2000) concluíram que a germinação de sementes de *Lycopersicon esculentum* ocorria devido ao enfraquecimento mecânico do endosperma. Mas poucos trabalhos têm

associado o enfraquecimento mecânico do tegumento com a atividade de enzimas e a parede celular (Bewley, 1997).

A espécie *Dalbergia nigra* (Leguminosae-Papilionoidea) é nativa da Mata Atlântica, encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. A espécie é adaptada a locais secos, indicada para plantio misto em áreas degradadas, possuindo características pioneiras (Lorenzi, 1992). Devido à exploração da sua madeira e à falta de replantios, a espécie está classificada como vulnerável, conforme “Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção” (IBAMA, 2008).

Não há estudos aprofundados a respeito de enzimas que atuem durante a germinação de sementes de *D. nigra*, principalmente em relação às enzimas relacionadas aos tegumentos. Estudos desta natureza são importantes, especialmente em se tratando de espécies em risco de extinção, como subsídios para o armazenamento, pois a inatividade de determinadas enzimas permitirá reduzir o ritmo metabólico da semente. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade e caracterizar parcialmente a poligalacturonase, bem como verificar a composição e a alteração dos açúcares presentes na parede celular e na fração péctica dos tegumentos das sementes de *Dalbergia nigra* durante a fase de embebição.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas sementes de *Dalbergia nigra* colhidas em Viçosa, Minas Gerais. Durante o beneficiamento foram eliminados os frutos imaturos, deteriorados ou danificados. Os frutos foram acondicionados em sacos de aniagem e armazenados em câmara fria a 20°C e umidade relativa de 62 %, até a realização do trabalho.

A germinação foi acompanhada em sementes colocadas em placas de Petri de nove cm de diâmetro, forradas duplamente com papel tipo Germitest e umedecida com água destilada. Essas placas foram mantidas em germinador em temperatura de 25°C constante e sob luz contínua, proporcionada por quatro

lâmpadas fluorescentes de 40 Watts, tipo luz do dia, por um período de dez dias. A contagem de sementes germinadas foi diária, sendo consideradas germinadas aquelas que apresentavam protrusão da radícula (Pontes et al., 2002). Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes.

Durante seis dias foram retiradas amostras, quando então as sementes foram dissecadas em cotilédones, eixo embrionário e tegumento. O material foi utilizado para preparar o extrato enzimático e também para fazer a quantificação do teor de açúcares. Nas amostras frescas de tegumento, foi feita a caracterização parcial da poligalacturonase. O material utilizado para fazer a análise de açúcar foi seco em estufa a 45°C, até peso constante, acondicionado em vidros hermeticamente fechados e mantidos no freezer até a extração e quantificação dos açúcares da parede celular.

A extração de parede celular e a separação da fração péctica dos tegumentos de *Dalbergia nigra* foram feitas conforme descrito por Carpita e Gilbeaut (1993). A digestão da parede celular e da fração péctica dos tegumentos foi feita conforme metodologia descrita por Borges et al. (2000), e a quantificação dos açúcares redutores, conforme Englyst e Cummings (1984).

Os cromatogramas foram obtidos com o uso do cromatógrafo a gás Shimadzu CG14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um registrador e integrador C-R6A chromatopac. Utilizou-se coluna moderadamente polar, 50% de cianopropilfenildimetilsiloxane. O fluxo de gás foi de 0,25 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor, do detector e da coluna foram de 250 °, 220 ° e 275 °C, respectivamente. Foram utilizadas três repetições, com duas réplicas cada.

O extrato enzimático foi preparado, utilizando-se 100 mg de tegumento macerado em 1,5 mL do tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 em gral de porcelana sob gelo. Após a maceração, a amostra foi centrifugada a 14000 g por 20 min, a 4°C e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade da enzima e o teor de proteínas.

Utilizou-se como substrato o ácido poligalacturônico de laranja (Sigma) 0,3 % na avaliação da atividade da enzima poligalacturonase. O ensaio-padrão constou de 1500 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 100 µL do extrato enzimático e 350 µL de substrato. Os tubos contendo a solução foram mantidos em banho-maria, a 40 °C, por 60 minutos, sendo interrompida a reação

pela adição de 1,0 mL de solução de DNS (3,5 dinitrossalicílico) e colocado para ferver por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de água destilada. A leitura de absorvância foi feita a 540 nm. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de proteína necessária para produzir um μmol de glicose por minuto.

A proteína foi extraída com tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0 e quantificado conforme método descrito por Bradford (1976).

A determinação da atividade de PG em função da temperatura foi realizada incubando-se a mistura de reação em banho-maria, por 60 minutos, com temperaturas variando de 20 °C a 70 °C, com intervalos de 5 °C. A atividade enzimática foi determinada como descrito no ensaio-padrão

O pH ótimo de ação da PG foi determinado utilizando-se o tampão McIlvaine (Silva et al., 2007). Os valores pH utilizados foram de 3,0 a 8,0 com intervalo de 1,0 unidade. A atividade enzimática foi determinada como descrita no ensaio-padrão.

O valor de K_M e V_{max} foram determinados com base nas velocidades de reação em presença de 1,0, 1,3, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5 e 6,0 mg mL^{-1} do substrato ácido poligalacturônico, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente ao acaso. Foram utilizadas três repetições e a leitura da atividade foi feita em triplicatas. Na quantificação dos açúcares, foram utilizadas três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão. Nos casos em que não se encontrou modelo adequado aos dados, calculou-se o erro padrão da média para cada ponto. Para comparar o efeito do pH, foi feita análise de contrastes. Todas as análises foram feitas a 5% de significância. Utilizou-se o programa Statistica versão 6 (SratSoft, 2001).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a germinação das sementes de *D. nigra* teve início no terceiro dia de embebição, chegando a 90% de germinação total (Figura 1). Em outros trabalhos, a germinação das sementes de *D. nigra* foi mais lenta e a porcentagem final menor, tendo Andrade et al. (2006) encontrado 70 % de germinação ao final de 30 dias de análise.

As modificações na composição dos açúcares redutores da parede celular do tegumento podem ser observadas na Figura 2. Todos os açúcares componentes da parede celular tiveram redução significativa nas primeiras 24 horas de embebição, com exceção da xilose cujo conteúdo variou ao longo do período. Dentre os açúcares determinados no tegumento seco, o maior teor foi para arabinose. O teor de manose sofreu redução significativa a partir do início da embebição até o quarto dia, não sendo mais detectado nos dois últimos dias. A ramnose apresentou o menor teor nos tegumentos secos entre os açúcares analisados, com redução significativa durante o processo de germinação.

