

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

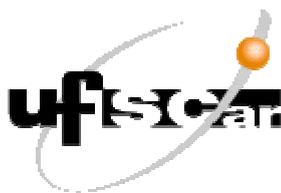
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E FISIOLÓGICO
DE SEMENTES FLORESTAIS NATIVAS
DURANTE A EMBEBIÇÃO**

EDUARDO EUCLYDES DE LIMA E BORGES

Engenheiro Florestal

SÃO CARLOS - SP
BRASIL
2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E FISIOLÓGICO DE SEMENTES FLORESTAIS NATIVAS DURANTE A EMBEBIÇÃO

EDUARDO EUCLYDES DE LIMA E BORGES

Engenheiro Florestal

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade Perez

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ecologia.

SÃO CARLOS - SP
BRASIL
2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B732cb

Borges, Eduardo Euclides de Lima e.

Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes
florestais nativas durante a embebição / Eduardo Euclides
de Lima e Borges. -- São Carlos : UFSCar, 2003.
107 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2003.

1. Sementes. 2. Florestas. 3. Ecologia. 4. Fisiologia
vegetal. 5. Bioquímica. I. Título.

CDD: 582.0467 (20^a)

AGRADECIMENTOS

À professora Dra.Sonia Cristina Perez pelo eficiente auxílio na orientação.

À minha esposa pelo estímulo, pelo companheirismo, pelas sugestões e pelo auxílio contínuo durante os trabalhos e preparo dos manuscritos.

À minha mãe pela oportunidade de desfrutar desta vida tão maravilhosa e pela confiança plena no filho, quando não havia razão para tanto, e que, infelizmente, não estará aqui para ver o resultado de seus estímulos.

Aos meus filhos Marcelo, Marcus e Luana e a minha neta Renata pela paciência quando não me tinham disponível para conversar.

Ao meu pai pelos exemplos de trabalho e honestidade.

À Nadia de Paula pela excelente sugestão e estímulo de cursar o doutorado na UFSCar.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pelo apoio e pela disponibilidade constante nas análises das enzimas.

Aos professores Efraim Lázaro Reis Cezar Reis, por permitir a utilização das dependências e dos equipamentos de seus laboratórios no Departamento de Química.

À professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela cessão de reagentes utilizados na tese.

Aos laboratoristas Jose Mauro Ferreira, Gilberto da Silva Lana e Leacir Brás da Silva, pelo inestimável auxílio durante todo o desenvolvimento dos trabalhos laboratoriais, além do excelente companheirismo.

Aos funcionários do Setor de Silvicultura Geraldo Machado, Marcio Edinei, Jose Maria Lopes, pelo trabalho dedicado e incansável na disponibilização das sementes para os trabalhos das pesquisas.

Ao Francisco Ricardo Bezerra, pelo eficiente e providencial auxílio na coordenação dos trabalhos de campo.

Ao Pedro Bernardes Cupertino, pelo competente trabalho de apoio na manutenção da rede elétrica e hidráulica, que muitas vezes salvou horas de trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, por permitir que eu realizasse o meu doutorado.

Aos Professores Drs. Rinaldo César de Paula, João Juarez Soares e José Antonio P. V. de Moraes pelas excelentes sugestões técnicas e na redação da tese.

E, finalmente, mas o mais importante, a Deus que colocou tanta gente competente e de boa vontade no meu caminho, para suprir as minhas inúmeras deficiências, permitindo que eu chegasse ao término de meus trabalhos.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO GERAL	vi
GENERAL ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Considerações sobre as espécies	8
1.1.1. <i>Platymiscium pubescens</i> var. <i>pubescens</i>	8
1.1.2. <i>Tachigalia multijuga</i> (Benth)	9
1.1.3. <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO I.....	15
COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DE SEMENTES OSMOCONDICIONADAS DE <i>Platymiscium pubescens</i> (Micheli) (TAMBORIL-DA-MATA).....	15
RESUMO.....	16
SUMMARY.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

	Página
CAPÍTULO II	40
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM SEMENTES DE <i>Tachigalia multijuga</i> (BENTH) (MAMONEIRA) RELACIONADAS À SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA.....	40
RESUMO.....	41
SUMMARY.....	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO III.....	63
CARACTERIZAÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE EM EMBRIÃO E COTILÉDONES DE SEMENTES DE <i>Platymiscium pubescens</i> (TAMBORIL-DA-MATA)	63
RESUMO.....	64
SUMMARY.....	65
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPÍTULO IV.....	84
CARACTERIZAÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE E SUA RELAÇÃO COM A GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Caesalpinia peltophoroides</i> (SIBIPIRUNA).....	84
RESUMO.....	85
SUMMARY.....	86
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	89
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4. CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
CONCLUSÕES GERAIS	106

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo estudar as modificações bioquímicas e fisiológicas com ênfase nas atividades da enzima alfa-galactosidase ocorrendo durante a embebição de sementes *Platymiscium pubescens* (Micheli), *Tachigalia multijuga* (Benth) e *Caesalpinia peltophoroides* (Benth) submetidas a diferentes tratamentos. Sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* foram osmocondicionadas em solução de polietilenoglicol (PEG 6.000), sendo analisadas as alterações no teor de água, no crescimento do eixo embrionário, na germinação, as alterações na parede celular, a mobilização de carboidratos e proteínas e a atividade de alfa-galactosidase. Observou-se que a umidade das sementes mantidas em água estabilizou *a posteriori* as daquelas mantidas em solução de PEG 6000. A germinação das sementes mantidas em água, consideradas como testemunha, alcançaram 30% em 120 horas. Enquanto a massa fresca e o comprimento do eixo embrionário aumentaram significativamente durante a permanência na solução de PEG, a massa fresca não foi alterada significativamente. A arabinose é o principal açúcar constituinte da membrana que recobre o embrião, tendo ela e a xilose, decréscimos significativos durante a permanência em solução de PEG 6000. A atividade da alfa-galactosidase do embrião apresentou alterações significativas durante o período de 120 horas em que esteve na solução de PEG. Os teores de ramnose, arabinose

e xilose foram alterados significativamente na fração p ctica, enquanto a ramnose foi a única na fra o hemicelulósica, da parede do eixo embrionário. Os teores de glicose foram reduzidos significativamente, tanto no eixo embrionário, quanto nos cotilédones durante o osmocondicionamento. Os teores de estaquiose e de rafinose não apresentaram altera es significativas nos cotilédones, enquanto o de sacarose foi reduzido significativamente. Os teores de proteínas decresceram significativamente nas 120 horas de osmocondicionamento. Concluiu-se que o osmocondicionamento potencializou a germina o das sementes durante o processo de embebi o, resultando em modifica es da parede celular pela deposi o de monossacarídeos. Tendo em vista as altera es significativas observadas na atividade de alfa-galactosidase em sementes de *P. pubescens* durante o osmocondicionamento e a sua possível participa o na germina o, este trabalho foi desenvolvido para caracterizar a enzima no embrião e nos cotilédones das sementes dessa espécie. As sementes foram colocadas para embeber em água, sendo retiradas amostras para as caracteriza es bioquímicas e cinéticas da enzima do eixo embrionário e cotilédones. Enquanto a atividade específica no eixo aumentou durante 96 horas, a dos cotilédones mostrou pequeno incremento. A atividade da alfa-galactosidase do eixo foi máxima no intervalo de pH de 4,5 a 6,0 e a dos cotilédones em 6,0. A temperatura de 55 C foi a que mais estimulou a atividade das enzimas de ambos compartimentos. As termoestabilidades das enzimas do eixo e dos cotilédones foram mantidas por 1.500 horas na temperatura de 40 C. A atividade da alfa-galactosidase do eixo embrionário foi inibida por melibiose, CuSO₄ e SDS, enquanto a dos cotilédones por todos os efetores, com exce o de galactose, SDS e CuSO₄. Os valores de K_M para o embrião e para os cotilédones foram 3,37 e 0,26 mM, respectivamente, indicando que as alfa-galactosidasas são diferentes e com atividades em tempos diferentes durante a embebi o. Da mesma forma, caracterizou-se a alfa-galactosidase de embrião e cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* e procurou-se estabelecer a rela o entre a sua atividade e as altera es na parede celular da micrópila nas sementes. Durante 144 horas de embebi o foram retiradas amostras para quantifica o da atividade de alfa-

galactosidase, de proteína e de açúcares. A germinação ocorreu com 96 horas de embebição, sem que houvesse modificações na parede celular da micrópila. Nesta, observou-se maior proporção de arabinose que mostrou tendência de aumento com o decorrer da embebição. A atividade da enzima foi detectada tanto em sementes secas, tanto no eixo embrionário, quanto nos cotilédones, aumentando no primeiro a partir de 24 horas de embebição. O teor de proteína decresceu continuamente no eixo embrionário a partir de 24 horas de embebição, enquanto se manteve estável nos cotilédones. A atividade da alfa-galactosidase foi máxima nas temperaturas de 55°C para o eixo embrionário e 50°C para os cotilédones. A faixa de pH que mais estimulou a atividade da enzima foi de 5,5 a 6,0 para o eixo embrionário e de 4,5 a 5,0 para os cotilédones. As alfa-galactosidases do eixo embrionário e dos cotilédones foram inibidas por melibiose, CuSO₄, SDS e galactose. Por outro lado, o mercaptoetanol estimulou a atividade dos cotilédones. A termoestabilidade também mostrou-se alta na temperatura de 50°C. Os K_M para o substrato p-NPGal para a alfa-galactosidase do embrião e dos cotilédones foram 1,74 e 2,64, respectivamente. Percebe-se que as alfa-galactosidases das duas espécies são também diferentes entre si, denotando-se especificidade, com atuações distintas, próprias do ecotipo de cada espécie. Com o objetivo de estudar o efeito de tratamentos pré-germinativos nas atividades das enzimas alfa-galactosidase e da beta-mananase, na porcentagem de embebição, na porcentagem e velocidade de germinação, na síntese de proteínas e na alteração na membrana que recobre o embrião em sementes de *Tachigalia multijuga*, foram coletadas sementes de três matrizes aplicando-se tratamentos de ácido sulfúrico, da água fervente e do desponte. Não houve germinação nas sementes tratadas com água quente. Com exceção do ácido sulfúrico por 10 minutos, todos os demais tratamentos resultaram em porcentagem de germinação superior ao da testemunha. Por outro lado, a velocidade de germinação dos diversos tratamentos foi diferente da testemunha somente em uma das matrizes. As porcentagens de água das sementes tratadas com ácido por 20 minutos e por água quente por 60 segundos diferiram estatisticamente da testemunha. As atividades das enzimas e teores de proteínas durante a embebição foram

diferentes estatisticamente entre os tratamentos com água e ácido. Enquanto a alfa-galactosidase no tratamento com água quente permaneceu constante durante a embebição, aquelas do ácido sulfúrico aumentaram durante o período de 96 horas, decrescendo em seguida. Por outro lado, a atividade da beta-mananase não foi detectada após 96 horas no tratamento com água quente e aumentou significativamente no de ácido sulfúrico. Verificou-se que, de modo geral, os teores de todos os açúcares componentes do tegumento das sementes da testemunha foram significativamente inferiores aos daqueles dos dois tratamentos pré-germinativos, especialmente em 144 horas de embebição. Conclui-se que não há relação entre a atividade de ambas enzimas e as alterações ocorridas nos tegumentos das sementes, devendo essas enzimas, estarem atuando na mobilização de reservas e não no enfraquecimento do tegumento na fase pré-germinativa.

GENERAL ABSTRACT

This work aimed to study the biochemical and physiological changes, with emphasis on alpha-galactosidase enzyme, which occur during the germination of *Platymiscium pubescens*, *Tachigalia multijuga* and *Caesalpinia peltophoroides* seeds submitted to different treatments. *Platymiscium pubescens* seeds were osmoconditioned in polyethilenoglycol (PEG, m.w. 6,000) and the alterations in water content, embryonic axis growth, germination, cellular wall, protein carbohydrate mobilization and alpha-galactosidase were analyzed. Moisture of seeds maintained in water stabilized after the moisture of those maintained in PEG. The germination of water-maintained seeds, which were regarded as control, reached 30% in 120 h. While the fresh mass and embryonic axis length increased significantly during permanence in the PEG solution, fresh mass did not alter significantly. Arabinose was found to be the main constituent of the membrane surrounding the embryo and, together with xylose, showed significant decreases during permanence in the PEG solution. Alpha-galactosidase activity underwent significant changes during the 120 h period in the PEG solution. Rhamnose, arabinose and xylose contents altered significantly in the pectic fraction, while rhamnose was the only one found in the hemicellulosic fraction of the embryonic axis wall. Glucose contents reduced significantly both in the embryonic axis and in the cotyledons during osmoconditioning. Stachyose and

raffinose contents had no significant alterations in the cotyledons while sucrose content reduced significantly. Protein contents decreased significantly during the 120h osmoconditioning. It was concluded that osmoconditioning potentialized seed germination during the imbibing process, resulting in cellular wall changes due to the deposition of reducing sugars. In view of the significant alterations observed in alpha-galactosidase activity in *P. pubescens* seeds during osmoconditioning and its likely involvement in the germination process, this work was developed to characterize the enzyme in the embryo and in the cotyledons of seeds of this species. The seeds were placed to imbibe in water and samples withdrawn for biochemical and kinetic characterization in the embryonic axis and cotyledons. While the specific activity in the axis increased during 96 h, cotyledon activity showed a small increase. Alpha-galactosidase activity in the axis was maximal during the pH interval from 4.5 to 6.0 and cotyledon activity at 6.0. The 55 °C temperature stimulated enzyme activity the most in both compartments. The thermo-stabilities of the axis and cotyledon enzymes were maintained for 1,500 h at 40 °C. The Alpha-galactosidase activity in the embryonic axis was inhibited by melibiosis, CuSO₄ and SDS whereas that of the cotyledons was inhibited by all the effectors. K_M values for the embryo and cotyledons were 3.37 and 0.26 mM, respectively, showing that the alpha-galactosidases are different and have activities at different times during imbibition. Similarly, the alpha-galactosidase of the embryo and cotyledons of *Caesalpinia peltophoroides* seeds was characterized, aiming to establish the relationship between its activity and the alterations in the cellular wall of the micropyle in the seeds. During the 114 h imbibition, samples were withdrawn for quantification of alpha-galactosidase activity, protein and sugars. Germination took place after 96 h imbibition, without any changes occurring in the cellular wall of the micropyle, where a greater proportion of arabinose, with a tendency to increase during imbibition, was observed. Enzyme activity was detected in dry seeds, in the embryonic axis and in the cotyledons, increasing in the first after 24 h imbibition. Protein content decreased continuously in the embryonic axis, after 24 h imbibition, while maintaining itself stable in the cotyledons. Alpha-

galactosidase activity was maximal at temperatures of 55 °C for the embryonic axis and 50 °C for the cotyledons. The pH that stimulated enzyme activity the most was in the range of 5.5 - 6.0 for the embryonic axis and 4.5 - 5.0 for the cotyledons. Melibiosis, CuSO₄, SDS and galactose inhibited the alpha-galactosidases of the embryonic axis and cotyledons. On the other hand, mercaptoethanol stimulated the activity of the cotyledons. Thermo stability was also shown to be high at the temperature of 50 °C. The K_M for the substrate p-NPGal for the alpha-galactosidase of the embryo and cotyledons was 1.74 and 2.64, respectively. The alpha-galactosidases of the two species were also found to be different from each other, with specificities and distinct behaviors characteristic of the ecotype of each species. Aiming to study the effect of the pre-germinating treatments on the activities of the enzymes alpha-galactosidase and beta-mannanase, in the imbibition percentage, germination percentage and velocity, protein synthesis and alteration of the membrane surrounding the embryo in seeds of *Tachigalia multijuga*, seeds of three selected trees were collected and sulphuric acid, snipped of seeds testa at micropyle end or at the other end and boiling water treatments were applied. No seed germination occurred in the boiling water treatment. Except for the sulphuric acid for 10 min, all the other treatments resulted in germination percentage greater than the control. On the other hand, germination velocity in the various treatments was different from that of the control only in one of the trees. Seeds water percentage of the ones treated in acid for 20 min. and boiling water for 60 sec differed statistically from the control. The enzyme activities and protein contents during imbibition were statistically different between the water and acid treatments. While the alpha-galactosidase remained constant in the boiling water treatment, during imbibition, those in the sulphuric acid increased during the 96 h period, followed by a decrease. In contrast, beta-mannanase activity was not detected after 96 h. in the hot water treatment, increasing significantly in the sulphuric acid treatment. It was verified that, overall, the contents of all the sugar components of the seed teguments in the control, were significantly lower than those in the two pre-germinating treatments, especially during 144 h imbibition.

