

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FABRÍCIO BONFIM SUDÉRIO

**CARACTERIZAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASES  
PURIFICADAS DE CAULES DE PLÂNTULAS DE *Vigna*  
*unguiculata* SEMEADAS NA AUSÊNCIA E NA  
PRESENÇA DE NaCl**

Fortaleza  
2007

FABRÍCIO BONFIM SUDÉRIO

**CARACTERIZAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASES PURIFICADAS  
DE CAULES DE PLÂNTULAS DE *Vigna unguiculata* SEMEADAS  
NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE NaCl**

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de doutor em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará

**ORIENTADOR:  
JOAQUIM ENÉAS FILHO**

**FORTALEZA – CE**

**- 2007 -**

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

S94c Sudério, Fabrício Bonfim

Caracterização de  $\beta$ -galactosidades purificadas de caules de plântulas de *Vigna unguiculata* sementeadas na ausência e na presença de NaCl [manuscrito] / Fabrício Bonfim Sudério  
113 f., il. color., enc.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007

Orientador: Joaquim Enéas Filho

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

I. Feijão-de-corda – Estresse salino 2. Enzimas – Purificação I. Enéas Filho, Joaquim (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Doutorado em Bioquímica  
III. Título

CDD 574.192

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

A citação de qualquer trecho dessa tese é permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

---

Fabício Bonfim Sudério

TESE APROVADA EM 03/07/2007.

### BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho  
Orientador - UFC

---

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho  
Conselheiro - UFC

---

Profª. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho  
Conselheiro - UFC

---

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira  
Conselheiro - UNIFOR

---

Profª. Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão  
Conselheiro - UECE

**A meus pais,**

**Antonio Sampaio Sudério e  
Maria do Socorro Bonfim Sudério,  
exemplos de amor, coragem,  
dedicação e permanente apoio  
durante toda a minha vida.**

**À minha esposa,**

**Daniele Caetano Beserra Sudério,  
pelo amor, compreensão e  
dedicação incondicional durante  
todo o período de realização  
desse trabalho.**

## **Agradecimentos**

Ao professor Joaquim Enéas Filho, por seu constante apoio, incentivo, orientação e pelo grande exemplo profissional e pessoal.

Ao professor Enéas Gomes Filho, pelas imprescindíveis sugestões e orientação durante a elaboração desse trabalho.

À amiga Gislainy Karla da Costa Barbosa, responsável por vários momentos de superação durante a realização desse trabalho, pela imprescindível colaboração, pela amizade sincera, união e companheirismo.

Ao professor Renato de Azevedo Moreira e às professoras Maria Erivalda Farias de Aragão e Cristina Paiva da Silveira Carvalho, pela gentileza de participar e colaborar com esse trabalho.

Ao Dr. José Hélio Costa pela gentileza em participar desse trabalho, orientando e colaborando de forma efetiva com a etapa de caracterização molecular, além do exemplo profissional.

Às integrantes do laboratório de Fisiologia Vegetal II, Michela e Daniela, pelo constante apoio e colaboração, bem como pela amizade.

À amiga Viviane Pinho, pelo apoio incondicional em todos os sentidos, principalmente na reta final do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Vegetal I, Professor José Tarquínio Prisco, Aiala, Alexcyane, Ana Raquel, Carlos Eduardo, Elton, Franklin, Juan Carlos, Nara e Valdinéia, pela colaboração, amizade e convivência.

À professora Dirce Fernandes de Melo, que além do incentivo, disponibilizou os recursos necessários para a realização do trabalho de caracterização molecular, bem como a todos os integrantes do seu laboratório, de forma especial à amiga Alana Cecília e ao Iuri, pela colaboração prestada durante esse trabalho de tese.

Meus agradecimentos ao professor Albenísio Gomes da Silveira e a todos os integrantes do seu laboratório, de um modo especial ao Eduardo Voight, pela efetiva participação em parte imprescindível do trabalho, à Thereza Christine e ao amigo Luiz Aguiar, pelo apoio durante o período de realização desse trabalho.

À professora Maria Raquel Alcântara de Miranda, pelo apoio e sugestões, e à bolsista de iniciação científica Luana, pela colaboração prestada durante esse trabalho.

Aos professores Francisco Assis de Paiva Campos, Ana Lúcia Pontes Freitas, Norma Maria Benevides, José Thadeu Abreu de Oliveira, Ilka Maria Vasconcelos e Thales Barbosa Grangeiro, que durante o período de realização desse trabalho, estiveram sempre dispostos a colaborar.

A todos os professores, colegas do curso de pós-graduação e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, que direta ou indiretamente, participaram desse trabalho.

A toda minha família e de forma especial meus irmãos, José Sudério Neto, Marcos Antonio Bonfim Sudério e Silvia Maria Bonfim Sudério, meus queridos sobrinhos e sobrinhas, minha sogra, meu sogro, minhas cunhadas e meus cunhados, pelo apoio, amizade e incentivo durante toda a minha vida acadêmica.

A todos os amigos e companheiros de trabalho da Faculdade de Educação de Crateús (FAEC) - Universidade Estadual do Ceará (UECE), pelo apoio e compreensão durante o período de realização desse trabalho.

A todos os meus amigos pessoais que durante a realização desse trabalho, me apoiaram e me incentivaram.

*Este trabalho foi realizado graças aos auxílios das seguintes instituições:*

Fundação Cearense de Pesquisa e Cultura (FUNCAP), que durante parte do período desse trabalho, concedeu a bolsa de estudo.

CAPES e CNPq, pelos financiamentos ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular e aos projetos do grupo de Fisiologia Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Biblioteca Central da Universidade Federal do Ceará, que forneceu as condições necessárias para a realização do levantamento bibliográfico e para a confecção da ficha catalográfica.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, por fornecer todo o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<u>1.1. Justificativa.....</u>	20
<u>1.2. Objetivos.....</u>	22
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
<u>2.1. Efeitos da salinidade nas plantas.....</u>	24
<u>2.2. Salinidade e crescimento.....</u>	27
<u>2.3. Enzimas envolvidas na expansão da parede celular.....</u>	29
<u>2.4. <math>\beta</math>-galactosidases.....</u>	31
<u>2.5. Feijão-de-corda.....</u>	38
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<u>3.1. Material vegetal.....</u>	40
<u>3.2. Condições de germinação.....</u>	40
<u>3.3. Obtenção de caules liofilizados.....</u>	42
<u>3.4. Extração de proteínas citosólicas.....</u>	42

<u>3.5. Preparação da parede celular.....</u>	<b>44</b>
<u>3.6. Extração das proteínas presentes na parede celular.....</u>	<b>44</b>
<u>3.7. Determinação da atividade enzimática da desidrogenase da glucose-6-fosfato e da fosfatase ácida.....</u>	<b>44</b>
3.7.1. Determinação da atividade da desidrogenase da glucose 6-fosfato.....	<b>45</b>
3.7.2. Determinação da atividade da fosfatase ácida.....	<b>45</b>
<u>3.8. Determinações da atividade <math>\beta</math>-galactosidásica e do teor de proteína.....</u>	<b>46</b>
<u>3.9. Purificação de <math>\beta</math>-galactosidases.....</u>	<b>46</b>
3.9.1. Fracionamento com sulfato de amônio.....	<b>46</b>
3.9.2. Cromatografia de troca iônica - DEAE Sephadex A-50.....	<b>47</b>
3.9.3. Cromatografias de afinidade - Lactosil-Sepharose.....	<b>47</b>
<u>3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-nativa) em condições ácidas.....</u>	<b>49</b>
<u>3.11. Revelação da atividade <math>\beta</math>-galactosidásica no gel de poliacrilamida.....</u>	<b>50</b>
<u>3.12. Coramento de bandas protéicas no gel de poliacrilamida.....</u>	<b>50</b>
<u>3.13. Caracterização das <math>\beta</math>-galactosidases purificadas.....</u>	<b>51</b>
3.13.1. Determinação da massa molecular - Cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-150).....	<b>51</b>
3.13.2. Curva de pH.....	<b>52</b>
3.13.3. Temperatura ótima de ensaio.....	<b>52</b>
3.13.4. Termoestabilidade.....	<b>52</b>
3.13.5. Termoinativação em presença de galactose e glucose.....	<b>52</b>

3.13.6. Efeito de açúcares na atividade $\beta$ -galactosidásica.....	53
3.13.7. Análise cinética da atividade $\beta$ -galactosidásica em função de diferentes concentrações de galactose e $\beta$ -PNPG.....	53
3.13.8. Atividades enzimáticas de $\beta$ -galactosidases em diferentes substratos.....	54
<u>3.14. Caracterização molecular.....</u>	<u>54</u>
3.14.1. Desenho dos “primers” para $\beta$ -galactosidase.....	54
3.14.2. Extração de RNA total de caules de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.....	56
3.14.3. Quantificação de RNA Total.....	57
3.14.4. Eletroforese do RNA Total.....	57
3.14.5. Reação de transcrição reversa (RT).....	58
3.14.6. Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).....	58
3.14.7. Eletroforese do cDNA amplificado de $\beta$ -galactosidase.....	59
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<u>4.1. Grau de pureza da preparação de parede celular.....</u>	<u>61</u>
<u>4.2. Purificação de <math>\beta</math>-galactosidases.....</u>	<u>61</u>
4.2.1. Fracionamento com sulfato de amônio.....	61
4.2.2. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50.....	61
4.2.3. Cromatografia de afinidade em Lactosil-sepharose.....	67
<u>4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-nativa) em condições ácidas.....</u>	<u>73</u>
<u>4.4. Caracterização das <math>\beta</math>-galactosidases purificadas.....</u>	<u>73</u>
4.4.1. Determinação da massa molecular.....	73
4.4.2. pH ótimo de atividade.....	79
4.4.3. Temperatura ótima de atividade.....	81
4.4.4. Termoestabilidade.....	81

4.4.5. Terminoativação.....	84
4.4.6. Efeito de açúcares na atividade $\beta$ -galactosidásica.....	88
4.4.7. Análise cinética da atividade $\beta$ -galactosidásica.....	89
4.4.8. Atividade das $\beta$ -galactosidases em diferentes substratos.....	93
<u>4.5. Caracterização molecular.....</u>	<u>95</u>
4.5.1. Grau de pureza e integridade do RNA total isolado de caules de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.....	95
4.5.2. Expressão de gene (s) da $\beta$ -galactosidase.....	95
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estádios de desenvolvimento III e VIII durante o estabelecimento das plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba oriundas de sementes semeadas sob condições controle (H<sub>2</sub>O destilada) e tratamento salino (NaCl 100 mM)..... 41
- Figura 2-** Esquema de obtenção das frações contendo proteínas citosólicas e oriundas da parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba..... 43
- Figura 3-** Esquema de purificação de  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -gal I e  $\beta$ -gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -gal III) a partir de extratos provenientes de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba..... 48
- Figura 4:** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de cDNAs de  $\beta$ -galactosidases usado para o desenho dos "primers" ..... 55
- Figura 5-** Purificação de  $\beta$ -galactosidases citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento III provenientes do tratamento controle..... 63
- Figura 6-** Purificação de  $\beta$ -galactosidases citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento III provenientes do tratamento salino..... 64
- Figura 7-** Purificação de  $\beta$ -galactosidases citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento VIII provenientes do tratamento controle. .... 65
- Figura 8-** Purificação de  $\beta$ -galactosidases citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento VIII provenientes do tratamento salino. .... 66
- Figura 9-** Purificação de  $\beta$ -galactosidases de parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] nos estádios de desenvolvimento III provenientes dos tratamentos controle e salino..... 70
- Figura 10-** Purificação de  $\beta$ -galactosidases de parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] nos estádios de desenvolvimento VIII provenientes dos tratamentos controle e salino..... 71
- Figura 11-** Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (gradiente 5-15%), em pH ácido. As setas indicam as bandas referentes às  $\beta$ -galactosidases de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba. .... 74
- Figura 12-** Calibração da coluna de Sephadex G-150. .... 75
- Figura 13-** Perfil de eluição em Sephadex G-150 para determinação da massa molecular de  $\beta$ -gal I de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de

desenvolvimento III e VIII, em condições controle e tratamento salino.....	76
<b>Figura 14-</b> Perfil de eluição em Sephadex G-150 para determinação das massa molecular de $\beta$ -gal II de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e tratamento salino.....	77
<b>Figura 15-</b> Perfil de eluição em Sephadex G-150 para determinação da massa molecular de $\beta$ -gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle.....	78
<b>Figura 16-</b> Atividade das $\beta$ -galactosidases citosólicas e presentes na parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba em função do pH. Plântulas provenientes do tratamento controle e tratamento salino.....	80
<b>Figura 17-</b> Efeito da temperatura do meio de ensaio na atividade das $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -Gal I e $\beta$ -Gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -Gal III) de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba. Plântulas provenientes do tratamento controle e tratamento salino.....	82
<b>Figura 18-</b> Atividade de $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -Gal I e $\beta$ -Gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -Gal III) de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba em função da temperatura de pré-incubação. Plântulas provenientes do tratamento controle e tratamento salino.....	83
<b>Figura 19-</b> Termoinativação de $\beta$ -gal I de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba em condições controle e tratamento salino na ausência e na presença de glucose a 50 mM e galactose a 50 mM.....	85
<b>Figura 20-</b> Termoinativação de $\beta$ -gal II de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba em condições controle e tratamento salino na ausência e na presença de glucose a 50 mM e galactose a 50 mM.....	86
<b>Figura 21-</b> Termoinativação de $\beta$ -gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba em condições controle e tratamento salino na ausência e na presença de glucose a 50 mM e galactose a 50.....	87
<b>Figura 22-</b> Curva de atividade enzimática em função de concentrações crescentes de substrato ( $\beta$ -PNPG) e seus respectivos gráficos duplo-recíprocos (Lineweaver-Burk) de $\beta$ -Gal I, $\beta$ -Gal II e $\beta$ -Gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba, no estágio de desenvolvimento VIII. ....	90
<b>Figura 23-</b> Efeito da concentração do substrato $\beta$ -PNPG na atividade de $\beta$ -Gal I, $\beta$ -Gal II e $\beta$ -Gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento VIII, em condições controle na ausência e na presença de galactose (gráfico de Lineweaver-Burk). ....	92
<b>Figura 24-</b> Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do RNA total (0,5 $\mu$ g) isolado de caules de plântulas de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> ) cv. Pitiúba. ....	96

**Figura 25-** Análise de transcritos de  $\beta$ -galactosidases de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba..... **98**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Etapas do coramento com prata das bandas de proteínas em gel de poliacrilamida, segundo Blum <i>et al.</i> (1987), com modificações.....	<b>51</b>
<b>Tabela 2-</b> Programa de PCR usado para amplificação do(s) gene(s) da $\beta$ -galactosidase de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba.....	<b>59</b>
<b>Tabela 3-</b> Programa de PCR usado para amplificação do(s) gene(s) da actina (controle constitutivo).....	<b>59</b>
<b>Tabela 4-</b> Fracionamento com sulfato de amônio dos extratos brutos contendo proteínas citosólicas e presentes na parede celular.....	<b>62</b>
<b>Tabela 5-</b> Purificação de $\beta$ -galactosidases citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII em condições controle e tratamento salino (NaCl 100 mM).....	<b>68</b>
<b>Tabela 6-</b> Purificação de $\beta$ -galactosidases presentes na parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII em condições controle e tratamento salino (NaCl 100 mM).....	<b>72</b>
<b>Tabela 7-</b> Efeito de açúcares na concentração de 50 mM, nas atividades de $\beta$ -gal I, $\beta$ -gal II e $\beta$ -gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento VIII em condições controle.....	<b>89</b>
<b>Tabela 8-</b> Atividade enzimática em diferentes substratos p-nitrofenil glicosídicos de $\beta$ -gal I, $\beta$ -gal II e $\beta$ -gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento VIII em condições controle.....	<b>94</b>
<b>Tabela 9-</b> Relações de absorvância $A_{260}/A_{230}$ e $A_{260}/A_{280}$ para verificação do grau de pureza dos RNAs totais extraídos de caules de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e tratamento salino (NaCl 100 mM).....	<b>96</b>



## RESUMO

As  $\beta$ -galactosidases constituem uma ampla família de enzimas envolvidas em vários processos biológicos em plantas, dentre eles o crescimento vegetal. Essas enzimas atuam como lactases, hidrolizando a lactose em galactose e glucose, e como transglicosilase, modificando a estrutura da lactose. Além disso, essas enzimas catalisam a hidrólise enzimática dos carboidratos e atuam sobre os componentes da parede celular durante o processo de expansão da parede. O estudo de purificação e caracterização é de fundamental importância para o esclarecimento do papel fisiológico de uma enzima. No presente trabalho, isoformas da enzima  $\beta$ -galactosidase, denominadas  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III, foram isoladas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) walp] cv Pitiúba semeadas em água destilada (condições controle) e em solução de NaCl 100 mM (tratamento salino), nos estádios de desenvolvimento III (ED III) – plântulas com radícula maior que 2 cm e menor que 5 cm - e VIII (ED VIII) – plântulas com radícula maior que 5 cm, cotilédones fora do papel, hipocótilo reto e folhas cotiledonárias abertas. O processo de purificação consistiu de fracionamento com sulfato de amônio, seguido de cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE-Sephadex e em cromatografia em coluna de afinidade Lactosil-Sepharose. As duas isoformas citosólicas ( $\beta$ -gal I e  $\beta$ -gal II) mostraram os mesmos padrões cromatográficos, os quais diferiram do padrão da  $\beta$ -gal III, presente na parede celular. A eletroforese em condição nativa e em pH ácido revelou que a  $\beta$ -gal II e a  $\beta$ -gal III apresentaram uma única banda no coramento para proteína e uma única banda com atividade  $\beta$ -galactosidásica. As  $\beta$ -gal I, II e III apresentaram massas moleculares aparentes de 89, 146 e 124 kDa, respectivamente, em todas as condições estudadas. As três isoformas mostraram o mesmo pH ótimo (4,0) e mesma temperatura ótima de ensaio (55°C) para atividade enzimática. Em relação à estabilidade térmica, as  $\beta$ -gal I, II e III mostraram-se estáveis até a temperatura de 50°C, havendo um decréscimo na sua atividade a 60°C e perdendo totalmente a atividade em 70°C. As curvas de termoinativação em função do tempo para as  $\beta$ -gal I, II e III mostraram que, na temperatura de 60°C, as curvas foram bifásicas, com uma fase inicial rápida, com grande perda de atividade, e uma segunda, mais lenta, com perda de atividade gradual até 80 minutos de incubação. Nos estádios de desenvolvimento (III e VIII) e nos tratamentos controle e salino, tanto a glucose quanto a galactose protegeram as enzimas contra a inativação térmica, sendo que a perda de atividade das enzimas foi menor na presença de galactose do que na presença de glucose. De todos os açúcares testados quanto aos seus efeitos nas atividades das  $\beta$ -gal I, II e III,

na presença do  $\beta$ -PNPG, a galactose foi a que mais inibiu a atividade das enzimas. Os valores de  $K_m$  e de  $V_{max}$  foram, respectivamente, de 1,69 e 0,29, para  $\beta$ -gal I, de 1,92 e 0,99, para  $\beta$ -gal II, e de 1,01 e 0,41, para  $\beta$ -gal III. A  $\beta$ -gal I e a  $\beta$ -gal II foram inibidas competitivamente pela galactose, com coeficientes de inibição ( $K_i$ ) iguais a 28,0 e 7,6 mM, respectivamente, enquanto a  $\beta$ -gal III apresentou um padrão de inibição mista. A  $\beta$ -gal I apresentou atividade com todos os substratos sintéticos testados. A  $\beta$ -gal II apresentou apenas atividades  $\beta$ -fucosidásica e  $\alpha$ -arabinosidásica. A  $\beta$ -gal III apresentou atividades  $\alpha$ -galactosidásica,  $\beta$ -fucosidásica e  $\alpha$ -arabinosidásica, mas praticamente não teve atividade  $\beta$ -xilosidásica e não apresentou atividades  $\alpha$ -manosidásica e  $\alpha$ -fucosidásica. Os resultados de RT-PCR a partir de RNA total de caules de plântulas de feijão-de-corda semeadas em condições controle e de tratamento salino, nos estádios de desenvolvimento III e VIII revelaram a amplificação de um fragmento de cDNA de tamanho molecular esperado em torno de 1.900 pb em todas as condições testadas e que o maior nível de transcrito foi detectado no estágio de desenvolvimento VIII (controle). No estágio VIII do tratamento salino, o nível de transcritos foi inferior ao das condições controle do mesmo estágio e as quantidades de transcritos detectadas no estágio de desenvolvimento III, tanto em condições controle como de tratamento salino, foram bem mais baixas. Esses resultados mostram que as  $\beta$ -gal I, II e III não sofrem modificações ao longo dos estádios iniciais de desenvolvimento, que há diferenças entre as propriedades das três isoformas, que a salinidade pode afetar a expressão gênica das enzimas e que as enzimas são expressas diferentemente nos estádios de desenvolvimento III e VIII.

Palavras-chave: feijão-de-corda - estresse salino; enzimas - purificação.

## ABSTRACT

The  $\beta$ -galactosidases a widespread family of enzymes involved in several biological processes in plants, including plant growth. These enzymes acts on hydrolyzes of lactose to galactose plus glucose but also acts as a transglycosylase, altering the structure of lactose. Although, these enzymes catalyze the enzymatic hidrolisis of carbohydrate and degrade cell wall components during cell wall expansion. The study of purification and characterization is of fundamental importance for the knowledge of physiological role of an enzyme. In the present work, isoforms of enzyme  $\beta$ -galactosidase, designated  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II and  $\beta$ -gal III, were isolated of the Pitiúba cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] stems sown in water distilled (control treatment) and 100 mM NaCl (salt treatment) at stages of development III – seedlings with radicles bigger than 2 cm and shorter than 5 cm - and VIII - seedlings with radicles bigger than 5 cm, cotyledons out papper, straight hypocotyls and cotyledonary opened leaves. The purification procedure consisted of ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography through DEAE-Sephadex and affinity chromatography through Lactosyl-Sepharose columns. The two solubles isoforms ( $\beta$ -gal I and  $\beta$ -gal II) showed the same chromatographic patterns, while a different pattern was observed for  $\beta$ -gal III, present on cell wall. Eletroforese in native page at acid pH showed a single band by protein staining and activity  $\beta$ -galactosidase staining for  $\beta$ -gal II and  $\beta$ -gal III. The  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II and  $\beta$ -gal III have molecular masses apparent of 89, 146 and 124 kDa, respectively, at all conditions studied. The three isoforms showed the same pH optima (4,0) and the same optimum of temperature (55°C). In relation to thermic satability, the  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II and  $\beta$ -gal III showed stable until the temperature of 50°C, suffering a decrease to 60°C and losing totally it's activity at 70°C. The thermoinativation time curves for  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II and  $\beta$ -gal III showed that at temperature of 60°C the curves were biphasic with an initial fast phase, with high loss of activity, followed by a second slower phase, with gradual loss of activity until 80 minutes of incubation. At stages of development (III and VIII) and at control and salt treatments, the glucose and galactose protected the enzymes of the thermic inativation. The loss of activity of the enzymes was shorted on the presence of the galactose than glucose. On the presence of the  $\beta$ -PNPG, the galactose was the most potent inhibitor for  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II and  $\beta$ -gal III. The values of the Km and Vmax for  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II and  $\beta$ -gal III were 1,69 and 0,29, 1,92 and 0,99, and 1,01 and 0,41, respectively. The  $\beta$ -gal I and  $\beta$ -gal II were inhibited competitively with galactose, with inhibitions contant of 28 and

7,6 mM, respectively, while the  $\beta$ -gal III showed a pattern of mixta inhibition. The  $\beta$ -gal I showed activity at the all sintects substrate tested, the  $\beta$ -gal II showed only  $\beta$ -fucosidasic and  $\alpha$ -arabinosidasic activity. The  $\beta$ -gal III showed  $\alpha$ -galactosidasic,  $\beta$ -fucosidasic and  $\alpha$ -arabinosidasic activities, but praticaly don't have  $\beta$ -xilosidasic and don't showed  $\alpha$ -manosidasic and  $\alpha$ -fucosidasic activities. The results of RT-PCR from total RNA of cowpea seedlings stems sown in distilled water (control treatment) and NaCl 100 mM (salt treatment), at the stages of development III and VIII showed an amplification of cDNA with approximately 1.900 pb. At all conditions tested the highest level of transcripts was detected at VIII stage (control treatment). At VIII stage of salt treatment, the level of transcripts detected was lower than at control treatment the same stage. The quantities of transcripts detected at III stage such in control condition as salt treatment, was very low. This results show that the  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II and  $\beta$ -gal III didn't suffer modifications along of initials stages of development, that there are differences between properties of the three isoforms, that the salinity can affect the genic expression of the enzymes and that the enzymes are expressed of different form at stages of developmental.

**Keywords:** cowpea - salt stress; enzymes - purification.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Justificativa

Considera-se a salinidade um dos estresses abióticos que mais afeta o crescimento e a produtividade das culturas vegetais em todo o mundo (PARIDA; DAS, 2005). Segundo as estimativas de Rengasamy (2006), em mais de 100 países, a agricultura é afetada pelo problema da salinidade. Esse problema se torna ainda mais relevante nas regiões áridas e semi-áridas por apresentarem altas taxas de evapotranspiração e baixas precipitações pluviométricas (ASHRAF; HARRIS, 2005). O problema da salinidade do solo é agravado em grande parte pela qualidade da água usada na irrigação, além de práticas agrícolas inadequadas, como o uso de adubos com altas concentrações de sais e drenagem deficiente. Todos esses fatores podem acelerar o processo de salinização (CHINNUSAMY *et al.*, 2005). No mundo, há aproximadamente 230 milhões de hectares de área irrigada e estima-se que, em torno de 45 milhões de hectares estejam severamente afetados por sais (FAO, 2005), acarretando graves prejuízos à produtividade agrícola. Estima-se que as taxas de perdas de terras irrigadas em decorrência da elevação do lençol freático e conseqüente salinização, são de cerca de 1,5 milhões de hectares por ano. No Brasil, avalia-se que a área total de solos afetados por sais seja superior a 4 milhões de hectares, incluindo-se as regiões litorâneas e as localizadas no interior do país (SZABOLCS, 1994), sendo o Nordeste do Brasil a região onde a agricultura é mais gravemente afetada pelo problema da salinidade (GHEYI, 2000).

Os resultados de alguns estudos, quando analisados em função do tempo após a semeadura, mostram que em várias espécies vegetais a salinidade retarda e/ou inibe o crescimento da planta (ZENG *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001; CHARTZOULAKIS *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-BALLESTA *et al.*, 2004; RAMOLIYA *et al.*, 2004; SOSA *et al.*, 2005). Na maioria dos casos, como observado nos trabalhos citados, quando se estuda o efeito da salinidade em função do tempo de estresse, compara-se o tratamento salino com o controle, ao longo do tempo de exposição aos sais, expresso em horas, dias ou semanas (PRISCO *et al.*, 1981; MUNNS *et al.*, 1995), isto é, leva-se em conta, apenas, a idade cronológica das plantas. Como a salinidade retarda e/ou inibe o desenvolvimento de plantas jovens (SUDÉRIO, 2001), sugeriu-se que estudos desta natureza deveriam ser feitos levando-se em consideração estádios morfofisiológicos de desenvolvimento e não a idade cronológica das plantas (PRISCO, 1987). Análises dos efeitos do estresse salino nos estádios de desenvolvimento morfofisiológicos de plântulas de feijão-de-

corda demonstram que enquanto as plântulas do tratamento controle levavam de 6 a 8 dias para atingirem o estágio VIII (plântulas com radícula maior que 5 cm, cotilédones fora do papel, hipocótilo reto e folhas cotiledonárias abertas), as estressadas levavam de 11 a 12 dias (SOUSA *et al.*, 2003).

A redução no crescimento devida ao estresse salino pode resultar: do efeito osmótico, decorrente do excesso de sais no ambiente radicular, o qual pode levar ao estresse hídrico; do efeito no desequilíbrio nutritivo, pois o acúmulo de certos íons pode acarretar mudanças na capacidade de absorção e de transporte de outros íons, que sejam essenciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal; e do efeito tóxico, decorrente do acúmulo de íons tóxicos nos tecidos, os quais podem afetar processos fisiológicos relevantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas (ZHU, 2001; YOKOI *et al.*, 2002; TESTER; DAVENPORT, 2003; PARIDA; DAS, 2005). Como a salinidade afeta o metabolismo vegetal, e deste modo, reduz o crescimento e o desenvolvimento das plantas, vários estudos visam elucidar os mecanismos envolvidos nos processos bioquímicos e fisiológicos que são afetados pelo estresse salino.

Um dos efeitos imediatos da salinidade no crescimento das plantas é a redução da área foliar disponível para a fotossíntese, podendo resultar na perda da biomassa dos órgãos vegetais (PARIDA; DAS, 2005). De acordo com Munns (2002), o crescimento da parte aérea é geralmente mais afetado que o crescimento do sistema radicular, havendo uma redução na razão de massa seca entre a parte aérea e a raiz.

Durante o estabelecimento da plântula, um dos fatores afetados pela salinidade é o alongamento celular, que pode levar a um retardamento e/ou inibição do crescimento. Como o afrouxamento da parede celular pode estar sendo inibido pela salinidade e este processo depende, dentre outras coisas, da quebra de ligações dos polissacarídeos da parede, é interessante que se tenha um conhecimento das enzimas envolvidas na hidrólise dos constituintes da parede celular.

Vários trabalhos relatam que as  $\beta$ -galactosidases atuam sobre os componentes da parede celular, podendo promover seu afrouxamento e o conseqüente alongamento celular (ALCÂNTARA *et al.*, 1999; BARNAVON *et al.*, 2000; MINIC; JOUANIN, 2006; PÉREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006).

Embora existam algumas informações sobre os efeitos da salinidade nas atividades das  $\beta$ -galactosidases (ENÉAS-FILHO *et al.*, 1995; SUDÉRIO, 2001; BARBOSA, 2002), pouco se conhece sobre os efeitos do estresse salino na expressão gênica dessas enzimas presentes no citosol e nas paredes celulares ao longo do desenvolvimento da plântula.

O feijão-de-corda é uma cultura de relevante importância econômica e social no Brasil, sendo a região Nordeste e especialmente o estado do Ceará, um dos seus maiores produtores mundiais (FERREIRA, 2001). Essa leguminosa é uma excelente fonte de proteínas e apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais, representando o alimento básico para as populações de baixa renda no Nordeste brasileiro (AMBROSANO, 1996). No período das chuvas, desde a preparação dos solos até a colheita, as culturas de feijão-de-corda geram um elevado número de empregos, sendo na maioria das pequenas cidades, a principal fonte de renda e a principal atividade de um elevado número de famílias. Portanto, a escolha do feijão-de-corda para a realização deste trabalho, foi principalmente devido à sua grande importância econômica e social no Ceará e no Brasil, que é um grande produtor mundial desta leguminosa (FERREIRA, 2001).

Resultados observados por Sudério (2001) mostram que a salinidade, não só inibe como retarda o crescimento dos caules das plântulas de feijão-de-corda estressadas. Além disso, mostram que a inibição do crescimento é mais conspícua nos estádios iniciais de desenvolvimento e que há uma correlação entre o crescimento dos caules e o desenvolvimento da atividade  $\beta$ -galactosidásica, especialmente nos estádios iniciais de desenvolvimento. Essa correlação foi observada tanto nas enzimas isoladas do citosol, como nas provenientes da parede celular. No entanto, não se tem conhecimento se uma das causas da inibição e do retardamento do crescimento dessas plântulas é devida a um efeito do sal na atividade  $\beta$ -galactosidásica ou se há uma alteração na expressão gênica dessas enzimas causada pela salinidade.

## 1.2. Objetivos

Do exposto, esse trabalho tem como objetivo geral, fazer a purificação seguida da caracterização de  $\beta$ -galactosidases presentes em caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII em condições controle e de estresse salino. Esse estudo tem como objetivos específicos, fazer a análise comparativa entre: 1) as  $\beta$ -galactosidases nos dois estádios de desenvolvimento; 2) as  $\beta$ -galactosidases citosólicas e da parede celular; e 3) as  $\beta$ -galactosidases provenientes dos tratamentos controle e salino. Com isso, poderemos ter subsídios para tentar esclarecer se: 1) ao longo do desenvolvimento essas enzimas sofrem alguma modificação; 2) as enzimas citosólicas e presentes na parede celular são estruturalmente as mesmas ou não, podendo, portanto, realizar

funções iguais ou distintas; e 3) a salinidade afeta diretamente a atividade dessas enzimas ou as suas sínteses (expressão gênica).



