



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

GISLAINY KARLA DA COSTA BARBOSA

**Purificação e Caracterização de β -Galactosidases
citosólicas e de parede celular de raízes de plântulas
de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. semeadas na
presença e na ausência de NaCl.**

FORTALEZA-CE
2007

GISLAINY KARLA DA COSTA BARBOSA

**Purificação e Caracterização de β -Galactosidases
citosólicas e de parede celular de raízes de plântulas
de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. semeadas na
presença e na ausência de NaCl.**

Tese submetida à coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho

FORTALEZA-CE

2007

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Azevedo U. Melo CRB-3/572

B197p Barbosa, Gislainy Karla da Costa

Purificação e caracterização de β -galactosidases citosólicas e de parede celular de raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. semeadas na presença e na ausência de NaCl / Gislainy Karla da Costa Barbosa .

197 f., il. color. enc.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Área de Concentração : Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho

1. Glicosidases 2. Raízes 3. Feijão-de-corda 4. Salinidade I. Enéas Filho, Joaquim (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

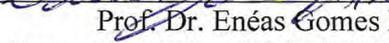
Esta tese foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

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

 Gislainy Karla da Costa Barbosa

TESE APROVADA EM: 3 de agosto de 2007

 Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Orientador

 Prof. Dr. Enéas Gomes Filho
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Conselheiro

Dr. José Hélio Costa
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Conselheiro

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira - UNIFOR
Conselheiro

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

“Este trabalho é dedicado, em primeiro lugar,
a Deus, meu criador. A Ele toda a glória e louvor”.

Dedico a José Íris, meu amado esposo, quem mais sofreu minhas ausências, mas que nunca deixou de acreditar. Dedico também à minha filhinha Gloria Christie que trouxe o sorriso para os meus lábios nas horas mais complicadas, e ao meu filho Davi, que justamente nesse momento, faz pulsar em mim dois corações em busca da vitória.

“Qualquer homem,
mesmo perfeito entre os homens,
não será nada, se lhe faltar
a sabedoria que vem de Deus”.

Sab. 9,6

AGRADECIMENTOS

Nenhum ser humano, por mais que se faça auto-suficiente, consegue seus objetivos unicamente por méritos próprios; por trás de suas conquistas se esconde sempre a “providência”, que chega pelas mãos de muitos, ou de poucos, não importa. O que é justo, é que nossas vitórias sejam um reflexo do dom de “saber para servir”, para o qual fomos criados.

Por isso, é com uma imensa satisfação que divido a minha alegria com cada um daqueles que participaram, direta ou indiretamente, desse trabalho. Todos os aparelhos, todos os reagentes e metodologias, todos os conselhos, palavras e simples olhares que transmitiram força e coragem foram a “providência” para alcançar este objetivo.

Fica registrado neste espaço o meu sincero agradecimento ao meu orientador Joaquim Enéas Filho, por todo o crédito depositado no meu trabalho, principalmente pelas vezes que este crédito precisou se revestir de paciência e obstinação.

Agradeço o apoio e as colaborações incontáveis do Professor Enéas Gomes Filho, que resultaram em valorosas contribuições para a finalização deste trabalho.

Agradeço ao Professor José Tarquínio Prisco que é exemplo de postura científica e colaboração profissional.

Ao meu companheiro de luta Fabrício Bomfim Sudério, por todos os momentos de batalha em que fomos apoio um para o outro, agradeço de todo o coração, desejando todo sucesso e os melhores frutos dessa vitória, que é nossa.

Aos queridos amigos do LABFIVE 1 e 2, minhas palavras não serão suficientes para agradecer toda ajuda, companheirismo e, principalmente, o respeito que eu encontrei em cada um de vocês, durante todo esse tempo de trabalho. A vocês, Michella, Daniela, Carlos Eduardo, Thalita, Alexcyane, Raquel, Elton, Paulo Henrique, Nara, Val, Juan, Franklin, Luana, Ayala, o meu sincero muito obrigada.

A você amiga Viviane Pinho de Oliveira, que tantas vezes foi meu anjo de providência, jamais negando qualquer ajuda pequena ou enorme, obrigada por existir na minha vida.

Este trabalho não seria realizado sem a colaboração efetiva de uma boa parte dos Laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, cujas portas sempre foram abertas em tempo oportuno. Assim agradeço, em primeiro lugar a toda a equipe do

Laboratório de Bioenergética que, sob comando da Profa. Dirce Fernandes de Melo, me acolheu como “filha adotiva” e tomou parte da luta nos piores e também nos melhores tempos. Aos meus irmãos, Alana Cecília Menezes, Maria Lúcia Franklin, Luciana Maia Moser, Érika Mota, Iuri Maia, Hélio Costa e Edson Garantizado e a todos que compõem esta equipe, fica registrado o meu agradecimento especial a cada um de vocês em particular.

Especialmente ao Dr. José Hélio Costa, pela realização da etapa de Caracterização Molecular e pela avaliação do trabalho, o meu muito obrigado pela dedicação e exemplo de competência.

À Profa Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão pelas importantes contribuições na elaboração e avaliação desse trabalho.

Meu agradecimento à toda equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal, sob comando do Prof. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira. Aos queridos Luiz Aguiar, Eduardo Voight, Lucilene e Thereza Christine por todo o apoio imprescindível para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Renato de Azevedo Moreira, pela valorosa colaboração e avaliação desse trabalho e por toda a disposição durante o desenvolvimento dessa tese.

À querida amiga Clébia, que tantas vezes se dispôs a ajudar, principalmente nesta última etapa de experimentos, o meu muitíssimo obrigado e o meu sincero desejo de vitória e sucesso para você.

À querida amiga Profa. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda por todo apoio e incentivos tão valiosos ao longo deste trabalho.

Enfim, meus agradecimentos a todos os laboratórios sob o comando dos Professores Francisco de Paiva Campos, Ana Lúcia Pontes Freitas, Norma Maria Benevides, José Thadeu Abreu de Oliveira, Ilka Maria Vasconcelos e Thales Barbosa Grangeiro.

Aos amigos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, que tanto nos facilitaram o trabalho. Obrigado a vocês, Marisa Leite, Márcio, Gildemar, Verônica, Maria, Edilberto, Francelma e Ednilda.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Buckeridge, do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo envio dos anticorpos anti- β -galactosidase.

Agradeço à amiga Márcia Sousa, da EMBRAPA-CNPAT, por todo o apoio e incentivo e pelo exemplo de seriedade e conduta profissional.

Perdoem-me pelo inevitável esquecimento de alguns nomes, já que muitos se fizeram tão importantes durante essa jornada. Deus abençõe a todos e que vocês sintam a satisfação de tomar parte da vitória de alguém que guarda com gratidão a sua amizade. Quem não vive para servir, não serve para viver. Obrigada.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e tecnológico (FUNCAP), pelo suporte financeiro;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Biblioteca Central da Universidade Federal do Ceará, que forneceu os subsídios necessários para a realização do levantamento bibliográfico;

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	17
RESUMO	18
ABSTRACT	20
1- INTRODUÇÃO	22
2- REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1- A Estrutura da parede celular	25
2.2 Crescimento celular e atividade enzimática.....	27
2.3- As β -galactosidases.....	29
2.4- As β -galactosidases são codificadas por uma família multigênica.....	33
2.5- O impacto da salinidade no crescimento da planta.....	35
2.6- A cultura do feijão-de-corda	38
3- OBJETIVOS	41
3.1- Objetivo Geral	41
3.2- Objetivos Específicos	41
4- MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1- Sementes e condições de germinação.....	42
4.2- Extração de proteínas citosólicas	44
4.3- Extração de proteínas ligadas à parede celular	44
4.4- Determinações das atividades das enzimas glucose 6-fosfato desidrogenase e fosfatase ácida nos extratos citosólicos e de parede celular.....	47
4.4.1-Atividade da glucose 6-fosfato desidrogenase	47
4.4.2. Atividade da fosfatase ácida	48

4.5- Determinações dos teores de proteína e da atividade β -galactosidásica	48
4.6- Purificação de β -galactosidasas	49
4.6.1. Fracionamento com sulfato de amônio	49
4.6.2. Cromatografia de troca iônica	51
4.6.3. Cromatografia de afinidade	52
4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições ácidas	53
4.7.1- Montagem dos géis e condições de corrida	53
4.7.2- Coramento de proteínas com nitrato de prata	55
4.7.3- Revelação da atividade β -galactosidásica	55
4.8- Caracterização Bioquímica das β -galactosidasas	56
4.8.1- Efeito do pH	57
4.8.2- Efeito da temperatura	57
4.8.3- Termoestabilidade	57
4.8.4- Determinações das massas moleculares	57
4.8.5- Termoinativação	58
4.8.6- Atividade enzimática em diferentes substratos.....	59
4.8.7- Efeito de açúcares na atividade β -galactosidásica.....	59
4.8.8- Análise cinética da atividade β -galactosidásica	60
4.9- Caracterização Molecular da β -galactosidase	60

4.9.1- Desenho de “primers”	61
4.9.2- Extração de RNA Total	61
4.9.3- Quantificação do RNA Total	63
4.9.4- Eletroforese do RNA Total	64
4.9.5- Reação de transcrição reversa (RT)	64
4.9.6. Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)	64
4.9.7. Eletroforese do cDNA amplificado de β -galactosidase	66
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1- Purificação de β -galactosidases citosólicas	67
5.2- Purificação da β -galactosidase associada à parede celular	72
5.3- Eletroforeses em gel de poliacrilamida de β -galactosidases.....	76
5.4- Caracterização das β -galactosidases	78
5.4.1- Determinações das massas moleculares aparentes	78
5.4.2- Efeito do pH.....	81
5.4.3- Efeito da temperatura	81
5.4.4- Termoestabilidade	84
5.4.5- Atividade das β -galactosidases em diferentes substratos	84
5.4.6- Efeito de açúcares na atividade β -galactosidásica	88
5.4.7- Termoinativação	91
5.4.8- Análise cinética da atividade β -galactosidásica	94
5.5. Caracterização molecular	96

5.5.1. Grau de pureza e integridade do RNA total	96
5.5.2- Expressão de gene(s) de β -galactosidasas	99
6- CONCLUSÕES.....	104
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Condições de semeadura das sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] em sala de cultivo sob condições controladas..... 43
- FIGURA 2-** 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 (NaCl 100mM)..... 45
- FIGURA 3-** Esquema de obtenção dos extratos contendo proteínas citosólicas e de parede celular de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba 46
- FIGURA 4-** Esquema de purificação de β -galactosidases a partir de extratos citosólicos e de parede celular provenientes de raízes de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba. 50
- FIGURA 5-** Sistema utilizado para a montagem do gel de separação..... 54
- FIGURA 6-** Gráfico da padronização da coluna de Sephadex G-150..... 58
- FIGURA 7-** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de cDNAs de β -galactosidases usado para o desenho dos “primers”. 62
- FIGURA 8-** Purificação da β -galactosidase I (β -gal I) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estádio de desenvolvimento III, em condições controle e em tratamento salino..... 69
- FIGURA 9-** Purificação da β -galactosidase I (β -gal I) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estádio de desenvolvimento VIII, em condições controle e em tratamento salino. 71
- FIGURA 10-** Purificação da β -galactosidase II (β -gal II) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino 74
- FIGURA 11-** PAGE-nativa em pH ácido da β -galactosidase citosólica (β -gal I) e da β -galactosidase presente na parede celular (β -gal II) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] nos estádios de desenvolvimento III e VIII, cultivadas em condições controle e em

tratamento salino.....	77
FIGURA 12- Perfis de eluição em coluna de Sephadex G-150 da β -galactosidase I de raízes de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento III, em condição controle e em tratamento salino, e no estágio VIII em condição controle e em tratamento salino.....	79
FIGURA 13- Perfis de eluição em coluna de Sephadex G-150 da β -galactosidase II de raízes de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento III, em condição controle e em tratamento salino, e no estágio VIII em condição controle e em tratamento salino.....	80
FIGURA 14- Atividade de β -galactosidases I e II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba em função do pH de ensaio.....	82
FIGURA 15- Efeito da temperatura do meio de ensaio na atividade de β -galactosidases I e II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba.....	83
FIGURA 16- Atividade de β -galactosidases I e II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba em função da temperatura de pré-incubação.	85
FIGURA 17- Termoinativação da β -galactosidase I de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba.....	92
FIGURA 18- Termoinativação da β -galactosidase II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba.....	93
FIGURA 19- Curvas de atividade enzimática em função de concentrações crescentes do substrato β -PNPG e seus respectivos gráficos duplos recíprocos (Lineweaver-Burk) da β -galactosidase I citosólica e da β -galactosidase II de parede celular de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba, no estágio de desenvolvimento VIII, cultivadas em condições controle.....	95

FIGURA 20- Análise cinética da atividade da β -galactosidase I de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba, no estágio de desenvolvimento III, em condições controle e em tratamento salino e no estágio VIII, em condições controle e em tratamento salino	97
FIGURA 21- Análise cinética da atividade da β -galactosidase II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba, no estágio de desenvolvimento III, em condições controle e no estágio VIII, em condições controle e de tratamento salino.....	98
FIGURA 22 Eletroforese em gel de agarose 1,5% de RNA total extraído de raízes de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba.....	100
FIGURA 23- Análise de transcritos de β -galactosidases de raízes de plântulas de feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cv. Pitiúba.....	102

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Fracionamento com sulfato de amônio dos extratos brutos contendo proteínas de citosol e de parede celular ----- 51
- TABELA 2-** Etapas do coramento dos géis com nitrato de prata, segundo BLUM *et al.* (1987), com modificações.----- 56
- TABELA 3-** Purificação da β -galactosidase presente no citosol (β -gal I) de raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino.----- 68
- TABELA 4-** Purificação da β -galactosidase presente na parede celular (β -gal II) de raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino.----- 73
- TABELA 5-** Atividade enzimática em diferentes substratos *p*-nitrofenil glicosídicos da β -galactosidase I de raízes de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino (NaCl a 100 mM).----- 86
- TABELA 6-** Atividade enzimática em diferentes substratos *p*-nitrofenil glicosídicos da β -galactosidase II de raízes de plântulas de feijão-de-corda em condições controle nos estádios de desenvolvimento III e VIII e em tratamento salino (NaCl a 100 mM) no estádio de desenvolvimento VIII. ----- 87
- TABELA 7-** Efeito de açúcares na atividade da β -galactosidase I de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII em condições controle, cultivadas em condições controle e em tratamento salino (NaCl a 100mM) ----- 89
- TABELA 8-** Efeito de açúcares na atividade da β -galactosidase II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, cultivadas em condições controle e em tratamento salino (NaCl a 100mM) ----- 90
- TABELA 9-** Relações de absorbância A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} para verificação do grau de pureza dos RNAs totais extraídos de raízes de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino (NaCl 100 mM). ----- 99

RESUMO

A β -galactosidase é uma das hidrolases envolvidas na modificação dos constituintes da parede celular durante os processos de alongamento celular e o conseqüente crescimento da planta. Com o intuito de esclarecer o papel dessas enzimas durante esses processos, realizou-se a purificação seguida da caracterização das β -galactosidasas citosólica e associada à parede celular presentes nas raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino. A finalidade desse estudo foi de realizar a análise comparativa entre as β -galactosidasas do citosol e presentes na parede celular, nos dois estádios de desenvolvimento; e entre as enzimas de plântulas submetidas aos tratamentos controle e salino. Inicialmente, sementes de feijão-de-corda foram semeadas em água destilada (tratamento controle) e em presença de NaCl a 100 mM (tratamento salino). Após as plântulas serem coletadas e separadas de acordo com os estádios de desenvolvimento morfofisiológico (III e VIII), as raízes foram separadas dos outros órgãos, liofilizadas e utilizadas para as extrações de proteínas citosólicas e de parede celular. O processo de purificação das β -galactosidasas consistiu de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex e cromatografia de afinidade em Lactosil-Sepharose. O perfil eletroforético da β -galactosidase citosólica (β -gal I) e da β -galactosidase associada à parede celular (β -gal II), em todas as condições estudadas, mostrou uma única banda protéica que correspondeu à mesma banda com atividade β -galactosidásica. As β -galactosidasas I e II, cujas massas moleculares foram 163 e 134 kDa, respectivamente, apresentaram pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de ensaio de 60°C. A termoestabilidade foi observada até a temperatura de 50°C, sendo as β -galactosidasas de parede celular mais sensíveis ao calor. As atividades dessas enzimas foram fortemente inibidas pela presença de galactose (70-79% de inibição) e levemente pela lactose, entretanto não foram afetadas pela arabinose e fucose. A glucose e, principalmente, a galactose protegeram parcialmente as enzimas contra a desnaturação pelo calor. A β -galactosidase citosólica e a associada à parede celular mostraram pequenas diferenças na especificidade pelo substrato. Os valores de K_m e de V_{max} para o β -PNPG foram respectivamente iguais a 0,657 mM e 0,707 $\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1}$ para a β -gal I, e iguais a 1,9 mM e 0,359 $\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1}$ para a β -gal II. A inibição promovida pela galactose nas atividades

das β -galactosidases I e II foram, respectivamente, dos tipos mista e competitiva ($K_i = 6,7$ mM). As análises de expressão dos transcritos de β -galactosidases das raízes de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba mostraram um nível de transcritos maior no estágio de desenvolvimento VIII do que no estágio III. Não foram visualizadas diferenças entre a expressão dos transcritos de β -galactosidases entre as raízes de plântulas semeadas em condições controle e em tratamento salino.

Palavras-chave: feijão-de-corda - salinidade; glicosidases-raiz

ABSTRACT

The β -galactosidase are one of hydrolases which are involved in the modification of cell wall components throughout the cellular elongation process and plant growth. To attempt elucidate the role of these enzymes during this process, display the purification and characterization of cytosolic and associated β -galactosidases from Pitiúba cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] roots of seedlings in development stages III and VIII, which were sown in distilled water (control treatment) and in NaCl (salt treatment). The purpose of this study was to analyse the β -galactosidases enzymes from both cytosol and cell wall root seedlings in different development stages, and to compare the enzymes from plants submitted to control and salt treatments. Firstly, Pitiúba cowpea seeds were sown in distilled water (control treatment) and in 100 mM NaCl (salt treatment). After the harvest and separation of the seedlings according to morphophysiological development stages (III and VIII), the roots were isolated from the other organs, lyophilized and brought to cytosolic and associated proteins extractions. The purification steps consisted of precipitation of the crude extract with ammonium sulphate, DEAE-Sephadex ion-exchange chromatography and Lactosyl-Sepharose affinity chromatography. The cytosolic (β -gal I) and associated-cell wall (β -gal II) β -galactosidases electrophoretic profile showed a once proteic band that corresponded to the same band containing β -galactosidasic activity. The β -galactosidases I and II, whose molecular mass were 163 and 134 kDa, respectively, had optimum pH of 4,5 and the assay optimum temperature was 60°C. The enzymes thermostability were at 50°C, and β -gal II had thermostability higher than cytosolic enzymes. The enzymes activities were inhibited strongly (70-79%) by free galactose, and slightly by free glucose. However, arabinose and fucose had no effect in activities. The glucose and, mainly, the galactose protected partial the enzymes against thermal denaturation. The cytosolic and associated-cell wall β -galactosidases showed differences in substrate specificities. The K_m e V_{max} values of enzymes with β -PNPG were 0,657 mM e 0,707 $\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1}$ for β -gal I, and 1,9 mM e 0,359 $\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1}$ for β -gal II. The galactose inhibited the cytosolic enzymes activity (mixed inhibition) and the associated-cell wall enzymes (competitive inhibition – K_i - 6,7 mM). The analysis of transcripts β -galactosidases expression in cowpea Pitiúba seedlings roots showed a higher transcripts level on development stage VIII than on development stage III. Differences couldn't

be viewed between transcripts β -galactosidases expression of roots from seedlings sown in control and salt treatments.

Keywords: cowpea - salinity; glycosidase - root.

1- INTRODUÇÃO

As paredes celulares de plantas superiores contêm um grupo de polissacarídeos altamente ramificados, denominados de hemiceluloses, tais como, os xiloglucanos, arabinoglucanos, galactomananos e galactanos que são predominantes nas paredes celulares primárias de dicotiledôneas. Estes polissacarídeos são funcionalmente definidos como aqueles que formam associações cruzadas não covalentes fortes com as microfibrilas de celulose (COSGROVE, 1999). Acredita-se que a natureza dinâmica dessas ligações cruzadas, principalmente dos xiloglucanos, seja o fator primordial na regulação do ajuste da parede celular, controlando o crescimento (alongamento) celular (WU *et al.*, 2001).

Numerosas atividades enzimáticas que fazem a hidrólise de glicanos são também relacionadas com a quebra das ligações cruzadas existentes entre os polissacarídeos constituintes da parede celular, fatores estes característicos dos processos autolítico e do “afrouxamento” da parede celular, que ocorrem antes do alongamento celular (COSGROVE, 2000).

Atividades enzimáticas associadas com paredes celulares de dicotiledôneas têm sido descritas por vários autores, entretanto, as enzimas mostrando atividade glicanohidrolítica têm recebido uma maior atenção. Dentre elas, encontram-se as β -galactosidases (PEREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006), β -xilosidases (FANUTTI *et al.*, 1993), glucosidases (NIKUS *et al.*, 2001) e glucanases (THOMAS *et al.*, 2000). Particularmente, as enzimas com atividade glucosidásica têm sido estudadas, desde que no processo de “afrouxamento” da parede celular ocorre degradação dos seus componentes estruturais devido suas ações. As glucosidases têm suas atividades aumentadas, também, durante o crescimento induzido por auxinas, hidrolisando polissacarídeos estruturais da parede celular (INOUE *et al.*, 2000). Bonghi *et al.* (1996) reportaram que as atividades das β -galactosidases e da β -xilosidase são altas em células em crescimento e que estão relacionadas com polissacarídeos, tais como, xiloglucanos, arabinoglucanos e galactanos, que sofrem mudanças durante o crescimento (JARVIS; MCCANN, 2000).

Estudos sobre α - e β -galactosidases presentes no citoplasma e em corpos protéicos foram realizados em diferentes órgãos de diferentes espécies de plantas (HALDER; BHADURI, 1997; BOM *et al.*, 1998; CHROST; SCHMITZ, 2000; KANG; LEE, 2001). A existência de β -galactosidases presentes em parede celular tem sido demonstrada em diversas partes da planta, tais como, em cotilédones (CORCHETE; GUERRA, 1987), em caules: hipocótilo e epicótilo (LI

et al., 2001), em folhas (SAWICKA; KACPERSKA, 1995) e em frutos (KITAGAWA *et al.*, 1995; YOSHIOKA *et al.*, 1995; ALI *et al.*, 1998). Estudos sobre isolamento e purificação de galactosidases têm mostrado que elas estão presentes em vários órgãos da planta e ocorrem sob várias formas (KITAGAWA *et al.*, 1995; SAWICKA; KACPERSKA, 1995; YOSHIOKA *et al.*, 1995; HALDER; BHADURI, 1997; ALI *et al.*, 1998; BOM *et al.*, 1998; CHROST; SCHMITZ, 2000; ENÉAS-FILHO, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2001; KANG; LEE, 2001; LI *et al.*, 2001). A purificação e a caracterização das β -galactosidases de diferentes órgãos da planta de diferentes cultivares de uma mesma espécie e de espécies diferentes e a comparação de suas propriedades são imprescindíveis para uma melhor compreensão de suas funções fisiológicas.

Quando as plantas são submetidas a condições de estresse hídrico e/ou salino, ocorrem várias alterações fisiológicas e morfológicas (ZENG *et al.*, 2001). O processo fisiológico mais sensível ao estresse é o alongamento celular, o qual pode conduzir a uma redução no crescimento das plantas. À medida que o grau de estresse aumenta, a pressão de turgescência se aproxima de zero e o alongamento celular pode ser muito inibido. Neste caso o crescimento é bastante reduzido (NEVES-PIESTUN; BERNSTEIN, 2001).

Algumas alternativas para solucionar o problema da salinização nas culturas irrigadas foram propostas: 1. recuperação dos solos salinizados; 2. seleção, através de melhoramento genético, de plantas que sejam mais resistentes ou tolerantes ao excesso de sais; 3. desenvolvimento de pesquisas no sentido de “domesticar” halófitas com potencial econômico; e 4. desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de encontrar um melhor manejo de glicófitas cultivadas em áreas salinizadas. Com exceção da primeira alternativa, o sucesso das demais depende do conhecimento da fisiologia e bioquímica de plantas submetidas ao estresse salino. Tais estudos são necessários durante todo o ciclo da planta, uma vez que o grau de susceptibilidade das espécies à salinidade varia com o estágio de desenvolvimento.

Os efeitos do estresse hídrico e/ou salino dependem do sistema enzimático que se está estudando, isto é, em alguns há aumento de atividade enzimática, em outros ocorre retardamento e em um terceiro grupo há inibição, dificultando o entendimento sobre seus efeitos no metabolismo vegetal. Os trabalhos existentes sobre os efeitos da salinidade nas atividades β -galactosidásicas estão relacionados com o citoplasma (em sementes de *Medicago sativa*, *Trifolium repens* e *T. brachycalycinum* (GONZALEZ-MURUA *et al.*, 1985), em sementes de lentilha (CORCHETE; GUERRA, 1986), em cotilédones de feijão-de-corda cv. Pitiúba

(ENEAS-FILHO *et al.*, 1995). Na literatura existem poucos dados sobre os efeitos do estresse salino sobre as atividades β -galactosidásicas de plantas, principalmente em raízes.

No estado do Ceará, o feijão-de-corda pode ser considerado como o mais importante representante de culturas de subsistência utilizado em projetos de irrigação. O clima do Nordeste brasileiro se caracteriza por uma precipitação pluviométrica irregular, existindo na região dois tipos de exploração agrícola: de sequeiro e sob regime de irrigação. O primeiro tipo de exploração é extremamente vulnerável à seca, razão porque tende a ser substituído, gradativamente, pela agricultura irrigada, como tem acontecido na grande maioria das zonas áridas e semi-áridas do globo. Além deste fenômeno, comum na agricultura de sequeiro, o manejo inadequado do solo e da água nos perímetros irrigados, pode ser responsabilizado pelo aumento da área salinizada, que inibe ou retarda o crescimento e a produção das culturas. De acordo com Gheyi, (2000), no Brasil, os problemas de salinidade localizam-se, principalmente, no semi-árido nordestino, aonde chegam a atingir cerca de 20 a 25% da área irrigada. Portanto, estudos que facilitem o entendimento dos processos bioquímicos e fisiológicos que envolvem os efeitos da salinidade no crescimento das plantas são de grande relevância.

Do exposto, verifica-se que apesar de existirem várias informações a respeito das β -galactosidases em plantas, seu papel fisiológico durante a germinação e o estabelecimento da plântula não foi esclarecido. Portanto, estudos que caracterizem a atividade β -galactosidásica podem fornecer valiosos subsídios para este esclarecimento e ainda para entender o envolvimento das β -galactosidases na resposta de plantas aos efeitos do estresse salino.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A estrutura da parede celular

A parede celular é um compartimento dinâmico, continuamente modificado durante o crescimento e a diferenciação celular. Apesar da diversidade morfológica, as paredes celulares vegetais podem ser classificadas em dois tipos principais: primárias e secundárias. A parede celular primária se origina durante a divisão celular e aumenta sua área superficial rapidamente durante a expansão da célula. A interface entre as paredes primárias de células vizinhas é denominada de lamela média, cuja composição difere do restante da parede, por ser rica em pectina e conter proteínas diferentes (TAIZ; ZEIGER, 2004). A parede secundária, por sua vez, forma-se depois de cessado o crescimento da célula, e pode se tornar altamente especializada em estrutura e composição, refletindo o estado diferenciado da célula (CARPITA; MCCANN, 2000).

As paredes celulares primárias descritas para as angiospermas são constituídas de uma rede de microfibrilas de celulose entrelaçada por hemiceluloses, embebidas em uma complexa matriz de polissacarídeos pécticos e glicoproteínas estruturais (JARVIS; MCCANN, 2000).

As microfibrilas de celulose são constituídas por longas cadeias lineares de β -D-glucose unidas por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$. Devido a sua estrutura cristalina, ela desempenha um papel fundamental na determinação da resistência da parede celular. A rigidez estrutural e a força da parede celular dependem da integridade da rede formada por celulose e hemiceluloses (glicanos) (REITER, 1998).

As hemiceluloses são polissacarídeos flexíveis que caracteristicamente ligam-se à superfície de celulose. O xiloglucano é a principal hemicelulose de dicotiledôneas e monocotiledôneas (exceto nas gramíneas). A maioria deles consiste em unidades heptassacarídicas repetidas, constituídas de quatro resíduos de $(1 \rightarrow 4)$ β -D-glucose e três resíduos de $(1 \rightarrow 6)$ α -D-xilose. Cerca de metade dessas unidades heptaméricas contém extensões de $(1 \rightarrow 2)$ β -D-galactose sobre a xilose. Os xiloglucanos de reserva das sementes não apresentam resíduos de $(1 \rightarrow 2)$ α -L-fucose terminais ligados a β -D-galactose na primeira posição, o que os diferencia dos xiloglucanos estruturais da parede celular de outros tecidos de dicotiledôneas (ALCÁNTARA *et al.*, 1999; VISSENBERG *et al.*, 2000).

Os resíduos contendo galactose são bastante ativos durante os processos de crescimento e diferenciação celular. Como exemplo disso, nos xiloglucanos, os resíduos galactosilados desempenham um papel importante no controle do entrelaçamento deste polímero com as microfibrilas de celulose e na atividade da enzima xiloglucano-endotransglicosilase (XET) (TINÉ *et al.*, 2003; PEREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006). Este fato justifica o aumento do metabolismo dos xiloglucanos durante o alongamento da célula, sendo um fator primordial na extensão da parede celular (PEREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006). De acordo com o desenvolvimento e com a espécie vegetal, a parede celular pode conter outros polissacarídeos hemicelulósicos, como, por exemplo, glucuronoarabinoxilano e glucomananos (COSGROVE, 2001).

As pectinas, polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, constituem cerca de um terço das paredes celulares de dicotiledôneas. Esses polissacarídeos ácidos parecem formar uma rede tridimensional independente, entrelaçada de forma mecânica com a rede de celulose-xiloglucano, sendo constituídos de uma mistura complexa de homogalacturonano (HG) e polímeros de ramnogalacturonano I (RG I) e de ramnogalacturonano II (RG II). Os polissacarídeos pécticos variam principalmente nas cadeias laterais neutras (COSGROVE, 2001). Têm sido propostos diversos papéis para os polímeros pécticos incluindo a regulação da adesão entre células, a expansão celular, a mediação da porosidade da parede celular, fonte de moléculas de sinalização, eventos de diferenciação celular e organogênese (REITER, 1998).

Em adição aos polissacarídeos, a parede celular de plantas contém muitas proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos. Algumas proteínas desempenham apenas papel estrutural e são classificadas como proteínas ricas em glicina (GRPs) e proteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs) (FRY, 1995; REITER, 1998). Outras estão envolvidas na modificação da matriz de polissacarídeos. Estas incluem várias endoglicanases que são capazes de clivar a cadeia principal; as glicosidases que removem cadeias laterais e as transglicosilases, que tem a habilidade de cortar e ligar polissacarídeos. Fazem parte ainda deste grupo as esterases, que são capazes de remover grupos metilas das pectinas e clivar ligações ésteres entre as cadeias de polissacarídeos, e as peroxidases que podem formar ou quebrar ligações fenólicas (COSGROVE, 2001).