It was concluded that there is no relation between the activity of either enzyme and the alterations in the seed teguments, with the likelihood of both enzymes acting on mobilization of reserves rather than on the weakening of the tegument in the pre-germinating phase.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O estabelecimento de uma dada espécie na regeneração de povoamentos florestais está ligado à capacidade de suas sementes germinarem rápido e uniformemente, a fim de vencer a concorrência com outras espécies presentes no local, ou pela capacidade de se manterem viáveis por períodos mais longos, até que as condições ambientais sejam propícias ao desenvolvimento das plântulas. Para tanto, cada espécie lança mão de adaptações como a dormência, o osmocondicionamento ou a mobilização de determinadas reservas que serão úteis para formação de estruturas físicas, como a parede celular, ou para respiração, sintetizando intermediários metabólicos com finalidades diversas.

A dormência tem sido definida como a incapacidade de uma semente germinar sob condições adequadas de luz, temperatura e umidade, por características intrínsecas, sendo, portanto, uma determinação genética, que, segundo FOLEY & FENNIMORE (1998), em sementes de *Avena fatua*, a herdabilidade é de, aproximadamente, 0,50, enquanto os valores para *Hordeum vulgare* estão entre 0,69 e 0,80 (BURAAS & SKINNES, 1984). Tal afirmativa é confirmada por McDONALD (2000) cujos dados obtidos com 12 espécies mostraram variações no limite de temperatura e nas taxas de superação da dormência entre os lotes de um mesmo cultivar e entre espécies. Os dois cultivares de *Leucaena leucocephala*, cunningham e tarramba, tiveram a quantidade de sementes dormentes decrescendo continuamente por vários meses.

Dentre as diversas formas de dormência com que as sementes se apresentam, a tegumentar predomina entre as leguminosas. Segundo CARVALHO & NAKAGAWA (2001), a dormência tegumentar caracteriza-se, por diversos aspectos como a presença de inibidores, impermeabilidade a água e a gases, resistência física à expansão do eixo embrionário, alteração na composição da luz, entre outras. Segundo LUSH & EVANS (1980), há, aparentemente, associação entre a espessura do tegumento e o grau de domesticação da espécie. Aquelas selvagens apresentam tegumentos mais espessos. O tegumento é formado pelo tecido maternal e, segundo SOUZA & MARCOS-FILHO (2001), o ambiente provoca alterações na sua espessura e composição. Revisando vários autores, SOUZA & MARCOS-FILHO (2001), mostram que a absorção de água pela semente depende das características do tegumento como a sua natureza hidrofóbica, ligada à composição química das células do tegumento, pela cor, grau de enrugamento e escurecimento. Estudando a estrutura dos tegumentos de *Caesalpinia ferrea*, *C. pyramidalis*, *Senna martiana* e *S. spectabilis*, var. *excelsa*, MELO-PINNA et al. (2001) observaram que eles eram compostos de uma camada de macroesclereídeos revestida de cutícula e subcutícula, seguida de camadas de osteoesclereídeos, parênquima esclerificado e outra camada mais interna de osteoesclereídeos. Segundo os autores, a impermeabilidade é devida, provavelmente, à região de macroesclereídeos, uma vez que nas sementes não escarificadas o corante não ultrapassou a porção cônica dos macroesclereídeos, diferentes daquelas escarificadas em que o corante azul de metileno alcançou o endosperma. Dessa forma, a compreensão das características físicas e anatômicas do tegumento permite aplicação do melhor tratamento na superação da dormência ou a manipulação por meio de cruzamento entre espécimens de diferentes procedências.

O estabelecimento do método de superação da dormência é variável, dependente da espécie, haja vista as variações dos métodos utilizados para as diferentes espécies. LEDO (1977) verificou que a água fervente era mais adequada para superar a dormência de *Schizolobium parahybum* e o ácido

sulfúrico para *Enterolobium contortisiliquum*, enquanto DUARTE (1978) utilizou o desponte para *Delonix regia*.

O ácido sulfúrico tem sido utilizado com sucesso por diversos autores como, por exemplo, HASHIM (1990) para *Dichrostachys cinerea*, JELLER & PEREZ (1999) para sementes de *Cassia excelsa*, ARAUJO-NETO & AGUIAR (2000) para *Guazuma ulmifolia* e ALVES et al. (2000) para *Bauhinia monandra*.

Segundo Rolston, citado por MARTINS-CORDER et al. (1999), o ácido atua no enfraquecimento do tegumento pela remoção da cutícula e dissolução das células macroesclereídicas. Entretanto, a utilização de ácido sulfúrico, ácido clorídrico e imersão em água quente por FRANCO & FERREIRA (2002) resultaram em morte das sementes de *Didymopanax morototoni*, enquanto o picote por toda a semente ou a escarificação resultou em 25 e 16% de germinação, respectivamente. Como houve embebição daquelas sementes sem tratamento pré-germinativo, é de se supor que a utilização do ácido é mais adequada no caso em que há impermeabilidade à água e não naquelas com dormência em que há resistência ao crescimento do embrião.

O melhor tratamento para superar a dormência de sementes de *Bauhinia unguolata*, segundo ALVES et al. (2000), foi a escarificação mecânica, do mesmo modo que se mostrou o mais indicado para *Acacia mearnsii* (MARTINS-CONDER et al., 1999). A utilização de água fervente não se mostrou adequada para *Acacia mearnsii* (MARTINS-CONDER et al., 1999) e nem para *Cassia excelsa* (JELLER & PEREZ, 1999). A redução da germinabilidade para esses últimos autores se deveu a danos às estruturas internas, devido ao extravasamento de exsudatos.

A germinação é um processo que se inicia com a embebição das sementes, estimulando a síntese de enzima ou a ativação daquelas pré-formadas, resultando na mobilização de reservas ou na digestão de parede celular, enfraquecendo-a e permitindo que a raiz rompa o tegumento.

Trabalho realizado por GROOT & KARSSSEN (1987) demonstrou que a ação da endo- β -mananase enfraqueceu o tegumento de sementes de *Lycopersicon esculentum* e tornou possível o seu rompimento pela radícula. Por outro lado,

NONOGAKI & MOROHASHI (1996) demonstraram que a forma de endo-beta-mananase responsável pela digestão de reservas é diferente daquela presente no tegumento. NONOGAKI, GEE & BRADFORD (2000) verificaram a expressão dos genes LeMAN2, que codificam a beta-mananase, no endosperma junto a ponta da radícula de sementes de *Lycopersicon esculentum* antes da protrusão da radícula, enquanto LeMAN1 foi expresso somente no endosperma lateral após a protrusão da radícula. Acreditam os autores que a mananase LeMAN2 está, provavelmente, associada com o enfraquecimento do endosperma, enquanto LeMAN1 relaciona-se à mobilização de galactomanano, no crescimento pós-germinativo. SANCHEZ & MIGUEL (1997) mostraram que em sementes de *Datura ferox* as atividades de beta-mananase e beta-manosidase, envolvida na degradação de manose na região da micrópila, aumentam bastante antes da protrusão da radícula. Segundo os autores, há necessidade da presença do eixo embrionário para que tal fenômeno ocorra.

BEWLEY (1997) propõem que a dormência de sementes de determinadas espécies se deva à falta de atividade de beta-mananase, o que dificultaria o enfraquecimento do tegumento. Segundo o autor, este pode ser o caso de *Datura ferox*, mas o mesmo não poderia ocorrer com as sementes de *Apium graveolens*, *Capsicum* e *Cucumis melo*.

DOWNIE, HILHORST & BEWLEY (1997) observaram que a beta-mananase está presente no embrião, no megagametófito e na nucela de sementes de *Picea glauca* antes e durante a embebição. Os autores verificaram aumento na atividade de endo beta-mananase na região micropilar antes da protrusão da radícula, declinando após a germinação, em parte pela exsudação da mesma para o ambiente externo.

Entretanto, PEETAMBAR, NEVINS, BRADFORD & DAHAL (1997) não verificaram relação entre a atividade da beta-mananase e a germinação em sementes de *Lycopersicon esculentum* pois, não foram observadas correlações entre as alterações nas quantidades de açúcares da parede celular na região da ponta da radícula e a atividade da enzima, com a taxa de germinação. Segundo os autores, muito embora tenha havido aumento na atividade da beta-mananase nas

sementes, antes da protrusão da radícula, quando colocadas em temperaturas sub-ótimas, a redução do potencial hídrico atrasou ou evitou a emergência da radícula mas aumentou a atividade da enzima. Há, aparentemente, o efeito específico governando a relação da atividade da enzima e a germinação, pois DUTTA, BRADFORD & NEVINS (1997) verificaram em sementes de *Lactuca sativa*, cv. Pacific, que a termoinibição ou tratamento com ácido abscísico em temperatura ótima suprimiram tanto a germinação, quanto a atividade da beta-mananase na parede celular do endosperma. Concluem os autores, que a atividade da enzima é expressa antes da germinação e é regulada pelas mesmas condições que governam a germinação.

Da mesma forma, NASCIMENTO et al. (2000) verificaram que sementes de genótipos termotolerantes como Everglades e PI 251245 tiveram maior atividade de beta-mananase antes da protrusão da radícula do que termosensíveis como Dark Green Boston, Valmaine e Floricos 83.

A confirmação dessa pressuposição é feita por CANTLIFFE, NASCIMENTO, SUNG et al. (2000) que trabalharam com sementes de *Lactuca sativa*, verificando que havia menor necessidade de força para a raiz penetrar o endosperma nas sementes de genótipo termotolerantes. Em temperaturas altas os genótipos termotolerantes aumentaram a atividade de mananase e germinaram melhor do que genótipos termosensíveis. Também TOOROP et al. (2000) encontraram menor força necessária para romper o tecido envoltório de sementes de *Lycopersicon esculentum* durante as primeiras 38 horas de embebição. Nos primeiros dois dias de embebição houve correlação entre a atividade da enzima e o decréscimo na força necessária para romper o tecido envoltório.

BEWLEY (1997) acredita que seja necessária a presença de hidrolases em sementes de tomate e alface, para que ocorra a germinação, como observado por REN & KERMONDE (2000), que estudando o papel da enzima pectina metil esterase em sementes de *Chamaecyparis nootkatensis* não verificaram atividade em sementes dormentes, mas aumento gradual naquelas submetidas à estratificação e durante a germinação.

SITRIT et al. (1999) verificaram que a protrusão da radícula em sementes de *Lycopersicon esculentum*, cv. Moneymaker requer a presença da poligalacturonase para o enfraquecimento do endosperma.

Por outro lado, CHEN & BRADFORD (2000) verificaram a presença de genes ligados às expansinas no endosperma de sementes de *Lycopersicon esculentum* envolvidos na regulação da germinação pela desagregação da parede celular do endosperma durante a protrusão da radícula. Por outro lado, WU et al. (2001) estudando a relação entre as atividades das enzimas beta-glicanase e quitinase e a germinação de sementes de *Lycopersicon esculentum* constataram que muito embora houvesse atividade de ambas as enzimas antes da protrusão da radícula, e que ambas fossem expressas no tecido do endosperma no local de protrusão da radícula, não houve evidências suficientes do envolvimento direto de ambas na modificação da parede celular ou enfraquecimento da mesma.

A mobilização de reservas constitui outra característica da germinação de sementes, envolvendo também a degradação de parede, como observado por WANG et al. (1998) em sementes de *Hordeum vulgare*.

BUCKERIDGE et al. (1995) constataram que antes da protrusão da radícula em sementes de *Dimorphandra mollis* houve degradação da estaquiose, da rafinose e da sacarose com produção de galactose, glicose e frutose, no endosperma e cotilédones. Somente após protrusão da radícula houve mobilização de galactomanano do endosperma. A degradação de reservas da família da rafinose é feita pela α -galactosidase, conforme constatado por GUIMARÃES et al. (2001) em sementes de *Glycine max*. Segundo os autores, houve decréscimo no teor de rafinose durante a germinação e aumento substancial na atividade da enzima.

FEURTADO et al. (2001) detectaram a presença de alfa-galactosidase no embrião, micrópila e endosperma de sementes de *Lycopersicon esculentum*, verificando que a atividade durante e após a germinação, não havendo alterações na atividade mesmo em presença de osmoticum.

Por outro lado, WILLIAMS et al. (2001) acompanharam a germinação de sementes de *Asparagus officinalis*, constatando a mobilização de reservas nas células do endosperma após a germinação. Diferentemente de outros autores,

esses observaram que não houve alterações na parede celular na região da micrópila, o que, segundo os mesmos, funcionaria como uma barreira viva contra a perda de hidrolisados para o meio. Esses autores verificaram que houve participação das enzimas beta-manosidase e beta-mananase durante a digestão das reservas. Enquanto a primeira aumenta continuamente a atividade no endosperma e embrião após a germinação, a beta-mananase aumenta consideravelmente no endosperma até a metade da mobilização das reservas. Por outro lado, CARVALHO et al. (2001) somente detectaram alterações na atividade da mesma enzima em sementes de *Sesamum indicum* após a germinação.

Para a grande maioria das espécies florestais nativas não existem disponíveis na literatura informações a respeito dos mecanismos envolvidos na germinação, especialmente quando se trata das alterações fisiológicas e bioquímicas das sementes como, por exemplo, as modificações no eixo embrionário e tegumento durante a embebição. As espécies escolhidas neste estudo são nativas da mata Atlântica, que sofrem contínuo desmatamento ao longo do tempo, levando a uma grande restrição em sua base genética.

Este trabalho teve como objetivo estudar as modificações bioquímicas e fisiológicas, com ênfase nas atividades das enzimas alfa-galactosidase, que ocorrem durante a embebição de sementes de *Platymiscium pubescens*, *Tachigalia multijuga* e *Caesalpinia peltophoroides* submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos.

1.1. Considerações sobre as espécies

1.1.1. *Platymiscium pubescens* (Micheli) var. *pubescens* (Leguminosae Papilionoideae)



Segundo KLITGAARD (1995) o *Platymiscium pubescens* var. *pubescens* ocorre nos estados da Bahia, Espírito Santo, Distrito Federal e Minas Gerais. Neste, foi identificada a presença da espécie nas cidades de Carangola, Vespasiano, Coronel Pacheco, Jequitibá, Paraopeba, Lagoa Santa, Caratinga, Ipatinga Viçosa e nas rodovias Viçosa-Cajurí e Belo Horizonte-Brasília. A espécie é conhecida pelos nomes de timburí, timburil e jacarandá-branco. Ainda segundo a autora, o habitat da espécie é o cerrado, embora MARANGON (1999) a identifique como de floresta estacional semidecidual, ocorrendo em altitudes de 300 a 750 m. De acordo com KLITGAARD (1995) a espécie é de vegetação secundária e sua madeira é usada para construção de moirão de cerca, além de sua utilização como planta ornamental e de reflorestamento e, segundo LORENZI (1992), pode ser usada na recuperação de áreas degradadas.

1.1.2. *Tachigalia multijuga* (Benth) (Leguminosae Caesalpinioideae)



Segundo LORENZI (1998), a espécie ocorre nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, na mata pluvial da encosta Atlântica. Sua madeira é moderadamente pesada, muito dura ao corte, textura média, altamente resistente e muito durável. Ainda segundo o autor, a madeira é empregada na forma bruta para obras externas, como dormentes, esteios, vigas de currais, poste, moirões e como árvore ornamental, podendo ser usada para arborização. O mesmo autor a classifica como planta perenifólia, heliófita ou de luz difusa, clímax, indiferente às condições de umidade do solo, na mata pluvial Atlântica, é rara ou ocasional. Ocorre preferencialmente no interior da mata primária localizada em várzeas aluviais e início de encostas, onde o solo é fértil e profundo.

1.1.3. *Caesalpinia peltophoroides* (Benth) (Leguminosae Caesalpinioideae)



Segundo LORENZI (1992), a *Caesalpinia peltophoroides* é uma espécie florestal típica de mata atlântica, ocorrendo nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo, sendo utilizada para diversas finalidades como construção civil, de móveis, caixotaria em geral, além do uso em arborização urbana. É também recomendada para plantios mistos em áreas degradadas de preservação permanente. É uma árvore semidicídua, heliófila, característica de mata pluvial atlântica indiferente às condições físicas do solo. Ocorre no interior de matas primárias e em formações abertas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M.C.S.; MEDEIROS-FILHO, S.; ANDRADE-NETO, M.; TEÓFILO, E.M. Superação da dormência em sementes de *Bauhinia monandra* Britt e *Bauhinia unguolata* L.- Caesalpinioideae. **Rev. Bras. Sem.**, Brasília, v.22, n.2, p.139-144, 2000.
- ARAÚJO NETO, J.C.; AGUIAR, I.B. Tamentos pré-germinativos para superar a dormência de sementes de *Guazuma ulmifolia* Lam. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.58, p.15-24, 2000.
- BEWLEY, J.D. Breaking down the walls – a role for endo-beta-mannanase in release from seed dormancy? **Trend in Plant Sci.**, Cambridge, v.2, n.12, p.464-469, 1997.
- BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R.; DIETRICH, S.M.C. Storage carbohydrate mobilization of *Dimorphandra mollis* Benth (Leguminosae) following germination. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v.18, n.2, p.171-175, 1995.
- BURAAS, T.; SKINNES, H. Genetic investigations on seed dormancy in barley. **Hereditas**, Landskrona, v.101, p.235-244, 1984.
- CANTIFFE, D.J.; NASCIMENTO, W.M.; SUNG, Y.; HUBER, D.J. Lettuce endosperm weakening: a role for endo-beta-mannanase in seed germination at high temperature. In: BLACK, M.; BRADFORD, K.J. **Seed biology: advances and application**. Proceeding of the sixth International workshop on seeds. Merida: Mexico. 1999, p.277-285, 2000.
- CARVALHO, P.G.P.; BORGHETTI, F.; BUCKERIDGE, M.S.; MORPHY, L.; FILHO, E.X.F. Temperature-dependent germination and endo- β -mannanase activity in sesame seeds. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, Lavras, v.13, n.2, p.1-11, 2001.

- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes - ciência, tecnologia e produção**. FUNEP, Jaboticabal, SP, 2000. 588p.
- CHEN, F.; BRADFORD, K.J. Expression of an expansion is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.124, n.3, p.1265-1274, 2000.
- DOWNIE, B.; HILHORST, W.M.; BEWLEY, J.D. Endo- β -mannanase activity during dormancy alleviation and germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.101, p.405-415, 1997.
- DUARTE, A.P. Contribuição ao conhecimento da germinação de algumas essências florestais. **Rodrig.**, Rio de Janeiro, v.30, n.45, p.439-446, 1978.
- DUTTA, S.; BRADFORD, K.J.; NEVINS, D.J. Endo- β -mannanase activity present in cell-walls extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.113, p.155-161, 1997.
- FEURTADO, J.A.; BANIK, M.; BEWLEY, J.D. The cloning and characterization of alpha-galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.52, n.359, p.1239-1249, 2001.
- FOLEY, M.E.; FENNIMORE, S.A. Genetic basis for seed dormancy. **Seed Sci. & Technol.**, Zürich, v.8, p.173-182, 1998.
- FRANCO, E.T.H.; FERREIRA, A.G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl) Dcne et Planch. **Ciência Flor.**, Santa Maria, v.12, n.1, p.1-10, 2002.
- GROOT, S.P.C.; KARSSSEN, C.M. Gibberellins regulate seed germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. Studies with the sitiens mutant. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.99, p.525-531, 1987.
- GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIX, C.R. Characterization of alpha-galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochem.**, Oxford, v.58, n.1, p.67-73, 2001.
- HASHIM, I.M. Germination of kadal (*Dichrostachys cinerea*) seed following ponde digestion by goats, and various chemical treatments. **Forest Ecol. Manag.**, Amsterdam, v.38, p.105-110, 1990.
- JELLER, H.; PEREZ, S.C.G.A. Estudo da superação da dormência e da temperatura em sementes de *Cassia excelsa* Schrad. **Rev. Bras. Sem.**, Brasília, v.21, n.1, p.32-40, 1999.

- KLITGAARD, B.B. **Systematics of Platymiscium (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae): taxonomy, morphology, ontogeny and phylogeny.** Aarhus, 1995. 168p. Tese (Doutorado) – University of Aarhus. Finlândia.
- LEDO, A.A.M. **Estudo da causa da dormência em sementes de guapuruvú (*Schizolobium parahybum* (Vell) Black) e orelha de negro (*Enterolobium constortisiliquum* (Vell) Morong) e métodos para sua quebra.** Viçosa: UFV, 1977, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 1977.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- LUSH, W. M.; EVANS, L.T. The seed coat on cowpeas and other grain legumes: structure and relation to function. **Field Crop Res.** v.3, p.267-286, 1980.
- MARANGON, L.C. **Florística e fitossociologia de área de floresta estacional semidecidual visando dinâmica de espécies florestais arbóreas no município de Viçosa-MG.** São Carlos: UFSC, 1999. 145p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de São Carlos, 1999.
- MARTINS-CONDER, M.P.; BORGES, R.Z.; JUNIOR, N.B. Fotoperiodismo e quebra de dormência em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.9, n.1, p.71-77, 1999.
- McDONALD, C.K. Variation in the rate of hard-seed breakdown of twelve tropical legumes in response to two temperatures regime in the laboratory. **Aust. J. Exp. Agric.**, Melbourne, v.40, p.387-396, 2000.
- MELO-PINA, G.F.A.; NEIVA, M.S.M.; BARBOSA, D.C.A. Estrutura do tegumento seminal de quatro espécies de Leguminosae (Caesalpinioideae), ocorrentes numa área de caatinga (Pe, Brasil). **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v.22, n.3, p.375-379, 1999.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J.; HUBER, K.J.; HERREGODS, M. Endo-beta-mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature conditions. **Acta Hort.**, The Haghe, n.517, p.10-112, 2000.
- NONOGAKI, H.; GEE, O.G.; BRADFORD, K.J. A germination-specific endo-beta-mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.123, n.4, p.1235-1245, 2000.
- NONOGAKI, H.; MOROHASHI, Y. An endo-beta-mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.110, p.555-559, 1996.

- PEETAMBAR, D.; NEVINS, D.J.; BRADFORD, K.J.; DAHAL, P. Relationship of endo-beta-D-mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.113, n.4, p.1243-1252, 1997.
- REN, C.W.; KERMODE, A.R. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. **plant Physiol.**, Bethesda, v.124, n.1, p.231-242, 2000.
- SANCHEZ, R.A.; MIGUEL, L. Phytochrome promotion of mannanase-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds require the presence of embryo and gibberellin synthesis. **Seed Sci. Res.**, Wallingford, v.7, p.27-33, 1997.
- SITRIT, Y.; HADFIELD, K.A.; BENNET, A.B.; BRADFORD, K.J.; DOWNIE, A.B. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.121, n.2, p.419-428 1999.
- SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as modulator of seed-environment relationship on *Fabaceae*. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v.24, n.4, p.365-375, 2001.
- TOOROP, P.E.; VanAELST, A.C.; HILHORST, H.W.M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.51, n.349, p.1371-1379, 2000.
- WANG, M.; OPPEDIJK, B.J.; CASPERS, M.P.M.; LAMERS, G.E.M.; BOOT, M.J.; GEERLINGS, D.N.G.; BAKHUIZEN, B.; MEIJER, A.H.; VAN DUIJN, B. Spatial and temporal regulation of DNA fragmentation in the aleurone of germinating barley. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.49, n.325, p.1293-1301, 1998.
- WILLIAMS, H.A.; BEWLEY, J.D.; GREENWOOD, J.S.; BOURGAULT, R.; MO, B.X. The storage cell walls in the endosperm of *Asparagus officinalis* L. seeds during development and following germination. **Seed Sci. Res.**, Wallingford, v.11, n.4, p.305-315, 2001.
- WU, C.T.; LEUBNER, M.G.; MEINS, F.; BRADFORD, K.J. Class I beta-1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.126, n.3, p.1299-1313, 2001.

CAPÍTULO I

COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DE SEMENTES OSMOCONDICIONADAS DE *Platymiscium pubescens* (Micheli) (TAMBORIL-DA-MATA)

Publicado na **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.5, p.603-613, 2002.

Resumo: O objetivo desse trabalho foi investigar alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes osmocondicionadas de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens* Micheli). Foram analisados o crescimento do eixo embrionário, a germinação, as alterações na parede celular, a mobilização de carboidratos e proteínas e a atividade de α -galactosidase. Observou-se que o teor de água das sementes da testemunha aumentou continuamente até 96 horas de embebição, enquanto as mantidas nas soluções de PEG estabilizaram a partir de 48 horas. A germinação ocorreu somente nas sementes mantidas em água, alcançando 30% em 120 horas. As sementes mantidas em solução -0,4 MPa de PEG por 120 horas tiveram 66% de germinação quando transferidas para água, sendo a maior em relação aos demais potenciais. A massa fresca e o comprimento do embrião aumentaram significativamente durante o período de 120 horas em solução de PEG (-0,4 MPa/120 horas). Entretanto, a massa seca teve incremento não significativo. Os teores de arabinose e xilose em membranas lavadas com água decresceram significativamente durante o osmocondicionamento. A galactose não foi detectada na membrana em 120 horas. A arabinose mostrou ser a principal constituinte da membrana. A atividade de α -galactosidase mostrou diferença significativa durante o período de 120 horas. Os teores de ramnose, arabinose e xilose alteraram-se significativamente na fração pécica, enquanto a ramnose foi a única na fração hemicelulósica. A glicose foi detectada somente nessa última fração. Os teores de glicose no embrião e cotilédones alteraram-se significativamente durante o osmocondicionamento. Os teores de estaquiose e de rafinose não tiveram alterações significativas nos cotilédones, enquanto o de sacarose reduziu significativamente, mantendo-se mais alto do que os dos outros dois oligossacarídeos. O teor de proteína decresceu significativamente nas 120 horas de osmocondicionamento. Conclui-se que o osmocondicionamento potencializou a germinação das sementes durante o processo de embebição, resultando em modificações da parede celular pela deposição de monossacarídeos.

Palavras-chaves: germinação, *Platymiscium pubescens*, carboidrato, proteína, parede celular.

Summary: The objective of this study was to investigate physiological and biochemical alterations in tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) osmoconditioned seeds. It was analyzed embryonic axis growth, germination, changes in the cell wall, carbohydrate and protein content and α -galactosidase activity. It was observed that the seed water content for the control seed increased continuously for as long as 96 hours of imbibition, while those maintained in the PEG solutions stabilized at 48 hours. The germination occurred only in seeds maintained in water, reaching 30% in 120 hours. The seeds maintained in -0.4 MPa PEG solution for 120 hours showed 66% of germination when transferred to water, and had the greatest potential. Fresh matter and length increased significantly during the 120 hours period in PEG solution (-0.4 MPa/120 hours). However, the dry matter showed no significant increment. Arabinose and xilose contents in water washed membranes decreased significantly during the osmopriming. Galactose was not detected until 120 hours. Arabinose had the largest concentration. The α -galactosidase activity showed significant activity during the 120 hours period. Ramnose, arabinose and xilose contents changed significantly in the pectic fraction, while ramnose was the only one in the hemicellulose fraction that showed significant change. Glucose contents changed significantly during the osmopriming. Staquiose and raffinose contents showed no significant changes, while sucrose content was reduced significantly though was maintained higher than the other oligossacharides during the entire period. Protein contents decreased significantly after 120 hours of osmopriming. It was concluded that priming potentiated seed germination by reducing sugars deposition in cell wall.

Key words: germination, *Platymiscium pubescens*, carbohydrate, protein, cellular wall.

1. INTRODUÇÃO

A germinação de sementes é um processo complexo e os mecanismos variam entre espécies ou mesmo entre populações de mesma espécie (KHATRI, SETHI & KAUSHIK, 1991). O osmocondicionamento de semente tem sido empregado, para que os mecanismos envolvidos na germinação de diversas espécies sejam entendidos. Solução de polietilenoglicol (PEG) tem sido usada como meio osmótico para simular o estresse hídrico que ocorre no campo e que, segundo BASKIN & BASKIN (1998), poderia induzir dormência secundária. Há, porém, necessidade de que a semente alcance determinado nível de umidade, cujo teor é variável com a espécie. KHAN & KARSSSEN (1980), trabalhando com *Chenopodium bonnes-hericus* e SAMIMY & KHAN (1983), com *Rumex crispus*, induziram dormência secundária quando as sementes foram submetidas ao estresse hídrico de -0,86 MPa e -1,57 MPa, respectivamente. A condição hídrica e temperatura são dois fatores que exercem influência decisiva na manutenção do banco de sementes no solo. A absorção de água pelas sementes de espécies pioneiras, por exemplo, em quantidade suficiente para alcançar nível mínimo, poderia estimular o metabolismo. Entretanto, a baixa temperatura no solo florestal não seria adequada para que ocorra a germinação, levando as sementes a dormência secundária. Assim, elas teriam a potenciação para germinar, mas teriam que aguardar condições térmicas propícias, que viriam em

outra estação ou a queda de alguma árvore, para que isso ocorresse. A dormência secundária asseguraria a sobrevivência nesse período. Por outro lado, o período de alta temperatura poderia encontrar as sementes com baixo teor de água, mas com o estímulo metabólico pronto para que ocorra a germinação em curto espaço de tempo, adequado para vencer a concorrência com as demais espécies, pelo osmocondicionamento ocorrido na estação anterior.

A germinação de sementes de fedegoso (*Senna macranthera*) ocorre pela expansão celular, segundo BORGES et al. (2001), que verificaram não haver alterações significativas nas reservas. Resultados semelhantes a esses foram encontrados por ARMSTRONG e McDONALD (1992) em sementes de soja, cujos comprimentos e a matéria seca da radícula e da plúmula aumentaram após o osmocondicionamento.

TOOROP et al. (2000) concluíram que a germinação de sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) ocorria devido ao enfraquecimento mecânico do endosperma, permitindo que a radícula o rompesse. Muito embora alguns autores tenham tentado relacionar o enfraquecimento mecânico de tegumento com a atividade de enzimas, em poucas espécies tem havido essa associação com a parede celular (BEWLEY, 1997).

SPYROPOULOS & LAMBIRIS (1980) observaram em sementes de *Ceratonia siliqua* L. que o crescimento do eixo embrionário, o decréscimo da matéria seca total e a formação de amido correlacionaram-se com o decréscimo de galactomanano. Entretanto, a atividade de α -galactosidase embrionária não foi afetada significativamente. Teores de açúcares solúveis nos cotilédones foram altos quando as sementes estiveram sob estresse hídrico, especialmente devido ao alto teor de galactose e manose.

HULBERT et al. (1988) observaram a não incorporação de metionina em proteína durante o estresse hídrico de sementes de *Pinus taeda*. Da mesma forma, os resultados obtidos por DELL'AQUILLA (1992), com sementes de trigo (*Triticum aestivum*), evidenciaram que a síntese de proteína no eixo embrionário é reduzida quando o embrião é submetido ao estresse hídrico. Entretanto, o bloqueio da germinação sob estresse e subsequente recuperação em água não está

associado ao bloqueio ou estímulo a síntese de determinada proteína.

Tendo em vista a carência de informações fisiológicas e bioquímicas concernentes à germinação das sementes de grande parte das espécies florestais arbóreas nativas, foi desenvolvido o presente trabalho, com o objetivo de verificar o efeito do osmocondicionamento nos mecanismo fisiológico envolvido na germinação de sementes de *Platymiscium pubescens* (tamboril-da-mata).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes colhidas de quatro árvores, foram colocadas para embeber em solução de polietilenoglicol (PEG, p.m. 6.000) nos potenciais de -0,2 MPa, -0,4 MPa e -0,6 MPa e a testemunha onde se utilizou somente água destilada, por 120 horas, na temperatura constante de 25°C, colhendo-se amostras a cada 24 horas para determinação de umidade. Esta determinação foi feita diariamente, em estufa a 105°C por 24 horas. Foram utilizadas três repetições de 20 sementes cada. Durante a retirada de amostras procurou-se verificar a ocorrência de sementes germinadas em cada potencial. Não se detectando germinação em -0,4 MPa e -0,6 MPa, colocou-se, então, as sementes para embeber nesses potenciais por 96 e 120 horas, à temperatura de 25°C. Foram, então, lavadas ao final de cada tempo e colocadas para germinar à mesma temperatura, sob iluminação constante, proporcionada por oito lâmpadas fluorescentes OSRAM, de 40 W, tipo luz do dia especial. A cada hora era feita contagem de sementes germinadas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam protrusão de radícula. Utilizaram-se cinco repetições com 20 sementes cada, para cada tratamento.

O comprimento, as massas dos embriões frescos e secos de sementes colocadas em solução de PEG -0,4 MPa foram avaliados em amostras colhidas com tempos zero, 72 e 120 horas de embebição. As avaliações dos comprimentos

dos embriões foram feitas antes de serem levados para a estufa, utilizando-se um ampliador fotográfico e curvímeter. As matérias secas foram avaliadas após secagem dos embriões em estufa a 45°C, por 48 horas. Todas as quantificações foram feitas em cinco repetições de 20 sementes.

A extração de proteína foi feita em embriões mantidos em solução de PEG -0,4 MPa, pelo período de zero a 120 horas, segundo ALFENAS et al. (1991). Utilizou-se o tampão TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7,5 como solução de extração. A quantificação foi feita conforme BRADFORD (1976), utilizando-se a albumina de serum bovina (BSA) como padrão de proteína. Foram feitas cinco repetições, cada uma em duplicata.