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Efeitos da salinidade nas plantas

A salinidade é um dos principais fatores ambientais que limitam o crescimento e a produtividade das plantas (PARIDA; DAS, 2005). Quando cultivadas em ambientes salinos, as plantas passam por uma série de alterações morfofisiológicas e bioquímicas que são conseqüências de fatores osmóticos e iônicos (XIONG; ZHU, 2002). A redução no crescimento devida ao componente osmótico, é decorrente de elevadas concentrações de sais na solução do solo, que promovem uma redução no potencial osmótico dessa solução e, por conseqüência, diminui a disponibilidade da água para a planta (MUNNS; TERMAAT, 1986; PARIDA; DAS, 2005). Quando o crescimento é afetado pelo efeito tóxico, é porque houve um acúmulo de íons nos tecidos que pode afetar processos fisiológicos relevantes para o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Um desses processos é o desequilíbrio nutritivo, pois o acúmulo de íons potencialmente tóxicos pode acarretar mudanças na capacidade de absorção e de transporte de outros íons que sejam essenciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal (ZHU, 2001). Em condições de salinidade, há, por exemplo, o acúmulo de espécies iônicas como os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos tecidos vegetais. Esse acúmulo foi observado por Bezerra e Oliveira (2003) e por Bezerra *et al.* (2005) em plantas de cajueiro anão-precoce; por Silva *et al.* (2003 b) em plantas de feijão-de-corda cv. Pitiúba e por Lacerda *et al.* (2003 a) em plantas de sorgo forrageiro. Costa *et al.* (2003), analisando os efeitos da salinidade em sete cultivares de *Vigna unguiculata*, verificaram que o  $\text{Na}^+$  se acumulou em níveis maiores que os de  $\text{Cl}^-$  nos cultivares mais afetados pela salinidade. Sabe-se que deficiências de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  podem ser induzidas por excesso de  $\text{Na}^+$ , e a absorção de  $\text{NO}_3^-$  pode ser inibida por  $\text{Cl}^-$  (MARCHNER, 1995). Uma das principais funções do  $\text{Ca}^{2+}$  é manter a estabilidade da membrana plasmática (COLMER *et al.*, 1996), sendo de fundamental importância no transporte seletivo de íons minerais através das membranas celulares. Resultados observados por Franco *et al.* (1999) em plântulas de *Vigna unguiculata* sugerem que o cálcio pode minorar os efeitos do estresse com NaCl sobre o crescimento das raízes, favorecendo a seletividade  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  e promovendo o acúmulo de prolina nos ápices desse órgãos. Silva *et al.* (2003a), trabalhando com plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba, embora tenham verificado que a adição de  $\text{CaCl}_2$  ao ambiente radicular de plantas estressadas com NaCl tenha reduzido o teor de  $\text{Na}^+$ , especialmente nas raízes, observaram que essa adição não minorou os efeitos do estresse nas relações hídricas e no crescimento das plantas, não dando suporte, portanto, à hipótese de que

o cálcio suplementar pode minorar os efeitos inibitórios do estresse induzido por NaCl. Alguns resultados demonstram que a concentração de  $K^+$  decresce sob condições de estresse salino (LACERDA *et al.*, 2003 a; SILVA *et al.*, 2003 a), e que os teores de  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e de  $K^+$  parecem exercer importantes papéis na aclimação de plantas de sorgo a este tipo de estresse (SILVA *et al.*, 2003 b). No entanto, nem sempre fica evidenciada uma relação positiva entre o aumento na proporção de  $K^+$  no meio de crescimento e o aumento no grau de tolerância das plantas à salinidade (COSTA *et al.*, 2003; LACERDA *et al.*, 2003 b). Essas diferentes respostas podem estar relacionadas com as espécies ou cultivares utilizados nos estudos, com o estágio de desenvolvimento em que o estresse foi aplicado, com os níveis e forma de aplicação de sais no ambiente radicular, com o tempo de duração do estresse (MUNNS, 2002) e com as condições ambientais nas quais as plantas são cultivadas (YEO, 1999).

Portanto, apesar de a sobrevivência das plantas em ambientes salinos depender da manutenção da concentração iônica intracelular, que é importante para o bom funcionamento dos processos metabólicos envolvidos no crescimento e desenvolvimento (NIU *et al.*, 1995), a absorção elevada de determinados solutos inorgânicos leva a um desequilíbrio iônico. Os solutos orgânicos, ao contrário de alguns íons inorgânicos, que podem inibir as atividades de muitas enzimas citosólicas, são compatíveis com as atividades metabólicas das células, e por isso, podem se acumular em altas concentrações no citoplasma (BOHNERT; SHEN, 1999).

Procurando explicar o processo de inibição do crescimento das plantas pela salinidade, Munns e Termaat (1986) sugeriram que essa inibição é caracterizada como uma resposta bifásica, sendo o potencial osmótico o primeiro responsável pela redução no crescimento, e o segundo, o efeito específico dos íons. De acordo com essa hipótese, a redução inicial do crescimento vegetal seria ocasionada pelos efeitos osmóticos dos sais presentes no meio externo (estresse hídrico), e a redução na segunda fase, seria causada pelo acúmulo excessivo de sais nas folhas, ultrapassando a capacidade das células de realizar a compartimentalização dos íons nos vacúolos (MUNNS, 2002; YOKOI *et al.*, 2002). Quando as concentrações de sais no citoplasma das células aumentam, há uma inibição na atividade das enzimas envolvidas em várias rotas metabólicas (MUNNS, 2005).

Vários processos sofrem alterações causadas pelo desequilíbrio iônico gerado pelo estresse salino, levando a uma redução do crescimento vegetal. Dentre eles, estão a fotossíntese, a condutância estomática, a respiração, o metabolismo dos lipídios, a produção das espécies reativas de oxigênio e a síntese de proteínas (ZHU, 2001; PARIDA; DAS, 2005).

Em adição aos componentes iônicos e osmóticos, o estresse salino tem levado ao estresse oxidativo através do aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) (MITTLER, 2002). As ROS podem alterar o metabolismo celular normal, causando danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (ALSCHER *et al.*, 1997). Para minorar o dano oxidativo das “ROS”, as plantas têm desenvolvido um complexo sistema de defesa antioxidativo que inclui tanto antioxidantes não-enzimáticos de baixa massa molecular (como o ascorbato e a glutatona) quanto enzimas antioxidantes, tais como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), as peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX) e a redutase da glutatona (GR) (NOCTOR; FOYER, 1998). Vários estudos têm fornecido evidências de que a tolerância de algumas espécies ou cultivares vegetais à salinidade se deve, pelo menos em parte, a sistemas antioxidativos de eliminação das ROS (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2005; AZEVEDO-NETO *et al.*, 2006).

Quanto ao grau de tolerância ou susceptibilidade à salinidade, as plantas são classificadas em halófitas e glicófitas. As halófitas são capazes de tolerar elevadas concentrações de sal, devido ao desenvolvimento de estratégias que permitem a resistência ao excesso de íons em condições de alta salinidade. As glicófitas, por sua vez, são mais susceptíveis à salinidade, e por isso, têm seus crescimentos inibidos mesmo em concentrações de sal não muito altas (PARDO; QUINTERO, 2002).

Algumas plantas se aclimatam ao estresse salino por meio da redução do potencial osmótico de suas células (ajustamento osmótico). O ajustamento osmótico é um processo que resulta em acúmulo líquido de solutos na célula, acarretando diminuição do potencial hídrico sem que ocorra diminuição na turgescência celular. Trata-se, pois, de uma resposta das plantas em razão do abaixamento do potencial hídrico do meio de cultivo, cuja principal consequência é a manutenção da absorção de água e da turgescência celular, que torna possível a continuação da expansão das células e a manutenção dos estômatos suficientemente abertos para possibilitar as trocas gasosas (TAIZ; ZEIGER, 2004):

Analisando o conteúdo de proteínas solúveis em folhas de diferentes espécies submetidas a estresse salino, alguns autores observaram que houve uma redução desse nível em resposta a salinidade (WANG; NIL, 2000; PARIDA *et al.*, 2003). Hassanein (1999) demonstrou que a salinidade causou repressão da síntese polipeptídica em plantas de ervilha semeadas na presença de NaCl.

Vários mecanismos estão envolvidos na tolerância das plantas à salinidade. Dentre eles estão: a compartimentalização e a regulação iônica, a síntese de solutos compatíveis, a síntese de

enzimas antioxidantes, o aumento dos níveis de determinados hormônios vegetais, e os mecanismos moleculares (PARIDA; DAS, 2005).

A tolerância das plantas ao estresse salino envolve alterações na maquinaria celular que resultam de modificações na expressão de vários genes (HURKMAN, 1992), de modo que a salinidade exerce um forte efeito na expressão gênica das plantas (HASEGAWA *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2006). Os genes induzidos pelo estresse salino podem ser classificados em diferentes grupos funcionais. Há, por exemplo, genes para a síntese de enzimas envolvidas na fotossíntese, genes para síntese de solutos compatíveis, genes para síntese de enzimas envolvidas no seqüestro vacuolar, e genes para síntese de enzimas antioxidantes (PARIDA; DAS, 2005). Portanto, a análise do padrão de expressão gênica é de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos na aclimatação e adaptação de plantas submetidas ao estresse salino.

## 2.2. Salinidade e crescimento

Os efeitos deletérios da salinidade no crescimento vegetativo de plantas foram observados por diversos autores (COSTA *et al.*, 2003, em vários cultivares de *Vigna unguiculata*; LACERDA *et al.*, 2003 b, em plantas de sorgo forrageiro; SILVA *et al.*, 2003 b, em plantas de feijão-de-corda cv. Pitiúba; AZEVEDO-NETO *et al.*, 2004, em diferentes genótipos de milho; RAMOLIYA *et al.*, 2004, em *Salvadora pérsica*, BEZERRA *et al.*, 2005, em plantas de cajueiro anão precoce; COSTA *et al.*, 2005, em dois genótipos de sorgo forrageiro), nos quais se observa que, de um modo geral, o estresse salino resulta em um decréscimo considerável nas massas fresca e seca de folhas, caules e raízes, bem como na área foliar, no tamanho e número de folhas emitidas, e na taxa de crescimento relativo.

De acordo com Nonami e Boyer (1993), a diminuição da disponibilidade de água ocasionada pelo estresse salino pode afetar diretamente a expansão e a divisão das células. Durante o estabelecimento da plântula, a salinidade pode retardar e/ou inibir o crescimento porque afeta, dentre outros fatores, o alongamento celular, de modo que o afrouxamento da parede celular, necessário para o crescimento, pode estar sendo inibido pela salinidade.

O crescimento dos tecidos vegetais depende, basicamente, da divisão e/ou do aumento em volume das suas células. Estes dois fenômenos, por sua vez, são dependentes do metabolismo e especialmente do balanço hídrico da célula (NONAMI; BOYER, 1993). A expansão celular está associada ao aumento na pressão de turgescência da célula (P). Se P aumenta, a parede é

submetida a uma pressão que faz com que haja um aumento na sua extensibilidade. Se a parede cede, a célula aumenta de volume, a pressão de turgescência diminui e, conseqüentemente, o potencial hídrico celular ( $\Psi_w$ ) também diminuirá. Esta redução em  $\Psi_w$  irá possibilitar mais entrada de água, novo aumento em P e reinício de todo o ciclo. Isto continuará acontecendo até que a parede celular perca a sua extensibilidade (PRISCO, 1980). Portanto, a expansão ou crescimento celular (C), que é o aumento irreversível em volume, será função da extensibilidade da parede (m) e da diferença entre a pressão de turgescência da célula (P) e a pressão mínima requerida para provocar distensão da parede (Y), ou seja,  $C = m (P - Y)$  (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Um dos fatos associados ao aumento da extensibilidade da parede celular é a acidificação da parede celular. Essa explicação se baseia na teoria do "crescimento ácido", onde se diz que o deslocamento de prótons para dentro da região da parede celular, promovido pelas auxinas, e o resultante decréscimo do pH, ativa algumas enzimas que promovem a quebra das ligações das paredes celulares, aumentando assim, a sua extensibilidade (TAIZ; ZEIGER, 2004; COSGROVE, 2001).

Levando em consideração que o aumento da taxa de crescimento está associado ao aumento da acidificação da parede celular, e que o decréscimo do pH é considerado um fator que promove os eventos de afrouxamento da parede necessários ao alongamento da célula, Neves-Piestun e Bernstein (2001) procuraram analisar se a inibição da acidificação estava associada com a salinidade e com a redução na taxa de crescimento celular. Eles observaram que as cinéticas do pH apoplástico das plantas de milho estressadas pelo sal e não estressadas são idênticas e não estão correlacionadas com a intensidade de crescimento. Viram também que um aumento de até 250 vezes na concentração de NaCl não alterou a cinética da acidificação, ao contrário da inibição do crescimento pelo estresse hídrico, que é acompanhada por um aumento do pH apoplástico, e portanto, por um decréscimo no grau de acidificação (BOGOSLAVSKY; NEUMANN, 1998). Com base nesse trabalho, Neves-Piestun e Bernstein (2001) sugerem que o aumento na concentração de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  no apoplasto não afeta a acidificação espontânea dos tecidos.

Ao investigar a redução na capacidade de extensão irreversível da parede celular na zona de alongamento foliar em plântulas de milho, Neumann (1993) observou que essa redução foi revertida após 20 minutos da remoção do sal do ambiente radicular. A rápida reversão da inibição da extensibilidade da parede e o crescimento foliar depois da remoção do sal do ambiente radicular das plantas estressadas sugerem que nenhuma deficiência nos nutrientes minerais essenciais ao crescimento, nem o efeito tóxico do NaCl na membrana plasmática estavam

diretamente envolvidos na inibição do crescimento foliar. Nesse ponto, uma mudança metabolicamente rápida nas propriedades físicas do crescimento da parede celular causada pelo efeito osmótico (ou outros efeitos), parece ser um fator preponderante que regula o crescimento foliar de milho em condições de estresse salino (NEUMANN, 1993). Anteriormente, pesquisadores do mesmo grupo (NEUMANN *et al.*, 1988), trabalhando com plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), observaram que a salinidade (50 ou 100 mM de NaCl) causou um decréscimo na taxa de expansão celular das folhas. Ao avaliarem se esse decréscimo era devido a uma redução na extensibilidade da parede ou na turgescência da célula, eles observaram que a esse nível e a curto prazo, a salinidade afetou a taxa de crescimento foliar mais por um decréscimo na turgescência do que pela redução da extensibilidade da parede. Em longo prazo (10 dias), a salinização resultou num aparente ajustamento mecânico, isto é, num aumento da extensibilidade da parede. Com isso, a célula aumenta de volume, havendo uma diminuição da pressão de turgescência e uma conseqüente redução do potencial hídrico. E deste modo, a taxa de crescimento foliar pode ser mantida. No entanto, Termaat *et al.* (1985), trabalhando com trigo e cevada, sugerem que o crescimento foliar pode ser afetado sem haver alguma redução paralela na turgescência em plantas estressadas pelo sal, ou seja, que a perda da turgescência não é a causa primária da redução do crescimento.

Como o afrouxamento da parede celular pode estar sendo inibido pela salinidade e este processo depende, dentre outras coisas, da quebra de ligações dos polissacarídeos da parede, é interessante que se tenha um conhecimento das enzimas envolvidas no processo de expansão da parede celular.

### 2.3. Enzimas envolvidas na expansão da parede celular

A parede celular é uma estrutura dinâmica, continuamente modificada durante o crescimento e a diferenciação celular (PÉREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006). Comumente, os polissacarídeos compreendem 80 a 90% da parede primária, sendo os outros componentes, proteínas e compostos fenólicos, como a lignina (LIMA *et al.*, 2001). Os polissacarídeos estão usualmente agrupados em três classes: celulose, hemiceluloses e pectinas. Destes, a celulose representa o principal polissacarídeo da parede celular o qual forma microfibrilas que dão uma considerável resistência à parede (MINIC; JOUANIN, 2006). Estas microfibrilas são embutidas na matriz de polissacarídeos pécticos e hemicelulósicos (REITER, 1998). Esses últimos, formam associações cruzadas não covalentes e fortes com as microfibrilas de celulose. Nas paredes

celulares primárias das dicotiledôneas, as hemiceluloses predominantes são os xiloglicanos, galactomananos e galactanos. O xiloglucano, em consequência das associações cruzadas com as microfibrilas de celulose, é tido como uma estrutura que pode suportar a parede celular primária (FRY, 2004). Os polissacarídeos pécticos são altamente carregados negativamente, e parecem formar uma cadeia tridimensional que é entrelaçada com a cadeia de celulose e xiloglicano (REITER, 1998).

Tem sido sugerido que o alto grau de complexidade da parede celular pode ser requerido para permitir contínuos eventos de reorganização em resposta ao desenvolvimento (REITER, 1998). Em adição aos polissacarídeos, as paredes celulares das plantas superiores contêm muitas proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos. Algumas proteínas do apoplasto estão envolvidas na modificação da parede celular durante o processo de crescimento (NOTHNAGEL, 1997).

A degradação dos polissacarídeos da parede celular é dependente da ação de várias enzimas. Fry (2004) classificou essas enzimas nos seguintes grupos: exopolissacaridases, endopolissacaridases e outras hidrolases que não participam dos dois primeiros grupos. As exopolissacaridases quebram poli- e oligossacarídeos progressivamente na extremidade não-redutora ou nos grupos laterais, liberando monossacarídeos e alguns dissacarídeos. As endopolissacaridases atuam na quebra dos polissacarídeos em qualquer posição. Elas têm um imediato e amplo impacto na massa molecular dos polissacarídeos. As hidrolases do terceiro grupo podem quebrar alguma porção que não seja formada por carboidrato que esteja ligada aos polissacarídeos da parede.

Após a síntese e deposição dos polissacarídeos da parede, essas enzimas, de localização celular indefinida, participam da degradação de diferentes polissacarídeos da parede celular, podendo resultar em mudanças na estrutura e na composição dos mesmos. Desta maneira, as polissacaridases atuam na regulação da alteração e da expansão da parede celular. Contudo, nenhuma informação tem sido reportada sobre a localização celular exata destas enzimas (MINIC; JOUANIN, 2006).

As hidrolases dos glicosídeos formam um amplo grupo de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e outro tipo de macromolécula. A nomenclatura das hidrolases dos glicosídeos é baseada nas suas especificidades aos substratos e ocasionalmente no seu mecanismo molecular (MINIC; JOUANIN, 2006; PÉREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006).

Segundo Akiyama *et al.* (1998), uma  $\beta$ -glucosidase está provavelmente envolvida, não somente na hidrólise, mas também na modificação dos oligossacarídeos das paredes celulares de sementes de arroz.

Algumas exo- e endo-glucanases mediam a degradação específica de  $\beta$ -D-glucanos da parede celular. Inouhe *et al.* (2000), trabalhando com milho, determinaram as atividades de glucanases e suas atividades autolíticas na parede celular em diferentes órgãos e verificaram, pelos produtos da hidrólise, que as glucanases e outras hidrolases de polissacarídeos da parede parecem ter um amplo e fundamental papel no metabolismo de tecidos em crescimento.

#### 2.4. $\beta$ -galactosidases

As  $\beta$ -galactosidases atuam como lactases, degradando a lactose em galactose e glucose, e como transglicosilase, modificando a estrutura da lactose (MATHEWS, 2005). Essas enzimas catalisam a hidrólise enzimática entre as ligações glicosídicas dos carboidratos (PÉREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006).

As  $\beta$ -galactosidases aparecem como as principais responsáveis pela autólise da parede em *Cicer arietinum* (DOPICO *et al.*, 1989), embora seja, provavelmente, coadjuvada por outras enzimas associadas à parede celular.

Alguns trabalhos relatam que as  $\beta$ -galactosidases atuam sobre os componentes da parede celular, podendo promover seu afrouxamento e conseqüentemente, o alongamento celular (ALCÂNTARA *et al.*, 1999; BARNAVON *et al.*, 2000). A alteração da elasticidade da parede celular é considerada um importante componente das respostas adaptativas das plantas à salinidade (BOLANOS; LONGSTRETH, 1984).

Apesar de existir algumas informações sobre os efeitos da salinidade na atividade de  $\beta$ -galactosidases isoladas de cotilédones (ENÉAS-FILHO *et al.*, 1995), raízes (BARBOSA, 2002) e caules (SUDÉRIO, 2001) de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba, pouco se conhece sobre os efeitos do estresse salino nas propriedades físicas e cinéticas dessas enzimas presentes no citosol e na parede celular.

Considerando o efeito da salinidade na atividade  $\beta$ -galactosidásica em órgãos vegetativos, Sudério (2001) mostrou que houve correlação entre o crescimento de caules de plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba semeadas na presença de NaCl e o desenvolvimento da atividade  $\beta$ -galactosidásica, especialmente nos estádios iniciais de desenvolvimento e, que esta



correlação foi observada, tanto nas enzimas isoladas de citosol como nas provenientes de parede celular. Barbosa (2002) verificou que a salinidade tanto retardou quanto inibiu o crescimento das raízes de plântulas de feijão-de-corda e que houve correlação entre o crescimento e a atividade de  $\beta$ -galactosidases citosólicas e presentes na parede celular das raízes. Observou também que a salinidade inibiu a atividade de  $\beta$ -galactosidases presentes no citosol e na parede celular, sugerindo que a inibição e/ou retardamento no crescimento das raízes na presença de salinidade estão relacionados à atividade  $\beta$ -galactosidásica.

Uma das formas de esclarecer o papel fisiológico de uma enzima é fazer a sua purificação, a fim de realizar estudos sobre suas propriedades físicas e catalíticas. Estudos de purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidases de plantas têm sido realizados com o intuito de identificar o papel fisiológico dessas enzimas. Considerando o crescimento vegetativo da planta, alguns estudos de caracterização mostram as propriedades físicas e cinéticas em  $\beta$ -galactosidases isoladas de epicótilo de *Cicer arietinum* (DOPICO *et al.*, 1989 e 1990), de folha de *Brassica napus* (SAWICKA; KACPERSKA, 1995) e da parte aérea (caules e folhas) de *Oryza sativa* (KONNO; TSUMUKI, 1993). Contudo, os trabalhos mais recentes relacionados à purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidases têm utilizado órgãos de reserva como material vegetal, a exemplo de cotilédones de *Vigna unguiculata* (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001), cotilédones de plântulas de *Vigna radiata* com 5 dias após a semeadura (LI *et al.*, 2001), cotilédones de *Kestingella geocarpa* (CHILAKA *et al.*, 2002), cotilédones de *Phaseolus vulgaris* (BISWAS *et al.*, 2003), frutos de carambola (BALASUBRAMIAM *et al.*, 2005) e cotilédones de sementes quiescentes da leguminosa *Hymenaea courbaril* (ALCÂNTARA *et al.*, 2006). Algumas diferenças podem ser observadas entre as propriedades de  $\beta$ -galactosidases nos trabalhos citados, as quais podem ser devidas a vários fatores, como: diferenças entre cultivares e espécies, diferentes órgãos, diferentes localizações dessas enzimas na célula, possíveis modificações das mesmas ao longo do desenvolvimento da planta e diferentes condições às quais as plantas foram submetidas.

Um estudo comparativo entre as propriedades de  $\beta$ -galactosidases presentes no citosol e na parede celular de folhas de *Brassica napus* mostrou que elas apresentaram temperatura ótima de atividade de 50 e 55°C, respectivamente. Após a pré-incubação em 60°C durante 20 minutos, verificaram que as  $\beta$ -galactosidases associadas à parede celular apresentaram mais termoestabilidade quando comparadas com as citosólicas, havendo uma perda de atividade de 32%, enquanto as citosólicas tiveram uma redução de 53%. Ambas apresentaram um pH ótimo

de 4,0. No entanto, usando o p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\beta$ -PNPG) como substrato, os valores de  $K_m$  e de  $V_{max}$  (expressos em mM e  $\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína  $\times \text{h}^{-1}$ , respectivamente) para as  $\beta$ -galactosidases associadas à parede foram de 0,25 e 2,80, respectivamente, enquanto os valores encontrados para as  $\beta$ -galactosidases citosólicas foram de 0,50 e 1,42 (SAWICKA; KACPERSKA, 1995).

Uma  $\beta$ -galactosidase isolada de epicótilo de *Cicer arietinum* apresentou uma única subunidade com massa molecular de 45 kDa, pH ótimo de 4,0, temperatura ótima de atividade igual a 45°C, valores de  $K_m$  e de  $V_{max}$  para o substrato  $\beta$ -PNPG iguais a 1,72 mM e 18,5 nKat  $\times \text{mg}^{-1}$  de proteína  $\times \text{h}^{-1}$ , respectivamente, e inibição na presença de galactose (DOPICO *et al.*, 1990).

A análise eletroforética em gel de poli-acrilamida em condições desnaturantes revelou que uma  $\beta$ -galactosidase citosólica isolada da parte aérea de *Oryza sativa* apresentou uma única subunidade com massa molecular de 42 kDa, semelhante à massa molecular da proteína nativa estimada em coluna de filtração em gel, que foi de 40 kDa. Os valores de  $K_m$  e de  $V_{max}$  para o  $\beta$ -PNPG foram de 0,63 mM e 0,32 mmol  $\times \text{mg}^{-1}$  de proteína  $\times \text{h}^{-1}$ , respectivamente, e o máximo de atividade foi observado em pH 3,4 (KONNO; TSUMUKI, 1993).

Como já mencionado, além dos estudos de purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidases de órgãos vegetativos (DOPICO *et al.*, 1989 e 1990; KONNO; TSUMUKI, 1993; SAWICKA; KACPERSKA, 1995), vários trabalhos acerca da caracterização de  $\beta$ -galactosidases isoladas de órgãos de reserva também têm sido realizados (BISWAS, 1986; SEKIMATA *et al.*, 1989; SIMOS *et al.*, 1989; KUNDU *et al.*, 1990; ALI *et al.*, 1995; ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001; CHILAKA *et al.*, 2002; BISWAS *et al.*, 2003; BALASUBRANIAM *et al.*, 2005; ALCÂNTARA *et al.*, 2006).

Dentre as várias características das enzimas, a determinação da massa molecular de  $\beta$ -galactosidases vegetais é relatada em vários trabalhos (LI *et al.*, 2001; BISWAS *et al.*, 2003; BALASUBRANIAM *et al.*, 2005; ALCÂNTARA *et al.*, 2006). As massas moleculares de cinco isoformas de  $\beta$ -galactosidase isoladas de cotilédones de plântulas de *Vigna radiata* com 5 dias após a semeadura foi estimada por Li *et al.* (2001). Nesse trabalho, foi verificado que três das cinco isoformas apresentaram uma massa molecular de 87 kDa, enquanto outras duas isoformas apresentaram massas moleculares de 45 e 73 kDa. Isoformas de  $\beta$ -galactosidase isoladas de frutos de carambola apresentaram massas moleculares com variação de 58 a 130 kDa (BALASUBRANIAM *et al.*, 2005). A massa molecular de uma  $\beta$ -galactosidase cotiledonária de

*Phaseolus vulgaris*, foi igual a 75 kDa (BISWAS *et al.*, 2003) e uma isoforma de  $\beta$ -galactosidase de cotilédones de sementes quiescentes de *Hymenaea courbaril* teve massa molecular estimada em 62 kDa (ALCÂNTARA *et al.* 2006).

Múltiplas formas de  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias de *Vigna unguiculata* apresentaram ótimos de pH entre 3,0 e 4,5 (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000). Isoformas de  $\beta$ -galactosidases isoladas de cotilédones de *Vigna radiata* apresentaram ótimos de pH entre 3,6 e 4,0 (LI *et al.*, 2001). Uma  $\beta$ -galactosidase purificada de cotilédones de *Kestingella geocarpa* revelou um pH ótimo de 4,4 (CHILAKA *et al.*, 2002). ALCÂNTARA *et al.* (2006), trabalhando com  $\beta$ -galactosidases extraídas de cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril*, mostraram que a forma purificada da enzima apresentou pH ótimo de 4,0. Esse mesmo pH ótimo de ensaio também foi encontrado para  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias isoladas de *Phaseolus vulgaris* (BISWAS *et al.*, 2003).

A temperatura ótima de ensaio para  $\beta$ -galactosidases vegetais observadas em alguns trabalhos varia de 50 a 60°C em cotilédones de *Vigna unguiculata* (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001), em cotilédones de plântulas de *Vigna radiata* com 5 dias após a semeadura (LI *et al.*, 2001) e em cotilédones de *Kestingella geocarpa* (CHILAKA *et al.*, 2002).

De um modo geral, alguns estudos de termoestabilidade em  $\beta$ -galactosidases de plantas mostram que há pouca ou nenhuma inativação nas enzimas quando pré-incubadas a 50°C, havendo uma perda considerável apenas a partir de 55°C (SIMOS *et al.*, 1989, em cotilédones de sete diferentes espécies vegetais; KUNDU *et al.*, 1990, em cotilédones de *Vigna radiata*; ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000, em cotilédones de *Vigna unguiculata*). Sekimata *et al.* (1989), trabalhando com  $\beta$ -galactosidases isoladas de sementes de *Raphanus sativus* observaram que as enzimas apresentavam-se completamente inativadas quando pré-incubadas a 55°C.

A estabilização da  $\beta$ -galactosidase contra a termoinativação na presença de glucose e galactose sugere que a rota de termoinativação envolve mudanças no sítio ativo da enzima, de modo que a exposição da mesma a altas temperaturas pode não necessariamente inativá-la devido à proteção oferecida pela glucose e pela galactose, tornando-a mais resistente às altas temperaturas (CHILAKA *et al.*, 2002). No entanto, há poucas informações sobre a redução da inativação térmica de  $\beta$ -galactosidases vegetais na presença desses açúcares. Chilaka *et al.* (2002), realizou o estudo de termoinativação em  $\beta$ -galactosidases purificadas de cotilédones de *Kestingella geocarpa* e demonstraram que tanto a glucose quanto a galactose protegem as enzimas contra a inativação térmica. De acordo com Daniel *et al.* (1996), a estabilidade

conformacional de uma proteína deve-se ao conjunto de interações fracas, como as ligações de hidrogênio, as interações de van der Waals e as interações hidrofóbicas. A desestabilização dessas forças aumenta amplamente o grau de desordem conformacional das proteínas e todas elas são afetadas pela temperatura. Em temperaturas muito elevadas, processos de degradação irreversíveis podem levar à completa inativação da enzima e, em contraste com a desnaturação, os processos irreversíveis de inativação protéica aumentam devido a mudanças nas ligações covalentes. A desaminação e a oxidação de aminoácidos são comuns nos processos de degradação de proteínas. Esses mecanismos de degradação protéica são fortemente acelerados em altas temperaturas, e podem assim, desempenhar um importante papel na inativação térmica das enzimas (DANIEL *et al.*, 1996). Contudo, a glucose e a galactose, que são produtos da reação catalisada pela  $\beta$ -galactosidase (lactase), provavelmente se ligam às enzimas, mudando suas conformações e fazendo com que elas se tornem mais resistentes ao aumento de temperatura (CHILAKA *et al.*, 2002).

Os efeitos de alguns açúcares na atividade de  $\beta$ -galactosidases isoladas de diferentes espécies vegetais também foram analisados em órgãos relacionados ao crescimento da planta (DOPICO *et al.*, 1990, em epicótilo em *Cicer arietinum*) e em cotilédones de *Vigna radiata* (LI *et al.*, 2001), de *Kestingella geocarpa* (CHILAKA *et al.*, 2002) e de sementes quiescentes de *Hymenaea courbaril* (ALCÂNTARA *et al.*, 2006). Dopico *et al.* (1990), observaram um baixo percentual de inibição pela arabinose sobre a atividade de  $\beta$ -galactosidases isoladas de epicótilos de *Cicer arietinum*. Em cotilédones de *Vigna radiata*, arabinose e fucose praticamente não inibiram a atividade das enzimas (LI *et al.*, 2001). Contudo, vários trabalhos relatam um padrão de moderada a forte a inibição na atividade  $\beta$ -galactosidásica na presença da galactose, glucose e lactose (LI *et al.*, 2001, em cotilédones de plântulas de *Vigna radiata*; CHILAKA *et al.*, 2002, em cotilédones de *Kestingella geocarpa*; ALCÂNTARA *et al.*, 2006, em cotilédones de *Hymenaea courbaril*). De acordo com Nelson e Cox (2000), alguns açúcares podem se ligar aos sítios ativos ou a qualquer outra região das enzimas, agindo como inibidores competitivos, incompetitivos ou não-competitivos. Na inibição competitiva, o inibidor, por ter semelhança estrutural com o substrato, concorre com o substrato pelo sítio ativo da enzima livre, diminuindo a afinidade da enzima pelo substrato. Nesse caso, é necessária uma maior concentração de substrato para se obter a mesma quantidade do complexo enzima-substrato que se formaria na ausência do inibidor. Com isso, há um aumento no  $K_m$  aparente da enzima. Na inibição incompetitiva, o inibidor não interage com o sítio ativo. Eles se ligam às enzimas num local diferente do sítio

ativo, podendo causar uma mudança na conformação da enzima, alterando o sítio ativo. Nesse caso, o sítio ativo ainda pode se ligar a moléculas do substrato, mas a taxa de formação do produto pode ser reduzida. Na inibição não-competitiva, que é uma das variações do padrão de inibição mista, ou a enzima se liga primeiramente ao inibidor, formando um complexo enzima-inibidor, que depois se liga ao substrato, ou a enzima se liga primeiro ao substrato, formando um complexo enzima-substrato, que depois se liga ao inibidor (NELSON; COX, 2000).

Para verificar o grau de afinidade das  $\beta$ -galactosidases a diferentes substratos, muitos estudos de análise cinética com a determinação do  $K_m$  e do  $V_{max}$  foram realizados (SEKIMATA *et al.*, 1989, em sementes de *Raphanus sativus*; BISWAS *et al.*, 2003, em cotilédones de *Phaseolus vulgaris*; BALASUBRAMIAM *et al.*, 2005, em frutos de carambola; ALCÂNTARA *et al.*, 2006, em cotilédones de sementes quiescentes de *Hymenaea courbaril*). Nesses trabalhos, os valores de  $K_m$  de diferentes isoformas de  $\beta$ -galactosidases variaram de 0,63 a 21,7 mM e os de  $V_{max}$  de 2,2 a 33,6 mmol x mg<sup>-1</sup> de proteína x h<sup>-1</sup>. Os tipos e o grau de inibição promovida por açúcares nas atividade das enzimas podem ser analisados através da cinética enzimática, incluindo a determinação das constantes de inibição ( $K_i$ ). Em  $\beta$ -galactosidases essa análise foi feita por alguns autores (BISWAS, 1986, em sementes de *Vigna sinensis*; LI *et al.*, 2001, em cotilédones de *Vigna radiata*; CHILAKA *et al.*, 2002, em cotilédones de *Kestingella geocarpa*; ALCÂNTARA *et al.*, 2006, em cotilédones de *Hymenaea courbaril*) e em todos esses trabalhos, observou-se que a galactose atua como um inibidor competitivo. A constante de inibição ( $K_i$ ) causada pela galactose em  $\beta$ -galactosidases de sementes de *Vigna sinensis* foi de 2,4 mM (BISWAS, 1986) e em  $\beta$ -galactosidases de cotilédones de *Hymenaea courbaril*, foi de 3,7 mM (ALCÂNTARA *et al.*, 2006). Em três isoformas de  $\beta$ -galactosidase isoladas de cotilédones de *Vigna radiata*, os valores de constante de inibição ( $K_i$ ) na presença de galactose foram de 11, 15 e 13, respectivamente (LI *et al.*, 2001). Uma constante de inibição mais elevada (59 mM) foi observada em  $\beta$ -galactosidase cotiledonária de *Kestingella geocarpa* na presença de galactose (CHILAKA *et al.*, 2002).