2.2- Crescimento celular e atividade enzimática

O crescimento e o desenvolvimento das plantas é um processo contínuo que integra afrouxamento e síntese da parede celular. O alongamento celular é primeiramente controlado pela absorção osmótica de água seguida pela distensão irreversível da parede celular (BAGATHARIA; CHANDA, 1998). Existem várias enzimas envolvidas na modificação da parede celular e suas ações parecem controlar o processo de crescimento da célula (THOMAS *et al.*, 2000). Com base nisto, várias enzimas de parede celular de tecidos em crescimento têm sido amplamente investigadas, e algumas teorias que tentam explicar os mecanismos de crescimento celular foram propostas, embora, muitas vezes esbarrem em contradições (LI *et al.*, 2003).

De modo geral, para que ocorra o crescimento de uma célula vegetal, a parede celular que a reveste deve sofrer uma distensão, permitindo que a célula aumente de tamanho. Grande parte do processo de distensão da parede celular deve-se à clivagem seletiva de uma série de polímeros da matriz, que unida por ligações covalentes, pontes de hidrogênio e outras forças intermoleculares, restringem a expansão celular. Conforme a turgidez pressiona até um determinado limite de tensão as moléculas de hemicelulose, as pontes de hidrogênio entre as microfibrilas são rompidas causando a extensão plástica irreversível, proporcionando a expansão celular (FRY, 1989). Propõe-se ainda, que simples mudanças nas massas moleculares dos polímeros da parede celular, resultado da ação de endopolissacaridases, ou pela remoção de cadeias laterais essenciais, permitem sua extensão (NEUMANN, 1995).

Um grupo de proteínas denominadas expansinas é amplamente citado na literatura como sendo responsável por alguns mecanismos envolvidos na extensão da parede celular. Segundo Cosgrove (1997), existem muitas evidências de que as expansinas agem rompendo as associações não covalentes entre os polissacarídeos, permitindo o afrouxamento da parede celular. No entanto, a base molecular da ação destas enzimas permanece incerta. Em hipocótilo de pepino, observaram que a hidrólise dos polissacarídeos contribuiu muito pouco para a distensão da parede celular e que as expansinas provavelmente agem na quebra das pontes de hidrogênio, relaxando as ligações entre os xiloglucanos e as microfibrilas de celulose (MCQUEEN-MASON *et al.*, 1993). Wu e Cosgrove (2000) estudaram algumas proteínas de parede celular durante a adaptação de raízes de plântulas de milho ao baixo potencial hídrico. Eles constataram que houve um aumento na extensibilidade da parede celular na zona apical da raiz (2-3 mm do ápice), associado com o aumento da atividade das expansinas.

Outra enzima implicada nestes processos é a xiloglucano-endotransglicosilase. Esta enzima é capaz de separar cadeias de xiloglucano e ligá-las novamente, permitindo a integração de novas moléculas de xiloglucano sintetizadas durante este processo (VISSENBERG *et al.*, 2000; COSGROVE, 2001).

As glicosidases constituem um grupo variado de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas em oligo e polissacarídeos e que variam na sua especificidade pelo substrato (HENRISSAT, 1991). Essas enzimas têm sido investigadas quanto ao papel que elas podem desempenhar nos processos de crescimento celular. Kavi Kishor *et al.* (1992) detectaram atividades de α - e β -glucosidases, α - e β - galactosidases, α -manosidase, β -1,3-glucanase e invertases presentes em frações citoplasmáticas e de parede celular isoladas de cultura de calos de algodão (*Gossypium hirsutum*). A atividade dessas enzimas foi associada ao crescimento dos calos. Além disso, a atividade β -galactosidásica foi mais significativa nas frações citoplasmáticas, enquanto que a β -glucosidase foi mais representativa entre as enzimas associadas à parede celular. Segundo Lorences e Fry (1993), a ação combinada das enzimas α -D-xilosidase, β -D-glucosidase, α -L-fucosidase e β -D-galactosidase modularia a ação da XET no reparo ou distensão da parede celular em folhas de *Phaseolus vulgaris* e caules de *Pisum sativum*.

O metabolismo da parede celular envolve a liberação de partes específicas de seus componentes pela própria parede, processo denominado autólise. A autólise destaca-se no mecanismo de afrouxamento da parede celular, uma vez que libera β -(1-3), (1-4)-glucanos, cuja degradação acompanha o alongamento da célula (LABRADOR; NICOLÁS, 1985). As α - e β -galactosidases são as principais enzimas glicano-hidrolíticas envolvidas neste processo (SEARA *et al.*, 1988; VALERO; LABRADOR, 1993; GALEGO; ZARRA, 1998). Em experimentos com ervilha, Labrador & Nicolás (1985), observaram que a parede celular de epicótilos jovens com alta capacidade de crescimento mostrou maiores capacidades autolíticas que epicótilos mais velhos. Eles também estudaram as proteínas responsáveis pela autólise e verificaram que a α -galactosidase apresentou a maior atividade, enquanto a β -galactosidase, a α -arabinosidase e a exoglucanase mostraram atividades um pouco menores. Por outro lado, Dopico *et al.* (1990) estabeleceram a β -galactosidase como a principal enzima envolvida na autólise de epicótilos de *Cicer arietinum*.

Bagatharia e Chanda (1998) investigaram as atividades de algumas glicosidases, incluindo a β -galactosidase, durante o crescimento de hipocótilos de *Phaseolus vulgaris*. As

atividades das glicosidases foram detectadas tanto nas frações citoplasmáticas quanto nas frações ligadas à parede celular, sendo mais pronunciadas nas citoplasmáticas.

Iglesias *et al.* (2006) estudaram as expressões dos genes de α -fucosidase, α -xilosidase, β -galactosidase e β -glucosidase presentes nos fluidos apoplásticos de vários tecidos de *Arabidopsis thaliana*, associando-as à degradação dos xiloglucanos. O nível de expressão desses genes foi analisado em diferentes partes da planta (folhas, caules, raízes, flores) usando RT-PCR. Os padrões de expressão foram muito diversos, bem como as relações com as taxas de crescimento, mostrando uma situação muito complexa, onde a expressão de determinados genes variou entre os diferentes órgãos e com o estágio de desenvolvimento dos tecidos, principalmente o que diz respeito à β -galactosidase.

Apesar de existirem alguns trabalhos com enzimas oriundas de frações citoplasmáticas (BAGHATARIA; CHANDA, 1998; SAWICKA; KACPERSKA, 1995), não se têm registros sobre a localização intracelular de glicosidases, além da parede celular, membrana plasmática e fluidos apoplásticos (MINIC; JOUANIN, 2006). À exceção feita para a β -glucosidase que foi detectada também em plastídios, proplastídios, citoplasma e células-guarda em arroz, trigo e milho (NIKUS *et al.*, 2001). Essas enzimas podem ter outras funções além da hidrólise de polissacarídeos da parede celular, tais como defesa da planta ao ataque de patógenos, hidrólise de polissacarídeos de reserva e de porções glicosídicas de glicoproteínas e glicolípídeos ou de diferentes metabólitos presentes na parede celular (MINIC; JOUANIN, 2006).

Ressalta-se que, apesar da grande diversidade dos estudos sobre as enzimas que estão envolvidas nos processos metabólicos de crescimento, o papel destas enzimas ainda não foi totalmente esclarecido, e muitos pontos da fisiologia e bioquímica do crescimento das plantas ainda precisam ser investigados (WU; COSGROVE, 2000).

2.3- As β -galactosidases

Toda a dinâmica da galactose presente nos tecidos vegetais envolve as β -galactosidases (E.C.3.2.1.23), são exo-galactanase com habilidade de hidrolisar resíduos terminais não redutores de β -D-galactose de polissacarídeos, de oligossacarídeos, de glicoproteínas e de glicolípídeos (BOM *et al.*, 1998; CHROST; SCHMITZ, 2000). Essas enzimas são amplamente distribuídas na natureza. Em mamíferos e *Escherichia coli* são comumente associadas com a hidrólise da lactose em galactose e glucose (MATTHEWS, 2005). A ação destas enzimas em

plantas resulta na liberação de energia para os processos rápidos de crescimento como a mobilização de xiloglucanos em cotilédones, na liberação de galactose durante a reciclagem metabólica de galactolipídios, de glicoproteínas e de componentes da parede celular e na degradação da parede celular durante a senescência (SMITH; GROSS, 2000; TINÉ *et al.*, 2000; ROGERS *et al.*, 2001). Embora as atividades da maioria das β -galactosidases (exogalactanases) resultem na degradação de polissacarídeos da parede celular, algumas delas seriam capazes de atuar em atividades biossintéticas específicas, uma vez que em condições termodinamicamente favoráveis, *in vitro*, elas podem agir em reações de transglicosilação e hidrólise reversa (BONNIN *et al.*, 1995; YOON; AJISAKA, 1996).

Na classificação das glicosil hidrolases feita por Henrissat (1991), as β -galactosidases pertencem à família 35 apresentando seqüências de aminoácidos semelhantes às β -manosidases e às β -glucuronidases. Essas enzimas catalisam a hidrólise enzimática das ligações glicosídicas entre dois carboidratos ou entre um carboidrato e uma molécula não carboidrato via catálise ácida que requer dois resíduos críticos: um doador de prótons e uma base nucleofílica. No caso das β -galactosidases, o segundo glutamato presente no sítio ativo é o doador de prótons e a hidrólise ocorre via retenção completa da configuração anomérica, de tal forma que o produto retém a mesma configuração anomérica do substrato (MATTHEWS, 2005; PEREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006).

Devido ao seu envolvimento no metabolismo da parede celular, as β -galactosidases são estudadas com o intuito de entender os mecanismos precisos pelos quais atuam na hidrólise de ligações glicosídicas (KANG; LEE, 2001; MARANVILLE; ZHU, 2000). Elas têm sido detectadas no citosol e na parede celular de diferentes tecidos em crescimento, tais como parte aérea (DOPICO *et al.*, 1990; KONNO; TSUMUKI, 1993), folhas (HIRANO *et al.*, 1994; SAWICKA; KACPERSKA, 1995), raízes (BOM *et al.*, 1998), frutos (PRESSEY, 1983; DE VEAU *et al.*, 1993; KITAGAWA *et al.*, 1995) e sementes (ENEAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001) de onde foram purificadas, caracterizadas, e suas atividades analisadas com base no crescimento e desenvolvimento.

Tendo em vista que as auxinas são hormônios que estimulam o crescimento da planta, Valero & Labrador (1995), trabalhando com epicótilos de *Cicer arietinum*, estudaram os efeitos do ácido indol acético (AIA) nas enzimas glicano-hidrolíticas da parede celular. O padrão eletroforético indicou que aparentemente não houve síntese *de novo* de nenhum polipeptídeo específico em resposta ao hormônio. No entanto, houve um acréscimo na intensidade de alguns

polipeptídios, o que indicaria um incremento na biossíntese das proteínas da parede celular. Além disso, eles observaram que houve um aumento significativo na atividade específica da β -galactosidase como resposta à incubação com AIA.

Kundu *et al.* (1990) realizaram a purificação parcial e a caracterização de múltiplas formas de β -galactosidases em sementes de *Vigna radiata*. Foram obtidos quatro picos de atividade β -galactosidásica, indicando a presença de quatro isoformas, as quais apresentaram massas moleculares iguais a 44, 67, 83, e 96 kDa determinados por filtração em gel. O máximo de atividade foi observado entre pH 3,5 e 4,0. Em pH 4,0, três isoformas mostraram-se mais ativas a 55°C, enquanto outra isoforma mostrou-se mais ativa a 60°C. Após 30 min de pré-incubação a 55°C e pH 5,0, uma das enzimas manteve 71% de sua atividade inicial, enquanto as outras três mantiveram 80% de suas atividades iniciais. No entanto, quando pré-incubadas a 60°C, as enzimas apresentaram perdas maiores que 50% em suas atividades.

Konno e Tsumuki (1993), ao trabalharem com β -galactosidase da parte aérea de plântulas de arroz, observaram que esta enzima apresentava peso molecular 42.000 e pI igual a 6,0. A atividade enzimática foi ótima em pH 3,4 com temperatura ótima de 55°C. Além disso, eles observaram que a atividade enzimática mostrou-se estável por no mínimo três meses quando armazenada a -20°C.

Uma única isoforma de β -galactosidase, com cerca de 60 kDa, foi purificada de folhas de *Camellia sinensis*. Essa isoforma mostrou um pH ótimo de 4,0 e temperatura ótima igual a 50°C. O K_m para a lactose foi de 4,2 mM determinado com β -PNPG. A galactose inibiu competitivamente a atividade dessa β -galactosidase com um K_i igual a 2,4 mmol/L. Além disso, na concentração de 5 mmol/L, a galactose protegeu parcialmente a enzima contra a inativação térmica (HALDER; BHADURI, 1997).

Uma β -galactosidase foi purificada de sementes de *Kestingeilla geocarpa* cerca de 31 vezes, através de cromatografias de troca iônica em DEAE-celulose seguida de filtração em gel Sephadex G 100. A atividade enzimática foi inibida de forma competitiva pela lactose, pela galactose e pela glucose com K_i respectivamente iguais a 26, 59,5 e 49 mM. O padrão de inibição para a glucose mudou de competitivo, em baixas concentrações, para não competitivo em concentrações mais elevadas de glucose. A galactose também protegeu essa enzima contra a termoinativação irreversível (CHILAKA *et al.*, 2002).

Biswas *et al.* (2003), utilizando cinco diferentes etapas, purificaram uma β -galactosidase de sementes de *Phaseolus vulgaris*. Em condições nativas, essa enzima apresentou uma massa

molecular de 75 kDa, e mostrou ser um heterodímero com massas iguais a 45 e 30 kDa. O pH ótimo para a enzima foi de 4,0 e a termoestabilidade foi observada até 67°C. O K_i para a inibição competitiva pela galactose foi de 2,7 mMol/L. Existem poucos trabalhos de purificação e caracterização de β -galactosidases de tecidos vegetativos. A grande maioria deles trata-se de frutos, sementes ou cotilédones. Não existem trabalhos dessa natureza com raízes.

Tendo em vista a correlação entre atividade enzimática e crescimento, é de se esperar que a redução do crescimento causada por algum fator ambiental como a alta ou baixa temperatura, o déficit hídrico ou a salinidade, possa estar associada com mudanças nas atividades dessas enzimas (MURRAY; BANDURSKI, 1975). No entanto, pouca atenção vem sendo dada ao comportamento das enzimas envolvidas no crescimento de plantas sob condições de estresse (THIYAGARAJAH *et al.*, 1996).

Zabotin *et al.* (1998), trabalhando com raízes de trigo (*Triticum aestivum*), observaram que durante as primeiras horas de exposição à baixa temperatura, houve uma inibição no crescimento das raízes e uma redução no conteúdo de pectina e de hemicelulose da parede celular atribuída a um aumento nas atividades de algumas glicosidases, entre elas a β -galactosidase. Por outro lado, Sawicka e Kacperska (1995), trabalhando com folhas de *Brassica napus*, isolaram uma isoforma solúvel de β -galactosidase com massa molecular estimada em 65 kDa, e duas isoformas presentes na parede celular. As temperaturas ótimas para as enzimas solúveis e para as associadas à parede celular foram de 50°C e 55°C, respectivamente, e o pH ótimo foi igual a 4,0 para todas elas. As β -galactosidases associadas à parede celular foram mais termoestáveis até 60°C que as enzimas solúveis. Eles observaram também que o frio causou uma redução de cerca de 38% na atividade específica da β -galactosidase solúvel e de 70% nas atividades específicas das β -galactosidases associadas à parede celular.

Estudos, *in vitro*, com algumas hidrolases, incluindo as α - e β -galactosidases de folhas de *Sueda maritima* (halófito) e de hipocótilos de *Vigna radiata* e de *Cicer arietinum*, mostraram que o NaCl, em concentrações de até 1 M, praticamente não afetou a atividade destas enzimas, principalmente as de parede celular, que se mostraram mais tolerantes à salinidade (THIYAGARAJAH *et al.*, 1996).

A inibição da expansão celular em plantas submetidas a estresse salino, apesar da manutenção da pressão de turgescência ou, até mesmo, quando esta é aumentada, sugere que a salinidade possa interferir no afrouxamento da parede celular, podendo este efeito estar relacionado com a atividade das galactosidases, as quais parecem estar envolvidas neste processo

(SUDÉRIO, 2001). Apesar disto, existem poucos estudos, *in vivo*, sobre os efeitos da salinidade nas atividades de β -galactosidases. A maioria deles enfoca a fase de germinação das sementes (GONZÁLES-MURUA *et al.*, 1985; CORCHETE; GUERRA, 1986), sendo dada pouca atenção à fase de estabelecimento da plântula. Vale ressaltar que não existem estudos desta natureza em raízes.

Enéas-Filho *et al.* (1995) estudaram os efeitos da salinidade nas atividades de galactosidases extraídas de cotilédones de *Vigna unguiculata* durante a germinação e o estabelecimento da plântula. Eles verificaram que a salinidade reduziu o crescimento da plântula em cerca de 65,4% e causou modificações nas atividades das α - e β -galactosidases do tratamento salino, entretanto, os experimentos *in vitro* demonstraram que a salinidade não afetou as atividades enzimáticas. Estes autores sugerem que *in vivo*, a salinidade retarda a solubilização e/ou ativação destas enzimas ou a sua renovação. Já em caules de plântulas dessa mesma espécie, a salinidade inibiu e retardou o crescimento desse órgão, sendo verificada uma correlação entre o crescimento dos caules e as atividades α - e β -galactosidásicas (SUDÉRIO, 2001).

2.4- As β -galactosidases são codificadas por uma família multigênica

É comum encontrar famílias multigênicas em plantas quando as funções das enzimas que eles codificam estão começando a elucidar-se. Por exemplo, o genoma de *Arabidopsis* contém uma extensa família de genes com 18 seqüências descritas como codificantes dessas proteínas. Tal família pode estar relacionada com vários processos associados com o crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo a hidrólise de tipos diferentes de polissacarídeos (xiloglucanos, proteínas com arabinogalactanos-AGPs ou cadeias laterais de ramnogalacturonanos I), cuja ocorrência é espacial e/ou temporalmente regulada (PEREZ-ALMEIDA; CARPITA, 2006). A atividade de diferentes membros dessa família provavelmente ocorre em diferentes tecidos e tipos de células, assim como em diferentes períodos do crescimento. Alguns genes de β -galactosidases de *Arabidopsis thaliana* (*AtBGALs*) podem contribuir na degradação ou no afrouxamento da parede celular, outros podem expressar-se em células ou tecidos específicos, ou em regiões distintas da parede celular. A caracterização das atividades enzimáticas *in vitro* e *in vivo*, junto com a determinação da localização da expressão gênica e o acúmulo das proteínas, levará a um entendimento mais completo da função de cada

AtBGAL, conhecimento que poderá se estender para as plantas cultivadas (YOSHIOKA *et al.*, 2003).

Foram identificados membros da família de genes de β -galactosidases em fumo (ROGERS *et al.*, 2001), em laranja (WU; BURNS, 2004), em morango (TRAINOTTI *et al.*, 2001) e em pêra (MWANIKI *et al.*, 2005). Durante o amadurecimento do tomate são expressos pelo menos sete genes que codificam β -galactosidases, as quais compartilham em torno de 33 a 79% de semelhança em suas seqüências de aminoácidos (SMITH; GROSS, 2000). Em estudos posteriores, a redução dos níveis de mRNA do gene *TBG4*, que codifica para a β -galactosidase II, foi correlacionada com a redução da atividade β -galactosidásica e com o retardamento do processo de amaciamento do tomate (SMITH *et al.*, 2002).

Nas paredes celulares de epicótilos de *Cicer arietinum*, foi detectada uma família de genes de β -galactosidases associadas com a degradação de pectinas durante o crescimento. A clonagem e o padrão de expressão de cDNAs de quatro desses genes (*CanBGal-1*, *CanBGal-3*, *CanBGal-4* e *CanBGal-5*) de plântulas em vários estádios de desenvolvimento sugeriram diferentes papéis para suas proteínas correspondentes na planta. A expressão de *CanBGal-5* estava relacionada com tecidos jovens e meristemáticos com taxa de divisão celular elevada, como ganchos, epicótilos muito jovens e entrenós apicais. Por outro lado, *CanBGal-1* e *-4* estavam mais associados a estágios mais avançados do crescimento do epicótilo, estando mais presentes nos entrenós basais. Em plantas adultas, *CanBGal-1* mostrou o mais alto nível de expressão em folhas, enquanto *CanBGal-4* foi melhor representada em raízes (ESTEBAN *et al.*, 2005). O gene *CanBGal-3*, posteriormente foi utilizado na transformação de plântulas de *Solanum tuberosum*, as quais apresentaram um incremento nas atividades β -galactosidásicas e que foram associadas com a redução do conteúdo de galactose da parede celular (MARTÍN *et al.*, 2005).

Zhang e Liu (2005) isolaram um cDNA completo que codifica para β -galactosidase de fibras de algodão (*Gossypium hirsutum*), designado *GhGal1*. Os transcritos de *GhGal1* foram regulados espacialmente e temporalmente e estiveram presentes em abundância no estágio de alongamento da fibra, estando provavelmente associados com o metabolismo da parede celular primária.

Existem ainda poucos estudos de genes de β -galactosidases expressos em órgãos vegetativos, tais como raízes, epicótilos e folhas. As β -galactosidases têm sido caracterizadas

bioquimicamente em diferentes plantas, entretanto, o conhecimento do ponto de vista molecular teve início há pouco tempo (ESTEBAN *et al.*, 2003).

2.5- O impacto da salinidade no crescimento da planta

A salinidade atinge em torno de 930 milhões de ha de terra do mundo e esse número vem aumentando. Um estudo sobre as terras em uso em todo o mundo prediz que em 45 anos 6% delas tornar-se-ão salinizadas (MUNNS, 2002). Este problema afeta a agricultura, principalmente em regiões áridas e semi-áridas de todo o mundo. Na maioria das vezes, a salinização é decorrente do manejo inadequado do solo e da água. Desse modo, a drenagem deficiente e a utilização de águas com elevados riscos de salinidade e de adubos com elevado índice salino são fatores que aceleram o processo de salinização (OLIVEIRA, 1997). Portanto, a área irrigada é particularmente um risco, com aproximadamente 19,5% atingidos pela salinidade (FAO, 2000). Estima-se que, apesar de relativamente pequena, a zona irrigada seja responsável por um terço da alimentação mundial, portanto a salinização nessa área requer atenção (MUNNS, 2002).

No Brasil os problemas da salinidade encontram-se principalmente no semi-árido nordestino. Um levantamento realizado pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), em 1991, em alguns estados nordestinos, inclusive no Ceará, mostrou que, em média, 12% das terras em uso foram desativadas e 7,6% estavam salinizadas (GHEYI, 2000).

O excesso de sais no solo pode afetar as plantas de três maneiras: reduzindo a disponibilidade de água devido à diminuição do potencial hídrico do solo, causando toxicidade através do acúmulo de íons específicos e provocando desbalanço nutricional (AMZALLAG, 1997; CAINNES; SHENNAN, 1999). No primeiro caso, a elevada concentração de sais causa uma diminuição do potencial osmótico e, conseqüentemente, provoca a redução do potencial hídrico no ambiente radicular. Isto proporciona uma redução na absorção de água pelas plantas (GHEYI, 2000). Por outro lado, quantidades excessivas de íons específicos nos tecidos, principalmente de Na^+ e Cl^- , ocasionam toxidez e conduzem a desordens no metabolismo da planta (PRISCO; O'LEARY, 1970; GREENWAY; MUNNS, 1980). Além disso, os sais podem causar um estado de desequilíbrio nutricional na planta, onde o excesso de determinado íon afeta a disponibilidade do outro (LEOPOLD; WILLING, 1984). Assim, um excesso de Na^+ pode induzir a deficiência de K^+ e de Ca^{2+} e a absorção de

NO_3^- pode ser inibida por Cl^- (SHANNON, 1992). A redução no gradiente de potencial hídrico no sistema solo-planta provocada pela salinidade dificulta a absorção da água, favorecendo o aparecimento do déficit hídrico. Esta seria a causa primária da inibição do crescimento das plantas cultivadas em solos salinos, como conseqüência das alterações de muitos processos metabólicos que induzem modificações anatômicas e morfológicas (SOHAN *et al.*, 1999). Essas alterações dependem não só da espécie da planta como também da concentração dos sais, do tempo de exposição e da composição específica destes sais (SHANNON, 1992).

Muitos pesquisadores têm estudado os efeitos do NaCl durante as fases de germinação e de estabelecimento da plântula. Em glicófitas, a etapa de estabelecimento da plântula é mais afetada pela salinidade do que o processo de germinação (PRISCO, 1987; LUTTS *et al.*, 1995), embora a elevada concentração de sais no ambiente radicular provoque uma diminuição na velocidade e na percentagem da germinação (PRISCO *et al.*, 1981). Lacerda (1995) trabalhando com *Vigna unguiculata* em diferentes fases de desenvolvimento observou que os efeitos do NaCl sobre o crescimento foram menores durante a germinação do que durante o estabelecimento da plântula. Gomes-Filho & Prisco (1978), trabalhando com cotilédones de *Vigna unguiculata*, constataram que a salinidade retardava a hidrólise e/ ou o transporte dos produtos de hidrólise protéica dos cotilédones para o eixo embrionário afetando seu crescimento. Em relação às etapas de crescimento posteriores ao estabelecimento da plântula, tem-se observado maior sensibilidade durante o crescimento vegetativo do que durante a produção (LUTTS *et al.*, 1995; UNO *et al.*, 1996).

As plantas tolerantes à salinidade são designadas como halófitas. Estas plantas possuem características morfofisiológicas específicas e adequadas para sobreviverem em condição de salinidade. As que são denominadas glicófitas sofrem inibição no crescimento até mesmo em baixos níveis de sais e incluem a maioria das espécies cultivadas (GREENWAY; MUNNS, 1980; SERRANO; GAXIOLA, 1994). Apesar dessa distinção entre estes dois grupos, a resistência à salinidade varia em termos de espécies cultivadas e, até mesmo numa mesma espécie, entre cultivares (LUTTS *et al.*, 1995). Isto demonstra a grande variabilidade genética para a tolerância ao estresse salino (CAINNES; SHENNAN, 1999).

Além da variabilidade genética, o estágio de desenvolvimento da planta é um outro fator intrínseco que influencia o grau de resistência ao estresse salino. Apesar da salinidade poder afetar as plantas em todas as fases de seu desenvolvimento, a fase ou estágio mais sensível é uma

característica da espécie ou da variedade (LUTTS *et al.*, 1995). Fatores ambientais incluindo temperatura, umidade e intensidade de radiação podem interagir com a salinidade, agravando seus efeitos sobre as plantas (BOHNERT *et al.*, 1995; SHANNON; GRIEVE, 1999). O tempo de exposição à salinidade é um outro fator a ser considerado (AMZALLAG, 1997; CAINNES; SHENNAN, 1999). Em diversos trabalhos, as respostas das plantas ao estresse salino são analisadas com base nos efeitos do NaCl no crescimento da parte aérea (caule e folhas), das folhas, do epicótilo, do hipocótilo e das raízes (SELLIGMANN; AMZALLAG, 1995; MAMO *et al.*, 1996; DE PASCALE *et al.*, 1997; SANTA-CRUZ *et al.*, 1997; CHEN, *et al.*, 1999).

Plântulas de *Stylosanthes humilis* submetidas a diferentes concentrações de NaCl apresentaram o comprimento da parte aérea reduzido por baixas concentrações de NaCl, enquanto que a raiz foi mais tolerante, com o seu comprimento reduzido apenas em concentrações mais elevadas de NaCl (LOVATO *et al.* 1999).

Em análises dos efeitos dos estresses hídrico (BEZERRA, 1996) e salino (SOUSA *et al.*, 2003) em vários estádios de desenvolvimento morfofisiológicos de plântulas de feijão-de-corda demonstraram que, quando submetidas ao estresse, essas plântulas levavam em torno de 5 dias a mais para atingirem o estágio de desenvolvimento VIII (radícula maior que 5 cm, folhas cotiledonares abertas cotilédones fora do papel e hipocótilo reto) do que as plântulas em tratamento controle, sugerindo que os estresses hídrico e salino retardaram o crescimento e o desenvolvimento destas plantas.

Lutts *et al.* (1995), estudando cinco variedades de arroz (*Oryza sativa*), observaram vários níveis de resistência à salinidade em diferentes estádios específicos de crescimento, tendo sido as plântulas mais jovens as mais sensíveis ao NaCl. Além disto, plantas no mesmo estágio de desenvolvimento apresentaram respostas variáveis de acordo com o critério usado para quantificar a resistência à salinidade. Segundo estes autores, a identificação de genótipos resistentes aos sais em estádios específicos de desenvolvimento é essencial para o entendimento da fisiologia do estresse salino.

Mudanças rápidas, metabolicamente controladas, nas propriedades físicas da parede celular em crescimento, causadas por efeitos osmóticos ou outros, parecem regular o crescimento em resposta à salinização da raiz (NEUMANN, 1993). Corroborando com isso, Patakas e Noitsakis (1997) consideraram a elasticidade da parede celular o mais importante mecanismo fisiológico de adaptação ao estresse hídrico. Trabalhando com parreira, estes autores analisaram estresse hídrico, turgidez, potencial osmótico e conteúdo de água em folhas de diferentes

estádios de desenvolvimento. Eles observaram que a redução na elasticidade das paredes celulares de folhas maduras resultou em uma rápida mudança do potencial hídrico em resposta ao déficit hídrico.

Para identificar genes potencialmente importantes na tolerância de plantas de *Arabidopsis* a diferentes estresses ambientais, amostras de mRNA foram coletadas de folhas e de raízes de plântulas controle e submetidas aos diferentes tratamentos: 4°C, 100 mM de NaCl ou 200 mM de manitol, após 3h e 27h (KREPS *et al.*, 2002). Os resultados desse estudo mostraram que entre outros cDNAs, o que codifica a β -galactosidase (At2g28470) teve seus níveis de expressão aumentados 3,2 vezes em resposta ao sal e 7,5 e 7,7 vezes em resposta ao frio e ao estresse hídrico, após 3h. Entretanto esse aumento foi transiente, uma vez que não houve modificações nos níveis de expressão após 27h. Esse tipo de análise é de extrema importância para ajudar a elucidar o papel das proteínas na resposta às diversas condições ambientais. Entretanto é importante enfatizar que os níveis de mRNA podem não estar correlacionados com mudanças nos níveis de atividade de uma proteína ou enzima (GYGI *et al.*, 1999). O perfil dos níveis de expressão é um importante instrumento usado para criar uma lista de genes potencialmente úteis para serem utilizados na produção de espécies mais tolerantes aos estresses ambientais (LANG *et al.*, 2005).

2.6- A cultura do feijão-de-corda

O feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., também chamado de feijão macassar, feijão fradinho ou feijão-de-praia, é uma leguminosa que se constitui na principal fonte protéica das populações de baixa renda das regiões Norte e Nordeste do Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 1988). Essa cultura ocupa uma área em torno de 690.000 ha, distribuída, sem exceções, por todos os municípios cearenses. Abrangendo aproximadamente 5% de todo o território do estado do Ceará, o feijão-de-corda ocupa a primeira colocação no ranking das culturas agrícolas, seguida do milho (650.000 ha) e do caju (280.000 ha). Considerando que cada hectare cultivado com feijão requer o emprego de mão-de-obra gerado por dois homens, não é difícil estimar que implicações de cunho econômico-social esta cultura representa. São cerca de 1.380.000 empregos temporários diretos, aproximadamente, 340.000 se distribuídos ao longo de um ano, que, se comparados aos 90.000 empregos gerados através de todo o esforço e incentivos despendidos para a industrialização recente no Estado, se configura como

um dado bastante expressivo. Além disto, como é cultivado, em geral, por pequenos agricultores, para estas famílias, em muitos casos, a cultura representa, não apenas a principal fonte de suprimento alimentar, mas também, a principal atividade econômica. Considerado uma fonte barata no suprimento de proteínas, para Teixeira *et al.* (1988), o feijão-de-corda constitui um alimento básico para a população, exercendo a função social de suprir necessidades alimentares das camadas carentes. Para a produção agrícola a salinização dos solos tem grande impacto, uma vez que ela reduz consideravelmente os rendimentos das lavouras e restringe as latitudes e os solos onde as espécies comercialmente importantes podem ser cultivadas. As implicações são grandes, haja vista que não somente produtores, mas toda a sociedade é afetada (NEPOMUCEMO *et al.*, 2001).