Na Figura 3, observam-se os açúcares componentes da fração pécica do tegumento das sementes de *D. nigra*. Houve redução significativa durante o período analisado nos teores de ramnose, arabinose, manose, galactose e glicose. O teor de xilose variou com o tempo de embebição, porém sua redução não foi significativa.

As reduções observadas nos teores dos açúcares da parede celular e da fração pécica nas primeiras 24 horas podem estar relacionadas com sua mobilização para o eixo embrionário em crescimento ou podem estar sendo lixiviadas para o meio de embebição. Borges et al. (2000) relataram que não houve movimentação dos açúcares do tegumento para o eixo embrionário em sementes de *Dalbergia nigra*. Segundo os mesmos autores, possivelmente, os açúcares teriam sido lixiviados para o meio.

Segundo Bhatti (1990) e Goonerate et al. (1994), a parede celular de leguminosas possui grande quantidade de arabinose na fração pécica. Resultado semelhante ao encontrado nos tegumentos de *D. Nigra*, em que a arabinose é o segundo açúcar com maior teor. No tegumento de *Phaseolus vulgaris*, os principais componentes foram xilanas e arabinanas (Shiga e Lajolo, 2006). Segundo os mesmos autores, há evidências da presença de grande quantidade de cadeias ramificadas com arabinanas e baixa ramificação de xiloglucanas. Segundo Huber et al. (1983), as alterações no conteúdo de pectina estão associadas à degradação enzimática.

Não foi detectada atividade da enzima PG nos tegumentos secos das sementes de *D. nigra*, mas foi verificado um aumento da atividade a partir do início da embebição, sendo maior no terceiro dia, decrescendo em seguida (Figura 4). A germinação das sementes teve início no terceiro dia de embebição,

o que coincide com o máximo de atividade da enzima poligalacturonase. Com base nesses resultados, pode-se atribuir à enzima poligalacturonase participação no processo de amolecimento do tegumento das sementes de *D. nigra*. Segundo Borges e Rena (1993), para ocorrer a germinação, é necessário o enfraquecimento do tecido próximo à radícula, tendo este processo início com a embebição das sementes. Sitrit et al. (1999) concluíram que a enzima PG está envolvida no processo de amolecimento do endosperma micropilar de sementes de *Lycopersicon esculentum*.

Nos tegumentos de sementes de *D. nigra*, foi possível verificar que, com o aumento da atividade da enzima PG, houve redução significativa dos açúcares componentes da parede celular e da fração péctica, o que pode estar relacionado com a perda de coesão das células do tegumento, resultando assim no rompimento do tegumento pelo eixo embrionário.

Pimenta et al. (2000) verificaram que a atividade da enzima PG em frutos secos de *Coffea arabica* foi alta, o que pode indicar deterioração nas paredes celulares dos grãos nesse estágio de maturação. Segundo Lima et al. (2006), a atividade da poligalacturonase varia entre as espécies.

O teor de proteína nos tegumentos secos de sementes *D. nigra* foi de 2,90 mg mL⁻¹, apresentando queda no primeiro dia de embebição e aumento a partir do quarto dia (Figura 5). O aumento no teor de proteína pode ser resultado da lixiviação de proteínas presentes nos cotilédones. Em sementes de *Apuleia leocarpa*, foi observado aumento no teor de proteínas nos cotilédones no período de germinação (Pontes et al., 2002).

O aumento da temperatura resulta em maior atividade de enzimas até certo ponto, a partir do qual começa a ocorrer redução até a perda total da atividade. Porém, os resultados encontrados nesse trabalho mostram picos de atividade da enzima PG, e a maior atividade foi a 25, 40 a 45 e 60 °C (Figura 6), sendo, provavelmente, isoformas diferentes da mesma enzima. Em frutos de *Mangifera indica*, a temperatura ótima de atividade foi de 40 °C para as três isoformas estudadas (Prasanna et al., 2006). Já em frutos de *Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus inda* e *Berchemia discolos*, a temperatura ótima esteve na faixa de 25 °C a 37 °C (Muchuweti et al., 2005). A poligalacturonase tem sido caracterizada em fungos, como *Penicillium viridicatum*, com temperatura ótima de 60 °C (Silva et al., 2007).

A poligalacturonase apresentou atividade na faixa de pH de 3,0 a 7,0 (Figura 7), não havendo diferença significativa entre esses valores. O maior erro padrão entre os dados dos diferentes valores de pH indicaria que podem estar ocorrendo modificações conformacionais nas moléculas, proporcionando alterações no sítio ativo, que pode resultar no aumento ou redução de sua afinidade pelo substrato (Rombout e Pilnik 1978). Em pH 8,0, houve redução significativa na atividade da enzima. Em frutos de *Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus inda* e *Berchemia discolor*, o pH ótimo de atuação da enzima PG foi de 4,5 a 5,0, mostrando que o efeito do pH varia de acordo com a espécie estudada (Muchuweti et al., 2005).

Nos frutos de *Mangifera indica*, os valores ótimos de pH nas diferentes isoformas foram de 3,2, 3,6 e 3,9 para PGI, PGII e PGIII, respectivamente (Prasanna et al., 2006). No fungo *Penicillium viridicatum*, o pH ótimo foi de 6,0, (Silva et al., 2007).

Os valores de K_M e de V_{max} para hidrólise do ácido poligalacturônico foram de 1,34 mM e $0,012 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente (Figuras 8 e 9). Em frutos de *Mangifera indica*, o valor de K_M foi de 0,25, 0,23 e 0,22 mg mL^{-1} para as isoformas PGI, PGII e PG III, respectivamente, enquanto o V_{max} foi de 5,7, 3,6 e 4,4 $\mu\text{mol min}^{-1}$ para as três isoformas da enzima (Prasanna et al., 2006).

4- CONCLUSÕES

A poligalacturonase demonstrou atividade no tegumento das sementes de *D. nigra* a partir do primeiro dia de embebição.

A maior atividade da enzima foi verificada na faixa de 40 a 45 °C e pH de 3,0 e 7,0.

O K_M e o V_{max} para hidrólise do ácido poligalacturônico foi de 1,34 mM e $0,012 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente.