Levando em consideração que as  $\beta$ -galactosidases atuam na mobilização dos constituintes da parede celular durante a germinação e o crescimento da planta, a análise da especificidade dessas enzimas a diferentes substratos também foi observada em alguns trabalhos (KONNO; TSUMUKI, 1993, na parte aérea de *Oryza sativa*; ALI *et al.*, 1995, em frutos de *Mangifera indica*; LI *et al.*, 2001, em cotilédones de *Vigna radiata*; ALCÂNTARA *et al.*, 2006, em cotilédones de *Hymenaea courbaril*).  $\beta$ -galactosidases isoladas de caules e folhas de *Oryza sativa*

L. não apresentaram nenhuma atividade  $\alpha$ -arabinosidásica,  $\alpha$ -galactosidásica,  $\beta$ -manosidásica e nem  $\beta$ -xilosidásica (KONNO; TSUMUKI, 1993). Isoformas de  $\beta$ -galactosidase de frutos de *Mangifera indica* não foram capazes de hidrolisar nenhum p-nitrofenil glicosídeo testado, mostrando que a preparação enzimática estava totalmente livre de atividade  $\beta$ -glucosidásica,  $\alpha$ -manosidásica e  $\alpha$ -arabinosidásica (ALI *et al.*, 1995). Diferentes isoformas de  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias de *Vigna radiata* apresentaram atividades  $\beta$ -fucosidásica e  $\alpha$ -arabinosidásica, no entanto, praticamente não apresentaram nenhuma atividade para outros nove p-nitrofenilglicosídeos testados (LI *et al.*, 2001). Não houve atividade  $\beta$ -manosidásica nem  $\beta$ -xilosidásica em  $\beta$ -galactosidases de cotilédones de *Hymenaea courbaril* (ALCÂNTARA *et al.*, 2006).

A expressão gênica e a atividade de  $\beta$ -galactosidases vegetais têm sido analisadas em alguns trabalhos (KREPS *et al.*, 2002; ESTEBAN *et al.*, 2003 e 2005; MARTÍN *et al.*, 2005). Com o intuito de identificar genes de potencial importância na tolerância das plantas à salinidade, o perfil de expressão gênica global foi determinado em raízes e folhas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a estresse salino (NaCl 100 mM) (KREPS *et al.*, 2002). Os resultados desse trabalho indicam o envolvimento de genes das  $\beta$ -galactosidases com a adaptação desta espécie ao estresse salino. Estudos sobre expressão gênica realizados por Esteban *et al.* (2005) revelaram a presença de três diferentes cDNAs responsáveis pela codificação de  $\beta$ -galactosidases associadas à parede celular de diferentes órgãos vegetativos de *Cicer arietinum*, com 2.600, 2.900 e 2.700 pares de bases. Para avaliar a expressão temporal (dias após a semeadura) desses genes, eles usaram RNA extraído de epicótilo, de mesocótilo (zona de junção entre a raiz e o epicótilo) e da raiz de plântulas com 2 e 8 dias após a semeadura e verificaram que os níveis de mRNA aumentaram, principalmente, com o comprimento dos epicótilos. No entanto, um dos genes isolados, denominado *CanBGal-3*, foi expresso somente no quarto dia após a semeadura, não sendo observado transcrito em epicótilos muito jovens (2 e 3 dias após a semeadura). Após a clonagem dos cDNAs, os autores verificaram ainda que o padrão de expressão do gene foi compatível com as flutuações das enzimas nos diferentes órgãos, principalmente no epicótilo. Além disso, observaram que todos os cDNAs foram expressos em epicótilos, mostrando seu alto nível de expressão em órgãos responsáveis pelo crescimento vegetativo de plântulas. Apesar dos transcritos desses cDNAs terem sido detectados em mesocótilos e na radícula, o nível foi bem inferior ao encontrado em epicótilos. Nesse trabalho, os autores sugerem que essas  $\beta$ -galactosidases exercem um importante papel na degradação de pectinas da parede celular de

órgãos vegetativos (ESTEBAN *et al.*, 2005). Martín *et al.* (2005) observaram que a expressão *in vivo* de uma  $\beta$ -galactosidase de *Cicer arietinum* em tubérculos de batata levou a uma redução das cadeias laterais de galactanos em pectinas da parede celular. Nesse trabalho, os autores identificaram o cDNA correspondente ao gene que codifica uma  $\beta$ -galactosidase envolvida na degradação de pectinas da parede celular e verificaram que a expressão desse gene na planta de batata, transformada geneticamente, esteve relacionada a uma redução no conteúdo de glicosídeos e um aumento da atividade dessas  $\beta$ -galactosidas.

## 2.5. Feijão-de-corda

O feijão-de-corda, também conhecido como feijão caupi, macassar, fradinho, entre outros, cuja origem está ligada ao continente africano, é uma dicotiledônea herbácea que pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Rosales, família Fabaceae, subfamília Papilionideae e gênero *Vigna* (CRONQUIST, 1988). Essa cultura é uma das mais importantes leguminosas do tradicional sistema de culturas das regiões tropicais de clima semi-árido, podendo ser encontrada na Ásia, na África, na América Central e na América do Sul. Essa leguminosa é bem adaptada às condições brasileiras de clima e de solo, além de apresentar ciclo curto, baixa exigência hídrica, sendo considerada resistente à seca (SINGH *et al.*, 2003). Segundo Ferreira (2001), o feijão-de-corda é uma planta anual de rápido desenvolvimento e apresenta adaptabilidade às condições de estiagem prolongada e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade. Além disso, possui ampla variabilidade genética e excelente potencial de produção e adaptação a fatores adversos (FREIRE-FILHO *et al.*, 1988), sendo bem adaptado às condições de temperatura elevada e estresse hídrico e salino, quando comparado a outras espécies agronomicamente importantes (EHLERS; HALL, 1997).

O feijão-de-corda trata-se de uma cultura com excelente fonte de proteínas e apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais e representa alimento básico para as populações de baixa renda no Nordeste brasileiro (AMBROSANO *et al.*, 1996).

No mundo, as áreas cultivadas com feijão-de-corda estão em torno de 12,5 milhões de hectares, sendo que, desses, aproximadamente 8,0 milhões são cultivados somente na África. A outra parte da área está localizada na América do Sul, América Central e Ásia, com pequenas áreas divididas pelo sudoeste da Europa, sudoeste dos Estados Unidos e da Oceania. No Brasil, o feijão-de-corda é cultivado predominantemente no sertão semi-árido da região Nordeste e em

pequenas áreas na Amazônia. Os Estados do Ceará, Bahia, Amazonas, Maranhão, Piauí e Rio Grande do Norte são responsáveis por cerca de 95% do total de áreas plantadas com feijão-de-corda, sendo o Estado do Ceará o maior produtor nacional (EMBRAPA, 2007).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

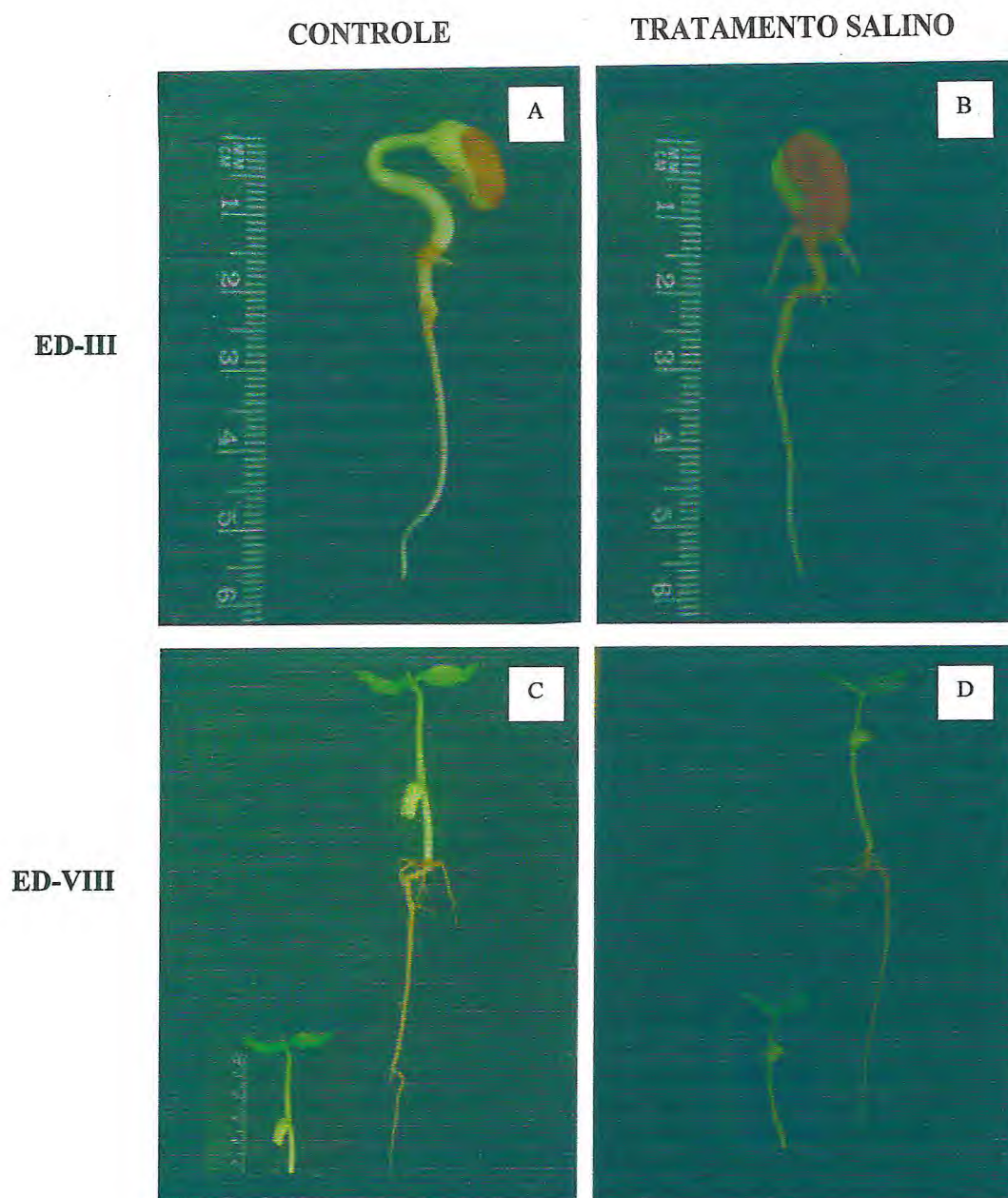
#### 3.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado nesse trabalho - caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivar Pitiúba - foi obtido de sementes provenientes de uma área irrigada do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Ceará, Brasil que, após limpeza e acondicionamento em frascos de vidro contendo sílica gel, foram armazenadas à temperatura de aproximadamente 10°C até posterior utilização.

#### 3.2. Condições de germinação

As sementes de feijão-de-corda cv. Pitiúba foram selecionadas para a germinação de acordo com o tamanho, conformação e cor, sendo excluídas as pequenas, escuras e mal formadas. As sementes selecionadas foram tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio, contendo 4% de cloro ativo, diluída 1:8 (v/v), durante cinco 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 desionizada (GOMES-FILHO; PRISCO, 1978).

Após esse tratamento as sementes foram semeadas em folhas de papel de filtro de 30 x 30 cm (papel mata-borrão 80 g/cm<sup>2</sup>), esterilizadas por autoclavagem a 121°C, durante 20 min, e umedecidas em água desionizada autoclavada (controle) ou em solução de NaCl a 100 mM, preparada com água desionizada autoclavada (tratamento salino). As sementes, em número de 10, foram colocadas em uma única fileira a aproximadamente 1,5 cm da borda superior do papel e a 3,0 cm das bordas laterais. Após a semeadura, cinco conjuntos de folhas de papel de filtro contendo as sementes foram enrolados individualmente e dispostos verticalmente dentro de recipientes plásticos de 8 x 8 x 13 cm, contendo 50 ml da mesma solução utilizada para o umedecimento do papel. Posteriormente, quatro desses recipientes contendo os rolos de papel com as sementes foram colocados em cubas de acrílico (24 x 24 x 50 cm), as quais foram fechadas e mantidas sob fotoperíodo de 12 h, sob irradiância de 16  $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sendo a umidade relativa no interior das cubas próxima a 100%. As cubas de acrílico foram previamente tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio contendo 0,5% de cloro ativo, por 24 h. Após a germinação, as plântulas foram selecionadas e coletadas de acordo com os estádios de desenvolvimento (estádios III e VIII) (Figura 1), seguindo a caracterização morfológica proposta por Prisco (1987), que foi a seguinte:



**Figura 1-** Estádios de desenvolvimento III (A e B) e VIII (C e D) [PRISCO, 1987] durante o estabelecimento das plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba oriundas de sementes semeadas sob condições controle (H<sub>2</sub>O destilada) (A e C) e tratamento salino (NaCl 100 mM) (B e D).

**Estádio 0** - semente quiescente;

**Estádio I** - semente intumescida;

**Estádio II** - radícula emergida, comprimento até 2 cm;

**Estádio III** - radícula maior que 2 cm e menor que 5 cm;

**Estádio IV** - radícula maior que 5 cm;

**Estádio V** - radícula maior que 5 cm, hipocótilo saindo do papel;

**Estádio VI** - radícula maior que 5 cm, cotilédones fora do papel, hipocótilo curvo e folhas cotiledonárias não abertas;

**Estádio VII** - radícula maior que 5 cm, cotilédones fora do papel, hipocótilo reto e folhas cotiledonárias não abertas;

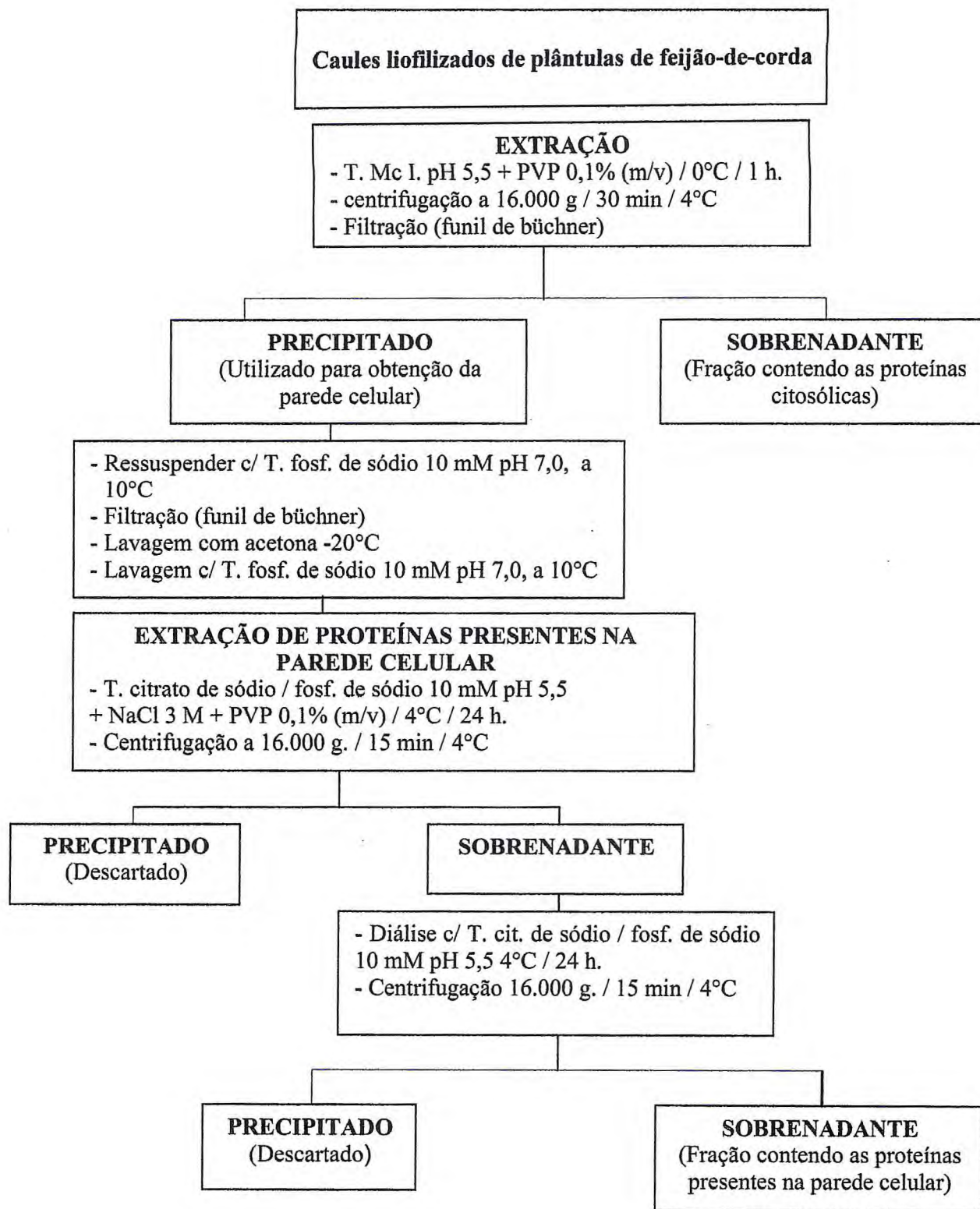
**Estádio VIII** - radícula maior que 5 cm, cotilédones fora do papel, hipocótilo reto e folhas cotiledonárias abertas.

### 3.3. Obtenção de caules liofilizados

Após a coleta das plântulas, os caules foram separados dos outros órgãos, identificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (III e VIII) e o tratamento [controle (água destilada) e salino (NaCl a 100 mM)], congeladas e liofilizadas. Posteriormente, os caules foram macerados em almofariz e armazenados à temperatura de aproximadamente 10°C até posterior utilização.

### 3.4. Extração de proteínas citosólicas

A extração de proteínas citosólicas foi realizada de acordo com Alani *et al.* (1989), com modificações realizadas por Enéas-Filho *et al.* (1995), a partir dos caules liofilizados de plântulas nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e tratamento salino (Figura 2). No início, os caules liofilizados foram macerados em almofariz em tampão citrato de sódio 25 mM - fosfato de potássio 50 mM (tampão McIlvaine; McILVAINE, 1921) pH 5,5 acrescido de polivinil polipirrolidona (PVP) 0,1% (m/v), na proporção de 1:50, durante uma hora em banho de gelo. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 16.000 g por 30 min, a 4°C. O sobrenadante (extrato bruto contendo as proteínas citosólicas), que posteriormente foi submetido a um fracionamento com sulfato de amônio, foi utilizado para a determinação do teor de proteínas (BRADFORD, 1976) e da atividade  $\beta$ -galactosidásica (KANFER *et al.*, 1973) e o precipitado, utilizado para obtenção da parede celular.



**Figura 2-** Esquema de obtenção das frações contendo proteínas citosólicas e oriundas da parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba.

### 3.5. Preparação da parede celular

Para a preparação da parede celular, utilizou-se o método de Seara *et al.* (1988). Para isso, o precipitado obtido a partir do item anterior foi ressuscitado e lavado com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0, a 10°C, utilizando-se um sistema formado por tela de nylon, funil de büchner, kitazato e bomba de vácuo. Em seguida, o resíduo foi lavado com acetona a -20°C, seguido de nova lavagem com tampão fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,0, a 10°C. O filtrado foi então descartado e o resíduo foi utilizado para extração de proteínas presentes na parede celular (Figura 2).

### 3.6. Extração das proteínas presentes na parede celular

A extração das proteínas presentes na parede celular foi feita de acordo com a metodologia de Seara *et al.* (1988). O resíduo obtido no item anterior foi ressuscitado em tampão citrato de sódio 10 mM/fosfato de sódio a 10 mM, pH 5,5, com NaCl 3 M e PVP 0,1% (m/v), a 4°C, durante 24 horas, sob constante agitação. Após esse período, esse material foi centrifugado a 16.000 g por 15 min, a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado, dialisado contra tampão citrato de sódio a 10 mM/fosfato de sódio a 10 mM, pH 5,5, durante 24 horas, a 4°C e centrifugado a 16.000 g por 15 min, a 4°C. O precipitado foi novamente descartado e o sobrenadante contendo as proteínas foi submetido a um fracionamento com sulfato de amônio para a determinação da fração protéica com atividade  $\beta$ -galactosidásica (Figura 2).

### 3.7. Determinação da atividade enzimática da desidrogenase da glucose-6-fosfato e da fosfatase ácida

Após a obtenção das proteínas citosólicas e das presentes na parede celular, foi feita a determinação das atividades das enzimas desidrogenase da glucose-6-fosfato e fosfatase ácida, que são consideradas enzimas marcadoras envolvidas em processos metabólicos que ocorrem no citosol e no vacúolo, respectivamente (GÓMEZ *et al.*, 1995). Esse procedimento foi feito com o intuito de verificar se não havia a presença de proteínas citosólicas nas frações protéicas da parede celular. As determinações dessas atividades enzimáticas foram feitas em amostras provenientes de três extrações, cada uma delas em triplicata.

### 3.7.1. Determinação da atividade da desidrogenase da glucose 6-fosfato

A atividade da enzima citoplasmática desidrogenase da glucose 6-fosfato foi determinada de acordo com Molina *et al.* (2003), com modificações. O ensaio foi baseado na redução do NADP<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) a NADPH. A mistura de reação com um volume total de 1,0 mL, foi composta de 840 µL de tampão Tris-HCl a 40 mM, pH 7,5, 10 µL de glucose-6-fosfato a 100 mM, 10 µL de MgCl<sub>2</sub> a 1 M, 100 µL de extrato e 40 µL de NADP<sup>+</sup> (-β) a 10 mM. Todos os reagentes utilizados nesse ensaio foram dissolvidos em tampão Tris-HCl a 40 mM, pH 7,5. A reação ocorreu à temperatura ambiente e foi iniciada pela adição do substrato (NADP). A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de NADPH formado, medindo-se a absorbância em 340 nm ( $A_{340}$ ) durante 10 min a intervalos de 1 min. Uma unidade arbitrária de glucose 6-fosfato desidrogenase é definida como a quantidade de enzima (por 1 mL da mistura de reação) que cataliza a reação entre o NADP e a glucose 6-fosfato e (sob as condições descritas acima) requer um tempo de 1 minuto para causar um aumento de 0,1 na absorbância. A diferença entre a variação da densidade ótica em  $A_{340}$  ( $\Delta A_{340}$ ) dos ensaios a cada minuto e a  $\Delta A_{340}$  do testemunho (100 µL de H<sub>2</sub>O no lugar de 100 µL do extrato) dividido pelo coeficiente de extinção molar ( $6,22 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) determinou a atividade da enzima, que foi expressa em unidades de atividade ( $\mu\text{moles de NADPH} \times \text{min}^{-1}$ ).

### 3.7.2. Determinação da atividade da fosfatase ácida

A atividade da enzima vacuolar fosfatase ácida foi determinada de acordo com o método de Granjeiro *et al.* (2003), com modificações. A mistura de reação foi composta de 0,5 mL de extrato (diluído quando necessário) e 0,5 mL do substrato sintético p-nitrofenil-fosfato (PNP-fosfato) 1 mM dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. Após 10 min a 37°C em banho-maria, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 M. A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de produto formado (p-nitrofenol), medindo-se a absorbância em 405 nm ( $A_{405}$ ), usando-se um coeficiente de extinção molar de  $18.000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . A atividade da fosfatase ácida foi expressa em  $\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  de MS (matéria seca).

### 3.8. Determinações da atividade $\beta$ -galactosidásica e do teor de proteína

A atividade  $\beta$ -galactosidásica foi determinada de acordo com Kanfer *et al.* (1973), com modificações. A mistura de reação foi composta de 0,5 mL de extrato e do substrato sintético p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\beta$ -PNPG) a 3mM dissolvido em tampão citrato de sódio a 25 mM - fosfato de potássio a 50 mM (tampão McIlvaine pH 4,0). Após 15 minutos a 55°C em banho-maria, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de carbonato de sódio a 0,1 M. A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de produto formado, 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 atividade (UA), sendo uma UA correspondente a uma  $\Delta A_{400}$  de 0,01. Os valores em UA foram multiplicados pelos fatores de diluição e pelos volumes de extrato. A atividade  $\beta$ -galactosidásica total foi expressa em UA x h<sup>-1</sup>. A atividade  $\beta$ -galactosidásica específica foi determinada dividindo-se a atividade total pela concentração de proteína (UA x mg<sup>-1</sup> de proteína x h<sup>-1</sup>).

A determinação da concentração de proteína foi feita de acordo com Bradford (1976), tendo a albumina sérica bovina como padrão. A reação foi realizada por meio da adição de 2,5 mL do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,05 mL da amostra, quando 10 minutos após a adição do reagente, realizou-se a leitura de absorbância em 595 nm ( $A_{595}$ ). A proteína total foi expressa em mg.

### 3.9. Purificação de $\beta$ -galactosidases

#### 3.9.1. Fracionamento com sulfato de amônio

Inicialmente, os extratos brutos contendo proteínas citosólicas e presentes na parede celular foram submetidos a um fracionamento com sulfato de amônio nas faixas de 0 a 20, 20 a 40, 40 a 60, 60 a 80 e 80 a 100% de saturação. Esses intervalos foram utilizados para se verificar em que faixa se encerra uma maior atividade  $\beta$ -galactosidásica. Após a definição desses intervalos, os precipitados das frações que encerravam maiores atividades  $\beta$ -galactosidásicas ( $F_{20-80}$  e  $F_{40-100}$ , para proteínas citosólicas e presentes na parede celular, respectivamente) foram ressuspensos com tampão McIlvaine pH 5,5. Em seguida, o homogenato foi dialisado contra água desionizada, por 24 horas, a 4°C. A partir de alíquotas dessas frações dialisadas foram determinadas a atividade  $\beta$ -galactosidásica e a concentração de proteínas. Após liofilização, a fração contendo as proteínas citosólicas foi aplicada a uma

coluna de troca iônica (DEAE-Sephadex A-50) e a fração contendo as proteínas presentes na parede celular foi aplicada a uma coluna de afinidade (Lactosil-sepharose) (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000) (Figura 3).

### 3.9.2. Cromatografia de troca iônica - DEAE Sephadex A-50

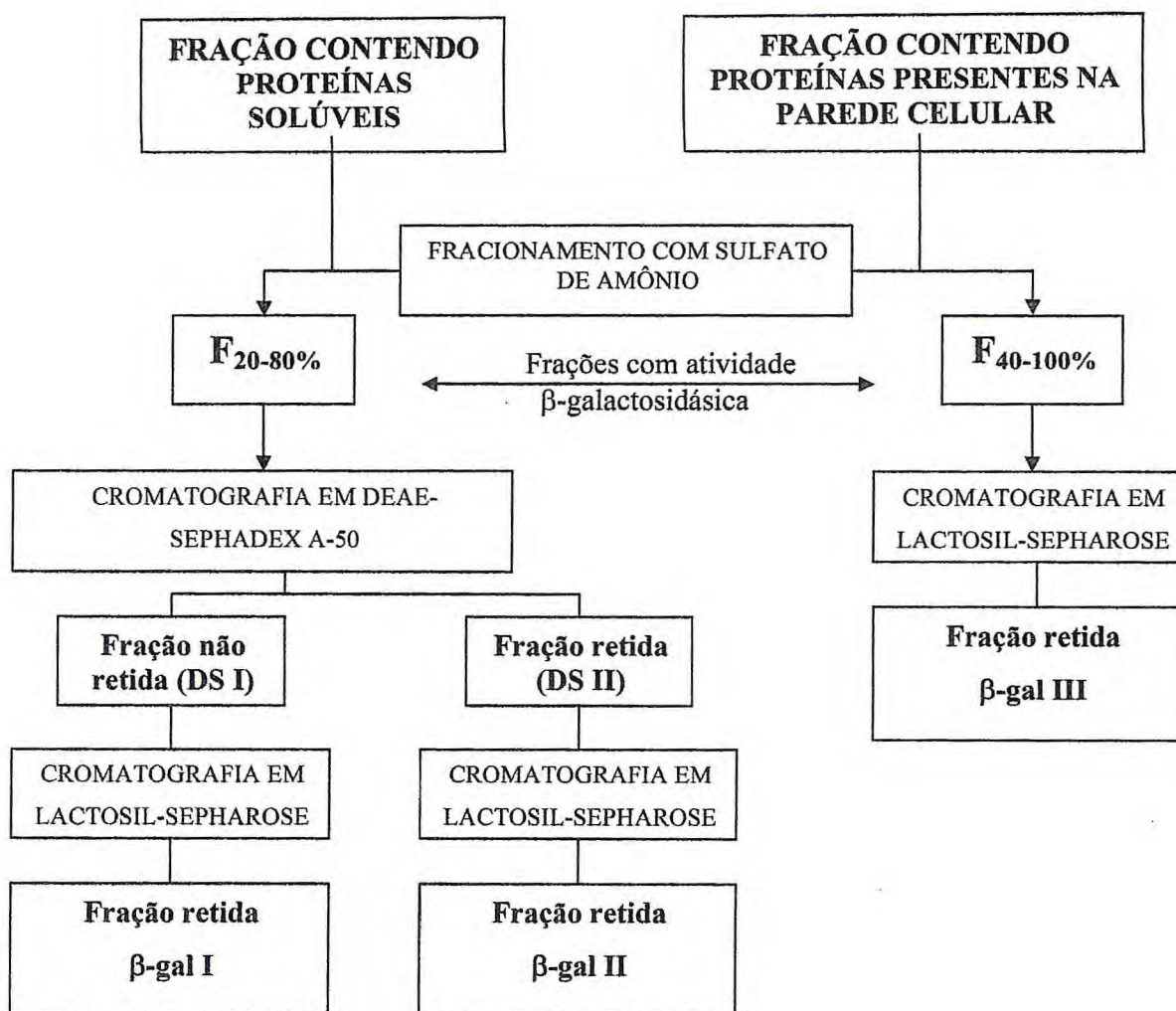
A coluna de troca iônica - DEAE Sephadex A-50 (Sigma Chemical Company, USA) - foi preparada intumescendo-se o gel em água desionizada na proporção de 1,5 g por 10 mL, retirando-se, após várias trocas de água, as partículas finas em suspensão. Em seguida, o gel foi lavado sucessivamente com NaOH 0,01 M por 15 minutos, com água desionizada até atingir pH neutro, com HCl 0,2 M por 15 minutos, novamente com água desionizada e equilibrado com tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,2. A coluna (1,7 x 18 cm) foi preparada sob a ação da gravidade (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000).

Em geral, foram aplicadas em cada cromatografia 150.000 UA x h<sup>-1</sup> da fração 20-80% (F<sub>20-80</sub> – proteínas citosólicas) liofilizada e dissolvida em 5,0 mL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,2. Essa cromatografia foi realizada a um fluxo de 31,5 mL x h<sup>-1</sup>, a 4°C, sendo coletadas frações de 4,2 mL. O perfil cromatográfico foi definido após a leitura dessas frações em 280 nm e determinação da atividade β-galactosidásica. A eluição dos picos retidos na coluna foi feita com um gradiente salino (0,2-1,0 M NaCl, em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,2; 100mL) (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000). Os picos com atividade β-galactosidásica resultantes de várias dessas cromatografias de troca iônica foram reunidos e dialisados contra água destilada por 24 horas, a 4°C, concentrados separadamente por liofilização parcial e aplicados a uma coluna de afinidade (Lactosil-Sepharose).

### 3.9.3. Cromatografia de afinidade - Lactosil-Sepharose

O procedimento para a preparação da coluna de afinidade foi adaptado de Levi e Teichberg (1981). Nesta preparação, 100 mL de sedimentos de Sepharose 4B (Sigma Chemical Company, USA) foram ressuspensos em carbonato de sódio 0,5 M e lavado várias vezes até alcançar pH 11,0. Após ter sido lavado em funil de Büchner, o gel seco foi ressuspendido em 100 mL de carbonato de sódio 0,5 M adicionando-se lentamente 10 mL de divinilsulfona. A mistura foi agitada suavemente durante 70 minutos a 23°C, filtrada e novamente lavada em carbonato de sódio 0,5 M contendo lactose 10%. A reação procedeu-se por 15 horas a 23°C sob leve agitação. A Sepharose ativada com lactose foi novamente filtrada e lavada com carbonato de sódio 0,5 M, com água desionizada e





**Figura 3-** Esquema de purificação de  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -gal I e  $\beta$ -gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -gal III) a partir de extratos provenientes de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba.

finalmente equilibrada com tampão McIlvaine pH 4,0, diluído 1:4, contendo 0,1 mM de EDTA e 1 mM de 2-mercaptoetanol (CAMPILLO; SHANNON, 1982). A coluna (1,6 x 18,0 cm) foi preparada sob a ação da gravidade.

Os picos com atividade de  $\beta$ -galactosidases citosólicas obtidos em DEAE-Sephadex A-50 foram aplicados à coluna de afinidade. Na purificação de  $\beta$ -galactosidases presentes na parede celular as frações liofilizadas oriundas do fracionamento com sulfato de amônio foram diretamente aplicadas a essa coluna de afinidade. Essa cromatografia foi realizada a um fluxo de 36,0 mL x h<sup>-1</sup> a 4°C, sendo coletadas frações de 4,8 mL. O perfil cromatográfico foi obtido após a leitura dessas frações em 280 nm e determinação da atividade  $\beta$ -galactosidásica. A eluição dos picos que ficaram retidos na coluna foi feita com o tampão de equilíbrio, contendo lactose 100 mM e NaCl 0,5 M. As frações ricas em atividade  $\beta$ -galactosidásica foram juntas, dialisadas contra água desionizada por 24 horas, a 4°C e armazenadas no freezer até posterior utilização (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000). Após utilização, a coluna foi regenerada com solução de uréia 6,0 M (SIMOS *et al.*, 1989).