A extração e a determinação de atividade de α -galactosidase foram feitas segundo REZENDE (1998), com modificações. O extrato foi obtido macerando-se 50 mg de embriões mantidos em PEG -0,4 MPa pelo período de 72 a 120 horas em 1,5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e centrifugado sob refrigeração a, aproximadamente, 21.000 x g por 60 s. A quantificação de α -galactosidase foi feita com adição de *p*-nitrofenil galactopiranosídeo (*p*-NPGal) 2,0 mM ao extrato enzimático, seguida de incubação em banho-maria, a 37°C, por 30 min. Acrescentou-se 1,0 mL de carbonato de sódio 0,5 M para paralisar a reação. A leitura foi feita no comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorbância foram transformados em micromoles de *p*-NP formados, utilizando-se uma curva-padrão. Uma unidade da atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um 1,0 μ mol de *p*-NP, por minuto, nas condições do ensaio. Foram realizadas três repetições de medidas de atividade de cada enzima.

Embriões originados de sementes mantidas em solução de PEG -0,4 MPa por zero, 72 e 120 horas tiveram a membrana que os recobre retirada e submetida ou não a lavagem com água desionizada, quantificando-se a sua composição após preparação dos alditóis acetatos.

A extração de parede celular e a separação de pectina e hemicelulose foram feitas conforme descrito por CARPITA e GILBEAUT (1993), sendo

preparados alditóis acetatos para análise de monossacarídeos em cromatografia gasosa. Foram feitas quatro repetições de cada extração e quantificação.

As extrações de monossacarídeos e de oligossacarídeos do embrião e dos cotilédones foram feitas conforme metodologia descrita por BLACK et al. (1996), com modificações: o material seco e moído foi homogeneizado com etanol 80% a 75°C, por 30 min, após o qual foi centrifugado a 12.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi separado e homogeneizou-se o precipitado com etanol 80% por mais cinco vezes. Os sobrenadantes foram misturados e secados totalmente, ressuspendendo-se com 1,0 mL de água ultrapura. Retirou-se 0,5 mL que foi usado para preparo do alditol acetato. O restante da amostra foi utilizado para quantificação dos oligossacarídeos.

As digestões da membrana, da hemicelulose e da pectina foram feitas conforme metodologia descrita em BORGES et al. (2000) e a quantificação dos monossacarídeos conforme ENGLYST e CUMMINGS (1984). Utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu GC14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um registrador e integrador C-R6A chromatopac. Utilizou-se coluna moderadamente polar, 50% de cianopropilfenil-dimetilsiloxane. O fluxo de gás foi de 0,25 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor, do detector e da coluna foram 250°, 220° e 275°C, respectivamente. A razão de divisão foi de 1/40, tendo sido injetado 1,0 µL de alditol acetato.

Os oligossacarídeos foram quantificados após passagem das amostras em coluna sep-pak C-18 e, após redução de volume, injetados 20 µL em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) Shimadzu, equipado com coluna aminex HPX-42C, de 300 mm X 7,8 mm, tendo a água como fase móvel, com fluxo de 0,6 mL/min. O aparelho está equipado com detector de índice de refração.

Todos os experimentos foram estabelecidos no delineamento inteiramente casualizado. As determinações de teor de água e atividade da alfa-galactosidase tiveram três repetições, enquanto aqueles correspondentes a massas fresca e seca e comprimento do eixo embrionário tiveram cinco repetições. As características avaliadas foram submetidas aos testes de normalidade dos dados e de

homogeneidade de variância e posteriormente submetidas à análise de variância e teste F, a 1% de probabilidade. Os experimentos de membrana foram instalados no esquema fatorial 2 X 3 (sem e com lavagem e três tempos: 0, 72 e 120 horas), com quatro repetições. Os dados de monossacarídeos foram submetidos ao teste de homogeneidade e normalidade e, em seguida, procedeu-se à análise de variância e teste F, a 1% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o Sistema de Análise Estatística (SAEG, versão 8.X, Universidade Federal de Viçosa).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se no Quadro 1 que houve rápida embebição das sementes, tanto na água, quanto nas soluções de PEG, nas primeiras 24 horas. Enquanto a estabilização da umidade das sementes mantidas em água ocorre em 96 horas, aquelas mantidas nos potenciais $-0,4$ e $-0,6$ MPa o fizeram em 24 horas e, no potencial de $-0,2$ MPa, em 48 horas. Houve 30% de germinação nas sementes mantidas em água por 120 horas, alcançando 67% em 144 horas, indicando que elas alcançaram nível crítico de umidade, o que lhes permitiu germinar. Por outro lado, não se observou germinação das sementes mantidas em soluções de PEG, em todos os potenciais. Verifica-se pela Figura 1 que as sementes alcançaram teor de água que as permitiram germinar somente quando transferidas para água. O potencial de $-0,4$ MPa por 120 horas estimulou claramente a germinação em relação aos demais, o que permitiu alcançar, aproximadamente, 60% de germinação em 300 minutos. Quando o osmocondicionamento em $-0,4$ e $-0,6$ MPa foi feito por 120 horas, a similaridade da porcentagem de germinação foi somente verificada nos primeiros 180 minutos, com incremento superior aos demais tratamentos. O tratamento no potencial de $-0,6$ MPa/120 horas representou maior incremento na germinação nos primeiros 180 minutos.

As sementes mantidas em soluções de potencial $-0,4$ MPa por 120 horas, tiveram a matéria fresca dobrada nas primeiras 72 horas de germinação,

Quadro 1 – Teor de água (%) em sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens* Micheli) em soluções com diferentes potenciais osmóticos.

Potencial (MPa)	Tempo (h)					
	0	24	48	72	96	120
Água	12,68±1,59	58,16±7,90	63,30±0,27	68,83±0,71	72,88±1,28	69,26±0,16
-0,2	12,68±1,59	58,37±1,00	62,39±0,06	63,31±1,03	62,99±1,42	57,73±0,22
-0,4	12,68±1,59	59,64±5,04	61,63±0,15	60,06±0,51	60,48±0,91	59,39±0,53
-0,6	12,68±1,59	57,65±0,15	58,66±1,00	57,01±0,63	57,72±0,78	56,23±0,15

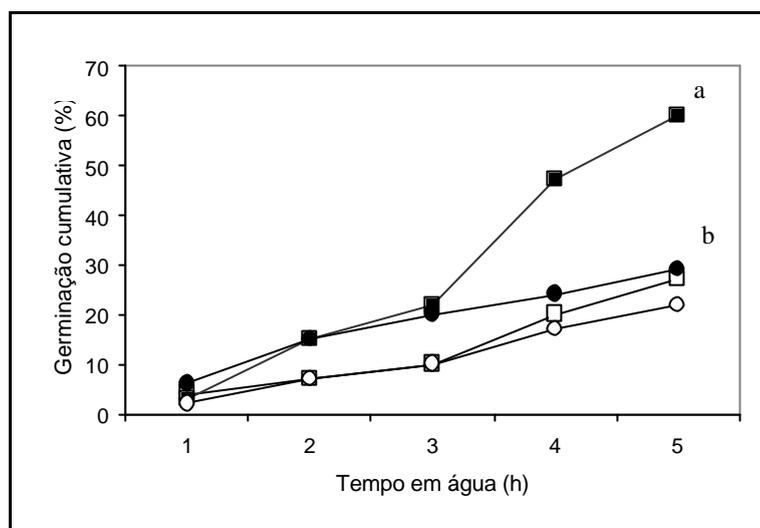


Figura 1 – Germinação acumulada de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium Pubescens*) após osmocondicionamento em solução de PEG. Concentração/tempo de permanência em solução de PEG: -0,4 MPa/96h: □; -0,4 MPa/120h: ■; -0,6 MPa/96h: ○; -0,6 MPa/120h: ●. As médias no tempo de 300 minutos seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey ($P < 0,01$).

estabilizando-se em seguida (Figura 2). Houve alterações significativas no comprimento e massa fresca de embriões entre os diferentes tempos de osmocondicionamento, ao passo que para a massa seca de embriões as alterações foram não significativas (Quadro 2). Assim, a germinação observada quando as sementes são transferidas para água se deve a pré-expansão do embrião, em parte ocasionada pela água absorvida. BORGES et al. (2001) estudando sementes de fedegoso (*Senna macranthera*) durante o período inicial de germinação verificaram que a massa fresca apresentou pequeno aumento, enquanto o comprimento do embrião aumentou nas primeiras 24 horas, estabilizando-se em

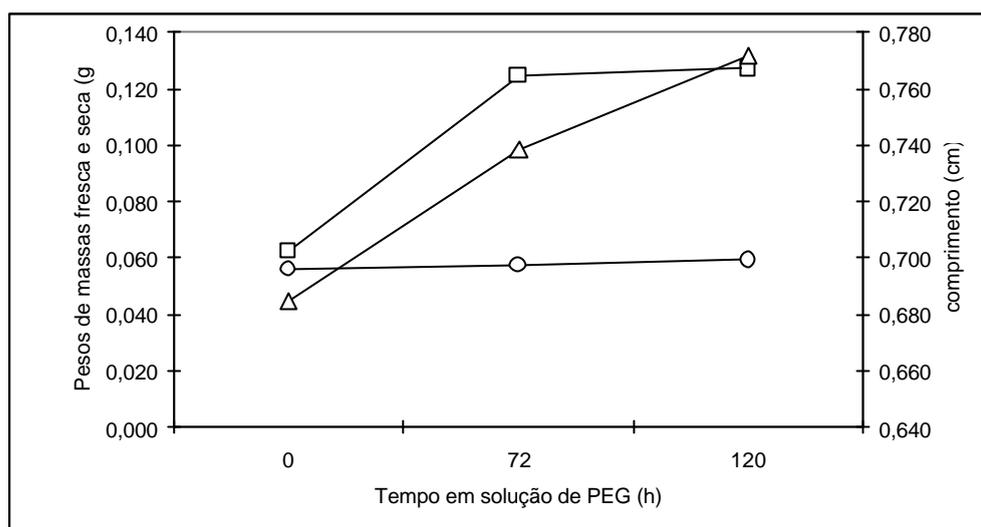


Figura 2 – Comprimento e massas fresca e seca de embriões de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) durante o osmocondicionamento em solução de PEG (-0,4 MPa). Massa fresca: □; massa seca: ○; comprimento: Δ.

Quadro 2 – Resumo da análise de variância de massas fresca e seca e do comprimento de embriões de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*)

FV	GL	Quadrado Médio		
		Peso Fresco	Peso Seco	Comprimento
Tempo	2	$0,6732 \cdot 10^{-2}^{**}$	$0,1447 \cdot 10^{-4}$ ns	$0,9706 \cdot 10^{-2}^{**}$
Resíduo	12	$0,2151 \cdot 10^{-4}$	$0,6533 \cdot 10^{-5}$	$0,7019 \cdot 10^{-3}$
CV (%)	-	4,42	4,46	3,62

** F significativo a 1% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade

seguida. Houve pequena redução na massa seca. Trabalhos realizados com sementes de milho (*Zea mays*) por GARCIA et al. (1995) não permitiram observar sinal de divisão celular durante o osmocondicionamento. Entretanto, ao serem transferidos para água, houve aumento de divisão celular e de síntese de ADN, supondo-se que ambas atividades são eventos específicos da germinação daquela espécie.

A análise das alterações na composição da membrana que recobre o embrião mostra que os teores dos açúcares arabinose e xilose, reduziram significativamente quando as sementes mantidas por 120 horas em solução de

PEG, foram lavadas (Quadro 3). Somente galactose não foi detectada naquele tempo. A arabinose mostra-se como a principal constituinte da membrana. É interessante ressaltar a diferença na composição da membrana com e sem lavagem em água antes das análises. Foram observados maiores teores para todos os açúcares analisados nas membranas sem lavagem enquanto no PEG, indicando erradamente aumento nos seus teores como deposição na membrana. Esses resultados permitem depreender que durante o período de embebição há remoção de açúcares do eixo embrionário ou dos cotilédones, que ficam retidos na membrana. Comparando-se esses dados com aqueles da Figura 3, percebe-se que a atividade da enzima α -galactosidase no embrião, quando no PEG, mantém-se constante nas primeiras 96 horas, aumentando em seguida. A análise estatística mostrou que houve diferença significativa, a 1% de probabilidade, na atividade da enzima, entre os tempos de avaliação. Entretanto, a atividade da enzima não parece ser o provável componente metabólico que justificaria a redução na galactose da membrana. É interessante ressaltar que testes realizados não indicaram a presença da enzima na membrana, havendo a necessidade da presença do embrião para essa atividade ou mesmo a síntese de uma isoenzima de α -galactosidase específica para atuar na membrana.

Quadro 3 – Teores de monossacarídeos (mg/g matéria seca) em membrana de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) em solução de PEG (-0,4 MPa)

Açúcares	Tempo (horas)	Sem Lavagem	Com Lavagem
Ramnose	0	16,99 A	12,42 B
	72	16,14 A	13,19 B
	120	22,53 A	10,63 B
Arabinose	0	34,68 A	35,18 A
	72	40,71 A	37,22 A
	120	55,47 A	30,63 B
Xilose	0	12,07 A	11,58 A
	72	12,50 A	11,13 B
	120	15,16 A	10,31 B
Galactose	0	13,63	12,50 (3)
	72	14,23	12,81 (2)
	120	18,64	

Mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F ($P < 0,05$). Os valores entre parênteses correspondem ao número de repetições.

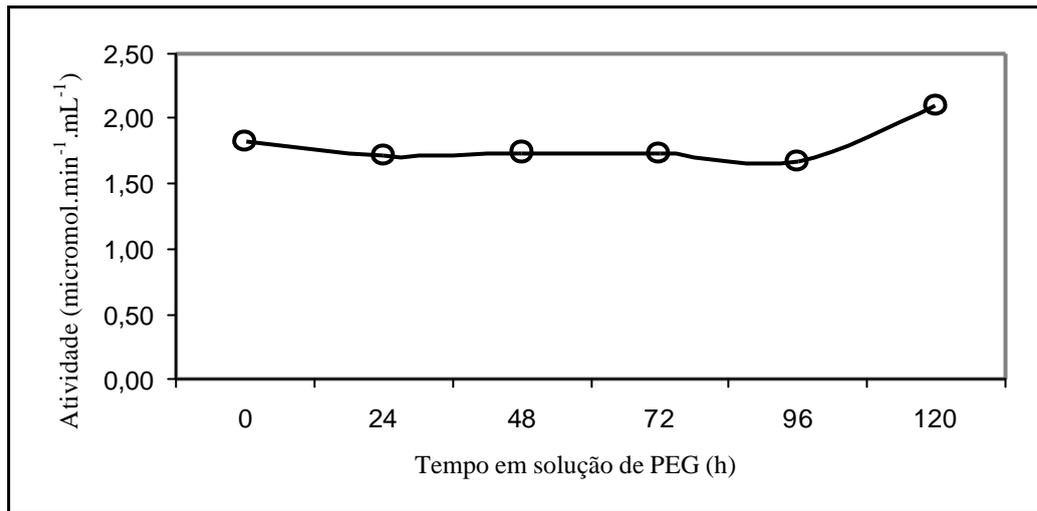


Figura 3 – Atividades de α -galactosidase em embriões de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) mantidos em solução de PEG (-0,4 MPa).

Considerando-se os valores dos monossacarídeos da parede celular do embrião (Quadros 4 e 5) conclui-se que a ativação de α -galactosidase (Figura 3), muito embora tenha mostrado diferença significativa ao longo de 120 horas de observação, não parece ser em nível de parede celular, pois a análise estatística não detectou diferença significativa entre os três tempos de avaliação de galactose na fração pécica ou hemicelulósica. Observa-se que houve aumentos significativos para a ramnose, arabinose e xilose na fração pécica, percebendo-se que há deposição de monossacarídeos com a permanência em solução de PEG, especialmente em relação a arabinose que apresentou aumento mais que dobrado nas primeiras 72 horas. Também chama a atenção a ausência da glicose na fração pécica. O comportamento desse açúcar na hemicelulose é semelhante aos demais, na mesma fração, cujas variações ao longo do tempo não diferiram significativamente (Quadro 4), com exceção da ramnose, que apresentou decréscimo significativo em seu conteúdo, em PEG. A manose apareceu na fração hemicelulose somente com 120 horas de embebição em solução de PEG, com valor de $0,15 \text{ mg.g}^{-1}$ de massa seca. Assim, conclui-se que há deposição de açúcares na parede celular (Quadro 5), apesar de não se perceber aumento significativo na mesma (Figura 2). Resultados obtidos por QOUTA et al. (1999) com sementes de *Brassica oleracea* mostraram que houve pequeno aumento de açúcar depositado na parede somente após a retirada do meio osmótico.