Houve redução significativa no teor dos açúcares componentes da parede celular e da fração péctica ao longo do período de embebição.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, A.C.S.; Pereira, T.S.; Fernandes, M.J.; Cruz, A.P.M.; Carvalho, A.S.R. Substrato, temperatura de germinação e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Dalbergia nigra*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 517-523, 2006.
- Bewley, J.D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, v. 9, p. 1055-1066, 1997.
- Bhatty, R.S. Cooking quality of lentils: The role of structure and composition of cell walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n. 2, p. 376-383, 1990.
- Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G.; Buckeridge, M.S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de jacarandá-da-bahia osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n.1, p. 10-16, 2000.
- Borges, E.E.L.; Rena, A.B. Germinação de sementes. In: **Sementes Florestais Tropicais**. Aguiar, I.B.; Pinã-Rodrigues, F.C.M. Figliolia, M.B. Cood. Brasília: ABRATES, 1993, 350p.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- Carpita, N.G.; Gilbeaut, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993
- Castro, R.D.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: **Germinação do básico ao aplicado**. Org. Ferreira, A.G.; Borghetti, F. Porto Alegre; Ed. Artmed, 2004, 323p.
- Clarke, A.E.; Gleeson, P.A. Molecular aspects of recognition and response in pollen-stigma interactions. **Rec. Adv. Phytochem**, v. 15, p. 161-211, 1981.
- Englyst, H.N.; Cummings, J.H. Simplified method for the measurement of non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugar as alditol acetates. **Analyst.**, v. 109, p. 937-942, 1984.
- Gooneratne, J.; Needs, P.W.; Ryden,P.; Selvendran, R.R. Structural features of cell wall polysaccharides from the cotyledons of mung bean *Vigna radiata*. **Carbohydrate Research**, v. 256, n. 1, p. 61-67, 1994.
- Huber, D.J. Polyuronideos degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 108, p. 405-409, 1983.

IBAMA – Lista de flora ameaçada de extinção – acesso em 26 de janeiro de 2008.
Site: <http://www.ibama.gov.br/flora/extinção.htm>

Lima, M.A.C.; Alves, R.G.; Filgueiras, H.A.C. Mudanças relacionadas ao amadurecimento da graviola durante a maturação pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; v. 41, n.2, p. 1707-1713, 2006.

Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992, 352p.

Muchuweti, M.; Moyo, E.; Mushipe, S. Some properties of the polygalacturonase from four Zimbabwean wild fruits (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus inda* and *Berchemia discolors* fruits). **Food Chemistry**, v. 90, p. 655-661, 2005.

Peretto, R.; Favaron, F.; Bettini, V.; DeLorenzo G.; Marini, S.; Alghisi, P.; Cervone, F.; Bonfante, P. Expression and localization of polygalacturonase during the outgrowth of lateral roots in *Allium porrum* L. **Planta**, v. 188, p. 164-172, 1992.

Pimenta, C.J.; Chagas, S.J.R.; Costa, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica* L.) colhido em quatro estádios em maturação. **Ciência agrotecnica**, v. 24, n. 4, p. 1079-1083, 2000.

Pontes, C. A; Borges, E.E.L; Borges, R.C.G.; Soares, C.P.B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v. 26, n. 5, p.593-601, 2002.

Prasanna, V.; Prabha, T.N.; Tharanathan, R.N. Multiples forms pf polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L. cv Alphonso) fruit. **Food Chemistry**, v. 95, p. 30-36, 2006.

Rombout, F.M.; Pilnik, W, Enzymes in fruit and vegetable juice technology. **Process Biochemistry**, p. 9-13, 1978.

Shiga, T.M.; Lajolo, F.M. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) composition and structure. **Carbohydrate Polymers**, v.63, n. 1, p.1-12, 2006.

Silva, D.; Martins, E. S.; Leite, R.S.R.; Silva, R.; Gomes, V.F.E. Purification and characterization of an exo-polygalacturosase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1237-1243, 2007.

Sitrit, Y.; Hadfield, K.A.; Bennett, A.B.; Bradford, K.J.; Downie, A.B. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. **Plant Physiology**, v. 121, p. 419-428, 1999.

StatSoft, Inc. (2001), Statistic (data analysis software system), Version 6. www. Stasolf.com.

Still, D.W.; Bradford, K.J. Endo-beta-mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation to germination rates. **Plant Physiology**, v. 113, n. 1, p. 21-29, 1997.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. Tradução Santarém, E.R. (et al.) 3º Ed. - Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

Taylor, J.E.; Tucker, G.A.; Lasslett, Y.; Smith, C.J.S.; Arnold, C.M.; Watson, C.F.; Schuch, W.; Grierson, D.; Roberts, J.A. Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic tomato plants. **Planta**, v.183, p. 133-138, 1990.

Toorop, P.E.; Bewley, J.D.; Hilhorst, H.W.M. Endo- β -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion to the completion of germination. **Planta**, v. 200, p. 153-158, 1996.

Toorop, P.E.; Van Aelst, A.C.; Hilhorst, H.W.M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p.1371-1379, 2000.