Apesar da produção do feijão-de-corda ter aumentado nos últimos anos devido aos programas de irrigação, a salinização dos solos é um dos fatores que contribuem para a baixa produtividade desta cultura na região semi-árida (ARAÚJO; WATT, 1988). A situação sócio-econômica do produtor, as deficiências estruturais, o baixo nível tecnológico empregado (sementes não melhoradas geneticamente, ausência do preparo e da correção da acidez dos solos, etc), associados a condições ambientais desfavoráveis como baixa disponibilidade de água no solo e temperaturas elevadas são outros fatores agravantes (BUKOVINSKY *et al.*, 1992).

O cultivo do feijão-de-corda em áreas salinizadas ou em vias de salinização requer o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes e a utilização de técnicas de manejo que sejam mais adequadas a tais condições. Como o custo do manejo do solo é bastante elevado, uma grande ênfase vem sendo dada na melhoria da tolerância das plantas cultivadas ao estresse salino (TARCZYNSKI *et al.*, 1993).

Em estudos anteriores com feijão-de-corda cv. Pitiúba foram analisados os efeitos do estresse salino no crescimento e nas atividades das α - e β -galactosidases das raízes durante a fase de estabelecimento, com base nos estádios de desenvolvimento morfofisiológicos e no tempo após a semeadura. De acordo com os resultados, verificou-se que a salinidade tanto retardou quanto inibiu o crescimento das raízes de plântulas de feijão-de-corda. Observou-se que houve correlação entre o crescimento e as atividades galactosidásicas citosólicas das raízes, no entanto, esta correspondência foi verificada para a atividade galactosidásica de parede celular somente nos primeiros estádios de desenvolvimento. No citosol, a salinidade promoveu a atividade α -galactosidásica, enquanto que inibiu a atividade β -galactosidásica. Já

na parede celular, o NaCl inibiu a atividade da β -galactosidase, porém, induziu um aumento na atividade da enzima α -galactosidase, a partir do estágio de desenvolvimento VI. Isto sugere que a inibição e/ou retardamento no crescimento das raízes devido ao sal, estão mais relacionados às atividades β -galactosidásicas do que às atividades α -galactosidásicas (BARBOSA, 2002).

Com base no que foi exposto, deve-se considerar a complexidade em analisar a atuação das β -galactosidases durante a expansão celular e em outros processos. Não seria surpresa encontrar uma grande variação nos padrões de expressão entre essas β -galactosidases, em face da diversidade de genes que codificam essas enzimas. Além disso, elas podem agir em arabinogalactanos, cadeias laterais de galactanos ou ramnogalacturonanos I. Conseqüentemente, elas participam de muitos processos fisiológicos. Outro agravante é a possibilidade de subfuncionalização, uma vez que, diferentes enzimas podem agir em tecidos e/ou estádios de desenvolvimento específicos (IGLESIAS *et al.*, 2006). Purificar e caracterizar essas enzimas presentes em tecidos vegetativos, analisando a sua expressão ao longo do desenvolvimento da planta é uma etapa fundamental para se elucidar o papel das β -galactosidases em plantas.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Diante da relevância desses estudos, o objetivo desse trabalho foi purificar e em seguida caracterizar as β -galactosidases presentes no citosol e na parede celular de raízes de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba, nos estádios de desenvolvimento III (radícula medindo entre 3 e 5 cm) e VIII (hipocótilo reto, radícula maior que 5 cm, cotilédones fora do papel e folhas cotiledonares abertas), em condições controle e em tratamento salino.

3.2- Objetivos Específicos

A finalidade da caracterização das enzimas provenientes de plântulas nas diferentes condições citadas foi de fazer a análise comparativa entre:

- 1) Enzimas oriundas do citosol e da parede celular para constatar se são estruturalmente as mesmas ou não, podendo, realizar funções iguais ou distintas;
- 2) Enzimas nos dois estádios de desenvolvimento, para verificar se ao longo do desenvolvimento as enzimas sofrem alguma modificação;
- 3) Enzimas provenientes dos tratamentos controle e salino para verificar se a salinidade afeta diretamente a atividade dessas enzimas ou as suas sínteses (expressão gênica).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Sementes e condições de germinação

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivar Pitiúba utilizadas nestes experimentos foram provenientes de uma área irrigada do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil. Após seleção e limpeza, as sementes foram acondicionadas em frascos de vidro contendo sílica gel e armazenadas à temperatura de aproximadamente 10°C, até posterior utilização.

As sementes foram selecionadas para a germinação de acordo com o tamanho, conformação e cor, sendo excluídas as pequenas, escuras e mal formadas. Depois de selecionadas, foram esterilizadas com uma solução de hipoclorito de sódio, contendo 0,5% de cloro ativo, durante 5 minutos. Foram excluídas aquelas que flutuaram na referida solução, bem como as que se apresentaram "queimadas" após esse tratamento. Para a eliminação do cloro residual, as sementes foram lavadas exaustivamente com água destilada desionizada e, em seguida, semeadas em folhas de papel de filtro de 30 x 30 cm (papel mata-borrão 80 g/cm² esterilizadas por autoclavagem a 121°C durante 20 min), umedecidas em água destilada desionizada autoclavada (tratamento controle), ou em solução de NaCl a 100 mM, preparada com água destilada desionizada autoclavada (tratamento salino). Foram colocadas 10 sementes 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 no umedecimento do papel (GOMES-FILHO; PRISCO, 1978). 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 de luz/escuro, à temperatura de 26 ± 2°C e umidade relativa no interior das cubas próxima a 100% (Figura 1). As cubas de acrílico foram previamente tratadas, por 24 horas, com uma solução de hipoclorito de sódio contendo 0,5% de cloro ativo e, em seguida, lavadas exaustivamente com água destilada.

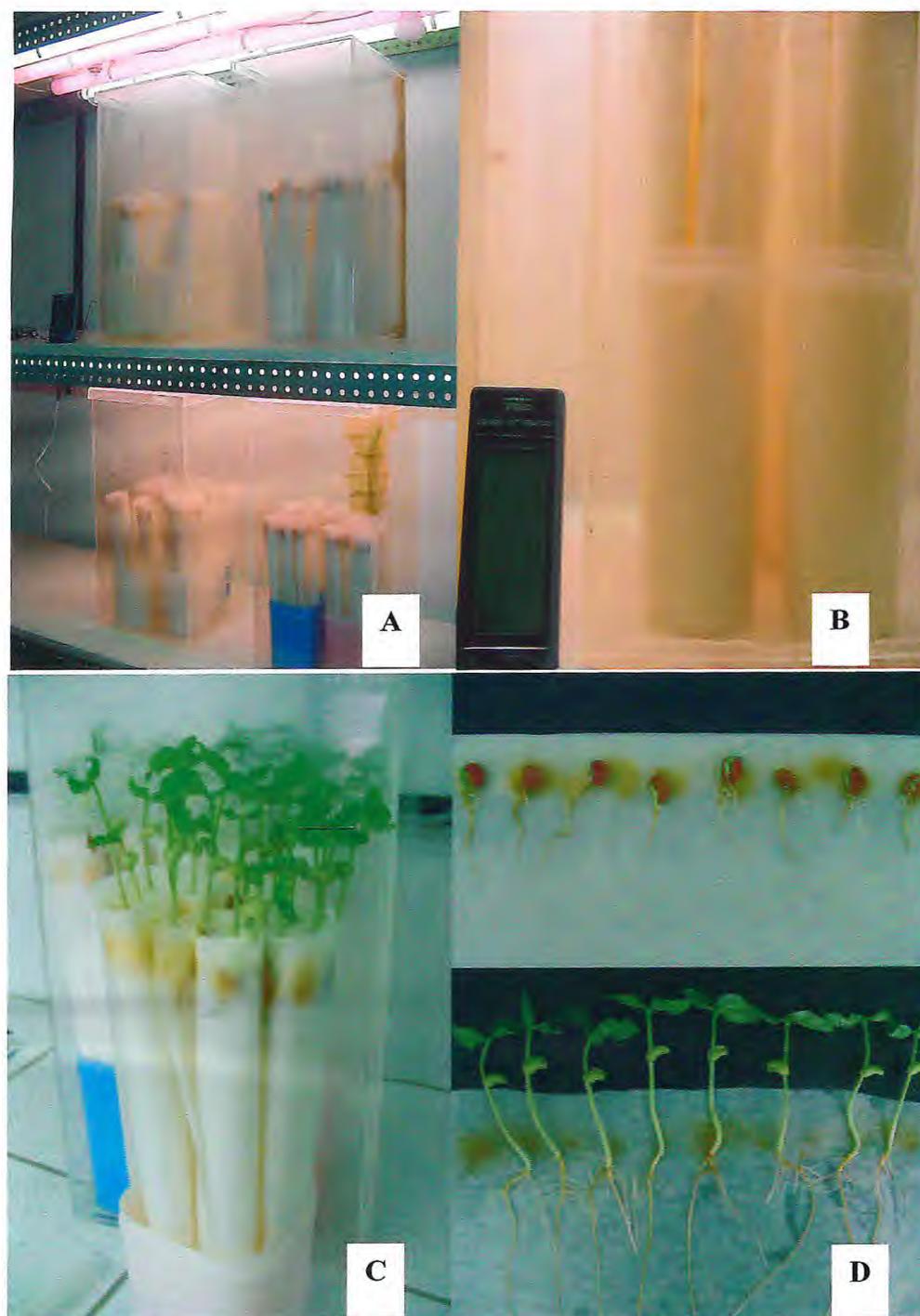


Figura 01: Condições de sementeira das sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] em sala de cultivo sob condições controladas. A-Disposição das cubas; B- Termohigrógrafos registrando: temperaturas mínima e máxima de 25,12 e 26,9°C; C e D- Disposição das plântulas no papel.

As plântulas foram selecionadas de acordo com seus estádios de desenvolvimento, utilizando-se a caracterização morfológica proposta por Prisco (1987). Neste estudo foram utilizadas as plântulas dos estádios III e VIII, cujas características são as seguintes:

Estádio III: plântulas com radícula maior que 2 cm e menor que 5 cm;

Estádio VIII: plântulas com radícula maior que 5 cm, cotilédones fora do papel, hipocótilo reto e folhas cotiledonares abertas (Figura 2).

Após a seleção das plântulas nos referidos estádios, cultivadas em condições controle (água destilada) e em tratamento salino (NaCl 100mM), foram coletadas as raízes, sendo estas congeladas e posteriormente liofilizadas, por um tempo suficiente para atingirem massa constante. Na seqüência, as raízes foram maceradas, pesadas e acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas a 10°C até posterior utilização.

4.2- Extração de proteínas citosólicas

As proteínas citosólicas das raízes de plântulas nos estádios III e VIII foram extraídas segundo Alani *et al.* (1989), com modificações realizadas por Enéas-Filho *et al.* (1995). Para cada estágio foram feitas extrações utilizando-se 6 g de matéria seca de raízes.

Inicialmente, as raízes foram maceradas em tampão citrato de sódio 25 mM – fosfato de potássio 50 mM (tampão McIlvaine; McILVAINE, 1921), pH 5,5, na proporção de 1:40 (m/v), contendo 0,1% (m/v) de polivinil polipirrolidona (PVP) e deixadas durante uma hora em banho de gelo. O homogenado foi centrifugado a 16.000 x g por 30 min, a 4°C. O precipitado obtido foi utilizado para a obtenção das proteínas da parede celular, enquanto o sobrenadante, contendo proteínas citosólicas, foi utilizado para as determinações de proteínas e de atividade β -galactosidásica presentes no citosol. Essas etapas do processo de extração estão esquematizadas na Figura 3.

4.3- Extração de proteínas ligadas à parede celular

Os precipitados obtidos nas extrações de proteínas citosólicas (item 2.2) foram utilizados para a obtenção de paredes celulares através do método de Huber e Nevins modificado

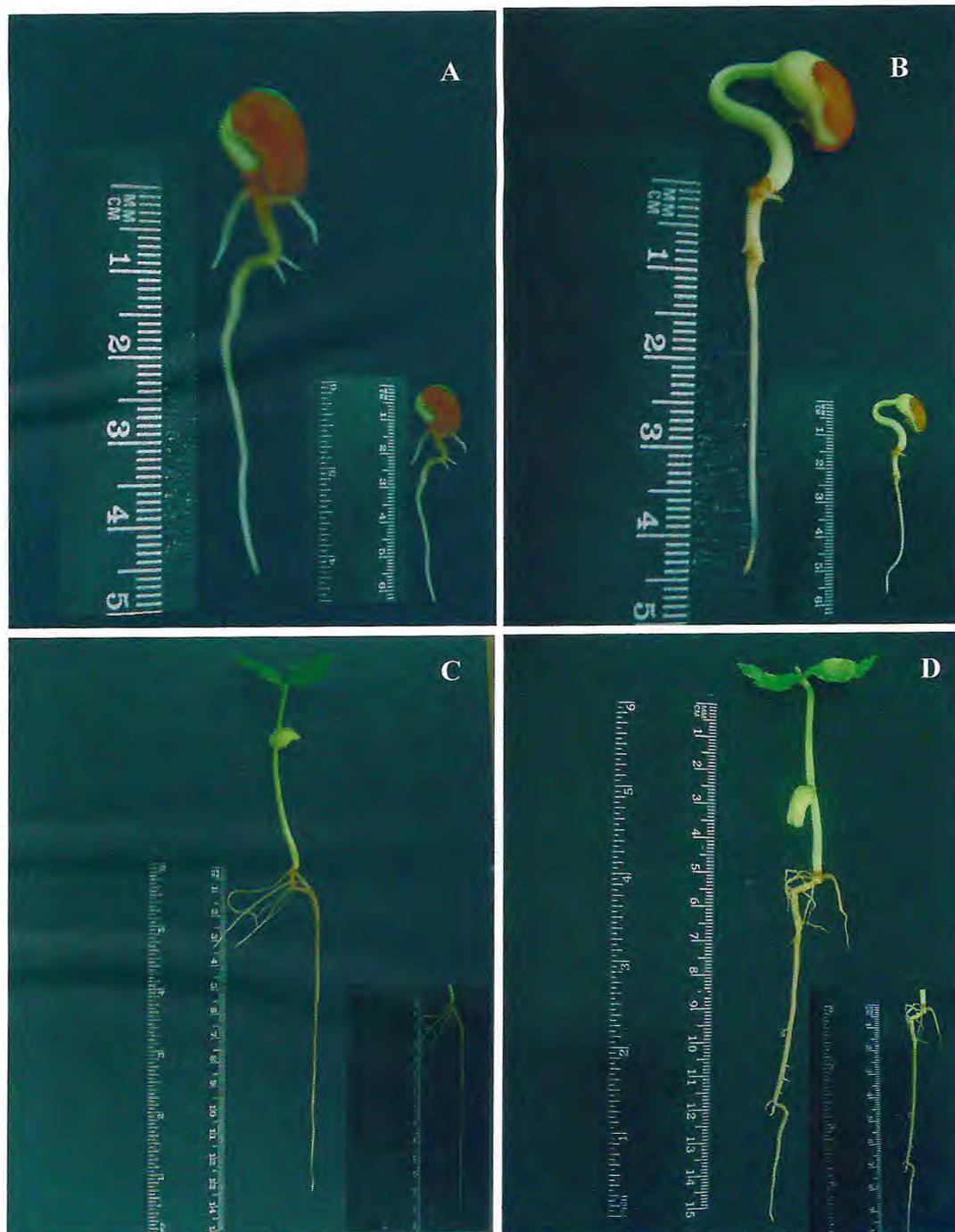


Figura 02: Plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III (A e B) e VIII (C e D), em condições controle (A e C) e de estresse salino (NaCl 100mM) (B e D).

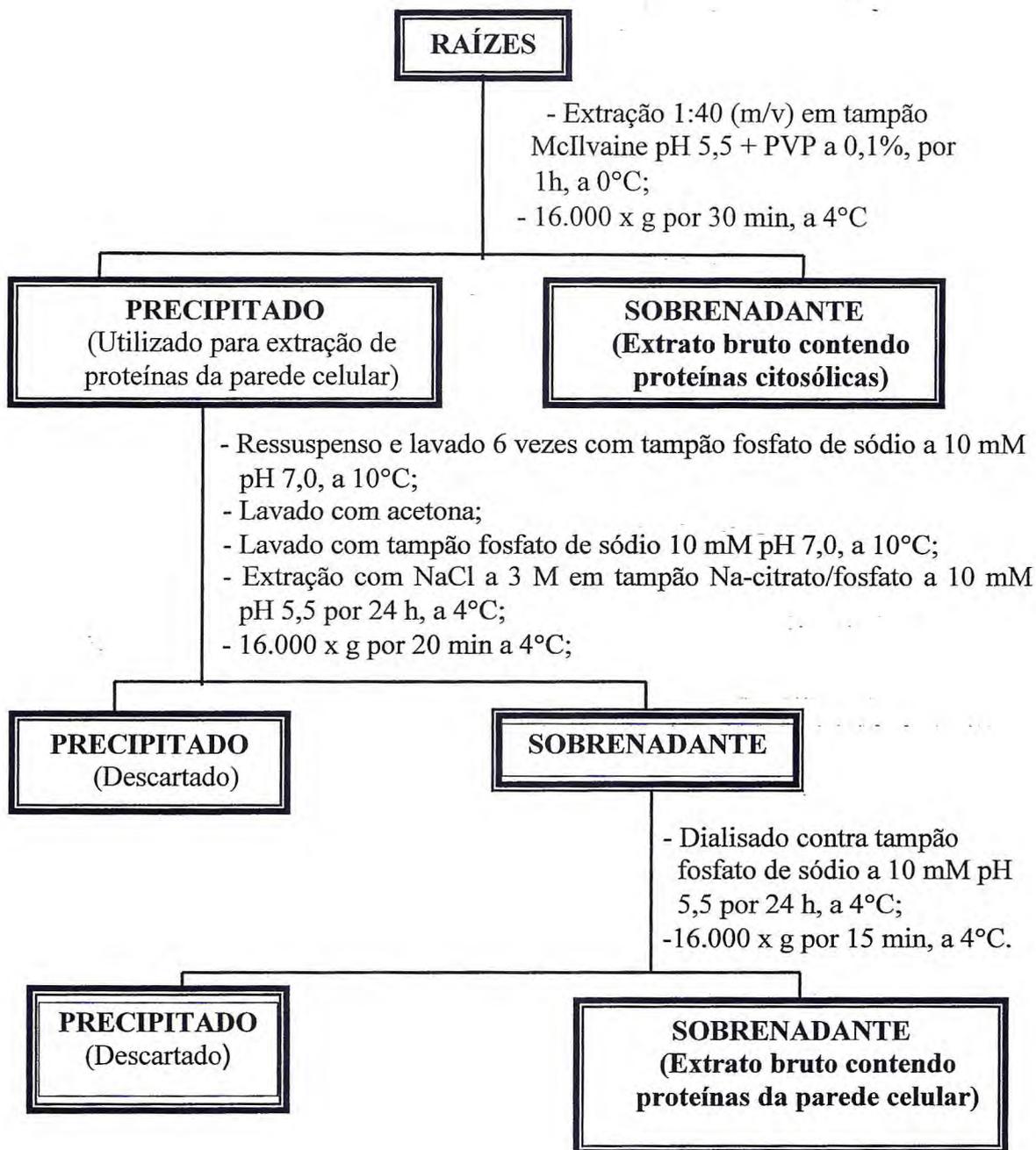


Figura 3 – Esquema de obtenção dos extratos contendo proteínas citosólicas e de parede celular de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba.

por Seara *et al.* (1988). Para a obtenção da parede celular, cada precipitado foi ressuscitado e lavado com 200 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0, a 10°C, por 6 vezes, seguidas de filtração à vácuo, utilizando-se um sistema formado por tela de nylon (150 fios), funil de buchner, kitazato e compressor. Após cada lavagem, foi feita a dosagem protéica no filtrado, para se certificar de que não havia proteínas citosólicas no mesmo, o que foi verificado após a 5ª lavagem. Em seguida, o homogenado foi lavado com 100 mL de acetona estocada a -20 °C, seguido de nova lavagem com 200 mL de tampão fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,0, a 10 °C. O filtrado foi descartado e, a partir dos resíduos obtidos, contendo a parede celular, procedeu-se a extração das proteínas. A etapa de extração de proteínas da parede celular sofreu algumas modificações descritas a seguir. Cada resíduo, contendo a parede celular, foi ressuscitado em tampão citrato/fosfato a 10 mM, pH 5,5, contendo NaCl a 3 M e mantido durante 24 horas a 4°C sob lenta agitação. Em seguida, esta suspensão foi centrifugada a 16.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra tampão citrato/fosfato a 10 mM, pH 5,5, por 24 horas e, em seguida, centrifugado a 16.000 x g por 15 min. O novo sobrenadante, contendo as proteínas da parede celular, foi então utilizado para as determinações dos teores de proteínas e de atividade β -galactosidásica.

4.4- Determinações das atividades das enzimas glucose 6-fosfato desidrogenase e fosfatase ácida nos extratos citosólicos e de parede celular

Após a obtenção dos extratos citosólicos e de parede celular, realizou-se ensaios com os referidos extratos para a determinação das atividades das enzimas glucose-6-fosfato desidrogenase e fosfatase ácida, com o objetivo de detectar a possível diferença de proteínas citosólicas contaminantes nos extratos protéicos de parede celular. As determinações dessas atividades enzimáticas foram feitas em amostras provenientes de três extrações, cada uma delas em triplicata.

4.4.1-Atividade da glucose 6-fosfato desidrogenase

A atividade da enzima glucose 6-fosfato desidrogenase baseou-se na redução do NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) a NADPH, seguindo a metodologia de Molina *et al.* (2003), com pequenas modificações. A mistura de reação, com um volume total de 1,0 mL, foi composta de 840 μ L de tampão Tris-HCl a 40 mM, pH 7,5, 10 μ L de MgCl₂ a 1M, 10 μ L de

glucose-6-fosfato a 100 mM, 100 μL de extrato (diluído quando necessário) e 40 μL de NADP^+ ($-\beta$) a 10 mM. Para a mistura de reação utilizada como testemunho foram adicionados 100 μL de água ao invés de extrato enzimático. Todos os reagentes utilizados nesse ensaio foram dissolvidos em tampão Tris-HCl a 40 mM, pH 7,5. A reação foi iniciada pela adição do substrato (NADP^+) e desenvolveu-se à temperatura ambiente. A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de NADPH formado, medindo-se a absorvância em 340 nm (A_{340}), durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto. Uma unidade arbitrária de glucose 6-fosfato desidrogenase foi 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 que requer um tempo de 1 minuto para causar um aumento de 0,1 na absorvância. A atividade da enzima foi calculada através da diferença entre a variação da densidade ótica em A_{340} (ΔA_{340}) dos ensaios a cada minuto e a ΔA_{340} do testemunho dividida pelo coeficiente de extinção molar ($6,22 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), e foi expressa em unidades de atividade ($\mu\text{moles de NADPH} \times \text{min}^{-1}$).

4.4.2. Atividade da fosfatase ácida

A atividade da enzima fosfatase ácida foi determinada de acordo com o método de Grangeiro *et. al.* (2003) e consistiu da adição de 0,5 mL do extrato enzimático (diluído quando necessário) a 0,5 mL do substrato *p*-nitrofenil-fosfato (PNP-fosfato) a 1,0 mM dissolvido em tampão acetato de sódio a 100 mM, pH 5,0. A reação processou-se durante 10 minutos a 37°C e foi interrompida pela adição de 1,0 mL de NaOH a 1,0 M e a atividade enzimática foi medida através da liberação de *p*-nitrofenol, o qual foi monitorado a 405 nm, usando-se um coeficiente de extinção molar de $18.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A atividade foi expressa em $\text{mM} \times \text{g MS}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

4.5- Determinações dos teores de proteína e da atividade β -galactosidásica

As concentrações de proteína nos extratos citosólicos e de parede celular foram determinadas de acordo com Bradford (1976), tendo a albumina sérica bovina como padrão. A reação foi realizada através da adição de 2,5 ml do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,05 mL da amostra, sendo efetuadas leituras de absorvância em 595 nm (A_{595}) com 10 minutos após a adição do reagente.

As atividades β -galactosidásicas foram realizadas de acordo com Kanfer *et al.* (1973), 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- β -D-galactopiranosídeo (β -PNPG) a 0,4mM, dissolvidos em tampão McIlvaine pH 4,5. Após 15 minutos a 60°C, 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 (ΔA_{400}) foram transformadas em unidades de atividade (UA), sendo uma UA correspondente a uma ΔA_{400} de 0,01. As atividades β -galactosidásicas totais foram expressas em UA. h⁻¹ e as específicas foram determinadas dividindo-se a atividade total pela concentração de proteína e expressas em UA x mgP⁻¹ x h⁻¹. Nas determinações da concentração de proteína e das atividades enzimáticas foram preparados três extratos, cada um dosado em triplicata.

4.6- Purificação das β -galactosidases

A purificação das β -galactosidases citosólicas e de parede celular, provenientes de raízes de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII e cultivadas em condições controle (água desionizada) e de tratamento salino (NaCl a 100 mM), iniciou-se com o fracionamento com sulfato de amônio, diálise e liofilização das frações obtidas. As frações citosólicas foram aplicadas em coluna de troca iônica (DEAE-Sephadex A-50), seguida da aplicação do pico com atividade β -galactosidásica em uma coluna de afinidade (Lactosil-Sepharose). As frações de parede celular foram aplicadas diretamente na coluna de afinidade Lactosil-Sepharose (Figura 4).

4.6.1. Fracionamento com sulfato de amônio

Nos estudos preliminares, os extratos protéicos de citosol e da parede celular foram submetidos a fracionamentos 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, para determinar as faixas que apresentaram as maiores atividades β -galactosidásicas. Nos extratos citosólicos, a faixa de 20-80% representou quase toda a atividade β -galactosidásica, enquanto nos extratos de parede celular a maior parte da atividade foi encontrada na faixa de 40-100% (Tabela 1).

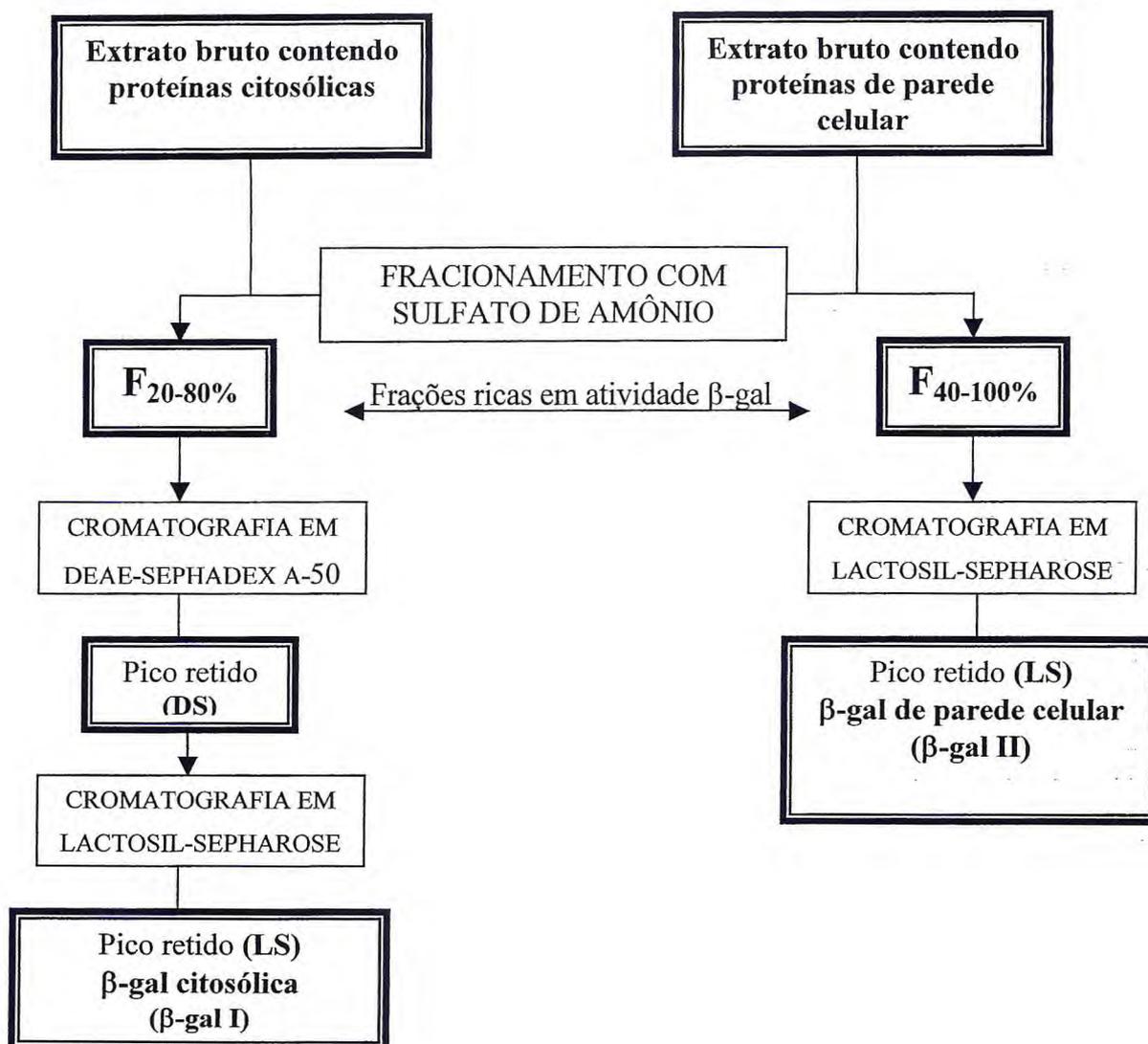


Figura 4- Esquema de purificação das β-galactosidases a partir de extratos citosólicos e de parede celular provenientes de raízes de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. Pitiúba.

Tabela 1- Fracionamento com sulfato de amônio dos extratos brutos contendo proteínas de citosol* e de parede celular**.

Fração	Atividade Total (UA x h⁻¹)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (UA x mg⁻¹ x h⁻¹)	Recuperação (%)
Proteínas citosólicas				
Extrato Bruto	1.141.888	40,13	28.455	100
F ₀₋₂₀	4.470	0,31	14.419	0,39
F ₂₀₋₄₀	74.628	7,39	10.099	6,5
F ₄₀₋₆₀	956.800	10,40	92.000	83,8
F ₆₀₋₈₀	67.392	3,18	21.193	5,9
F ₈₀₋₁₀₀	2.621	0,36	7.281	0,23
Proteínas de parede celular				
Extrato Bruto	222.000	6,04	36.755	100
F ₀₋₂₀	584	0,07	8.343	0,26
F ₂₀₋₄₀	2.126	0,26	8.177	0,95
F ₄₀₋₆₀	70.330	1,01	69.634	31,7
F ₆₀₋₈₀	28.006	0,64	43.759	12,6
F ₈₀₋₁₀₀	13.052	0,41	31.834	5,9

* Fração escolhida: F_{20-80%}; **Fração escolhida: F_{40-100%}

Uma vez determinadas estas faixas ideais, os precipitados oriundos dos fracionamentos foram ressuspensos com tampão McIlvaine pH 5,5 e dialisados contra água destilada por 24 horas a 4°C. Foram retiradas desses materiais, alíquotas para posteriores determinações das atividades enzimáticas e concentração de proteína, sendo então liofilizados. Na seqüência, as frações protéicas citosólicas foram aplicadas em colunas de troca iônica DEAE Sephadex A-50, enquanto as frações de parede celular foram aplicadas em coluna de afinidade Lactosil-Sepharose (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2001).

