

GALACTOSIDASE DE COTILÉDONES DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv  
PITIÚBA: EFEITO DA SALINIDADE NA ATIVIDADE DURANTE A  
GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA, PURIFICAÇÃO  
PARCIAL E PROPRIEDADES

Osmundo Brilhante de Oliveira Neto

C380334  
OATJVD

BCT/ UFC CATIVO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

T  
574.192  
0919  
1994

CENTRO DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FORTALEZA-CEARÁ

1994

UFC/BU/BCT 03/11/1997



R670529 Galactosidade de cotilédones de  
C380334 Vigna un  
T574.192 091g

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

O48g Oliveira Neto, Osmundo Brilhante de.  
Galactosidase de cotilédones de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv pitiúba : efeito da salinidade na atividade durante a germinação e estabelecimento da plântula, purificação parcial e propriedades. / Osmundo Brilhante de Oliveira Neto. – 1994.  
67 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 1994.  
Orientação: Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho.

1. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

---

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Osmundo Brilhante de Oliveira Neto

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

27/10/94

Prof. Joaquim Énéas Filho  
Orientador da Dissertação

Prof. Enéas Gomes Filho

Prof. Luiz Gonzaga Rebouças Ferreira

Para o meu irmão e melhor amigo  
**Carlos Augusto Bandeira Brilhante**

À minha mãe, exemplo de amor,  
força de vontade e grande sabedoria.

Ao meu pai pelo que representa  
na minha vida.

À minha irmã, pelo carinho e incentivo constante.

## AGRADECIMENTOS

De modo todo especial ao Professor Joaquim Enéas Filho, orientador desta dissertação, pelo constante apoio e incentivo à minha formação bem como pelo grande saber demonstrado durante todo este tempo.

Ao Professor Enéas Gomes Filho, pela colaboração e valiosas sugestões apresentadas na elaboração desta dissertação.

Ao Professor José Tarquínio Prisco, pelo exemplo de pessoa que tem sido para mim, bem como pelo estímulo e carinho demonstrado durante a realização deste trabalho.

Aos Professores Maria Altair de Albuquerque Rebouças e José Gilberto Vieira Façanha, pelo incentivo e orientação no decorrer da minha formação acadêmica e por suas amizades e carinho.

Aos professores José Xavier Filho e Dirce Fernandes de Melo pela amizade

Aos bolsistas e amigos Cynthia Monteiro Nogueira e José Erdinan Pinheiro Júnior pela participação efetiva na elaboração deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Cármen Rogélia F. Machado, Antônio C. Mota, Valdirene M. Gomes e Carlos Iberê A. Freitas.

Aos amigos e bolsistas Francisca Solange Morais Teixeira e José Raniere M. V. Bezerra do Laboratório de Fisiologia Vegetal, pela união, força e amizade.

Estendo meus agradecimentos aos demais professores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo ambiente de cooperação e amizade, necessário ao bom desenvolvimento de qualquer trabalho.

De forma especial à minha família, pelo amor, carinho, otimismo, fé, paciência e presença constantes.

Por fim, agradeço de modo especial, a Marinilda Oliveira Pinéo, pelo carinho e compreensão durante a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsa de pós-graduação concedida ao autor e de auxílios ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de auxílios ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará;

Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, que forneceu as sementes utilizadas neste trabalho;

Biblioteca Central da Universidade Federal do Ceará, através do programa de Comutação Bibliográfica (COMUT);

Laboratório de Estatística e Matemática Aplicada (LEMA) do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada, pelo relatório de análise estatística dos dados do autor;

Laboratório de Informática do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, pelo uso dos computadores e impressoras para a edição do presente trabalho;

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi realizada.

## SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</u> .....	ix
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	xiii
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u> .....	xiv
<u>RESUMO</u> .....	xv
<u>ABSTRACT</u> .....	xvii
1 - <u>INTRODUÇÃO</u> .....	1
1.1 - <u>Salinidade: Conceito, Causas e Soluções Preconizadas</u> .....	1
1.2 - <u>Germinação e Estabelecimento da Plântula</u> .....	3
1.2.1 - <u>Germinação</u> .....	4
1.2.2 - <u>Estabelecimento da Plântula</u> .....	5
1.3 - <u>Salinidade nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento</u> .....	6
1.4 - <u>Mobilização de Carboidratos de Reserva</u> .....	7
1.5 - <u>Salinidade e Mobilização de Carboidratos de Reserva</u> .....	9
1.6 - <u>Propriedades Bioquímicas das Galactosidases</u> .....	11
1.7 - <u>Objetivos</u> .....	12
2 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> .....	14
2.1 - <u>Sementes e Condições de Germinação</u> .....	14
2.2 - <u>Preparação do Extrato Total</u> .....	15
2.3 - <u>Atividade Galactosidásica</u> .....	16
2.4 - <u>Determinação de Proteína</u> .....	17
2.5 - <u>Purificação da <math>\alpha</math>-Galactosidase</u> .....	17

2.5.1 - Precipitação com Ácido Cítrico e Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	17
2.5.2 - Cromatografia de Exclusão Molecular - Sephadex G-100.....	18
2.5.3 - Cromatografia de Troca Iônica - CM-Celulose.....	19
2.6 - <u>Caracterização da <math>\alpha</math>-Galactosidase Parcialmente Purificada</u> .....	20
2.6.1 - Curva de pH.....	20
2.6.2 - Estabilidade Térmica.....	20
2.6.3 - Íons Metálicos e Agentes Químicos.....	21
2.7 - <u>Delineamento Experimental e Análise Estatística</u> .....	21
3 - <u>RESULTADOS</u> .....	23
3.1 - <u>Condições de Ensaio de Atividade Galactosidásica</u> .....	23
3.2 - <u>Efeito do Estresse Salino na Atividade Galactosidásica e na Concentração de Proteína</u> .....	26
3.3 - <u>Efeito do NaCl <i>in vitro</i> nas Atividades Galactosidásica</u> .....	35
3.4 - <u>Purificação Parcial da <math>\alpha</math>-Galactosidase</u> .....	38
3.4.1 - Precipitação com Ácido Cítrico e Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	38
3.4.2 - Cromatografia de Exclusão Molecular - Sephadex G-100.....	38
3.4.3 - Cromatografia de Troca Iônica - CM-Celulose.....	43
3.5 - <u>Caracterização da <math>\alpha</math>-Galactosidase Parcialmente Purificada</u> .....	45
3.5.1 - Curva de pH.....	45
3.5.2 - Estabilidade Térmica.....	45
3.5.3 - Íons Metálicos e Agentes Químicos.....	45
4 - <u>DISCUSSÃO</u> .....	50
5 - <u>CONCLUSÕES</u> .....	57
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	59

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura		Página
1	Atividades $\alpha$ -galactosidásica e $\beta$ -galactosidásica em função do pH em extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba.....	24
2	Atividades $\alpha$ -galactosidásica e $\beta$ -galactosidásica em função de quantidades crescentes de extratos (enzima bruta) de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba.....	25
3	Atividade $\alpha$ -galactosidásica total de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba, semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M.....	27
4	Atividade $\beta$ -galactosidásica total de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba, semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M.....	29

Figura	Página
5 Atividade $\alpha$ -galactosidásica específica de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba, semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M.....	32
6 Atividade $\beta$ -galactosidásica específica de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba, semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M.....	33
7 Concentração de proteína em extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba, semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M.....	34
8 Atividades $\alpha$ -galactosidásica e $\beta$ -galactosidásica de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação.....	37
9 Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da F20-85 de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba.....	40

Figura	Página
10 Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da F <sub>20-85</sub> de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba após 5 dias de semeadura em água destilada.....	41
11 Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da F <sub>20-85</sub> de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba após 5 dias de semeadura em solução de NaCl 0,1 M.....	42
12 Cromatografia em coluna de CM-Celulose do pico eluído da cromatografia em Sephadex G-100 da F <sub>20-85</sub> de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba.....	44
13 Atividade enzimática em função do pH da $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba.....	46
14 Efeito da temperatura na atividade da enzima $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Atividades $\alpha$ -galactosidásicas total e específica de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M.....	28
2	Atividades $\beta$ -galactosidásicas total e específica de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M.....	31
3	Teor de proteína em extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M.....	36
4	Purificação parcial da enzima $\alpha$ -galactosidase de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba.....	39
5	Efeitos de íons metálicos e outros efetores na atividade da $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) cv Pitiúba.....	48

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

A <sub>400</sub>	- Absorbância em 400 nm;
A <sub>595</sub>	- Absorbância em 595 nm;
cv	- Cultivar;
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético;
$\Delta A_{400}$	- Diferença de absorbância em 400 nm;
F20-85	- Fração do extrato total obtida por precipitação com sulfato de amônio no intervalo de saturação de 20 a 85%;
mmho x cm <sup>-1</sup>	- Unidade de condutividade elétrica;
2-ME	- 2-Mercaptoetanol;
PM	- Peso molecular;
P <sub>AC.CÍTRICO</sub>	- Precipitação do extrato total com ácido cítrico;
V <sub>e</sub>	- Volume de eluição da enzima;
V <sub>o</sub>	- Volume de exclusão da coluna;
SDS	- Dodecil sulfato de sódio;
UA	- Unidade de atividade, definida como sendo igual a um $\Delta A_{400}$ de 0,01;
UA x cot <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup>	- Atividade total;
UA x mgP <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup>	- Atividade específica;
mgP <sup>-1</sup> x cot <sup>-1</sup>	- Concentração de proteína.

## RESUMO

Sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv Pitiúba foram semeadas em água destilada (tratamento controle) e em solução de NaCl 0,1 M (tratamento salino). Os efeitos da salinidade nas atividades das  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases foram estudados *in vivo* e *in vitro*. Nos experimentos *in vivo* as atividades enzimáticas foram determinadas, nos dois tratamentos, em extratos totais de cotilédones provenientes de sementes quiescentes ou de plântulas durante os primeiros estágios de desenvolvimento, enquanto que naqueles *in vitro* as atividades enzimáticas dos extratos totais cotiledonários provenientes de sementes quiescentes foram determinadas em função de concentrações crescentes de NaCl. As duas enzimas mostraram-se com altos níveis de atividade em extratos cotiledonários de sementes quiescentes. A atividade  $\alpha$ -galactosidásica aumentou no primeiro dia após a semeadura, permaneceu constante até o 3º dia, quando começou a decrescer até o final do período experimental. A atividade  $\beta$ -galactosidásica mostrou a mesma tendência geral, mas somente começou a cair significativamente após o 5º dia. A adição de NaCl ao meio de germinação (experimento *in vivo*) retardou o desenvolvimento da atividade de ambas as enzimas, todavia, quando a mesma concentração de sal foi adicionada ao meio de reação (*in vitro*) ela não afetou a atividade das enzimas. Os resultados obtidos sugerem que a salinidade retarda a solubilização das galactosidases e/ou afeta a renovação ("turnover") destas enzimas durante o processo de germinação e estabelecimento da plântula. Visando purificar a  $\alpha$ -galactosidase, o extrato de cotilédones provenientes de sementes quiescentes foi precipitado com ácido cítrico até pH 3,5 e o sobrenadante (pH 5,5) foi

precipitado com sulfato de amônio entre 20 e 85% de saturação, seguindo-se de filtração em gel em uma coluna de Sephadex G-100. Usando-se este método obteve-se um pico de atividade com uma purificação de 9,0 vezes e um rendimento em atividade de 29,0%. Quando esta fração foi fracionada em uma coluna de CM-Celulose obteve-se apenas um pico de atividade  $\alpha$ -galactosidásica. Entretanto, esta etapa adicional forneceu uma purificação de apenas 3,5 vezes e um rendimento em atividade de 2,4%. O peso molecular desta enzima parcialmente purificada, determinado por filtração em gel foi de 43.500, o mesmo encontrado quando foram usados extratos de cotilédones com 5 dias após a semeadura. A salinidade não provocou o aparecimento de novas formas de  $\alpha$ -galactosidase. Esta enzima parcialmente purificada, teve pH ótimo de 6,0 e foi fortemente inibida por galactose e  $\text{Hg}^{2+}$ , moderadamente inibida por  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e EDTA, mas os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , bem como o agente redutor 2-mercaptoetanol não tiveram nenhum efeito sobre sua atividade. Sua estabilidade térmica foi semelhante à encontrada para outras  $\alpha$ -galactosidas de vegetais.

## ABSTRACT

Pitiuba cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds were sown in distilled water (control treatment) and in 0.1 M NaCl solutions (saline treatment). The effects of salinity on  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activities were studied both *in vivo* and *in vitro*. The *in vivo* experiments were performed in both treatments by assaying these enzymes in cotyledon crude extracts obtained from seeds or seedlings along germination and seedling establishment, and the *in vitro* ones were performed by assaying the enzymes in cotyledon crude extracts from quiescent seeds as a function of increasing NaCl molarities. The activity of both enzymes was present at higher levels in the quiescent seed.  $\alpha$ -galactosidase activity increased during the first day after sowing, stayed constant up to the 3rd day, and then started to decrease up to the end of the experimental period.  $\beta$ -galactosidase activity showed the same trend, however, it started to drop only after the 5th day. The addition of 0.1 M NaCl to the germination medium (*in vivo* experiments) retarded the development of the activity of both enzymes, however, when the same concentration of this salt was added *in vitro* it had no effect on the activities of both enzymes. The obtained results suggest that salinity delays galactosidases and/or affected their turnover throughout germination and seedling establishment. In order to purify  $\alpha$ -galactosidase a cotyledonary crude extract obtained from quiescent seeds was precipitated with citric acid to pH 3.5 and the supernatant was fractionated by ammonium sulphate between 20-85% saturation, and gel-filtered through a Sephadex G-100 column. Using this procedure it was obtained one peak of activity which gave an enzyme purification of 9.0 fold and an activity yield of 29.0%. When this fraction was

subjected to fractionation on a CM-Cellulose column only one peak of  $\alpha$ -galactosidase was obtained. However, this additional step gave an enzyme purification of only 3.5 fold and an activity yield of 2.4%. The molecular weight of the partially purified enzyme determined by gel-filtration was 43,500, and it was observed only one cotyledonary  $\alpha$ -galactosidase with the same molecular weight at the 5th day after sowing throughout germination and seedling establishment. Salinity did not cause the appearance of new forms of  $\alpha$ -galactosidase. This partially purified enzyme had an optimal pH of 6.0, and it was strongly inhibited by galactose and  $\text{Hg}^{2+}$ , moderately inhibited by  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and EDTA, but  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  as well as the reducing agent 2-mercaptoethanol had no effect on its activity. Its thermal stability was similar to other plant  $\alpha$ -galactosidases.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Salinidade: Conceito, Causas e Soluções Preconizadas

Um solo é considerado salino quando a condutividade elétrica do extrato de saturação da "pasta do solo" é superior a  $4 \text{ mmho} \times \text{cm}^{-1}$ . Este limite foi estabelecido porque a partir dele o crescimento e a produção da maioria das plantas cultivadas são afetados. Nos últimos anos a Sociedade Americana de Ciência do Solo sugeriu que este limite fosse diminuído para  $2 \text{ mmho} \times \text{cm}^{-1}$ , pois muitas espécies ornamentais e frutíferas podem sofrer injúrias quando cultivadas em solos que apresentam condutividade elétrica do extrato de saturação na faixa de  $2-4 \text{ mmho} \times \text{cm}^{-1}$  (BRESLER *et al.*, 1982). Nos ambientes em que são encontrados os solos salinos, geralmente, também ocorrem baixa umidade, altas temperaturas e alta intensidade luminosa (MOLION, 1985), o que potencializa o efeito da salinidade sobre as plantas.

A salinidade resulta de causas naturais ou provocadas pelo homem (WAISEL, 1972; BERNSTEIN, 1975). Embora a acumulação de sais em consequência da evapotranspiração seja a causa primária dos problemas na agricultura relacionados à salinidade, existem outros. Alguns solos contêm naturalmente sais suficientes para limitar a produção das culturas. Alguns solos foram derivados de rochas salinas e outros contêm depósitos naturais de sais o que acarreta uma salinidade suficientemente alta que é capaz de limitar a produção das culturas (CARTER, 1975).

O acúmulo de sais tem sido um problema sério para a agricultura em regiões áridas e semi-áridas (BRESLER, 1982; ASHRAF *et al.* 1987). O uso da irrigação tem contribuído para salinizar áreas que anteriormente não apresentavam este problema (CRAMER *et al.*, 1985; SALISBURY & ROSS, 1991), devido a utilização de águas com elevadas concentrações de sais solúveis ou de práticas de manejo inadequadas, tais como, dotação insuficiente de água, drenagem deficiente e uso excessivo de fertilizantes (HAYWARD & WADLEIGH, 1949; KENT & LAUCHLI, 1985). No Nordeste brasileiro, a alta demanda evaporativa do ar associada ao sistema deficiente de drenagem e ao manejo inadequado do solo e da água de irrigação, são os principais responsáveis por este problema (PRISCO, 1987). Além disto, a água de irrigação usada nesta região, em algumas situações, pode incorporar até 60 toneladas de sais por hectare por ano, que pode resultar em uma rápida salinização da área se não forem adotadas práticas adequadas de cultivo e de manejo do sistema solo-água-planta (MACEDO, 1988).