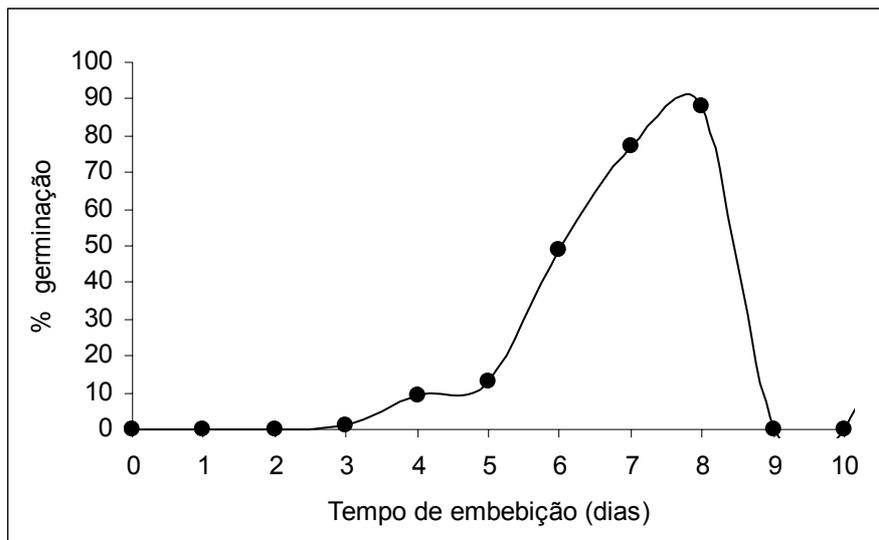
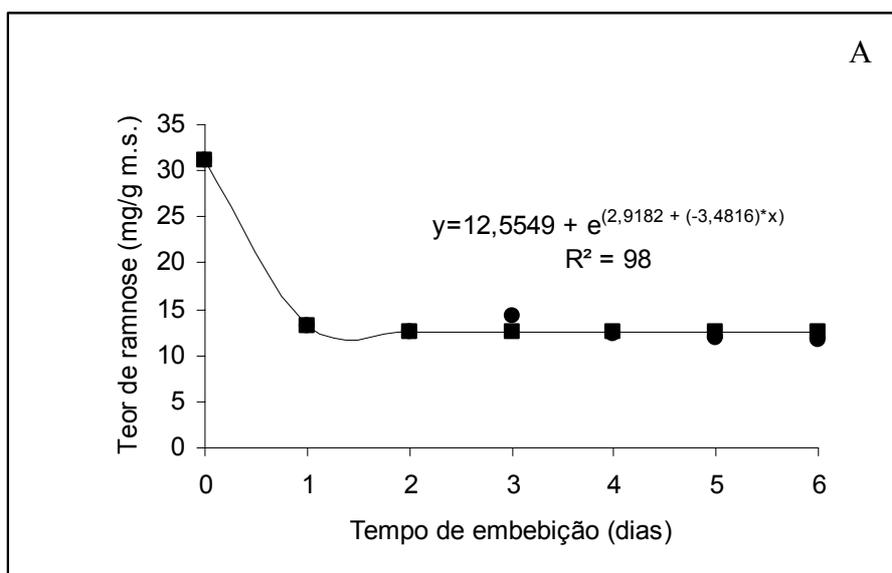
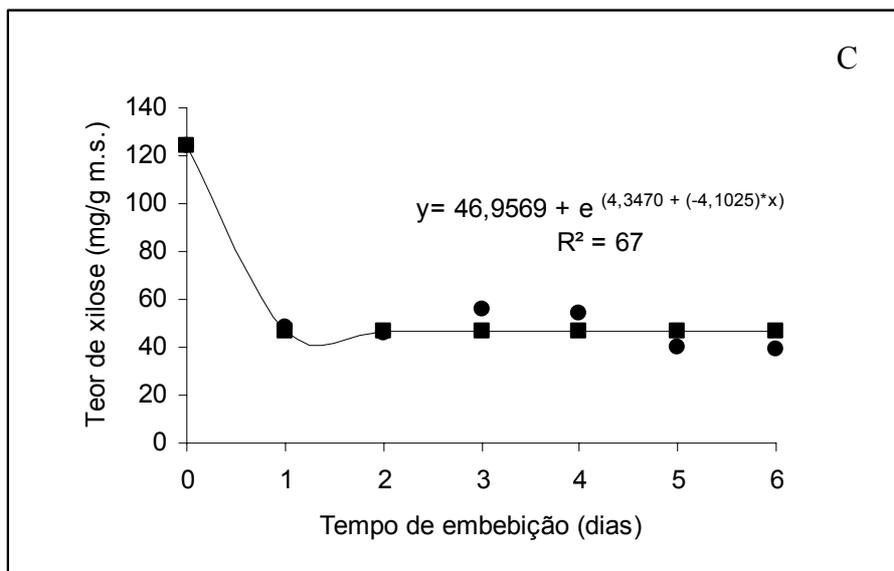
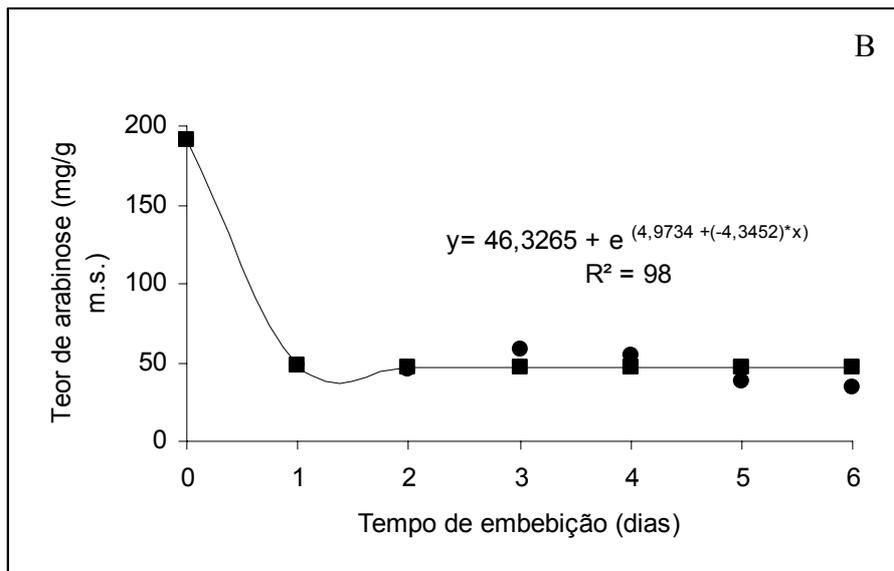


Figura 1 - Porcentagem de germinação cumulativa de sementes de *Dalbergia nigrao* longo do tempo.