4.6.2. Cromatografia de troca iônica

No preparo da coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A-50 (Sigma Chemical Company, USA), o gel foi intumescido em água destilada 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 com NaOH a 0,01 M, por 15 minutos, com água destilada até atingir pH neutro, com

HCl a 0,2 M por 15 minutos, água destilada e por fim equilibrado com tampão Tris-HCl a 25 mM pH 7,2. A coluna foi preparada sob a ação da gravidade (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000).

Frações protéicas de citosol correspondentes a uma atividade β -galactosidásica de, aproximadamente, 150.000 UA. h⁻¹ foram dissolvidas em 5 mL de tampão Tris-HCl a 25 mM, pH 7,2, e aplicadas à coluna de DEAE Sephadex, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Essas cromatografias foram realizadas a um fluxo de 32,7 mL.h⁻¹ a 10°C, sendo coletadas frações de 4,9 mL, determinando-se suas absorvâncias em 280 nm e suas atividades β -galactosidásicas. A eluição das frações que ficaram retidas na coluna foi feita com 100 mL de gradiente salino de 0,2-1,0 M NaCl, em tampão Tris-HCl a 25 mM, pH 7,2 (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000).

As frações ricas em atividade β -galactosidásica foram unidas, dialisadas contra água destilada por 24 horas, concentradas até 2,5 mL através de liofilização parcial e aplicadas em coluna de afinidade Lactosil-Sepharose (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000).

4.6.3. Cromatografia de afinidade

O procedimento para a preparação das colunas 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 a 0,5 M e lavado por várias vezes até alcançar pH 11,0. Após ser lavado em funil de Büchner, o gel seco foi ressuspense em 100 mL de carbonato de sódio a 0,5 M adicionando-se lentamente 10 mL de divinilsulfona. A mistura foi lentamente agitada durante 70 minutos à temperatura ambiente, filtrada e a ela adicionada carbonato de sódio a 0,5 M contendo lactose a 10%, permanecendo por 15 horas sobre lenta agitação. A Sepharose ativada com lactose foi novamente filtrada e lavada com carbonato de sódio a 0,5 M, com água destilada desionizada e 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 foi montada sob a ação da gravidade.

Foram aplicadas nessa coluna, separadamente, frações protéicas de parede celular correspondentes a uma atividade β -galactosidásica de, aproximadamente, 80.000 UA. h⁻¹ dissolvidas em 4 mL de tampão McIlvaine pH 4,0 diluído 1:4, contendo 0,1 mM de EDTA e 1 mM de 2-mercaptoetanol e os picos com atividade β -galactosidásica obtidos nas

cromatografias DEAE-Sephadex equilibrados com o referido tampão. As cromatografias foram realizadas a um fluxo de $32,0 \text{ mL.h}^{-1}$ a 4°C , sendo coletadas frações de 4,8 mL, determinando-se suas absorvâncias em 280 nm e suas atividades β -galactosidásicas. A eluição das frações que ficaram retidas nas colunas foi feita com o tampão de equilíbrio, contendo lactose a 100mM e NaCl a 0,5 M. As frações ricas em atividade β -galactosidásica foram reunidas, dialisadas contra água destilada por 24 horas, concentradas até 1,0 mL através de liofilização parcial. Determinaram-se as concentrações de proteínas destas frações, de acordo com Bradford (1976), sendo em seguida congeladas para posteriormente serem analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições ácidas

Foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida para a determinação das bandas protéicas e para a identificação das β -galactosidases presentes nos picos LS provenientes dos procedimentos de extração e de purificação das β -galactosidases citosólicas e de parede celular de raízes de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII, cultivadas em condições controle e sob condições de estresse salino (NaCl a 100 mM).

4.7.1- Montagem dos géis e condições de corrida

O método utilizado para a eletroforese em condições não desnaturantes e em pH ácido foi realizado segundo Biswas *et al.* (2003), com algumas modificações. Foram utilizadas placas de vidro medindo 12,5 x 11,5 x 0,1 cm. Utilizou-se um gel descontínuo composto de gel de separação na forma de um gradiente linear de 5% a 15% de poliacrilamida. A solução do gel a 5% foi composta de tampão acetato-KOH a 0,57 M, pH 4,3, acrilamida 5%, bis-acrilamida 0,13%, 12 $\mu\text{L/mL}$ de persulfato de amônio a 10%, e 3,5 $\mu\text{L/mL}$ de TEMED. A solução do gel a 15% foi preparada com tampão acetato-KOH a 0,68 M, pH 4,3, 160 $\mu\text{L/mL}$ de glicerol a 50%, acrilamida a 15%, bis-acrilamida a 0,4%, 4 $\mu\text{L/mL}$ de persulfato de amônio a 10%, e 2,0 $\mu\text{L/mL}$ de TEMED.

Para a formação do gel em gradiente de poliacrilamida, utilizou-se um sistema composto de um misturador de soluções de 10 mL conectado a uma bomba peristáltica (Figura 5). As soluções a 15 % e 5% foram colocadas em cada reservatório, sendo que a

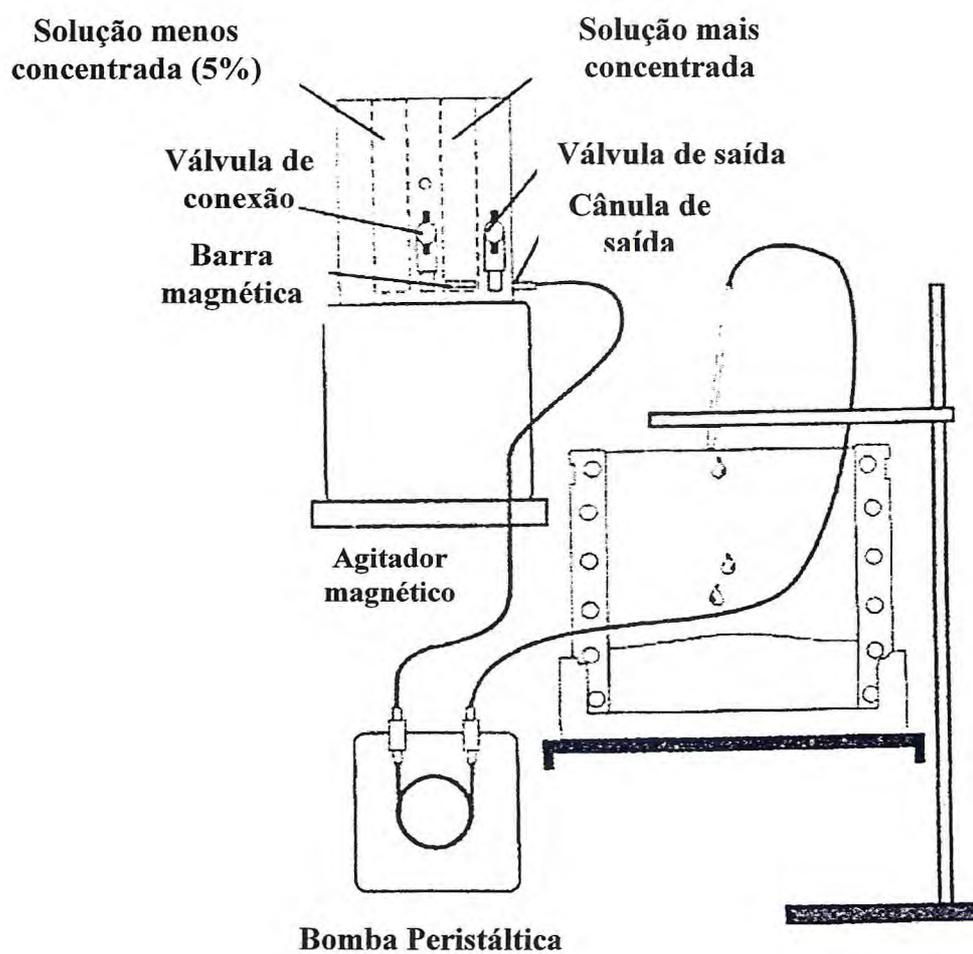


Figura 5- Sistema utilizado para a montagem do gel de separação.

solução de maior concentração foi posta no reservatório diretamente conectado à bomba. O gradiente foi formado quando a bomba peristáltica foi ligada a um fluxo de aproximadamente 1,5 mL/min e o canal que liga os dois reservatórios foi aberto para que as duas soluções fossem misturadas com o auxílio de um agitador e uma barra magnética. Na preparação do gel de aplicação utilizou-se tampão acetato-KOH a 0,06 M, pH 6,8, acrilamida 4%, bis-acrilamida a 0,1%, 10 µL/mL de persulfato de amônio a 10%, e 1,0 µL/mL de TEMED. O tampão de equilíbrio das amostras foi constituído de glicerol a 70%, tampão acetato-KOH a 1,0 M, pH 6,8, acrescido de traços de fucsina básica como indicadora da frente de corrida.

Imediatamente antes da aplicação no gel de eletroforese, as amostras, contendo cerca de 3 µg de proteína, foram equilibradas com o tampão de equilíbrio tendo o cuidado de mantê-los a 0°C em banho de gelo. Alíquotas de 50 µL por poço foram aplicadas no gel e a eletroforese desenvolveu-se a uma corrente de 30 mA em direção ao catodo, durante 5 horas à temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$, utilizando um tampão de corrida em pH 4,3, contendo ácido acético a 0,14 M e β-alanina a 0,35 M.

Terminada a corrida, o gel foi dividido em duas metades, sendo uma para revelação da atividade β-galactosidásica e a outra para determinação de bandas protéicas no gel.

4.7.2- Coramento de proteínas com nitrato de prata

A metade do gel destinada à determinação de bandas protéicas foi fixada durante uma noite com uma solução aquosa de ácido acético a 10% e etanol a 40%, sob agitação lenta. Em seguida, procedeu-se o coramento com nitrato de prata a 0,2%, seguindo a metodologia de Blum *et al.* (1987), com pequenas modificações. Os procedimentos utilizados neste coramento estão descritos na Tabela 2. Após o coramento das bandas protéicas, o gel foi incubado por duas horas com uma solução contendo metanol a 50% e glicerol a 5%. As imagens foram então registradas e o gel foi seco em papel celofane e guardado para posteriores análises comparativas.

4.7.3- Revelação da atividade β-galactosidásica

Para a revelação das bandas com a atividade β-galactosidásica, seguiu-se a metodologia de Simos e Georgatsos (1988), com modificações. O gel foi pré-incubado com

tampão McIlvaine pH 4,5 por 10 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, incubado com 20 mL do referido tampão contendo 4 mM de substrato sintético 6-bromo-2-naftil- β -D-galactopiranosídeo (β -BNGal) (Sigma Chemical Company, USA) e 25 mg/mL do corante “Fast Blue B Salt” (Sigma Chemical Company, USA) até o aparecimento das bandas de β -galactosidase. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada para a retirada do excesso de corante e incubado por duas horas em uma solução contendo metanol a 50% e glicerol a 5%. As imagens foram então registradas e o gel foi seco em papel celofane e guardado para posteriores análises comparativas.

4.8- Caracterização bioquímica das β -galactosidases

Após as análises dos padrões eletroforéticos, todos os procedimentos de extração e de purificação foram seqüencialmente repetidos para a obtenção de material suficiente para realizar o estudo das propriedades das β -galactosidases presentes no citosol (β -gal I) e na parede celular (β -gal II) de raízes de plântulas de feijão-de-corda, nos estádios de desenvolvimento III e VIII, cultivadas em condições controle e sob condições de estresse salino (NaCl 100 mM).

Tabela 2- Etapas do coramento dos géis com nitrato de prata, segundo Blum et al. (1987), com modificações.

Procedimentos	Composições das soluções	Tempo
Fixação	Etanol 40% / ácido acético 10%	12 horas
Incubação	Etanol 30%	2 x 20 minutos
Lavagem	Água desionizada	20 minutos
Sensibilização	Tiosulfato de sódio 0,02%	1 minuto
Lavagem	Água desionizada	3 x 20 segundos
Adição de prata	Nitrato de prata 0,2% / formaldeído 0,02%	20 minutos
Lavagem	Água desionizada	3 x 20 segundos
Revelação	Carbonato de sódio 3% / formaldeído 0,05% / tiosulfato de sódio 0,0005%	Acima de 3 minutos
Lavagem	Água desionizada	30 segundos
Parada	Glicina 0,5%	5 minutos
Lavagem	Água desionizada	2 x 10 minutos

4.8.1- Efeito do pH

As atividades das β -gal I e II foram estudadas em faixas de pH que variaram de 2,5 a 6,5 a intervalos de 0,5. Na realização dos ensaios de atividade enzimática utilizou-se o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (β -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 a média de três repetições, cada uma realizada em triplicata.

4.8.2- Efeito da temperatura

Estudou-se a atividade das β -gal I e II em diferentes temperaturas do meio de ensaio. Para isto, foram realizados ensaios de atividade nas temperaturas 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, nas condições padrão já descritas no item 4.5. Os valores de atividades enzimáticas foram expressos em $\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$ e representam a média de três repetições, sendo cada uma delas em triplicata.

4.8.3- Termoestabilidade

No estudo da estabilidade térmica, alíquotas de 500 μl das amostras de β -gal I ou β -gal II foram, inicialmente, pré-incubadas por 10 minutos nas temperaturas 30, 40, 50, 60 e 70°C e, em seguida, foram submetidas a ensaios para determinação da atividade β -galactosidásica em condições padrão.

Os valores de atividades enzimáticas foram expressos em percentagens dos controles (amostras sem tratamento térmico) e correspondem à média de três repetições, cada uma dosada em triplicata.

4.8.4- Determinações das massas moleculares

As massas moleculares aparentes das β -gal I e II foram determinadas através de filtração em gel de Sephadex G-150. A coluna, medindo 58,0 x 1,3 cm, foi montada a um fluxo de 18 mL x h⁻¹, sendo, em seguida, equilibrada com tampão tris-HCl a 25 mM, pH 7,2.

A calibração foi feita utilizando como padrões as proteínas β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O volume de exclusão (V_o) da coluna foi determinado com “Blue dextrana” (2.000 kDa). Após a padronização da coluna, as amostras de β -gal I e de β -gal II foram aplicadas separadamente, sendo coletadas frações de 2,0 mL sob o mesmo fluxo utilizado para a montagem da coluna. Os volumes de eluição (V_e) das proteínas foram monitorados através da leitura em A_{280} . Todas as frações coletadas foram usadas para ensaio de atividade β -galactosidásica nas condições padrão. As massas moleculares foram calculadas através da equação da reta obtida para o gráfico de massa molecular x $\log V_e/V_o$ (Figura 6).

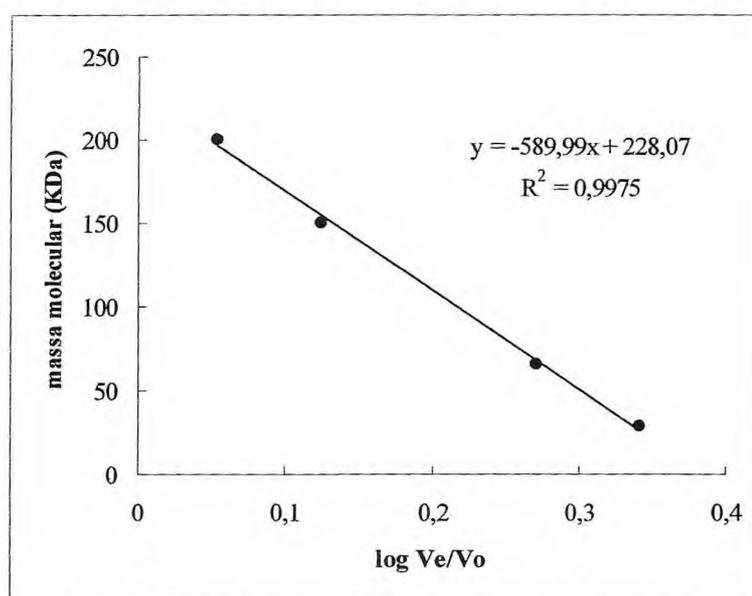


Figura 6: Gráfico da padronização da coluna de Sephadex G-150, utilizando como padrões as proteínas β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O volume de exclusão (V_o) da coluna foi determinado com “Blue dextrana” (2.000 kDa).

4.8.5- Termoinativação

Análises de termoinativação foram feitas com as enzimas β -gal I e II. Amostras contendo as enzimas foram pré-incubadas a 60°C em presença e ausência dos açúcares glucose (50 mM) e galactose (50 mM). Após 20, 40, 60 e 80 minutos de pré-incubação, as frações

foram submetidas a ensaios para determinação da atividade β -galactosidásica nas condições padrão. Os valores de atividades enzimáticas foram expressos em percentagens dos controles (amostras sem adição de açúcares) e correspondem à média de três repetições, cada uma dosada em triplicata.

4.8.6- Atividade enzimática com diferentes substratos

A atividade enzimática das β -galactosidases (I e II) foi testada com os substratos p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, p-nitrofenil- β -D-fucopiranosídeo, p-nitrofenil- α -L-fucopiranosídeo, p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo, p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo e p-nitrofenil- α -L-arabinopiranosídeo. Cada mistura de reação foi composta de 0,5 mL de cada amostra de β -gal I ou II e 0,5 mL de substrato sintético dissolvidos em tampão McIlvaine pH 4,5. Após 15 minutos a 60°C, 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}), subtraindo-se de cada leitura o valor de A_{400} da prova em branco. As atividades enzimáticas totais foram expressas em UA x h⁻¹, sendo expressas também em percentagens do controle (atividade enzimática com o substrato β -PNPG a 3mM, nas condições padrão) e correspondem à média de três repetições, cada uma dosada em triplicata.

4.8.7- Efeito de açúcares na atividade β -galactosidásica

Realizou-se o estudo dos efeitos dos açúcares glucose, lactose, galactose, arabinose e fucose na atividade das β -gal I e β -gal II. A concentração final de todos os açúcares no meio de ensaio foi de 50 mM. Alíquotas de 2,0 ml das amostras de enzimas foram pré-incubadas por 10 min a temperatura ambiente em ausência e presença dos referidos açúcares. Em seguida, realizou-se o ensaio de atividade em condições padrão. Os valores de atividade enzimática foram expressos UA x h⁻¹ e em percentagens do controle (amostra sem adição de açúcar) e correspondem à média de três repetições, cada uma delas em triplicata.

4.8.8- Análise cinética da atividade β -galactosidásica

Para as determinações da constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) das β -galactosidases I e II, determinou-se a atividade enzimática em função de concentrações crescentes do substrato sintético p -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (β -PNPG) nas concentrações de 1,0 a 5,0 mM em intervalos de 0,5, dissolvidos em tampão McIlvaine pH 4,5, mantendo-se constante a concentração da enzima. Os valores de K_m e de V_{max} foram obtidos a partir do gráfico duplo recíproco (Lineweaver-Burk) dos valores obtidos experimentalmente da velocidade da reação em função da concentração de substrato, e foram expressos, respectivamente, em $\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1}$ e mM. Cada ponto do gráfico representa a média de três repetições, cada uma realizada em triplicata.

Para analisar o tipo de inibição exercida pela galactose na atividade enzimática das β -gal I e II, foram testadas as suas atividades β -galactosidásicas na ausência e na presença de concentrações crescentes de galactose (2,5, 10, 20 e 30 mM). Foram realizados ensaios de atividade nas condições padrão utilizando como substrato o β -PNPG nas concentrações de 2,0, 2,5, 3,5, 5 e 10 mM. Os valores obtidos experimentalmente das velocidades da reação em função das concentrações de substrato nas diferentes concentrações de galactose foram utilizados nos gráficos duplos recíprocos ($1/V$ versus $1/[S]$ - Lineweaver-Burk) sendo expressos, respectivamente, em $(\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1})^{-1}$ e mM^{-1} . Os valores das tangentes obtidos a partir dos gráficos duplos recíprocos foram expressos em função dos valores da concentração de galactose no meio de ensaio. Os pontos dos gráficos representam as médias de três repetições, cada uma realizada em triplicata.

4.9- Caracterização Molecular da β -galactosidase

Após a caracterização bioquímica, foram realizadas análises dos transcritos (RT-PCR semiquantitativa) de β -galactosidases presentes em raízes de plântulas de feijão-de-corda, nos estádios de desenvolvimento III e VIII, cultivadas em condições controle e de estresse salino (NaCl 100 mM).

4.9.1- Desenho de “primers”

“Primers” degenerados da β -galactosidase foram desenhados a partir do alinhamento (Figura 7) 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* 1 (NM125070), *Arabidopsis thaliana* 2 (AJ270298), *Arabidopsis thaliana* 3 (AJ270308) e *Arabidopsis thaliana* 4 (AJ270300) (ESTEBAN *et al.*, 2005).

⇒ Seqüências dos “primers” deduzidos

β -gal F*: 5' AGCACHCCHSARATGTGGC 3'

β -gal R**: 5' CGDGGHAYRTGRTACCATC 3'

* Seqüência senso (“Forward”).

** Seqüência antisenso (“Reverse”).

Degenerações: **H:** A/C/T; **S:** C/G; **R:** A/G; **D:** A/G/T; **Y:** C/T; **R:** A/G.

4.9.2- Extração de RNA Total

A extração do RNA total foi feita de acordo com o protocolo da Qiagen. Foram utilizados 300 mg de raízes de plântulas de feijão-de-corda, nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e de tratamento salino usando um “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen). As raízes foram seccionadas em pequenos pedaços e maceradas 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 eppendorf contendo 900 μ L de tampão RLT (tampão de extração que contém tiocianato de guanidina) e 20 μ L de β -mercaptoetanol. Em seguida, a mistura foi homogeneizada por uma vigorosa agitação em “vortex”. Essa 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 x g por 2 minutos à temperatura

Extremidade 5'

<i>L. angustifolius</i>	TC	ACTATCCAAGA	AGCACA	CCTCAGATGTGGCC	AGACCTTATTC	AAAAGGCCAAAGATGG	227
<i>V. radiata</i>	TC	ACTACCCAAGA	AAGCACTCCT	CAAATGTGGCC	AGACCTCATT	CAGAAGGCCAAAGATGG	197
<i>C. sinensis</i>	TC	ATTATCCCAGA	AAGCACTCCC	GAGATGTGGCC	TGACCTTATA	CAAAAAGGCCAAAGATGG	239
<i>M. domestica</i>	TC	ACTATCCCAGA	AAGCACTCCC	GAGATGTGGCC	GGATTTAATT	CAGAAGGCCAAAGATGG	200
<i>P. pyrifolia</i>	TC	ACTATCCCAGA	AAGCACTCCT	GAGATGTGGCC	GGATTTAATT	CAGAAGGCCAAAGATGG	200
<i>L. esculatum</i>	TC	ATTATCCAAGA	AAGCACTCC	CAGATGTGGCC	TGATCTTATA	CAAAAAGGCTAAAGATGG	197
<i>C. papaya</i>	TC	ATTATCCCAGA	AAGCACTCCT	CAGATGTGGCC	TGATCTTATA	CAAAAATGCTAAAGAAGG	191
<i>A. thaliana1</i>	TC	ACTATCCACGA	AAGCAC	CCTGAGATGTGGCC	TGGCCTAATA	CAGAAAGCCAAAGAAGG	209
<i>A. thaliana2</i>	AC	CTATCCAAGA	AAGCACTCCT	GAGATGTGGCC	TGATCTTATA	AAAAGAAGCCAAAGAAGG	209
<i>A. thaliana3</i>	TC	ACTACCCAAGA	AAGCACA	CCTGAGATGTGGCC	TGACCTTATA	CAAAAAGGCCAAAGATGG	209
<i>A. thaliana4</i>	TC	ACTATCCACGA	AAGCAC	CCTGAGATGTGGCC	TGGCCTAATA	CAGAAAGCCAAAGAAGG	209
	**	**	**	*****	**	* *****	* * ** * ** * ***** **
		β-gal F		AGCACHCCHSARATGTGGC			

Extremidade 3'

<i>L. angustifolius</i>	ACC	TCCCAAAGATGGTAT	CATGTTCC	TCGGTCATGGCTGAGATCGGGTGGTAACTACTT	2132
<i>V. radiata</i>	ACC	ATCTCAGAGATGGTAT	CATGTTCC	TTCGTTTCATGGCTGAACTCGGGTGGTAACTCCTT	2105
<i>C. sinensis</i>	GCC	TCTCAACGATGGTAT	CACGTTCC	TCGCTCACGGCTGAAGCCGAGTGGAAACCTGTT	2150
<i>M. domestica</i>	GCC	TCTCAGAGATGGTACCACAT	TCCTCGATCATGGTTGACCCCGACTGGGAATCTTTT	2111	
<i>P. pyrifolia</i>	GCC	TCTCAGAGATGGTACCACAT	TCCTCGATCGTGGTTGACCCCGAATGGAAATCTTTT	2111	
<i>L. esculatum</i>	AC	TCTCAGAGATGGTACCATGTTCC	TCGATCGTGGCTGAAACCAAGTGGAACTTGTT	2111	
<i>C. papaya</i>	GG	TCTCAGAGATGGTACCATGTTCC	TCGCTCGTGGCTCAACCCAACCTGCGAACCTATT	2102	
<i>A. thaliana1</i>	AG	CTTCACAAAGATGGTACCATGT	ACCTCGTTCATGGCTTAAGTC---	TCAAAACCTTAT	2114
<i>A. thaliana2</i>	AC	CTTCAAAGATGGTACCATGT	ACCTCGTTCATGGCTAAAACCGTTTGGGAACCTTCT	2117	
<i>A. thaliana3</i>	AG	CTTCACAAAGATGGTACCATGT	TCGTTTCATGGCTGAAGCCAACCTAATAACCTTGT	2120	
<i>A. thaliana4</i>	AG	CTTCACAAAGATGGTACCATGT	ACCTCGTTCATGGCTTAAGTC---	TCAAAACCTTAT	2114
	*	**	**	*****	** * ** * ** * ** * * * * * *
				GATGGTAYCAYRTDCCHCG	
	β-gal R	5'	CGDGGHAYRTGRTACCATC	3'	

Figura 7: 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) e cDNAs de diferentes espécies publicadas no “genbank” (www.ncbi.nlm.nih.gov): *Lupinus angustifolius* (AJ011047), *Vigna radiata* (AF229794), *Citrus sinensis* (AY029198), *Malus domestica* (L29451), *Pyrus pyrifolia* (AB0465543), *Lycopersicon esculatum* (AJ012798), *Carica papaya* (AF064786), *Arabidopsis thaliana* 1 (NM125070), *Arabidopsis thaliana* 2 (AJ270298), *Arabidopsis thaliana* 3 (AJ270308) e *Arabidopsis thaliana* 4 (AJ270300). Os números à direita das seqüências indicam a quantidade de nucleotídeos a partir do códon ATG (primeira metionina);

ambiente em centrífuga 5415C, rotor F-4518-11 (Eppendorff, Alemanha). O destaque amarelo corresponde aos nucleotídeos dos “primers” mais conservados entre as espécies; O destaque em rosa corresponde aos nucleotídeos variantes. Um total de 900 µl do eluato foi recuperado e transferido para um novo tubo eppendorf, ao qual foram adicionados 450 µl de etanol 95%, misturando-se por pipetagem. Posteriormente, transferiu-se o volume dessa mistura para a coluna de fixação de RNA (“RNeasy spin column”-rosa, acoplada a um tubo coletor de 2 ml) e centrifugou-se a 10.000 x g por 15 segundos. O eluato foi descartado. Em seguida, adicionaram-se 700 µL de tampão RW1 (primeiro tampão de lavagem, contendo etanol) à coluna e centrifugou-se novamente a 10.000 x 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), realizando-se uma nova centrifugação a 10.000 x g por 15 segundos. O eluato foi posteriormente descartado e o tubo coletor foi reutilizado na mesma coluna. Um volume de 500 µL de RPE foi adicionado à coluna que então foi centrifugada a 10.000 x g por 2 minutos para remoção de qualquer resíduo de etanol que poderia interferir com as reações subseqüentes. O RNA total foi eluído da coluna com 40 µL de água livre de RNase, centrifugando-se a 10.000 x g por 1 minuto. O eluato (RNA total) foi quantificado e armazenado à -20°C para posteriores reações de RT-PCR. A concentração e a integridade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

4.9.3- Quantificação do RNA Total

A quantificação do RNA total das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000) a 260 nm. Para o cálculo das concentrações, utilizou-se a seguinte relação: densidade ótica igual a 1,0 corresponde a uma concentração de 40 µg/mL de RNA total.

A pureza do RNA total de cada amostra foi avaliada através 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) (GASIC *et al.*, 2004).

4.9.4- Eletroforese do RNA Total

A integridade do RNA total foi avaliada a partir de eletroforese em gel de agarose 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 0,4% (m/v), xileno cyanol 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 no gel o equivalente a 0,5 µg da amostra de RNA total das raízes. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos. 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).

4.9.5- Reação de transcrição reversa (RT)

Amostras equivalentes a 2 µg de 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 500 µL, usando “kit” da Invitrogen. A mistura de reação continha 2 µg de RNA total (volume variável), 4 µl de tampão 5x (tampão de reação da Invitrogen), 2 µl de DTT 0,1 M, 2 µl de dNTP mix (5 mM cada), 3 µl de Oligo dT₁₈ (20 pmoles/µL), M-MLV RT e água DEPC com quantidade suficiente para 20 µl. Esta mistura foi submetida a 65°C por 5 minutos e transferida imediatamente após para o gelo. A reação de transcrição reversa foi realizada a 37°C por uma hora e, em seguida, a transcriptase reversa foi inativada por aquecimento a 75°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

4.9.6. 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 β-galactosidase

através da reação em cadeia de polimerase (PCR). A mistura de reação continha 1 μL de produto de RT (cDNA), 1 μL de dNTPs a 5 mM, 5 μL de Tampão 5x (tampão Tris-HCl a 250 mM, NaCl a 250 mM, MgCl a 25 mM e BSA a 0,5 μM), 1 μL de β -gal F (20 pmoles em 1 μL da solução estoque), 1 μL de β -gal R (20 pmoles em 1 μL da solução estoque), 0,15 μL de *Taq* polimerase (5 U/ μL) e Água Mili-Q estéril com quantidade suficiente para 25 μL . Esta mistura foi submetida a ciclos de PCR num termociclador [MJ research, PTC-200 (Pertier thermal cycler)].

O quadro abaixo apresenta o programa de PCR usado para amplificação do(s) gene(s) da β -galactosidase.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)
30 ciclos		
Desnaturação	95	4
	95	1
Anelamento	53	1
Alongamento	72	2
Extensão	72	5
Armazenamento	4	indefinido

Para verificar se as quantidades de produtos de RT (cDNA) submetidas à amplificação por PCR foram as mesmas para as diferentes condições [Estádio III (controle e tratamento salino) e Estádio VIII (controle e tratamento salino)], foi feita a amplificação do gene da actina (controle constitutivo) utilizando uma mistura de reação contendo 1 μL de produto de RT (cDNA), 1 μL de dNTPs a 5 mM, 5 μL de Tampão 5x (tampão Tris-HCl a 250 mM, NaCl a 250 mM, MgCl a 25 mM e BSA a 0,5 μM), 0,5 μL de Actina F (40 pmoles em 1 μL da solução estoque), 0,5 μL de Actina R (40 pmoles em 1 μL da solução estoque) 0,15 μL de *Taq* polimerase (5 U/ μL) e água Mili-Q estéril com quantidade suficiente para 25 μL , a qual foi submetida a ciclos de PCR num termociclador [MJ research, PTC-200 (Pertier thermal cycler)].