Quadro 4 – Resumo da análise de variância de teores de monossacarídeos (mg/g massa seca) na pectina e hemicelulose de parede celular de embriões de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) mantidas em solução de PEG (-0,4 MPa)

FV	GL	Quadrados Médios				
		Ramnose	Arabinose	Xilose	Galactose	Glicose
Tempo	2	0,2861.10 ^{-2*}	0,1143*	0,4780.10 ^{-2*}	0,7707.10 ^{-2ns}	-
Resíduo	9	0,5033.10 ⁻³	0,0239	0,8589.10 ⁻³	0,2622.10 ⁻²	-
CV (%)	-	24,29	36,99	25,07	32,11	-
Tempo	2	0,1286.10 ^{-2*}	0,1120.10 ^{-1ns}	0,1117.10 ^{-2ns}	0,1264.10 ^{-1ns}	0,0499ns
Resíduo	9	0,1872.10 ⁻³	0,8263.10 ⁻²	0,4008.10 ⁻²	0,8508.10 ⁻²	0,0318
CV (%)	-	9,51	20,18	17,98	35,10	37,70

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 5 – Teores médios de monossacarídeos (mg/g massa seca) na pectina e na hemicelulose da parede celular de embriões de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) mantidas em solução de PEG (-0,4 MPa)

Componentes	Tempo (h)	Ramnose	Arabinose	Xilose	Galactose	Glicose
Pectina	0	0,062	0,224	0,077	0,109	-
	72	0,104	0,494	0,133	0,186	-
	120	0,111	0,535	0,141	0,184	-
Hemicelulose	0	0,159	0,485	0,357	0,286	0,468
	72	0,150	0,390	0,334	0,199	0,346
	120	0,124	0,477	0,366	0,304	0,569

Analisando-se os monossacarídeos nos cotilédones e no eixo embrionário não se detectou a presença de nenhum outro açúcar que não a glicose (Figura 4). Esta, por sua vez, decresceu significativamente em ambos os compartimentos nas primeiras 96 horas no PEG, com tendência de aumento em seguida. Como a utilização desse açúcar pela deposição na parede celular não foi proporcional a sua degradação, pode-se supor que ele foi utilizado em outras funções, como a respiração, por exemplo, não havendo a sua retenção pela membrana (Quadro 3). Não deixa de ser intrigante o fato de se detectar a presença de um único açúcar redutor em ambos compartimentos. Provavelmente ele exerce função osmótica, permitindo maior absorção de água na fase inicial de embebição.

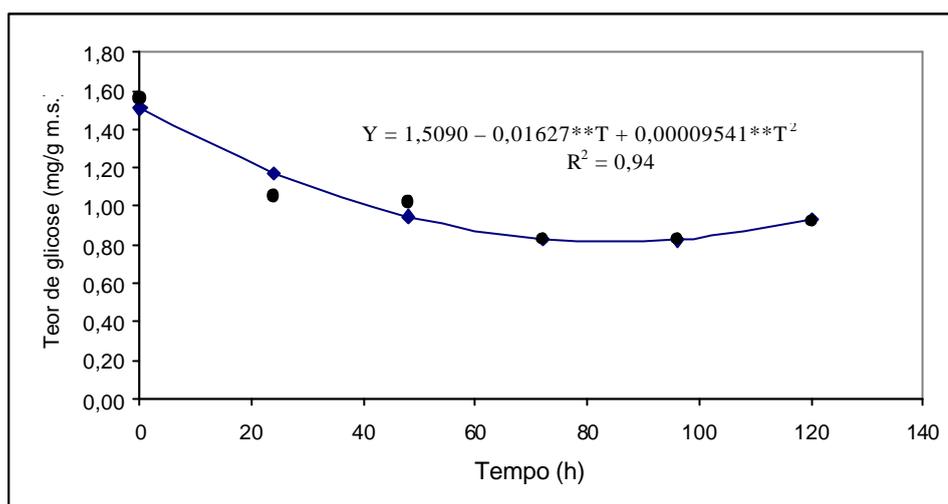


Figura 4 – Teores de glicose (mg/g massa seca) em sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) em solução de PEG (-0,4 MPa).

Os teores de oligossacarídeos nos cotilédones são mostrados na Figura 5. Vê-se que a sacarose é o maior componente entre os demais, apresentando redução significativa durante o período em que as sementes estiveram na solução do PEG. Não se observaram maiores variações na concentração da rafinose, durante as primeiras 96 horas, sendo, contudo, inteiramente consumida em 120 horas. O seu destino é desconhecido, tendo em vista que a frutose não foi detectada em nenhuma amostra de qualquer tempo de embebição. A glicose, por sua vez, teve sua concentração reduzida a partir das primeiras 24 horas (Figura 4). A galactose poderia ter sido incorporada, em parte, na parede celular, onde não se detectaram variações significativas nem na pectina e nem na hemicelulose (Quadro 4), mas apresentou tendência de aumento na membrana (Quadro 3), naquelas não lavadas, em 120 horas, e desapareceu nas lavadas, no mesmo tempo, mostrando que foi eliminada durante o tempo de embebição. Os valores de estaquiose decresceram significativamente durante a o período em que esteve no PEG. Dessa forma, a estaquiose e a sacarose mostraram ser os primeiros oligossacarídeos a serem utilizados durante a pré-emergência da radícula. Observa-se que não existe um padrão de comportamento entre as diferentes espécies, quanto ao consumo de oligossacarídeos e de monossacarídeos. Diferentemente do tamboril da mata, sementes de *Brassica napus* (BALERONI et

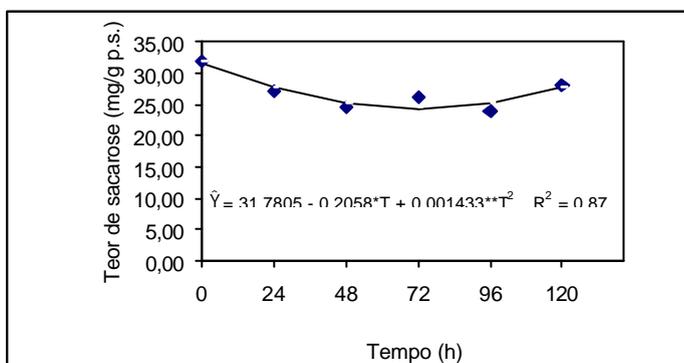
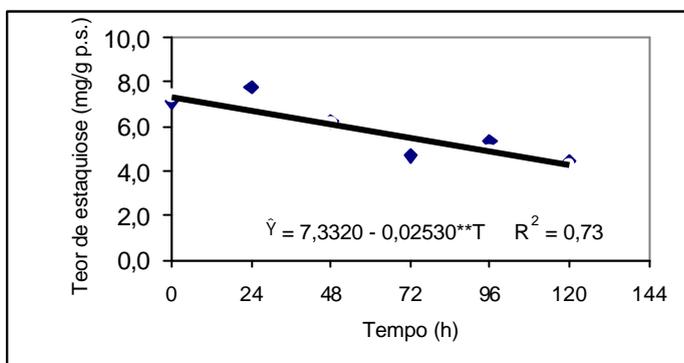
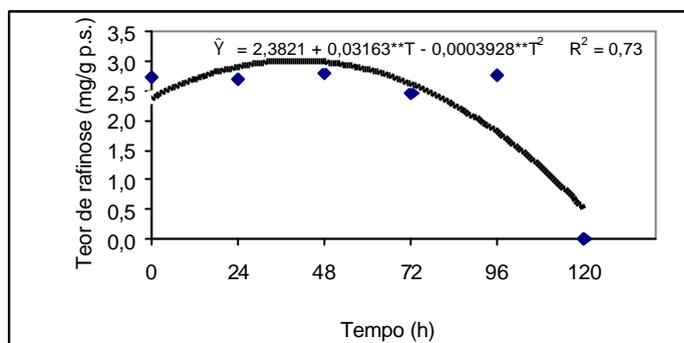


Figura 5 – Teores de oligossacarídeos (mg/g massa seca) em cotilédones de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) em solução de PEG (-0,4 MPa).

al., 1997) e de *Dimorphandra mollis* (BUCKERIDGE et al., 1995) degradam sacarose, rafinose e estaquiose antes da protrusão da radícula. Em sementes de *Pinus lambertiana* observou-se que no início da embebição a sacarose aumentou 50%, a estaquiose decresceu e a glicose aumentou. A rafinose decresceu somente após a germinação (MURPHY & HAMMER, 1988). Em sementes de *Senna macranthera*, a concentração de monossacarídeos permaneceu constante, enquanto o teor de amido reduziu (BORGES et al., 2001). Uma parte do desaparecimento dos açúcares pode ser explicada pela suposição de JENSEN (1985), segundo o qual a rota da biossíntese de aminoácidos aromáticos e de fenóis depende do metabolismo do carboidrato como fonte inicial de substrato. Apesar de o autor não apresentar dados de tais conversões em sementes, o mesmo levanta a possibilidade dessa ocorrência no cloroplasto de folha. Aparentemente não houve interconversão acentuada entre açúcares e proteínas, tendo em vista decréscimo significativo das segundas (Figura 6).

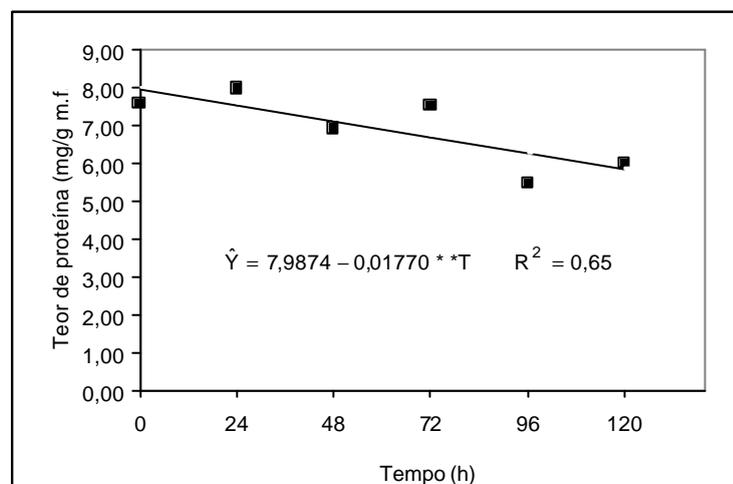


Figura 6 – Teor de proteína (mg/g massa fresca) em embriões de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) mantidos em solução de PEG (-0,4 MPa).

Diferentemente, SMITH & COOB (1992) verificaram aumento significativo no teor de proteína durante o osmocondicionamento de sementes de *Capsicum annuum*. Por outro lado, QOUTA et al. (1999) somente observaram queda no

teor de proteínas após dois dias do final da embebição, com o que concordam GARCIA et al. (1995) segundo os quais os embriões de *Zea mays* sintetizam ADN, ARN e proteínas em maiores quantidades após remoção da solução osmótica. Segundo BRAY (1995), o tipo de proteína formada e não a taxa de sua formação seria responsável pela germinação, o que foi confirmado por BORGES & BORGES (1996) com sementes de *Dalbergia nigra*, durante o osmocondicionamento, quando não encontraram correlação entre o teor de proteína e germinação das sementes. Por outro lado, FUJIKURA & KARSSSEN (1992) verificaram que proteínas relacionadas ao vigor expressam-se mais em sementes osmocondicionadas, havendo correlação entre essa expressão e taxa de germinação.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, chegou-se às seguintes conclusões:

1. O osmocondicionamento das sementes de *Platysmiscium pubescens* provoca entumescimento e expansão do eixo embrionário, associados a alterações de monossacarídeos na parede celular resultando em aumento do comprimento do eixo embrionário.

2. Não se detectou clara participação de proteínas e modificações em mono e oligossacarídeos nas alterações físicas observadas durante o osmocondicionamento.

3. A atividade de α -galactosidase não se mostrou responsável pelas alterações na composição da parede celular ou nos teores dos açúcares.

4. Estaquiose e sacarose mostraram ser os primeiros oligossacarídeos a serem degradados durante a protrusão da radícula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; I. PETERS; W. BRUNE; G.C. PASSADOR. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- ARMSTRONG, H.; McDONALD, M.B. Effect of osmoconditioning on water uptake and electrical conductivity in soybean seeds. **Seed Sci. & Technol.**, Zürich, v.20, p.391-400, 1992.
- BALERONI, C.R.S.; FERRARESE, M.L.L.; COSTA, S.C.; SOUZA, N.E.; FERRARESE-FILHO, O. Isocitrato lyase activity and mobilization of lipids and carbohydrate in cotyledons of canola. **Rev. Bras. Fis. Veg.**, Brasília, v.9, n.3, p.189-192, 1997.
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds- Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. London: Academic Press, 1998. 666p.
- BEWLEY, J.D. Breaking down the walls – a role for endo- β -mannase in release from seed dormancy? **Trends Plant Science**, Cambridge, v.2, p.464-469, 1997.
- BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GRZESIK, M.; GUY, P.; CÔME, D. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.47, n.295, p.161-169, 1996.
- BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G. Modificações fisiológicas em sementes osmocondicionadas de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All.). **Rev. Árvore**, Viçosa, v.20, n.2, p.147-154, 1996.

- BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; BUCKERIDGE, M.S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de jacarandá-da-bahia osmocondicionadas. **Rev. Bras. de Fis. Veg.**, Lavras, v.12, n.1, p.10-16. 2000.
- BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; SOARES, C.P.B.; PERES, S.C.J.G.A. Crescimento e mobilização de carboidrato em embrião de sementes de fedegoso (*Senna macranthera* Irwin et Barnaby) durante a germinação. **Rev. Cerne**, Lavras, v.7, n.1, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.**, Maryland, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAY, C.M. Biochemical process during the osmopriming of seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995, p.767-789.
- BUCKRIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.E.; DIETRICH, S.M.C. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v.18, n.2, p.171-175, 1995.
- CARPITA, N.G.; GILBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.3, p.1-3. 1993.
- DELL'AQUILLA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under the osmotic stress of polyethylene glycol. **Ann. Bot.**, London, v.69, p.167-171, 1992.
- ENGLYST, H.N.; CUMMINGS, J.H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst.**, Herts, v.109, p.937-942.1984.
- FUJIKURA, Y.; KARSSSEN, C.M. Effects of controlled deterioration and osmopriming on protein synthesis of cauliflower seeds during early germination. **Seed Sci. Res.**, Wallingford, v.2, p.23-31, 1992.
- GARCIA, F. C.; JIMENEZ, L. F.; VAZQUEZ-RAMOS, J. M. Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds. **Seed Sci. Res.**, Wallingford, v.5, p.15-23, 1995.
- HULBERT, C.; FUNKHOUSER, E.A.; SOLTER, E.J.; NEWTON, R.H. Inhibition of protein synthesis in loblolly pine hypocotyls by mannitol induced water stress. **Tree Physiol.**, Victoria, v.4, p.19-26, 1988.

- JENSEN, R.A. The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.66, p.164-168, 1985.
- KHAN, A.A.; KARSSSEN, C.M. Induction of secondary dormancy in *Chenopodium bonnes-henricus* L. seeds by osmotic and growth regulators. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.66, p.175-181, 1980.
- KHATRI, R.; SETHI, V.; KAUSHIK, A. Inter-population variations of *Kochia indica* during germination under different stress. **Ann. Bot.**, London, v.67, p.413-415, 1991.
- KLITGAARD, B.B. **Systematics of Platymiscium (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae): taxonomy, morphology, ontogeny and phylogeny.** Aarhus, 1995. 168p. Tese (Doutorado) – University of Aarhus. Finlândia.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Vol. 2, Nova Odessa: Plantarum, 1998. 352p.
- MARANGON, L.C. **Florística e fitossociologia de área de floresta estacional semidecidual visando dinâmica de espécies florestais arbóreas no município de Viçosa-MG.** São Carlos, 1999. 145p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, SP.
- MODI, A.T.; McDONALD, M.B.; STREETER, J.G. Soluble carbohydrates in soybean seeds during development and imbibition. **Seed Sci. & Technol.**, Zürich, v.28, n.1, p.115-127, 2000.
- MURPHY, J.B.; HAMMER, M.F. Respiration and soluble sugar metabolism in sugar pine embryos. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.74, p.95-100, 1988.
- QOUTA, L.A.; WALDRON, K.W.; BAYDOUN, E.A.H.; BRETT, C.T. Changes in seed reserves and cell-wall composition of component organs during germination of cabbage (*Brassica oleraceae*) seeds. **J. Plant Physiol.**, Stuttgart, v.138, n.6, p.700-707, 1999.
- REZENDE, S.T. **Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertase e alfa galactosidase de microorganismos.** Brasília, 1998. 166p. (Tese Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- SAMIMY, C.; KHAN, A.A. Secondary dormancy, growth regulators effects and embryo growth potential in curly dock (*Rumex crispus*) seeds. **Weed Sci.**, Illinois, v.31, p.153-158, 1983.