Existem, em geral, 4 opções para atacar o problema das áreas salinizadas ou em vias de salinização: (i) recuperação do solo; (ii) desenvolvimento de pesquisas no sentido de conseguir-se, através da seleção e do melhoramento genético, plantas que sejam mais resistentes ou tolerantes ao excesso de sais; (iii) desenvolvimento de pesquisas visando a "domesticação de halófitas" com potencial econômico; (iv) desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de encontrar um melhor manejo para glicófitas cultivadas em solos salinos (PRISCO, 1987). Na opinião deste autor, com exceção da primeira opção, o sucesso das demais depende de conhecimentos sobre a fisiologia e bioquímica de plantas submetidas ao estresse salino. Estes estudos são necessários ao longo de todo o ciclo da planta, especialmente durante os estágios

iniciais do desenvolvimento (germinação e crescimento da plântula), pois deles depende o estabelecimento das culturas.

## 1.2 - Germinação e Estabelecimento da Plântula

Quando uma semente viável é colocada em um ambiente em que a umidade, o suprimento de oxigênio e a temperatura são adequados, observa-se que ela sofre uma série de mudanças morfo-fisiológicas, sendo as mais aparentes os aumentos de volume e da atividade metabólica da semente, resultantes da água absorvida, que, como consequência redundam na emergência da radícula ou de outra parte do embrião. Quando isto acontece, diz-se que a semente germinou (BEWLEY & BLACK, 1978).

Para o processo germinativo ser iniciado, três condições devem ser satisfeitas: (i) a semente deve ser viável, isto é, o embrião deve ser capaz de se desenvolver, (ii) a semente deve estar em condições ambientais apropriadas de disponibilidade de água, de temperatura, de suprimento de oxigênio e luz; (iii) devem ser sobrepujadas as condições de dormência primária, por ventura, presentes nas sementes (CHING, 1972; JANN & AMEM, 1977).

Baseando-se em BEWLEY & BLACK (1985), pode-se afirmar que o processo germinativo e de desenvolvimento da plântula compõe-se de duas etapas distintas: a primeira inicia-se com a embebição de água e termina com a emergência da radícula ou de outra parte do embrião (germinação) e a segunda caracteriza-se pela intensa mobilização de reservas associada com o crescimento do eixo embrionário e que resulta no estabelecimento da plântula.

### 1.2.1 - Germinação

Quando a semente seca é colocada em ambiente adequado observa-se um rápido aumento no conteúdo de umidade devido a embebição de água pelos colóides existentes na semente, que provoca amaciamento do tegumento e hidratação do protoplasma das células. Este processo é essencialmente físico e pode ocorrer até mesmo em sementes mortas. Durante esta fase, inicia-se a solubilização de proteínas necessárias à ativação de certas enzimas bem como a reorganização e a reativação do sistema sintetizador de proteínas e do sistema produtor de energia (mitocôndrias). Além disto, ocorre também a síntese *de novo* de várias enzimas (BEWLEY & BLACK, 1985; KERMODE *et al.*, 1986), que pode iniciar-se com a transcrição de moléculas de mRNA específicas (BEWLEY & BLACK, 1985) ou a partir moléculas de mRNA e ATP formadas durante o desenvolvimento e conservadas na semente seca para serem reativadas nas etapas iniciais da germinação (BEWLEY & BLACK, 1985; HARTMANN *et al.*, 1990). Estas mudanças que ocorrem a nível molecular são evidenciadas pelo intenso aumento na atividade metabólica e pelo aumento no tamanho, acompanhado ou não do aumento no número de células, do eixo embrionário (HABER & LUIPPOLD, 1960; BERLYN, 1972; BEWLEY & BLACK, 1985). Em consequência destas mudanças, observa-se a emergência da radícula ou de outra parte do embrião.

### 1.2.2 - Estabelecimento da Plântula

Após a emergência da radícula observa-se que o eixo embrionário aumenta de tamanho e há um incremento, tanto em peso fresco como em peso seco deste órgão e diminuição no peso seco do órgão de reserva. A absorção de água aumenta exponencialmente e a taxa respiratória segue a mesma tendência. O órgão de reserva, eventualmente diminuirá sua atividade metabólica a níveis muito baixos, até esgotar suas reservas e separar-se da plântula. Em alguns casos os órgãos de reserva mantêm-se ativos, podendo até se transformarem em órgãos fotossintetizadores, como é o caso do algodão (RAVEN *et al.*, 1992). As mudanças em peso relatadas acima, resultam da intensa mobilização das reservas, principalmente de carboidratos, lipídios e proteínas, armazenadas nos cotilédones, no endosperma ou perisperma, as quais são transformadas em produtos solúveis, que podem ser reutilizados no órgão de reserva, antes de serem transportados. Estes produtos solúveis são, em geral, usados como substratos da respiração ou podem dar origem a outros compostos mais complexos, especialmente no eixo embrionário, onde serão usados nos processos fisiológicos necessários ao alongamento, divisão e diferenciação celulares (BEWLEY & BLACK, 1982).

Nas dicotiledôneas não endospermicas, o embrião consta de um eixo e de dois cotilédones (órgãos de reserva), dispostos um de cada lado deste eixo. Em uma das extremidades do eixo encontra-se a radícula, que, ao desenvolver-se transforma-se no sistema radicular, e na outra extremidade, localizada acima dos cotilédones, encontra-se a plúmula, que irá originar o epicótilo da plântula. De acordo com RAVEN *et al.* (1992), do ponto de vista morfológico, após a emergência da radícula, o crescimento do eixo embrionário

pode dar origem a dois tipos de estabelecimentos de plântulas: no primeiro, que tem como exemplo a ervilha, os cotilédones permanecem sob o solo (hipógeo), enquanto que a plúmula cresce para dar origem ao epicótilo, que neste caso é a parte aérea da plântula; no segundo tipo, que ocorre no feijão-de-corda (WIEN & SUMMERFIELD, 1984), os cotilédones emergem do solo (epígeo) em decorrência do crescimento do hipocótilo (porção do eixo localizada entre os cotilédones e a radícula), desenvolvendo-se a plúmula, acima dos cotilédones. Neste caso a parte aérea da plântula é composta de hipocótilo e de epicótilo.

### 1.3 - Salinidade nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento

Quando a concentração de sais no solo ou no meio de cultivo aumenta, ocorre uma diminuição na velocidade e na percentagem de germinação (BUFFUM, 1896, 1899; UHVITS, 1946; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1963; LYLES & FANNING, 1964; STROGONOV, 1964; UNGAR, 1967; PRISCO & O'LEARY, 1970; ENÉAS FILHO, 1979; CASTRO, 1982; BANDEIRA, 1992). Em glicófitas, o processo até a emersão da radícula é menos afetado pela salinidade do que aquele do estabelecimento da plântula (HASSON & POLJAKOFF-MAYER, 1980/1981; PRISCO, 1987), em oposição ao que UNGAR (1978) afirma ocorrer com certas halófitas, as quais requerem concentrações de sais mais baixas durante a germinação do que nas etapas subsequentes, ou seja, durante o estabelecimento da plântula.

A inibição da germinação das sementes pela salinidade advem, primordialmente, da redução do gradiente de potencial hídrico entre a semente e o solo, a qual acarreta diminuição na absorção de água (UHVITS, 1946;

PRISCO & O'LEARY, 1970), com repercussão negativa no metabolismo (PRISCO 1987).

A salinidade ao inibir o desenvolvimento da planta em suas etapas iniciais, o faz porque afeta, principalmente, a segunda fase do processo germinativo, ou seja, o estabelecimento da plântula (PRISCO & O'LEARY, 1970). De acordo com PRISCO (1987), a salinidade retarda o estabelecimento da plântula de *Vigna unguiculata*, sendo este efeito bem mais acentuado quando a concentração de NaCl é superior a 4,0 g/l. A partir desta concentração o crescimento do eixo embrionário é afetado, coincidindo com a inibição da mobilização das reservas (PRISCO, 1987). Após a emergência da radícula, há uma acentuada inibição na mobilização das reservas da semente, que redundando no retardamento ou inibição do crescimento do eixo embrionário (PRISCO & VIEIRA, 1976; ENÉAS FILHO, 1979; PRISCO *et al.*, 1981; CASTRO, 1982; GOMES FILHO *et al.*, 1983; GOMES FILHO, 1985; BANDEIRA, 1992). Isto ocorre porque o excesso de sais afeta: a atividade ou solubilização das hidrolases; a síntese *de novo* destas enzimas; a translocação dos produtos de hidrólise dos cotilédones para o eixo embrionário, ou, devido a uma combinação de tais efeitos (PRISCO, 1987).

#### 1.4 - Mobilização de Carboidratos de Reserva

A degradação de substâncias armazenadas nas diversas partes da semente ocorre desde os estágios iniciais do processo germinativo. Entretanto a mobilização das substâncias armazenadas nos órgãos ditos de reserva acontece, predominantemente após a germinação (MURRAY, 1984). No processo de

mobilização das reservas de carboidratos tem sido dado maior destaque à mobilização do amido, principal carboidrato de reserva nas leguminosas não endospermicas (*Phaseolus*, *Pisum*, *Lupinus*, *Lens*). Entretanto, outros carboidratos de reserva são também encontrados em cotilédones de leguminosas, tais como, oligossacarídeos (rafinose, estaquiase e verbascose) e polissacarídeos (galactomananos, xiloglicanos e galactano-pectinas) que contém galactose em suas estruturas (PRIDHAM & DAY, 1974; BEWLEY & BLACK, 1978). Estes últimos encontrados principalmente nas paredes celulares.

A D-galactose é uma hexose presente nas plantas superiores e ocorre sobretudo na forma combinada, usualmente ligada a outros resíduos de monossacarídeos. Polissacarídeos constituídos somente por unidades de D-galactose são raros. Contudo a D-galactose é encontrada em combinação com vários monossacarídeos ou seus derivados, em diversos oligo e polissacarídeos (COURTOIS, 1968, citado por TIPSON & HORTON, 1980).

A via catabólica para liberação de resíduos de galactose, presentes nos oligo e polissacarídeos, envolve dois tipos de enzimas hidrolíticas: as  $\alpha$ -galactosidases (E.C 3.2.1.22) e as  $\beta$ -galactosidases (E.C 3.2.1.23). As primeiras, que catalisam a hidrólise de ligações galactopiranosídicas do tipo  $\alpha$ -1,6 (BEWLEY & BLACK, 1978), já foram encontradas em microrganismos (LI *et al.*, 1963; SUZUKI *et al.*, 1966 citados por AGRAWAL & BAHL, 1968) e em plantas superiores (DEY, 1981; CHANDRA-SEKHAR & DEMASON, 1990; PORTER & LADISCH, 1991; PORTER *et al.* 1992). Atuam como exo-galactosidases liberando resíduos de D-galactose de oligossacarídeos e de polissacarídeos (BEWLEY & BLACK, 1978; DEY, 1980, 1981). As  $\beta$ -galactosidases catalisam a hidrólise de ligações galactopiranosídicas do tipo  $\beta$ -1,2 (EDWARDS *et al.*, 1988) e já foram encontradas em microrganismos (REID

& BEWLEY, 1979) e em diferentes órgãos de várias espécies de plantas superiores (AGRAWAL & BAHAL., 1968; SOMME, 1971; PALMIANO & JULIANO, 1973; JOHNSON *et al.*, 1974; WALLNER & WALKER, 1975; REID & BEWLEY, 1979; BISWAS, 1987; KUNDU *et al.*, 1990; KONNO & KATOH, 1992). Do mesmo modo que as  $\alpha$ -galactosidases, elas liberam resíduos de D-galactose, os quais podem atingir a via glicolítica e constituírem-se em importante fonte de energia, especialmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento da plântula (DEY, 1980).

### 1.5 - Salinidade e Mobilização de Carboidratos de Reserva

Como a mobilização das reservas da semente ocorre, principalmente, após a emergência da radícula e é fundamental para que a planta se estabeleça (BEWLEY & BLACK, 1978), é lógico esperar-se que a salinidade exerça algum efeito sobre este processo.

GOMES FILHO & PRISCO (1978) através de medidas de peso seco de cotilédones de plântulas de *Vigna unguiculata* demonstraram claramente que a salinidade retardava a hidrólise e/ou o transporte dos produtos de hidrólise das reservas para o eixo embrionário, afetando drasticamente o crescimento deste último. Sendo assim, algumas possibilidades foram levantadas de como a salinidade poderia afetar a mobilização de reservas cotiledonárias: (i) inibindo a síntese *de novo* de enzimas responsáveis pela hidrólise das reservas cotiledonárias; (ii) inibindo a atividade destas hidrolases; (iii) impedindo a solubilização destas enzimas; e finalmente, (iv) impedindo a translocação dos produtos de hidrólise dos cotilédones para o eixo embrionário (PRISCO, 1987).

Os cotilédones das leguminosas não endospérmicas contém células com paredes celulares ricas em hemiceluloses. A mobilização destes componentes têm sido descrita em *Pisum*, *Phaseolus* e *Lupinus spp.* (PARKER, 1975, citado por BEWLEY & BLACK, 1978), embora a composição destas hemiceluloses e seus produtos de hidrólise sejam largamente desconhecidos, provavelmente, podem exercer funções de reserva, principalmente na etapa de estabelecimento da plântula, fase em que os efeitos da salinidade são conspícuos. Apesar disto, existem poucos dados sobre os efeitos da salinidade na mobilização dessas reservas (GONZALEZ-MURUA *et al.*, 1985; CORCHETE & GUERRA, 1986).

São poucos os estudos dos efeitos da salinidade nas atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas. Entretanto, CORCHETE & GUERRA (1986), acompanharam a atividade destas enzimas ao longo da germinação em sementes de lentilha sob condições de estresse. Os resultados obtidos por eles mostram que as atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas nos cotilédones não variam sob condições de estresse, mantendo-se em níveis semelhantes àqueles encontrados em condições controle. Além disto, eles verificaram que estas enzimas se apresentavam com elevadas atividades em sementes quiescentes. Posteriormente, os mesmos autores (1987b) demonstraram que as atividades destas enzimas durante o processo de geminação eram controladas pelo eixo embrionário. Entretanto, eles não elucidaram como o eixo embrionário atuava, isto é, se ele funcionava como dreno ou como liberador de substâncias reguladoras de crescimento.

## 1.6 - Propriedades Bioquímicas das Galactosidases

Muitas pesquisas envolvendo o metabolismo de sementes germinantes têm sido feitas, visando a obtenção de informações sobre as diversas vias metabólicas que ocorrem durante o processo germinativo e como elas se interrelacionam. Um pré-requisito essencial para o esclarecimento do papel fisiológico de uma enzima consiste em sua purificação e acompanhamento do estudo de suas propriedades físicas e cinéticas. Vários esquemas têm sido propostos através dos anos tentando simplificar e agilizar a purificação da  $\alpha$ -galactosidase, bem como identificar seu papel fisiológico.

PETEK & DONG (1961), citado por DEY (1981), foram os primeiros a encontrarem múltiplas formas de  $\alpha$ -galactosidase quando trabalhavam com café. DEY & PRIDHAM (1969) trabalhando com sementes de *Vicia faba* encontraram dois picos de atividade  $\alpha$ -galactosidásica por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100). Essas duas formas apresentaram pesos moleculares de 209.000 e 38.000, com termoestabilidade e ótimos de pH diferentes. Posteriormente, eles mostraram que sementes de outras espécies também apresentavam duas formas de  $\alpha$ -galactosidase, com pesos moleculares e ótimos de pH diferentes (DEY & PRIDHAM, 1972; DEY, 1981). Por outro lado, CORCHETE & GUERRA (1987a) trabalhando com cotilédones de plântulas de lentilha e utilizando cromatografia de troca iônica verificaram a existência de duas formas de  $\alpha$ -galactosidase. Os mesmos autores (1987b) observaram efeitos semelhantes de alguns íons metálicos e outros agentes químicos nas atividades dessas duas formas de  $\alpha$ -galactosidase. Associando a técnica de purificação em cromatografia de exclusão molecular com aquela de troca iônica, ALANI *et al.* (1989), trabalhando com uma variedade de *Vigna*

*unguiculata* coletada na Califórnia (EE.UU), encontraram a existência de três isoenzimas de  $\alpha$ -galactosidase, com pesos moleculares de 111.000, 30.000 e 29.000. Eles concluíram, através de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, que a isoenzima de peso molecular de 111.000 era um tetrâmero daquela de 30.000 e que estas isoenzimas apresentaram diferentes propriedades.

De acordo com LI *et al.* (1975) e KONNO *et al.* (1986), trabalhos com purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidases de plantas são relativamente escassos em comparação com aqueles em microrganismos. Entretanto, estudos de purificação e caracterização destas enzimas em algumas espécies de plantas e em diferentes órgãos, comprovam a existência de isoenzimas de  $\beta$ -galactosidase, que apresentam diferentes propriedades físicas e cinéticas (PRESSEY, 1983; BISWAS, 1987; KUNDU *et al.* 1990).

### 1.7 - Objetivos

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também chamado de feijão macassar, feijão fradinho, feijão-de-praia e caupi, é uma leguminosa dotada de alto valor protéico, amplamente distribuída no mundo (SINGH & RACHIE, 1985), e suas sementes são consumidas em grandes quantidades por populações de baixa renda do Nordeste brasileiro (MAY *et al.*, 1988).