### 3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-nativa) em condições ácidas

Com o intuito de identificar as bandas com atividade  $\beta$ -galactosidásica e de proteínas oriundas do processo da purificação enzimática em caules de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII dos tratamentos controle e salino, foram realizadas eletroforeses em condições nativas (PAGE-nativa) e em pH ácido de acordo com Goldenberg (1997), com algumas modificações.

Nesses experimentos foram utilizadas placas de vidro de 11,5 cm de largura, 12,5 cm de altura e 0,1 cm de espessura, com espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação consistiu de um gradiente de concentração de 5 a 15% de poliacrilamida. A solução do gel 5% continha tampão acetato de potássio 0,57 M pH 4,3, acrilamida 5%, bis-acrilamida 0,13%, 12  $\mu$ L/mL de persulfato de amônio 10%, e 3,5  $\mu$ L/mL de TEMED. Já a solução do gel 15% era constituída de tampão acetato de potássio 0,68 M pH 4,3, 160  $\mu$ L/mL de glicerol 50%, acrilamida 15%, bis-acrilamida 0,4%, 4  $\mu$ L/mL de persulfato de amônio 10%, e 2,0  $\mu$ L/mL de TEMED. A solução do gel de aplicação era formada por tampão acetato de potássio 0,06 M pH 6,8, acrilamida 4%, bis-acrilamida 0,1%, 10  $\mu$ L/mL de persulfato de amônio 10%, e 1,0  $\mu$ L/mL de TEMED. Para a formação do gel em gradiente foi utilizado um sistema de formação de gradiente acoplado a uma bomba peristáltica e um agitador magnético.

Antes de serem aplicadas ao gel, as amostras ( $\beta$ -galactosidases purificadas) foram previamente concentradas por liofilização parcial e armazenadas no freezer. No momento da

aplicação, as amostras foram degeladas, sendo 45  $\mu\text{L}$  destas rapidamente equilibrados com 15  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (acetato de pot 1 M pH 6,8) contendo glicerol (50%) e fucsina básica (0,005%). Durante essa preparação, as amostras, que continham uma quantidade mínima de 3,0  $\mu\text{g}$  de proteína, foram mantidas em banho de gelo, sendo então aplicadas nos poços do gel. Antes da aplicação das amostras, colocou-se tampão de corrida (tampão acetato 0,14 M- $\beta$ -alanina 0,35 M, pH 4,3) nas partes superior e inferior da placa. A eletroforese desenvolveu-se a uma corrente de 30 mA, com inversão dos eletrodos (pólo positivo para o pólo negativo), durante aproximadamente 5 horas, à temperatura de  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Com o término da corrida, o gel foi separado em duas partes, uma para revelação das bandas com atividade  $\beta$ -galactosidásica e a outra para coramento das bandas protéicas no gel.

### 3.11. Revelação da atividade $\beta$ -galactosidásica no gel de poliacrilamida

As bandas com atividade  $\beta$ -galactosidásica foram reveladas no gel de poliacrilamida por coramento específico, de acordo com a metodologia de Simos e Georgatsos (1988), com modificações. Para isso, o gel foi pré-incubado em placa de petri contendo tampão McIlvaine pH 4,0 durante 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, incubado em uma solução contendo o substrato sintético 6-bromo-2-naftil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\beta$ -BNGal) (Sigma Chemical Company, USA) a 4 mM dissolvido em N,N dimetilformamida (DMF) e o corante "Fast Blue B Salt" (Sigma Chemical Company, USA) (10 mg/mL) dissolvido em tampão McIlvaine pH 4,0. Após a mistura das duas soluções, o gel foi incubado à temperatura ambiente até o aparecimento das bandas com atividade  $\beta$ -galactosidásica. Após o aparecimento dessas bandas, o gel foi lavado com água desionizada para a retirada do excesso de corante e incubado por duas horas em solução de secagem (metanol 50% e glicerol 5%). O gel foi seco em papel celofane e guardado para análise.

### 3.12. Coramento de bandas protéicas no gel de poliacrilamida

O coramento dos géis com nitrato de prata, para a revelação das bandas de proteínas no gel de poliacrilamida, foi feito de acordo com Blum *et al.* (1987), com algumas modificações. Após a corrida eletroforética, a parte do gel destinada à determinação de bandas protéicas foi colocada em placa de petri contendo solução de fixação (ácido acético a 10% e etanol a 40%) por no mínimo 1 hora (ou durante uma noite) sob leve agitação. Em seguida, procedeu-se o coramento das bandas protéicas seguindo as etapas descritas na Tabela 1. Após

**Tabela 1-** Etapas do coramento com prata das bandas de proteínas em gel de poliacrilamida, segundo Blum *et al.* (1987), com modificações

ETAPAS	SOLUÇÕES	TEMPO
1. Fixação	Etanol 40% / Ácido acético 10%	1 a 12 horas
2. Incubação	Etanol 30%	20 minutos (2 x)
3. Lavagem	Água desionizada	20 minutos
4. Sensibilização	Tiosulfato de sódio 0,02%	1 minuto
5. Lavagem	Água desionizada	20 segundos (3 x)
6. Adição de prata	Nitrato de prata 0,2% / Formaldeído 0,02%	20 minutos
7. Lavagem	Água desionizada	20 segundos (3 x)
8. Revelação	Carbonato de sódio 3% / Formaldeído 0,05% / Tiosulfato de sódio 0,0005%	3 minutos
9. Lavagem	Água desionizada	30 segundos
10. Parada	Glicina 0,5%	5 minutos
11. Lavagem	Água desionizada	10 minutos (2 x)

o coramento, o gel foi incubado por duas horas em solução de secagem (metanol a 50% e glicerol a 5%) e em seguida, seco em papel celofane e guardado para análise.

### 3.13. Caracterização das $\beta$ -galactosidases

#### 3.13.1. Determinação da massa molecular - Cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-150)

O gel de Sephadex G-150 foi montado em uma coluna medindo 58,0 x 1,3 cm, a um fluxo de 18 mL x h<sup>-1</sup>, a qual em seguida, foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,2. Antes da aplicação das amostras ( $\beta$ -galactosidases purificadas) à matriz cromatográfica, determinou-se o volume de exclusão (V<sub>o</sub>) da coluna com “Blue dextrana” (2.000 kDa) e foi feita a calibração prévia da coluna utilizando-se os seguintes padrões protéicos:  $\beta$ -amilase (200 kDa), desidrogenase alcoólica (150 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). Antes de serem aplicadas à coluna, as amostras foram equilibradas com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,2. Durante todo o processo manteve-se o mesmo fluxo utilizado para a montagem da coluna, sendo coletadas frações de 2,0 mL.

### 3.13.2. Curva de pH

A partir das isoformas de  $\beta$ -galactosidase foram estudadas as atividades enzimáticas na faixa de pH que variou de 2,5 a 6,5, a intervalos de 0,5. Para a realização do ensaio de atividade enzimática utilizou-se o substrato  $\beta$ -PNPG dissolvido em tampão McIlvaine nos referidos pHs. Os valores de atividade enzimática foram expressos em  $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  e representam médias de três experimentos, cada um com três repetições.

### 3.13.3. Temperatura ótima de atividade $\beta$ -galactosidásica

Para a determinação da temperatura ótima de atividade em isoformas de  $\beta$ -galactosidase o substrato sintético  $\beta$ -PNPG foi dissolvido em tampão McIlvaine pH 4,0. O ensaio foi feito nas temperaturas de 30, 40, 50, 55, 60, 70 e 80°C e os valores de atividade enzimática foram expressos em  $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  e representam médias de três experimentos, cada um com três repetições.

### 3.13.4. Termoestabilidade

A termoestabilidade de isoformas de  $\beta$ -galactosidases também foi realizada. Para isso, alíquotas de 0,5 mL da solução enzimática foram incubadas por 10 minutos em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 e 80°C), seguidas de resfriamento em banho de gelo e posterior determinação da atividade enzimática em condições padrão de ensaio. Os valores de atividade enzimática foram expressos em percentagens de controle (amostra sem tratamento térmico) e representam a média de três experimentos, cada um com três repetições.

### 3.13.5. Termoinativação em presença de galactose e glucose

A inativação térmica das isoformas de  $\beta$ -galactosidase foi verificada por meio da pré-incubação de alíquotas de 0,5 mL a 60°C durante 20, 40, 60 e 80 minutos, na ausência e na presença dos açúcares galactose (50 mM) e glucose (50 mM) dissolvidos em tampão McIlvaine pH 4,0. Após o período de incubação, as alíquotas foram colocadas em banho de gelo, sendo feita em seguida, a determinação da atividade enzimática em condições padrão. O substrato  $\beta$ -PNPG usado no ensaio de atividade foi dissolvido em tampão McIlvaine pH 4,0, acrescido ou não de galactose ou glucose a 50 mM, de acordo com o tratamento. Os valores de atividade enzimática foram expressos em percentagens de controle (Controle 1- amostra

sem tratamento térmico e sem a presença de açúcares; Controle 2- amostra sem tratamento térmico na presença de galactose 50 mM; Controle 3- amostra sem tratamento térmico na presença de glucose 50 mM) e correspondem à média de três experimentos, cada um com três repetições.

### 3.13.6. Efeito de açúcares na atividade $\beta$ -galactosidásica

Para analisar o efeito de alguns açúcares na atividade das isoformas de  $\beta$ -galactosidases, os ensaios de atividade foram realizados em condições padrão, na ausência (controle) e na presença dos açúcares lactose, galactose, arabinose e fucose (todos na concentração de 50 mM), os quais foram dissolvidos em tampão McIlvaine pH 4,0. O substrato  $\beta$ -PNPG usado nos ensaios de atividade foi dissolvido em tampão McIlvaine pH 4,0, acrescido ou não dos açúcares citados acima, de acordo com o tratamento. Os valores de atividade enzimática foram expressos em percentagens de controle e correspondem à média de três experimentos, cada um com três repetições.

### 3.13.7. Análise cinética da atividade $\beta$ -galactosidásica em função de diferentes concentrações de galactose e $\beta$ -PNPG

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ), as atividades de isoformas de  $\beta$ -galactosidase foram determinadas em função de concentrações crescentes no meio de reação, do substrato  $\beta$ -PNPG (1,0 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0 mM) dissolvido em tampão McIlvaine pH 4,0, mantendo-se constante a concentração das enzimas. Os valores de  $K_m$  e de  $V_{max}$  foram obtidos a partir do gráfico duplo recíproco (Lineweaver-Burk) dos valores obtidos da velocidade da reação em função da concentração do substrato, e foram expressos, respectivamente, como  $1/[\text{substrato}]$  e  $(\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1})^{-1}$ . Cada ponto do gráfico representa a média de três experimentos, cada um realizado em triplicata.

Com o intuito de verificar que tipo de inibição a galactose exerce na atividade enzimática das isoformas de  $\beta$ -galactosidase, foi feita uma análise cinética dessas enzimas em função da ausência e da presença de concentrações crescentes de galactose e de diferentes concentrações do substrato  $\beta$ -PNPG. Para isso, alíquotas das enzimas (0,5 mL), na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de galactose (2,5, 10,0, 20,0 e 30 mM), tiveram suas atividades enzimáticas determinadas em função de concentrações crescentes do

substrato  $\beta$ -PNPG (2,0, 2,5, 3,5, 5,0 e 10,0 mM) dissolvido em tampão McIlvaine pH 4,0, mantendo-se constante a concentração das enzimas. O ensaio de atividade foi realizado em diferentes concentrações de substrato, mas em condições padrão de tempo e de temperatura. Os valores de atividade enzimática obtidos experimentalmente foram plotados no gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. Cada ponto do gráfico representa a média de três experimentos, cada um realizado em triplicata.

### 3.13.8. Atividades enzimáticas das $\beta$ -galactosidases em diferentes substratos

A capacidade das  $\beta$ -galactosidases I, II e III em hidrolisar outros substratos também foi analisada. Para isso, foram utilizados os substratos sintéticos p-nitrofenil  $\beta$ -D-xilopiranosídeo, p-nitrofenil  $\beta$ -D-fucopiranosídeo, p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo, p-nitrofenil  $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo, p-nitrofenil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo, p-nitrofenil  $\alpha$ -D-galactopiranosídeo e p-nitrofenil  $\alpha$ -L-fucopiranosídeo), todos na concentração de 3 mM. Os ensaios de atividade foram realizados em condições padrão e os valores de atividade enzimática foram expressos em percentagens de controle (atividades  $\beta$ -D-galactosidásica) e correspondem à média de três experimentos, cada um com três repetições.

### 3.14. Caracterização molecular

#### 3.14.1. Desenho dos “primers” para $\beta$ -galactosidase

Os “primers” degenerados da  $\beta$ -galactosidase foram desenhados a partir do alinhamento (Figura 4) de regiões de cDNAs apresentando homologia entre as seqüências nucleotídicas das espécies: *Lupinus angustifolius* (AJ011047), *Vigna radiata* (AF229794), *Citrus sinensis* (AY029198), *Malus domestica* (L29451), *Pyrus pyrifolia* (AB0465543), *Lycopersicon esculentum* (AJ012798), *Carica papaya* (AF064786), *Arabidopsis thaliana* (NM125070), *Arabidopsis thaliana* 4 (AJ270300), *Arabidopsis thaliana* 3 (AJ270308) e *Arabidopsis thaliana* 2 (AJ270298) (ESTEBAN *et al.*, 2005).

## Extremidade 5'

LangAJ011047	TCACCTATCCAAGAAGCACACCTCAGATGTGGCCAGACCTTATTCAAAAGGCCAAAGATGG	227
VrAF229794	TCACTACCCAAGAAGCACTCCTCAAATGTGGCCAGACCTCATTTCAGAAAGGCCAAAGATGG	197
CsAY029198	TCATTATCCCAGAAGCACTCCCGAGATGTGGCCTGACCTTATACAAAAGGCCAAAGATGG	239
MdL29451	TCACTATCCCAGAAGCACTCCCGAGATGTGGCCGGATTTAATTTCAGAAAGGCCAAAGATGG	200
PpAB046543	TCACTATCCCAGAAGCACTCCTGAGATGTGGCCGGATTTAATTTCAGAAAGGCCAAAGATGG	200
LeAJ012798	TCATTATCCAAGAAGCACTCCACAGATGTGGCCTGATCTTATACAAAAGGCTAAAGATGG	197
CpAF064786	TCATTATCCCAGAAGCACTCCTCAGATGTGGCCTGATCTTATACAAAATGCTAAAGAAGG	191
AtNM_125070	TCACTATCCACGAAGCACCCCTGAGATGTGGCCGGCCTAATACAGAAAGGCCAAAGAAGG	209
At4AJ270300	TCACTATCCACGAAGCACCCCTGAGATGTGGCCGGCCTAATACAGAAAGGCCAAAGAAGG	209
At3AJ270308	TCACTACCCAAGAAGCACACCTGAGATGTGGCCTGACCTTATACAAAAGGCCAAAGATGG	209
At2AJ270298	ACACTATCCAAGAAGCACCTGAGATGTGGCCTGATCTTATAAAGAAGGCCAAAGAAGG	209
	** * * * * ***** * * * ***** * * * * * * * * * * * * * *	
	<b>β-gal F</b> AGCACHCCHSARATGTGGC	

## Extremidade 3'

Lang (AJ011047)	ACCTCCCAAAGATGGTATCATGTTCCTCGGTCATGGCTGAGATCGGGTGGTAACTACTT	2132
Vr (AF229794)	ACCATCTCAGAGATGGTATCATGTTCCCTCGTTCATGGCTGAACCTCGGGTGGTAACTCCTT	2105
Cs (AY029198)	GCCTCTCAACGATGGTATCACGTTCCTCCGCTCACGGCTGAAGCCGAGTGGAAACCTGTT	2150
Md (L29451)	GCCCTCTCAGAGATGGTACCACATTCCTCGATCATGGTTGACCCCGACTGGGAATCTTTT	2111
Pp (AB046543)	GCCTCTCAGAGATGGTACCACATTCCTCGATCGTGGTTGACCCCGAATGGAAATCTTTT	2111
Lê (AJ012798)	ACCTTCTCAGAGATGGTACCATGTTCCTCGATCGTGGCTGAAACCAAGTGGAAACTTGT	2111
Cp (AF064786)	GGCTTCTCAGAGATGGTACCATGTTCCTCGCTCGTGGCTCAACCAACTGCGAACCTATT	2102
At (NM125070)	AGCTTCACAAAAGATGGTACCATGTACCTCGTTCATGGCTTAAGTC---TCAAACCTTAT	2114
At4 (AJ270300)	AGCTTCACAAAAGATGGTACCATGTACCTCGTTCATGGCTTAAGTC---TCAAACCTTAT	2114
At3 (AJ270308)	AGCTTCACAAAAGATGGTACCATGTGCCTCGTTCATGGCTGAAGCCAACCTAATAACCTGT	2120
At2 (AJ270298)	ACCTTCTCAAAGATGGTACCATGTACCTCGTTCATGGCTAAACCGTTTGGGAACCTTCT	2117
	* * * * * ***** * * * ***** * * * * * * * * * * * * * *	
	<b>GATGGTAYCAYRTDCHCG</b>	
	<b>β-gal R</b> 5' CGDGGHAYRTGRTACCATC 3'	

**Figura 4:** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de cDNAs de β-galactosidases usado para o desenho dos “primers”. O alinhamento foi feito usando a ferramenta “on line” Clustal W ([www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html)) e cDNAs de diferentes espécies publicadas no “GenBank” ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)): *Lupinus angustifolius* (AJ011047), *Vigna radiata* (AF229794), *Citrus sinensis* (AY029198), *Malus domestica* (L29451), *Pyrus pyrifolia* (AB0465543), *Lycopersicon esculentum* (AJ012798), *Carica papaya* (AF064786), *Arabidopsis thaliana* (NM125070), *Arabidopsis thaliana* 4 (AJ270300), *Arabidopsis thaliana* 3 (AJ270308), *Arabidopsis thaliana* 2 (AJ270298). As regiões em amarelo representam os nucleotídeos dos “primers” mais conservados entre as espécies. As regiões em rosa representam os nucleotídeos variantes. Os números à direita das seqüências indicam a quantidade de nucleotídeos a partir do códon ATG (primeira metionina).



Após o alinhamento, as seqüências dos “primers” deduzidos foram determinadas.

- seqüências dos “primers” deduzidos (as degenerações estão destacadas\*)

β-gal F<sup>\*\*</sup>: 5' AGCACHCCHSARATGTGGC 3'

β-gal R<sup>\*\*\*</sup>: 5' CGDGGHAYRTGRTACCATC 3'

\*(**H**: A/C/T; **S**: C/G; **R**: A/G; **D**: A/G/T; **Y**: C/T; **R**: A/G).

\*\* Seqüência senso (“Forward”).

\*\*\* Seqüência antisenso (“Reverse”)

### 3.14.2. Extração de RNA total de caules de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp

A extração do RNA total foi feita de acordo com o protocolo da Qiagen. O RNA total foi isolado a partir de 200 mg de caules de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e de tratamento salino usando o “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen). Os caules foram cortados em pequenos pedaços e macerados em nitrogênio líquido (para disrupção das paredes celulares e membranas) com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino, que então foi transferido para um tubo Eppendorf contendo 900 µl de tampão RLT (tampão de extração que contém tiocianato de guanidina) e 20 µl de β-mercaptoetanol. Em seguida, a mistura do Eppendorf foi homogeneizada por uma vigorosa agitação em vortex. A homogeneização quebra o DNA genômico e outros compostos celulares de alto peso molecular produzindo um lisato homogêneo.

A amostra homogeneizada foi aplicada em uma mini coluna do “kit” (“QIAshredder spin column” - lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e, em seguida, centrifugada a 10.000 g por 2 minutos à temperatura ambiente. Um total de 900 µl do eluato foi recuperado e transferido para um novo tubo Eppendorf, ao qual foi adicionado 450 µL de etanol 95%, sendo a mistura homogeneizada por pipetagem. Posteriormente, transferiu-se o volume dessa mistura para a coluna de fixação de RNA (“RNeasy spin column” - lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugou-se a 10.000 g por 15 segundos. O eluato foi descartado, sendo adicionados 700 µL de tampão RW1 (primeiro tampão de lavagem, contendo etanol) à coluna, realizando-se uma nova centrifugação a 10.000 g por 15 segundos, sendo o eluato novamente descartado. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, ao qual foram adicionados 500 µL de RPE (segundo tampão de lavagem, contendo etanol).

Após nova centrifugação a 10.000 g durante 15 segundos, o eluato foi descartado e o tubo coletor foi reutilizado na mesma coluna. Um volume de 500 µL de RPE foi adicionado à coluna e esta, centrifugada a 10.000 g por 2 minutos para remoção de qualquer resíduo de etanol que poderia interferir com as reações subsequentes. O RNA total foi eluído da coluna com 40 µL de água livre de RNase (DEPC – Dietilpirocarbonato), centrifugando-se a 10.000 g por 1 minuto. O eluato (RNA total) foi quantificado e armazenado à -20° C para posteriores reações de RT-PCR (Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia de Polimerase). A concentração e a integridade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose (1,5%).

### 3.14.3. Quantificação do RNA Total

A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm em cubeta de quartzo. Para o cálculo da concentração utilizou-se a seguinte relação: densidade ótica igual a 1,0 corresponde a uma concentração de 40 µg/mL de RNA total.

A pureza das amostras de RNA total foi avaliada por meio das relações de absorvância  $A_{260}/A_{230}$  (para verificação de contaminação com polissacarídeos) e  $A_{260}/A_{280}$  (para verificação de contaminação com proteínas e/ou fenóis). Para uma amostra sem contaminação com polissacarídeos, a primeira relação deve estar acima de 2,0. Para uma amostra sem contaminação com proteínas e/ou fenóis, a segunda relação deve estar entre 1,8 e 2,0. Uma relação abaixo de 1,8, indica contaminação com proteínas e/ou fenóis e acima de 2,0, indica contaminação com açúcares solúveis (GASIC *et al.*, 2004).

### 3.14.4. Eletroforese do RNA Total

A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM). As amostras foram preparadas com 1/10 do volume do tampão de carga contendo azul de bromofenol a 0,4% (m/v), xileno cyanol a 0,4% e glicerol 50% (v/v). A migração foi feita utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua Bio Rad (Power - pac 300) com amperagem constante de 50 mA por aproximadamente 60 minutos à temperatura de 25°C.

Foi aplicado em cada poço do gel o equivalente a 0,5 µg da amostra de RNA total dos caules. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por, aproximadamente, 15 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta. O gel foi fotografado em um sistema de imagem de gel

(Labortechnik-Alemanha). A densidade das bandas foi analisada com o programa Scion Image Release beta 3b (Scion Corporation, USA) (COSTA *et al.*, 2007).

#### 3.14.5. Reação de transcrição reversa (RT)

Amostras do RNA total, foram submetidas a uma reação de transcrição reversa pela enzima transcriptase reversa [M-MLV RT (“Moloney murine leukemia vírus”)]. O ensaio foi realizado em tubos de Eppendorf de 500  $\mu$ l, usando o “kit” da Invitrogen. A mistura de reação continha 2  $\mu$ g de RNA total (volume variável), 4  $\mu$ l de tampão 5x (tampão de reação da Invitrogen), 2  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 2  $\mu$ l de dNTP mix (5 mM cada), 3  $\mu$ l de Oligo dT<sub>18</sub> (20 pmoles/ $\mu$ L) e água DEPC com quantidade suficiente para 20  $\mu$ l. Essa mistura foi submetida a 65°C por 5 minutos e transferida imediatamente para o gelo. A reação de transcrição reversa foi realizada a 37°C por uma hora e em seguida a transcriptase reversa foi inativada aquecendo-se a 75°C por 10 minutos. As amostras foram guardadas a -20°C.

#### 3.14.6. Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

Os produtos da reação de transcrição reversa (cDNA) e os “primers” degenerados deduzidos anteriormente, foram utilizados para amplificação do(s) gene(s) da  $\beta$ -galactosidase por meio da “reação em cadeia de polimerase” (PCR). A mistura de reação continha 1  $\mu$ l de produto de RT (cDNA), 1  $\mu$ l de dNTPs a 5 mM, 5  $\mu$ l de Tampão 5x (tampão Tris-HCl a 250 mM, NaCl a 250 mM, MgCl a 25 mM e BSA a 0,5  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de  $\beta$ -gal F (20 pmoles em 1  $\mu$ L da solução estoque), 1  $\mu$ l de  $\beta$ -gal R (20 pmoles em 1  $\mu$ L da solução estoque), 0,15  $\mu$ l de *Taq* polimerase (5 U/ $\mu$ L) e Água Mili-Q estéril com quantidade suficiente para 25  $\mu$ l. Essa mistura foi submetida a ciclos de PCR (Tabela 2) em termociclador [MJ research, PTC-200 (Pertier thermal cycler)].

Para verificar se as quantidades de produtos da RT (cDNA) submetidas à amplificação por PCR foram as mesmas para as diferentes condições [Estádio III (controle e tratamento salino); Estádio VIII (controle e tratamento salino)], foi feita a amplificação do gene da actina (controle constitutivo). A mistura de reação continha 1  $\mu$ l de produto de RT (cDNA), 1  $\mu$ l de dNTPs a 5 mM, 5  $\mu$ l de Tampão 5x (tampão Tris-HCl a 250 mM, NaCl a 250 mM, MgCl a 25 mM e BSA a 0,5  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l de Actina F (40 pmoles em 1  $\mu$ L da solução estoque), 0,5  $\mu$ l de Actina R (40 pmoles em 1  $\mu$ L da solução estoque) 0,15  $\mu$ l de *Taq* polimerase (5 U/ $\mu$ L) e Água Mili-Q estéril com quantidade suficiente para 25  $\mu$ l. Essa

**Tabela 2-** Programa de PCR usado para amplificação do(s) gene(s) da  $\beta$ -galactosidase de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
<b>30 ciclos</b>		
Desnaturação	95	4 minutos
	95	1 minuto
Anelamento	53	1 minuto
Alongamento	72	2 minutos
Extensão	72	5 minutos
Armazenamento	4	indefinido

mistura foi submetida a ciclos de PCR descritos na Tabela 3 num termociclador [MJ research, PTC-200 (Pertier thermal cycler)].

**Tabela 3-** Programa de PCR usado para amplificação do(s) gene(s) da actina (controle constitutivo)

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
<b>30 ciclos</b>		
Desnaturação	94	3 minutos
	94	1 minuto
Anelamento	55	1 minuto
Alongamento	72	30 segundos
Extensão	72	5 minutos
Armazenamento	4	indefinido

### 3.14.7. Eletroforese do cDNA amplificado de $\beta$ -galactosidase

A eletroforese para detecção das bandas correspondentes aos cDNAs de  $\beta$ -galactosidases de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba, foi realizada em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE pH 8,0. Foram aplicados no

gel 10  $\mu\text{L}$  do produto da RT-PCR para uma melhor visualização das bandas. A migração foi feita utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua Bio Rad (Power - pac 300) com amperagem constante de 50 mA por, aproximadamente, 60 minutos à temperatura de 25°C. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por, aproximadamente, 15 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta. O gel foi fotografado em um sistema de imagem de gel (Labortechnik-Alemanha). A densidade das bandas foi analisada com o programa Scion Image Release beta 3b (Scion Corporation, USA) (COSTA *et al.*, 2007).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Grau de pureza da preparação de parede celular

Para se certificar que o extrato contendo proteínas associadas à parede celular, não continha proteínas citosólicas e nem vacuolares em quantidades que comprometessem a eficiência do processo de purificação, foi feita a determinação das atividades das enzimas desidrogenase da glucose-6-fosfato (marcadora de citosol) e fosfatase ácida (marcadora de vacúolo) nos dois extratos (citosólico e de parede celular). Após as determinações, verificou-se que não havia atividade da desidrogenase da glucose-6-fosfato no extrato de parede celular e que o percentual de atividade da fosfatase ácida representava apenas 4,6% da atividade total determinada no extrato bruto citosólico. Deste modo, esses resultados garantiram que realmente não havia a presença de proteínas citosólicas e vacuolares nas proteínas associadas à parede celular já que o percentual de 4,6% de atividade da fosfatase ácida está dentro do limite aceitável, que é de 5%. Esse mesmo procedimento foi utilizado por Gómez *et al.* (1995) para garantir que o fluido extracelular de células de hipocótilos de feijão-de-corda não estava contaminado com proteínas citoplasmáticas, o que permitiu obter um fluido extracelular com apenas 1,5 e 1,4% de contaminação com proteínas citosólicas e vacuolares, respectivamente.

### 4.2. Purificação de $\beta$ -galactosidases

#### 4.2.1. Fracionamento com sulfato de amônio

As frações contendo proteínas citosólicas apresentaram quase toda a atividade  $\beta$ -galactosidásica na faixa de 20-80%, enquanto as frações contendo proteínas da parede celular apresentaram a maior parte da atividade na faixa de 40-100% (Tabela 4).

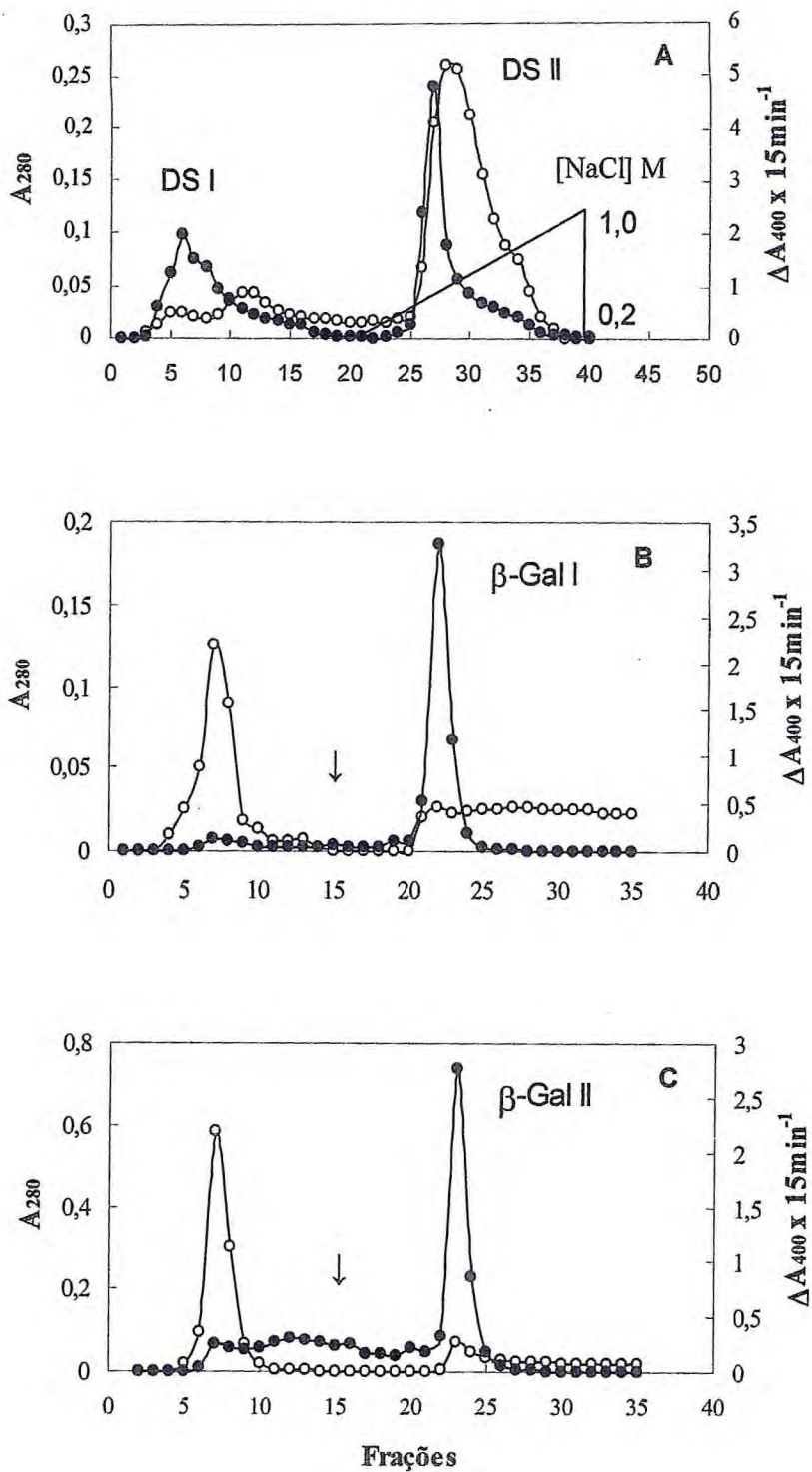
#### 4.2.2. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex

As frações 20-80% (F<sub>20-80</sub>) obtidas a partir da extração de proteínas citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII, sob condições controle e de estresse salino foram submetidas a cromatografias de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50. Como pode ser visto nas Figuras 5A, 6A, 7A e 8A, os perfis cromatográficos revelaram a existência de dois picos de proteína (A<sub>280</sub>), sendo um não-retido (DS I) e outro adsorvido à DEAE-Sephadex (DS II). Tanto os picos DS I quanto os DS II apresentaram atividade  $\beta$ -galactosidásica. Os picos DS I da DEAE-Sephadex mostraram purificação de 8,6, 36,5, 10,1 e 24,5 para as amostras de F<sub>20-80</sub> dos estádios III (tratamentos

Tabela 4- Fracionamento com sulfato de amônio dos extratos brutos contendo proteínas citosólicas\* e presentes na parede celular\*\*.