- SMITH, P.T.; COOB, B.G. Physiological and enzymatic characteristics of primed, redried, and germinated pepper seeds (*Capsicum annuum* L). **Seed Sci. & Technol.**, Zürich, v.20, p.503-513, 1992.
- SPYROPOULOS, C.G.; LAMBIRIS, M.P. Effect of water stress on germination and reserve carbohydrate metabolism in germination seeds of *Cerotonia siliqua* L. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.31, n.122, p.851-857, 1980.
- TOOROP, P.E.; Van AELST, A.C.; HILHORST, H.W.M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.51, n.349, p.1371-1379, 2000.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM SEMENTES DE *Tachigalia multijuga* (BENTH) (MAMONEIRA) RELACIONADAS À SUPERANÇA DA DORMÊNCIA

Resumo: Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de métodos de quebra da dormência em sementes de *Tachigalia multijuga* (Benth) provenientes de três matrizes (Cachoeira, Araponga 1 e 2) e as suas respostas fisiológicas. Compararam-se os efeitos do ácido sulfúrico, da água fervente e do despolvo na porcentagem de embebição, na porcentagem e velocidade de germinação, na atividade de alfa-galactosidase e beta-mananase, na síntese de proteína e na alteração na membrana que recobre o embrião. Não houve germinação em sementes tratadas com água quente. Todos os tratamentos resultaram em porcentagem de germinação superior ($P < 0,05$) ao da testemunha, com exceção das sementes de Cachoeira, onde o tratamento com ácido sulfúrico por 10 minutos foi semelhante. Por outro lado, a velocidade de germinação da testemunha foi diferente ($P < 0,05$) de todos os tratamentos somente em sementes de Araponga 2. A porcentagem de umidade das sementes tratadas com água quente por 60 segundos foi semelhante àquelas da testemunha e diferente ($P < 0,05$) das tratadas com água quente por 30 minutos e ácido por 20 minutos. As atividades das enzimas e teores de proteínas durante a germinação foram diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos com água e ácido. Discutem-se as alterações dos teores de açúcares da membrana que recobre o embrião das sementes.

Palavras-chave: dormência, *Tachigalia multijuga*, semente, carboidrato.

Summary: This work had the aim to study the effects of methods to overcome the dormancy of *Tachigalia multijuga* (Benth) seeds of three selected trees (Cachoeira, Araponga 1 and 2) and its physiologic response. It was compared the effects of the sulfuric acid, of the boiling water and of the it blunts in the embibition percentage, in the percentage and speed of germination, in the activity of alpha galactosidase and beta mananase, in the protein synthesis and in the alteration in the membrane that recovers the embryo. There was no germination in seeds treated with hot water. All the treatments resulted in germination percentage superior ($P<0.05$) to the control, except for the seeds of Cachoeira, where the treatment with sulfuric acid for 10 minutes was the same. On the other hand, the speed of germination of the control was only different ($P<0.05$) from all the treatments in seeds of Araponga 2. The water percentage of the seeds treated with hot water by 60 seconds went the same to those of the control and different ($P<0.05$) from the treated with hot water by 30 minutes and by acid for 20 minutes. The activities of the enzymes and proteins content during the germination were different ($P<0.05$) among the treatments with water and acid. It is discussed the alterations of the membrane sugars content that recovers the embryo seeds.

Key word: dormancy, *Tachigalia multijuga*, seed, carbohydrate.

1. INTRODUÇÃO

A dormência tegumentar caracteriza-se pela dificuldade de absorção de água pelas sementes, o que a impede de iniciar a hidratação e, conseqüentemente, restringe os processos físicos e as reações metabólicas básicas de germinação. As espécies florestais são especialmente ricas em exemplos desse tipo de dormência. Trabalhos realizados por FONSECA (1982) mostraram que a dormência tegumentar sofre influência genética, dentre outras interferências, determinando variações entre locais bem como em uma única árvore.

Os métodos de superação da dormência têm sido investigados por diversos autores, demonstrando a eficiência de um e outro, dependendo da espécie em questão. Assim, SOUZA et al. (1980) mostraram que o desponte na região proximal da radícula em sementes de *Piptadenia obliqua* resultou na porcentagem de germinação significativamente maior que imersão em água quente ou fria e escarificação com ácido sulfúrico. Quanto às sementes de *Pithecellobium parvifolium*, os mesmos autores observaram que o tratamento de desponte na região de emergência da radícula foi o mais eficiente na quebra da dormência. Segundo ainda os mesmos autores, sementes de *Cassia excelsa* com desponte em ambas as extremidades não diferiram entre si na porcentagem de germinação.

O tratamento com ácido sulfúrico tem sido utilizado com sucesso na superação da dormência de *Schizolobium parahybum* (CÂNDIDO et al., 1981), de *Peltophorum dubium* (PEREZ & FANTI, 1995), de *Adenantha parvonina* (ZPEVAC et al., 1995), de *Bowdichia virgilioides* (LOUREIRO et al., 1995) e de *Guazuma ulmifolia* (ARAUJO NETO & AGUIAR, 2000). Observa-se que o sucesso do tratamento está relacionado ao tempo de exposição ao ácido, além, naturalmente, da espécie. O uso de ácido sulfúrico durante 15 ou 20 minutos em sementes de *Leucaena leucocephala* resultou em porcentagem de germinação acima de 90% (TELES et al., 2000).

Tratando sementes de *Dimorphandra mollis* com ácido sulfúrico durante 45-90 minutos HERMANSEN et al. (2000) conseguiram porcentagem de germinação maior do que 90%. Entretanto, tempos superiores a 90 minutos resultaram em decréscimo marcante na viabilidade.

Segundo BOSCAGLI & SETTE (2001), a escarificação ácida de sementes de *Satureja montana* foi inefetiva na promoção da germinação quando aplicada por 60 segundos e torna-se prejudicial se por mais que cinco minutos. O mais alto valor de germinação de sementes de *Cassia fistula* foi obtida por SREERAMA et al. (2000) com tratamento com ácido sulfúrico por 30 minutos, enquanto que para *Delonix regia* o mesmo ocorreu no tempo de 15 minutos e, para *Enterolobium contortisiliquum*, segundo MENEGUELLO et al. (2000), o tratamento por 10 minutos resultou no aumento da porcentagem de germinação, melhora na uniformidade de emergência das mudas e maior comprimento das raízes.

Outro método utilizado na quebra da dormência é a água fervente, que demonstrou seu efeito benéfico em sementes de *Acacia* sp., segundo BROWN & BOOYSEN (1969), que observaram que o tratamento com água em ebulição causou perda da rigidez da camada paliçádica e a sua separação do mesófilo, resultando em rachaduras no tegumento.

Da mesma forma, MARTINS-ORDER, BORGES & JUNIOR (1999) verificaram aumento significativo da porcentagem e velocidade de germinação em sementes de *Acacia mearnsii* submetidas à água quente. Por outro lado, a

água quente não mostrou melhoria significativa da germinação de sementes de *Cassia excelsa* em relação à testemunha (SOUZA et al., 1980). A imersão de sementes de *Leucaena leucocephala* em água na temperatura de 80°C por mais de cinco minutos resultou em porcentagem de germinação acima de 90% (TELES et al., 2000). Por outro lado, o mesmo tratamento em sementes de *Satureja montana* foi danoso à qualidade da semente (BOSCAGLI & SETTE, 2001). Quando sementes de *Pueraria lobata* foram submetidas à água nas temperaturas de cinco e 300 segundos a germinação foi de 30 e 80%, respectivamente (SUSKO et al., 2001).

O presente trabalho teve como objetivo estudar métodos para superação da dormência de sementes de mamoneira (*Tachigalia multijuga*) e as suas conseqüências na germinação, uma vez que não se encontra na literatura qualquer informação a esse respeito.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de mamoneira (*Tachigalia multijuga*, Benth) foram colhidos em três árvores, denominadas Cachoeira e Araponga 1 e 2. Esses foram secadas ao sol e as sementes foram retiradas dos mesmos manualmente. Em seguida foram separadas amostras de 60 sementes de cada uma delas, onde foram feitas medidas do comprimento, da largura e da espessura.

Testes de embebição demonstraram a presença de dormência tegumentar, razão pela qual as sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos: ácido sulfúrico concentrado durante 10 e 20 minutos, despoite na área proximal e na distal em relação ao local de protrusão da radícula e água na temperatura de 90°C por 60 segundos e 30 minutos. Após cada tempo de exposição as sementes foram lavadas em água corrente. No tratamento com água quente manteve-se a fonte de aquecimento ligada durante todo o tempo em que as sementes ficaram submersas. As sementes foram tratadas com solução de captan 0,5% por 60 segundos e, em seguida, colocadas para germinar sobre duas folhas de papel germitest umedecidas com água, em placa de Petri plástica, que foram mantidas em temperatura de 25°C constante e sob luz contínua, proporcionada por seis lâmpadas fluorescentes de 40 Watts, tipo luz do dia, por nove dias. Foram feitas contagens diárias de sementes germinadas, sendo consideradas como tal todas aquelas que apresentaram a protrusão da radícula. A velocidade de germinação

foi calculada pelo índice de velocidade de germinação (IVG), conforme NAKAGAWA (1994). Cada tratamento foi repetido cinco vezes, com 20 sementes por repetição, no delineamento inteiramente casualizado, de um experimento fatorial 3 X 5. As médias dos níveis dos fatores foram testadas pelo teste de Tukey, adotando-se $\alpha = 5\%$, de acordo com o resultado de significância da interação entre os dois fatores.

Foram feitas determinações da umidade nas sementes tratadas com ácido sulfúrico por 20 minutos e água quente por 30 e 60 segundos, além daquelas da testemunha, no nono dia de teste. Utilizou-se o método de estufa a 105°C durante 24 horas. Foram realizadas três repetições de 20 sementes por repetição, no delineamento inteiramente casualizado, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foram determinados o teor de proteína solúvel, as atividades das enzimas alfa-galactosidase e beta-mananase nos tratamentos com água quente e ácido por 20 min para as sementes de Araponga 1, após zero, 48, 96, 144 e 192 h de embebição. Esse experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas para tempo de embebição, com cinco repetições. Foram ajustadas as equações de regressão em função do tempo de embebição, as quais foram testadas pelo teste F e seus coeficientes pelo teste de “t”, aos níveis de 5 e 1% de probabilidade. A diferença entre os dois tratamentos para superação da dormência, em cada período de embebição, foi testada pelo teste Tuckey a 5%. As comparações entre os dois tratamentos (água e ácido) com a testemunha foram realizadas pelo teste de Dunnett a 5%, de acordo com o resultado de significância da interação.

A proteína foi extraída com tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 5,0 e quantificada pelo método BRADFORD (1976). As enzimas foram quantificadas usando-se o mesmo tampão. A atividade de alfa-galactosidase foi medida conforme REZENDE (1998), utilizando-se como substrato p-NPGal, tendo-se a mistura de reação 200 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 µL de de solução de p-NPGal, 2 mM e 50 µL de solução de enzima. A reação foi conduzida por 15 min. em banho maria a 37°C e interrompida pela adição de

1,0 mL de solução de Na_2CO_3 , $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. O extrato enzimático de beta-mananase foi feito pela trituração de 45 embriões em nitrogênio líquido, em cadinho gelado, seguido de liofilização. Foram pesados 100 mg de pó seco e adicionados 1,0 mL de tampão acetato de sódio, 0,1M, pH 5,0 em substituição ao tampão usado por GIORGINI e COMOLI (1996). A atividade foi avaliada utilizando-se 650 μL do tampão de extração, 300 μL de solução de goma guar 1% e 50 μL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 37°C por 30 min, adicionou-se 1,0 mL de reativo de ácido dinitro salicílico (DNS) e feita a leitura em 540 nm, em substituição ao procedimento de GIORGINI e COMOLI (1996), sendo calculado a atividade relativa com base no teor de proteína.

No teste de tetrazólio utilizou-se solução 1% de cloreto de 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio mantendo-se os embriões no escuro, na temperatura constante de 25°C por 120 minutos, sendo, em seguida, lavadas e avaliadas quanto ao padrão de distribuição de coloração, conforme testes preliminares realizados no laboratório.

Extraíram-se os 3,0 mm da membrana que recobre o embrião, a partir da ponta da radícula, digerindo-a com ácido trifluoracético, 2 M. Em seguida a solução foi neutralizada com hidróxido de amônia e preparado o alditol acetato para quantificação de monossacarídeos em cromatógrafo a gás, conforme metodologia descrita por ENGLYST & CUMMINGS (1984), sendo injetados em cromatógrafo a gás, conforme descrito por BORGES et al. (2000). Para estas determinações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, discriminando as médias dos tratamentos em relação à testemunha pelo teste de Dunnett e ajustando-se as equações de regressão para cada tratamento (água e ácido) em função do período de embebição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dimensões das sementes das três matrizes mostraram-se semelhantes, como visto na Figura 1. As sementes possuem maior comprimento que largura e espessura, sendo a última a menor das três dimensões.

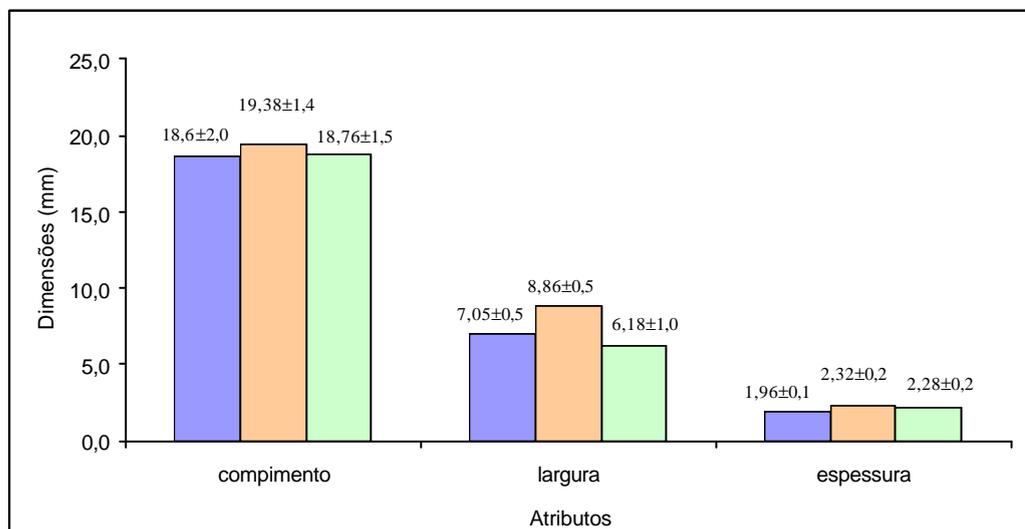


Figura 1 – Dimensões de sementes (médias \pm erro padrão) de *Tachigalia multijuga* de diferentes matrizes. Cachoeira ■, Araçá 1 ■, Araçá 2 ■.

Sementes pré-tratadas com água a 90°C por 60 s e 30 min. não germinaram e, por isto, os tratamentos foram desconsiderados das análises estatísticas.

Verifica-se pelo Quadro 1 que os melhores tratamentos para superar a dormência de sementes da matriz Cachoeira foram o ácido sulfúrico durante 20 minutos e os despontes para as sementes oriundas de Araponga 1 ($P < 0,05$). Quando se usou o ácido por 20 minutos obteve-se a melhor germinação para a matriz Araponga 2, que diferiu ($P < 0,05$) de todos os outros tratamentos. É interessante ressaltar a maior sensibilidade das sementes de Araponga 2 que tiveram a germinação decrescida ($P < 0,05$) quando se utilizou o desponte.

Quadro 1 – Médias das porcentagens de germinação de sementes de *Tachigalia multijuga* provenientes de diferentes matrizes e submetidas a métodos de superação da dormência

Tratamentos	Matrizes		
	Cachoeira	Araponga 1	Araponga 2
Controle	3,0 bA	2,0 cA	3,0 dA
Ácido 10 min	16,0 bB	24,0 bB	40,0 cA
Ácido 20 min	90,0 aA	87,0 aA	80,0 aA
Desponte proximal	83,0 aB	97,0 aA	59,0 bC
Desponte distal	82,0 aA	85,0 aA	40,0 cB

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna e por uma mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Quando se compara a procedência das sementes, observa-se que as sementes de Araponga 2 foram mais sensíveis ao ácido por 10 min e que as sementes de Araponga 1 foram mais sensíveis ao desponte proximal e distal ($P < 0,05$), sendo estes últimos tratamentos também eficientes para a germinação das sementes de Cachoeira. Tais respostas concordam com resultados de HERMANSEN, DURYEA & WHITE (2000) que concluíram que há alto controle genético na capacidade de germinação e moderado controle genético na taxa de germinação em sementes de *Dimorphandra mollis*. Observam também os autores que os diferentes microclimas em que as árvores crescem também têm influência nessa variabilidade.