Além disto, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, apresenta algumas vantagens no estudo de bioquímica e fisiologia da germinação sob condições de estresse salino porque: (i) é uma espécie sensível a salinidade; (ii) possui sementes grandes, o que facilita o manuseio em laboratório; (iii) seu

metabolismo durante a germinação vem sendo estudado com relação à várias substâncias de reserva (PRISCO, 1987).

Considerando-se que no feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba a mobilização de reservas cotiledonárias é uma etapa fundamental para o estabelecimento da plântula (PRISCO *et al.*, 1975), especialmente sob condições de salinidade (PRISCO, 1987), pretende-se, usando-se cotilédones desta espécie, estudar os efeitos do NaCl *in vivo* e *in vitro* nas atividades das enzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases, responsáveis pela mobilização das reservas de carboidratos que possuem galactose em suas estruturas. Além disto, pretende-se fazer uma purificação parcial da enzima  $\alpha$ -galactosidase e a partir daí estudar suas propriedades físicas e cinéticas, com a finalidade de contribuir para a compreensão da função destas enzimas no processo de mobilização de reservas de carboidratos em leguminosas não endospermicas.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Sementes e Condições de Germinação

As sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cultivar Pitíuba, foram obtidas do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Ceará, Brasil). Elas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados, contendo sílica gel e armazenadas à uma temperatura de 10 °C até utilização nos experimentos.

As sementes foram selecionadas para germinação de acordo com a cor, tamanho e conformação, sendo excluídas as pequenas, escuras e mal formadas. As selecionadas foram desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio contendo 2,5% de cloro ativo (Brilux, Raimundo da Ponte Indústria S/A. Olinda, Pernambuco, Brasil), diluída 1:3 (v:v), durante 10 minutos, sendo excluídas as que flutuaram na referida solução, bem como aquelas que se apresentaram "queimadas" após esse tratamento. Em seguida, foram lavadas com água destilada, a fim de retirar o excesso de cloro residual.

Para a germinação, usou-se como substrato duas folhas de papel de filtro (PRISCO & O'LEARY, 1970) de 30 cm x 30 cm (papel mata borrão filtro 80 g/cm<sup>2</sup>; Companhia Fabricadora de Papel, São Paulo, SP), devidamente esterilizadas por autoclavagem à 121 °C durante 20 minutos e umedecidas com água destilada ou com solução de NaCl 0,1 M. Uma única fileira de 10 sementes foi semeada a aproximadamente 2,5 cm da borda superior do papel. Após a semeadura, cinco conjuntos de duas folhas de papel de filtro, contendo 10

sementes cada, foram enrolados individualmente e dispostos verticalmente, dentro de recipientes de plásticos (8 cm x 8 cm x 13 cm), contendo cada um 20 ml da mesma solução utilizada para umedecer o papel. Os recipientes contendo os rolos de papel com as sementes, foram então colocados dentro de cubas de vidro (24 cm x 24 cm x 42 cm) e estas mantidas no escuro. A temperatura e a umidade relativa registradas no interior das cubas de vidro, durante o período experimental, foram  $25 \pm 1$  °C e 100%, respectivamente.

## 2.2 - Preparação do Extrato Total

O extrato total foi obtido segundo ALANI *et al.* (1989), com modificações. Para cada preparação, cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas com 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a semeadura foram macerados em almofariz com tampão citrato 25 mM - fosfato 50 mM (McILWAINE, 1921) pH 5.5 na proporção de 1:10 (p/v) e deixados por uma hora em banho de gelo. Em seguida, a suspensão foi filtrada em tela de nylon e centrifugada a  $10.000 \times g$  por 30 minutos a 4 °C, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante (extrato total) congelado para posterior utilização nas determinações de atividade galactosidásica.

### 2.3 - Atividade Galactosidásica

As atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas foram determinadas de acordo com o método de DEY & PRIDHAM (1969), com modificações. A mistura de reação continha 0,5 ml de extrato (diluído quando necessário) e 0,5 ml de p-nitrofenil- $\alpha$ -galactopiranosídeo ou p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) como substratos dissolvidos no tampão McIlwaine pH 5,0 e pH 4,0, respectivamente. Em seguida a mistura foi incubada a 37 °C por 15 minutos e a reação foi parada pela adição de 1,5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1 M. Para cada reação preparou-se uma prova em branco de ensaio, constituída do substrato e de carbonato de sódio 0,1 M com a posterior adição do extrato. As atividades galactosidásicas foram determinadas medindo-se a absorbância em 400 nm ( $A_{400}$ ) e subtraindo-se de cada leitura o valor de  $A_{400}$  da prova em branco. Estas diferenças em absorbâncias ( $\Delta A_{400}$ ) foram transformadas em unidades de atividades (UA). Uma unidade de atividade foi definida como sendo igual a um  $\Delta A_{400}$  de 0,01.

Estudou-se o efeito do NaCl *in vivo* e *in vitro* nas atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas. Nos experimentos *in vivo* as atividades foram determinadas em extratos de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas com 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a semeadura em água destilada (tratamento controle) e em solução de NaCl 0,1 M (tratamento salino). As atividades total e específica foram expressas em  $\text{UA} \times \text{cot.}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  e  $\text{UA} \times \text{mgP}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ , respectivamente e, representam médias de 3 repetições, oriundas de extratos diferentes e cada um dosado em triplicata. Nos experimentos *in vitro* as atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas foram obtidas de extratos totais de cotilédones provenientes de sementes quiescentes, e foram determinadas em função de quantidades

crescentes de NaCl no meio de reação (0,10, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 M). Os resultados de atividade enzimática foram expressos como percentagens do controle e representam médias de dois experimentos cada um, em duplicata.

#### 2.4 - Determinação de Proteína

Determinou-se a concentração de proteína pela adição de 2,5 ml do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) a 50  $\mu$ l da amostra, realizando-se a leitura de absorbância em 595 nm, 10 minutos após a adição do reagente (BRADFORD, 1976). Albumina sérica bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) foi usada como padrão.

#### 2.5 - Purificação da $\alpha$ -galactosidase

##### 2.5.1 - Precipitação com Ácido Cítrico e Fracionamento com Sulfato de Amônio

O extrato total foi inicialmente submetido à uma precipitação com ácido cítrico 1 M até pH 3,5. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante teve seu pH elevado para 5,5 com fosfato de sódio dibásico 1 M. O sobrenadante resultante foi submetido a um fracionamento com sulfato de amônio usando-se as faixas de 0 a 20, 20 a 85 e

85 a 100% de saturação, tendo-se escolhido a fração 20 a 85% (F<sub>20-85</sub>) para ser aplicada numa coluna de Sephadex G-100.

### 2.5.2 - Cromatografia de Exclusão Molecular - Sephadex G-100

O gel de Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Uppsala, Suécia) foi intumescido em água destilada a 90 °C por 5 horas. Uma coluna de 2,8 cm x 30 cm foi montada de acordo com ROBYT & WHITE (1987) e equilibrada com tampão McIlwaine pH 5,5 contendo KCl 0,1 M.

Para a determinação do volume de exclusão da coluna ( $V_o$ ) dissolveram-se 10 mg de azul dextrana (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) em 4,0 ml tampão McIlwaine pH 5,5. Em seguida, aplicou-se esta solução à coluna de Sephadex G-100 e mediu-se o volume de eluição do corante (volume de exclusão da coluna,  $V_o$ ). O peso molecular (PM) da enzima  $\alpha$ -galactosidase foi calculado de acordo DETERMANN (1969) conforme a equação abaixo:

$$\text{Log PM} = 5,941 - 0,847 (V_e/V_o)$$

onde  $V_e$  corresponde ao volume de eluição da enzima .

O pó liofilizado da F<sub>20-85</sub> foi dissolvido em tampão McIlwaine pH 5,5 e, em seguida, aplicado a uma coluna, previamente equilibrada com o mesmo tampão. A cromatografia se realizou a um fluxo constante de 34,8 ml por hora e a 12 °C. Os efluentes foram recolhidos em frações de 4,5 ml, em um coletor automático, determinando-se em seguida a absorbância em 280 nm e a atividade  $\alpha$ -galactosidásica em cada uma das frações. As que mostraram-se ativas foram

juntas e após diálise por 24 horas contra água destilada a 12 °C foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos, sendo o sobrenadante liofilizado.

### 2.5.3 - Cromatografia de Troca Iônica - CM-Celulose

Para preparação da coluna de troca iônica, uma quantidade suficiente de CM-Celulose foi lavada sucessivamente em água destilada, HCl 0,1 M, água destilada, NaOH 0,1 M e por fim equilibrada com tampão McIlwaine pH 3,5. A coluna (2 cm x 19 cm) foi preparada sob a ação da gravidade. A cromatografia em CM-Celulose do concentrado do pico de atividade da Sephadex G-100 realizou-se a um fluxo de 24 ml por hora e a 12°C. O pó liofilizado deste pico foi dissolvido em tampão McIlwaine pH 3,5 e o pH ajustado com ácido cítrico 1 M para 3,5. A eluição foi iniciada com o tampão McIlwaine pH 3,5 e em seguida com um gradiente salino (0,2 a 0,8 M de KCl; 60 ml) no mesmo tampão. Foram coletadas frações de 3,5 ml, sendo determinadas suas absorvâncias em 280 nm e atividades  $\alpha$ -galactosidásicas. As frações ativas foram juntas e dependendo do objetivo, foram dialisadas contra água destilada ou tampão McIlwaine pH 5,0 por 24 horas a 12 °C. Após centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C o sobrenadante foi congelado para posterior utilização ( $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada).

Ao final de cada cromatografia, o gel era lavado com HCl e NaOH como descrito anteriormente.

## 2.6 - Caracterização da $\alpha$ -Galactosidase Parcialmente Purificada

### 2.6.1 - Curva de pH

Utilizando a fração parcialmente purificada da  $\alpha$ -galactosidase, dialisada contra água destilada, estudou-se a atividade  $\alpha$ -galactosidásica em função de diferentes pH (2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5). Para a realização do ensaio de atividade utilizou-se o substrato sintético específico dissolvido em tampão McIlwaine nos referidos pH. Os valores de atividade enzimática foram expressos em percentagens do controle e representam médias de dois experimentos, cada um com três repetições.

### 2.6.2 - Estabilidade Térmica

Verificou-se o efeito de diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C) na atividade enzimática, usando-se o dialisado em tampão McIlwaine pH 5,0, do pico retido na cromatografia em CM-Celulose. Para isso, alíquotas de 500  $\mu$ l da solução enzimática foram incubadas por 10 minutos nas temperaturas indicadas acima, procedendo-se em seguida às determinações das atividades enzimáticas, que foram expressas em percentagens do controle e representam médias de três experimentos, cada um com três repetições.

### 2.6.3 - Íons Metálicos e Agentes Químicos

Utilizando-se a fração parcialmente purificada da  $\alpha$ -galactosidase, dialisada em tampão McIlwaine pH 5,0 investigou-se o efeito de vários íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) e agentes químicos (galactose, 2-mercaptoetanol, EDTA) na atividade enzimática. Esta fração (500  $\mu\text{l}$ ) foi pré-incubada a 37 °C por 10 minutos em presença e ausência (controle) do íon metálico ou agente químico na concentração de 4 mM, com exceção da galactose cuja concentração foi de 8 mM. Em seguida, o ensaio de atividade enzimática foi realizado em presença dos íons metálicos ou agentes químicos nas concentrações indicadas acima. Os valores de atividade foram expressos em percentagens do controle e representam médias de três experimentos, cada um com três repetições.

### 2.7 - Delineamento Experimental e Análise Estatística

A análise estatística dos resultados dos experimentos foi feita partindo-se de um delineamento fatorial com dois fatores. O primeiro fator possuía dois níveis (controle e salinidade) e o segundo correspondia aos dias após a semeadura. Foram estudadas as variáveis: atividades  $\alpha$ -galactosidásicas total e específica, atividades  $\beta$ -galactosidásicas total e específica e as concentrações de proteínas dos extratos. Usando-se o delineamento acima, determinou-se as diferenças estatísticas entre o controle e o tratamento salino pelo teste F, a partir da análise de variância (GOMES, 1973; MONTGOMERY, 1991) e comparações múltiplas através do teste de Tukey (MONTGOMERY,

1991). Usou-se um nível de 5% de significância nos testes realizados nas comparações múltiplas

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Condições de Ensaio de Atividade Galactosidásica

O estudo das atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas durante a germinação e estabelecimento da plântula foi precedido da determinação das condições ótimas de ensaio, em extratos totais obtidos de cotilédones de sementes quiescentes.

Na faixa de pH estudada (2,0 a 8,0) a atividade  $\alpha$ -galactosidásica aumentou desde pH 2,0 até pH 5,5, quando a partir daí começou a decrescer até pH 8,0 (Figura 1A). O pH 5,0 foi escolhido como pH de ensaio para a enzima  $\alpha$ -galactosidase. A atividade  $\beta$ -galactosidásica foi estudada na faixa de pH de 2,0 a 7,5. Esta atividade mostrou-se crescente até pH 3,5, decrescendo em seguida até pH 6,5, quando permaneceu constante até pH 7,5. O pH 4,0 foi escolhido como pH de ensaio para a enzima  $\beta$ -galactosidase (Figura 1B).

As atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas aumentaram em função de quantidades crescentes de extrato total (enzima bruta), diluídos 1:20 (v:v) com tampão McIlwaine pH 5,0 e pH 4,0, respectivamente, na mistura de reação, observando-se linearidade até o valor de  $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  de aproximadamente 0,600 (Figura 2). Portanto, todas as medidas de atividade galactosidásica foram feitas a partir de leituras de absorbâncias que resultassem em valores de  $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  menores ou iguais a 0,600.

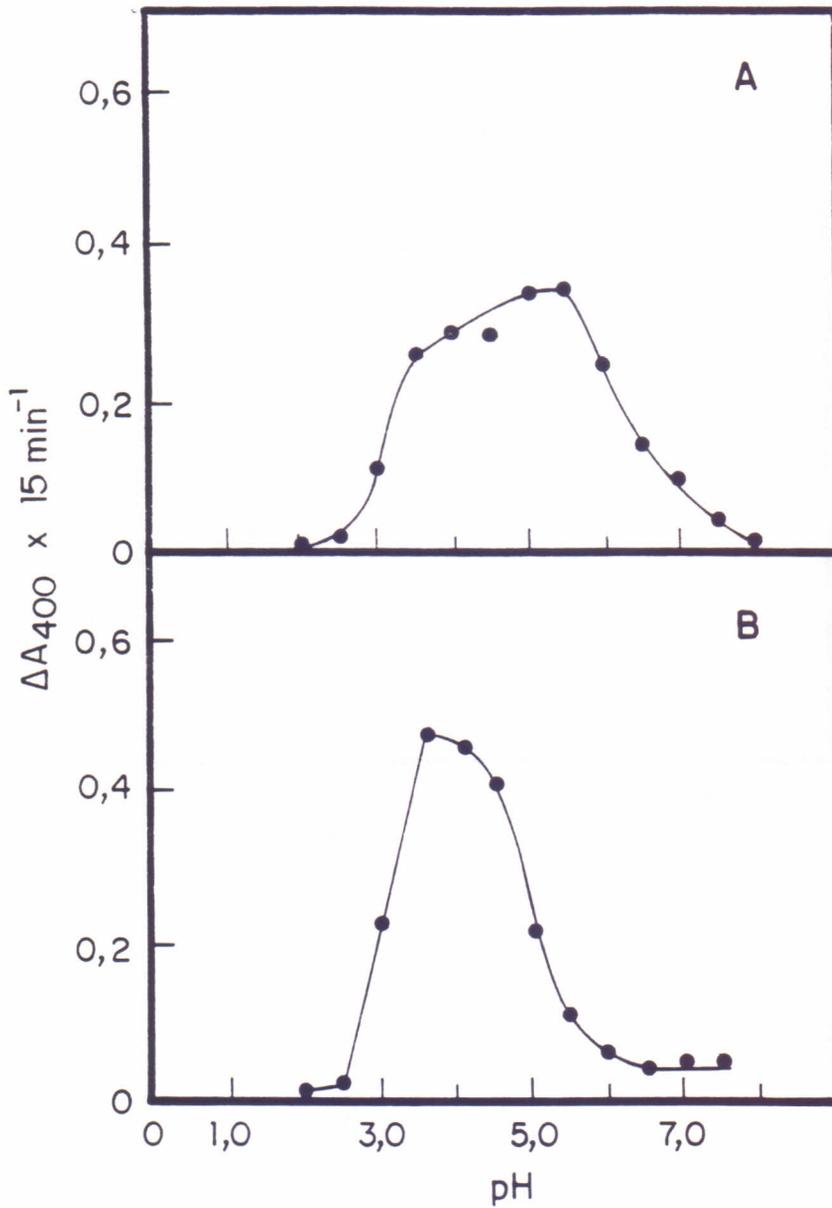


Figura 1 - Atividades  $\alpha$ -galactosidásica (A) e  $\beta$ -galactosidásica (B) em função do pH em extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba .