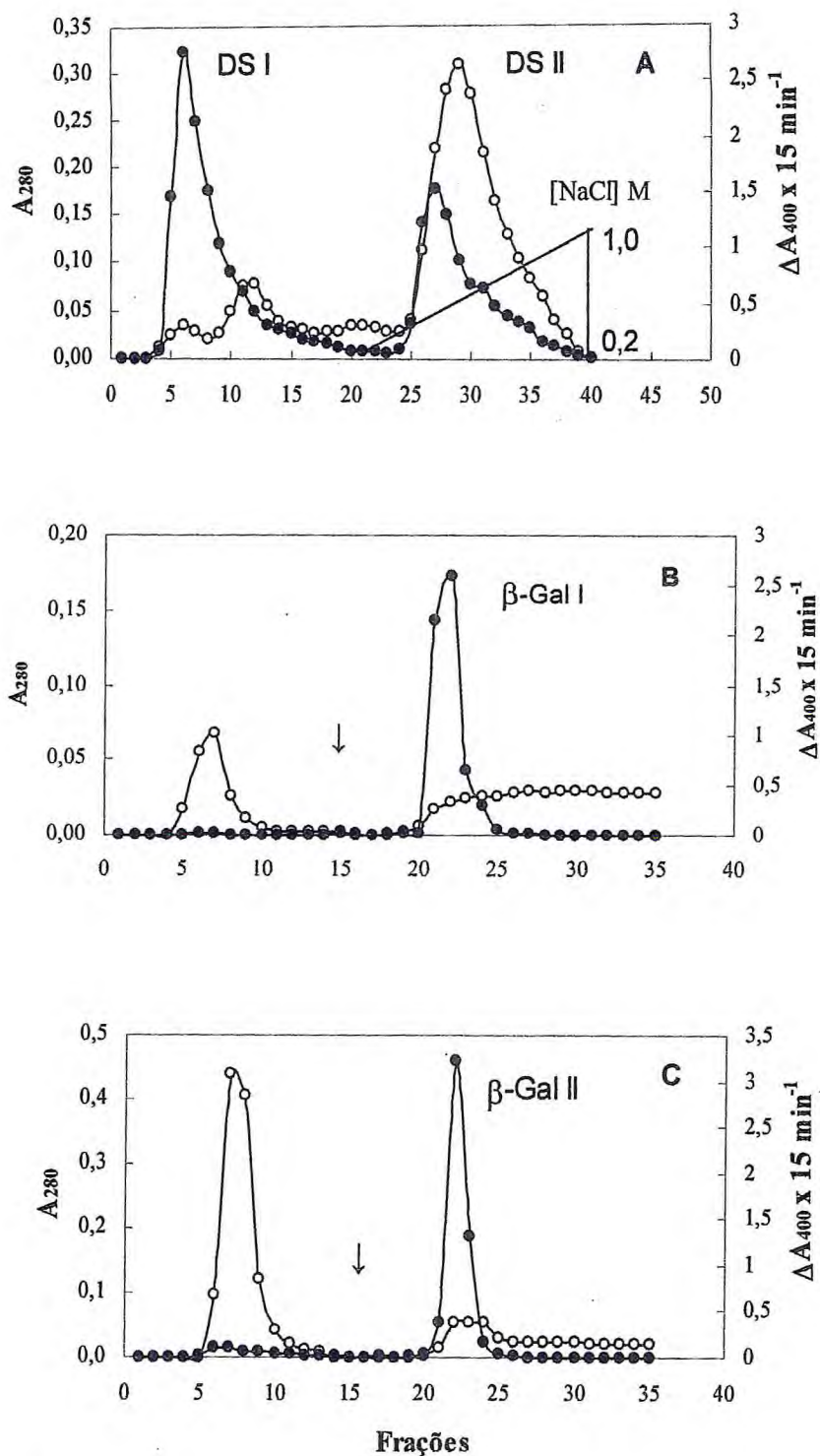
Fração	Volume (mL)	Atividade Total (UA x h <sup>-1</sup> )	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (UA x mg <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Purificação (X)
<b>Proteínas citosólicas</b>						
Extrato Bruto	98,8	1.067.040	35,2	30.313	100	1
F <sub>0-20</sub>	12,2	13.859	0,6	23.098	1,29	0,76
F <sub>20-40</sub>	11,5	65.504	5,3	12.359	6,13	0,40
F <sub>40-60</sub>	12,8	707.788	15,5	45.663	66,33	1,50
F <sub>60-80</sub>	12,6	119.548	6,2	19.281	11,20	0,63
F <sub>80-100</sub>	14,0	212	0,4	530	0,02	0,01
<b>Proteínas da parede celular</b>						
Extrato Bruto	80,0	124.416	2,43	51.200	100	1
F <sub>0-20</sub>	12,5	2.010	0,19	10.578	1,61	0,20
F <sub>20-40</sub>	10,5	966	0,13	7.430	0,77	0,14
F <sub>40-60</sub>	15,4	9.363	0,44	21.279	7,52	0,41
F <sub>60-80</sub>	15,0	18.480	0,54	34.222	14,85	0,66
F <sub>80-100</sub>	12,3	5.274	0,23	22.930	4,23	0,44

\* Fração escolhida: F<sub>20-80%</sub> ; \*\*Fração escolhida: F<sub>40-100%</sub>

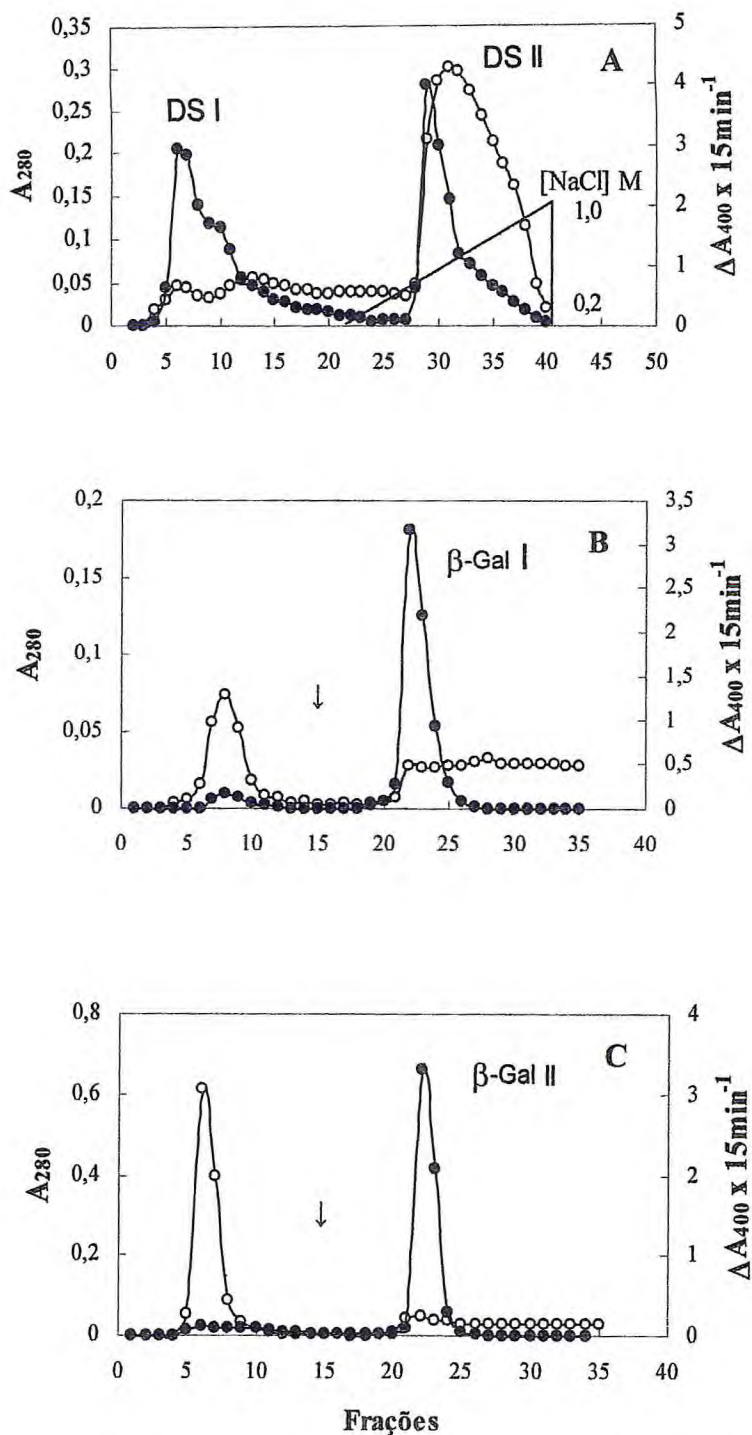


**Figura 5-** Purificação de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento III provenientes do tratamento controle. A. Cromatografia em DEAE-Sephadex da fração rica em atividade  $\beta$ -galactosidásica (F<sub>20-80</sub>). B. e C. Cromatografias de afinidade em Lactosil-Sepharose de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas dos picos não-retido (DS I) e retido (DS II) de DEAE-Sephadex, respectivamente. Proteína ( $A_{280}$  o—o) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  ●—●). A seta representa o início da adição do tampão de eluição contendo lactose 100 mM e NaCl 0,5 M.

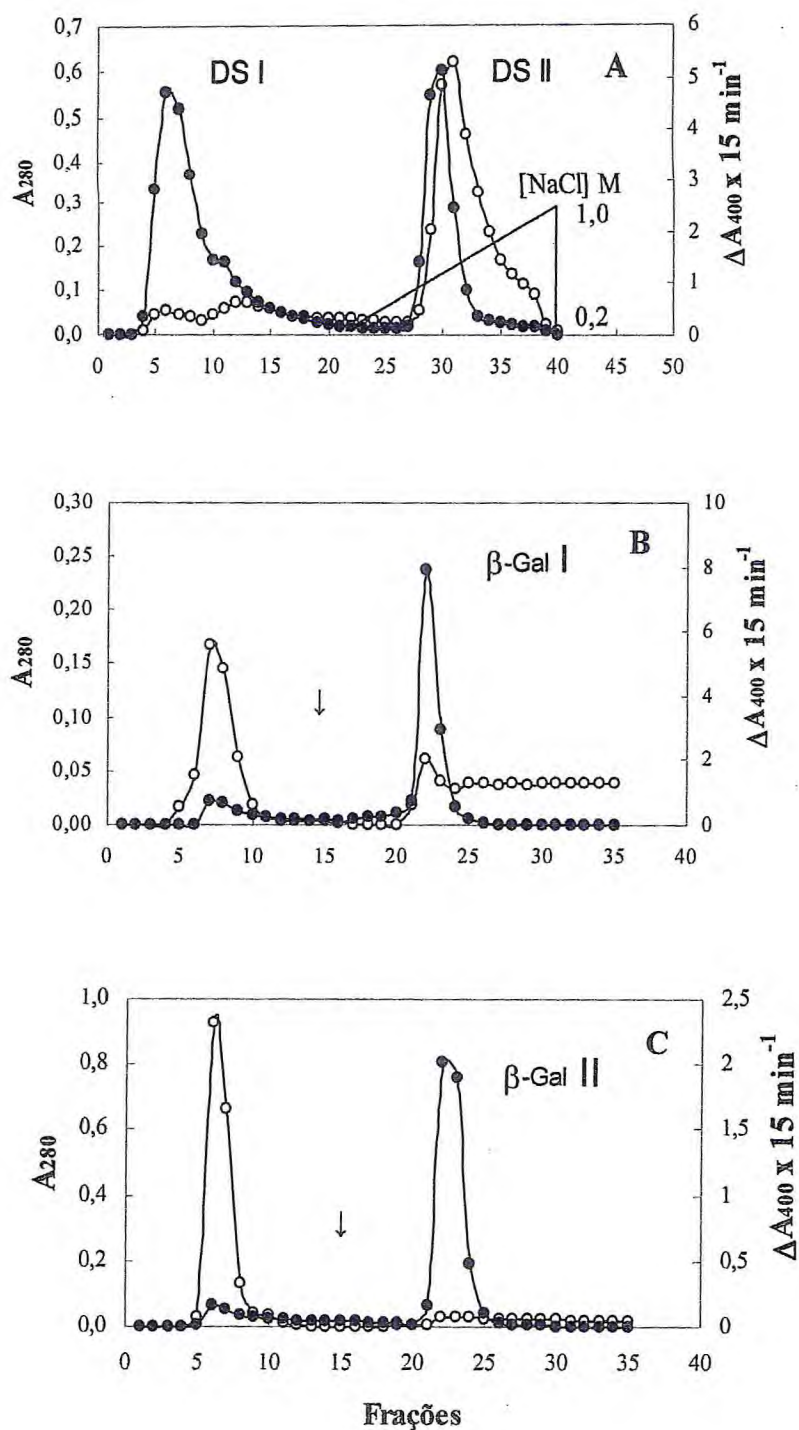




**Figura 6-** Purificação de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento III provenientes do tratamento salino. **A.** Cromatografia em DEAE-Sephadex da fração rica em atividade  $\beta$ -galactosidásica (F<sub>20-80</sub>). **B.** e **C.** Cromatografias de afinidade em Lactosil-Sepharose de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas dos picos não-retido (DS I) e retido (DS II) de DEAE-Sephadex, respectivamente. Proteína ( $A_{280}$  o—o) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  ●—●). A seta representa o início da adição do tampão de eluição contendo lactose 100 mM e NaCl 0,5 M.



**Figura 7-** Purificação de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento VIII provenientes do tratamento controle. **A.** Cromatografia em DEAE-Sephadex da fração rica em atividade  $\beta$ -galactosidásica (F<sub>20-80</sub>). **B.** e **C.** Cromatografias de afinidade em Lactosil-Sepharose de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas dos picos não-retido (DS I) e retido (DS II) de DEAE-Sephadex, respectivamente. Proteína ( $A_{280}$  o—o) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{min}^{-1}$  ●—●). A seta representa o início da adição do tampão de eluição contendo lactose 100 mM e NaCl 0,5 M.



**Figura 8-** Purificação de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento VIII provenientes do tratamento salino. **A.** Cromatografia em DEAE-Sephadex da fração rica em atividade  $\beta$ -galactosidásica (F<sub>20-80</sub>). **B.** e **C.** Cromatografias de afinidade em Lactosil-Sepharose de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas dos picos não-retido (DS I) e retido (DS II) de DEAE-Sephadex, respectivamente. Proteína ( $A_{280}$  o—o) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  ●—●). A seta representa o início da adição do tampão de eluição contendo lactose 100 mM e NaCl 0,5 M.

controle e salino) e VIII (tratamentos controle e salino), respectivamente (Tabela 8). Para os mesmos estádios de desenvolvimento e respectivos tratamentos – III (controle), III (salino), VIII (controle) e VIII (salino) – os picos DS II tiveram purificação de 0,7, 1,3, 1,5 e 2,4 vezes, respectivamente (Tabela 5).

#### 4.2.3. Cromatografia de afinidade em Lactosil-sepharose

Os picos com atividade  $\beta$ -galactosidásica resultantes das cromatografias em DEAE-sephadex (DS I e DS II) foram submetidos a cromatografias de afinidade em Lactosil-sepharose. A aplicação do pico DS I na coluna de afinidade resultou em um grande pico protéico ( $A_{280}$ ) não-retido na coluna com atividade  $\beta$ -galactosidásica residual que não foi utilizado para análises posteriores. Por outro lado, o pico retido, denominado  $\beta$ -gal I, apresentou quase toda a atividade  $\beta$ -galactosidásica. Esse perfil foi o mesmo para todas as condições estudadas (estádios III e VIII e tratamentos controle e salino) (Figuras 5B, 6B, 7B e 8B). Esses picos retidos com atividade  $\beta$ -galactosidásica apresentaram purificação de 366,4, 42,8, 133,5 e 27,9 vezes nos respectivos estádios de desenvolvimento e tratamentos já descritos (III controle, III salino, VIII controle e VIII salino) (Tabela 5). Quando os picos DS II foram aplicados à cromatografia de afinidade, o perfil cromatográfico nos dois estádios de desenvolvimento e nos tratamentos estudados, da mesma forma que o perfil de DS I, também resultou em dois picos em  $A_{280}$ , um não-retido, bem evidente, mas com uma atividade  $\beta$ -galactosidásica muito baixa que não foi usado nas análises, e o outro retido, que apresentou quase toda a atividade  $\beta$ -galactosidásica chamado de  $\beta$ -gal II (Figuras 5C, 6C, 7C e 8C). A  $\beta$ -gal II foi purificada 30,3, 174,7, 21,4 e 102,4 vezes nos estádios de desenvolvimento III nos tratamentos controle e salino, e VIII nos tratamentos controle e salino, respectivamente (Tabela 5). A Tabela 5 mostra que no estágio de desenvolvimento III, mesmo com uma quantidade maior de proteína em condições de salinidade (0,33 mg) do que em condições controle (0,05 mg), a  $\beta$ -gal I mostrou uma menor atividade no tratamento salino (200.385 UA x h<sup>-1</sup>) do que no controle (262.933 UA x h<sup>-1</sup>), indicando que o NaCl retarda a expressão da enzima  $\beta$ -gal I. Pode-se observar também que o aumento da atividade específica da  $\beta$ -gal II na presença de salinidade no estágio de desenvolvimento III se deve a uma redução no teor de proteína (reduz de 0,65 mg para 0,09 mg) e não a um aumento da atividade enzimática, indicando que a salinidade pode afetar a síntese protéica. Pode-se inferir que a salinidade, no estágio III, reduz a atividade da  $\beta$ -gal II porque afeta a expressão gênica da mesma. No estágio de desenvolvimento VIII (Tabela 5) observa-se que a salinidade também reduz a atividade da  $\beta$ -gal I (de 453.696 para 154.272 UA x h<sup>-1</sup>) e da  $\beta$ -gal II (de 245.180 para 211.762 UA x h<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos com a  $\beta$ -gal I também indicam que a salinidade

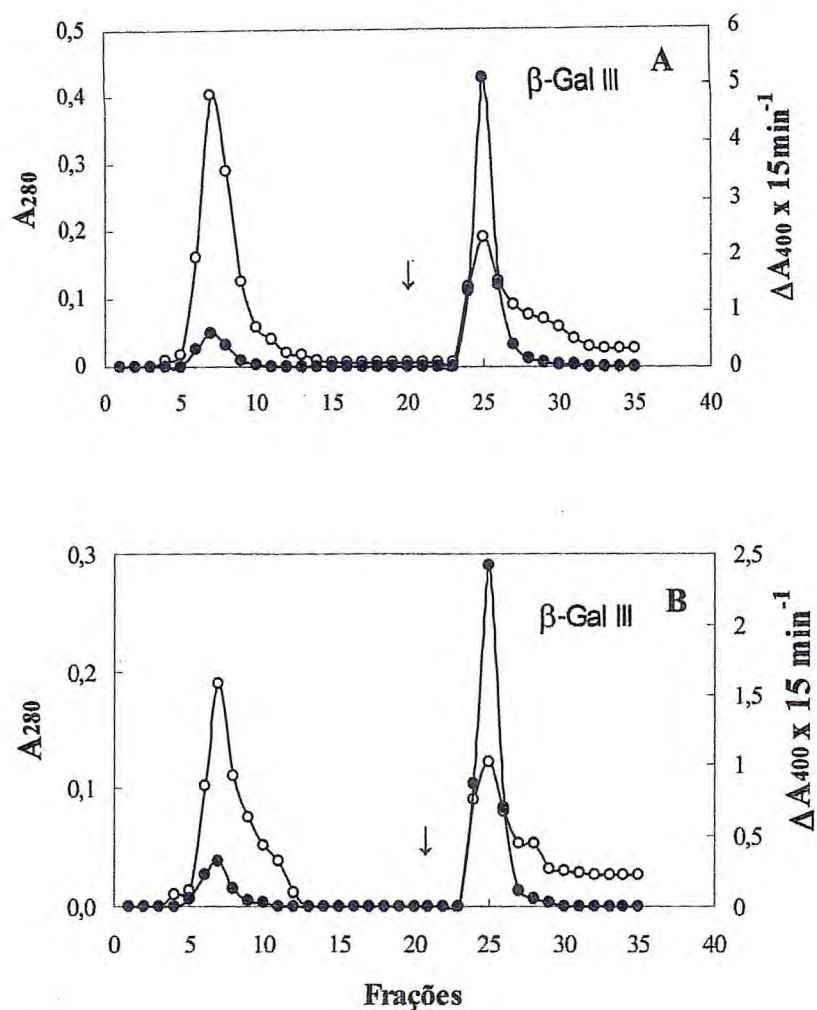
**Tabela 5-** Purificação de  $\beta$ -galactosidases citosólicas de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII em condições controle e tratamento salino (NaCl 100 mM)

Estádio de desenvolvimento III					
ETAPAS	Atividade (UA x h <sup>-1</sup> )	Proteína (mgP)	Atividade específica (UA x mgP <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> )	Recupe- ração (%)	Purifi- cação (X)
Condições controle (H <sub>2</sub> O destilada)					
Extrato bruto	2.725.440	189,92	14.350	100	1
F <sub>20-80</sub>	2.224.064	70,48	31.555	81,6	2,2
DS-I	605.532	4,90	123.578	22,2	8,6
DS-II	881.867	82,29	10.716	32,3	0,7
$\beta$ -gal I	262.933	0,05	5.258.660	9,6	366,4
$\beta$ -gal II	283.073	0,65	435.496	10,3	30,3
Tratamento salino (NaCl 100 mM)					
Extrato bruto	2.640.000	186,50	14.155	100	1
F <sub>20-80</sub>	1.615.680	92,80	17.410	61,2	1,2
DS-I	496.905	0,96	517.610	18,8	36,5
DS-II	389.252	20,28	19.193	14,7	1,3
$\beta$ -gal I	200.385	0,33	607.229	7,5	42,8
$\beta$ -gal II	222.638	0,09	2.473.755	8,4	174,7
Estádio de desenvolvimento VIII					
ETAPAS	Atividade (UA x h <sup>-1</sup> )	Proteína (mgP)	Atividade específica (UA x mgP <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> )	Recupe- ração (%)	Purifi- cação (X)
Condições controle (H <sub>2</sub> O destilada)					
Extrato bruto	3.003.000	194,4	15.447	100	1
F <sub>20-80</sub>	2.966.080	106,4	27.876	98,7	1,8
DS-I	1.174.333	7,5	156.577	39,1	10,1
DS-II	744.785	31,5	23.643	24,8	1,5
$\beta$ -gal I	453.696	0,22	2.062.255	15,1	133,5
$\beta$ -gal II	245.180	0,74	331.324	8,1	21,4
Tratamento salino (NaCl 100 mM)					
Extrato bruto	2.714.400	118,2	22.964	100	1
F <sub>20-80</sub>	2.037.504	51,8	39.334	75,0	1,7
DS-I	621.209	1,1	564.736	22,8	24,5
DS-II	629.562	11,4	55.224	23,1	2,4
$\beta$ -gal I	154.272	0,24	642.803	5,6	27,9
$\beta$ -gal II	211.762	0,09	2.352.920	7,8	102,4

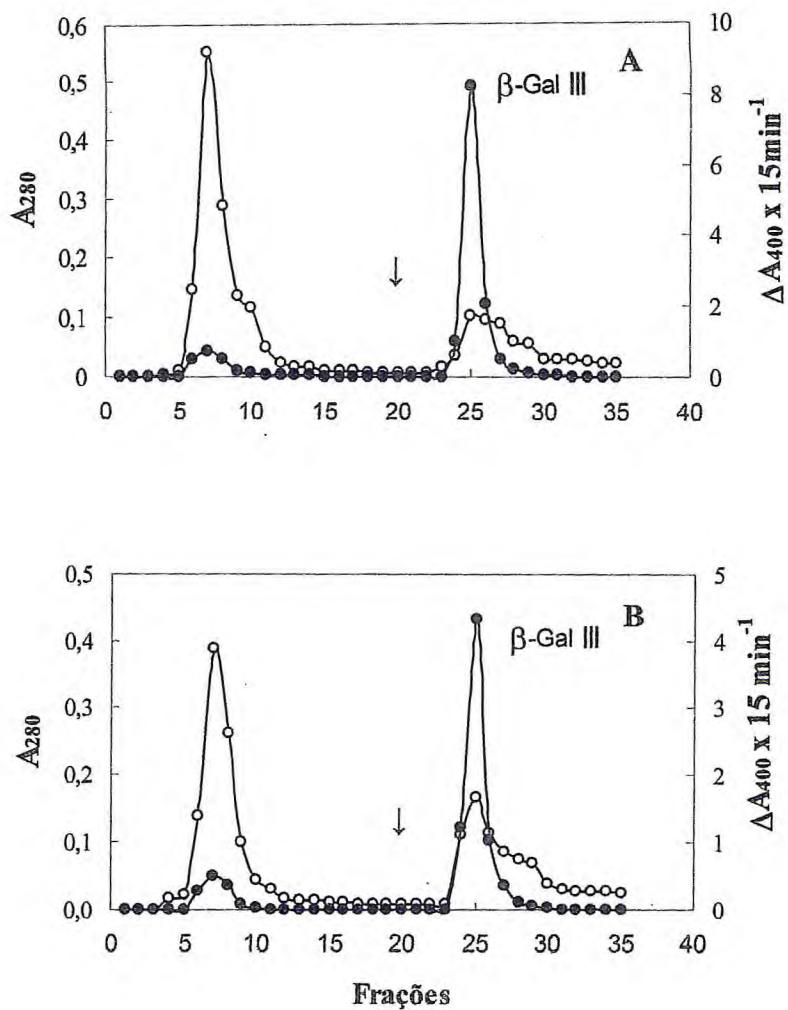
redução da atividade específica se deve à diminuição da atividade enzimática na presença da salinidade. Observa-se que há uma forte redução da proteína total na presença de NaCl (reduz de 0,74 mg para 0,09 mg), indicando que a salinidade afeta a síntese protéica, sendo a redução desta, responsável pelo aumento da atividade específica da  $\beta$ -gal II no tratamento salino. Portanto, esses resultados indicam que as  $\beta$ -gal I e II dos dois estádios de desenvolvimento analisados (III e VIII) parecem ter uma redução nas suas atividades devido a uma alteração na expressão gênica causada pela salinidade.

As frações 40-100% ( $F_{40-100}$ ), obtidas a partir da extração de proteínas associadas à parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII semeadas em condições controle e de salinidade foram aplicadas à coluna de afinidade Lactosil-Sepaharose. Como pode ser visto nas Figuras 9 e 10, os perfis cromatográficos revelaram a existência de um pico de proteína ( $A_{280}$ ) não-retido, com atividade  $\beta$ -galactosidásica residual que não foi utilizado em análises posteriores, e outro retido, com um percentual considerável de atividade  $\beta$ -galactosidásica em relação à quantidade que foi aplicada, denominado de  $\beta$ -gal III. Para se certificar que o processo de purificação de proteínas associadas à parede celular havia sido eficiente fez-se uma eletroforese aplicando-se a  $\beta$ -gal III e observou-se a presença de uma única banda protéica que correspondia à mesma banda com atividade  $\beta$ -galactosidásica, confirmando a eficiência do processo de purificação. Os detalhes dos perfis eletroforéticos das  $\beta$ -gal I, II e III serão descritos com detalhes em seguida no item 4.3. A  $\beta$ -gal III dos tratamentos controle e salino no estádio de desenvolvimento III foi purificada 49,0 e 13,8 vezes, respectivamente, e no estádio VIII, ela foi purificada 52,3 e 132,0 vezes, nos tratamentos controle e salino, respectivamente (Tabela 6). Pode-se observar na tabela 6 que a salinidade reduziu a atividade da  $\beta$ -gal III nos estádios de desenvolvimento III (baixou de 174.062 para 5.461 UA x h<sup>-1</sup>) e VIII (baixou de 59.418 para 12.108 UA x h<sup>-1</sup>). Contudo, observou-se também que houve uma redução nos teores de proteína de 0,23 mg para 0,04 mg e de 0,06 mg para 0,01 mg, nos estádios III e VIII, respectivamente, indicando que essa queda de atividade na presença de salinidade pode estar relacionada à inibição da síntese protéica, de forma semelhante ao que foi observado com as isoformas  $\beta$ -gal I e II.

Resultados observados por Sudério (2001) mostraram que houve uma correlação entre a redução do crescimento dos caules de plântulas de feijão-de-corda e a diminuição da atividade  $\beta$ -galactosidásica na presença de NaCl, tanto nas enzimas isoladas do citosol como nas provenientes da parede celular. No entanto, nesse trabalho, não se teve conhecimento se uma das causas da inibição e do retardamento do crescimento dos caules foi devido a um efeito do sal na atividade  $\beta$ -galactosidásica ou se houve uma alteração na expressão gênica



**Figura 9-** Purificação de  $\beta$ -galactosidasas de parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] nos estádios de desenvolvimento III provenientes dos tratamentos controle (A) e salino (B). Cromatografias de afinidade em Lactosil-Sepharose da fração rica em atividade  $\beta$ -galactosidásica (F<sub>40-100</sub>). Proteína ( $A_{280}$  o—o) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  ●—●). A seta representa o início da adição do tampão de eluição contendo lactose 100 mM e NaCl 0,5 M.



**Figura 10-** Purificação de  $\beta$ -galactosidasas de parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] nos estádios de desenvolvimento VIII provenientes dos tratamentos controle (A) e salino (B). Cromatografias de afinidade em Lactosil-Sepharose da fração rica em atividade  $\beta$ -galactosidásica (F<sub>40-100</sub>). Proteína ( $A_{280}$  o—o) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  ●—●). A seta representa o início da adição do tampão de eluição contendo lactose 100 mM e NaCl 0,5 M.



**Tabela 6-** Purificação de  $\beta$ -galactosidases presentes na parede celular de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII em condições controle e tratamento salino (NaCl 100 mM)

<b>Estádio de desenvolvimento III</b>					
<b>ETAPAS</b>	<b>Atividade (UA x h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Proteína (mgP)</b>	<b>Atividade específica (UA x mgP<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Purificação (X)</b>
<b>Condições controle (H<sub>2</sub>O destilada)</b>					
Extrato bruto	521.400	33,8	15.426	100	1
F <sub>40-100</sub>	334.336	15,5	21.570	64,1	1,4
$\beta$ -gal III	174.062	0,23	756.791	33,3	49,0
<b>Tratamento salino (NaCl 100 mM)</b>					
Extrato bruto	210.296	21,4	9.826	100	1
F <sub>40-100</sub>	7.776	0,80	9.720	3,7	0,9
$\beta$ -gal III	5.461	0,04	136.525	2,5	13,8
<b>Estádio de desenvolvimento VIII</b>					
<b>ETAPAS</b>	<b>Atividade (UA x h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Proteína (mgP)</b>	<b>Atividade específica (UA x mgP<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Purificação (X)</b>
<b>Condições controle (H<sub>2</sub>O destilada)</b>					
Extrato bruto	209.040	11,04	18.934	100	1
F <sub>40-100</sub>	84.014	3,87	21.709	40,1	1,1
$\beta$ -gal III	59.418	0,06	990.300	28,4	52,3
<b>Tratamento salino (NaCl 100 mM)</b>					
Extrato bruto	205.440	22,4	9.171	100	1
F <sub>40-100</sub>	21.200	0,69	30.724	10,3	3,3
$\beta$ -gal III	12.108	0,01	1.210.800	5,9	132,0

dessas enzimas causada pela salinidade. Procedimentos de purificação semelhantes foram observados em alguns trabalhos (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001; LI *et al.*, 2001). As etapas de purificação de múltiplas formas de  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba envolveram fracionamento com sulfato de amônio, precipitação ácida e cromatografias de troca iônica em DEAE-Sephadex e de afinidade em Lactosil-Sepharose. Esse processo de purificação originou três isoformas de  $\beta$ -galactosidase que foram purificadas 5, 509 e 62 vezes (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000). Empregando-se o mesmo procedimento, três isoformas da enzima  $\beta$ -galactosidase foram isoladas e purificadas a partir de cotilédones de sementes quiescentes dos cultivares Vita 3 e Vita 5 de *Vigna unguiculata*, as quais foram purificadas 7, 53 e 16 vezes no cultivar Vita 3, e 3, 21 e 12 vezes no cultivar Vita 5 (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2001). Três isoformas de  $\beta$ -galactosidase foram isoladas e purificadas de cotilédones de plântulas de *Vigna radiata* com cinco dias após a semeadura. Com o

procedimento de purificação, que envolveu precipitação ácida, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias em DEAE-Celulose e ConA-Sepharose, as enzimas foram purificadas 690, 1.650 e 1.660 vezes (LI *et al.*, 2001).