O programa de PCR usado para amplificação do(s) gene(s) da actina utilizada como controle constitutivo é descrito no quadro abaixo:

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

4.9.7. Eletroforese do cDNA amplificado de β -galactosidase

Para a observação das bandas correspondentes aos cDNAs de β -galactosidases presentes em raízes de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM). Foi aplicado no gel 10 μ L do produto da RT-PCR para uma melhor visualização das bandas. A migração foi feita utilizando-se uma amperagem constante de 50 mA por aproximadamente 60 minutos à temperatura de 25°C. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 μ g/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).

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Purificação de β -galactosidases citosólicas

As β -galactosidases são enzimas importantes para a expansão celular, estando relacionadas com a modificação dos polissacarídeos da parede celular (LIMA; BUCKERIDGE, 2001). Para ajudar a esclarecer o papel dessas enzimas no crescimento de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], que é uma importante cultura da região Nordeste, foram purificadas e caracterizadas as β -galactosidases presentes em raízes do cultivar Pitiúba.

Na etapa de purificação, partiu-se de proteínas extraídas de raízes de plântulas em dois estádios morfofisiológicos, III e VIII. Parte dessas plântulas foram semeadas sob condições de estresse salino (NaCl a 100 mM) e a outra em condições controle (água destilada). Desta forma, foram analisadas as β -galactosidases de raízes em dois estádios de desenvolvimento e os efeitos que o estresse salino poderia causar nessas enzimas. A tabela 3 mostra os dados obtidos durante as etapas de purificação da β -galactosidase extraída do citosol (β -gal I) no estádio de desenvolvimento III. Após o fracionamento dos extratos brutos, verificou-se que as frações 20-80% obtidas apresentaram recuperações de 78,5% e 75,5%, com graus de purificação iguais a 2,8 e 1,2, para o controle e para o tratamento salino, respectivamente.

Quando essas frações foram aplicadas separadamente em colunas de Deae-Sephadex, os perfis cromatográficos obtidos foram semelhantes (Figura 8), apresentando dois picos de proteínas: um pico não retido com atividade β -galactosidásica residual (não analisada) e um pico que ficou retido na coluna (eluído com um gradiente de 0,2 a 1,0 M de NaCl) e que foi responsável por praticamente toda a atividade β -galactosidásica, sendo este pico denominado **DS**.

TABELA 3. Purificação da β -galactosidase presente no citosol (β -gal I) de raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino.

Etapa de Purificação	Atividade Total (UA x h ⁻¹)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (UA x mg ⁻¹ x h ⁻¹)	Recuperação (%)	Purificação (X)
Estádio III condições controle					
Extrato Bruto	1.960.913	67,59	29.012	100	1,0
F ₂₀₋₈₀	1.539.390	34,5	44.620	78,5	1,5
Deae-Sephadex (DS)	796.098	9,75	81.651	40,6	2,8
Lactosil-Sepharose β -gal I	653.599	0,53	1.233.206	33,3	42,5
Estádio III tratamento salino					
Extrato Bruto	1.957.723	59,43	32.942	100	1,0
F ₂₀₋₈₀	1.478.440	38,1	38.804	75,5	1,2
DEAE-Sephadex (DS)	612.319	8,07	75.876	31,3	2,3
Lactosil-Sepharose β -gal I	94.969	0,16	593.556	4,8	18,0
Estádio VIII condições controle					
Extrato Bruto	2.709.042	95,69	28.312	100	1,0
F ₂₀₋₈₀	2.322.220	38,34	60.563	85,7	2,0
DEAE-Sephadex (DS)	1.576.234	20,0	78.812	58,18	2,8
Lactosil-Sepharose β -gal I	847.974	0,54	1.570.322	31,3	55,5
Estádio VIII tratamento salino					
Extrato Bruto	1.023.043	34,68	29.499	100	1,0
F ₂₀₋₈₀	931.968	16,20	57.529	91,1	2,0
DEAE-Sephadex (DS)	625.006	10,8	57.871	61,1	2,0
Lactosil-Sepharose β -gal I	225.359	0,16	1.408.494	22,0	47,7

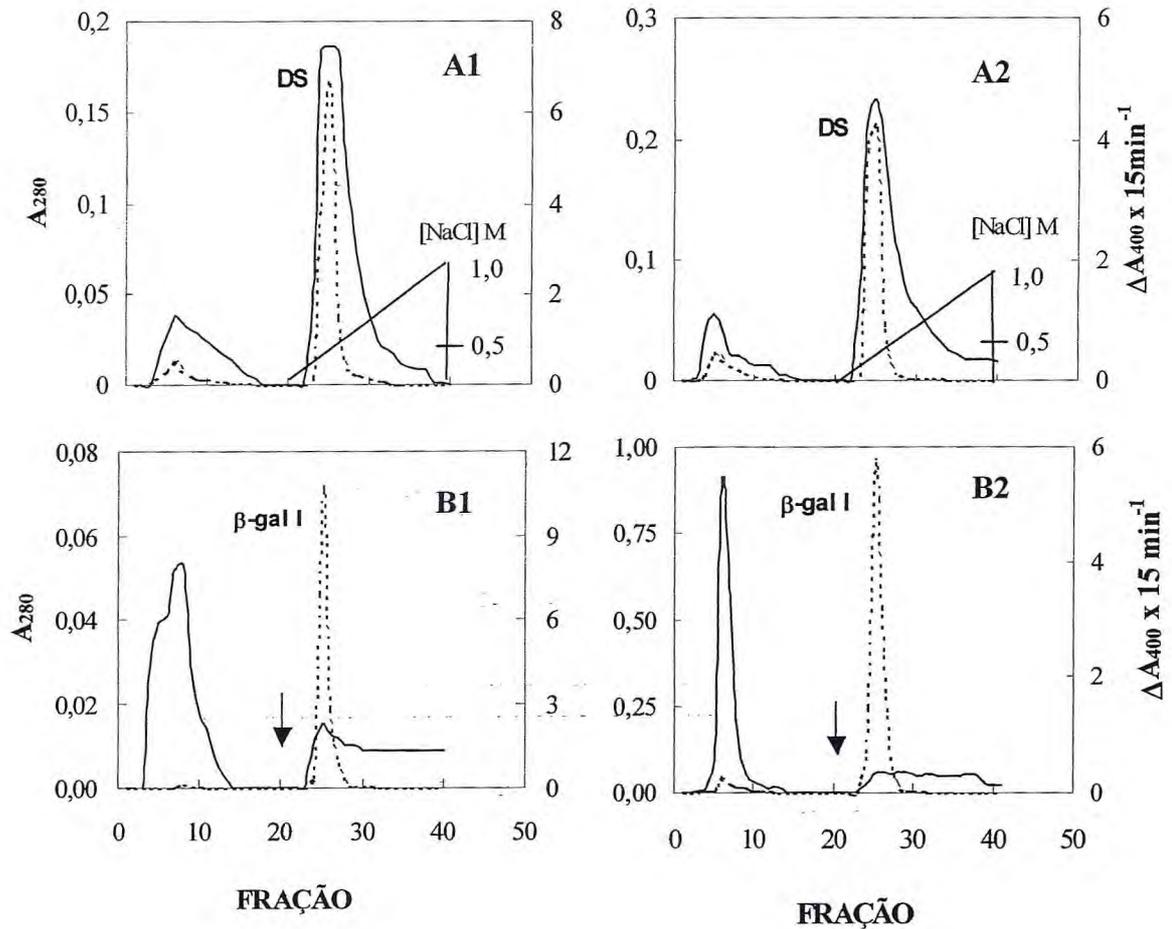


Figura 8- Purificação da β -galactosidase I (β -gal I) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento III, em condições controle (1) e de tratamento salino (2). **A.** Cromatografia em DEAE-Sephadex das frações citosólicas (F_{20-80%}). **B.** Cromatografia em Lactosil-Sepharose dos picos retidos (DS). Proteína (A_{280} —) e atividade β -galactosidásica ($\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$ ----).

Os picos retidos com atividade β -galactosidásica foram dialisados, concentrados e aplicados em coluna de afinidade em Lactosil Sepharose. Os perfis cromatográficos (Figura 10 B1 e B2) obtidos mostraram que toda a atividade β -galactosidásica permaneceu nas proteínas retidas na coluna, as quais apresentaram graus de purificação iguais a 42,5 nas condições controle e 18,5, no tratamento salino (Tabela 3).

A β -gal I de raízes de plântulas no estágio de desenvolvimento VIII, em condições controle e de tratamento salino, foram submetidas ao mesmo processo de purificação aplicado para a enzima proveniente do estágio III e os resultados obtidos foram bastante semelhantes. As frações 20-80% resultaram numa recuperação de 85,7 e 91,1% nas condições controle e no tratamento salino (Tabela 3). Quando aplicadas nas colunas de DEAE-Sephadex estas frações também resultaram em dois picos de proteínas, um não retido e outro retido na coluna (Figura 9 A1 e A2) tendo praticamente toda a atividade β -galactosidásica. Estes picos, denominados DS, apresentaram recuperações de 58,2 e 61,1% desta atividade, nos tratamentos controle e salino, respectivamente (tabela 3). Os picos não retidos também foram desprezados, uma vez que apresentaram uma atividade apenas residual. Os picos retidos com atividade β -galactosidásica (DS) quando aplicados em Lactosil-Sepharose resultaram em um pico de proteína que não foi retido e um outro que foi retido bem menor que o primeiro, mas que conteve toda a atividade β -galactosidásica (Figuras 9 B1 e B2). Este pico retido (β -gal I) teve um grau de purificação de 35,6 e 18,5 nas condições controle e de tratamento salino, respectivamente.

Com relação à β -galactosidase citosólica, os dados obtidos indicam que as raízes de plântulas do estágio de desenvolvimento VIII apresentam atividade β -galactosidásica superior às raízes do estágio III, o que pode ser verificado pelos valores de atividades específicas apresentados na tabela 3. Esses resultados confirmam o aumento da atividade da β -galactosidase citosólica ao longo dos estádios de desenvolvimento morfofisiológico (do III ao VIII) observado em trabalhos anteriores, também com feijão-de-corda cv. Pitiúba (BARBOSA, 2002). Outra observação a ser considerada foi que o tratamento salino provavelmente retardou a expressão da β -gal I durante o estágio de desenvolvimento III, fato que não foi observado no estágio VIII. Sabe-se que, apesar da salinidade poder afetar as plantas em todas as fases de seu desenvolvimento, a fase ou estágio mais sensível é uma característica de cada espécie ou variedade (LUTTS *et al.*, 1995).

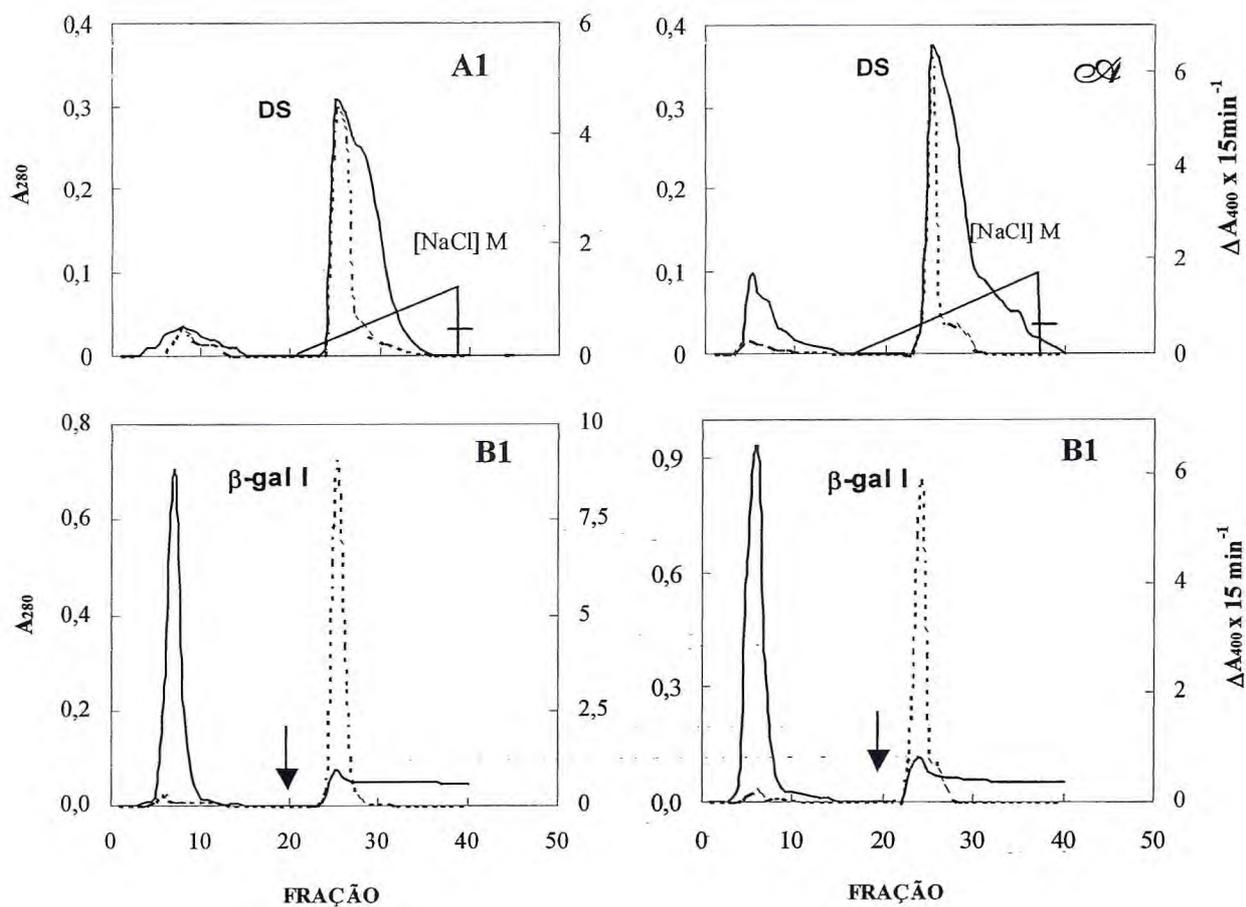


Figura 9- Purificação da β -galactosidase I (β -gal I) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no estágio de desenvolvimento VIII, em condições controle (1) e em tratamento salino (2) A. Cromatografia em DEAE-Sephadex das frações citosólicas (F_{20-80%}). B. Cromatografia em Lactosil-Sepharose dos picos retidos (DS). Proteína (A₂₈₀ —) e atividade β -galactosidásica ($\Delta A_{400} \times 15 \text{min}^{-1}$ ----).

5.2- Purificação da β -galactosidase associada à parede celular

Durante o processo de extração de proteínas oriunda de parede celular das raízes, foram realizados ensaios das enzimas glucose-6-fosfato desidrogenase e fosfatase ácida, para detectar a presença de contaminações oriundas dos extratos citosólicos nos extratos de parede celular. Essas enzimas são utilizadas como marcadoras, uma vez que são proteínas tipicamente citosólicas e vacuolares, respectivamente. Nos ensaios da glucose-6-fosfato desidrogenase, verificou-se uma atividade de $7,39 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ de NADPH/min nos extratos citosólicos, já nos extratos de parede celular, não foi detectada atividade dessa enzima. A atividade da fosfatase ácida observada nos extratos de parede celular foi de $0,052 \text{ mM} \times \text{gMS}^{-1} \times \text{h}^{-1}$, o que representou apenas 2,6% da atividade verificada nos extratos citosólicos, que foi de $2,0 \text{ mM} \times \text{gMS}^{-1} \times \text{h}^{-1}$. Esses resultados comprovaram a eficácia das 6 lavagens realizadas nos precipitados utilizados nas extrações de proteínas presentes na parede celular, garantindo uma baixa contaminação.

O processo de purificação da β -gal II está sumarizado na tabela 4. Diferente das frações 20-80% de proteínas citosólicas, a fração rica em atividade β -galactosidásica presente nos extratos de parede celular correspondeu à fração precipitada no intervalo de 40-100% de saturação ($F_{40-100\%}$). Após o fracionamento, a quantidade de proteína obtida chegou a pouco mais de 4,0 mg de proteína no estágio VIII em condições controle, já no tratamento salino, a $F_{40-100\%}$ foi de apenas 0,59 mg de proteína. No III estágio, as frações corresponderam a 1,77 e 2,0 mgP, nos tratamentos controle e salino, respectivamente. A baixa quantidade protéica das frações de parede celular limitou o uso das mesmas nas colunas cromatográficas utilizadas para a purificação da β -galactosidase citosólica (β -gal I). Desta forma, para viabilizar a purificação da β -gal II e garantir a recuperação da atividade enzimática, as frações 40-100% foram aplicadas diretamente na coluna de afinidade Lactosil Sepharose, uma vez que, para a enzima citosólica, esta etapa proporcionou o maior grau de purificação. Quando aplicadas nessa coluna, a $F_{40-100\%}$ originou um único pico com atividade β -galactosidásica, o qual ficou retido na coluna (β -gal II) e que foi eluído com solução de lactose a 100 mM e NaCl a 0,5 M (Figura 10).

Essa etapa proporcionou graus de purificação de 3,7 e 3,5 para a enzima no estágio III, tratamentos controle e salino, respectivamente, e de 22,7 e 13 para a enzima do estágio VIII, tratamentos controle e salino.

TABELA 4. Purificação da β -galactosidase presente na parede celular (β -gal II) de raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino.

Etapa de Purificação	Atividade Total (UA x h⁻¹)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (UA x mg⁻¹ x h⁻¹)	Recuperação (%)	Purificação (X)
Estádio III condições controle					
Extrato Bruto	524.400	7,45	70.389	100	1,0
F ₄₀₋₁₀₀	146.765	1,77	82.918	28	1,2
Lactosil-Sepharose β -gal II	56.079	0,21	267.043	10,7	3,7
Estádio III tratamento salino					
Extrato Bruto	371.471	13,36	27.805	100	1,0
F ₄₀₋₁₀₀	67.361	2,0	33.681	18,1	1,2
Lactosil-Sepharose β -gal II	22.304	0,23	96.974	6,0	3,5
Estádio VIII condições controle					
Extrato Bruto	419.474	11,39	36.828	100	1,0
F ₄₀₋₁₀₀	236.368	4,12	57.371	56,3	1,5
Lactosil-Sepharose β -gal II	109.154	0,13	839.646	26,0	22,7
Estádio VIII tratamento salino					
Extrato Bruto	156.945	4,52	34.722	100	1,0
F ₄₀₋₁₀₀	34.394	0,59	58.295	21,9	1,7
Lactosil-Sepharose β -gal II	22.619	0,05	839.646	14,4	13,0

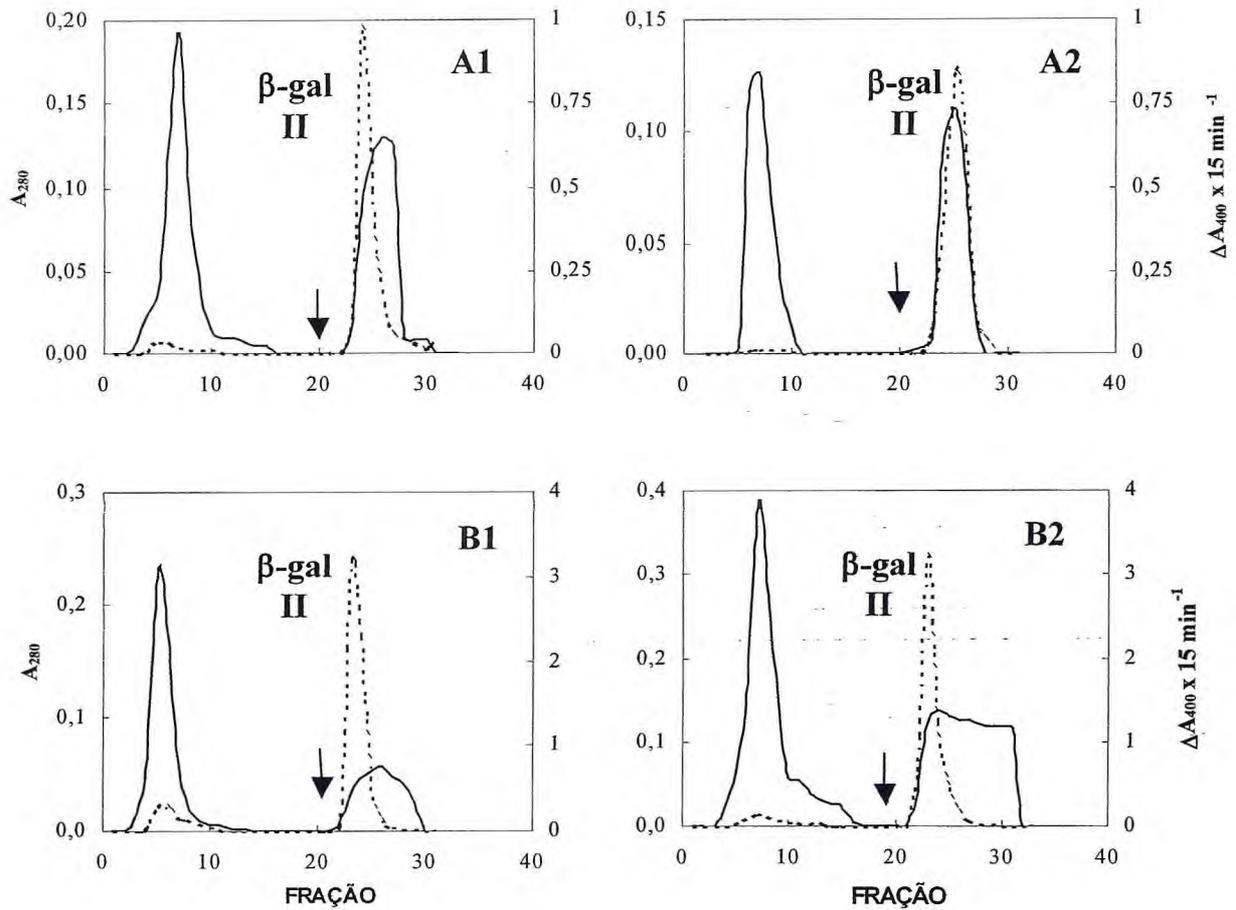


Figura 10- Purificação da β -galactosidase II (β -gal II) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] nos estádios de desenvolvimento III (A) e VIII (B), em condições controle (1) e em tratamento salino (2). Cromatografia em Lactosil-Sepharose das frações (F_{40-100%}). Proteína (A_{280} —) e atividade β -galactosidásica ($\Delta A_{400} \times 15 \text{ min}^{-1}$ ----).

A β -galactosidase II apresentou atividade inferior àquela que estava presente no citosol em todas as condições testadas. Os dados obtidos com a proteína associada à parede celular se assemelham aos encontrados para a enzima citosólica, onde a β -galactosidase mostrou atividade específica superior no estágio de desenvolvimento VIII do que no estágio III (Tabelas 3 e 4).

A ocorrência de várias formas de β -galactosidases purificadas através de uma combinação de técnicas cromatográficas, incluindo cromatografias de troca iônica e de afinidade, foi observada em outras plantas (SIMOS *et al.*, 1989; LI *et al.*, 2001; BISWAS *et al.*, 2003). β -galactosidases oriundas de frações citoplasmáticas e de frações protéicas ligadas à parede celular foram associadas com o crescimento de hipocótilos de *Phaseolus vulgaris* L. (GÓMEZ *et al.*, 1995; BAGATHARIA; CHANDA, 1998) e de epicótilos de *Cicer arietinum* (VALERO; LABRADOR, 1995). A tendência observada em todos os estudos é que a expressão das diferentes isoformas dessas enzimas está sujeita a regulação em função do desenvolvimento da planta (THOMAS *et al.*, 2000).

De acordo com os resultados aqui obtidos, o tratamento salino parece ter retardado a expressão da β -gal II, tanto no estágio III como no estágio VIII. Reduções nas atividades β -galactosidásicas estão correlacionadas com reduções no crescimento das raízes de feijão-de-corda sob efeito de estresse salino (BARBOSA, 2002). Segundo Sousa *et al.* (2003), o estresse salino provoca um retardamento no crescimento e desenvolvimento de plântulas de feijão-de-corda, fato que também foi demonstrado em trabalhos com caules, onde a salinidade inibiu e retardou o crescimento desse órgão (SUDÉRIO, 2001). Por outro lado, em estudos com cotilédones desta mesma espécie, durante a germinação e o estabelecimento de plântulas submetidas ao estresse salino, apesar de terem sido observadas reduções nas atividades de α - e β -galactosidases, nos experimentos *in vitro* não se observou efeito do NaCl nas atividades dessas enzimas (ENÉAS-FILHO *et al.*, 1995). Estes autores sugerem que *in vivo*, a salinidade retarda a solubilização e/ou ativação destas enzimas ou a sua renovação. Estudos, *in vitro*, com algumas hidrolases, incluindo α - e β -galactosidases, de folhas de *Sueda maritima* (halófita) e de hipocótilos de *Vigna radiata* e de *Cicer arietinum*, mostraram que o NaCl, em concentrações de até 1 M, praticamente não afetou a atividade destas enzimas, principalmente as de parede celular, que se mostraram mais tolerantes à salinidade (THYIGARAJAH *et al.*, 1996). Existem poucos dados do efeito do estresse salino na atividade β -galactosidásica, principalmente em órgãos vegetativos. As β -galactosidases têm sido estudadas em plântulas submetidas a outros tipos de estresse. Sawicka & Kacperska (1995) isolaram uma isoforma solúvel de β -galactosidase e duas isoformas presentes

na parede celular de folhas de *Brassica napus*, cujas reduções nas suas atividades específicas estiveram correlacionadas com a inibição do crescimento causado pelo tratamento das plantas com baixas temperaturas.

5.3- Eletroforeses em gel de poliacrilamida de β -galactosidases

As β -galactosidases citosólica (β -gal I) e de parede celular (β -gal II) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes e em pH ácido (4,3). Essas condições de eletroforese são indicadas para proteínas básicas, com pontos isoelétricos (pI) acima de 7,0. Pontos isoelétricos nessa faixa foram obtidos para três isoformas de β -galactosidases parcialmente purificadas de cotilédones desta mesma espécie, *Vigna unguiculata*, cujos pIs foram iguais a 8,7, 8,4 e 8,1 (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000). Outras três isoformas de β -galactosidases isoladas de cotilédones de *Vigna radiata* tiveram pIs iguais a 7,7, 7,5 e 7,3 (LI *et al.*, 2001).

O perfil eletroforético para cada uma das frações de β -galactosidase I e II nos dois estádios (III e VIII), nos tratamentos controle e salino mostrou uma única banda protéica (revelada com nitrato de prata) que correspondeu à mesma banda com atividade β -galactosidásica (revelada por coramento específico) (Figura 11). Esses resultados demonstraram a presença de uma única isoforma de β -galactosidase e que, provavelmente, são de mesma natureza em ambos os estádios estudados. Não foram visualizadas diferenças significativas entre a β -galactosidase I a II e nem entre os tratamentos controle e salino, através do perfil eletroforético. Resultados bastante semelhantes foram encontrados por Biswas *et al.* (2003) trabalhando com *Phaseolus vulgaris*. Eles isolaram uma única isoenzima de β -galactosidase, purificada 90,6 vezes, que correspondeu a uma única banda de proteína no gel em pH 4,0 e que correspondia à única banda revelada no coramento de atividade. Por outro lado, Li *et al.*, (2001) partindo de plântulas completas de *Vigna radiata*, isolaram cinco isoformas de β -gal através de procedimentos de precipitação ácida, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias em DEAE-Celulose e Con A- Sepharose.

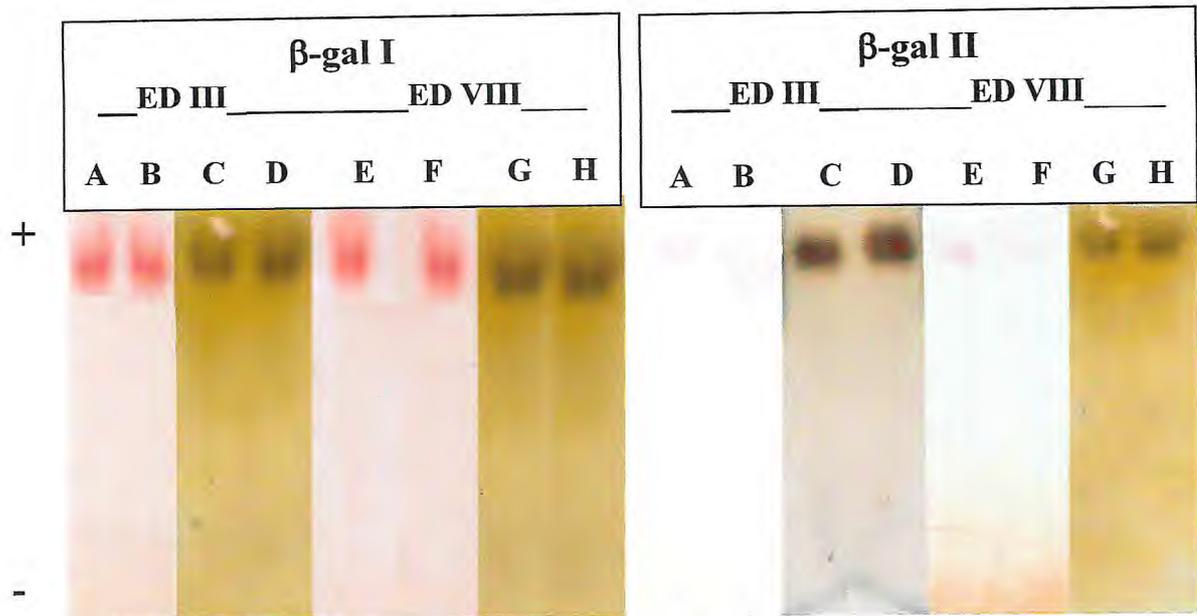


Figura 11. PAGE-nativa em pH ácido da β -galactosidase citosólica (β -gal I) e de parede celular (β -gal II) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] nos estádios de desenvolvimento III e VIII, cultivadas em condições controle (A, C, E e G) e em tratamento salino (B, D, F e H). (A, B, E e F) Revelação das β -galactosidas. (C, D, G e H) Coramento de proteínas com nitrato de prata. Sentido de migração das proteínas no gel: do pólo positivo (+) para o pólo negativo (-).

Na literatura, existem pouquíssimos trabalhos que fazem a distinção entre β -gal oriunda de citosol e as associadas à parede celular (CORCHETE; GUERRA, 1987; SAWICKA; KACPERSKA, 1995). A grande maioria dos trabalhos de purificação parte de proteínas extraídas de frutos (KITAGAWA *et al.*, 1995, ALI *et al.*, 1998) de sementes (BISWAS, 1986; EDWARD *et al.*, 1988; KUNDU *et al.*, 1990; ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001; BISWAS *et al.*, 2003; ALCÂNTARA *et al.*, 2006). Existem poucos trabalhos relacionados com um órgão específico da planta (DOPICO *et al.*, 1990; KONNO; TSUMIKI, 1992; HIRANO *et al.*, 1994; HALDER; BHADURI, 1997).

5.4- Caracterização das β -galactosidases

A segunda etapa desse trabalho consistiu no estudo das propriedades cinéticas das β -galactosidases citosólica (β -gal I) e de parede celular (β -gal II) provenientes de raízes de plântulas no estágio de desenvolvimento III e VIII, semeadas em condições controle e em tratamento salino, para fins comparativos.