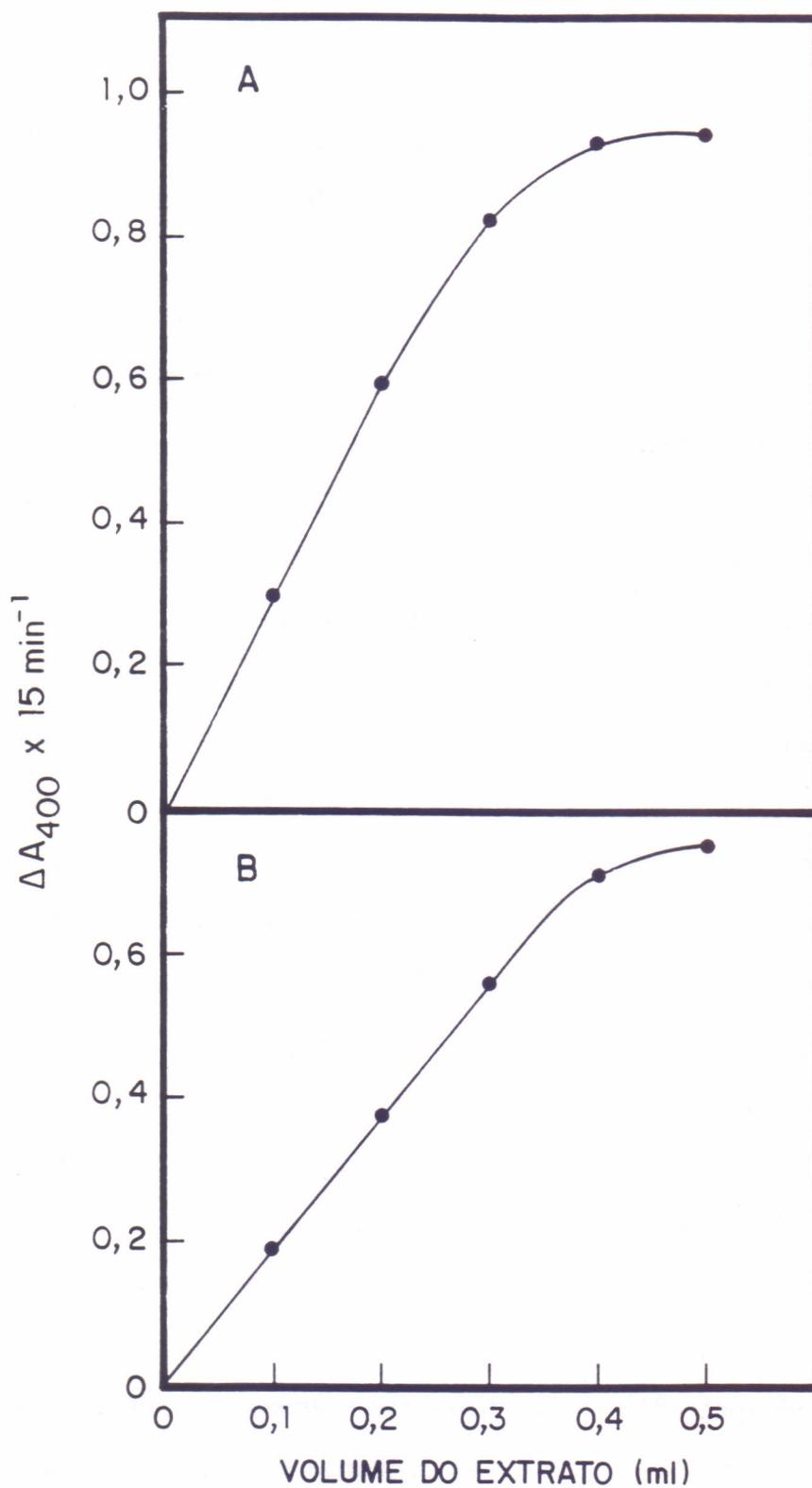


Figura 2 - Atividades  $\alpha$ -galactosidásica (A) e  $\beta$ -galactosidásica (B) em função de quantidades crescentes de extrato (enzima bruta) de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba.

### 3.2 - Efeito do Estresse Salino na Atividade Galactosidásica e na Concentração de Proteína

Nos experimentos realizados para se estudar os efeitos do estresse salino na atividade galactosidásica durante os primeiros estágios de desenvolvimento, observou-se que a atividade  $\alpha$ -galactosidásica total (Figura 3) nos cotilédones provenientes de sementes que foram semeadas em água destilada (tratamento controle) aumentou até o 1º dia após a semeadura, manteve-se constante até o 3º dia, quando decresceu até o final do experimento, atingindo um valor de 80% daquele do dia zero. Por outro lado, a atividade  $\alpha$ -galactosidásica total nos cotilédones provenientes de sementes semeadas em solução de NaCl 0.1 M (tratamento salino), decresceu no 1º dia, em seguida, aumentou até o 3º dia e, manteve-se aproximadamente constante até o 7º dia, e daí aumentou até o 9º dia quando apresentou valor igual a 111% daquele observado no dia zero. A atividade total medida no tratamento controle foi estatisticamente superior àquela do tratamento salino, até o 3º dia, igualou-se no 5º dia, e após o 7º dia ocorreu o inverso, ou seja, os valores do tratamento salino superaram os do controle (Tabela 1).

A atividade  $\beta$ -galactosidásica total (Figura 4) nos colitédones provenientes de sementes que foram semeadas em água destilada aumentou até o 3º dia após a semeadura, decrescendo, acentuadamente, até o final do experimento quando apresentou um valor igual a 61% daquele do dia zero. Nos cotilédones provenientes de sementes que foram semeadas em solução de NaCl 0.1 M, a atividade  $\beta$ -galactosidásica total aumentou até o 3º dia após a semeadura, decresceu até o 5º dia, e, finalmente, aumentou de atividade até o 9º dia quando apresentou um valor igual a 130% daquele do dia zero. No primeiro

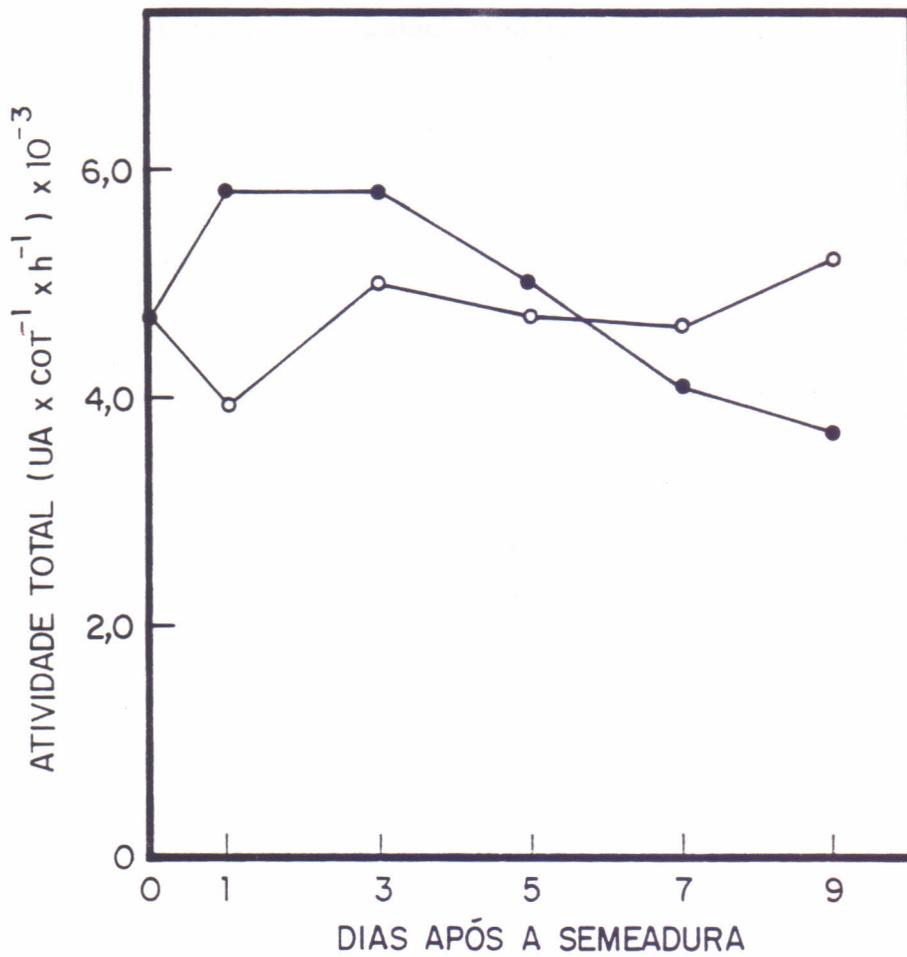


Figura 3 - Atividade  $\alpha$ -galactosidásica total de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba, semeadas em água destilada (●) e em solução de NaCl 0,1 M (○).

Tabela 1 - Atividades  $\alpha$ -galactosidásicas total e específica de extratos de cotilédones de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba semeadas em água destilada (C) e em solução de NaCl 0,1 M (S).

Dias após a semeadura	Atividade Total (UA x cot <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> )		Atividade Específica (UA x mgP <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> )	
	C	S	C	S
	1	5.880,1	3.968,5	2.059,6
3	5.802,6	5.012,2	2.997,2	1.991,3
5	<u>4.532,9</u>	<u>4.785,4</u>	6.348,6	2.862,1
7	4.101,7	4.698,8	9.034,6	3.120,0
9	3.753,0	5.239,0	27.195,7	5.275,9

-Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

-Os valores de atividades total e específica em extratos de cotilédones de sementes quiescentes foram 4.705,0 e 1.598,5, respectivamente.

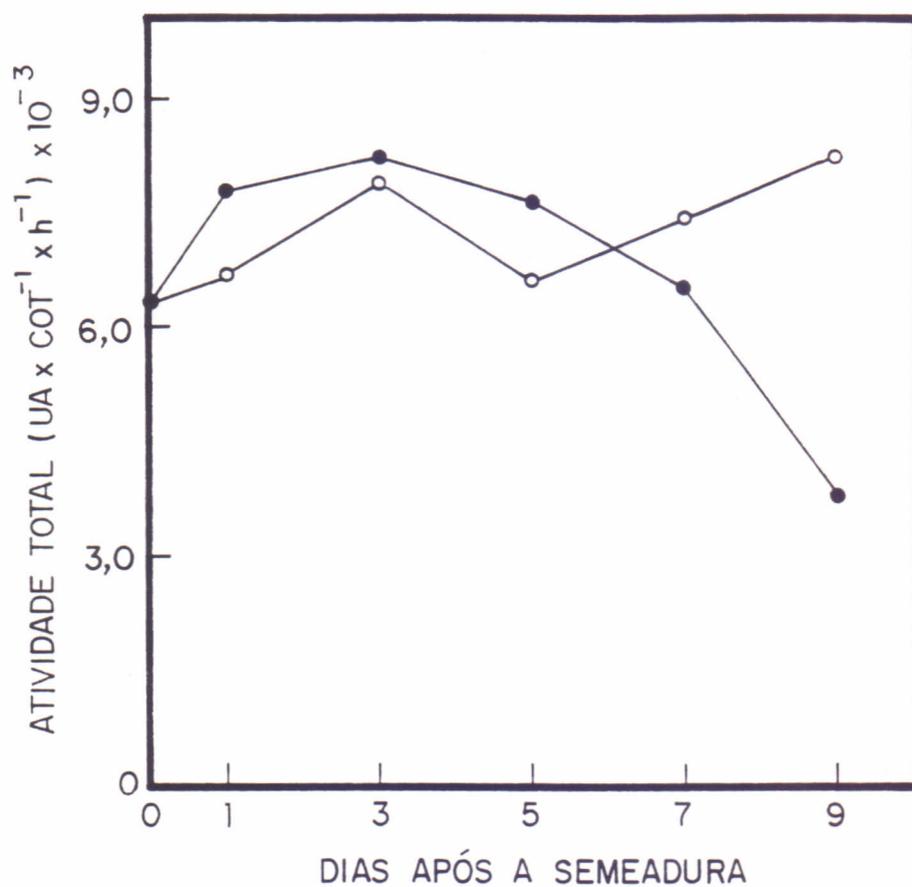


Figura 4 - Atividade  $\beta$ -galactosidásica total de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba, semeadas em água destilada (●) e em solução de NaCl 0,1 M (○).

dia do período experimental a atividade  $\beta$ -galactosidásica foi estatisticamente superior no tratamento controle, enquanto que no final (9º dia) a atividade no tratamento salino foi maior do que no controle (Tabela 2). Apesar da análise estatística haver mostrado diferença significativa entre os dois tratamentos no 5º dia após a semeadura (Tabela 2) as tendências das duas curvas (Figura 4) sugerem que do 3º ao 7º dias os valores de atividade nos dois tratamentos não devam diferir entre si.

As atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas específicas dos extratos de cotilédones provenientes de plântulas dos dois tratamentos apresentaram-se crescentes ao longo de todo o experimento, tendo a atividade específica do tratamento controle se mantido sempre superior àquela do tratamento salino, exceto no caso da atividade  $\beta$ -galactosidásica, que no 1º foi igual nos dois tratamentos (Figuras 5 e 6; Tabelas 1 e 2). No último dia do experimento o valor da atividade  $\alpha$ -galactosidásica específica medida no tratamento controle foi 5,0 vezes superior àquela do tratamento salino, enquanto que, para o mesmo dia a atividade  $\beta$ -galactosidásica específica medida no tratamento controle foi de 3.3 vezes àquela do tratamento salino (Figuras 5 e 6).

A Figura 7 mostra os valores de concentração de proteína dos extratos de cotilédones dos tratamentos controle e salino utilizados para as determinações das atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas. Como pode ser observado, a concentração de proteína nos dois tratamentos decresceu ao longo de todo o período experimental. Nos extratos de cotilédones provenientes de plântulas de sementes semeadas em água destilada a concentração de proteína apresentou um pequeno decréscimo até o 1º dia após a semeadura, decrescendo de forma acentuada até o 9º dia quando apresentou valor igual a 4,6% daquele do dia zero. Nos extratos de cotilédones provenientes do tratamento salino a

Tabela 2 - Atividades  $\beta$ -galactosidásicas total e específica de extratos de cotilédones de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba semeadas em água destilada (C) e em solução salina (S).

Dias a após semeadura	Atividade Total		Atividade Específica	
	$(\text{UA} \times \text{cot}^{-1} \times \text{h}^{-1})$		$(\text{UA} \times \text{mgP}^{-1} \times \text{h}^{-1})$	
	C	S	C	S
1	7.889,7	6.769,9	2.763,5	2.501,8
3	8.213,4	7.906,9	4.242,5	3.141,4
5	7.649,8	6.635,4	10.714,0	3.968,5
7	6.527,3	7.441,4	14.377,3	4.941,2
9	3.860,1	8.271,6	27.971,7	8.329,9

- Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.
- Os valores de atividades total e específica em extratos de cotilédones de sementes quiescentes foram 6.367,1 e 2.161,9, respectivamente.

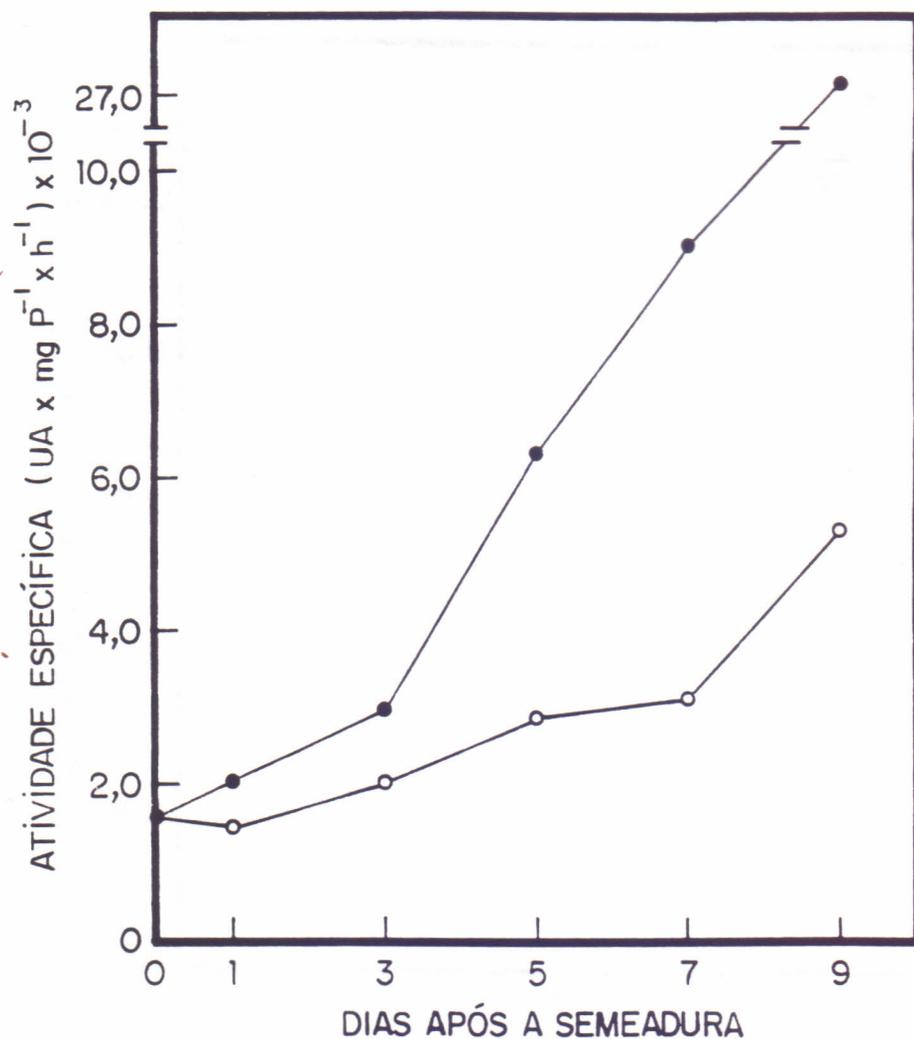


Figura 5 - Atividade  $\alpha$ -galactosidásica específica de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba, semeadas em água destilada (●) e em solução de NaCl 0,1 M (○).