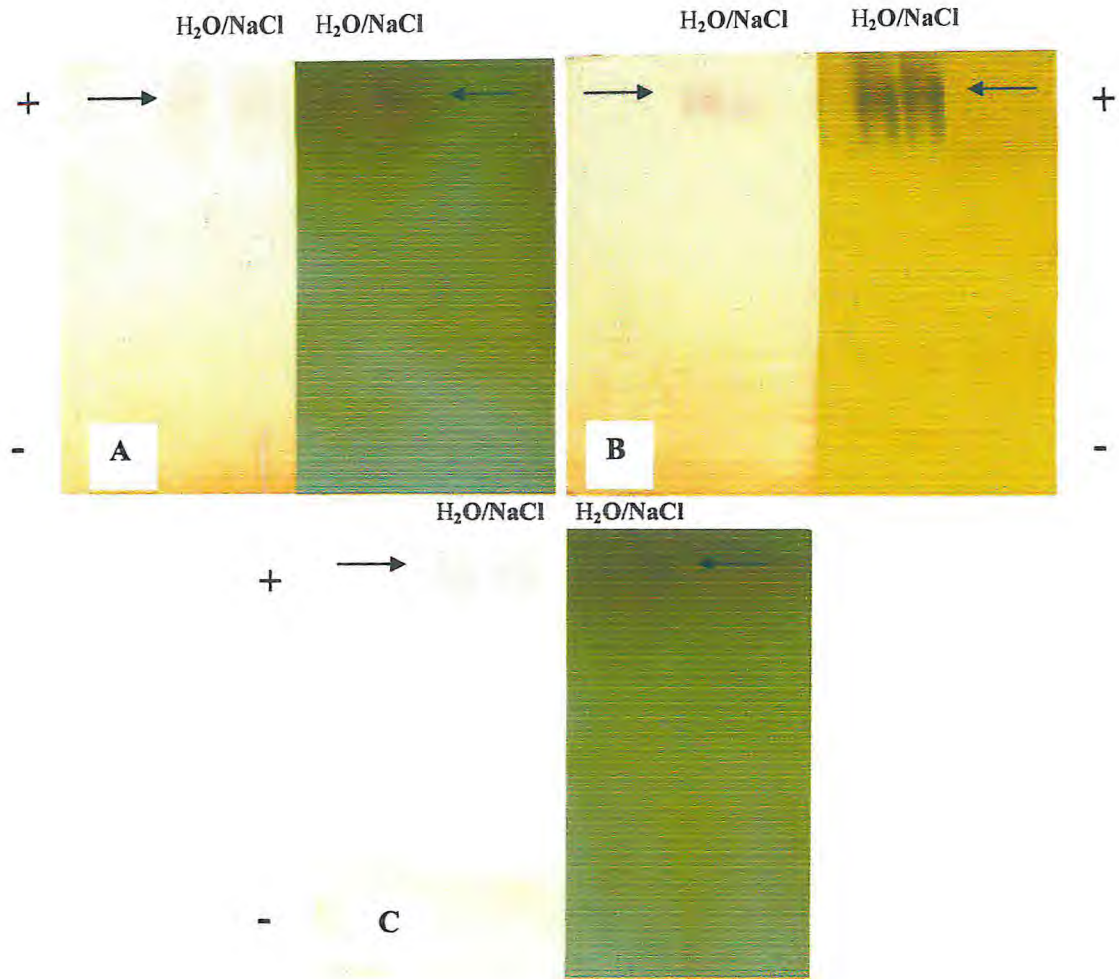
#### 4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-nativa) em condições ácidas

A eletroforese para análise das  $\beta$ -gal I, II e III foi feita em gel de poliacrilamida (gradiente de 5-15%), em condições nativas e em pH ácido. Essa metodologia de eletroforese em gel ácido é específica para proteínas básicas, com pontos isoelétricos (pI) acima de 7,0. Como foi observado em alguns trabalhos (SIMOS *et al.*, 1989; ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001; BALASUBRANIAM *et al.*, 2005), grande parte das isoformas de  $\beta$ -galactosidase isoladas de espécies vegetais são básicas, com pI acima de 7,0. Por esse motivo, associado ao fato de o pH ótimo de todas as  $\beta$ -galactosidase estudadas nesse trabalho ser igual a 4,0, utilizou-se essa metodologia. A análise eletroforética feita nesse gel ácido mostrou que a  $\beta$ -gal II e a  $\beta$ -gal III apresentaram uma única banda protéica (revelada com nitrato de prata) que correspondeu à mesma banda com atividade  $\beta$ -galactosidásica (revelada por coramento específico) (Figura 11). Esse mesmo perfil eletroforético foi observado em caules de plântulas nos estádios de desenvolvimento III e VIII dos tratamentos controle e salino. Resultado semelhante foi observado por Biswas *et al.* (2003) em  $\beta$ -galactosidases de *Phaseolus vulgaris*. Usando essa mesma metodologia, os autores purificaram uma  $\beta$ -galactosidase cerca de 90 vezes e também observaram uma única banda de proteína que correspondia à única banda revelada no coramento de atividade. No entanto, devido a pouca quantidade de proteína e de atividade enzimática em  $\beta$ -gal I, a revelação de proteína com prata bem como a determinação da atividade enzimática não foi eficaz, não sendo possível identificar bandas dessa  $\beta$ -galactosidase em gel de poliacrilamida.

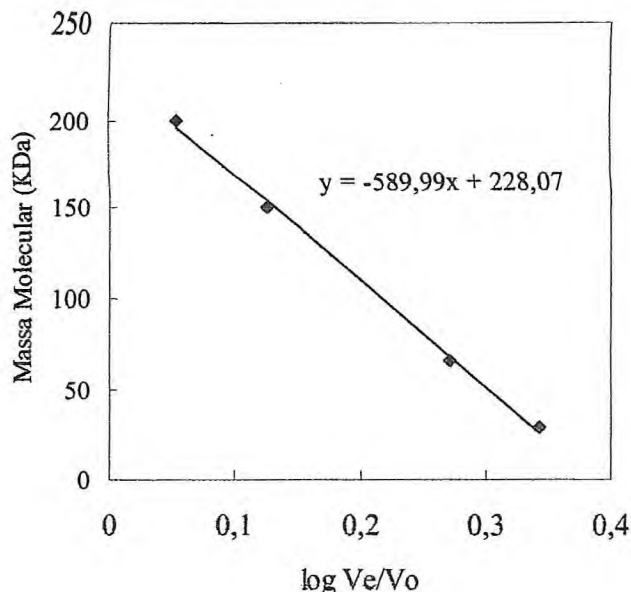
#### 4.4. Caracterização das $\beta$ -galactosidases purificadas

##### 4.4.1. Determinação da massa molecular

Após a calibração da coluna de Sephadex G-150 com os marcadores de massa molecular, verificou-se que o volume de exclusão da coluna ( $V_0$ ), determinado pela aplicação do “Blue dextrana” (2.000 kDa), foi de 36,0 mL. Os volumes de eluição dos marcadores  $\beta$ -amilase (200 kDa), desidrogenase alcoólica (150 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa), foram respectivamente, 40,8 mL, 48,0 mL, 67,2 mL e 79,2 mL (Figura 12). Para a determinação das massas moleculares das  $\beta$ -gal I, II e III, as frações



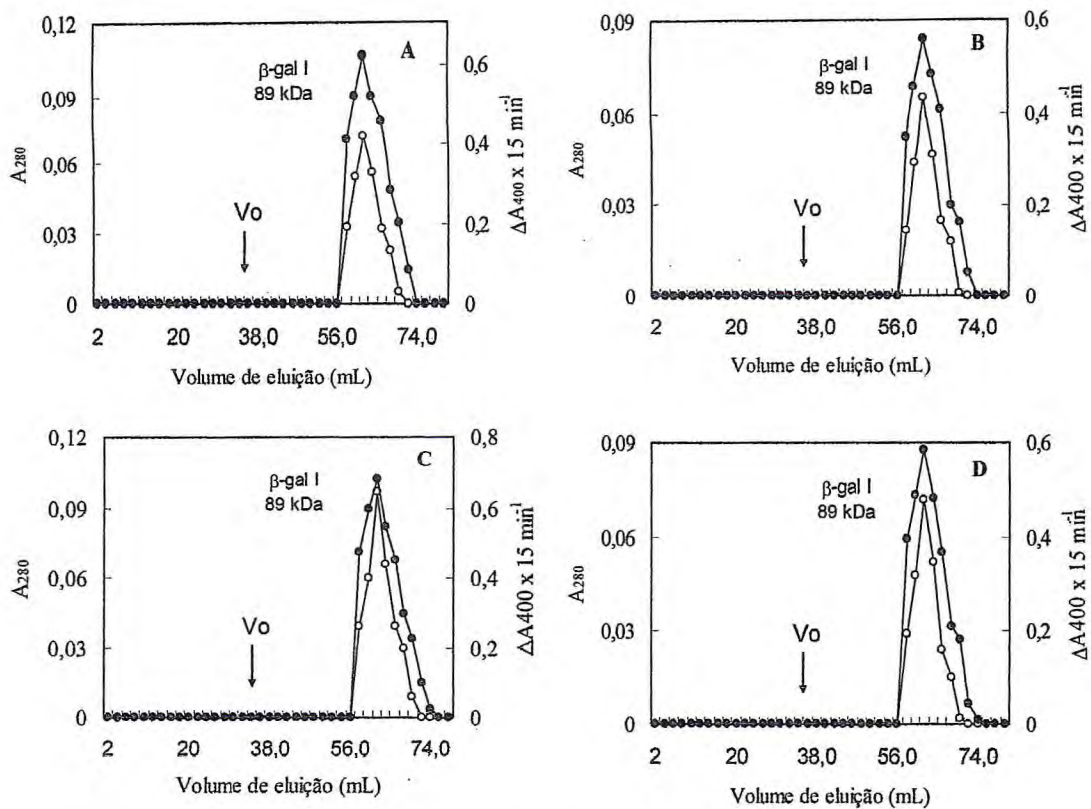
**Figura 11-** Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (gradiente 5-15%), em pH ácido. As setas indicam as bandas referentes às  $\beta$ -galactosidases de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba. **A-**  $\beta$ -gal II (citossólica) do estágio de desenvolvimento III em condições controle e tratamento salino; **B-**  $\beta$ -gal II (citossólica) do estágio de desenvolvimento VIII em condições controle e tratamento salino; **C-**  $\beta$ -gal III (parede celular) do estágio de desenvolvimento VIII em condições controle e tratamento salino; O lado esquerdo dos géis representa o coramento específico de atividade  $\beta$ -galactosidásica. O lado direito do gel representa o coramento de proteína.



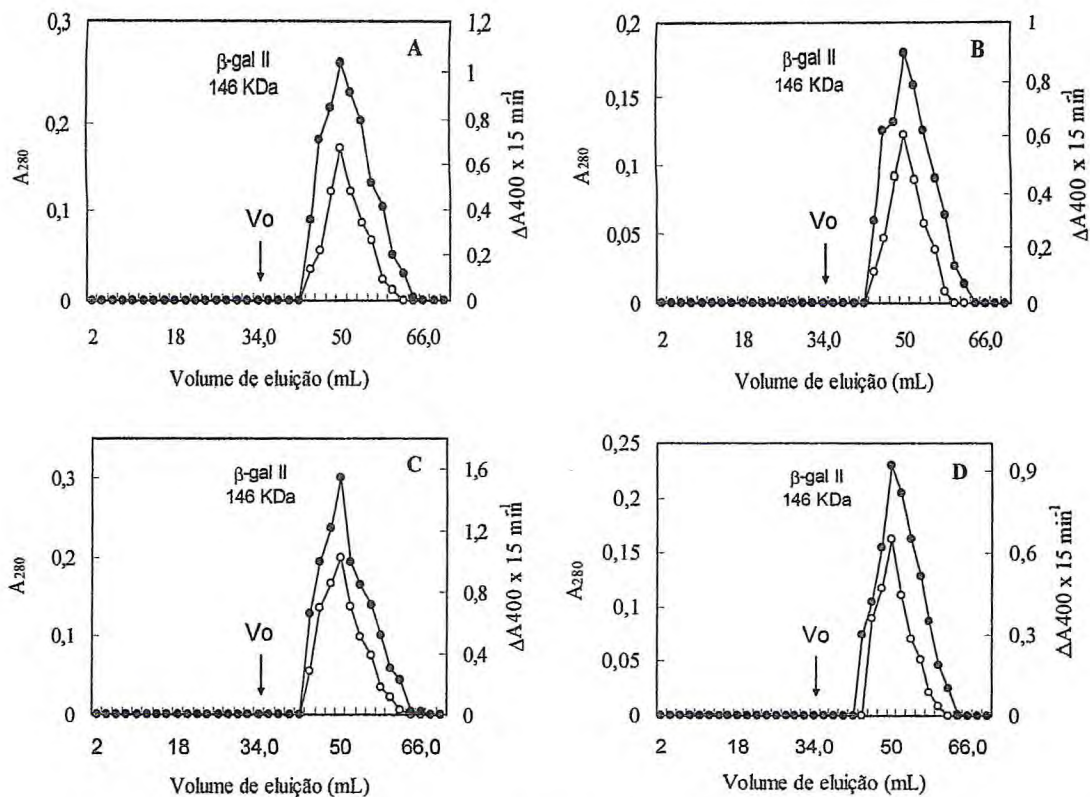
**Figura 12-** Calibração da coluna de Sephadex G-150. Os marcadores moleculares utilizados foram:  $\beta$ -amilase (PM = 200 kDa), desidrogenase alcoólica (50 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). A equação da reta foi utilizada para determinação das massas moleculares das amostras aplicadas.

oriundas das cromatografias de exclusão molecular (Sephadex G-150) foram monitoradas em  $A_{280}$  e usadas para ensaio de atividade  $\beta$ -galactosidásica. De acordo com o volume de eluição das amostras ( $V_e$ ), calculou-se a relação  $V_e/V_o$ . O logaritmo dessa relação ( $\log V_e/V_o$ ) foi aplicado à equação da reta obtida no gráfico de calibração com os padrões protéicos (Figura 12). As  $\beta$ -gal I, II e III apresentaram massas moleculares aparentes de 89 kDa (Figura 13), 146 kDa (Figura 14) e 124 kDa (Figura 15), respectivamente, em todas as condições estudadas (estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e de tratamento salino). Esses resultados mostram que não houve diferença entre as  $\beta$ -galactosidases no que diz respeito à idade fisiológica da planta (estádios III e VIII) nem à ausência ou presença de NaCl. Contudo, mostram que houve diferença de massa molecular entre as duas  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -gal I e II) e, entre elas e a da parede celular ( $\beta$ -gal III), o que é um forte indício de que essas enzimas são, de fato, de natureza distinta.

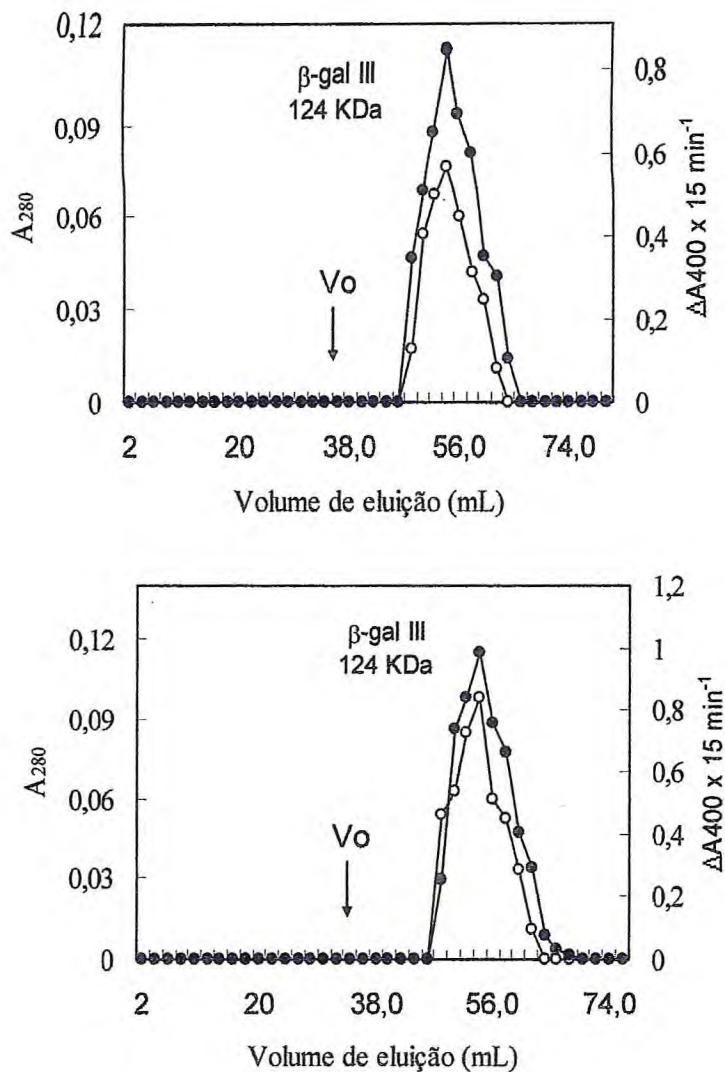
Uma  $\beta$ -galactosidase isolada de células de *Daucus carota* cultivadas em meio enriquecido com sacarose e regulador de crescimento teve a massa molecular aparente determinada em Sephadex G-200 em 104 kDa (KONNO *et al.*, 1986). Li *et al.* (2001), estimou a massa molecular de cinco isoformas de  $\beta$ -galactosidase isoladas de cotilédones de *Vigna radiata* através do volume de eluição em Sephacryl S-200. Esses autores verificaram que três das cinco isoformas apresentaram uma massa molecular aparente de 87 kDa, semelhante à massa molecular da  $\beta$ -gal I (89 kDa) estudada nesse trabalho, enquanto outras



**Figura 13-** Perfil de eluição em Sephadex G-150 para determinação da massa molecular de  $\beta$ -gal I de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III (A e B) e VIII (C e D), em condições controle (A e C) e tratamento salino (B e D). Proteína ( $A_{280}$  o—o) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  ●—●).



**Figura 14-** Perfil de eluição em Sephadex G-150 para determinação das massa molecular de  $\beta$ -gal II de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III (A e B) e VIII (C e D), em condições controle (A e C) e tratamento salino (B e D). Proteína ( $A_{280}$  ○—○) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  ●—●).



**Figura 15-** Perfil de eluição em Sephadex G-150 para determinação da massa molecular de  $\beta$ -gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III (A) e VIII (B), em condições controle. Proteína ( $A_{280}$  o—o) e atividade  $\beta$ -galactosidásica ( $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$  ●—●).

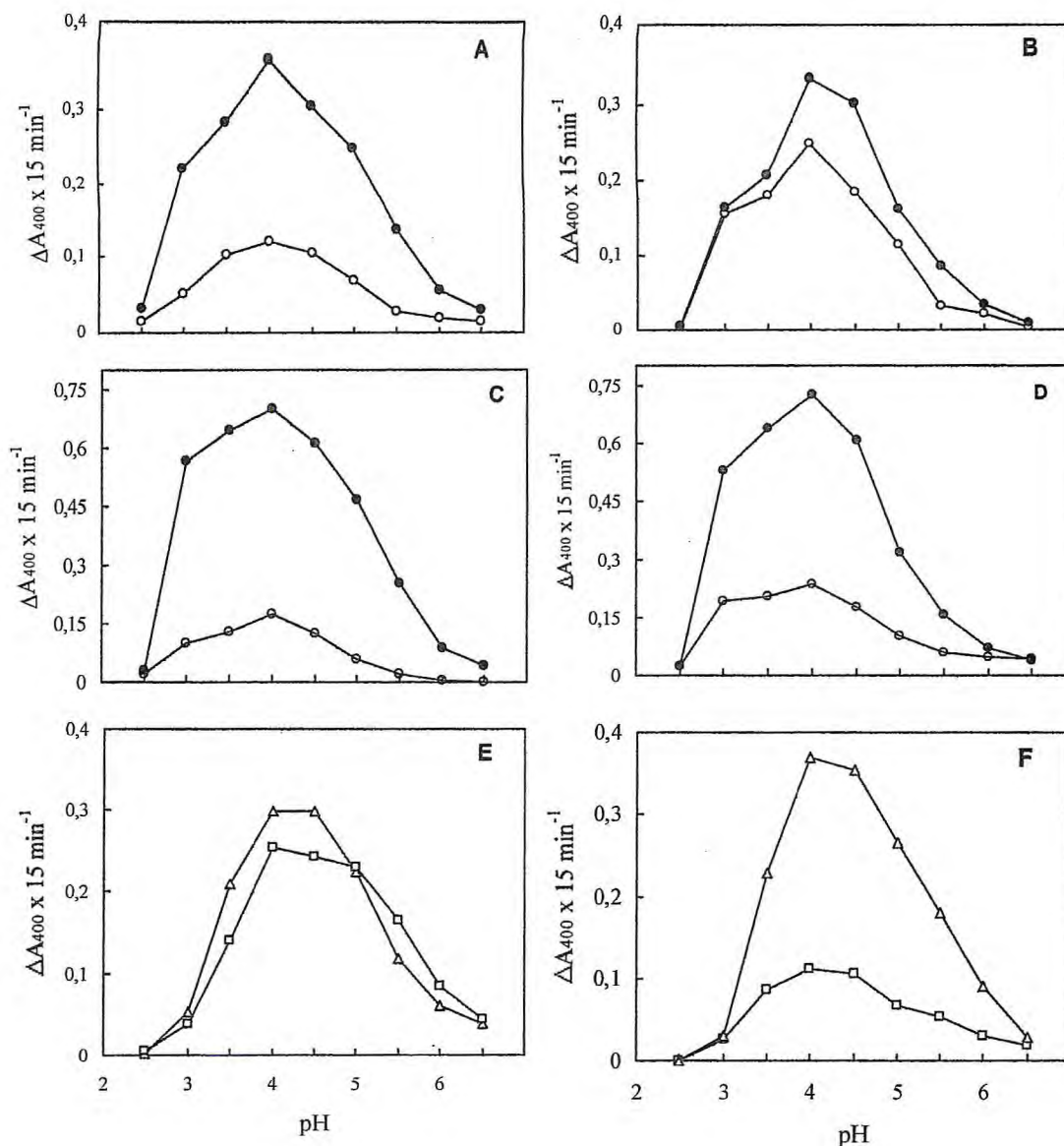
duas isoformas apresentaram massas moleculares aparentes de 45 e 73 kDa. Quatro isoformas de  $\beta$ -galactosidase isoladas do fruto de carambola tiveram suas massas moleculares estimadas em valores que variaram de 58 a 130 kDa (BALASUBRANIAM *et al.*, 2005). A massa molecular aparente de uma  $\beta$ -galactosidase isolada de cotilédone de *Phaseolus vulgaris*, determinada em coluna de filtração em gel Superdex G-75, foi de 75 kDa (BISWAS *et al.*, 2003). Uma isoforma de  $\beta$ -galactosidase cotiledonária da leguminosa *Hymenaea courbaril* teve sua massa molecular estimada em 62 kDa através de Sephacryl S-200 (ALCÂNTARA *et al.* 2006).

Todos esses estudos com  $\beta$ -galactosidases purificadas de plantas demonstram que isoformas dessas enzimas apresentam as mais variadas massas moleculares (KONNO *et al.*, 1986; LI *et al.*, 2001; BISWAS *et al.*, 2003; BALASUBRANIAM *et al.*, 2005; ALCÂNTARA *et al.* 2006).

#### 4.4.2. pH ótimo de atividade

Os estudos da atividade enzimática em  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -gal I e  $\beta$ -gal II) e presente na parede celular ( $\beta$ -gal III) em função do pH no meio de reação podem ser observados na Figura 16. Em todas as amostras analisadas, houve um aumento da atividade enzimática a partir do pH 2,5 até atingir um máximo de atividade em pH 4,0, havendo um decréscimo constante até pH 6,5. Essa faixa de pH ótimo de atividade para  $\beta$ -galactosidases é comum em uma ampla variedade de espécies vegetais, principalmente em leguminosas. Múltiplas formas de  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias de *Vigna unguiculata* apresentaram ótimos de pH entre 3,0 e 4,5 (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001). Li *et al.* (2001) demonstraram que isoformas de  $\beta$ -galactosidases isoladas de cotilédones de *Vigna radiata* apresentaram ótimos de pH entre 3,6 e 4,0. O ensaio da atividade enzimática de uma  $\beta$ -galactosidase purificada de sementes de *Kestingella geocarpa* em função do pH revelou um pH ótimo de 4,4 (CHILAKA *et al.*, 2002). Alcântara *et al.* (2006) trabalhando com  $\beta$ -galactosidases extraídas de cotilédones de plântulas *Hymenaea courbaril* mostrou que as enzimas do extrato bruto apresentaram pH ótimo de 3,0, mas quando as  $\beta$ -galactosidases purificadas foram analisadas, o pH ótimo foi entre 4,0 e 5,0. Esse mesmo pH ótimo de ensaio também foi encontrado para  $\beta$ -galactosidases isoladas de *Phaseolus vulgaris* (BISWAS *et al.*, 2003).





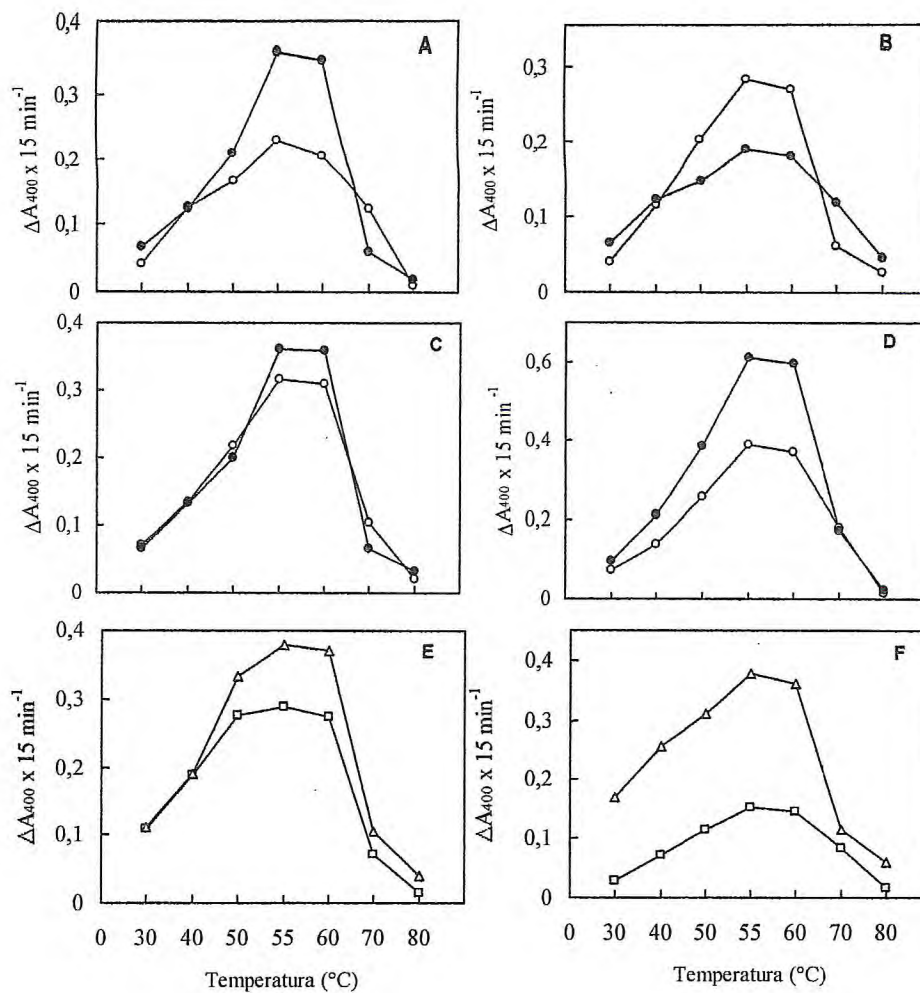
**Figura 16-** Atividade das  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -Gal I e  $\beta$ -Gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -Gal III) de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba em função do pH. Plântulas provenientes do tratamento controle (A, C e E) e tratamento salino (B, D e F). **Figuras A e B-** estágio de desenvolvimento III ( $\beta$ -Gal I,  $\circ$ — $\circ$ ;  $\beta$ -Gal II,  $\bullet$ — $\bullet$ ); **Figuras C e D-** estágio de desenvolvimento VIII ( $\beta$ -Gal I,  $\circ$ — $\circ$ ;  $\beta$ -Gal II,  $\bullet$ — $\bullet$ ); **Figuras E e F-**  $\beta$ -Gal III (estádio de desenvolvimento III,  $\square$ — $\square$ ; estágio de desenvolvimento VIII,  $\Delta$ — $\Delta$ ).

#### 4.4.3. Temperatura ótima de atividade

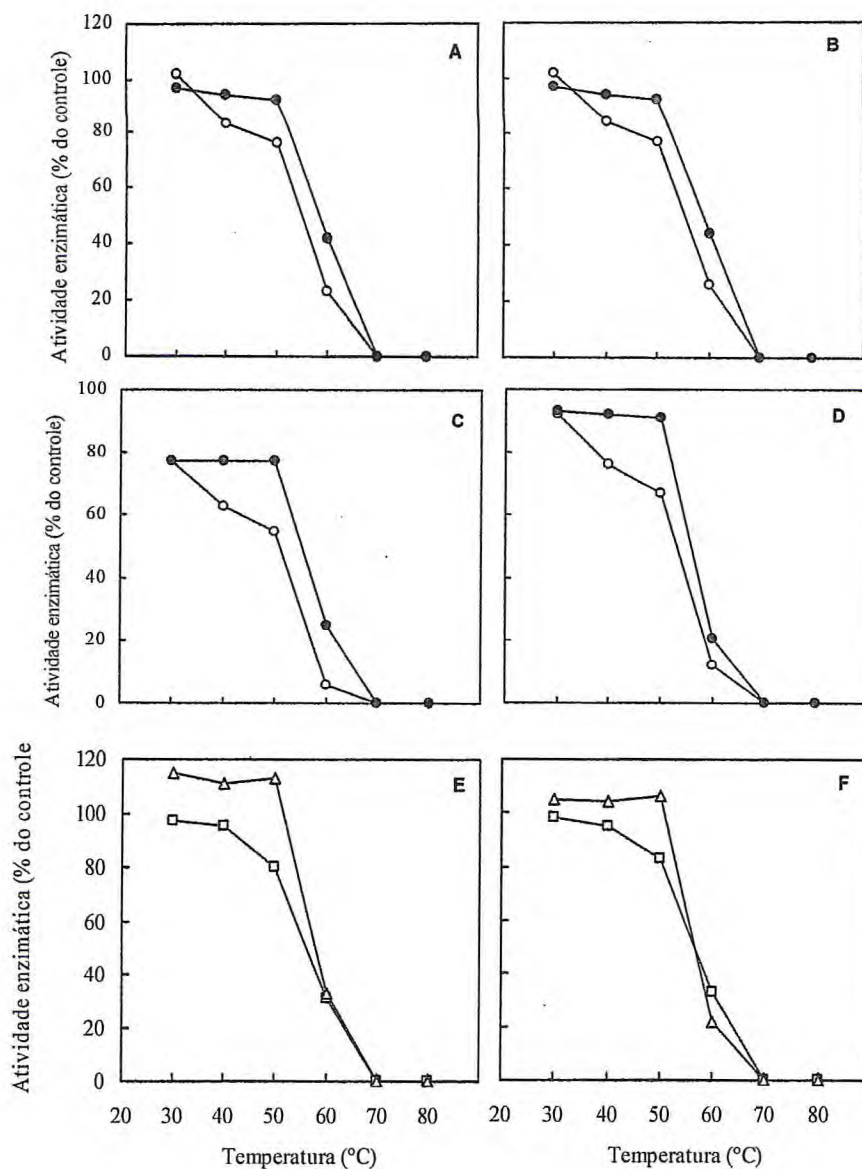
A temperatura ótima de ensaio para  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III foi de 55°C (Figura 17), havendo em todas elas, muito pouca diferença de atividade entre 55 e 60°C e uma queda considerável na atividade a partir de 70°C. No entanto, em  $\beta$ -gal I e  $\beta$ -gal II houve uma diferença de atividade considerável entre as temperaturas de 50 e 55°C, ao contrário de  $\beta$ -gal III, em que há muito pouca diferença de atividade entre essas temperaturas. Esses dados, assim como os dados de pH ótimo, evidenciam as diferenças de propriedades existentes entre as  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -gal I e  $\beta$ -gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -gal III). Contudo, esses dois parâmetros estudados (ótimos de pH e de temperatura) praticamente não mostram diferenças entre as enzimas purificadas de caules de plântulas semeadas em condições controle e em tratamento salino e nem entre os estádios III e VIII. A faixa de temperatura ótima de ensaio aqui observada se assemelha às encontradas em outras  $\beta$ -galactosidases purificadas de plantas (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001; LI *et al.*, 2001; CHILAKA *et al.*, 2002). Isoformas de  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias de *Vigna unguiculata* (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001) e de *Vigna radiata* (LI *et al.*, 2001) apresentaram temperaturas ótimas de ensaio em 60 e 55°C, respectivamente. O efeito da temperatura na atividade de  $\beta$ -galactosidases de cotilédones de *Kestingela geocarpa* também mostrou uma temperatura ótima de ensaio entre 55 e 60°C.

#### 4.4.4. Termoestabilidade

O estudo da termoestabilidade das enzimas  $\beta$ -gal I, II e III pode ser observado na Figura 18. Observa-se que em todos os casos, há uma leve queda ou praticamente não há redução na atividade quando as enzimas foram pré-incubadas com temperatura até 50°C. Observa-se também que a  $\beta$ -gal I mostrou uma maior sensibilidade à temperatura do que a  $\beta$ -gal II, apresentando redução na sua atividade já quando incubadas na temperatura de 40°C, havendo em média uma redução de 13% na sua atividade em relação à de  $\beta$ -gal II. Em 50°C essa diferença foi maior, cerca de 20%. Contudo, na temperatura de 60°C todas elas apresentam uma queda pronunciada, até a completa inativação na temperatura de 70°C. A incubação até a temperatura de 50°C praticamente não afetou a atividade da  $\beta$ -gal III (Figura 18). Assim como em  $\beta$ -gal I e  $\beta$ -gal II, a incubação da  $\beta$ -gal III em 60°C causou uma queda pronunciada na atividade. A incubação da  $\beta$ -gal III em 70°C levou a uma perda completa na atividade. Apesar das semelhanças, esses resultados mostram que entre as enzimas estudadas, a  $\beta$ -gal II é a mais sensível ao aumento da temperatura. De um modo geral, alguns estudos de termoestabilidade de  $\beta$ -galactosidases de plantas (SIMOS *et al.*, 1989, em cotilédones de



**Figura 17-** Efeito da temperatura do meio de ensaio na atividade das  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -Gal I e  $\beta$ -Gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -Gal III) de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba. Plântulas provenientes do tratamento controle (A, C e E) e tratamento salino (B, D e F). **Figuras A e B-** estágio de desenvolvimento III ( $\beta$ -Gal I, o—o;  $\beta$ -Gal II, ●—●); **Figuras C e D-** estágio de desenvolvimento VIII ( $\beta$ -Gal I, o—o;  $\beta$ -Gal II, ●—●); **Figuras E e F-**  $\beta$ -Gal III (estádio de desenvolvimento III, □—□; estágio de desenvolvimento VIII,  $\Delta$ — $\Delta$ ).