Nota-se pelo Quadro 2 que, para a matriz Cachoeira, os melhores tratamentos foram ácido por 20 min, despontes proximal e distal ($P < 0,05$). Para Araponga 1, somente o ácido por 20 min e o desponte proximal e, para Araponga 2, somente ácido por 20 min ($P < 0,05$). O uso de água quente nos dois tempos de exposição não resultou em morte das sementes, embora não tenha sido constatada germinação durante o período de observação. Considerando-se os dados obtidos conclui-se que o uso de ácido sulfúrico por 20 minutos é viável.

Quadro 2 – Médias dos índices de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Tachigalia multijuga* provenientes de diferentes matrizes e submetidas a métodos de superação da dormência

Tratamentos	Matrizes		
	Cachoeira	Araponga 1	Araponga 2
Controle	0,08 bA	0,07 cA	0,08 cA
Ácido 10 min	0,44 bB	0,63 cAB	1,09 bA
Ácido 20 min	2,67 aA	2,67 aA	2,18 aA
Desponte proximal	2,05 aB	2,65 aA	1,19 bC
Desponte distal	2,21 aA	1,93 bA	0,98 bB

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna e por uma mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Percebe-se pela Figura 2 que os tratamentos com ácido durante 20 minutos e água quente durante 30 minutos resultaram em graus diferenciados de hidratação pelas sementes ($P < 0,05$), comparativamente aos demais tratamentos. Enquanto as sementes da testemunha e aquelas submetidas a água quente durante 60 segundos não diferiram entre si no teor de água, o fizeram em relação ao ácido durante 20 minutos e água quente durante 30 minutos, que não diferiram entre si. É possível estabelecer que a água quente por 60 segundos não superou a dormência adequadamente, resultando em menor velocidade de germinação, muito embora em tempo mais longo esta se processasse adequadamente. O uso de água quente por tempo mais longo facilita a hidratação de forma semelhante ao ácido. Por outro lado, causa danos ao embrião ou inibe alguma atividade metabólica, necessitando de tempo maior para a devida recuperação. Testes usando o tetrazólio mostraram a presença de poucos embriões mortos quando se

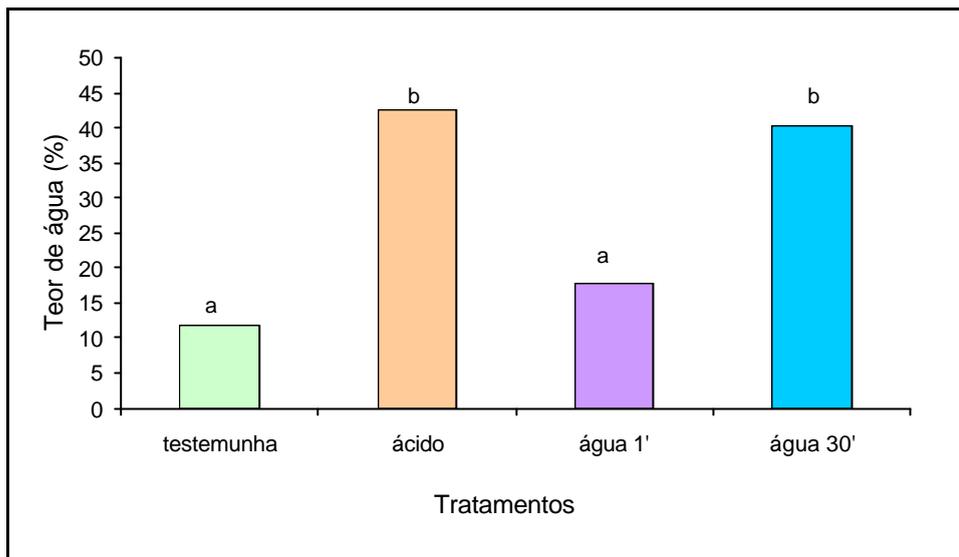


Figura 2 – Médias das porcentagens dos teores de água em sementes de *Tachigalia multijuga* da matriz Araponga 1 sob efeito de ácido sulfúrico por 20 min e água quente por 60 seg e 30 min. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

usou a água quente, o mesmo não ocorrendo naquelas submetidas ao ácido. Trabalho realizado por GUPTA (2001) mostrou que a escarificação com ácido sulfúrico e tratamento com água fervente resultaram em 100% e 96% de germinação em sementes dormentes. Aquelas tratadas com ácido a 25% de concentração tiveram alterações principalmente nas regiões micropilar e hilar, havendo total desintegração do tecido da região micropilar em *Argyrea nervosa* e *Urena lobata*. Em concentrações mais elevadas apareceram também rachaduras na testa, permitindo que o ácido alcançasse o tecido embrionário, matando-o. No tratamento com água a 100°C houve ruptura da testa, próximo do hilo em *U. lobata*.

Os dados da atividade da enzima alfa-galactosidase encontram-se na Figura 3 e no Quadro 3. Observa-se que ela foi constante no tratamento com água quente, sendo inclusive, maior ($P < 0,05$) nas sementes tratadas com ácido em 96 e 192 horas, que, por sua vez, aumentou a atividade até atingir o seu máximo (1,69 micromol ρ -NP.min⁻¹.mL⁻¹) em 81,57 horas e, posteriormente, reduzindo a sua atividade, a qual foi menor ($P < 0,05$) que no tratamento com água em 192 horas.

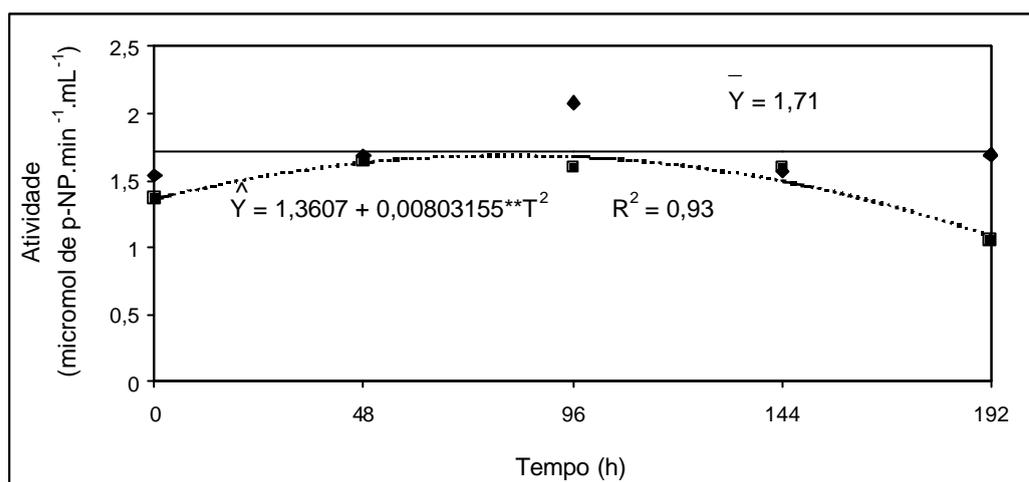


Figura 3 – Estimativas das atividades de alfa galactosidase em eixo embrionário de *Tachigalia multijuga* da matriz Araponga 1 sob efeito de ácido sulfúrico e água quente por diferentes tempos (T) de embebição. Água ◆; ácido ■. ** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Quadro 3 – Médias de atividade de alfa-galactosidase (micromol p-NP.min⁻¹.mL⁻¹) em sementes de *Tachigalia multijuga* sob efeito de ácido sulfúrico e água quente por diferentes tempos de embebição

Tratamento	Tempo (h)				
	0	48	96	144	192
Água quente	1,54 a	1,68 a	2,08 a	1,57 a	1,70 a
Ácido sulfúrico	1,37 a	1,65 a	1,59 b	1,59 a	1,05 b

CV(%) = 13,13

Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tuckey (P>0,05).

Vê-se no Quadro 4 e na Figura 4 que a atividade de beta-mananase nas sementes tratadas com ácido permaneceu constante por até 96 horas, quando, então, não foi detectada sua atividade nos tempos posteriores. Quando se observa a atividade em água, percebe-se que houve um ligeiro decréscimo até às 47 horas, tendo a partir daí, uma elevação de atividade bastante rápida.

Conclui-se que o tratamento com água quente tem interferência na atividade de ambas as enzimas, percebendo-se que a alfa-galactosidase tem sua atividade em fase decrescente quando a beta-mananase tem aumento na sua, indicando uma seqüência de atividade de ambas na degradação de reservas.

Quadro 4 – Médias de atividade de beta-mananase (micromol AR.min⁻¹.mL⁻¹) em sementes de *Tachigalia multijuga* sob efeito de ácido sulfúrico e água quente por diferentes tempos de embebição

Tratamento	Tempo (h)				
	0	48	96	144	192
Água quente	0,16 a	0,15 a	0,21 a	0,20	0,41
Ácido sulfúrico	0,18 a	0,17 a	0,20 a	-	-

CV(%) = 8,93

Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste F (P>0,05).

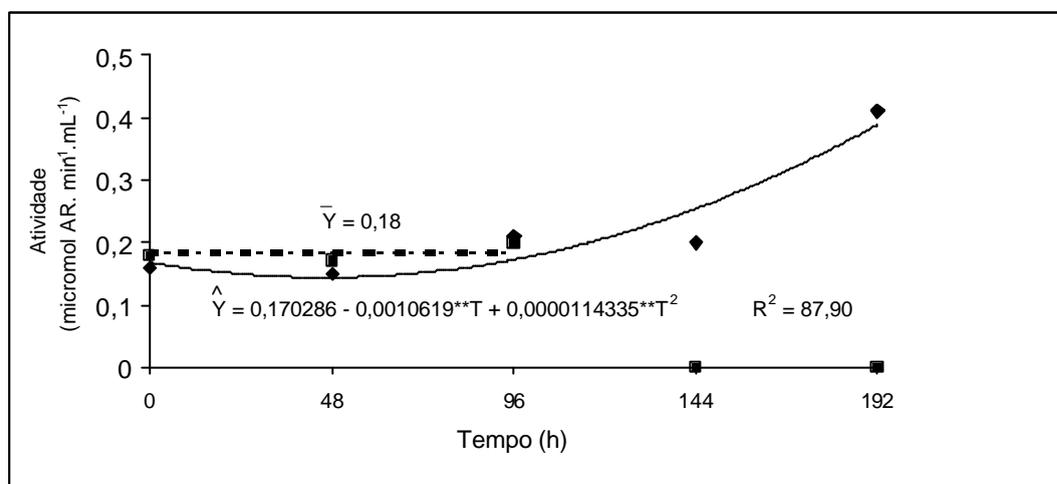


Figura 4 – Estimativas das atividades de β -mananase em eixo embrionário de *Tachigalia multijuga* da matriz Araponga 1 sob efeito de ácido sulfúrico e água quente por diferentes tempos (T) de embebição. Água \blacklozenge ; ácido \blacksquare . Significativo pelo teste t (P<0,01).

Os dados de teores de proteína no eixo embrionário encontram-se na Figura 5 e Quadros 5 e 6. Os aumentos nos teores nas sementes submetidas à água nos tempos de 96 e 144 horas diferiram (P<0,05) dos teores encontrados nas sementes da testemunha, vindo a decrescer em seguida, mas não diferindo da testemunha. Por outro lado, os teores de proteína nas sementes submetidas ao ácido mostraram tendência de queda, com valores diferentes da testemunha (P<0,05), com exceção do tempo de 96 horas. Nota-se pelo Quadro 6 que os teores de proteína diferem (P<0,05) entre sementes submetidas à água quente e ao ácido.

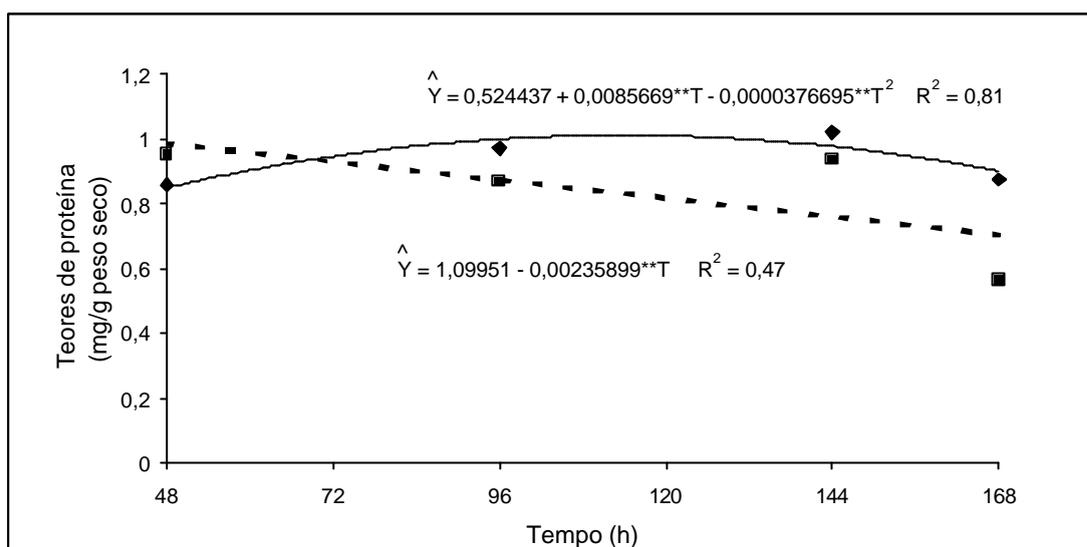


Figura 5 – Estimativas dos teores de proteína em eixo embrionário de sementes de *Tachigalia multijuga* da matriz Araponga 1 sob efeito de ácido sulfúrico por 20 min e água quente por 30 min por diferentes tempos (T) de embebição. Água ◆; ácido ■. ** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Quadro 5 – Médias de teores de proteína em embriões de sementes de *Tachigalia multijuga* relativas às comparações entre os tratamentos com água e ácido sulfúrico e a testemunha durante diferentes tempos de embebição

Tratamentos	Médias
Água	
48 horas	0,86 b
96 horas	0,97 a
144 horas	1,02 a
168 horas	0,88 b
Ácido Sulfúrico	
48 horas	0,95 a
96 horas	0,87 b
144 horas	0,94 a
168 horas	0,56 a
Testemunha	0,86 b
CV(%) = 5,64	

Médias seguidas da mesma letra da testemunha não diferem da mesma pelo teste de Dunnett (P>0,05).

Quadro 6 – Médias de teores de proteína em embriões de sementes de *Tachigalia multijuga* sob efeito de ácido sulfúrico e água quente por diferentes tempos de embebição

Tratamento	Tempo (h)			
	48	96	144	192
Água quente	0,86 b	0,97 a	1,02 a	0,88 a
Ácido 20 min	0,95 a	0,87 b	0,94 b	0,56 b

CV(%) = 5,64

Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

Assim, a síntese de proteínas solúveis pode ser estimulada no tratamento com água quente, pela possível inibição de proteases, enquanto permanece constante ou é consumida no tratamento com ácido.

As médias dos teores de monossacarídeos presentes na membrana são mostradas no Quadro 7. Comparando-se os valores de monossacarídeos percebe-se que há, de modo geral, valores significativamente maiores do que os da testemunha, com exceção dos de xilose e glicose em água quente, em 144 horas de embebição cujos decréscimos alcançam valores semelhantes ao da testemunha e da galactose, onde os valores em ácido foram superiores ($P < 0,05$) ao da testemunha após 24 horas de embebição.

Ao se comparar os valores dos açúcares (Quadros 6 e 7) com os das atividades de alfa-galactosidase e beta-mananase (Figuras 3 e 4) percebe-se que são eventos independentes, pois enquanto valores de alfa-galactosidase em tratamento com água quente são estáveis por 192 horas de embebição, os teores de galactose permanecem superiores ($P < 0,05$) ao da testemunha, mas estáveis e lineares com a atividade da enzima. Por outro lado, se os teores da galactose em tratamento com ácido permanecem superiores ao da testemunha ($P < 0,05$), com exceção do teor no tempo de 24 horas, o aumento seria significativamente linear e contínuo, enquanto a atividade da enzima alcançaria o seu máximo em 81,57 horas, decrescendo em seguida.