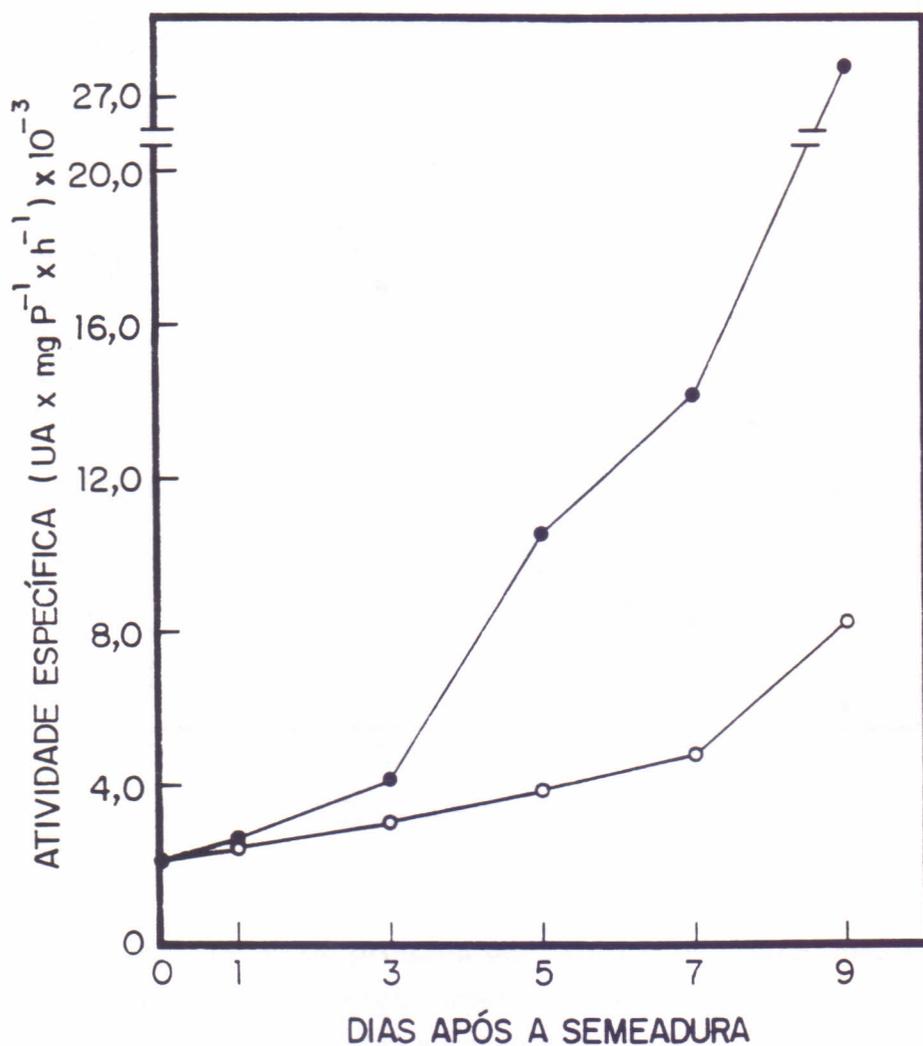


Figura 6 - Atividade  $\beta$ -galactosidásica específica de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), cv. Pitiúba semeadas em água destilada (●) e em solução de NaCl 0,1 M (○).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

R670529

BCT/UFC CATIVO

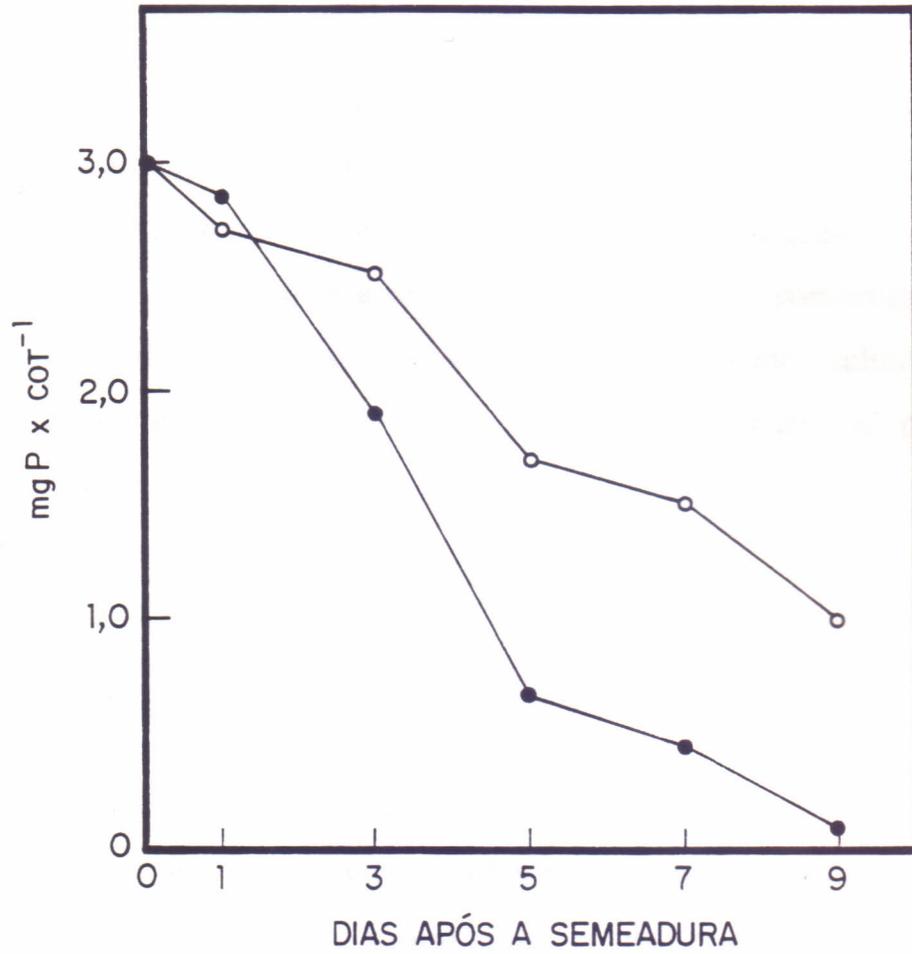


Figura 7 - Concentração de proteína em extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cv. Pitiúba semeadas em água destilada (●) e em solução de NaCl 0,1 M (○).

concentração de proteína apresentou pequeno decréscimo até o 3º dia após a semeadura, quando então começou a decrescer de modo significativo, chegando no final do experimento, com um valor de 33,4% daquele do dia zero. Além disso, do 3º ao 9º dias após a semeadura, os valores de concentração de proteína nos extratos de cotilédones provenientes do tratamento salino foram sempre estatisticamente maiores do que os encontrados para os provenientes do tratamento controle (Tabela 3).

### 3.3 - Efeito do NaCl *in vitro* na atividade galactosidásica

As atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas presentes no extrato cotiledonário total foram determinadas em função de quantidades crescentes de NaCl na mistura de reação. Como pode ser observado na Figura 8, este sal, na mesma concentração usada nos experimentos *in vivo*, praticamente não afetou a atividade das enzimas. Na concentração de NaCl mais elevada (1 M) as atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas apresentaram-se com valores iguais a 82,5% (Figura 8A) e 88,7% (Figura 8B) daqueles do controle, ou seja, as percentagens de inibição foram de 17,5% e de 11,3%, respectivamente.

Tabela 3 - Teor de proteína em extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba semeadas em água destilada (C) e em solução salina (S).

Dias após a semeadura	Concentração de Proteína ( mgP x cot <sup>-1</sup> )	
	C	S
1	<u>2,855</u>	<u>2,706</u>
3	1,936	2,517
5	0,714	1,672
7	0,454	1,506
9	0,138	0,993

- Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

- O valor do teor de proteína de extratos de cotilédones de sementes quiescentes foi de 2,966.

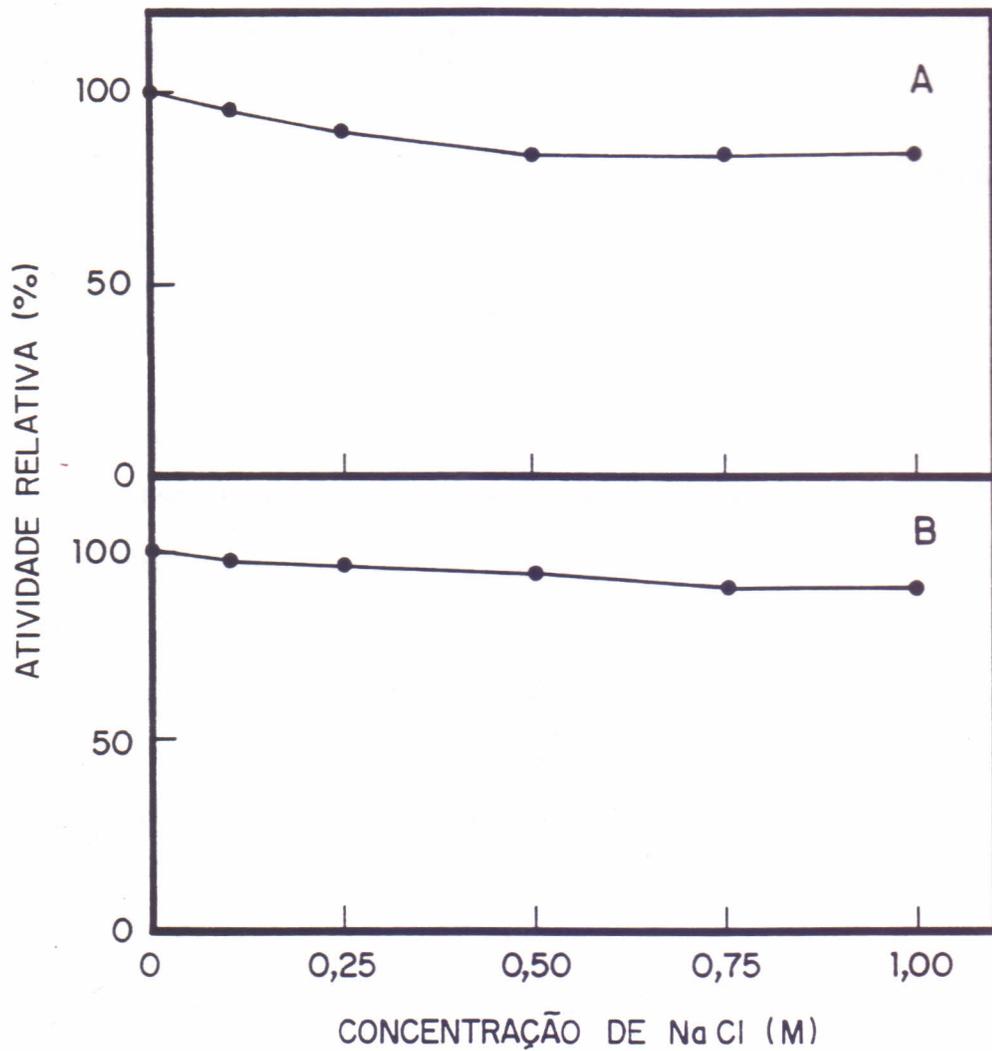


Figura 8 - Atividades  $\alpha$ -galactosidásica (A) e  $\beta$ -galactosidásica (B) de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação.

### 3.4 - Purificação Parcial da $\alpha$ -Galactosidase

#### 3.4.1 - Precipitação com Ácido Cítrico e Fracionamento com Sulfato de Amônio

O processo de purificação parcial da  $\alpha$ -galactosidase (Tabela 4) teve início com a precipitação do extrato total com ácido cítrico 1 M até pH 3,5. Esta etapa foi responsável por uma purificação da enzima de 3,8 vezes. Em seguida, o extrato assim purificado foi fracionado com sulfato de amônio nos intervalos de 0 a 20, 20 a 85 e 85 a 100% da saturação. Como resultado, observou-se que a fração precipitada no intervalo de 20 a 85% (F<sub>20-85</sub>) encerrava quase toda a atividade  $\alpha$ -galactosidásica recuperada do processo e apresentou uma purificação de 8,6 vezes em relação ao extrato total.

#### 3.4.2 - Cromatografia de Exclusão Molecular - Sephadex G-100

As frações (F<sub>20-85</sub>) provenientes de cotilédones de sementes quiescentes e de cotilédones de plântulas com 5 dias após a semeadura em água destilada (tratamento controle) e em solução de NaCl 0,1 M (tratamento salino) foram cromatografadas em coluna de Sephadex G-100 (Figuras 9, 10 e 11). Como pode ser observado, os três perfis cromatográficos foram semelhantes. Em cada um deles observou-se a presença de três picos de proteína (A<sub>280</sub>), com pesos moleculares, determinados segundo DETERMANN (1969), de aproximadamente 69.000, 20.000 e 4.500 e de somente um pico de atividade  $\alpha$ -galactosidásica correspondente a peso molecular de aproximadamente 43.500.

Tabela 4 - Purificação parcial da enzima  $\alpha$ -galactosidase de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba.

ETAPAS	Vol. (ml)	Atividade (UA x h <sup>-1</sup> )	Prot. (mg)	Ativ. Espec. (UA x mgP <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> )	Purif. (x)	Rend. (%)
Extrato Total	88,0	988.416	938,9	1.052,7	1	100
P <sub>AC. CITRÍCO</sub>	95,0	823.840	207,3	3.974,1	3,8	83,3
F <sub>20-85</sub>	29,0	686.720	76,2	9.012,0	8,6	69,5
Sephadex G-100	49,5	286.550	30,1	9.519,9	9,0	29,0
CM-Celulose	35,0	23.369	6,8	3.436,6	3,3	2,4

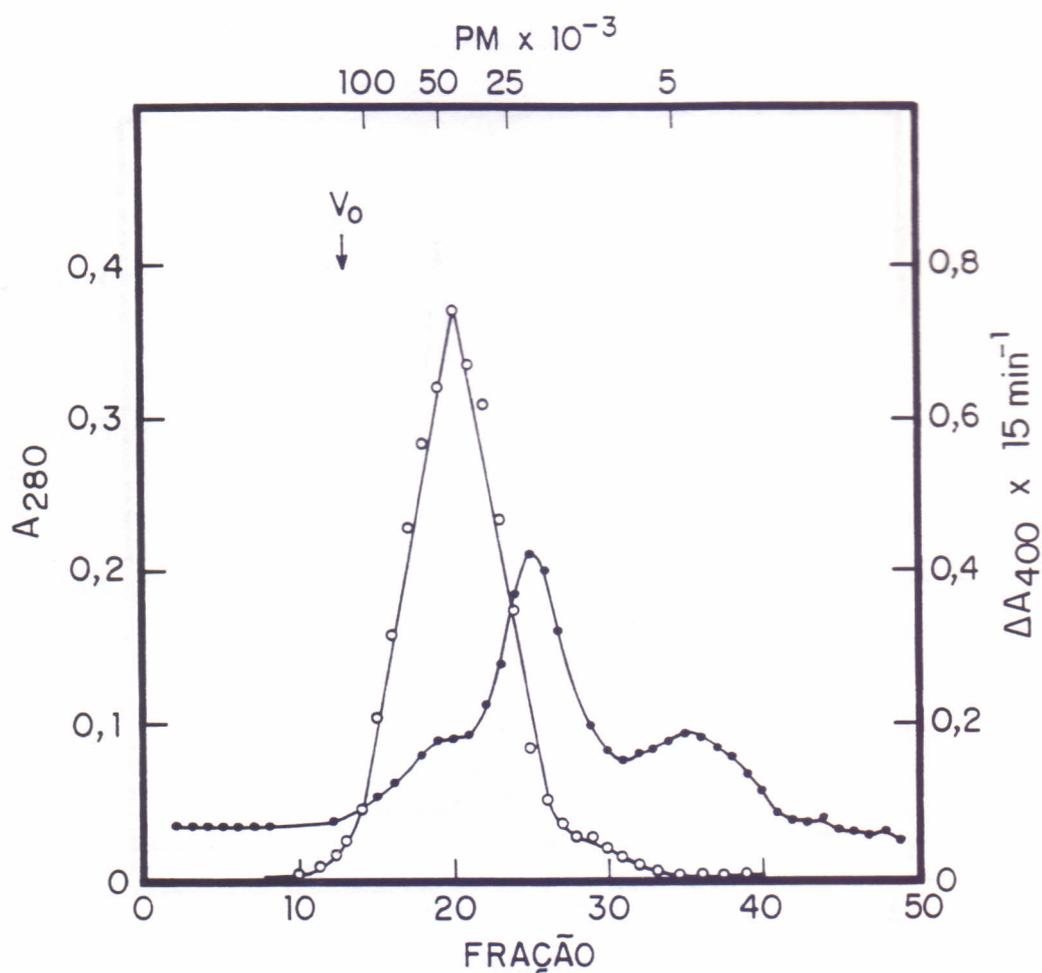


Figura 9 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da F<sub>20</sub> - 85 de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba. Proteína ( $A_{280}$ ; ●) e atividade  $\alpha$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$ ; ○).