5.4.1- Determinações das massas moleculares aparentes

As massas moleculares aparentes da β -gal I e da β -gal II em raízes de plântulas nos estádios de desenvolvimento III e VIII, sob condições controle e de tratamento salino foram determinadas utilizando-se uma coluna de filtração em gel Sephadex G-150. Os perfis de eluição de cada uma das amostras são apresentados nas figuras 12 e 13. A massa molecular da β -galactosidase citosólica na sua forma nativa foi estimada em 163 kDa (Figura 12), enquanto que a β -galactosidase associada à parede celular mostrou uma massa molecular aparente de 134 kDa (Figura 13). Esses resultados demonstram que a β -galactosidase oriunda de citosol corresponde a um tipo de enzima diferente daquela associada à parede celular. Diferentes isoformas de β -galactosidases apresentaram massas moleculares variadas, como em cultura de células de cenoura - 104 kDa (KONNO *et al.*, 1986); em cotilédones de *Vigna sinensis* - 43, 54, 67 e 80 kDa (BISWAS *et al.*, 1986) e de *Trapaolus majus* 97 kDa (EDWARDS *et al.*, 1988); em plântulas de *Vigna radiata* - 87 kDa (LI *et al.*, 2001); em sementes de *Phaseolus vulgaris* - 75 kDa (BISWAS *et al.*, 2003); em caqui - 118 kDa (KANG *et al.*, 1994) e em carambola - 84, 77, 58 e 130 kDa (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2005).

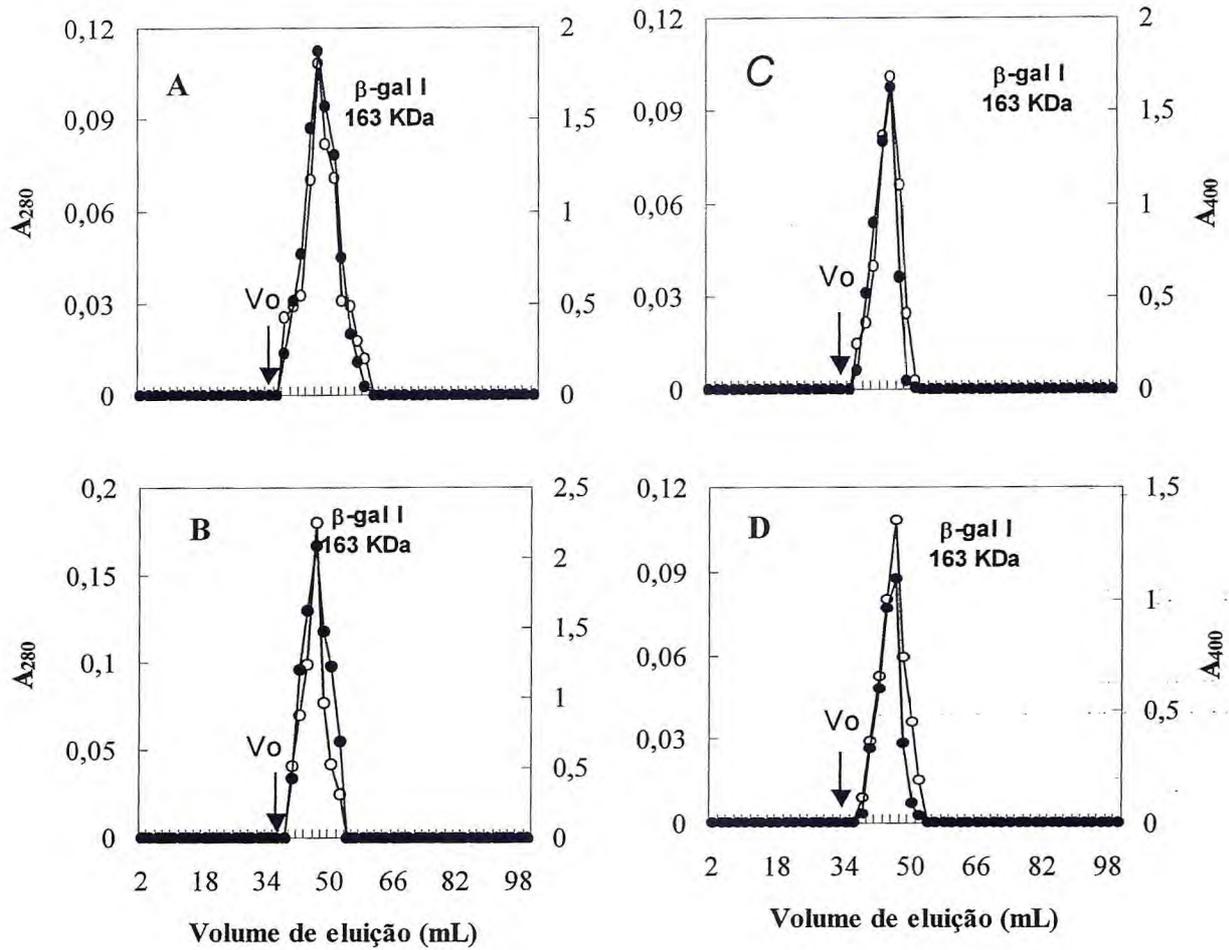


Figura 12– Perfis de eluição em coluna de Sephadex G-150 da β -galactosidase I de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento III, em condição controle (A) e em tratamento salino (B), e no estágio VIII em condição controle (C) e em tratamento salino (D). V_0 representa o volume de exclusão da coluna; A_{400} (o—o); A_{280} (●—●)

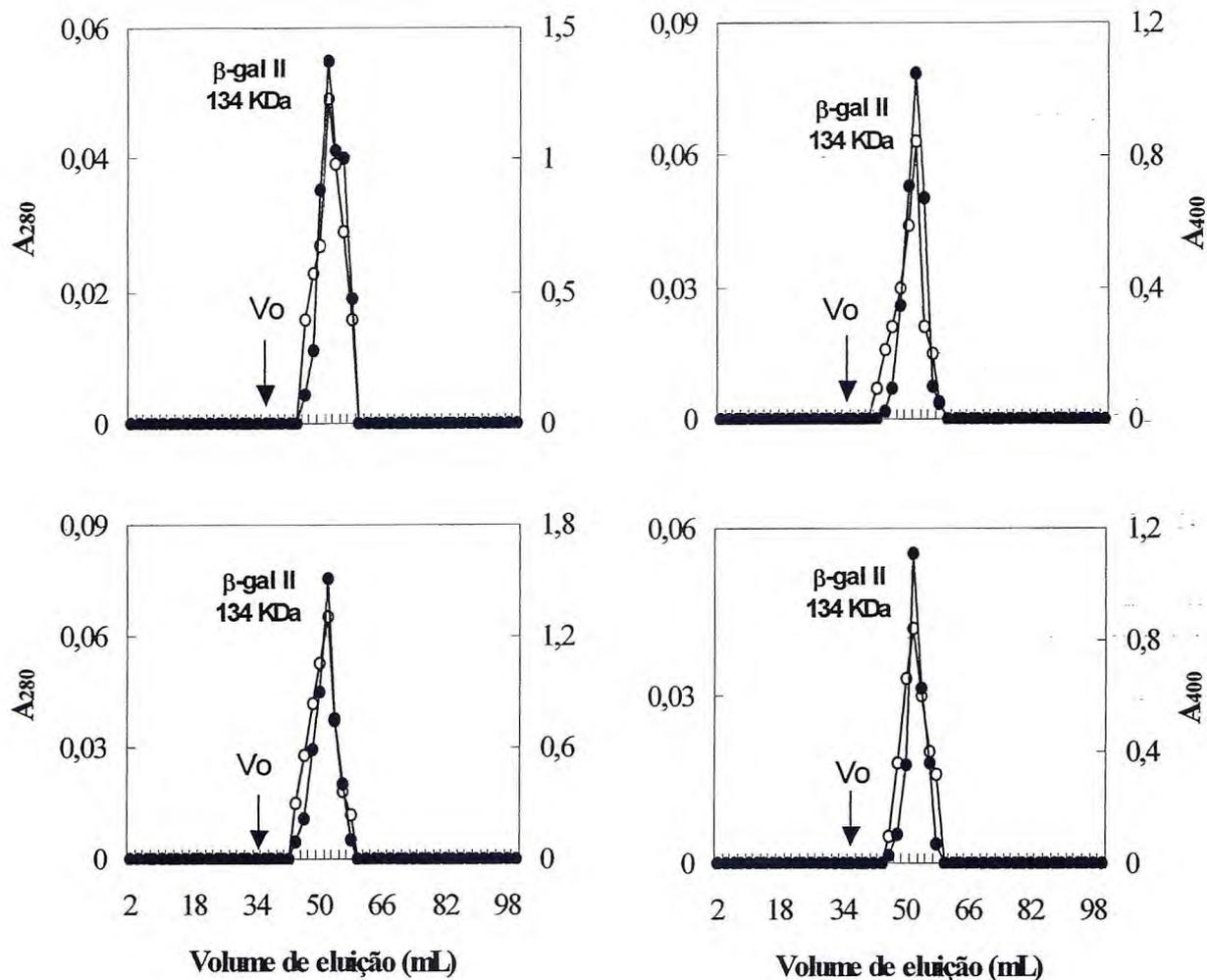


Figura 13—Perfis de eluição em coluna de Sephadex G-150 da β -galactosidase II de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba no estágio de desenvolvimento III, em condição controle (A) e em tratamento salino (B), e no estágio VIII em condição controle (C) e em tratamento salino (D). V_0 representa o volume de exclusão da coluna; A_{400} (O—O); A_{280} (●—●).

5.4.2- Efeito do pH

A figura 14 mostra os resultados do estudo das atividades β -galactosidásicas (β -gal I e II) em função do pH. Na faixa de pH estudada (de 2,5 a 6,5), tanto a atividade β -galactosidásica de citosol quanto a de parede celular foram crescentes até pH 4,5, quando passaram a decrescer, apresentando valores próximos de zero já em pH 6,0. β -galactosidases de sementes de *Kestingeilla geocarpa* (CHILAKA *et al.*, 2002) e de frutos de *Carica papaya* (ALI *et al.*, 1998) apresentaram valores de pHs ótimos iguais aos encontrados no presente trabalho. Outras β -galactosidases apresentaram pHs ótimos próximos, como em cotilédones de *Vigna unguiculata* (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000) e em folhas de *Camellia sinensis* (HALDER; BAHDURI, 1997) que mostraram atividades máximas em pH 4,0. O pH ótimo igual a 4,5 encontrado para a β -gal I e para a β -gal II de ambos os estádios, justifica o insucesso dos coramentos específicos para detecção de atividade da β -galactosidase realizados com géis em pH 8,3 (método de Laemmli, 1970) (resultados não apresentados), ao passo que, em géis com pH 4,3 as atividades dessas enzimas puderam ser reveladas.

5.4.3- Efeito da temperatura

No estudo dos efeitos da temperatura do meio de ensaio nas atividades β -galactosidásicas, observaram-se que as β -gal I e II de ambos os estádios tiveram temperaturas ótimas de 60°C (Figura 15). Diferente da β -gal I citosólica, a β -gal II associada à parede celular apresentou atividade enzimática muito próxima nas temperaturas de 40, 50 e 60°C. Estes resultados concordam com os resultados encontrados para β -galactosidases de cotilédones (ENÉAS-FILHO *et al.*, 2000 e 2001) e de caules (SUDÉRIO, 2001) de plântulas deste mesmo cultivar. Por outro lado, outras temperaturas ótimas foram verificadas para β -galactosidases de folhas de *Camellia sinensis* (50°C) (HALDER; BHADURI, 1997), de sementes de *Glycine Max* (45°C e 50°C) (GUIMARÃES *et al.*, 2001) e em plântulas de *Vigna radiata* (53°C) (LI *et al.*, 2001).

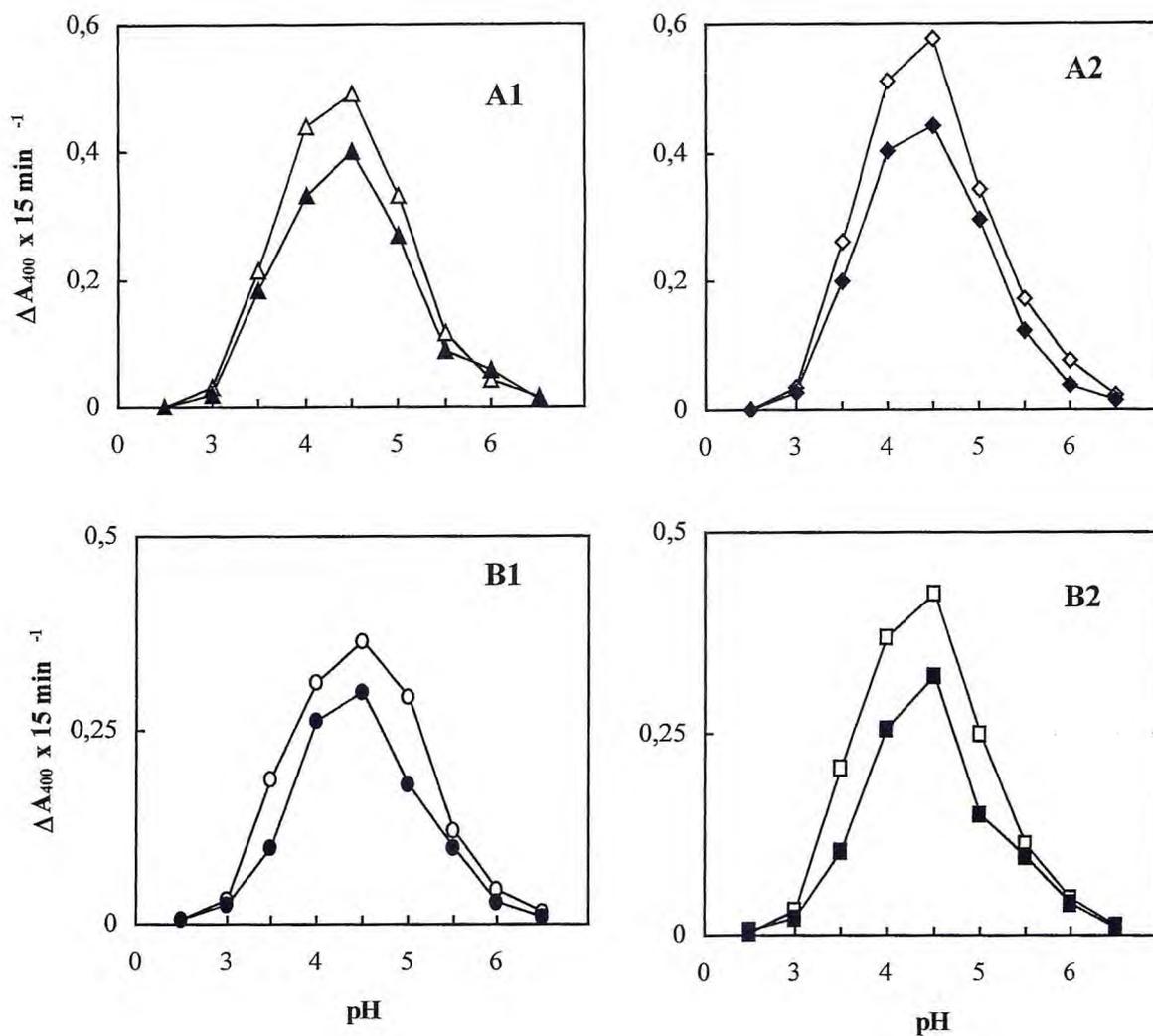


FIGURA 14- Atividade das β -galactosidases I e II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba em função do pH de ensaio.

β -gal I: estágio III (A1) - controle (Δ) e tratamento salino (\blacktriangle); estágio VIII (A2) - controle (\diamond) e tratamento salino VIII (\blacklozenge); β -gal II: estágio III (B1) - controle (O) e tratamento salino (\bullet); estágio VIII (B2) - controle (\square) e tratamento salino (\blacksquare).

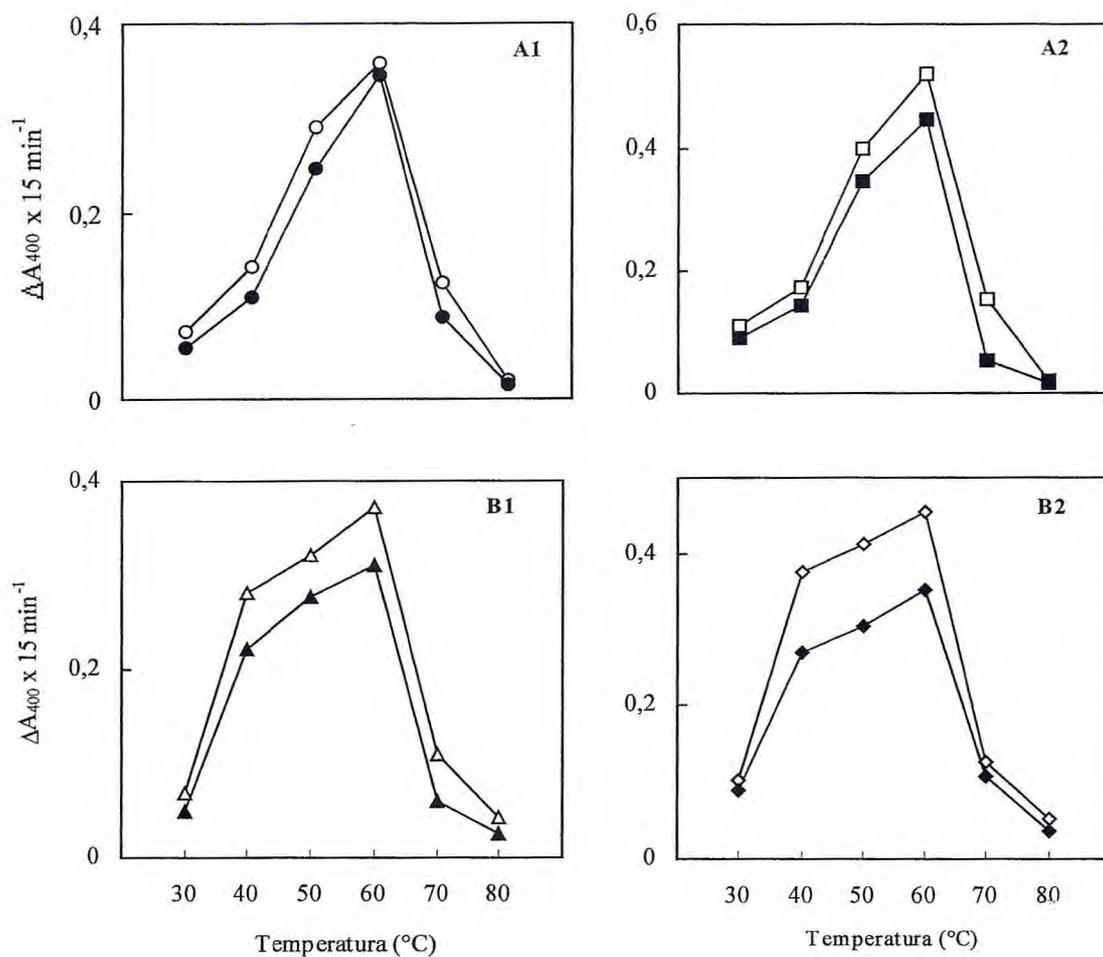


FIGURA 15- Efeito da temperatura do meio de ensaio na atividade das β -galactosidas I e II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba. β -gal I: estágio III (A1) - controle (Δ) e tratamento salino (\blacktriangle); estágio VIII (A2) - controle (\diamond) e tratamento salino VIII (\blacklozenge); β -gal II: estágio III (B1) - controle (O) e tratamento salino (\bullet); estágio VIII (B2) - controle (\square) e tratamento salino (\blacksquare).

5.4.4- Termoestabilidade

Os efeitos de diferentes temperaturas de pré-incubação das β -galactosidases I e II podem ser observados na Figura 16. Tanto a β -gal I quanto a β -gal II foram termoestáveis até 50°C, perdendo toda a atividade a 70°C. Entretanto, a β -gal II mostrou-se mais sensível ao calor, perdendo cerca de 15% de sua atividade na temperatura de 50°C. Resultados similares foram encontrados em caules de plântulas desta mesma espécie, onde as β -galactosidases de citosol e de parede celular também foram termoestáveis até 50°C (SUDÉRIO, 2001). Em cotilédones de *Hymenaea courbaril*, uma β -galactosidase purificada, denominada *hcbetagal*, mostrou um aumento linear na sua atividade quando incubada até a temperatura de 50°C por 30 minutos, perdendo totalmente sua atividade a 55°C (ALCÂNTARA *et al.*, 2006).

Sawicka e Kacperska (1995), trabalhando com folhas de *Brassica napus*, verificaram que as β -galactosidases solúveis e de parede celular, embora tenham apresentado o mesmo pH ótimo igual a 4,0, diferiram em suas temperaturas ótimas (50°C e 55°C, respectivamente) e na termoestabilidade (as enzimas de parede celular foram mais termoestáveis). Em relação às β -galactosidases do presente estudo, as variações nos resultados de termoestabilidade, juntamente com as pequenas diferenças no efeito da temperatura observadas entre a β -galactosidase citosólica e associada à parede celular, apesar de sutis, refletem a natureza diferenciada destas enzimas, sugerindo formas diferentes de regulação, de acordo com sua localização (NAGAHASHI *et al.*, 1992).

5.4.5- Atividade das β -galactosidases em diferentes substratos

As β -galactosidases I e II foram testadas quanto às suas atividades de hidrólise frente a diferentes substratos (Tabelas 5 e 6). Foram utilizados substratos sintéticos glicosídicos derivados do p-nitrofenil na concentração de 3 mM, nas mesmas condições padrões de ensaio utilizadas para o controle (β -PNPG).

O PNP- β -D-fucopiranosídeo foi hidrolisado pelos dois tipos de β -gal correspondendo a percentuais entre 20-28% da atividade do controle. O PNP- α -L-arabinopiranosídeo foi hidrolisado em menor proporção (10-16% da atividade do controle) pelas enzimas estudadas.

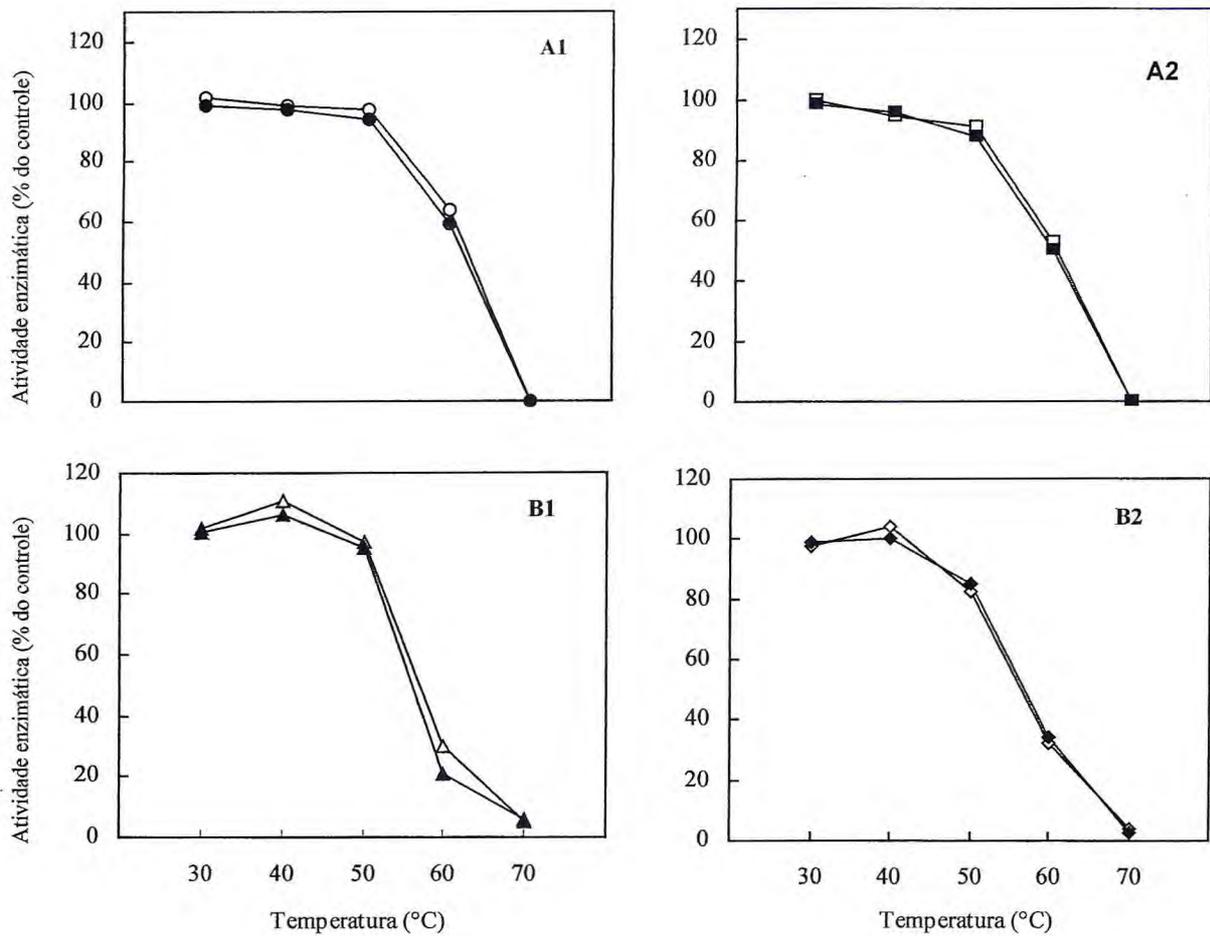


FIGURA 16- Atividade de β -galactosidases I e II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba em função da temperatura de pré-incubação.

β -gal I: estágio III (A1) - controle (Δ) e tratamento salino (\blacktriangle); estágio VIII (A2) - controle (\diamond) e tratamento salino VIII (\blacklozenge); β -gal II: estágio III (B1) - controle (O) e tratamento salino (\bullet); estágio VIII (B2) - controle (\square) e tratamento salino (\blacksquare).

TABELA 5- Atividade enzimática com diferentes substratos p-nitrofenil glicosídicos da β -galactosidase I de raízes de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e de tratamento salino (NaCl a 100 mM). O PNP- β -D-galactopiranosídeo foi utilizado como controle e todos os substratos foram ensaiados na concentração de 3 mM, durante 15 min a 60°C.

Substrato	Atividade β -galactosidásica (UA X h ⁻¹) (%)			
	III estágio		VIII estágio	
	Controle	Tratamento salino	Controle	Tratamento salino
PNP- β -D-galactopiranosídeo	12.480 (100%)	9.500 (100%)	17.384 (100%)	12.320 (100%)
PNP- α -D-galactopiranosídeo	1.232 (27,1%)	427 (4,5%)	1.007 (5,8%)	665 (5,4%)
PNP- β -D-fucopiranosídeo	3.376 (27,2%)	2.565 (27,0%)	4.885 (28,1%)	3.203 (26,0%)
PNP- α -L-fucopiranosídeo	12,4 (0,1%)	19 (0,2%)	139 (0,8%)	123 (1,0%)
PNP- β -D-glucopiranosídeo	200 (1,6%)	285 (3,0%)	782 (4,5%)	517 (4,2%)
PNP- β -D-xilopiranosídeo	528 (4,3%)	427 (4,5%)	920 (5,3%)	616 (5,0%)
PNP- α -D-manopiranosídeo	620 (5,0%)	579 (6,1%)	2.990 (17,2%)	1.281 (10,4%)
PNP- α -L-arabinopiranosídeo	1.390 (11,3%)	988 (10,4%)	1.964 (11,3%)	1.515 (12,3%)

TABELA 6- Atividade enzimática com diferentes substratos p-nitrofenil glicosídicos da β -galactosidase II de raízes de plântulas de feijão-de-corda em condições controle nos estádios de desenvolvimento III e VIII e em tratamento salino (NaCl a 100 mM) no estágio de desenvolvimento VIII. O PNP- β -D-galactopiranosídeo foi utilizado como controle e todos os substratos foram ensaiados na concentração de 3 mM, durante 15 min a 60°C.

Substrato	Atividade β -galactosidásica de parede celular (UA X h ⁻¹) (%)		
	III estágio		VIII estágio
	Controle	Controle	Tratamento salino
PNP- β -D-galactopiranosídeo	4.198 (100%)	5.210 (100%)	4.545 (100%)
PNP- α -D-galactopiranosídeo	180 (4,3%)	245 (4,7%)	227 (5,0%)
PNP- β -D-fucopiranosídeo	877 (20,9%)	1.245 (23,9%)	1.150 (25,3%)
PNP- α -L-fucopiranosídeo	336 (8,0%)	219 (4,2%)	218 (4,8%)
PNP- β -D-glucopiranosídeo	411 (9,8%)	495 (9,5%)	454 (10,0%)
PNP- β -D-xilopiranosídeo	382 (9,1%)	396 (7,6%)	382 (8,4%)
PNP- α -D-manopiranosídeo	361 (8,6%)	266 (5,1%)	241 (5,3%)
PNP- α -L-arabinopiranosídeo	672 (16,0%)	526 (10,1%)	582 (12,8%)

Para os substratos PNP- α -D-galactopiranosídeo e PNP- α -D-manopiranosídeo as atividades foram em torno de 4-6%. O PNP- α -L-fucopiranosídeo parece não ser um substrato compatível tanto para as β -gal I quanto para as β -gal II (atividades inferiores a 4%). A β -galactosidase I citosólica mostrou uma atividade em torno de 4-6% para o PNP- β -D-xilopiranosídeo, enquanto a β -galactosidase II de parede celular hidrolisou este mesmo substrato de 7,6-9,1% do controle. Outra pequena diferença entre as enzimas de parede celular e de citosol foi observada com o substrato PNP- β -D-glucopiranosídeo. Enquanto a β -galactosidase I apresentou atividades inferiores a 5%, a enzima de parede celular atingiu em torno de 10% da atividade do controle para este substrato. Essas pequenas diferenças na especificidade pelos substratos confirmam que a β -galactosidase I purificada de citosol e a isolada de parede celular são diferentes isoformas.

Li *et al.* (2001) compararam a ação de cinco diferentes isoformas de β -gal de *Vigna radiata* com doze substratos artificiais. Três delas, além de serem ativas no p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, utilizado como controle, também hidrolisaram o p-nitrofenil- α -L-arabinopiranosídeo (32 e 24% em relação à atividade do controle) e o p-nitrofenil- β -D-fucopiranosídeo (35 e 31%). Já em cotilédones de *Hymenaea courbaril*, a β -galactosidase foi ativa em pequenas proporções no p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (ALCÂNTARA *et al.*, 2006). β -galactosidases são capazes de explorar múltiplos substratos (MATTHEWS, 2005), portanto testes de atividade enzimática com diferentes substratos são importantes, uma vez que isoformas de β -galactosidases que diferem na especificidade pelos substratos são sintetizadas e/ou ativadas para mobilizar ou modificar componentes da parede celular durante o crescimento da planta (LI *et al.*, 2001).

5.4.6- Efeito de açúcares na atividade β -galactosidásica

As tabelas 7 e 8 mostram os efeitos de açúcares nas atividades enzimáticas das β -galactosidases I e II nos estádios de desenvolvimento III e VIII. Utilizou-se como controle as atividades das enzimas com β -PNPG 3 mM, nas condições padrão, sem adição de açúcar no meio de ensaio.

TABELA 7. Efeito de açúcares na atividade da β -galactosidase I de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII em condições controle, cultivadas em condições controle e em tratamento salino (NaCl a 100 mM). Todos os açúcares foram testados na concentração de 50 mM.

	Atividade β -galactosidásica (UA X h ⁻¹) (%)			
	Estádio III		Estádio VIII	
	Controle	Tratamento salino	Controle	Tratamento salino
Sem Inibidor	16.160 (100%)	15.600 (100%)	20.400 (100%)	17.980 (100%)
Lactose	14.350 (88,8%)	13.634 (87,4%)	19.094 (93,6%)	16.200 (90,1%)
Galactose	4.460 (27,6%)	3.276 (21,0%)	6.079 (29,8%)	4.908 (27,3%)
Arabinose	15.248 (94,4%)	14.789 (94,8%)	18.650 (91,4)	16.721 (93,0%)
Fucose	16.144 (99,9%)	15.382 (98,6%)	20.890 (102,4%)	17.944 (99,8%)

TABELA 8. Efeito de açúcares na atividade da β -galactosidase II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba nos estádios de desenvolvimento III e VIII, cultivadas em condições controle e em tratamento salino (NaCl a 100 mM). Todos os açúcares foram testados na concentração de 50 mM.