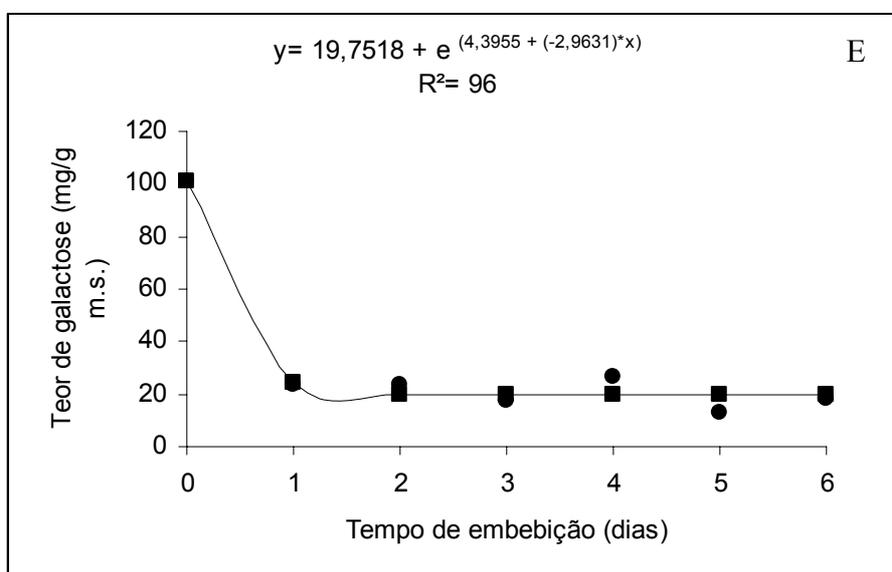
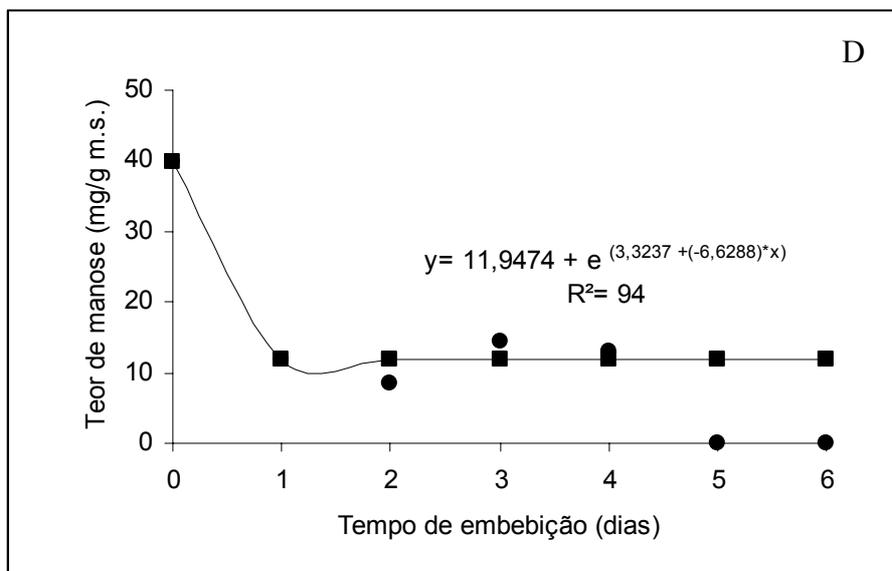
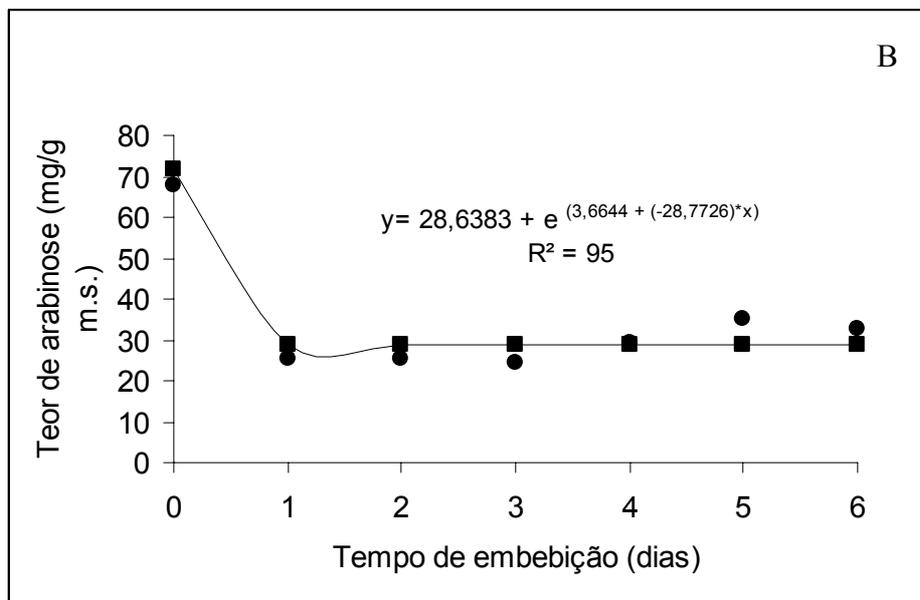
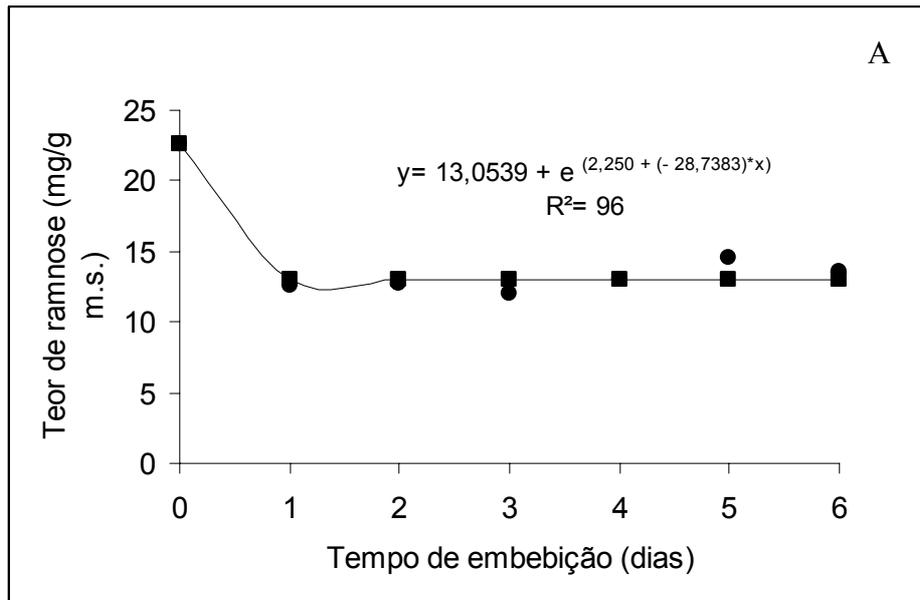
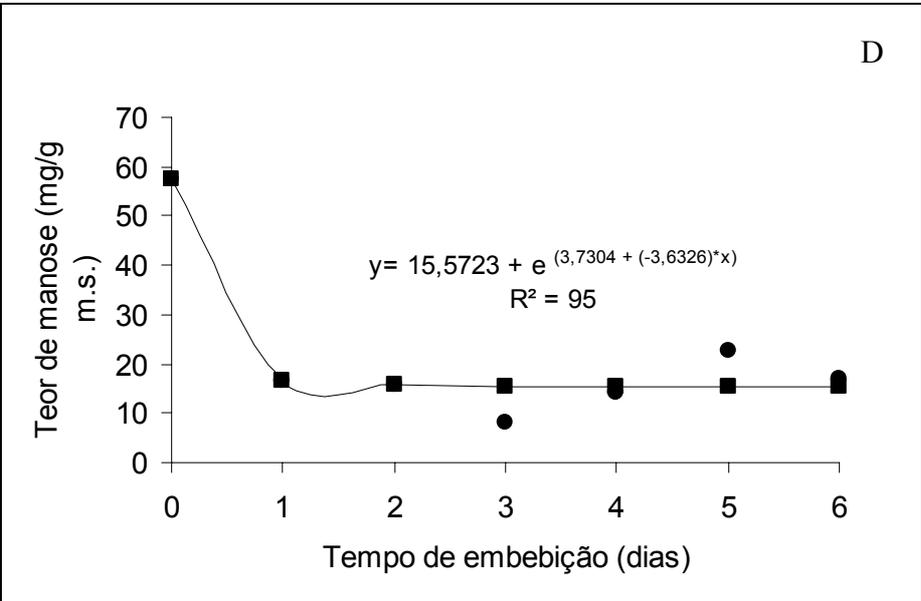
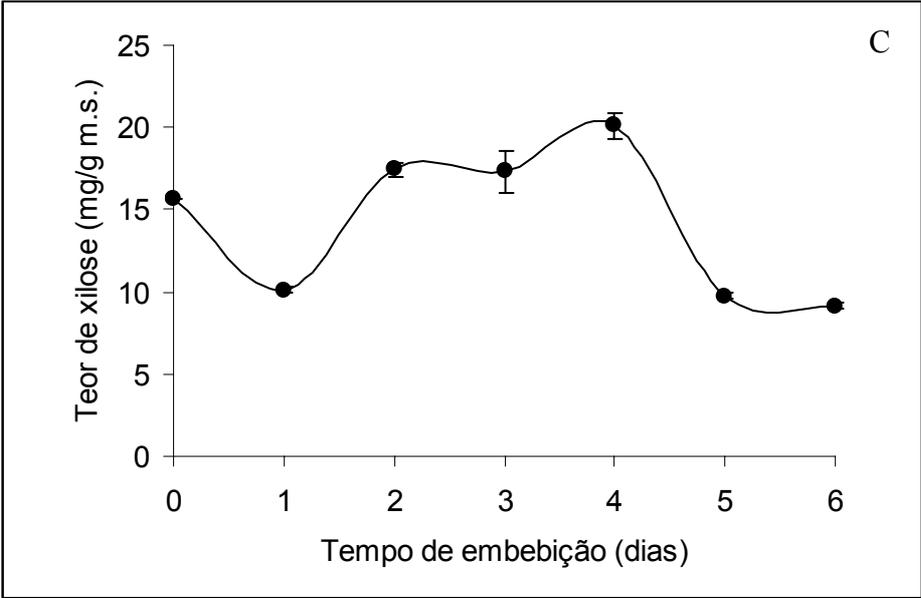