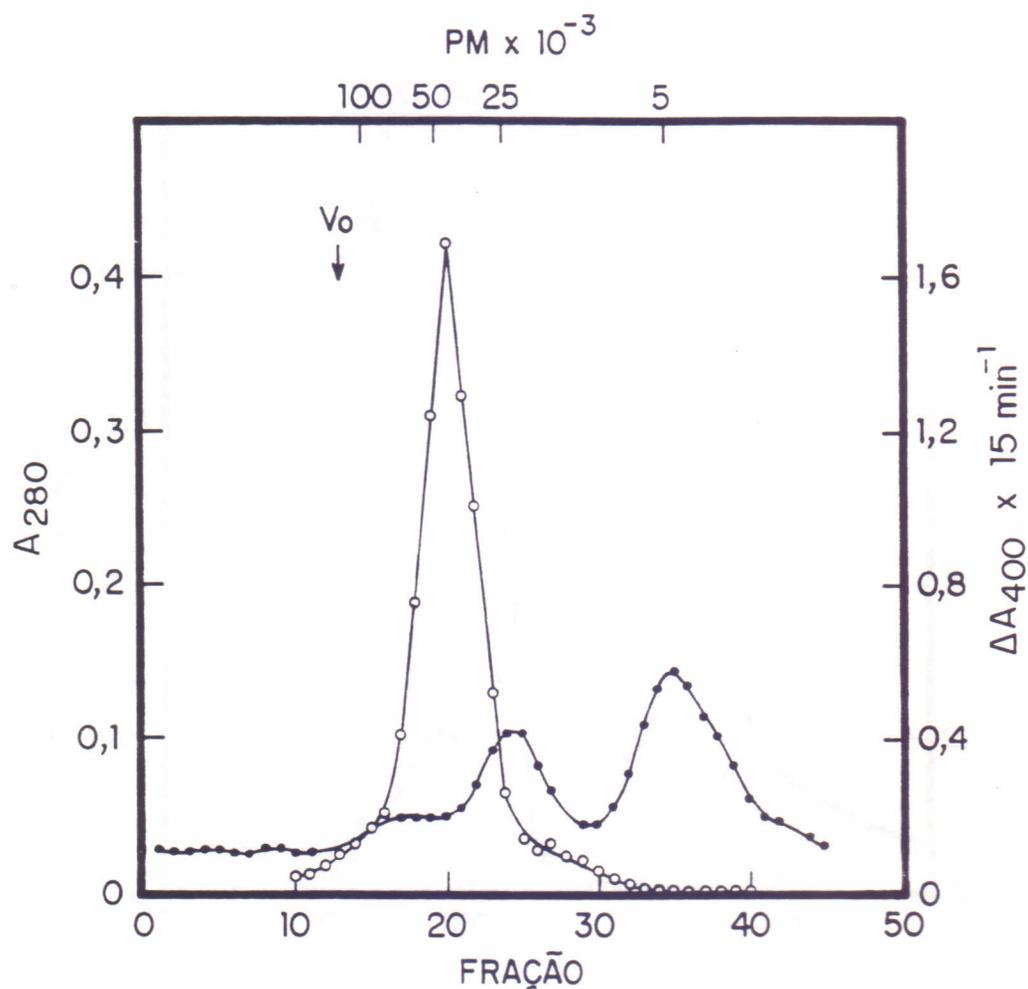


Figura 10 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da F<sub>20</sub> - 85 de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba após 5 dias de semeadura em água destilada. Proteína (A<sub>280</sub>; ●) e atividade α-galactosidásica (ΔA<sub>400</sub> × 15 min<sup>-1</sup>; ○).

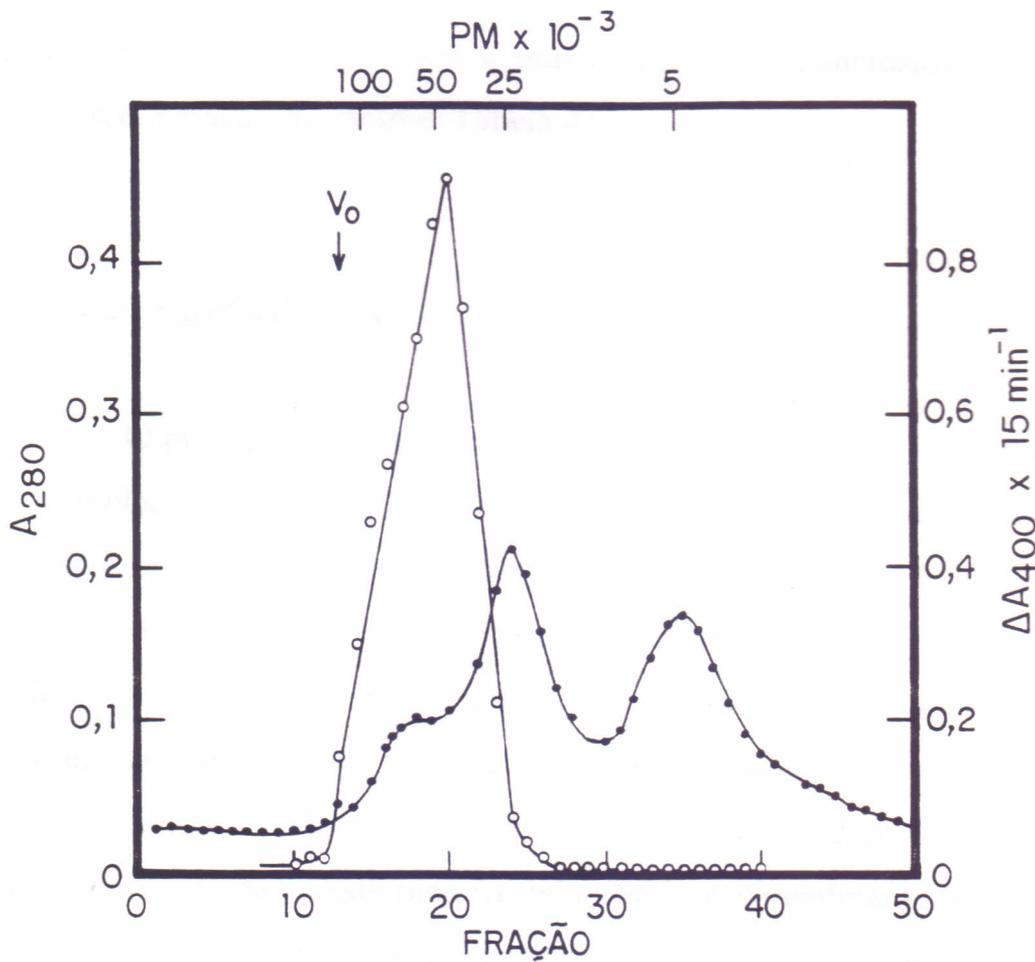


Figura 11 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da F<sub>20</sub> - 85 de extratos de cotilédones de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba após 5 dias de semeadura em solução de NaCl 0,1M. Proteína (A<sub>280</sub>; ●) e atividade α-galactosidásica (ΔA<sub>400</sub> × 15min<sup>-1</sup>; o).

Observou-se que, após esta etapa a purificação da  $\alpha$ -galactosidase era de 9.0 vezes, e a recuperação de 29,0% (Tabela 4).

### 3.4.3 - Cromatografia de Troca Iônica - CM-Celulose

O pico de atividade  $\alpha$ -galactosidásica resultante da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 da F<sub>20-85</sub> de sementes quiescentes foi submetido à uma cromatografia, de troca iônica em coluna de CM-Celulose. A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico onde evidenciou-se a presença de dois picos de proteína (A<sub>280</sub>), um não retido e outro adsorvido, o qual foi eluído por meio de um gradiente salino. Toda a atividade  $\alpha$ -galactosidásica ficou retida na coluna e foi eluída com KCl na concentração de aproximadamente 0,5 M sob a forma de um único pico. Este pico ( $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada) foi utilizado nos experimentos de caracterização da enzima. Vale ressaltar, que resultados diferentes deste foram obtidos quando a cromatografia em CM-Celulose era realizada sem uma lavagem prévia do gel com HCl e NaOH, como descrito em Material e Métodos. Neste caso ocorria o aparecimento de dois picos de atividade  $\alpha$ -galactosidásica eluídos com o gradiente de KCl (resultados não apresentados). Após esta cromatografia verificou-se que a purificação parcial da enzima foi de 3,3 vezes, e com recuperação em atividade de 2,4% (Tabela 4).

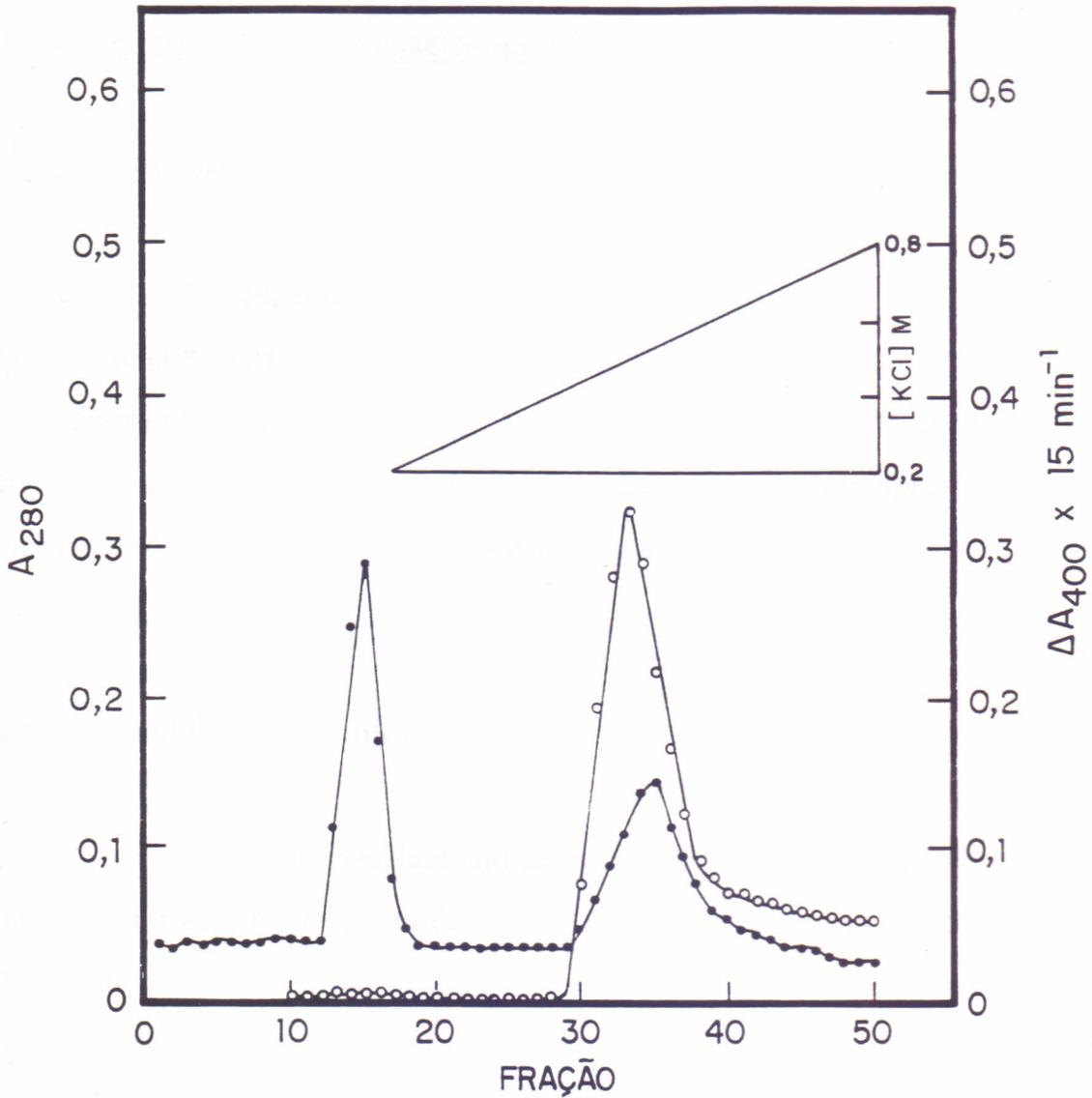


Figura 12 - Cromatografia em coluna de CM-Celulose do pico eluído da cromatografia em Sephadex G-100 da F<sub>20-85</sub> do extrato de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba. Proteína (A<sub>280</sub>; ●) e atividade α-galactosidásica (ΔA<sub>400</sub> x 15 min<sup>-1</sup>; ○).

### 3.5 - Caraterização da $\alpha$ -Galactosidase Parcialmente Purificada

#### 3.5.1 - Curva de pH

A dependência da atividade  $\alpha$ -galactosidásica parcialmente purificada com o pH do meio de reação é apresentada na Figura 13. A atividade  $\alpha$ -galactosidásica cresceu desde pH 2,0 até 2,5, manteve-se aproximadamente constante até pH 4,0 e cresceu novamente até pH 6,0, onde apresentou máxima atividade. A partir daí a atividade decresceu até pH 7,5.

#### 3.5.2 - Estabilidade Térmica

A enzima  $\alpha$ -galactosidase mostrou-se bastante estável quando pré-incubada em temperaturas na faixa de 30 a 50 °C, conservando 93% da atividade do controle. Contudo, para temperaturas mais elevadas a atividade mostrou-se decrescente, atingindo 13 e 6% da atividade do controle respectivamente, nas temperaturas de 60 e 80 °C (Figura 14).

#### 3.5.3 - Íons Metálicos e Agentes Químicos

Os efeitos de diferentes cátions divalentes e agentes químicos na atividade  $\alpha$ -galactosidásica são mostrados na Tabela 5. Como pode ser observado os cátions  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  praticamente não afetaram a atividade  $\alpha$ -galactosidásica. Os cátions  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  provocaram inibições

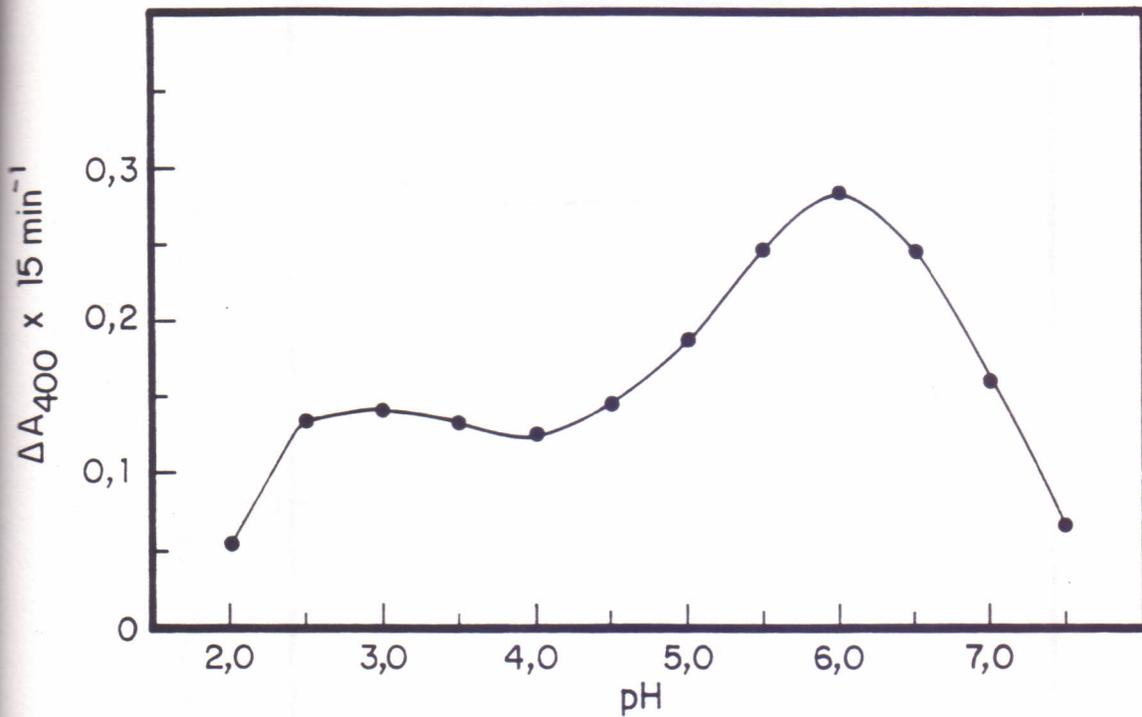


Figura 13 - Atividade enzimática em função do pH da  $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba.