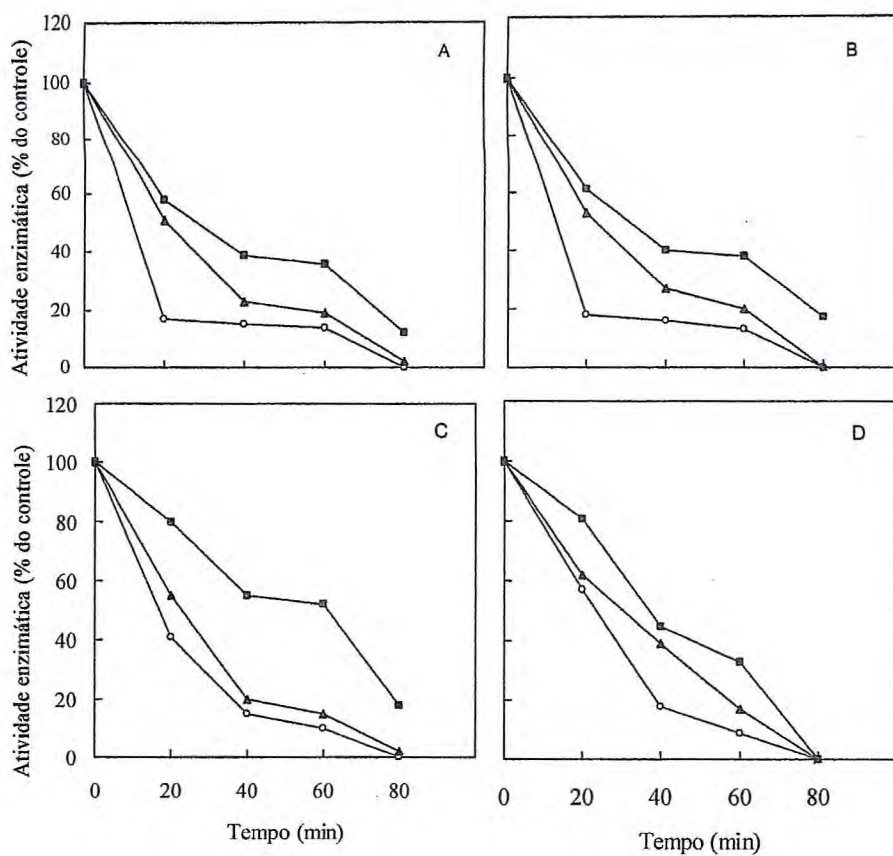
**Figura 18-** Atividade de  $\beta$ -galactosidasas citosólicas ( $\beta$ -Gal I e  $\beta$ -Gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -Gal III) de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba em função da temperatura de pré-incubação. Plântulas provenientes do tratamento controle (A, C e E) e tratamento salino (B, D e F). **Figuras A e B-** estágio de desenvolvimento III ( $\beta$ -Gal I, o—o;  $\beta$ -Gal II, ●—●); **Figuras C e D-** estágio de desenvolvimento VIII ( $\beta$ -Gal I, o—o;  $\beta$ -Gal II, ●—●); **Figuras E e F-**  $\beta$ -Gal III (estádio de desenvolvimento III, □—□; estágio de desenvolvimento VIII,  $\Delta$ — $\Delta$ ).

várias espécies vegetais; KUNDU *et al.*, 1990, em sementes de *Vigna radiata*; ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000, em cotilédones de *Vigna unguiculata*) mostram que há pouca ou nenhuma inativação nas enzimas quando pré-incubadas a 50°C, havendo uma perda considerável apenas a partir de 55°C. Resultados um pouco diferentes foram observados por Sekimata *et al.* (1989) com  $\beta$ -galactosidases isoladas de sementes de rabanete, em que as enzimas apresentavam-se completamente inativadas quando pré-incubadas a 55°C.

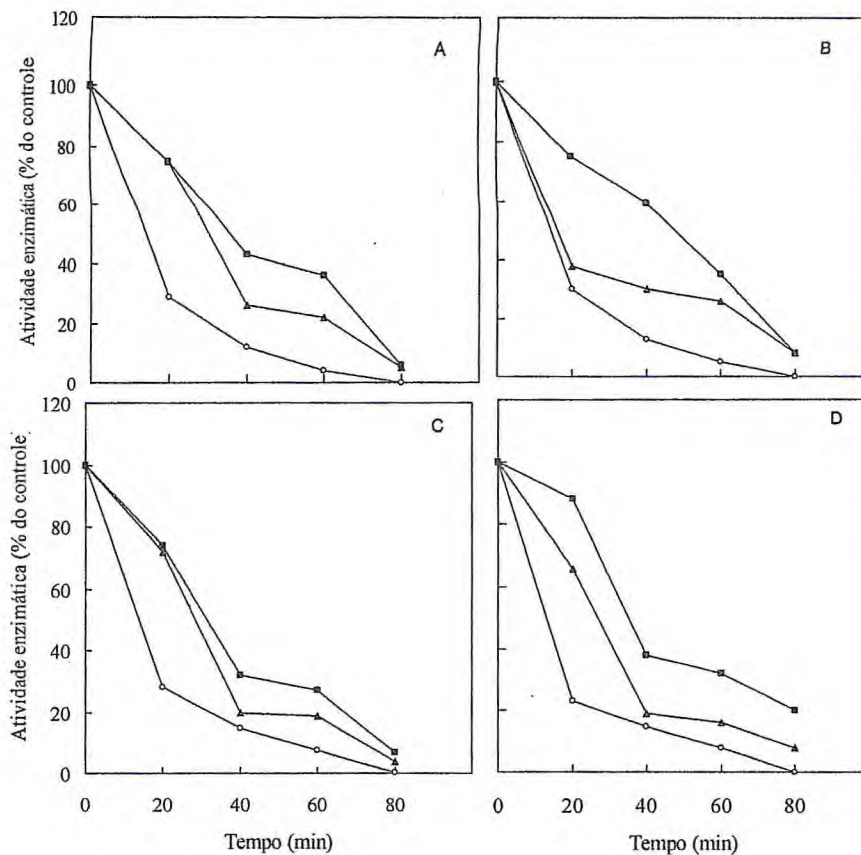
#### 4.4.5. Termoinativação

De um modo geral, as curvas de termoinativação (pré-incubação das enzimas a 60°C) em função do tempo (20, 40, 60 e 80 minutos) para  $\beta$ -gal I, II e III mostraram que na ausência de qualquer açúcar (controle) (Figuras 19, 20 e 21), as curvas foram bifásicas, com uma fase inicial rápida, com grande perda de atividade, e uma segunda fase, mais lenta. De acordo com Daniel *et al.* (1996), a curva de termoinativação bifásica pode refletir a habilidade da molécula enzimática existir em mais de um estado de conformação estável. É importante lembrar que a estabilidade conformacional de uma proteína é a soma de um amplo número de interações fracas, incluindo ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e efeitos hidrofóbicos, de modo que a desestabilização dessas forças aumenta amplamente a entropia conformacional. E todas essas forças são afetadas pela temperatura de um modo bastante complexo. A pré-incubação da  $\beta$ -gal III na temperatura citada, durante 40 minutos, resultou na inativação quase que completa da atividade da enzima (Figura 21). Contudo, para as enzimas  $\beta$ -gal I e II (Figuras 19 e 20), essa forte inativação foi observada somente com 80 minutos de pré-incubação, mostrando que a  $\beta$ -galactosidase associada à parede celular ( $\beta$ -gal III) é mais sensível à inativação térmica do que as  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -gal I e II). Em temperaturas muito elevadas, processos de degradação irreversíveis podem levar à inativação da enzima e, em contraste com a desnaturação, os processos irreversíveis de inativação protéica aumentam devido a mudanças nas ligações covalentes. A desaminação e a oxidação de aminoácidos são comuns nos processos de degradação de proteínas. Esses mecanismos de degradação protéica são fortemente acelerados em altas temperaturas, e podem assim, desempenhar um importante papel na inativação térmica das enzimas (DANIEL *et al.*, 1996).

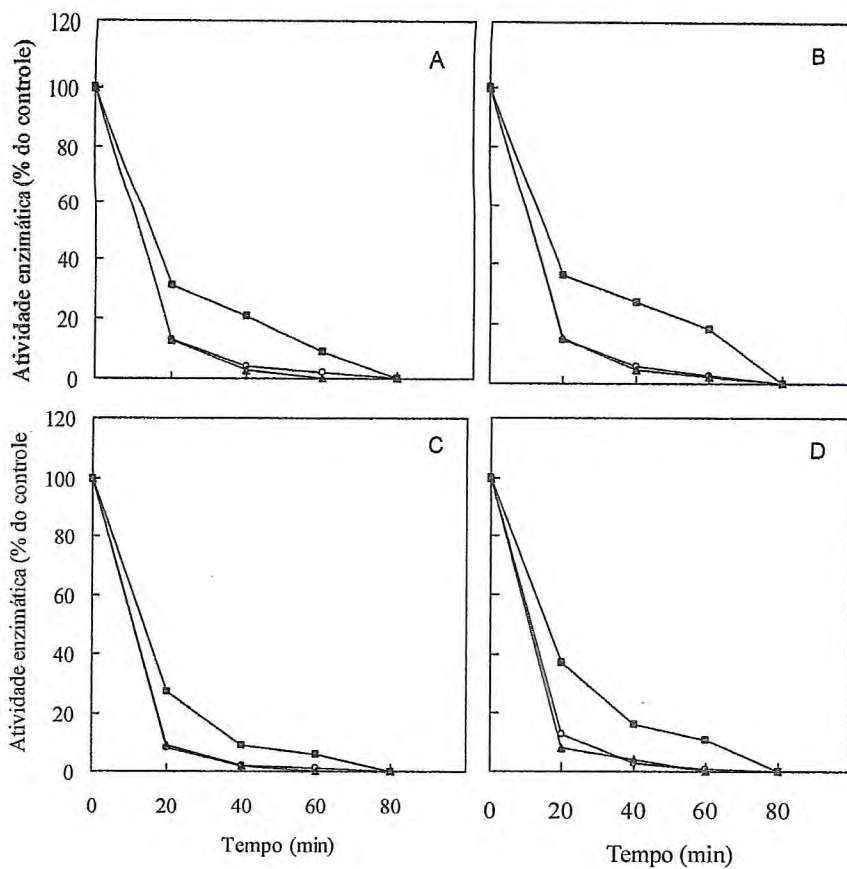
As Figuras 19, 20 e 21 também mostram o estudo de termoinativação das  $\beta$ -gal I, II e III na presença de glucose e galactose. Nos estádios de desenvolvimento (III e VIII) e nas condições estudadas (controle e tratamento salino), tanto a glucose quanto a galactose protegeram as enzimas contra a inativação térmica, sendo que a perda de atividade foi menor na presença de galactose do que na presença de glucose. A estabilização dessas enzimas



**Figura 19-** Termoinativação de  $\beta$ -gal I de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba em condições controle (A, C) e tratamento salino (B, D), na ausência (o—o) e na presença de glucose a 50 mM (▲—▲) e galactose a 50 mM (■—■). A. e B. Estádio de desenvolvimento III; C. e D. Estádio de desenvolvimento VIII.



**Figura 20-** Termoinativação de  $\beta$ -gal II de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba em condições controle (A, C) e tratamento salino (B, D), na ausência (o—o) e na presença de glucose a 50 mM ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ) e galactose a 50 mM ( $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ). A. e B. Estádio de desenvolvimento III; C. e D. Estádio de desenvolvimento VIII.



**Figura 21-** Terminoativação de  $\beta$ -gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba em condições controle (A, C) e tratamento salino (B, D), na ausência (o—o) e na presença de glucose a 50 mM (▲—▲) e galactose a 50 mM (■—■). A. B.  $\beta$ -Gal III no estágio de desenvolvimento III. C. D.  $\beta$ -Gal III no estágio de desenvolvimento VIII.



contra a termoinativação na presença desses açúcares sugere que a rota de termoinativação envolve mudanças no sítio ativo das enzimas, de modo que a exposição das mesmas a altas temperaturas pode não necessariamente inativá-la devido à proteção oferecida pela glucose e pela galactose. Esses açúcares são produtos da reação de hidrólise da lactose catalisada pela  $\beta$ -galactosidase (lactase). Eles provavelmente se ligam às enzimas, mudando suas conformações e fazendo com que elas se tornem mais resistentes às altas temperaturas (CHILAKA *et al.*, 2002).

Quase não há estudos de termoinativação em  $\beta$ -galactosidases na presença de açúcares. Contudo, estudos realizados por Chilaka *et al.* (2002) mostraram que as curvas de termoinativação em função do tempo para  $\beta$ -galactosidases purificadas de *Kestingella geocarpa* também mostraram que em todas as temperaturas analisadas (40, 60 e 80°C), as curvas foram bifásicas, com uma primeira fase rápida, com grande perda de atividade, seguida de uma segunda fase, mais lenta. A exemplo do que aconteceu com as  $\beta$ -galactosidases ( $\beta$ -gal I, II e III) analisadas nesse trabalho, as  $\beta$ -galactosidases de *K. geocarpa* foram completamente inativadas em 80°C, mas neste caso, somente quando incubadas durante 60 minutos, sendo que até 40 minutos ainda permanecia com cerca de 10% de atividade. A glucose e a galactose também protegeram as  $\beta$ -galactosidases de *K. geocarpa*, havendo uma proteção de 100% no caso da galactose, na concentração de 100 mM.

#### 4.4.6. Efeito de açúcares na atividade $\beta$ -galactosidásica

De todos os açúcares testados quanto aos seus efeitos na atividade das  $\beta$ -gal I, II e III (Tabela 7), na presença do  $\beta$ -PNPG, a galactose foi o que mais inibiu a atividade das enzimas. A  $\beta$ -gal I foi inibida 73%, a  $\beta$ -gal II, 71%, e a  $\beta$ -gal III, 83%. A lactose também afetou a atividade das  $\beta$ -galactosidases purificadas, mas em menor proporção, reduzindo as atividades das  $\beta$ -gal I, II e III em percentuais de 35, 27 e 25%, respectivamente. O percentual de inibição da fucose foi de 49, 20 e 13%, em  $\beta$ -gal I, II e III, respectivamente. De modo geral, o açúcar que menos afetou a atividade das  $\beta$ -gal I, II e III foi a arabinose, que reduziu a atividade das enzimas em 15, 20 e 13%, respectivamente. Portanto, de acordo com esses resultados, observa-se que, houve diferença no padrão de inibição dos diferentes açúcares testados na atividade das enzimas estudadas.

Alguns autores também analisaram os efeitos de alguns açúcares na atividade de  $\beta$ -galactosidases isoladas de diferentes espécies vegetais (DOPICO *et al.*, 1990; LI *et al.*, 2001; CHILAKA *et al.*, 2002; ALCÂNTARA *et al.*, 2006). O baixo percentual de inibição da arabinose também foi observado em  $\beta$ -galactosidases de epicótilos de *Cicer arietinum* (DOPICO *et al.*, 1990). Nesse caso, a arabinose inibiu a atividade  $\beta$ -galactosidásica em 11 e

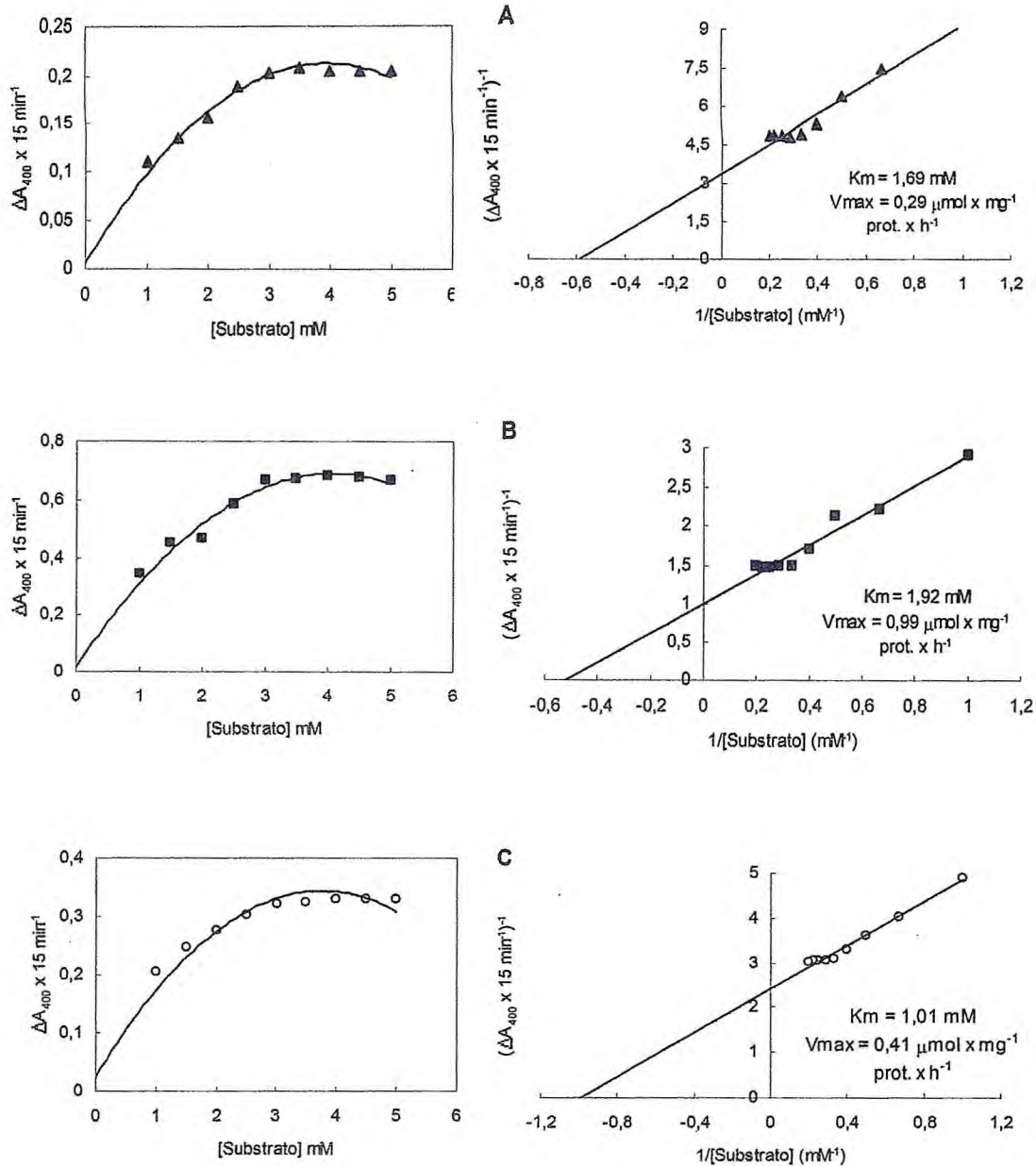
**Tabela 7-** Efeito de açúcares na concentração de 50 mM, nas atividades de  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento VIII em condições controle

Tratamento	[Atividade $\beta$ -galactosidásica (UA x h <sup>-1</sup> )] / [% do controle ( $\beta$ -PNPG)]		
	$\beta$ -gal I	$\beta$ -gal II	$\beta$ -gal III
Sem inibidor	204,8 (100%)	2.297,6 (100%)	992,0 (100%)
Lactose	131,2 (64,1%)	1.675,2 (72,9%)	742,4 (74,8%)
Galactose	54,4 (26,6%)	656,0 (28,6%)	163,2 (16,5%)
Arabinose	172,8 (84,4%)	1.795,2 (78,1%)	902,4 (91,0%)
Fucose	103,2 (50,4%)	1.817,9 (79,1%)	860,8 (86,8%)

3%, nas concentrações de 1,0 e 5,0 mM, respectivamente. De forma semelhante aos resultados aqui apresentados, as  $\beta$ -galactosidases de cotilédones de *Vigna radiata* (LI *et al.*, 2001) também tiveram suas atividades fortemente inibidas na presença da galactose (cerca de 70%) e uma inibição de cerca de 28% na presença da lactose. Em *Vigna radiata*, arabinose e fucose praticamente não inibiram a atividade das enzimas (LI *et al.*, 2001). Esse padrão de forte inibição da galactose (principalmente) e lactose também foi reportado no trabalho de Chilaka *et al.* (2002), com  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias de *Kestingela geocarpa*, sendo que esses açúcares foram classificados como inibidores competitivos. A inibição da atividade  $\beta$ -galactosidásica também foi observada em maior proporção pela galactose e em menor pela glucose por Alcântara *et al.* (2006), em cotilédones de *Hymenaea courbaril*. Esses açúcares, que apresentam uma semelhança estrutural com a galactose, tendem a agir como inibidores porque podem se ligar aos sítios ativos ou a qualquer outra região das enzimas, agindo como inibidores competitivos, incompetitivos ou não competitivos (NELSON; COX, 2000).

#### 4.4.7. Análise cinética da atividade $\beta$ -galactosidásica

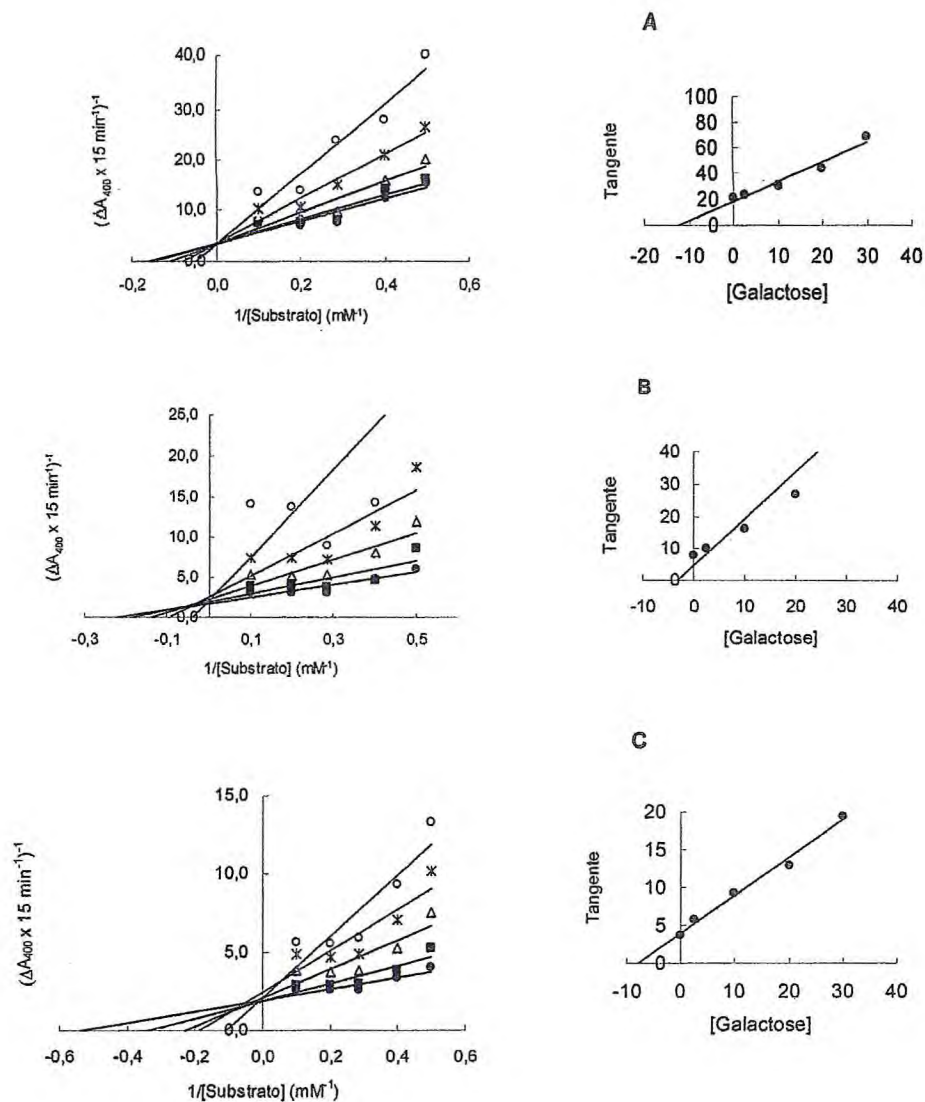
Os gráficos apresentados na Figura 22 mostram que as reações de hidrólise do substrato  $\beta$ -PNPG, catalisadas pelas  $\beta$ -gal I, II e III no estágio de desenvolvimento VIII em condições controle, seguem uma cinética do tipo Michaelis-Menten. Os valores de  $K_m$  e de  $V_{max}$  encontrados a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk foram expressos em milimolar (mM) e em  $\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1}$ , respectivamente. Os valores numéricos de  $K_m$  e de  $V_{max}$  para a  $\beta$ -gal I, II e III foram de 1,69 e 0,29, de 1,92 e 0,99 e de 1,01 e 0,41, respectivamente. Esses



**Figura 22-** Curva de atividade enzimática em função de concentrações crescentes de substrato ( $\beta$ -PNPG) e seus respectivos gráficos duplo-recíprocos (Lineweaver-Burk) de  $\beta$ -Gal I (A),  $\beta$ -Gal II (B) e  $\beta$ -Gal III (C) de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba, no estágio de desenvolvimento VIII.

resultados indicam que a  $\beta$ -gal III pode ter uma maior afinidade pelo  $\beta$ -PNPG do que as  $\beta$ -gal I e II. Há muitos estudos de análise cinética com determinação do  $K_m$  para verificar o grau de afinidade das  $\beta$ -galactosidases ao substrato  $\beta$ -PNPG (SEKIMATA *et al.*, 1989; BISWAS *et al.*, 2003; BALASUBRANIAM *et al.*, 2005; ALCÂNTARA *et al.*, 2006). Valores de  $K_m$  de diferentes isoformas de  $\beta$ -galactosidases de frutos de carambola (BALASUBRANIAM *et al.*, 2005) mostraram valores maiores do que os observados nesse trabalho, usando o mesmo substrato sintético ( $\beta$ -PNPG). Os valores de  $K_m$  variaram de 2,0 a 21,7 mM. O valor de  $K_m$  para uma  $\beta$ -galactosidase cotiledonária de *Phaseolus vulgaris* foi de 0,63 mM (BISWAS *et al.*, 2003). Em um  $\beta$ -galactosidase isolada de cotilédones de *Hymanaea courbaril*, o valor de  $K_m$  foi próximo aos valores aqui observados, sendo igual a 1,8 mM (ALCÂNTARA *et al.*, 2006).

Com o intuito de verificar o tipo de inibição promovida pela galactose (um dos produtos da degradação da lactose pela  $\beta$ -galactosidase) nas enzimas  $\beta$ -gal I, II e III, foi feito um estudo cinético dessas enzimas na ausência e presença de galactose em concentrações crescentes (2,5, 10, 20 e 30 mM) e em várias concentrações do substrato  $\beta$ -PNPG (2,0, 2,5, 3,5, 5,0 e 10 mM) (Figura 23). As  $\beta$ -gal I e II foram inibidas competitivamente pela galactose, com coeficientes de inibição ( $K_i$ ) iguais a 28,0 e 7,6 mM, respectivamente, enquanto a  $\beta$ -gal III apresentou um padrão de inibição mista. De acordo com Nelson e Cox (2000), na inibição competitiva, o inibidor (que tem semelhança estrutural com o substrato) concorre com o substrato pelo sítio ativo da enzima livre, diminui a afinidade da enzima pelo substrato, aumenta a concentração de substrato necessária para obter a mesma concentração do complexo enzima-substrato e aumenta o  $K_m$  aparente da enzima. Vários trabalhos relatam a atuação da galactose como um inibidor competitivo (BISWAS, 1986; LI *et al.*, 2001; CHILAKA *et al.*, 2002; ALCÂNTARA *et al.*, 2006). No entanto, não há nenhum relato de padrão de inibição mista em  $\beta$ -galactosidases. A constante de inibição ( $K_i$ ) na presença de galactose em  $\beta$ -galactosidases de sementes de *Vigna sinensis* foi de 2,4 mM (BISWAS, 1986). Em  $\beta$ -galactosidases cotiledonárias de *Hymenaea courbaril*, o  $K_i$  foi de 3,7 mM (ALCÂNTARA *et al.*, 2006). Em isoformas de  $\beta$ -galactosidase isoladas de cotilédones de *Vigna radiata*, os valores de constante de inibição ( $K_i$ ) na presença de galactose variaram entre 11 e 13 mM (LI *et al.*, 2001). Em  $\beta$ -galactosidases isoladas de cotilédones de *Kestingella geocarpa* na presença de galactose a constante de inibição observada foi de 59 mM (CHILAKA *et al.*, 2002).



**Figura 23-** Efeito da concentração do substrato  $\beta$ -PNPG na atividade de  $\beta$ -Gal I (A),  $\beta$ -Gal II (B) e  $\beta$ -Gal III (C) de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento VIII, em condições controle na ausência e na presença de galactose (gráfico de Lineweaver-Burk). Galactose 0 mM (●), 2,5 mM (■), 10 mM (Δ), 20 mM (\*) e 30 mM (o). Os gráficos à direita representam as tangentes das linhas de tendência nas diferentes concentrações de galactose.

#### 4.4.8. Atividade das $\beta$ -galactosidases com diferentes substratos

O estudo das atividades das  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III quanto às suas capacidades de hidrolisar diferentes substratos está apresentado na Tabela 8. As enzimas utilizadas para essa análise são oriundas de caules de plântulas do estágio de desenvolvimento VIII do tratamento controle. Nesse estudo foram utilizados substratos sintéticos glicosídicos derivados do p-nitrofenil na mesma concentração (3 mM) e nas mesmas condições de ensaio utilizadas para o controle ( $\beta$ -PNPG). Para  $\beta$ -gal I apresentou atividade para todos os substratos sintéticos testados, sendo que a atividade  $\beta$ -fucosidásica foi a que esteve mais evidente, representando 94% da atividade do controle (atividade  $\beta$ -galactosidásica). Em  $\beta$ -gal I, as atividades  $\beta$ -xilosidásica,  $\beta$ -glucosidásica,  $\alpha$ -arabinosidásica,  $\alpha$ -manosidásica,  $\alpha$ -galactosidásica e  $\alpha$ -fucosidásica representaram 50, 66, 67, 87, 68 e 61% da atividade do controle, respectivamente. Resultados diferentes foram observados com relação à  $\beta$ -gal II, que apresentou apenas atividades  $\beta$ -fucosidásica e  $\alpha$ -arabinosidásica, que representaram respectivamente, 21 e 10% da atividade do controle (atividade  $\beta$ -galactosidásica). De todos os substratos testados, aquele que a  $\beta$ -gal III hidrolisou em maior proporção foi o PNP- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, que representou 32% da atividade do controle ( $\beta$ -PNPG). A  $\beta$ -gal III apresentou atividades  $\beta$ -fucosidásica e  $\alpha$ -arabinosidásica de 13 e 10%, respectivamente, mas praticamente não teve atividade  $\beta$ -xilosidásica. Essa enzima não apresentou capacidade de hidrolisar os substratos PNP- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, PNP- $\alpha$ -D-manopiranosídeo e PNP- $\alpha$ -L-fucopiranosídeo. Esses resultados mostram que houve diferenças entre as duas  $\beta$ -galactosidases citosólicas ( $\beta$ -gal I e II) e entre elas e a  $\beta$ -galactosidase da parede celular ( $\beta$ -gal III), o que é um indício de que essas enzimas são de natureza distintas.

Alguns autores também observaram que  $\beta$ -galactosidases purificadas de diferentes espécies vegetais também apresentaram a capacidade de hidrolisar diferentes p-nitrofenil glicosídeos, além do  $\beta$ -PNPG (KONNO; TSUMUKI, 1993; ALI *et al.*, 1995; LI *et al.*, 2001; ALCÂNTARA *et al.*, 2006).  $\beta$ -galactosidases associadas à parede celular isoladas de caules e folhas de *Oryza sativa* não apresentaram nenhuma atividade  $\alpha$ -arabinosidásica,  $\alpha$ -galactosidásica,  $\beta$ -manosidásica e nem  $\beta$ -xilosidásica (KONNO; TSUMUKI, 1993). A ausência de atividade  $\beta$ -manosidásica e  $\beta$ -xilosidásica nessa espécie concorda com o que foi observado para as enzimas  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III, e da mesma forma que a  $\beta$ -gal II, as  $\beta$ -galactosidases de *Oryza sativa* também não apresentaram atividade  $\alpha$ -galactosidásica. Estudos de especificidade de isoformas de  $\beta$ -galactosidases citosólicas isoladas de frutos de *Mangifera indica* para degradar diferentes p-nitrofenilglicosídeos foram realizados por Ali *et al.* (1995). Nesse estudo, as isoformas não foram capazes de hidrolisar nenhum p-nitrofenil

**Tabela 8-** Atividade enzimática em diferentes substratos p-nitrofenil glicosídicos de  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento VIII em condições controle

Substrato	[Atividade $\beta$ -galactosidásica (UA x h <sup>-1</sup> )] / [% do controle ( $\beta$ -PNPG)]		
	$\beta$ -gal I	$\beta$ -gal II	$\beta$ -gal III
PNP- $\beta$ -D-galactopiranosídeo	164,8 (100%)	2.240,0 (100%)	595,9 (100%)
PNP- $\beta$ -D-xilopiranosídeo	83,2 (50,5%)	0 (0%)	12,8 (2,1%)
PNP- $\beta$ -D-fucopiranosídeo	155,2 (94,2%)	476,8 (21,2%)	76,8 (12,8%)
PNP- $\beta$ -D-glucopiranosídeo	108,8 (66,0%)	0 (0%)	0 (0%)
PNP- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo	110,4 (66,9%)	230,4 (10,2%)	57,6 (9,6%)
PNP- $\alpha$ -D-manopiranosídeo	144,0 (87,3%)	0 (0%)	0 (0%)
PNP- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo	112,0 (67,9%)	0 (0%)	192,0 (32,2%)
PNP- $\alpha$ -L-fucopiranosídeo	100,8 (61,1%)	0 (0%)	0 (0%)

glicosídeo testado, mostrando que a preparação enzimática estava totalmente livre de atividade  $\beta$ -glucosidásica e  $\alpha$ -manosidásica, concordando com os resultados observados com as enzimas  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III. Além da ausência dessas atividades, as  $\beta$ -galactosidases de *Mangifera indica* também não apresentaram atividade  $\alpha$ -arabinosidásica. Assim como as  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III, diferentes isoformas de  $\beta$ -galactosidases associadas à parede celular isoladas de cotilédones de *Vigna radiata* também mostraram comportamentos distintos quanto à capacidade de degradar diferentes substratos (LI *et al.*, 2001). Depois da purificação, os autores observaram que duas das isoformas apresentaram atividades  $\beta$ -fucosidásica e  $\alpha$ -arabinosidásica na proporção de 35 e 32%, respectivamente em relação ao controle (atividade  $\beta$ -galactosidásica). No entanto, praticamente não apresentaram nenhuma atividade para outros nove p-nitrofenilglicosídeos testados. Alcântara *et al.* (2006), observaram que não houve atividades  $\beta$ -manosidásica e  $\beta$ -xilosidásica nas  $\beta$ -galactosidases presentes na parede celular de cotilédones de *Hymenaea courbaril*, semelhante ao que foi observado para as  $\beta$ -gal II e III. Levando em consideração que as  $\beta$ -galactosidases atuam na mobilização dos constituintes da parede celular durante a germinação e o crescimento da planta, a análise da especificidade dessas enzimas frente a diferentes substratos é de fundamental importância para o entendimento do papel desempenhado por essas enzimas nesses processos.