	Atividade β -galactosidásica (UA X h ⁻¹) (%)			
	Estádio III		Estádio VIII	
	Controle	Controle	Tratamento salino	
Sem Inibidor	4.560 (100%)	9.504 (100%)	6.550 (100%)	
Lactose	3.922 (86,0%)	8.496 (89,4%)	5.830 (89,0%)	
Galactose	1.360 (29,6%)	3.056 (32,1%)	1.880 (28,7%)	
Arabinose	4.112 (90,2%)	8.720 (91,7%)	5.600 (91,6%)	
Fucose	4.368 (95,7%)	8.928 (93,9%)	6.236 (95,2%)	

Entre os açúcares testados, a galactose foi o que mais inibiu a atividade β -galactosidásica, reduzindo em torno de 68-79% das atividades, tanto da enzima citosólica quanto da oriunda de parede celular, em ambos os estádios de desenvolvimento e condições de tratamento. A lactose inibiu levemente as atividades enzimáticas (6-14% de inibição), enquanto a arabinose inibiu cerca de 6-10% dessas atividades. A fucose reduziu menos que 5% das atividades das β -galactosidases I e II. O padrão de inibição enzimática pelos açúcares não apresentou variação entre os diferentes estádios e condições estudadas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Li *et al.* (2001) para as β -galactosidases de *vigna radiata*. As atividades de três isoenzimas estudadas por esses autores, usando β -PNPG como substrato, foram inibidas em 71-72% pela galactose, e pela lactose em 26-28%, ambas a 50 mM. Entretanto, essas isoenzimas não foram afetadas pela arabinose e nem pela fucose. Tu *et al.* (2006) observaram que a galactose e a lactose também inibiram a atividade da β -galactosidase purificada de cotilédones de *Cicer arietinum*. A galactose tem sido reportada como um inibidor competitivo da atividade β -galactosidásica em sementes de *Kestingeilla geocarpa* (CHILAKA *et al.*, 2002) e em cotilédones de *Hymenaea courbaril* (ALCÂNTARA *et al.*, 2006).

5.4.7- Termoinativação

Para o estudo da inativação térmica, as β -galactosidases foram incubadas a 60°C por tempos de 20, 40, 60 e 80 minutos, em presença e ausência dos açúcares glucose (50 mM) e galactose (50 mM). Tanto a β -gal I quanto a β -gal II apresentaram curvas de termoinativação bifásicas, composta por uma fase inicial de inativação rápida e de uma segunda fase de inativação mais lenta (Figuras 17 e 18). As enzimas foram parcialmente protegidas da termoinativação pela glucose e, principalmente pela galactose. Essa tendência foi observada tanto para a β -gal I quanto para a β -gal II.

Resultados bastante semelhantes foram relatados por CHILAKA *et al.* (2002) para uma β -galactosidase purificada de semente de *Kestingeilla geocarpa*. Esses autores explicam que na fase inicial da termoinativação acontece a desnaturação das proteínas, desenrolando as moléculas protéicas e desfazendo suas conformações nativas. Forma-se assim uma mistura heterogênea de formas intermediárias instáveis de diferentes conformações. Na segunda fase, de inativação mais lenta, prevalecem formas diferentes da conformação nativa, mas que são termodinamicamente

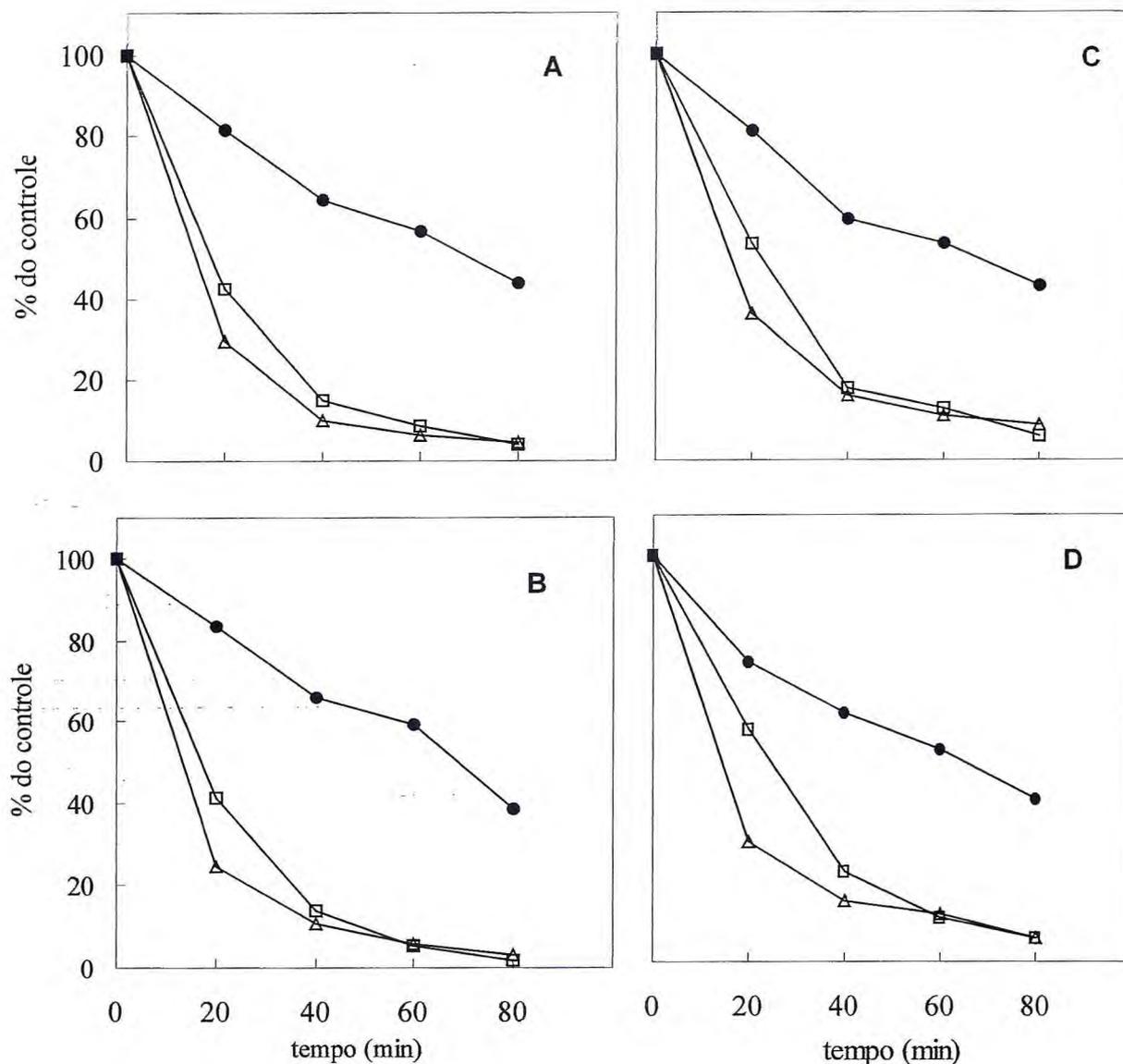


FIGURA 17- Termoinativação da β -galactosidase I de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba, na ausência (Δ) e na presença de glucose (\square) e de galactose (\bullet) em função do tempo de incubação a 60°C. Plântulas no estágio de desenvolvimento III, em condições controle (A) e em tratamento salino [NaCl a 100mM] (B); Plântulas no estágio de desenvolvimento VIII, em condições controle (C) e em tratamento salino [NaCl a 100 mM] (D).

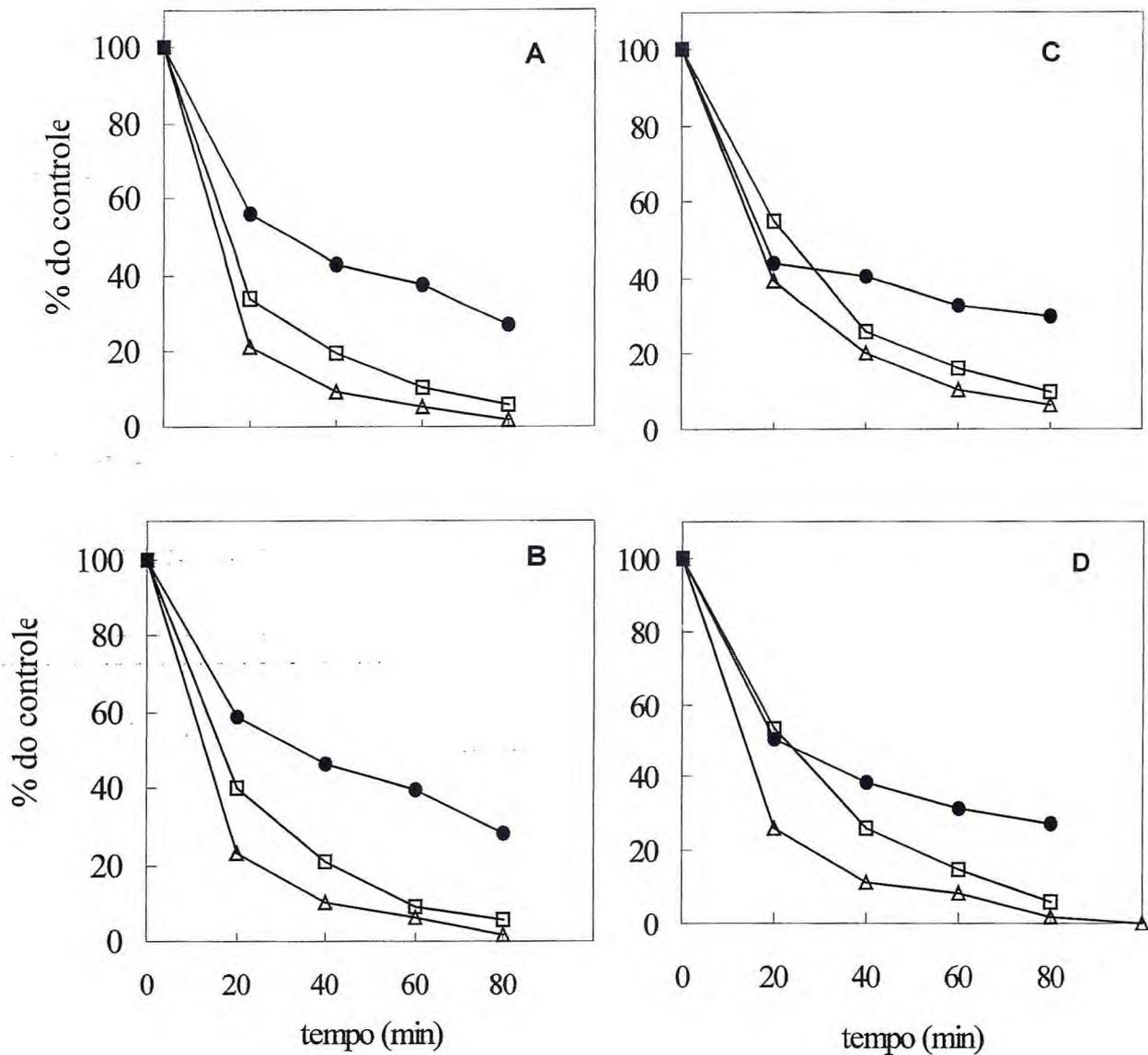


FIGURA 18- Termoinativação da β -galactosidase II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba, na ausência (Δ) e na presença de glucose (\square) e de galactose (\bullet) em função do tempo de incubação a 60°C. Plântulas no estágio de desenvolvimento III, em condições controle (A) e em tratamento salino (B) e no estágio de desenvolvimento VIII, em condições controle (C) e em tratamento salino [NaCl a 100 mM] (D).

mais estáveis (UVERSKY, 2002; BOWLER, 2007). A galactose e a glucose ligam-se ao sítio ativo das β -galactosidases causando mudanças conformacionais que estabilizam a forma cataliticamente ativa, controlando, até certo ponto, a desnaturação pelo calor (DANIEL *et al.* 1996). Ligantes, especialmente substratos, produtos e inibidores são capazes de aumentar a estabilidade térmica das proteínas (ROSE *et al.*, 2006).

5.4.8- Análise cinética da atividade β -galactosidásica

Para analisar a cinética enzimática das β -galactosidases I e II, inicialmente, determinou-se as constantes aparentes de Michaelis-Menten e as velocidades máximas das reações enzimáticas, através dos gráficos duplos-recíprocos.

A β -galactosidase I apresentou um K_m igual a 0,657 mM e V_{max} de 0,707 $\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1}$ para o β -PNPG (Figura19), enquanto a β -galactosidase II mostrou um K_m de 1,9 mM e V_{max} de 0,359 $\Delta A_{400} \times 15\text{min}^{-1}$. Valores de K_m para este mesmo substrato foram semelhantes aos de β -galactosidases de epicótilos de *Cicer arietinum* (1,72 mM) (DOPICO *et al.*, 1990); de frutos de *Mangifera indica* (0,98, 1,11 e 0,95 mM) (PRASANA *et al.*, 2004). Entretanto, eles foram contrastantes com os de Sawicka e Kacperska (1995), em trabalhos com folhas de *Brassica napus*, onde eles observaram que as β -galactosidases citosólicas e de parede celular tiveram K_m respectivamente iguais a 0,25 mM e 50 mM e valores de V_{max} iguais a 2,80 e 1,42 $\mu\text{mol} \cdot (\text{mgP})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, demonstrando que as enzimas associadas à parede celular tinham uma maior afinidade pelo β -PNPG que as enzimas solúveis.

A galactose é conhecida por ter um efeito tóxico nos tecidos vegetais porque ela reduz o afrouxamento da parede celular (CHEUNG; CLELAND, 1991). Tem sido demonstrado também que ela é capaz de inibir β -galactosidases, que liberam galactose da parede celular. Portanto, postula-se que o excesso de galactose livre inibe essa enzima na sua ação de afrouxamento da parede celular durante o alongamento de órgãos ou amadurecimento de frutos (THORPE *et al.*, 1999). É possível que esta inibição promovida pela galactose esteja relacionada com mecanismos de regulação da atividade dessa enzima (ALCÂNTARA *et al.*, 2006).

Para verificar o tipo de inibição promovida pela galactose nas β -galactosidases de raízes de feijão-de-corda, uma segunda análise cinética foi realizada. Para isso, as atividades das β -galactosidases I e II na ausência e na presença de concentrações crescentes de galactose (2,5, 10,

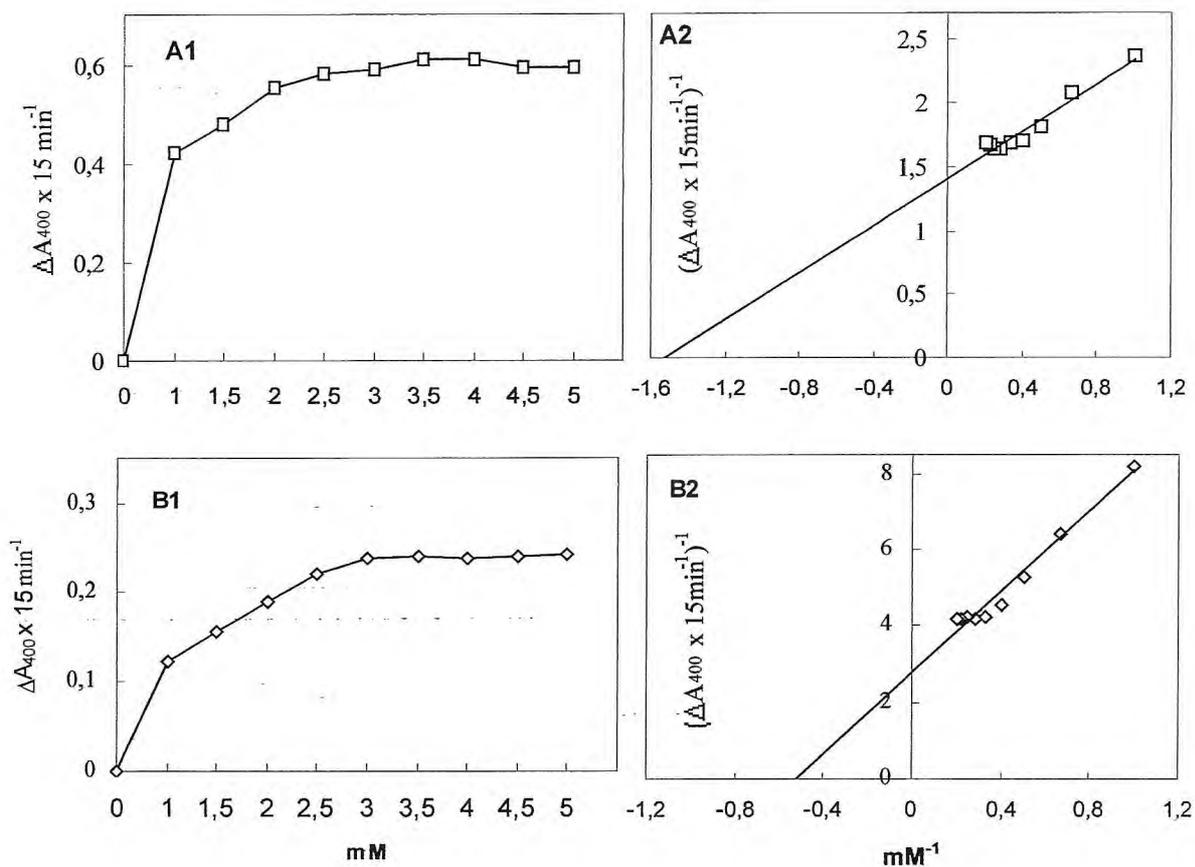


Figura 19– Curvas de atividade enzimática em função de concentrações crescentes do substrato β -PNPG (1) e seus respectivos gráficos duplos recíprocos (Lineweaver-Burk) (2) da β -galactosidase I citosólica (A) e da β -galactosidase II de parede celular (B) de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba, no estágio de desenvolvimento VIII, cultivadas em condições controle.

20 e 30 mM) foram realizadas. Utilizou-se o β -PNPG como substrato nas concentrações de 2,0, 2,5, 3,5, 5 e 10 mM. Os dados obtidos mostraram que a galactose promoveu a inibição da atividade da β -galactosidase I, atuando num padrão de inibição mista (Figura 20). Nesse caso a galactose é capaz de se ligar à enzima reduzindo sua afinidade pelo seu substrato, como pode se ligar ao complexo enzima/substrato, tornando a enzima cataliticamente inativa. Dessa forma, tanto a afinidade da enzima pelo substrato quanto a velocidade da reação podem ser afetadas pela presença do inibidor, cuja ação independe da concentração do substrato. Por outro lado, a enzima associada à parede celular (β -gal II) teve um tipo de inibição diferente da citosólica, tendendo para inibição competitiva, com um coeficiente de inibição (K_i) igual a 6,75 mM (Figura 21). Outros trabalhos com β -galactosidases purificadas relataram efeitos de inibição competitiva pela galactose (LADERO *et al.*, 2000; ALCÂNTARA *et al.*, 2006; BISWAS *et al.*, 2003).

5.5. Caracterização molecular

Numa terceira etapa de experimentos, realizou-se um estudo da expressão gênica das β -galactosidases em raízes de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino, tanto para confirmar o nível de expressão gênica das β -galactosidases nos dois estádios, como para analisar o efeito do sal na expressão dessas enzimas.

5.5.1. Grau de pureza e integridade do RNA total

Após a extração de RNA total das raízes, 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). A pureza de amostras de RNA total extraídas de materiais vegetais pode ser avaliada através das relações entre absorvâncias A_{230} , A_{260} e A_{280} . A relação A_{260}/A_{230} pode ser usada para verificação de contaminação com polissacarídeos, de modo que para uma amostra sem açúcares contaminantes, 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 (GASIC *et al.*, 2004). As relações de

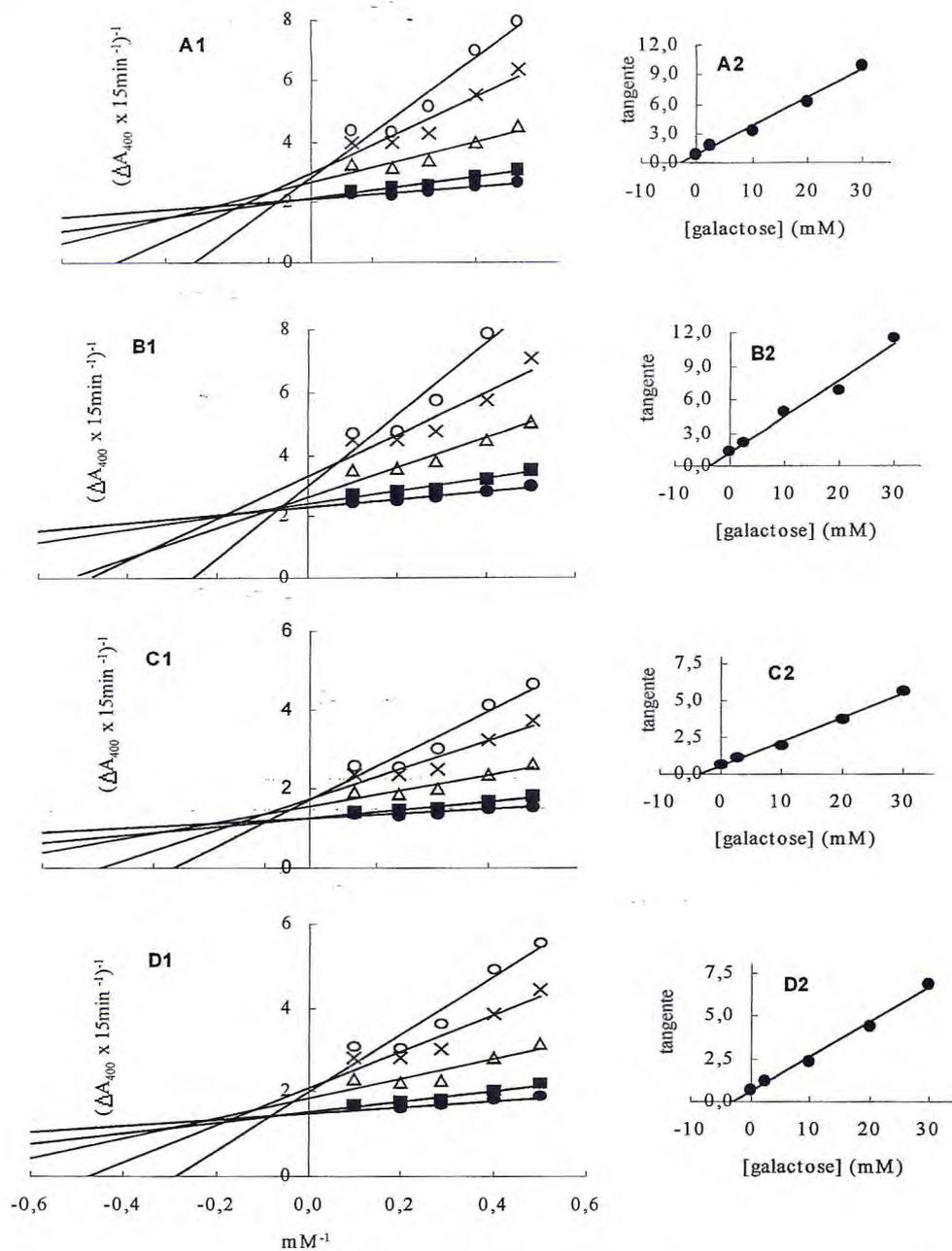


Figura 20– Análise cinética da atividade da β -galactosidase I de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba, no estágio de desenvolvimento III, em condições controle (A1 e A2) e em tratamento salino (B1 e B2) e no estágio VIII, em condições controle (C1 e C2) e em tratamento salino (D1 e D2). Inibição de diferentes concentrações de galactose livre com variadas concentrações de substrato (β -PNPG). 1. Gráfico de Lineweaver-Burk. (●) $1/V_i$ sem galactose livre; (■) $1/V_i$ com 2,5mM de gal; (Δ) $1/V_i$ com 10mM de gal; (\times) $1/V_i$ com 20mM de gal; (o) $1/V_i$ com 30mM de gal. 2. Gráficos dos valores das tangentes das linhas dos respectivos gráficos de Lineweaver-Burk versus concentração de gal.

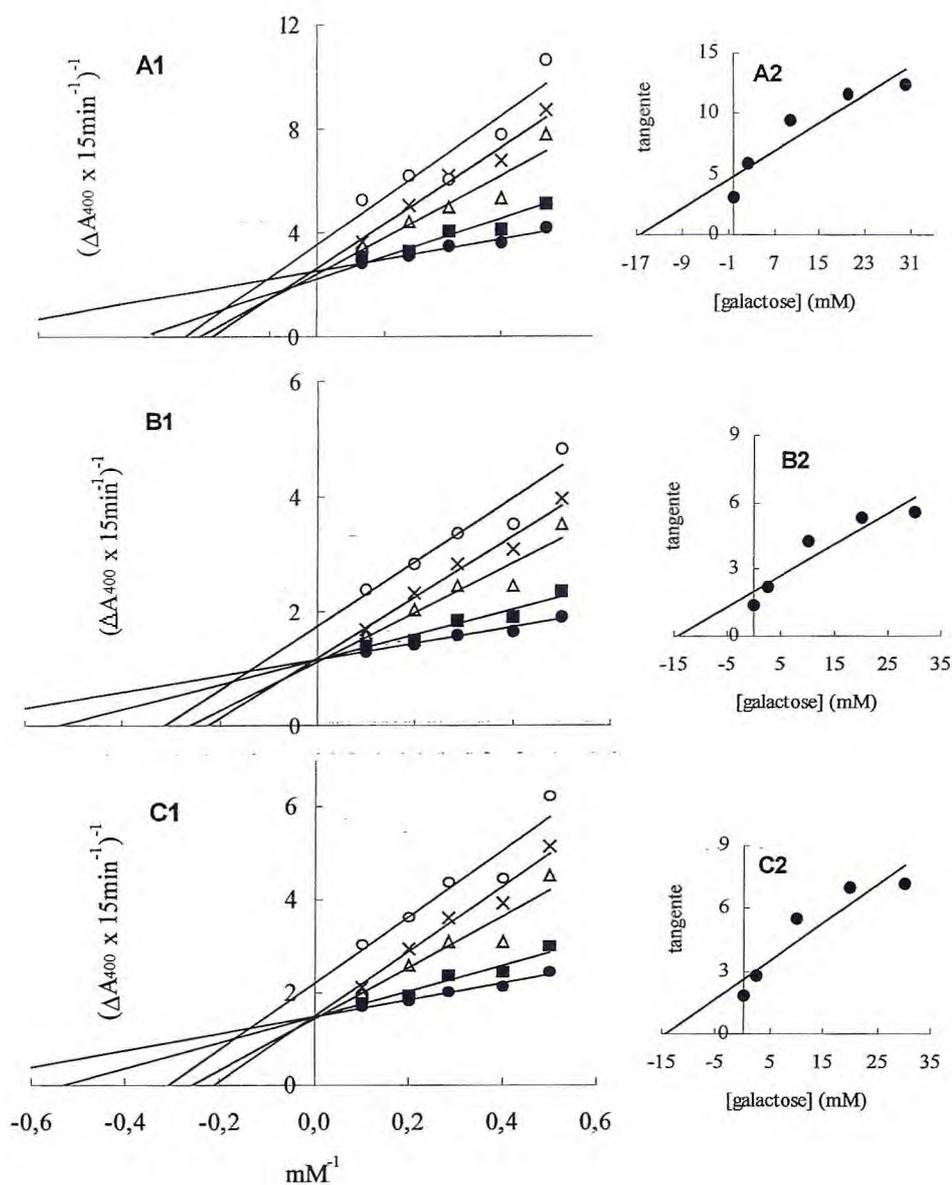


Figura 21- Análise cinética da atividade da β -galactosidase II de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba, no estágio de desenvolvimento III, em condições controle (A1 e A2) e no estágio VIII, em condições controle (B1 e B2) e de tratamento salino (C1 e C2). Inibição de diferentes concentrações de galactose livre com variadas concentrações de substrato (β -PNPG). 1. Gráfico de Lineweaver-Burk. (●) $1/V_i$ sem galactose livre; (■) $1/V_i$ com 2,5mM de gal; (Δ) $1/V_i$ com 10mM de gal; (\times) $1/V_i$ com 20mM de gal; (o) $1/V_i$ com 30mM de gal. 2. Gráficos dos valores das tangentes das linhas dos respectivos gráficos de Lineweaver-Burk versus concentração de galactose.

Tabela 9- Absorbâncias em 260 (A_{260}), 230 (A_{230}) e 280 (A_{280}) nm e relações de absorbância A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} para verificação do grau de pureza dos RNAs totais extraídos de raízes de plântulas de feijão-de-corda nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino (NaCl 100 mM).

Amostras de RNA total	Valores de absorbância			Relações	
	A_{260}	A_{230}	A_{280}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
Estádio III (Controle)	0,290	0,143	0,139	2,02	2,09
Estádio III (NaCl 100 mM)	0,325	0,170	0,159	1,91	2,04
Estádio VIII (Controle)	0,261	0,132	0,129	1,98	2,02
Estádio VIII (NaCl 100 mM)	0,199	0,099	0,099	2,01	2,01

A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} obtidas para o RNA total extraído de raízes em todas as condições estudadas (Estádios III e VIII, controle e tratamento salino) atenderam a esses critérios. A relação A_{260}/A_{230} apresentou valores entre 1,91 a 2,02, enquanto a relação A_{260}/A_{280} apresentou valores entre 2,01 e 2,08.

A integridade das amostras de RNA total das raízes foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (Figura 22), na qual se observou a presença de duas bandas principais correspondendo aos RNAs ribossômicos (rRNAs) 25 e 18 S, não apresentando degradação aparente. Além disso, não se observam bandas acima do rRNA 25 S, o que poderia indicar contaminação com DNA genômico. Portanto, de acordo com esses resultados, o RNA total obtido apresentou boa qualidade para ser utilizado nas reações de RT-PCR (SAMBROOK *et al.*, 1989).

5.5.2- Expressão de gene(s) de β -galactosidases

A expressão de gene(s) de β -galactosidases em raízes de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba foi analisada através de RT-PCR (Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da

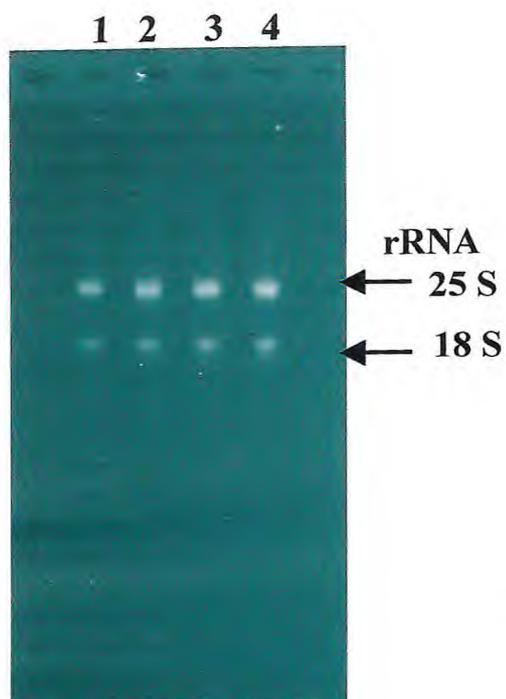


Figura 22- Eletroforese em gel de agarose 1,5% de RNA total (0,5 μ g) extraído de raízes de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba. **1.** Estádio de desenvolvimento III (controle); **2.** Estádio de desenvolvimento III (tratamento salino); **3.** Estádio de desenvolvimento VIII (controle); **4.** Estádio de desenvolvimento VIII (tratamento salino).

polimerase) usando-se “primers” degenerados da β -galactosidase(β -galF/ β -galR) e RNA total extraído de raízes de plântulas dos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino. Para se obter uma análise semiquantitativa dos transcritos de β -galactosidases, os ensaios foram realizados usando-se actina como controle constitutivo (Figura 23 B).