Figura 2 – Monossacarídeos presentes na parede celular do tegumento de sementes de *Dalbergia nigra* durante o período de germinação. A) Ramnose; B) Arabinose; C) Xilose; D) Monose; E) Galactose. ●Valores observados, ■ Valores calculados.





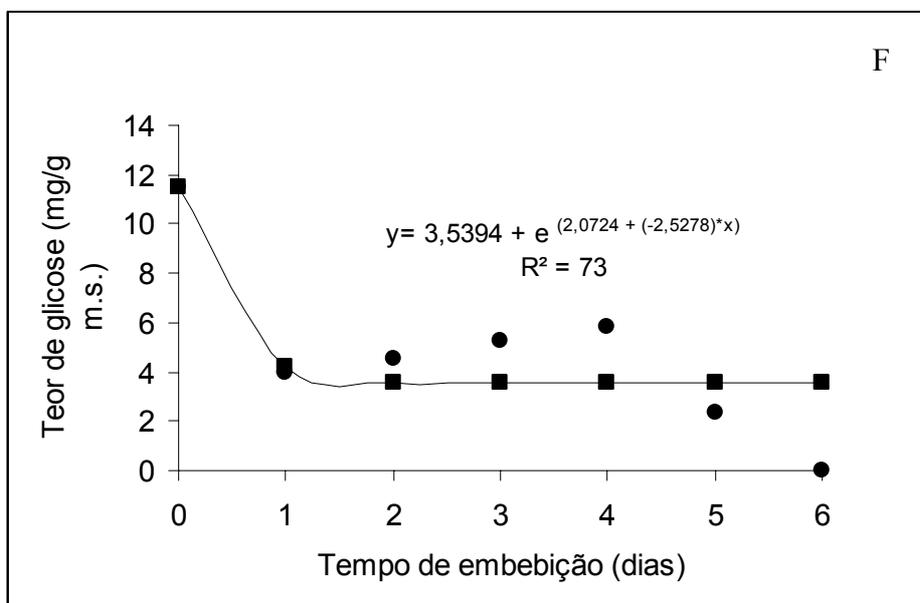
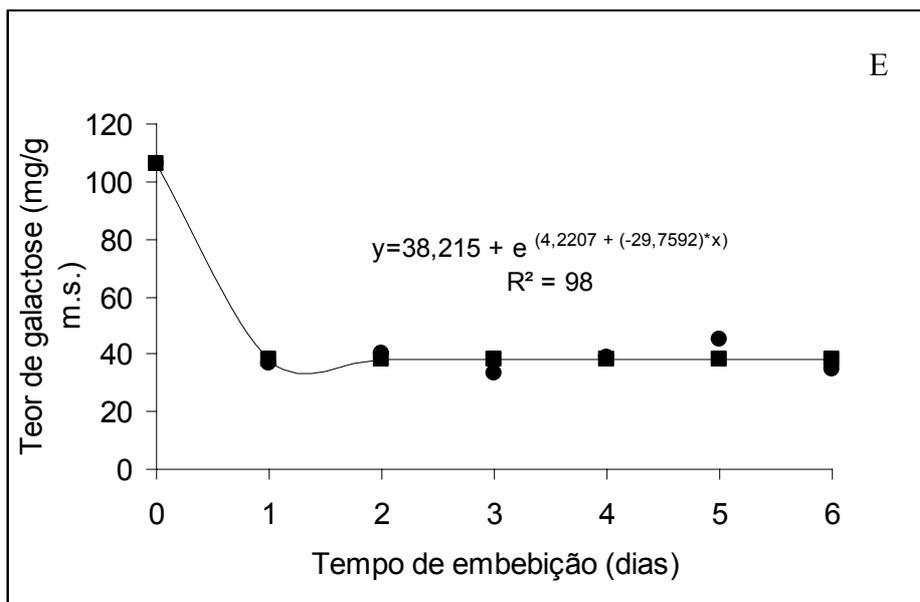