#### 4.5. Caracterização molecular

##### 4.5.1. Grau de pureza e integridade do RNA total isolado de caules de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Após a extração de RNA total de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e tratamento salino, foram determinadas as relações de absorvância  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$  para avaliar o grau de pureza do ácido nucléico isolado (Tabela 9). De acordo com Gasic *et al.* (2004), a pureza de amostras de RNA total extraídas dos materiais vegetais pode ser avaliada através das relações de absorvância citadas (para verificação de contaminação com proteínas e/ou fenóis). Segundo esses autores, a relação  $A_{260}/A_{230}$  pode ser usada para verificação de contaminação com polissacarídeos, de modo que para uma amostra sem contaminação com polissacarídeos, essa relação deve estar acima de 2,0. Já a relação  $A_{260}/A_{280}$  pode ser utilizada para verificar se há ou não contaminação com proteínas e/ou fenóis. Nesse caso, a relação deve estar entre 1,8 e 2,0. Uma relação abaixo de 1,8, indica contaminação com proteínas e/ou fenóis e acima de 2,0, indica contaminação com açúcares solúveis. Como pode ser visto na Tabela 12, as relações de  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$  obtidas para o RNA total extraído de caules em todas as condições estudadas (estádios de desenvolvimento III e VIII, controle e tratamento salino) atenderam a esses critérios. A relação  $A_{260}/A_{230}$  apresentou valores entre 2,0 e 2,1, enquanto a relação  $A_{260}/A_{280}$  apresentou valores entre 1,9 e 2,0 (Tabela 9).

A eletroforese do RNA total dos caules de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e tratamento salino, revelou a presença de duas bandas principais correspondendo aos RNAs ribossômicos (rRNAs) 25 e 18S (Figura 24), não apresentando degradação aparente. Além disso, não se observou nenhuma banda acima do rRNA 25 S, que poderia indicar contaminação com DNA genômico. Portanto, de acordo com esses resultados, o RNA total obtido apresentou boa qualidade para ser utilizado em reações de RT-PCR (SAMBROOK *et al.*, 1989).

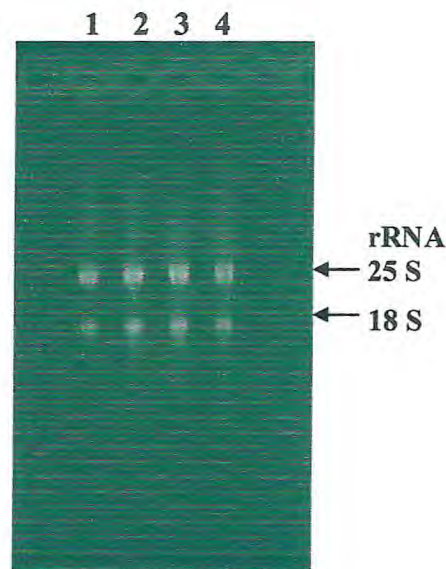
##### 4.5.2. Expressão de gene (s) da $\beta$ -galactosidase

A expressão de gene(s) da  $\beta$ -galactosidase foi analisada em caules de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba, empregando-se RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase) usando-se “primers” degenerados da  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -galF/ $\beta$ -galR) e RNA total extraído de caules de plântulas dos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e tratamento salino. Os ensaios foram realizados usando-se Actina



**Tabela 9-** Relações de absorvância  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$  para verificação do grau de pureza dos RNAs totais extraídos de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e tratamento salino (NaCl 100 mM)

Amostras	Absorvância			Relações	
	$A_{260}$	$A_{230}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$
RNA do ED III (Controle)	0,647	0,295	0,337	2,19	1,91
RNA do ED III (NaCl 100 mM)	0,192	0,088	0,092	2,18	2,08
RNA do ED VIII (Controle)	0,223	0,104	0,109	2,14	2,04
RNA do ED VIII (NaCl 100 mM)	0,071	0,033	0,034	2,15	2,08

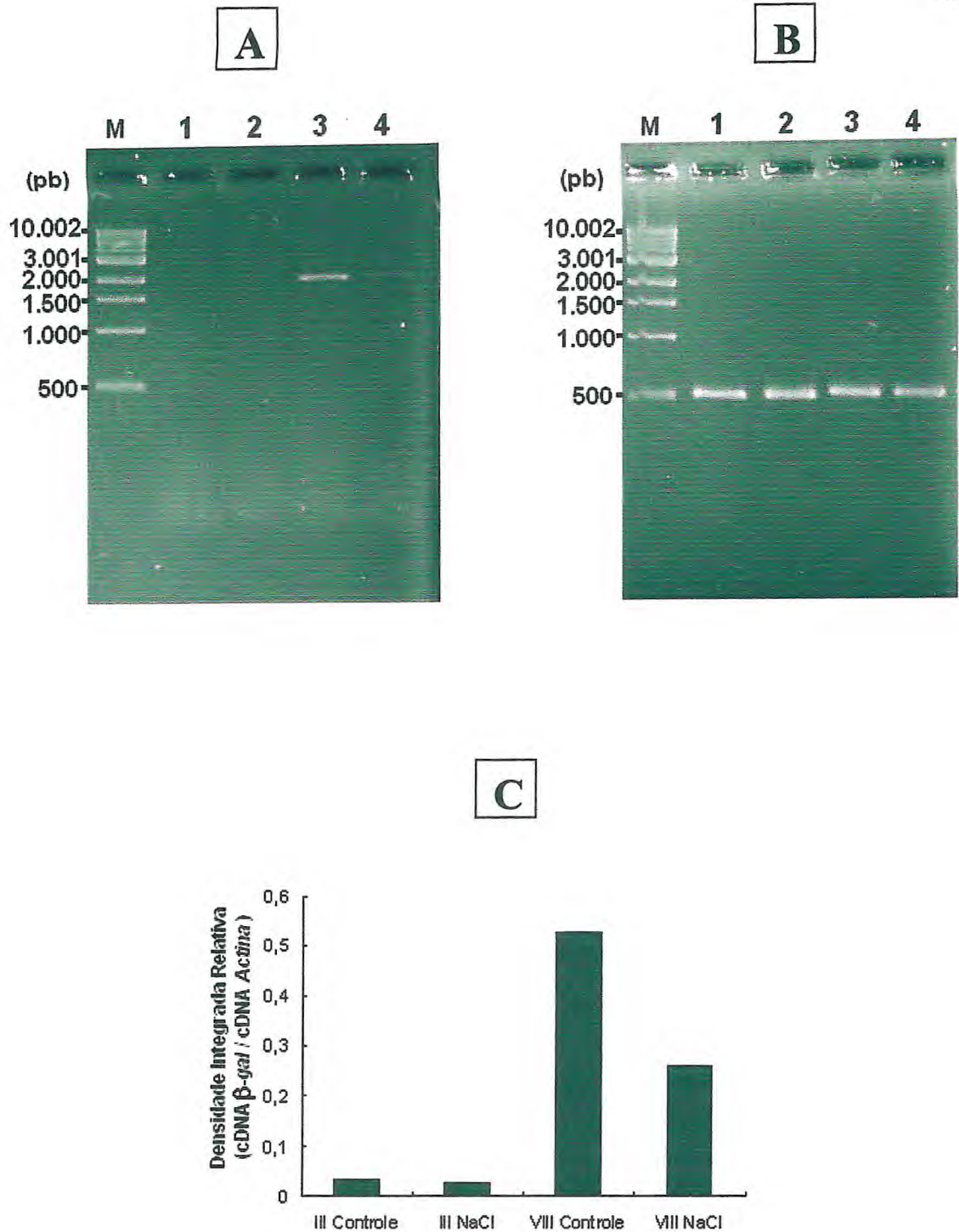


**Figura 24-** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do RNA total (0,5  $\mu$ g) isolado de caules de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) cv. Pitiúba. 1- Estádio de desenvolvimento III (controle); 2- Estádio de desenvolvimento III (tratamento salino); 3- Estádio de desenvolvimento VIII (controle); 4- Estádio de desenvolvimento VIII (tratamento salino).

como controle constitutivo a fim de se obter uma análise semiquantitativa de transcritos da  $\beta$ -galactosidase (Fig. 25B).

Os resultados de RT-PCR revelaram a amplificação de um fragmento de cDNA de tamanho molecular esperado em torno de 1.900 pb (pares de base) em todas as condições testadas (Figura 25A e C). O maior nível de transcrito foi detectado no estágio de desenvolvimento VIII (controle). No estágio VIII do tratamento salino, o nível de transcritos foi inferior ao das condições controle do mesmo estágio. As quantidades de transcritos detectadas no estágio de desenvolvimento III, tanto em condições controle como de tratamento salino, foi muito baixa. Esses resultados sugerem que em plântulas mais jovens (Estádio III), a expressão gênica, que irá posteriormente, resultar na síntese das  $\beta$ -galactosidases, não ocorreu com a mesma intensidade que aquela com plântulas no estágio de desenvolvimento mais avançado (estádio VIII). Além disso, sugerem que a salinidade afeta a expressão gênica das  $\beta$ -galactosidases, corroborando com os resultados obtidos na etapa de purificação das  $\beta$ -galactosidases (Tabelas 5 e 6), na qual verificou-se que a queda de atividades dessas enzimas na presença de salinidade pode ter ocorrido devido a uma redução na síntese de proteínas, o que infere que a salinidade alterou a expressão gênica das enzimas.

Os resultados que mostram uma menor intensidade na expressão gênica em caules de plântulas mais jovens (estádio III) do que em plântulas com idade mais avançada (estádio VIII) se assemelham aos encontrados por Esteban *et al.* (2005). Nesse estudo, avaliou-se a expressão temporal de cDNAs responsáveis pela codificação de  $\beta$ -galactosidases associadas à parede celular de epicótilo, de mesocótilo (zona de junção entre a raiz e o epicótilo) e de raiz de plântulas de *Cicer arietinum* com 2 e 8 dias após a semeadura. Usando RNA extraído desses órgãos, verificou-se um aumento nos níveis de mRNA, principalmente, em epicótilos de plantas com mais idade, e que um dos cDNAs isolados foi expresso somente no quarto dia após a semeadura, não sendo observado transcrito em epicótilos muito jovens (2 e 3 dias após a semeadura). Além disso, foi verificado que todos os cDNAs foram expressos em epicótilos e que o padrão de expressão do gene foi compatível com as flutuações das  $\beta$ -galactosidases nos diferentes órgãos, principalmente no epicótilo, mostrando seu alto nível de expressão em órgãos responsáveis pelo crescimento vegetativo de plântulas. Thiagarajah *et al.* (1996), analisou o grau de tolerância à salinidade *in vitro* de algumas hidrolases citoplasmáticas e associadas à parede celular de folhas de espécies halófitas (*Suaeda maritima* e *Kochia trichophylla*) e de hipocótilos de espécies glicófitas (*Vigna radiata* e *Cicer arietinum*). Nesse trabalho, os autores concluíram que não houve inibição da atividade de galactosidases na presença de NaCl (0,2 a 1,0 M), que enzimas da parede celular são mais tolerantes à salinidade do que as enzimas citoplasmáticas e, que não houve diferença de resposta entre as enzimas isoladas de halófitas e glicófitas. Resultados observados por Kreps *et al.* (2002) em



**Figura 25-** Análise de transcritos de  $\beta$ -galactosidases de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba. A- Produtos de RT-PCR de  $\beta$ -galactosidase; B- Produtos de RT-PCR de Actina (controle constitutivo); C- Quantidade relativa de transcritos de  $\beta$ -galactosidase obtida da densidade integrada de bandas de cDNA. M- Marcadores de pb; 1- Estádio de desenvolvimento III (controle); 2- estágio de desenvolvimento III (tratamento salino); 3- Estádio de desenvolvimento VIII (controle); 4- Estádio de desenvolvimento VIII (tratamento salino).

raízes e folhas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a estresse salino (NaCl 100 mM) mostraram evidências que indicam o envolvimento de genes das  $\beta$ -galactosidases com a adaptação de *Arabidopsis thaliana* ao estresse salino. Martín *et al.* (2005), observaram que a expressão *in vivo* de uma  $\beta$ -galactosidase de *Cicer arietinum* em tubérculos de batata levou a uma redução das cadeias laterais de galactanos em pectinas da parede celular. Nesse trabalho, foi observado que a expressão do gene que codifica uma  $\beta$ -galactosidase envolvida na degradação de pectinas da parede celular na planta transformada geneticamente se relacionou com a redução de glicosídeos e com o aumento da atividade  $\beta$ -galactosidásica.

## 5. CONCLUSÕES

1. Há pelo menos três isoformas de  $\beta$ -galactosidase em caules de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba, as quais foram denominadas  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III;
2. As enzimas  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III não sofreram alteração nas suas características quando comparadas em função do estágio de desenvolvimento da planta (ED III e VIII) e em função da ausência (tratamento controle) ou presença de salinidade (tratamento salino). Isso ficou evidente nos estudos de algumas propriedades, tais como: padrão eletroforético, massa molecular, pH ótimo, temperatura ótima de ensaio, estabilidade térmica e termoinativação. A manutenção das características dessas enzimas nos dois aspectos avaliados (idade fisiológica da planta e estresse salino) nos levou a concluir que essas enzimas não sofrem alteração, nem ao longo do desenvolvimento, nem pela presença de salinidade (na concentração de 100 mM de NaCl) em caules de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba;
3. O fato das enzimas  $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II e  $\beta$ -gal III terem apresentado algumas diferenças de propriedades, como: massa molecular, padrão de termoestabilidade e termoinativação, valores de  $K_m$  e de  $V_{max}$ , tipos de inibição por açúcares, valores de  $K_i$  atividades em diferentes substratos sintéticos, nos levou a concluir que essas enzimas citosólicas ( $\beta$ -gal I,  $\beta$ -gal II) e presentes na parede celular ( $\beta$ -gal III) podem realizar funções distintas em caules de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba;
4. As diferenças nas expressões gênicas entre as condições estudadas (estádios de desenvolvimento III e VIII e tratamentos controle e salino) forneceram subsídios para a sugestão de que o padrão de expressão gênica de  $\beta$ -galactosidases de caules de plântulas mais jovens (ED III) não ocorre com a mesma intensidade que ocorre em caules de plântulas no estágio de desenvolvimento mais avançado (ED VIII), e que a salinidade afeta a expressão gênica das  $\beta$ -galactosidases, corroborando com os resultados obtidos na etapa de purificação das  $\beta$ -galactosidases, em que foi visto que a queda das atividades dessas enzimas em caules de plântulas semeadas em NaCl 100 mM pode ter ocorrido devido a uma redução na síntese de proteínas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKYIAMA, T., KAKU, H.; SHIBUYA, N. A cell wall-bound beta-glucosidase from germinated rice: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 49-54, 1998.
- ALANI, S. R., SMITH, P. M.; MARKAKIS, P.  $\alpha$ -galactosidase of *Vigna unguiculata*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2047-2051, 1989.
- ALCÂNTARA, P. H. N., DIETRICH, S. M. C.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG / XLXG) specific  $\beta$ -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 37, n. 9, p. 653-663, 1999.
- ALCÂNTARA, P. H. N.; MARTIM, L.; SILVA, C. O.; DIETRICH, S. M. C.; BUCKERIDGE, M. S. Purification of a  $\beta$ -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 44, p. 619-627, 2006.
- ALI, Z. M., ARMUGAM, S. ; LAZAN, H.  $\beta$ -galactosidase and its significance in ripening mango fruit. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, 1109-1114, 1995.
- ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 224-233, 1997.
- AMBROSANO, E.J. Resposta da aplicação de micronutrientes no cultivo de feijão irrigado no inverno. **Scientia Agricola**, Piracicaba, 1996.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. **Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches**. New York: The Haworth Press, 2005.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; LACERDA, C. F.; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 31-38, 2004.

AZEVEDO-NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C. E. B.; GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 87-94, 2006.

BALASUBRANIAN, S.; LEE, H. C.; LAZAN, H.; OTHMAN, R.; ALI, Z. M. Purification and properties of a  $\beta$ -galactosidase from carambola fruit with significant activity towards cell wall polysaccharides. **Phytochemistry**. p. 1-11, 2005.

BARBOSA, G. K. C. Efeito do NaCl na atividade galactosidásica de raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica Vegetal**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 2002, 72 p.

BARNAVON, L., DOCO, T., TERRIER, N., AGCORGES, A., ROMICU, C. ; PELLERIN, P. Analysis of cell wall neutral sugar composition,  $\beta$ -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, n. 4, p. 289-300, 2000.

BEZERRA, M. A.; LACERDA, C. F.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e fotossíntese de plantas jovens de cajueiro anão precoce sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p. 90-94, 2005.

BEZERRA, M. A.; OLIVEIRA, R. A. Fotossíntese de plantas de cajueiro-anão precoce submetidas ao estresse salino. **Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.**, v. 47, p. 149-152, 2003.

BISWAS T. K. Cationic Form of  $\beta$ -galactosidase in the germinating seeds of *Vigna sinensis* (L.) Savi. **Arch. of Biochem. and Biophys.** v. 251, p. 379-384, 1986.

BISWAS, S.; KAYASTHA, A. M.; SECKLER, R. Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14. **J. Plant Physiology**, v. 160, p. 327-337, 2003.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOGOSLAVSKY, L.; NEUMANN, P. M. Rapid regulation by acid pH of cell wall adjustment and leaf growth in maize plants responding to reversal of water stress. **Plant Physiology**, v. 118, p. 701-709, 1998.

BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 237-260, 1999.

BOLAÑOS, J. A.; LONGSTRETH, D. J. Salinity effect on water potential component and bulk elastic modulus of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. **Plant Physiology**, v. 75, p. 281-284, 1984.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPILLO, E. D.; SHANNON, L. M. An  $\alpha$ -galactosidase with hemagglutinin properties from soybean seeds. **Plant Physiol.**, v. 69, p. 628- 631, 1982.

CHARTZOULAKIS, K. S; LOUPASSAKI, M.; BERTAKY, M.; ANDROULAKIS, I. Effects of NaCl on growth, ion content and CO<sub>2</sub> assimilation rate of six olive cultivars. **Scientia Horticulture**, v. 96, p. 235-247, 2002.

CHILAKA, F. C.; OKEKE, C.; ADAIKPOH, E. Ligand-induced thermal stability in  $\beta$ -galactosidase from the seeds of the black bean, *Kestingella geocarpa*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 143-149, 2002.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. -K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v. 45, p. 437-448, 2005.

COLMER, T. D., FAN, T. W. M., HIGASHI, R. M., LÄUCHLI, A. Effects of Ca<sup>2+</sup> and NaCl stress on the ionic relations and proline accumulation in the primary root tip of *Sorghum bicolor*. **Physiol. Plant.**, v. 97, p. 421 – 424, 1996.



- COSGROVE, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 131-134, 2001.
- COSTA, J. H.; JOLIVET, Y.; HASENFRATZ-SAUDER, M. P.; ORELLANO E. G.; LIMA, M. G. S.; DIZENGREMEL, P.; MELO, D. F. Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought / salt tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 6, p. 718-727, 2007.
- COSTA, P. H.; SILVA, AZEVEDO-NETO, A. D.; BEZERRA, M. A.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, n. 4, p. 353-361, 2005.
- COSTA, P. H.; SILVA, J. V.; BEZERRA, M. A.; ENÉAS-FILHO, J.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Crescimento em níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 289-297, 2003.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2. ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988.
- DANIEL, R. M.; DINES, M.; PETACH, H. H. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. **Biochem. J.**, v. 317, p. 1-11, 1996.
- DOPICO, B., NICOLÁS, G. ; LABRADOR, E. Partial purification of cell wall  $\beta$ -galactosidases from *Cicer arietinum* epicotyls. Relationship with cell wall autolytic processes. **Physiologia Plantarum**, v. 75, p. 458-464, 1989.
- DOPICO, B., NICOLÁS, G. ; LABRADOR, E. Characterization of a cell wall partial purification of cell wall  $\beta$ -galactosidase of *Cicer arietinum* involved in cell wall autolysis. **Physiol. Plant.**, v. 80, p. 629-635, 1990.
- EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**. v. 53, p. 187-204, 1997.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <<http://embrapa.gov.br/feijão>>. Acesso em: fev.2007.

ENÉAS-FILHO, J., BARBOSA, G. K. C.; SUDÉRIO, F. B., PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Isolation and partial purification of  $\beta$ -galactosidases from cotyledons of two cowpea cultivars. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 13 (3), p.251-261, 2001.

ENÉAS-FILHO, J., OLIVEIRA-NETO, O. B., PRISCO, J. T., GOMES-FILHO, E. ; NOGUEIRA, C. M. Effects of salinity *in vivo* and *in vitro* on cotyledonary galactosidases from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. during germination and seedling establishment. **Rev. Bras. Fis. Veg.**, v. 7, n. 2, p. 135-142, 1995.

ENÉAS-FILHO, J., SUDÉRIO, F. B., GOMES-FILHO, E. ; PRISCO, J. T. Multiple forms of cotyledonary  $\beta$ -galactosidases from *Vigna unguiculata* quiescents seeds. **R. Bras. Bot.**, v. 23, p. 69-76, 2000.

ESTEBAN, R.; DOPICO, B.; MUÑOS, F. J.; ROMO, S.; MARTÍN, I.; LABRADOR, E. Cloning of *Cicer arietinum*  $\beta$ -galactosidase with pectin-degrading function. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 718-725, 2003.

ESTEBAN, R.; LABRADOR, E.; DOPICO, B. A family of  $\beta$ -galactosidase cDNAs related to development of vegetative tissue in *Cicer arietinum*. **Plant Science**, v. 6, p. 457-466, 2005.

FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush>. 2005.

FERREIRA, C.M. **Comercialização de feijão no Brasil**. 2001. 162f. (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FRANCO, O. L., ENÉAS-FILHO, J., PRISCO J. T.; GOMES-FILHO, E. Effects of  $\text{CaCl}_2$  on growth and osmoregulator accumulation in NaCl stressed Cowpea seedlings. **Rev. Bras. de Fisiol. Veg., Brasil**, v. 11, n. 3, p. 145-151, 1999.

FREIRE-FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (eds). O caupi no Brasil, p. 27-46. Brasília: **Iita/EMBRAPA**, 722, 1988.

FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells, **New Phytol.**, v. 161, p. 641-675, 2004.

GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S. S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 437a-437g, 2004.

GHEYI, H. R. Problema de salinidade na agricultura irrigada. In: OLIVEIRA, T. S.; ASSIS JÚNIOR, R. N.; ROMERO, R. E.; SILVA, J. R. C. (Eds.). **Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido**. Fortaleza, CE: DCS/UFC, p. 329-346, 2000.

GOLDENBERG, D. P. **Analysis of protein conformation by gel electrophoresis**. In: Creighton TE (ed) **Protein structure: A practical approach**, Ed 2 Oxford University Press Inc. New York, pp 195.

GÓMES, L. D.; CASANO, L. M.; BRAGA, M. R.; BUCKERIDGE, M. S. Changes in extracellular  $\beta$ -galactosidase and protease activities during bean hypocotyls growth. **Rev. Bras. Fis. Veg.**, v. 7 (1), p. 1-6, 1995.

GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on the proteolytic activity of *Vigna sinensis* (L.) Savi cotyledons during germination. **Rev. Bras. Bot.**, v. 1, p. 83-88, 1978.

GRANJEIRO, P. A., FERREIRA, C. V., CAVAGIS, A. D. M., GRANJEIRO, J. M., AYOAMA, H. Essential sulfhydryl groups in the active site of castor bean (*Ricinus communis*) seed acid phosphatase. **Plant Science**, 164, p. 629-633, 2003.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. -K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HASSANEIN, A. M. Alterations in protein and esterases patterns of peanut in response to salinity stress. **Biol. Plant.**, v. 42, p. 241-248, 1999.

- HURKMAN, W. J. Effects of salt stress on plant gene expression: a review. **Plant and Soil**, v. 146, p. 145-151, 1992.
- INOUE, M., INADA, G., THOMAS, B. R. ; NEVINS, D. J. Cell wall autolytic activities and distribution of cell wall glucanases in *Zea mays* L. seedlings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 151-156, 2000.
- KANFER, J. N., PETROVICH, R.; MUMFORD, R. A. Purification of  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases by affinity chromatography. **Anal. Biochem.**, v. 55, p. 301-305, 1973.
- KONNO, H.; TSUMUKI H. Purification of a  $\beta$ -galactosidase from rice shoots and its involvement in hidrolisis of the natural substrate in cell walls. **Physiol. Plant.**, v. 89, p. 40-47, 1993.
- KONNO, H., YAMASAKI, Y.; KATOH, K. Characteristics of  $\beta$ -galactosidase purified from cell suspension cultures of carrot. **Physiol. Plant.** v. 68, p. 46-52, 1986.
- KREPS, J. A.; WU, Y. W.; CHANG, H-S; ZHU, T.; WANG, X.; HARPERJ. F. Transcriptoma changes for *Arabdopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2129-2141, 2002.
- KUNDU, R.K., DE-KUNDU, P.; BANERJEE, A.C. Multiple forms of  $\beta$ -galactosidase from the germinating seeds of *Vigna radiata*. *Phytochemistry*, 29(7):2079-2082, 1990.
- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A.; RUIZ, H. A. (a) Osmotic adjustment in roots and leaves of two sorghum genotypes under NaCl stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 113-118, 2003.
- LACERDA, C. F.; OLIVEIRA, H. P. M.; OLIVEIRA, T. S.; GOMES-FILHO, E. (b) Crescimento e acúmulo de íons em folhas de sorgo forrageiro submetido a soluções iso- osmóticas de sais (NaCl + KCl). *Revista Ciência Agronômica*, v. 34, n. 1, p. 7-12, 2003.
- LEVI, G. & TEICHBERG, V. I. Isolation and Physicochemical Characterization of Eletrolectin, a  $\beta$ -D-galactoside Binding Lectin from the Eletric Organ of *Electrophorus electricus*. **The J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 5735-5740, 1981.

- LI, S-C; HAN, J-W.; CHEN, K-C.; CHEN, C-S. Purification and characterization of isoforms of  $\beta$ -galactosidases in mung bean seedlings. **Phytochemistry**, v. 57, 349-359, 2001.
- LIMA, D. U.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A.; MOLLE, F. R. D.; BUCKERIDGE, M. S. Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 191-198, 2001.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, p. 889, 1995.
- MARTÍN, I.; DOPICO, B.; MUÑOS, F. J.; ESTEBAN, R.; OOMEN, R. J. F. J.; DRIOUICH, A.; VINCKEN, J-P; VISSER, R.; LABRADOR, E. In vivo expression of *Cicer arietinum* galactosidase in potato tubers leads to a deduction of the galactan side-chains in cell wall pectin. **Plant Cell Physiology**, v. 46, n. 10, p. 1613-1622, 2005.
- MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; MARTÍNEZ, V.; CARVAJAL, M. Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 161-174, 2004.
- MATTHEWS, B. W. The structure of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase. **C. R. Biologies**, v. 328, p. 549-556, 2005.
- McILWAINE, T. C. A buffer solution foil colorimetric comparison. **The J. Biol. Chem.**, v. 49, p. 185-186, 1921.
- MINIC, Z.; JOUANIN, L. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 435-449, 2006.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.
- MOLINA, L., CONSTANTINESCU, F., MICHEL, L., REIMMANN, C., DUFFY, B., DÉFAGO, G. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, 71-81, 2003.

- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.
- MUNNS, R., SACHACHTMAN, D. P.; CONDON, A. G. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 22, 561-569, 1995.
- MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 143-160, 1986.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. third edition. Worth, 2000, 1152 p.
- NEUMANN, P. M. Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell-walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. **Plant Cell and Environment**, v. 16, n. 9, 1107-1114, 1993.
- NEUMANN, P. M., VOLKENBURGH, E. V.; CLELAND, R. E. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. **Plant Physiol.**, v. 88, p. 233-237, 1988.
- NEVES-PIESTUN, B. G.; BERNSTEIN, N. Salinity-induced inhibition of leaf elongation in maize is not mediated by changes in cell wall acidification capacity. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1419-1428, 2001.
- NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735-742, 1995.
- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, 1998.

NOMANI, H.; BOYER, J. S. Direct demonstration of a growth-induced water potential gradient. **Plant Physiology**, v. 102, p. 13-19, 1993.

NOTHNAGEL, F. A. Proteoglycans and related components in plant cells. **Int. Rev. Cytol.**, v. 174, p. 195-291, 1997.

PARDO, J. M.; QUINTERO, F. J. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. Disponível em: <http://genomebiology.com/2002/3/6/reviews/1017.1>, 2002.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. **Photosynthetica**, v. 41, p. 191-200, 2003.

PÉREZ-ALMEIDA, I.; CARPITA, N. C. Las  $\beta$ -galactosidasas y la dinámica de la pared celular. **Interciencia**, v. 31, n. 7, p. 476-482, 2006.

PRISCO, J. T. Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. **Rev. Bras. Bot.** v. 3, p. 85-94, 1980.

PRISCO, J. T. Contribuição ao estudo da fisiologia do estresse salino durante a germinação e estabelecimento da plântula de uma glicófito (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Tese de Prof. Titular de Fisiologia Vegetal**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará. pp. 65., 1987.

PRISCO, J. T., ENÉAS-FILHO, J. ; GOMES-FILHO, E. Effecty of NaCl salinity on cotyledons starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed. **Rev. Bras. Bot.**, v. 4, p. 63-71, 1981.

QIAGEN. [www.qiagen.com/literature/protocol/nreasymini.aspx](http://www.qiagen.com/literature/protocol/nreasymini.aspx).

RAMOLIYA, P. J.; PATEL, H. M.; PANDEY, A. N. effect of salinization of soil on growth and macro- and micro-nutrient accumulation in seedlings of *salvadora persica* (Salvadoraceae). **Forest Ecology and Management**, p. 181-193, 2004.

- REITER, W-D. The molecular analysis of cell wall components. **Trends in plant Science**, v. 3, n. 1, p. 27-32, 1998.
- RENGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1017-1023, 2006.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.; HRSG. **Molecular cloning – A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition**. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.
- SAWICKA, T.; KACPERSKA, A. Soluble and cell wall-associated  $\beta$ -galactosidases from cold-grown winter rape (*Brassica napus* L., var. *oleifera* L.). **J. Plant Physiol.**, v. 145, p. 357-362, 1995.
- SEARA, J., NICOLÁS, G.; LABRADOR, E. Autolysis of the cell wall. Its possible role in endogenous and IAA-induced growth in epicotyls of *Cicer arietinum*. **Physiologia Plantarum**, v. 72, p. 762-774, 1988.
- SEKIMATA, M.; OGURA, K.; TSUMARAYA, Y.; HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, S. a  $\beta$ -galactosidase from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **Plant Physiology**, v. 90, p. 567-574, 1989.
- SILVA, J. V.; LACERDA, C. F.; AZEVEDO-NETO, A. D.; COSTA, P. H. A.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E. (a) Crescimento e osmorregulação em dois genótipos de sorgo submetidos a estresse salino. *Revista Ciência Agronômica*, v. 34, n. 2, p. 125-131, 2003.
- SILVA, J. V.; LACERDA, C. F.; COSTA, P. H. A.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. (b) Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl<sub>2</sub>. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 15, n. 2, p. 99-105, 2003.
- SIMOS, G.; GEORGATSOS, J. G. Lactose-hidrolizing  $\beta$ -glycosidases of barley meal. **Biochem. et Biophysica Acta.**, v. 967, 17-24, 1988.



SIMOS, G.; GIANNKOUROS, T.; GEORGATSOS, J. G. Plant  $\beta$ -galactosidases: purification by affinity chromatography and properties. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2587-2592, 1989.

SINGH, B. B.; AJEIGBE, H. A.; TARAWALI, S. A.; FERNACEZ-RIVERA, S.; ABUBAKAR, M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. **Field Crops Research**, v. 84, p. 169-177, 2003.

SOSA, L.; LLANES, A.; REINOSO, H.; REGINATO, M.; LUNA, V. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. **Annals of Botany**, v. 96, p. 261-267, 2005.

SOUSA, M. F.; CAMPOS, F. A. P.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E. Growth and protein pattern in cowpea seedlings subjected to salinity. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 3, p. 341-346, 2003.

SUDÉRIO, F. B. Efeito do NaCl na atividade galactosidásica de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica Vegetal**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará. pp. 66., 2001.

SZABOLCS, I. Soil salinization. In: PESSARAKLI, M. (ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 3-11, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TERMAAT, A., PASSIOURA, J. B.; MUNNS, R. Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl-affected wheat and barley. **Plant Physiol.**, v. 77, p. 869-872, 1985.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

THIYAGARAJAH, M.; FRY, S. C.; YEO, A. R. *In vitro* salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 304, p. 1717-1724, 1996.

VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) – differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v. 165, p. 1411-1418, 2003.

WANG, D., SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M. Salinity reduces radiation absorption and use efficiency in soybean. **Field Crops Research**, v. 69, p. 267-277, 2001.

WANG, Y.; NIL, N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaina content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. **J. Hortic. Sci. Biotechnol.**, v. 75, p. 623-627, 2000.

XIONG, L.; ZHU, J. -K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 131-139, 2002.

YEO, A. Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 159-174, 1999.

YOKOI, S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Salt stress tolerant of plants. **JIRCAS Working Report**, p. 25-33, 2002.

ZENG, L., SHANNON, M. C.; LESCH, S. M. Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. **Agric. Water Management**, v. 48, p. 191-206, 2001.

ZHENG, J.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; FU, J.; GOU, M.; DONG, Z.; HOU, W.; HUANG, Q.; WANG, G. Comparative expression profiles of maize genes from a water stress-specific cDNA macroarray in response to high-salinity, cold or abscisic acid. **Plant Science**, v. 170, p. 1125-1132, 2006.

ZHU, J. -K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001.