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 23 A). A análise dos transcritos mostrou que no estádio de desenvolvimento VIII, o nível de transcritos foi maior que no estádio III, tanto em condições controle como de tratamento salino. Esses resultados sugerem um controle temporal da síntese de β -galactosidases ao longo dos estágios morfofisiológicos. Os resultados encontrados para as atividades específicas na primeira etapa de experimentos, podem refletir esse incremento da expressão de β -galactosidases no estádio VIII. Por outro lado, não foram observadas diferenças aparentes entre os níveis de transcritos em raízes de plântulas em condições controle e de tratamento salino, portanto as condições de salinidade às quais foram submetidas as plântulas de feijão-de-corda parece não ter afetado a expressão gênica das β -galactosidases de raiz cujos cDNAs puderam ser amplificados com o uso desses “primers”. Portanto esses dados de expressão não corroboram com as reduções na atividade β -galactosidásica, sob efeito da salinidade, verificadas nas etapas de purificação e caracterização bioquímica. Uma possível explicação para essa discrepância é que, um determinado par de “primer” não é capaz de amplificar todos os cDNAs de β -galactosidases, principalmente porque essas enzimas pertencem a uma família multigênica.

Para o desenho dos “primers” utilizados na amplificação dos cDNAs do presente trabalho, tomamos como base a árvore filogenética descrita por Esteban *et al.* (2005), quando analisaram a expressão de quatro genes das β -galactosidases presentes em epicótilos de *Cicer arietinum*. As seqüências de β -galactosidases utilizadas no alinhamento adotado neste trabalho pertencem ao grupo IV da árvore filogenética descrita por esses autores, entre elas estão β -galactosidases de *Vigna radiata* e de *Lupinus angustifolius*, ambas leguminosas. De acordo com os resultados encontrados para as β -galactosidases de *Cicer arietinum*, as enzimas pertencentes ao grupo IV estão relacionadas com a degradação de polissacarídeos pécticos. Além disso, o gene CanBGal-4 (codifica β -gal pertencente ao grupo IV) foi detectado principalmente nos estádios mais

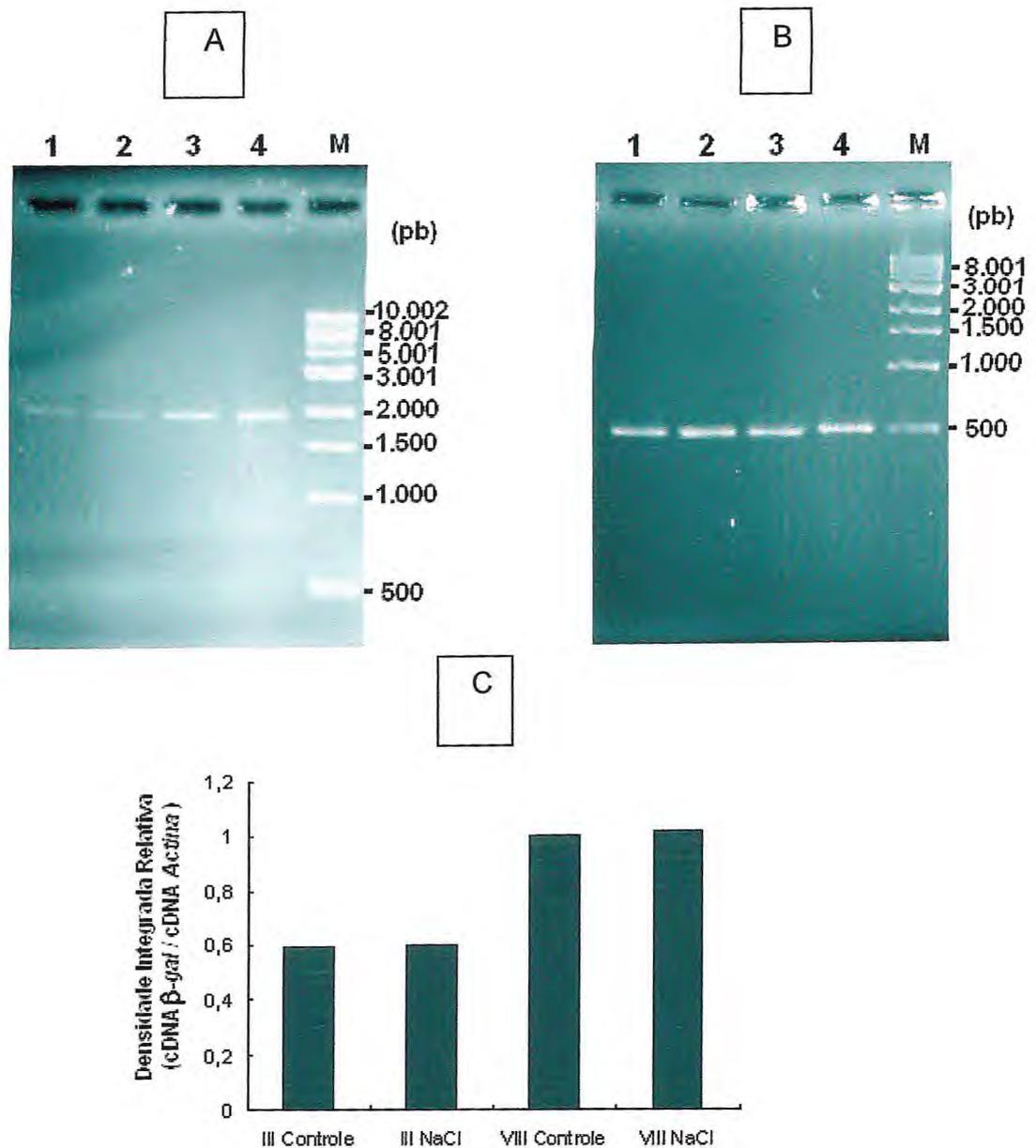


Figura 23- Análise de transcritos de β -galactosidases de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba. **A.** Produtos de RT-PCR de β -galactosidase; **B.** Produtos de RT-PCR de Actina (controle constitutivo); **C.** Quantidade relativa de transcritos de β -galactosidase 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).

avanzados do crescimento dos epicótilos de *Cicer arietinum*. Segundo os autores, essa enzima pode estar associada com a hidrólise de substratos desconhecidos cuja modificação causa uma rigidez na parede celular, provavelmente pela compactação das pectinas. Portanto, os transcritos aqui analisados, provavelmente, não estão relacionados com as β -gal I e II caracterizadas nas etapas iniciais. Além disso, sabe-se que a maioria dos genes que codificam proteínas de parede celular não é induzível, mas sim, constitutivo, desta forma, seus níveis de expressão variam em proporção limitada, podendo esta variação não ser detectada (YOSHIOKA *et al.*, 2003). Estudos anteriores mostraram que a salinidade tanto retardou quanto inibiu a atividade de β -galactosidases presentes nas raízes e nos caules de plântulas de feijão-de-corda e que as reduções de atividade destas enzimas estavam correlacionadas com as reduções de crescimento das plântulas sob efeito do estresse salino (SUDÉRIO, 2001; BARBOSA, 2002). Para saber se o efeito da salinidade está na redução da síntese protéica das β -galactosidases, seria necessário analisar este efeito em cada um dos genes que codificam as várias isoformas que provavelmente existem nessas plântulas, nesse caso, analisar os genes que codificam para a β -gal I e para β -gal II. Mesmo para a espécie de planta mais estudada, a complexidade de se analisar a expressão gênica de β -galactosidases é bem visível. Em *Arabidopsis thaliana*, entre os 18 genes que codificam para β -galactosidases, 12 codificam proteínas que são, provavelmente, secretadas para a parede celular. Não seria surpresa encontrar uma grande variação nos padrões de expressão entre essas β -galactosidases. Além disso, essas enzimas podem agir em arabinogalactanos, cadeias laterais de galactanos ou ramnogalacturonanos I. Conseqüentemente, elas participam de muitos processos fisiológicos. Outro agravante é a possibilidade de subfuncionalização, uma vez que, diferentes enzimas podem agir em tecidos e/ou estádios de desenvolvimento específicos (IGLESIAS *et al.*, 2006).

6- CONCLUSÕES

Foram purificadas duas isoformas de β -galactosidases de raízes de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba: uma oriunda do citosol, denominada β -gal I, e outra associada à parede celular, β -gal II.

Os estudos das propriedades enzimáticas da β -gal I e da β -gal II de raízes de plântulas nos estádios de desenvolvimento III e VIII, em condições controle e em tratamento salino mostraram que essas enzimas não sofrem alterações em suas estruturas ao longo do desenvolvimento, nem em condições de estresse salino;

As análises dos transcritos de β -galactosidases presentes nas raízes de plântulas de feijão-de-corda cv. Pitiúba mostraram que a expressão gênica dessas enzimas ocorre com maior intensidade em plântulas em estágio de desenvolvimento mais avançado (estádio VIII), e que os efeitos da salinidade nas atividades β -galactosidásicas detectadas nas etapas de purificação das enzimas podem não estar relacionados com alterações na expressão gênica.

7- 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. α -galactosidase of *Vigna unguiculata*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2047-2051, 1989.

ALCANTARA, P. H. N., DIETRICH, S. M. C.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG / XLXG) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 37, n. 9, p. 653-663, 1999.

ALCANTARA, P. H. N.; MARTIM, L.; SILVA, C. O.; DIETRICH, S. M. C.; BUCKERIDGE, M. S. Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 44, p. 619-627, 2006.

ALI, M. Z., NG, S., OTHMAN, R. GOH, L.; LAZAN, H. Isolation, characterization and significance of papaya β -galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening. **Physiol. Plant.**, 104:105-115, 1998.

AMZALLAG, G. N. **Estrategies for improving salt tolerance in higher plants**. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. LTD. New Delhi, Calcutta and Enfield (USA). pp 23, 1997.

ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA. Brasília – DF. 722p, 1988.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. **Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches**. New York: The Haworth Press, 2005.

BAGATHARIA, S. B.; CHANDA, S. V. Glycosidases and acid-vertase activities are not correlated with *Phaseolus* hypocotyl growth. **Acta Physiologiae Plantarum**. v.20 (4), p. 431-436, 1998.

BALASUBRANIAN, S.; LEE, H. C.; LAZAN, H.; OTHMAN, R.; ALI, Z. M. Purification and properties of a β -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, β -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. Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfofisiológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) com diferentes graus de resistência à seca. **Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal**. Lavras, Universidade Federal de Lavras. pp. 56, 1996.

BISWAS T. K. Cationic Form of β -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 β -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., NELSON, D.E.; JENSEN, R.G.. Adaptations to Enviromental Stresses. **The Plant Cell**, 7, 1099-1111, 1995.

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.

BOM, I., WASSENAAR, D. V.; BOOT, J. Hybrid affinity chromatography of α -galactosidase from *Verbascum thapsus* L.. **J. Chromat. A**, **808**: 133-13, 1998.

BONGHI, C.; PAGNI, S.; VIDRIH, R.; RAMINA, A.; TONUTTI, P. Cell wall hydrolases and amylase in kiwifruit softening. **Post. Bio. And Tec.** **9**: 19-29, 1996.

BONNIN, E.; LAHAYE, M.; VIGOUROUX, J.; THIBAUT, J. F. Preliminary characterization of a new exo- β -(1,4)-galactanase with transferase activity. **Int. J. Biol. Macromol.** V. 17, p. 345-351, 1995.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; VAN' RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enz. Micr. Tec.** v. 26, p. 271-281, 2000.

BOWLER, B. E. Thermodynamics of protein denatured states. **Mol. Biosyst.**, v. 3, p. 88-99, 2007.

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

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* benth. (Leguminosae- Faboideae). **Plant Science**, v. 117, p. 33-43, 1996.

BUCKERIDGE, M. S. Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 44, p. 619-627, 2006.

BUKOVINSZKY, L.; FROTA, D.Q.; SOUZA, W. Métodos de cadastramento e infraestrutura de uso comum e levantamento das exigências de recuperação de áreas salinizadas nos perímetro irrigados, Fortaleza, Convênio DNOCS/AGROINVEST, 35 P (mimeo), 1992.

CAINES, A. M.; SHENNAN, C.. Interactive effects of Ca^{2+} and NaCl salinity on the growth of two tomato genotypes differing in Ca^{2+} use efficiency. **Plant Physiol. Biochem.**, 37: 569-576, 1999.

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

CARPITA, N. C.; MCCANN, M. C. **The cell wall**. En Buchanan, B. B. Gruissem, W.; Jones, R. L. (Eds) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD, EEUU, pp. 52-108, 2000.

CHAN,C.; TEO, S.; HO,C.; OTHMAN, R. Y. Otimisation of RNA extraction from *Gracilaria changii*(Gracilariales, Rhodophyta) **J. Ap. Phycol**. v.16, p. 297-301, 2004.

CHEN, K., HU, G., KEUTGEN, N., JANSSENS, M. J. J.; LENS, F.. Effects of NaCl salinity and CO_2 enrichment on pepino (*Solanum muricatum* Ait.) I. growth and yield. **Sci. Hort.**, 81: 25-41, 1999.

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

CHROST, B.; SCHMITZ, K. Purification and characterization of multiple forms of alpha-galactosidase in *Cucumis melo* plants. **J. Plant Physiol.**, **156**: 483-491, 2000.

CORCHETE, M.P.; GUERRA, H. Effect of NaCl and Polyethylene glycol on solute content and glycosidase activities during germination of lentil seeds. **Plant, cell and environment**, **9**: 589-593, 1986.

CORCHETE, M. P.; GUERRA, H. α - and β -galactosidase activities in protein bodies and cell walls of lentil seed cotyledons. **Phytochem.** **26**: 927-932, 1987.

COSGROVE, D. J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. **The Plant cell**, **9**:1031-1041, 1997.

COSGROVE, D. J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v. 50, p. 391-417, 1999

COSGROVE, D.J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature** v. 407, p. 321-326, 2000.

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.

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.

DE PASCALE, S., BARBIERI, G.; RUGGIERO, C. Effects of water salinity on plant growth and water relations in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta. Hort.**, 2: 649-655, 1997.

DE VEAU, E. J. I., KENNETH, C. G., HUBER, D. J.; WATADA, A. E. Degradation and solubilization of pectin by β -galactosidases purified from avocado mesocarp. **Physiol. Plant.**, 87: 279-285, 1993.

DOPICO, B., NICOLÁS, G. ; LABRADOR, E. Characterization of a cell wall partial purification of cell wall β -galactosidase of *Cicer arietinum* involved in cell wall autolysis. **Physiol. Plant.**, v. 80, p. 629-635, 1990.

EDWARDS, M., BOWMAN, Y. J. L. , DEA, I. C. M.; REID, J. S. G. A β -D-galactosidase from *Nasturtium (Tropaeolum majus* L.) cotyledons. Purification, properties and demonstration that xyloglucan is the natural substrate. **J. Biol. Chem.** 263: 4333-4337, 1988.

ENÉAS-FILHO, J., BARBOSA, G. K. C.; SUDÉRIO, F. B., PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Isolation and partial purification of β -galactosidases from cotyledons of two cowpea cultivars. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 23, 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 β -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* β -galactosidase with pectin-degrading function. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 718-725, 2003.

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

FAGARD, M.; HÖFTE, H.; VERNHETTES, S. Cell wall mutants. **Plant Physiol. Biochem.** v.38, p. 15-25, 2000.

FANUTTI, C.; GIDLEY, M. J.; REID, J. S. G. Action of a pure xyloglucan endo transglycosylase formerly called xyloglucan-specific endo-(1-4)- β -D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. **Plant J.** 3: 691-700, 1993.

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

FRY, S.. Analysis of crosslinks in the growing cell-walls of higher plants. In: **Mod. Meth. Plant Anal.**, New Series. LINSKENS, H. F. AND JACKSON, J. F. (Eds.). Berlin: Springer, 10: 12-36, 1989.

FRY, S. C.. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Ann. R. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 46: 497-520, 1995.

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.

GALLEGO, P. P.; ZARRA, I.. Cell wall autolyses during kiwifruit development. **Ann. Bot.** 81: 91-96, 1998.

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.

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. **R. Bras. Bot.**, **1**: 83-88, 1978.

GÓMEZ, L. D.; CASANO, M. L.; BRAGA, . R.; BUCKERIDGE, M. S. Changes in extracellular β -galactosidase and protease activities during bean hypocotyl growth. **R. Bras. Fisiol.** V. (7)1, p. 1-6, 1995.

GONZALEZ-MURUA, C., SÁNCHEZ-DÍAZ, M., APARICIO-TEJO, P., MUÑOZ-RUEDA, A.; REID, J.S.G. The effect of NaCl and water stress on germination and α -galactosidase activity in germinated seeds of *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *T. brachycalycinum*. **J. Plant Physiol.**, 119:317-326, 1985.

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

GREENWAY, H.; MUNNS, R.. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Ann. R. Plant Physiol.**, **83**: 517-524, 1980.

GUIMARÃES, V. M., REZENDE S. T., MOREIRA, M. A., BARROS E. G. ; FELIX, C. R. Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

HALDER, J.; BHADURI, A.. Glycosidases from tea-leaf (*Camellia sinensis*) and characterization of β -galactosidase. **Nutr. Biochem.**, 8: 378-384, 1997.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **J. Biochem.** (Tokio) v. 280, p.309-316, 1991.

HIRANO, Y., TSUMURAIA, Y.; HASHIMOTO, Y. Characterization of spinach leaf α -L-arabinofuranosidases and β -galactosidases and their synergistic action on endogenous arabinogalactan – protein. **Physiol. Plant.** 92: 286-296, 1994.

HUBER, D. J.; NEVINS, D. J.. Autolysis of cell-wall β -D-glucan in corn coleoptiles. **Plant Cell Physiol.**, 20: 201-212, 1979.

IGLESIAS, N.; ABELENDA, J. A.; RODIÑO, M.; SAMPEDRO, J.; REVILLA, G.; ZARRA, I. Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.** v.47 (1), p. 55-63, 2006.

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.

JARVIS, M. C.; MACCANN, M. C. Macromolecular biophysics of the plant cell: concepts and methodology. **Plant Physiol. Biochem.** v. 38, p. 1-13, 2000.

KANFER, J. N., PETROVICH, R.; MUMFORD, R. A. Purification of α - and β -galactosidases by affinity chromatography. **Anal. Biochem.**, v. 55, p. 301-305, 1973.

KANG, H. C.; LEE, S. H. Characteristics of an α -galactosidase associated with grape flesh. **Phytochemistry**, 58: 213-219, 2001.

KANG, I.; SUH, S.; GROSS, K. C.; BYUN, J. N-terminal amino-acid sequence of Persimmon Fruit β -galactosidase. **Plant Physiol.** v. 105, p. 975-979, 1994.

KAVI KISHOR, P. B., DIVAKAR RAO, J.; REDDY, G. M. Activity of wall-bound enzymes in callus cultures of *Gossypium hirsutum* L. during growth. **Ann. Bot.**, 69: 145-149, 1992.

KITAGAWA, Y., KANAYAMA, Y.; YAMAKI, S. Isolation of β -galactosidase fractions from Japanese pear: Activity against native cell wall polysaccharides. **Physiol. Plant.**, 93: 545-550, 1995.

KONNO, H.; TSUMUKI H. Purification of a β -galactosidase from rice shoots and its involvement in hydrolysis of the natural substrate in cell walls. **Physiol. Plant.**, v. 89, p. 40-47, 1993.

KONNO, H., YAMASAKI, Y. ; KATOH, K. Characteristics of β -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.; HARPER, J. F. Transcriptome changes for *Arabidopsis* 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 β -galactosidase from the germinating seeds of *Vigna radiata*. *Phytochemistry*, 29(7):2079-2082, 1990.

LABRADOR, E.; NICOLÁS, G.. Autolysis of cell wall in Pea epicotyls during growth. Enzymatic activities involved. **Physiol. Plant.**, 64: 541-546, 1985.

LACERDA, C. F. Efeitos da salinidade no desenvolvimento e composição mineral do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e utilização do Ca^{2+} como meio de minorar tais efeitos. **Dissertação de Mestrado DCS/CCAUFV**. Fortaleza, 87p. 1995.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enz. Microb. Tech.** v. 27, p. 583-592, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. **Nature**, 227:680-685, 1970.

LANG, P.; ZHANG, C.; EBEL, R. C.; DANNE, F.; DOZIER, W. A. Identification of cold acclimates genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. **Gene** v. 359, p. 111-118, 2005.

LEOPOLD, A. C., WILLING, R. P.. Evidence for toxicity effects of salt on membranes. In: **Salinity Tolerance in Plants**. Staples, R. C. & Toinniessen, G. H. eds. New York, Willey, 67-76, 1984.

LEVI, G.; TEICHBERG, V. I.. Isolation and Physicochemical Characterization of Eletrolectin, a β -D-galactoside Binding Lectin from the Elettric Organ of *Electrophorus electricus*. **The J. Biol. Chem.**, 256: 5735-5740, 1981.

LI, Y.; JONES, L.; MCQUEEN-MASON, S. Expansins and cell growth. **Cur. Opinion in Plant Biol.** 6: 603-610, 2003.

LI, S-C; HAN, J-W.; CHEN, K-C.; CHEN, C-S. Purification and characterization of isoforms of β -galactosidases in mung bean seedlings. **Phytochemistry**, v. 57, 349-359, 2001.

LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Interaction btewwen cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carb. Polym.** v.46, p. 157-163, 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.

LORENCES, E. P.; FRY, C. Xyloglucan oligosaccharides with at least two α -D-xilose residues act as acceptor substrates for xyloglucan endotransglycosylase and promote the depolymerization of xyloglucan. **Physiol. Plant.**, 88: 105-112, 1993.

LOVATO, M. B., LEMOS-FILHO, J. P.; MARTINS, P. S. Growth responses of *Stylosanthes humilis* (Fabaceae) populations to saline stress. **Environ. Exp. Bot.**, 41: 145-153, 1999.

LUTTS, S., KINET, J. M.; BOUHARMONT, J.. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. **J. Exp. Bot.**, 46: 1843-1852, 1995.

MAMO, T., RICHTER, C.; HEILIGTAG, B.. Salinity effects on the growth and ion contents of some chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lenns culinaris* Medic.) varieties. **J. Agron. Crop Sci.**, 176: 235-247, 1996.

MARANVILLE, E.; ZHU, A. The carboxyl terminus of coffee bean α -galactosidase is critical for enzyme activity. **Arch. Biochem. Biophys.**, 373: 225-230, 2000.

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.

MATTHEWS, B. W. The structure of *E. coli* β -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.

MCQUEEN-MASON, S. J., FRY, S. C., DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J.. The relationship between xyloglucan endotransglycosilase and in-vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. **Planta** 190: 327-331, 1993.

MINIC, Z.; JOUANIN, L. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 435-449, 2006.

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.

MURRAY, A. K.; BANDURSKI, R. S. Correlative studies of cell wall enzymes and growth. **Plant Physiol.**, **56**: 143-147, 1975.

MWANIKI, M. W.; MATHOOKO, F. M.; MATSUZAKI, M.; HIWASA, K.; TATEISHI, A.; USHIJIMA, K.; NAKANO, R.; INABA, A.; KUBO, Y. Expression characteristics of seven members of the β -galactosidase gene family in 'La France' pear (*Pirus communis* L.) fruit during growth and their regulation by 1-methylcyclopropeno during postharvest ripening. **Postharv. Biol. Tec.** v. 36, p. 253-263, 2005.

NAGAHASHI, G.; LASSITER G. D.; PATERSSON, D. L. Unique properties of cell wall-associated β -glucosidases. **Plant Sci.** **81**: 163-168, 1992.

NEPOMUCEMO, A.L., NEUMAIER, N., FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à Seca em Plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 23, 12-18, 2001.

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. The role of cell wall adjustment in plant resistance to water deficits. **Crop Sci.**, **35**: 1258-1266, 1995.

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.

NIKUS, J.; DANIEL, G.; JONSSON, L. M. V. Subcellular localization of β -glucosidase in rye, maize and wheat seedlings. **Physiologia Plantarum**. v. 111, p. 466-472, 2001.

OLIVEIRA, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. Em: **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Pruski, F. F. XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, Campina Grande, Paraíba, Brasil. pp. 1-32, 1997.

PATAKAS, A.; NOITSAKIS, B. Cell wall elasticity as a mechanism to maintain favorable water relations during leaf ontogeny in grapevines. **Am. J. Enol. Vitic.**, 48: 352-356, 1997.

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

PRESSEY, R. α -galactosidasas in ripening tomatoes. **Plant Physiol.**, 71: 132-135, 1983.

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

PRISCO, J. T.; O'LEARY, J. W. Osmotic and "toxic" effect of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* l. seeds. **Turrialba**, 20: 177-184, 1970.

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

REITER, W-D. The molecular analysis of cell wall components. **Elsevier Science LTd.**, v. 3, n. 1, p. 27-32, 1998.

- ROGERS, H. J., MAUND, S. L.; JOHNSON, L. H.. A β -galactosidase-like gene is expressed during tobacco pollen development. **J. Exp. Bot.**, **52**: 67-75, 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.; HRSG. **Molecular cloning – A laboratory manual, 2nd edition**. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.
- SANTA-CRUZ, A., A; COSTA, M., PÉREZ-ALFOCEA, F.; BOLARIN, M. C. Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. **Physiol. Plant.**, **101**: 341-346, 1997.
- SELIGMANN, H.; AMZALLAG, G. N. Adaptative determinism during salt-adaptation in *Sorghum bicolor*. **BioSist.**, **36**: 71-77, 1995.
- SAWICKA, T.; KACPERSKA, A. Soluble and cell wall-associated β -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 endogenous and IAA-induced growth in epicotyls of *Cicer arietinum*. **Physiologia Plantarum**, v. 72, p. 762-774, 1988.
- SERRANO, R. V.; GAXIOLA, R.. Microbial models and salt tolerance in plants. **Crit. R. Plant Sci.**, **13**: 121-138, 1994.
- SHANNON, M. C. The effects of salinity on cellular and biochemical processes associated with salt tolerance in tropical plants. In: **Proc. Plant Stress in the trop. Environ.**, T. L. Davenport and H. M. Harrington., 20-25, 1992.
- SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M.. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Sci. Hort.**, **78**: 5-38, 1999.

- SIMOS, G.; GEORGATSOS, J. G. Lactose-hidrolizing β -glycosidases of barley meal. **Biochem. et Biophysica Acta.**, v. 967, 17-24, 1988.
- SIMOS, G.; GIANNKOUROS, T.; GEORGATSOS, J. G. Plant β -galactosidases: purification by affinity chromatography and properties. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2587-2592, 1989.
- SMITH, D. L.; GROSS, G. A Family of at least seven β -galactosidase gene is expressed during tomato fruit development. **Plant Physiol.** v.123:1173-1183, 2000.
- SMITH, D. L.; ABBOTT, J. A.; GROSS, K. C. Down regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. **Plant Physiol.** v.129:1155-1762, 2002.
- SOHAN, D., JASONI, R.; ZAJICEK, J.. Plant-water relations of NaCl calcium-treated sunflower plants. **Environ. Exp. Bot.**, 42: 105-111, 1999.
- 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.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TARCZYNSKI, M.C. , JENSEN, R.G.; BOHNERT, H.J. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. **Science**, 259, 508-510, 1993.
- TEIXEIRA, S. M., MAY, P.; SANTANA, A. C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: **O caupi no Brasil**. Araújo, J. P. P. & Watt, E. E. EMBRAPA/CNPAP. Brasília, DF. pp. 101-128, 1988.

THOMAS, B. R.; INOUHE, M.; SIMMONS, C. R.; NEVINS, D. J. Endo-1,3;1,4- β -glucanase from coleoptiles of rice and maize: role in the regulation of plant growth. **Int. J. Biol. Macromol.** V.27, p. 145-149, 2000.

THORPE, M. R.; MACRAE, E. A.; MINCHIN, P. E. H.; EDWARDS, C. M. Galactose stimulation of carbon import into roots is confined to the Poaceae. **J. Exp. Bot.** v. 50(339), p. 1613-1618, 1999.

THYIAGARAJAH, M., FRY, S. C.; YCO, A. R. In vitro salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. **J. Exp. Bot.**, 47: 1717-1724, 1996.

TINÉ, M. A. S.; LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Galactose branching modulates the action of cellulase on seed storage xyloglucans. **Carbohydr. Polym.** 52: 135-141, 2003.

TINÉ, M. A. S., CORTELAZZO, A. L.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. **Plant Sci.**, 154: 117-126, 2000.

TRAINOTTI, L.; SPINELLO, R.; PIOVAN, A.; SPOLAORE, S.; CASADORO, G. β -galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. **J. Exp. Bot.** v.52 (361), p. 1635-1645, 2001.

TU, W.; SUN, S.; NU, S.; LI, X. Immobilization of β -galactosidase from *Cicer arietinum* (Gram chicken bean) and its catalytic actions. **Food Chem.** v.64, p. 495-500, 1999.

UNO, Y., KANECHI, M., INAGAKI, N., SUGIMOTO, M.; MAEKAWA, S. The evaluation of salt tolerance during germination and vegetative Growth of asparagus, table beet and sea aster. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, 65: 579-585, 1996.

VALERO, P.; LABRADOR, E. Inhibition of cell wall autolysis and auxin-induced elongation of *Cicer arietinum* epicotyls by β -galactosidase antibodies. **Physiol. Plant.**, 89: 188-203, 1993.

VALERO, P.; LABRADOR, E. Effect of auxin on cell wall glycanhydrolytic enzymes in epicotyls of *Cicer arietinum*. **Physiol. Plant.**, 93: 764-770, 1995.

VISSENBERG, K., MARTINEZ-VILCHEZ, M., VERBELEN, J. P.; MILLER, J. G.. In vivo colocalization of xiloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of arabidopsis roots. **The Plant Cell**, 12: 1229-1237, 2000.

WU, Y.; COSGROVE, D. J. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. **J. Exp. Bot.**, 51: 1543-1553, 2000.

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.

WU, Z.; BURNS, J. K. A β -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis*). **J. Exp. Bot.** v. 55 (402), p. 1883-1490, 2004.

WU, Y.; MEELEY, R. B.; COSGROVE, D. J. Analysis and Expression of the alpha-Expansin and beta-Expansin Gene Families in Maize. **Plant Physiology** v.126, p. 222-232, 2001.

XAVIER-FILHO, J. Estudos Bioquímicos desenvolvidos com Caupi. **Em: O caupi no Brasil**. Ed. WATT, E. E. ARAÚJO, J. P. P. EMBRAPA/IITA, Ibadan-Nigéria. pp. 679-693, 1988.

YOSHIOKA, R. SOGA, K.; WAKABAYASHI, K.; TAKEBA, G.; HOSON, T. Hypergravity-induced changes in gene expression in *Arabidopsis* hypocotyls. **Adv. Space Res.** 10: 2187-2193, vol 31, 2003.

YOON, J. H.; AJISAKA, K. The synthesis of galactopiranosly derivatives with β -galactosidases of different origins. **Carbohydr. Res.** V.292, p. 153-163, 1996.

ZABOTIN, I. A., BARISHEVA, T. S., ZABOTINA, O. A., LARSKAYA, I. A., LOZOVAYA, V. V., BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Alterations in cell wall of winter wheat roots during low temperature acclimation. **J. Plant Physiol.**, **152**: 473-479, 1998.

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

ZHANG, H.; LIU, J. Molecular cloning characterization of a β -galactosidase gene expressed preferentially in cotton fibers. **J. Integr. Plant Biol.** v.71(2), p. 223-232, 2005.