Figura 3 – Monossacarídeos presentes na fração de pectina do tegumento de sementes de *Dalbergia nigra* durante o período de germinação. A) Ramnose; B) Arabinose; C) xilose; D) Manose; E) Galactose; F) Glicose. ● Valores observados, ■ Valores calculados.

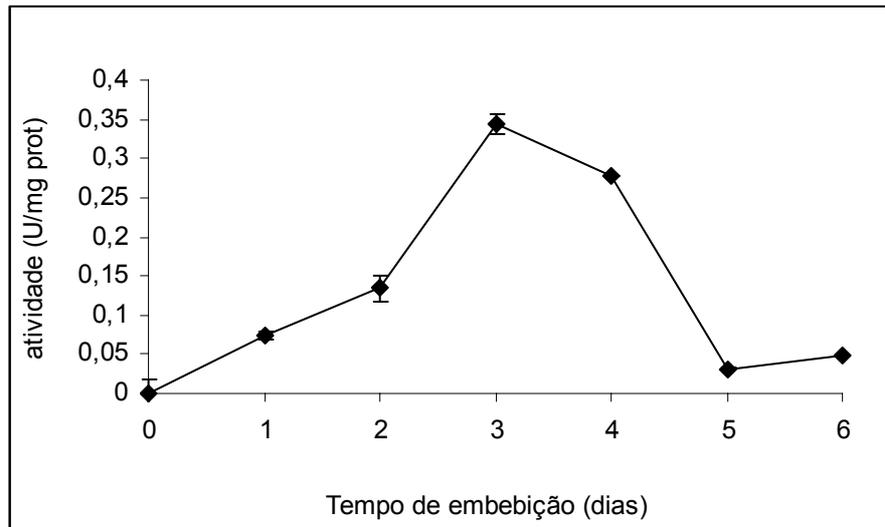


Figura 4 - Atividade de Poligalacturonase no tegumento de sementes de *Dalbergia nigra* durante o período de germinação. As barras em y indicam o erro padrão.

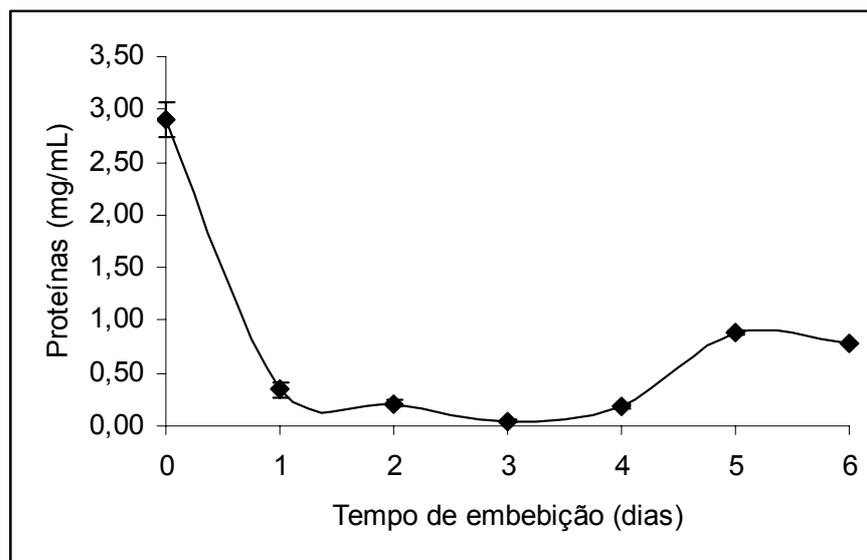


Figura 5 – Teor de proteína no tegumento de sementes de *Dalbergia nigra* durante o período de germinação.

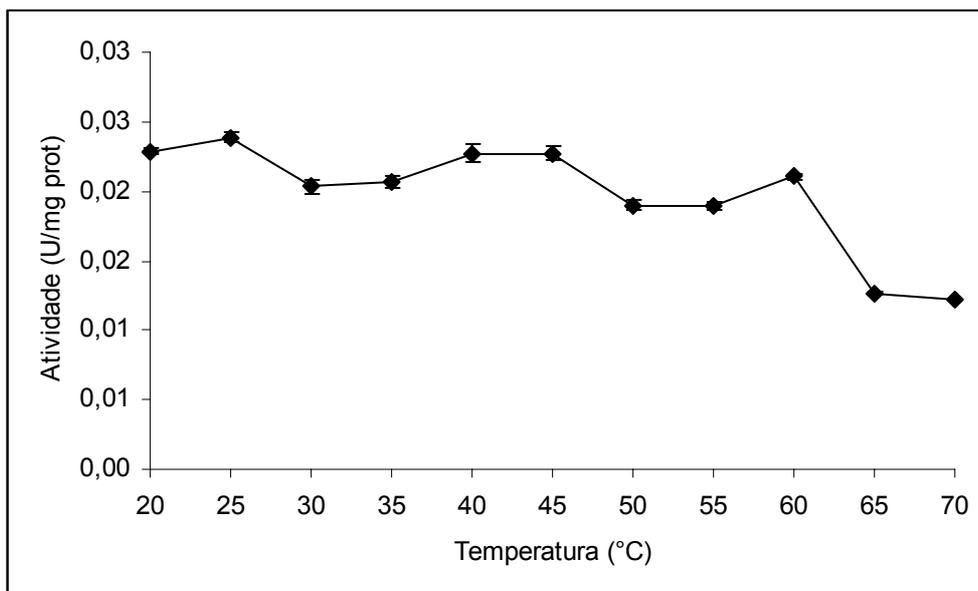


Figura 6 – Efeito da temperatura na atividade de poligalacturonase no tegumento de sementes de *Dalbergia nigra*. As barras em y indicam o erro padrão