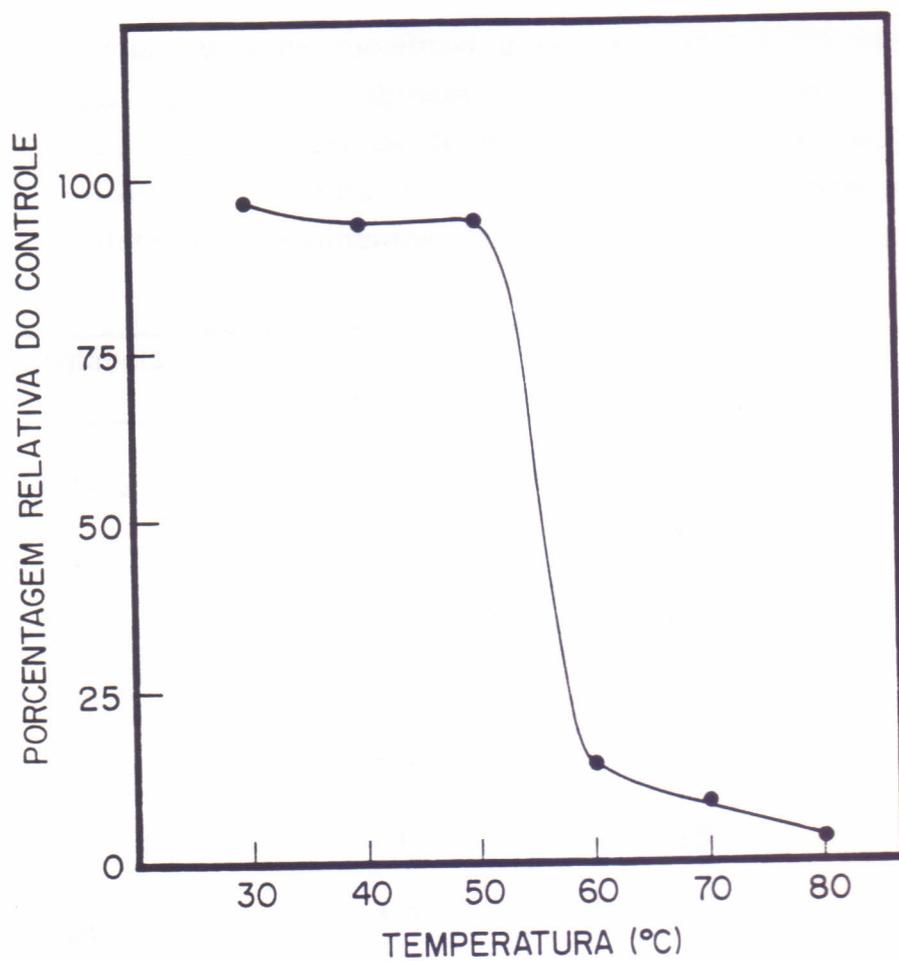


Figura 14 - Efeito da temperatura na atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba.

Tabela 5 - Efeito de íons metálicos e outros efetores na atividade da  $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada de extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba. Os valores representam uma média de três diferentes experimentos em triplicata cada.

Substância	Concentração Final (mM)	Atividade (% do Controle)	% de inibição
CaCl <sub>2</sub>	4,0	94	6
MgCl <sub>2</sub>	4,0	91	9
FeCl <sub>2</sub>	4,0	87	13
MnCl <sub>2</sub>	4,0	87	13
CoCl <sub>2</sub>	4,0	79	21
CuCl <sub>2</sub>	4,0	78	22
HgCl <sub>2</sub>	4,0	43	57
2-ME	4,0	99	1
EDTA	4,0	86	14
Galactose	8,0	23	77

moderadas de (13 a 22%). O íon  $Hg^{2+}$  apresentou-se, dentre os cátions estudados como o mais forte inibidor, causando uma redução na atividade enzimática de 57%. A atividade  $\alpha$ -galactosidásica praticamente não sofreu alteração devido a presença de 2-mercaptoetanol (2-ME), foi fracamente inibida pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (14% de inibição) e fortemente inibida pelo carboidrato galactose (77%).

#### 4 - DISCUSSÃO

A presença de  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias detectadas em sementes quiescentes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivar Pitiúba foi também observada nesta espécie (ALANI *et al.*, 1989), em outras espécies da mesma família (CORCHETE & GUERRA, 1987a, 1987b) e em espécies de família diferente (KUNDU *et al.*, 1990).

Quando se estudou os efeitos do pH (Figura 1) nas atividades destas enzimas, presentes em extratos totais de sementes quiescentes, verificou-se que elas apresentaram ótimos de pH nas faixas de 5,0 - 5,5 ( $\alpha$ -galactosidase) e de 3,5 - 4,0 ( $\beta$ -galactosidase). Os valores de pH ótimos para  $\alpha$ -galactosidase concordam com os encontrados por DEY & PRIDHAM (1969) em *Vicia faba*, DEY (1981) em *Castanea sativa* e ALANI *et al.* (1989) em *Vigna unguiculata* e aqueles para  $\beta$ -galactosidase foram semelhantes aos obtidos por AGRAWAL & BAHL (1968) em *Phaseolus vulgaris* e BISWAS (1987) em *Vigna sinensis*.

No presente trabalho, foram estudadas as atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas durante os estágios iniciais de estabelecimento da plântula. As duas enzimas aumentaram inicialmente suas atividades totais até atingirem determinados valores, quando, então, houve estabilização e, posteriormente, decréscimo progressivo em suas atividades (Figuras 3 e 4; Tabelas 1 e 2). De forma semelhante ao encontrado por outros autores (CORCHETE & GUERRA, 1987b), as atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas totais proveniente, de extratos de cotilédones de sementes quiescentes apresentaram-se em altos níveis (Figuras 3 e 4), sugerindo a importância dessas enzimas no processo germinativo. Como se

sabe as galactosidases são responsáveis pela hidrólise de polissacarídeos e oligossacarídeos com a produção de D-galactose, que pode ser uma fonte de energia (DEY, 1980) ou de matéria prima para o eixo embrionário em crescimento. Aumentos em atividades semelhantes aos aqui observados, em enzimas que pré-existem na semente quiescente são explicados por alguns autores como sendo devido à um aumento em seus processos de solubilização que ocorre nos primeiros dias de germinação (JULIANO & VARNER, 1969; TÁRRAGO & NÍCOLAS, 1976; CASTRO, 1982). Por outro lado, o comportamento das atividades específicas (Figuras 5 e 6; Tabelas 1 e 2) foi diferente daquele observado para as atividades totais, pois foi sempre crescente durante todo o período experimental. Isto deveu-se, principalmente, ao decréscimo no teor de proteína cotiledonária (Figura 7; Tabela 3). Este mesmo comportamento foi observado para galactosidases extraídas de cotilédones de lentilha (CORCHETE & GUERRA, 1987b) e para proteases, amilases e RNases cotiledonárias desta mesma espécie (GOMES FILHO & PRISCO, 1978; PRISCO *et al.*, 1981; GOMES FILHO *et al.*, 1983).

Os estudos sobre os efeitos do NaCl *in vivo* nas enzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases (Figuras 3, 4, 5 e 6; Tabelas 1 e 2) demonstraram que a salinidade retardou o desenvolvimento das atividades enzimáticas ao longo do processo germinativo e estabelecimento da plântula. Estes resultados são discordantes daqueles encontrados por CORCHETE & GUERRA (1986) em cotilédones de lentilha, que observaram que a salinidade não causou nenhum efeito nas atividades destas enzimas. Por outro lado, efeitos inibitórios semelhantes aos aqui observados foram encontrados por outros autores nas enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e RNases (PRISCO *et al.*, 1981; GOMES FILHO *et al.*, 1983) de feijão-de-corda Pitiúba. O fato dos valores de atividades totais  $\alpha$ - e  $\beta$ -

galactosidásicas no 9º dia após a semeadura terem sido estatisticamente superiores (Tabelas 1 e 2) nos extratos de cotilédones de plântulas do tratamento salino, sugere que, em condições de estresse há uma inibição do sistema enzimático que degrada essas enzimas, pois como se sabe o nível de uma determinada enzima numa célula é resultado do balanço entre sua síntese e sua degradação (LEHNINGER, 1990). É possível, portanto, que o efeito observado da salinidade nas galactosidases ou em outros sistemas enzimáticos (KAHANE & POLJAKOFF-MAYBER, 1968; PRISCO & O'LEARY, 1970), ocorram como consequência de outros eventos iniciais causados pelo estresse.

Vale ressaltar que na concentração de NaCl aqui utilizada (0,1 M), este sal é responsável pela inibição da mobilização e/ou do transporte das reservas cotiledonárias para o eixo embrionário, além de reduzir em cerca de 50% o tamanho das plântulas deste cultivar com 7 dias após a semeadura (GOMES FILHO & PRISCO, 1978; ENÉAS FILHO 1979; PRISCO *et al.*, 1981). Os resultados apresentados na Figura 7 e Tabela 3, demonstram que o estresse imposto às plantas foi responsável por uma significativa inibição da mobilização e/ou do transporte das proteínas solúveis dos cotilédones para o eixo embrionário. Efeitos inibitórios idênticos do NaCl ou de outros agentes osmóticos não iônicos na germinação e estabelecimento da plântula também foram encontrados por outros autores (UHVITS, 1946; PRISCO & O'LEARY, 1970; MACHADO *et al.*, 1976; SHEORAN & GARG, 1978; KAWASAKI *et al.*, 1983). É possível, portanto, que o efeito do NaCl aqui observado nas atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas seja, em parte, responsável pela redução no crescimento das plântulas sob condições de estresse.

Os experimentos realizados *in vitro* (Figura 9) demonstram claramente que o NaCl na concentração de 0,1 M não afeta as atividades

galactosidásicas. Isto, reforça a idéia de que os efeitos deste sal *in vivo* devem ser a níveis de solubilização e/ou renovação ("turnover") das enzimas e não à uma inibição propriamente dita em suas atividades. Efeitos semelhantes do NaCl *in vitro* na atividade ribonucleásica foram encontrados por GOMES FILHO (1976) em cotilédones deste mesmo cultivar. Todavia, GOMES FILHO & PRISCO (1978) observaram resultados diferentes ao estudarem o efeito do NaCl *in vivo* e *in vitro* na atividade de uma protease (pH 6,0) extraída de cotilédones de feijão-de-corda Pitiúba. Enquanto que, este sal *in vitro* foi um forte inibidor da atividade proteolítica, *in vivo* ele praticamente não afetou esta atividade. É importante destacar que devemos ser cautelosos ao extrapolar possíveis efeitos de íons inorgânicos sobre as atividades enzimáticas *in vitro* com aqueles *in vivo*. Segundo GREENWAY & OSMOND (1972) as interações dos íons com as enzimas *in vitro* se fazem de forma artificial, pois eles interagem diretamente com as proteínas em solução, enquanto que, *in vivo* é possível que as células regulem o meio iônico do citoplasma de tal maneira que as enzimas não são normalmente expostas a altos níveis de sais.

Quando a F<sub>20-85</sub> proveniente de extratos de sementes quiescentes foi submetida a uma cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (Figura 9), somente um pico de atividade (PM de 43.500) foi detectado, diferentemente de mais de um pico encontrado por ALANI *et al.* (1989) em sementes quiescentes desta mesma espécie, DEY & PRIDHAM (1969) em *Vicia faba* e DEY (1981) em *Castanea sativa*. Resultados idênticos foram obtidos quando feitos com a F<sub>20-85</sub> provenientes de extratos de cotilédones de plântulas com 5 dias após a semeadura em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M (Figura 10 e 11). Esses resultados demonstram que, pelo menos, nas condições aqui empregadas, novas formas de  $\alpha$ -galactosidase, diferindo significativamente em pesos

moleculares, não surgem com o processo germinativo e, conseqüentemente, a salinidade não provoca nenhuma alteração qualitativa, mas apenas quantitativa na atividade  $\alpha$ -galactosidásica. É possível que a discordância de nossos dados com aqueles observados por ALANI *et al.* (1989) na mesma espécie, ou daqueles encontrados por outros autores em espécies diferentes, seja devido ao fato de que nas condições por nós utilizadas, a enzima se encontra na forma monomérica e não em formas associadas (dímeros, trímeros, ou tetrâmeros). Reforçando esta idéia PORTER *et al.* (1992) mostraram que a  $\alpha$ -galactosidase de soja tinha comportamento diferente quando a cromatografia de exclusão molecular era realizada em diferentes condições de pH. Eles observaram que a pH 4,0 se comportava como um tetrâmero de sua forma monomérica a pH 7,0.

Quando o pico de atividade da Sephadex G-100 foi submetido a um fracionamento em coluna de troca iônica (Figura 12) somente um pico de atividade foi encontrado, o qual ficava retido na coluna, sendo eluído com KCl 0,5 M. Novamente nossos resultados diferiram dos encontrados por outros autores, onde a existência de mais de um pico de atividade  $\alpha$ -galactosidásica foi encontrado (DEY, 1981; CORCHETE & GUERRA, 1987a, 1987b; ALANI *et al.*, 1989). Vale ressaltar, que essa cromatografia quando realizada com o gel sem o prévio tratamento de lavagem com HCl e NaOH, apresentava dois picos de atividades, ambos retidos, gerando portanto, um resultado falso mostrando a existência de pelo menos, duas isoenzimas de  $\alpha$ -galactosidase (resultados não apresentados).

O decréscimo no grau de purificação de 9,0 para 3,3 vezes entre as etapas de Sephadex G-100 e CM-Celulose (Tabela 4) deve-se à uma grande perda de atividade da enzima que ocorre durante a cromatografia em CM-Celulose. Todavia, como demonstrado na Figura 12, esta etapa representa uma

purificação da enzima, visto que, o pico de proteína não retido, que se mostrou maior que o retido, não apresentou atividade  $\alpha$ -galactosidásica.

A curva de pH apresentada na Figura 13 com a  $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada, mostra claramente a existência de um máximo de atividade a pH 6,0. No entanto, é possível também admitir-se a existência de um outro pico de atividade na faixa de pH entre 2,5 e 3,5, porém com atividade enzimática muito inferior àquele encontrado a pH 6,0. Este resultado se assemelha aos encontrados por AGRAWAL & BAHL (1968) em *Phaseolus vulgaris* e por DEY & PRIDHAM (1969) em *Vicia faba*.

A  $\alpha$ -galactosidase de feijão-de-corda Pitiúba parcialmente purificada apresentou estabilidade térmica (Figura 14), semelhante à de outras galactosidases vegetais (DEY & PRIDHAM, 1969; OGAWA *et al.*, 1990).

Quando estudou-se os efeitos dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  na atividade da  $\alpha$ -galactosidase, observou-se que estes íons praticamente não alteraram a atividade enzimática (Tabela 5). Este resultado com relação ao  $\text{Ca}^{2+}$  difere daquele obtido por CORCHETE & GUERRA (1987a) na  $\alpha$ -galactosidase de corpos protéicos de cotilédones de sementes de lentilha quando este íon inibiu cerca de 19% da atividade da enzima. O efeito inibitório dos íons  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  sobre a atividade  $\alpha$ -galactosidásica é mostrada na Tabela 5. O resultado com relação ao  $\text{Mn}^{2+}$ , foi diferente daquele encontrado por CORCHETE & GUERRA (1987a), nesta enzima extraída de corpos protéicos de cotilédones de sementes de lentilha, a qual se mostrou insensível a este íon. Na literatura pesquisada não se encontrou dados sobre os efeitos dos íons  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  na atividade da  $\alpha$ -galactosidase, porém, os efeitos desses dois últimos íons na atividade da  $\beta$ -galactosidase de cotilédones de *Vigna radiata* são conhecidos (KUNDU *et al.*, 1990). Estes autores mostraram que o  $\text{Co}^{2+}$  não

afetava a atividade enzimática, enquanto que o  $\text{Cu}^{2+}$ , de forma semelhante ao aqui observado, era um inibidor da  $\beta$ -galactosidase. O íon  $\text{Hg}^{2+}$ , causa uma forte inibição na atividade desta enzima, inibição semelhante àquela encontrada em outras galactosidases vegetais (OGAWA *et al.*, 1990; KUNDU *et al.*, 1990). O 2-ME semelhante ao encontrado por OGAWA *et al.* (1990) para  $\beta$ -galactosidase de frutos de *Actinidia chinensis*, não teve efeito na atividade  $\alpha$ -galactosidásica (Tabela 5). Uma comparação dos efeitos do EDTA na  $\alpha$ -galactosidase não foi possível, devido à falta de dados na literatura pesquisada sobre os efeitos deste agente quelante em outras  $\alpha$ -galactosidases. No entanto, estudos feitos por KUNDU *et al.* (1990), para as isoenzimas de  $\beta$ -galactosidase de *Vigna radiata*, mostram que o EDTA provoca diferentes graus de inibição (4 a 56%) na atividade destas enzimas. A galactose, um dos produtos da ação catalítica das  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases, mostrou-se um potente inibidor da  $\alpha$ -galactosidase (Tabela 5), de forma semelhante ao encontrado para as  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases de lentilha CORCHETE & GUERRA (1987a) e para as  $\beta$ -galactosidases de *Vigna sinensis* (BISWAS, 1987) e de *Vigna radiata* (KUNDU *et al.* 1990). Este efeito da galactose é explicado por alguns autores como sendo devido a uma inibição competitiva das enzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases (CORCHETE & GUERRA, 1986; PORTER *et al.* 1992).