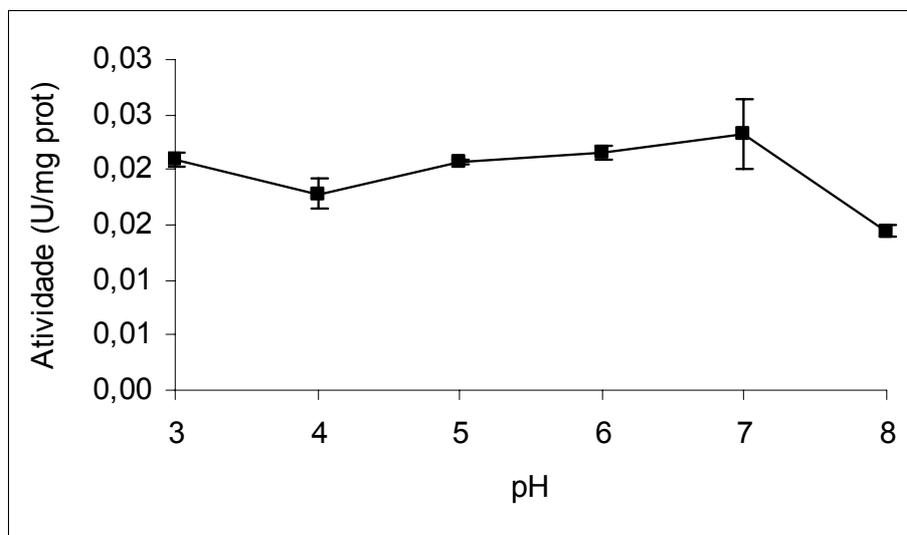


Figura 7 - Efeito do pH na atividade da poligalacturonase no tegumento de sementes de *Dalbergia nigra*. As barras em y indicam o erro padrão

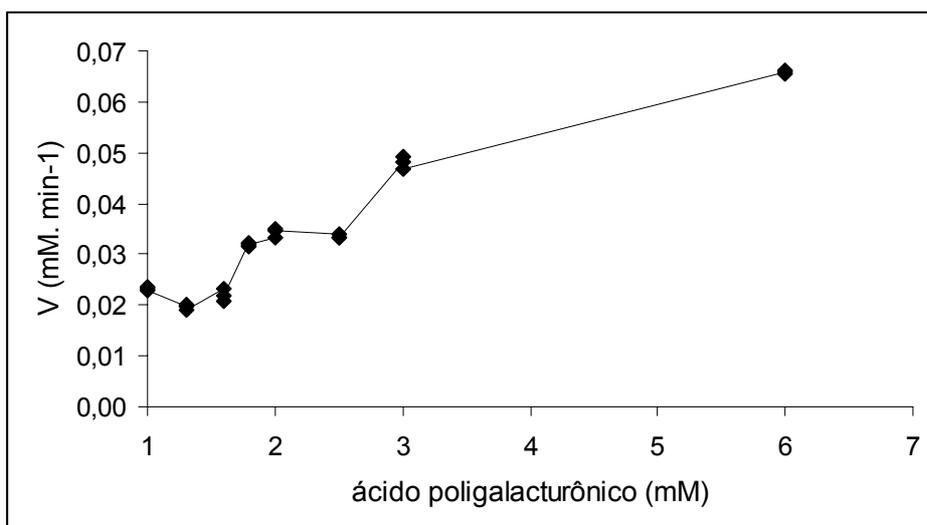


Figura 8 – Gráfico de Michaelis-Menten para hidrólise de ácido poligalacturônico pela poligalacturonase em tegumento de sementes de *Dalbergia nigra*.

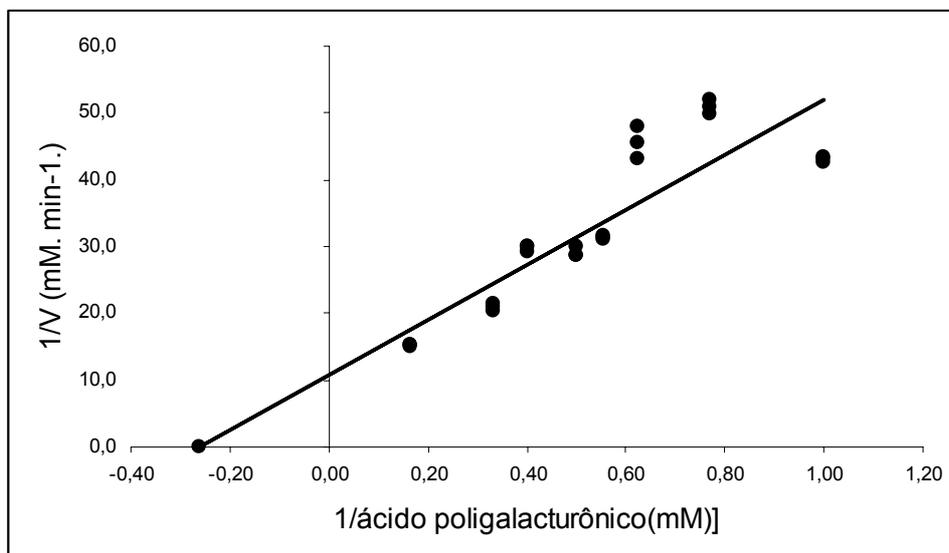


Figura 9 – Curva de duplo recíproco de poligalacturonase em tegumento de sementes de *Dalbergia nigra*.

6- CONCLUSÃO

1 - As enzimas α -galactosidase e poligalacturonase foram detectadas nas sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação.

2 - A enzima α -galactosidase apresentou aumento na atividade a partir do início da embebição. A enzima está presente nos cotilédones de sementes secas, contudo no eixo embrionário a atividade só é detectada a partir do início da embebição.

3 – A enzima poligalacturonase não foi detectada nas sementes secas, mas a partir da embebição observou-se aumento na atividade da enzima nos três compartimentos analisados – cotilédones, eixo embrionário e tegumentos. Com o aumento da atividade da poligalacturonase nos tegumentos, foi observada redução dos açúcares componentes da parede celular e da fração péctica.