## 5 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- 1 - as enzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases pré-existem em sementes quiescentes e se mantêm em níveis altos durante os primeiros estágios de desenvolvimento;
- 2 - a salinidade provocou um retardamento nas atividades  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidásicas, especialmente nos primeiros dias após a semeadura, que foi interpretado como sendo devido a menor solubilização destas enzimas no tratamento salino;
- 3 - no final do período experimental as atividades galactosidásicas no tratamento salino foram superiores às obtidas no tratamento controle, sugerindo um efeito da salinidade na renovação ("turnover") destas enzimas;
- 4 - a adição de NaCl *in vitro* não afetou a atividade galactosidásica na dose usada nos experimentos *in vivo* (0,1 M);
- 5 - a precipitação do extrato total com ácido cítrico mostrou-se adequada, apresentando uma purificação de 3,8 vezes, com uma recuperação de 83,3% da atividade presente no extrato total;

5 - a cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 da F20-85 foi responsável por uma purificação de cerca de 9,0 vezes, com uma recuperação de 29,0% da atividade presente no extrato total, enquanto que, a cromatografia de troca iônica em CM-Celulose foi capaz de purificar apenas cerca de 3,3 vezes com uma recuperação em atividade de 2,4%;

6 - o peso molecular da enzima parcialmente purificada, determinado por filtração em gel, foi de 43.500, tendo-se observado apenas uma  $\alpha$ -galactosidase cotiledonária de mesmo peso molecular ao longo da germinação e estabelecimento da plântula;

7 - a salinidade não provocou o aparecimento de novas formas de  $\alpha$ -galactosidase;

8 - a enzima parcialmente purificada teve termoestabilidade semelhante a outras  $\alpha$ -galactosidases vegetais, pH ótimo de 6,0 e foi fortemente inibida por galactose e por  $Hg^{2+}$ , porém os íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , bem como o agente redutor 2-mercaptoetanol não tiveram nenhum efeito sobre sua atividade.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, K. M. L. & O. P. BAHL (1968). Glicosidase of *Phaseolus vulgaris*. The J. Biol. Chem. 243(1):103-111.
- ALANI, S. R., P. M. SMITH & P. MARKAKIS (1989).  $\alpha$ -galactosidases of *Vigna Vinguiculata*. Phytochemistry 28: 2047-2051.
- ASHRAF, M., T. McNEILLY & A. D. BRADSHAW (1987). Selection and heritability of tolerance to sodium chloride in four forage species. Crop. Sci., 227: 232-239.
- BANDEIRA, M. L. A. (1992). Tentativas para minorar os efeitos da salinidade nas etapas iniciais do desenvolvimento de feijão-de-corda. Dissertação de Mestrado em Agronomia: Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 68pp.
- BERLYN, G. P. (1972). Seed germination and morphogenesis. In seed biology, vol.3, T.T. Kozlowski, ed. New York: Academic Pregs.
- BERNSTEIN, L. (1975). Effects of salinity and sodicity on plant growth. Ann. Rev. Phytopathol. 13: 295-312.
- BEWLEY, J. D. & M. BLACK (1978). Physiology and biochemistry of seeds. Vol. 1: Development, germination and growth. Springer-Verlag, New York, EE.UU. 306pp.
- BEWLEY, J. D. & M. BLACK (1982). Physiology and Biochemistry of Seeds. Vol. 2: Viability, Dormancy and Environmental Control. Springer-Verlag, New York, EE.UU, 375pp.
- BEWLEY, J. D. & M. BLACK (1985). Seeds: Physiology of development and germination. New York: Plenum Press.

- BISWAS, T. K. (1987). Characterization of  $\beta$ -galactosidases from the germinating seeds of *Vigna sinensis*. Phytochemistry 26(2)359-364.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal Biochem., 72: 248-254.
- BRESLER, E., B. L. McNEAL & D. L. CARTER (1982). Saline and sodic soils. Principles-dynamics-modeling. New York, Springer-Verlag, New York, EE.UU., 236 pp.
- BUFFUM, B. C. (1896). Alkali: some observations and experiments. Wyoming Agri. Eep. Stn. Bull. 29:219-253.
- BUFFUM, B. C. (1899). Alkali Studies III - Germinating Experiments With Alkali Salts. Ann. Rep. Wyoming Agric. Exp. Stn. pp. 1-40.
- CARTER, D. L. (1975). Problems of salinity in agriculture. In: Plants in Saline Enviroments. A. Poljakoff-Mayber & J. Gale (eds.) Springer-Verlang, New York, EE.UU., pp.25-35.
- CASTRO, M. A. R. (1982). Efeitos da salinidade na atividade de enzimas responsáveis pela mobilização de amido durante a germinação da *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Pitiúba. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ceará, 56 pp.
- CHANDRA-SEKHAR, K. N. & D. A. DEMASON (1990). Identification and imunocytochemical localization of  $\alpha$ -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. Planta, 181:53-61.
- CHING, Te May (1972). Metabolism of germination seeds. In seed biology, vol. 2, T. T. Kozlowski, ed. New York: Academic Press.

- CORCHETE, M. P. & H. GUERRA (1986). Effects of NaCl and polyethylene-glicol an solute content and glicosidase activities during germination of lentil seeds. Plant, Cell and Environment, 9:589-593.
- CORCHETE, M. P. & H. GUERRA (1987a).  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activities in protein bodies and cell walls of lentil seed cotyledons. Phytochemistry, 26(4):927-932.
- CORCHETE, M. P. & H. GUERRA (1987b).  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activities during germination of lentil seeds. Plant Physiol. Biochem., 25(2):105-109.
- CRAMER, G. R., A. LAUCHLI & V. S. POLITO (1985). Displacement of  $\text{Ca}^{2+}$  by  $\text{Na}^{2+}$  from the plasmalemma of root cells. A primare response to salt stress? Plant Physiol., 79: 207-211.
- DETERMANN, H. (1969). Gel Cromatography. Springer-Verlag, New York, U.S.A. 202p.
- DEY, P. M. (1980). Biochemistry of  $\alpha$ -D-galactosidic linkages in the plant plant kindom. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37,283.
- DEY, P. M. (1981).  $\alpha$ -galactosidase from sweet chestnut seeds. Phytochemistry, 20(7):1493-1496.
- DEY, P. M. & J. B. PRIDHAM (1969). Purification and properties of  $\alpha$ -galactosidases from *Vicia faba* seeds. Biochem. J. 113:49-55.
- DEY, P. M. & J. B. PRIDHAM (1972). Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases. Advanc. Enzimol. 36:91-130
- EDWARDS, M., I. C. M. DEA, P. V. BULPIN & J. S. G. REID (1988). Xiloglucan (amyloid) mobilisation in the cotiledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. Planta 163:133-140.

- ENEAS FILHO, J. (1979). Efeitos da salinidade na mobilização de carboidratos de reserva de feijão-de-corda Pitiúba (*Vigna sinensis* (L.) Walp) durante a germinação. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 78p.
- GOMES, F. P. (1973). Curso de estatística experimental. 5ª ed. Livraria Nobel, Piracicaba.
- GOMES FILHO, E. (1976). Efeitos da salinidade na atividade de três enzimas hidrolíticas extraídas de cotilédones de feijão-de-corda Pitiúba (*Vigna sinensis* (L.) Savi) durante a germinação. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 77p.
- GOMES FILHO, E. (1985). Efeitos da salinidade na atividade ribonucleásica de cotilédones de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Pitiúba durante a germinação. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 144pp.
- GOMES FILHO, E. & J. T. PRISCO (1978). Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on the proteolytic activity of *Vigna sinensis* (L.) Savi cotyledons during germination. Rev. Bras. Bot. 1:83-88.
- GOMES FILHO, E., J. T. PRISCO, F. A. P. CAMPOS & J. E. FILHO (1983). Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. Physiol. Plant., 59:183-188.
- GONZALEZ-MURUA, C., M. SANCHES-DIAZ, P. APARICIU-TEJU, A. MUÑOZ-RUEDA & J. S. G. REID (1985). The effect of NaCl and water stress on germination and  $\alpha$ -galactosidase activity in germinated seeds of *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *T. brachycaly cinum*. J. Plant Physiol. 119:317-326.
- GREENWAY, H. & C. B. OSMOND (1972). Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. Plant Physiol. 44:1031-1034.

- HABER, A. H. & H. J. LUIPPOLD (1960). Separation of mechanisms initiating cell division and cell expansion in lettuce seed germination. Plant Physiol. 35: 168-73.
- HARTMANN, H. T., D. E. KESTER & F. T. DAVIES (1990). Plant propagation-principles and practices. Prentice-Hall International Edition 5th 657pp.
- HASSON, E. & A. POLJAKOFF-MAYBER (1980/81) Germination and pea seeds exposed to stress. Israel J. Bot., 29: 98-104.
- HAYWARD, H. E. & C. H. WADLEIGH (1949). Plant growth on saline and alkali soils. Adv. Agron., 1: 1-39.
- JANN, R. C. & R. D. AMEM (1977). What is germination? In the physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. A. A. Khan, ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., pp. 7-28.
- JOHNSON, K. D. & P. D. DANIELS, M. J. DOWLER & D. L. RAYLE (1974). Activation of *Avena* coleoptile cell wall glycosidases by hydrogen ions and auxin. Plant Physiol., 53:224-228.
- JULIANO, B. O. & J. E. VARNER (1969). Enzymic degradation of starch granules in the cotyledons of germinating peas. Plant Physiol. 44:886-892.
- KAHANE, I. & POLJAKOFF-MAYBER (1968). Effect of substrate salinity on the ability for protein synthesis in pea roots. Plant. Physiol. 43:1115-1119.
- KAWASAKI, T., T. AKIBA & M. MORITSUGU (1983). Effects of high concentrations of sodium chloride and polyethylene glycol on the growth and ion absorption in plants. Plant Soil., 75:75-85.
- KENT, L. M. & A. LAUCHLI (1985). Germination and seedling growth of cotton: Salinity-calcium interactions. Plant, Cell and Environment, 8:155-159.

- KERMODE, A. R., J. D. BEWLEY, J. DASGUPTA & S. MISRA (1986). The transition from seed development to germination: A key role for desiccation? Hort. Science 21(5): 1113-18.
- KONNO, H. & H. KATOH (1992). An extracellular  $\beta$ -galactosidase secreted from cell suspension cultures of carrot. Its purification and involvement in cell wall-polysaccharide hydrolysis. Physiol. Plant. 85:507-514.
- KONNO, H., Y. YAMASAKI & K. KATOH (1986). Characteristics of  $\beta$ -galactosidase purified from cell suspension cultures of carrot. Physiol. Plant. 68:46-52.
- KUNDU, R. K., P. DE-KUNDU & A. C. BANERJEE (1990). Multiple forms of  $\beta$ -galactosidase from the germination seeds of *Vigna radiata*. Phytochemistry, 29:2079-2082.
- LEHNINGER, A. L. (1990). Princípio de bioquímica. Sarvier, 725pp.
- LI, S. C., M. Y. MAZZOTA, S. F. CHIEN & Y. T. LI (1975). Isolation and characterization of jack bean  $\beta$ -galactosidase. J. Biol. Chem., 250:6786-6791.
- LYLES, L. & C. D. FANNING (1964). Effect of presoaking, moisture tension, and soil salinity on the emergence of grain sorghum. Agron. J., 56:518-520.
- MACEDO, L. S. (1988). Salinidade em áreas irrigadas. João Pessoa, PB. EMEPA-PB. Comunicado Técnico, Nº 38, 11p.
- MACHADO, R. C. R., A. B. RENA & E. C. VIEIRA (1976). Efeito da desidratação osmótica na germinação de sementes de vinte cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) L. Rev. Ceres, 128:310-320.
- MAYER, A. M. & A. POLJAKOFF-MAYER (1963). The Germination of Seeds. Pergaminon Press. New York, EE.UU., 236 pp.

- MAY, P. H., S. M. TEIXEIRA & A. G. SANTANA (1988). Cawpea production and economic importance in Brazil. In E. E. WATT & J. P. P. ARAÚJO. Cowpea research in Brazil. IITA/EMBRAPA. IBADAN, Nigéria, 31-62.
- McILWAINE, T. C. (1921). A Buffer solution foil colorimetric comparison. J. Biol. Chem. 49:185-186.
- MOLION, L. C. B. (1985). Secas: o eterno retorno. Ciência Hoje, Nº 18 p.26.
- MONTGOMERY, D. C. (1991). Design and analysis de experiments. 3th ed. Jonh Wiley e Sons, New York.
- MURRAY, D. R. (1984). Seed physiology. Vol. 2: Germination and reserve mobilization. Academic Press, New York, EE.UU. 295pp.
- OGAWA, H., H. FUKUMOTO, T. YANO, H. YAMAMOTO & T. TOCHIKURA (1990). Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from kiwifruit. Nippon Shokukin Kogyo Gakkaishi, 37(4): 298-305.
- PALMIANO, E. P. & B. O. JULIANO (1973). Changes in the activity of some hydrolases, peroxidases, and catalase in the rice seed during germination. Plant Physiol. 52:274-277.
- PORTER, J. E. & M. R. LADISCH (1991). Ion-exchange and affinity chromatography costs in  $\alpha$ -galactosidase purification. Biotechnol. and Bioengineering, 39:717-724.
- PORTER, J. E., A. SARIKAYA, K. M. HERRMANN & M. L. LADISCH (1992). Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean  $\alpha$ -galactosidase. Enzyme Microb. Technol., 14:609-613.
- PRESSEY, R. (1983).  $\alpha$ -galactosidase in ripening tomatoes. Plant Physiol. 71:132-135.

- PRIDHAM, J. B. & P. M. DEY (1974). Plant Carbohydrate Biochemistry. (PRIDHAM, J. B. ed.) Academic Press. Londres pp. 83.
- PRISCO, J. T. (1987). Contribuição ao estudo da fisiologia do estresse salino durante a germinação e estabelecimento da plântula de uma glicófita (*Vigna unguiculata*) L. Walp. Tese para professor Titular de Fisiologia Vegetal. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 65 pp.
- PRISCO, J. T., I. L. AINOUS & S. C. MELO (1975). Changes in nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna unguiculata* (L.)Walp. seeds. Physiol. Plant., 33:18-21.
- PRISCO, J. T. & G. H. F. VIEIRA (1976). Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. Physiol. Plantarum., 36:317-320.
- PRISCO, J. T., J. ENÉAS FILHO & E. GOMES FILHO (1981). Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seeds. Rev. Bras. Bot. 4:63-71.
- PRISCO, J. T. & J. M. O'LEARY (1970). Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. Turrialba, 20:177-184.
- RAVEN, P. H., R. F. EVERT & S. E. EICHHORN (1992). Biology of plants. Wort Publishers, 791pp.
- REID, J. S. G. & D. BEWLEY (1979). A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*trigonella foenum-graecum* L.), an endospermic leguminous seed. Planta 147: 145-150.
- ROBYT, J. F. & B. J. WHITE (1987). Biochemical techniques, theory and practice. Brooks/Cole Publ. Comp., Califórnia, EE.UU., 407pp.

- SALISBURY, F. B. & C. W. ROSS (1991). Plant Physiology. 3rd ed. Wadsworth Publishing Company. California. EE.UU.. 540 pp.
- SHEORAN, I. S. & D. P. GARG (1978). Effect of salinity on the activities of RNasa, DNasa and protease during germination and early seedling growth of mung bean. Plant Physiol. 44:171-174.
- SINGH, S. H. & K. O. RACHIE (1985). Condea reserch, production and utilization. Chichester, Jonh Willey e sons. 373p.
- SOMME, R. (1971). The correlation between the mono-oligo and polysccharides and the glycosidases present. Acta Chem. Scand. 25:759.
- STROGNOV, B. P. (1964). Physiological basis of salt tolerance of plants. Traduzido por A. Poljakoff-Mayber & A. M. Mayer. Israel Program for Scientific Translations Ltda. Jerusalém, Israel. 200 pp.
- TÁRRAGO, F. J. & G. NICOLAS (1976). Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. Plant Physiol. 58:618-621.
- TIPSON, R. S. & D. HORTON (1980). Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Academic Press 33:283-372.
- UHVITS, R. (1946). Effect of osmotic pressure on water absortion and germination of alfalfa seeds. Amer. J. Bot., 33: 278-285.
- UNGAR, I. A. (1967). Influence of salinity and temperature on seed germination. Ohio J. Sci., 167: 120-123.
- UNGAR, I. A. (1978). Halophyte seed germination. Bot. Rev., 44: 233-264.
- WASEL, Y. (1972). Biology of halophytes. Academic Press. New York, EE.UU.. 395 pp.

WALLNER, S. J. & J. E. WALKER (1975). Glycosidases in cell wall-degrading extracts of ripening tomato fruits. Plant Physiol. 55:94-98.

WIEN, H. C. & SUMMERFIELD R. J. (1984). Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: The physiology of tropical field crops. John Wiley & Sons, New York, EE.UU., pp. 353-383.