Quadro 7 – Médias de teores de monossacarídeos de membrana em semente de *Tachigalia multijuga* nos tratamentos com ácido e água e a testemunha durante diferentes tempos de embebição

Tratamentos	Ram	Ara	Xil	Man	Gal	Gli
(mg/g peso seco)						
Água						
24 horas	6,53a	46,86a	8,59a	569,97a	127,87a	16,12a
72 horas	6,30a	47,61a	7,70a	870,59a	186,81a	16,64a
144 horas	2,76a	25,34a	4,57b	741,90a	148,94a	13,05b
Ácido						
24 horas	6,75a	49,42a	9,39a	428,41a	98,88b	13,09b
72 horas	4,64a	36,34a	6,30a	718,03a	156,59a	13,43b
144 horas	4,10a	35,65a	6,42a	789,34a	172,51a	14,88a
Testemunha	1,52b	20,19b	4,20b	212,14b	100,15b	12,80b
CV(%)	27,88	21,31	18,66	20,72	20,94	16,09

Médias seguidas pela mesma letra na coluna da testemunha não diferem da mesma, pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

Comparando-se os valores da atividade de beta-mananase com os teores de manose nas sementes tratadas com água, percebe-se que a atividade da enzima aumentou significativamente após as 48 horas (Figura 4) e os valores do açúcar têm um comportamento constante em função do tempo (Quadro 8). Em tratamento com ácido vê-se que há estabilidade na atividade da enzima (Figura 4) e aumento linear ($P < 0,01$) no teor de açúcar (Quadro 8), embora esse aumento continue apesar do desaparecimento da enzima do meio.

Depreende-se desses fatos que a atividade das enzimas se faz nos tecidos de reserva dos cotilédones ou embrião e movimentação desses açúcares para o meio exterior, conduzido pela água de hidratação e acumulando na parte interna da membrana, dando a falsa impressão de aumento da área da membrana pela deposição dos açúcares.

A dormência é mais um componente na garantia de sobrevivência das sementes, pois a ativação do embrião se faria concomitante com a hidratação do embrião e tecidos envoltórios, assegurando que houve suficiente água para que a espécie se estabeleça. Entretanto, permanece questionável como o fenômeno ocorre na natureza. TIEU & EGERTON-WARBURTON (2000) observaram

Quadro 8 – Médias e equações de regressão para os monossacarídeos presentes em membrana de sementes *Tachigalia multijuga* após quebra de dormência, em diferentes tempos de embebição (T), para os tratamentos água e ácido

Monossacarídeos	Tratamento	Tempo (horas)			Equações de Regressão	R ² (%)
		24	72	144		
Ramnose	Água	6,53	6,30	2,76	$\hat{Y} = 7,8241 - 0,0328107^{**}T$	88,02
	Ácido	6,75	4,64	4,10	$\hat{Y} = 6,84052 - 0,0209878^{**}T$	81,44
Arabinose	Água	46,86	47,61	25,34	$\hat{Y} = 55,1017 - 0,189574^{**}T$	82,00
	Ácido	49,42	36,34	35,65	$\hat{Y} = 48,9878 - 0,106465^{*}T$	68,64
Xilose	Água	8,59	7,70	4,57	$\hat{Y} = 9,69766 - 0,0343078^{**}T$	96,21
	Ácido	9,39	6,30	6,42	$\hat{Y} = 9,18379 - 0,0226674^{**}T$	61,16
Manose	Água	569,97	870,59	741,90	$\hat{Y} = 727,49$	-
	Ácido	408,41	718,03	789,34	$\hat{Y} = 417,383 + 2,84845^{**}T$	81,01
Galactose	Água	127,87	186,81	148,94	$\hat{Y} = 154,54$	-
	Ácido	98,88	156,59	172,51	$\hat{Y} = 96,054 + 0,582567^{**}T$	82,50
Glicose	Água	16,12	16,64	13,05	$\hat{Y} = 17,4709 - 0,0274944^{**}T$	73,45
	Ácido	13,09	13,43	14,88	$\hat{Y} = 13,80$	-

** Significativo pelo teste t (P<0,01).

* Significativo pelo teste t (P<0,05).

que em espécies como *A. manglesii* e *L. conostephioides* a germinação correlacionou significativamente com a deterioração do tegumento, com aumento da permeabilidade a água, após as sementes serem mantidas enterradas no solo. Estudando o efeito das queimadas no banco de sementes no solo, FERRANDIS, HERRANZ & MARTINEZ (1999) concluíram que outros fatores não associados ao fogo estariam enfraquecendo o tegumento das sementes de *Halimium ocymoides*, *Cistus ladanifer* e *C. salvifolius*. Tais considerações aliadas a de outros autores levaram BASKIN & BASKIN (2000) a procurarem evidências a respeito da atividade de microorganismos na decomposição do tegumento de sementes dormentes que as auxiliassem na germinação quando no banco de sementes. Segundo os autores, há poucas evidências na literatura científica que atestem a ação de microorganismos no solo na redução da dormência tegumentar e nenhum dado confirmando o efeito abrasivo com mesmo resultado, sendo mais suposição dos diversos autores a respeito do que poderia ocorrer.

4. CONCLUSÕES

1. As sementes de mamoneira possuem dormência tegumentar.
2. O tratamento com ácido sulfúrico concentrado no tempo de 20 minutos aumentou significativamente a permeabilidade do tegumento das sementes das três matrizes.
3. O tratamento com água fervente por 30 minutos atrasa a germinação.
4. A atividade de alfa-galactosidase manteve-se estável em tratamentos com água quente e variou a atividade quando em ácido sulfúrico por 20 minutos.
5. A presença de beta-mananase foi detectada somente por 96 horas de embebição em sementes tratadas com ácido e naquelas sementes tratadas com água quente houve aumento na atividade após 48 horas de embebição.
6. Os teores de monossacarídeos na membrana e de proteína variaram significativamente nas sementes tratadas com ácido ou com água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO NETO, J.C.; AGUIAR, I.B. Tratamentos pré-germinativos para superar a dormência de sementes de *Guazuma ulmifolia* Lam. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.58, p.15-24, 2000.
- BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. Evolutionary considerations of claims for physical dormancy-break by microbial action and abrasion by soil particles. **Seed Sci. Research**, Wallingford, v.10, n.4, p.409-413, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Maryland, v.72, p.248-254, 1976.
- BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; BUCKRIDGE, M.S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de jacarandá-da-bahia osmocondicionadas. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal.**, Lavras, v.12, n.1, p.10-16, 2000.
- BOSCAGLI, A.; SETTE, B. Seed germination enhancement in *Satureja Montana* L. ssp. Montana. **Seed Sci. & Technol.**, Zürich, v.29, n.2, p.347-355, 2001.
- BURNS, R.E. Effects of acid scarification on lupine seed impermeability. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.34, p.107-108, 1959
- BROWN, N.A.C.; BOOYSEN, P.V. Seed coat impermeability in several *Acacia* species. **Agroplanta**, Pretoria, v.1, p.51-60. 1969

- CÂNDIDO, J.F.; CONDÉ, A.R.; SILVA, R.F.; MARIA, J.; LÊDO, A.A.M. Estudo da causa da dormência em sementes de guapuruvú (*Schizolobium parahybum* (Vell.) Blacke) e métodos para sua quebra. **Rev. Árvore**, Viçosa, v.5, n.2, p.224-232, 1981
- ENGLYST, E.N.; CUMMINGS, J.H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, Herts, v.19, p.937-942, 1984.
- FERRANDIS, P.; HERRANZ, J.M; MARTINEZ, S.J.J. Effect of fire on hard-coated *cistaceae* seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. **Plant Ecology**, Dordrecht, v.144, n.1, p.103-104, 1999.
- FONSECA, S.M. **Variações fenotípicas e genéticas em bracaatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)**. Piracicaba-SP: ESALQ, 1982. p. Dissertação – (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1982.
- GIORGINI, J.F.; COMOLI, E. Effect of embryo and exogenous GA3 on endospermic endo- β -mannase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, Brasília, v.8, n.1, p.43-49, 1996.
- GUPTA, V. Structural changes in seed coat morphology during dormancy breaking in some medicinal plants. **J. Medic. Aromat. Plant Sci.**, Budakalasz, v.22-23, n.4A-1A, p.672-673, 2001.
- HERMANSEN, L.A.; DURYEA, M.L.; WEST, S.H.; WHITE, T.L.; MALAVASI, M.M. Pretreatments to overcome seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. **Seed Sci. Technol.**, Zürich, v.28, n.3, p.581-595, 2000.
- HERMANSEN, L.A.; DURYEA, M.L.; WHITE, T.L.. Variability in seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. **Seed Sci. Technol.**, Zürich, v.28, n.3, p.567-580, 2000.
- LOUREIRO, M.B. Quebra de dormência de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virglioides*) H.B.K. Leguminosae. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9, Florianópolis-SC, 1995. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.5, n.2, p.91, 1995.
- MARTINS-ORDER, M.P.; BORGES, R.Z.; JUNIOR, N.B.. Fotoperiodismo e quebra de dormência em sementes de Acacia negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.9, n.1, p.71-77, 1999.

- MENEGHELLO, G.E.; MORAES, D.M.; LOPES, N.F.; MORAES, R.C.P. Tratamentos para superar a dormência de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vel.) Morong. **Agropecuária Clima Temperado**, v.3, n.2, p.199-204, 2000.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.49-85.
- PEREZ, S.J.G.; FANTI, S.C. Efeitos do armazenamento, envelhecimento, tratamentos pré-germinativos na germinação e velocidade de germinação de *Peltophorum dubium* (Spring) Taubert (canafistula). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9, Florianópolis-SC, 1995. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.5, n.2, p.91, 1995.
- REZENDE, S.T. **Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertases e α -galactosidase de microorganismos**. Brasília: UnB, 1988. 166p. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, 1988.
- SREERAMA, R.; KRISHNAPPA, N.; REDDY, T.V.; REDDY, M.A.N. Effect of pre-sowing treatments on seed germination of ornamental trees. **Cur. Res.**, Estocolmo, v.29, n.7-8, p.127-128, 2000.
- SOUZA, S.M.; DRUMOND, M.A.; SILVA, H.O. **Estudos de métodos para superar a dormência de sementes de *Piptadenia obliqua* (Pers), *Pithecellobium parvifolium* (Willd.) Benth e *Cassia excelsa* S.Chard**. Boletim de Pesquisa nº 2, set. 1980, p.1-14, Pesquisa Florestal no nordeste semi-árido: sementes e mudas.
- SUSCO, D.J.; MUELLER, J.P.; SPEARS, J.F. An evaluation of methods for breaking seed dormancy in kudzu (*Pueraria lobata*). **Can. J. Botany**, Ottawa, v.79, n.2, p.197-203, 2001
- TELES, M.M.; ALVES, A.A.; J. C. G. OLIVEIRA, J.C.G.; BEZERRA, A.M.E. Métodos para quebra da dormência em sementes de leucena (*Leucaena leucephala* (Lam.) de Wit). **Rev. Bras. Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.2, p.387-391, 2000.
- TIEU, A.L.; EGERTON-WARBURTON, M. Contrasting seed morphology dynamics in relation to the alleviation of dormancy with soil storage. **Can. J. Botany**, Ottawa, v.78, n.9, p.1187-1198, 2000
- ZPEVAK, F.A.; PAGOTTO, T.C.S.; PEREZ, S.C.G.A. Quebra de dormência em sementes de *Adenanthera pavonina* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9, Florianópolis-SC, 1995. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.5, n.2, p.202, 1995.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE EM EMBRIÃO E COTILÉDONES DE SEMENTES DE *Platymiscium pubescens* (TAMBORIL-DA-MATA)

Resumo: Sementes de *Platymiscium pubescens* foram colocadas para embeber em água, sendo retiradas amostras para as caracterizações bioquímica e cinética da enzima alfa-galactosidase do eixo embrionário e dos cotilédones. A atividade específica no eixo embrionário aumenta de zero até o tempo de 96 horas de embebição, estabilizando em seguida. A atividade da enzima dos cotilédones mostrou pequeno incremento durante esse mesmo tempo. A alfa-galactosidase do eixo embrionário apresentou atividade máxima no intervalo de pH de 4,5 a 6,0. Por outro lado, para a enzima proveniente dos cotilédones, a maior atividade foi detectada na faixa de 4,0 a 6,0. A temperatura de 55°C foi a que mais estimulou as atividades da alfa-galactosidase do eixo embrionário e dos cotilédones. A enzimas do eixo embrionário e dos cotilédones mostraram-se termotolerantes, não se alcançando a meia vida na temperatura de 40°C, no período de 1.500 minutos. A atividade da alfa-galactosidase do eixo embrionário foi inibida por melibiose, CuSO₄ e SDS, enquanto a dos cotilédones foi por todos os efetores, SDS, CuSO₄ e galactose tiveram efeito neutro na atividade de alfa-galactosidase dos cotilédones. Os valores de K_M para as alfa-galactosidases do embrião e para o cotilédone foram 3,37 e 0,26 mM, respectivamente.

Palavras-chaves: alfa-galactosidase, sementes, *Platymiscium pubescens*.

Summary: *Platymiscium pubescens* seeds were placed to soak in water, being sampled for biochemistry and kinetic characterizations of embryonic axis and of the cotyledons enzyme of alfa-galactosidase. The specific activity in the embryonic axis increases of zero to 96 hours of imbibition, stabilizing soon after. The activity of the enzyme cotyledons showed small increment for that same time. The alfa-galactosidase of the embryonic axis presented its maximum activity in the interval of pH 4.5 to 6.0. On the other hand, for the enzyme of the cotyledons, the biggest activity was detected in the interval of 4.0 to 6.0. The temperature of 55°C stimulated more the activities of the alfa-galactosidase of the embryonic axis and of the cotyledons. Enzymes of the embryonic axis and of the cotyledons were termotolerants, not reaching the half life at 40°C, in 1.500 minutes. The embryonic axis alfa-galactosidase activity was inhibited by melibiose, CuSO₄ and SDS, while that of cotyledons was for all the effectors SDS, CuSO₄ and galactose had neutral effect. The values of K_M for the embryo and for the cotyledon alfa-galactosidases were 3.37 and 0.26 mM, respectively.

Key words: alfa-galactosidase, seeds, *Platymiscium pubescens*

1. INTRODUÇÃO

A mobilização de reservas em sementes é importante passo na disponibilização de substrato para manutenção do crescimento de plântulas. Segundo Dey, citado por REZENDE (1998), a rafinose é armazenada nos órgãos de reserva, sendo usada como precursora para síntese de outros oligossacarídeos ou ser hidrolisado por alfa-galactosidases.

CAMACHO et al. (1992) observaram a redução de oligossacarídeos em sementes germinadas de várias espécies, redução esta explicada pelo aumento na atividade de alfa-galactosidase.

Segundo FEURTADO et al. (2001), esta enzima está presente no endosperma e no embrião de sementes de *Lycopersicon esculentum* durante e após a germinação e em sementes secas e mantêm a atividade mesmo naquelas sementes cuja germinação foi bloqueada. A alfa-galactosidase está presente em sementes germinadas de *Tachigalia multijuga* (FIALHO et al., 2002), em sementes de *Platymiscium pubescens* (OLIVEIRA et al., 2002), em bactéria *Cladosporium cladosporoides* onde promove a liberação de galactose dos oligossacarídeos da família rafinose (CRUZ et al., 1981), no caule de *Colocasia esculenta* (CHEN & LIN-CHU, 1991) e em raiz de *Verbascum thapsus* (BOM et al., 1998).

Segundo OLIVEIRA et al. (2002) a enzima se apresenta em três isoformas, em sementes de *Platymiscium pubescens* enquanto FEURTADO et al. (2001) encontraram três isoformas em sementes de *Lycopersicon esculentum*. FIALHO et al. (2002a) investigando a presença de alfa-galactosidase em sementes de diversas leguminosas concluíram que a atividade da enzima em *Platymiscium pubescens* foi de 0,93 U/mL e 0,73 U/mL em extrato de *Tachigalia multijuga*.

Segundo BORGES et al. (2002) embriões de sementes de *Platymiscium pubescens* apresentaram diferenças significativas na atividade de alfa-galactosidase em 120 horas de embebição, muito embora não se observassem alterações significativas no teor de galactose nas frações pécticas e hemicelulósicas da parede celular no mesmo período. Dessa forma, a atividade dessa enzima nessas sementes estaria ligada à degradação de reservas de estaquiose, cuja concentração decresceu a partir de 96 horas, e rafinose, cuja presença não foi detectada em 120 horas de embebição.

A utilização da enzima como catalisadora em processos industriais como na hidrólise enzimática da hemicelulose na indústria de papel (ZEILINGER et al., 1993) ou para melhorar a qualidade gélica de polissacarídeos (BULPIN et al., 1990) torna-a útil na indústria em níveis econômicos.

Tendo em vista que os conhecimentos da presença e da atividade da alfa-galactosidase são bastante conhecidos em sementes da espécie em estudo, o objetivo da presente investigação foi de aprofundar a pesquisa a respeito da enzima em compartimentos das sementes de *Platymiscium pubescens*, tendo em vista a importância da mobilização de carboidratos durante a germinação de sementes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Sementes de *Platymiscium pubescens* foram colocadas sobre duas folhas de papel Germitest embebidas com água, colocadas em placa de Petri, em temperatura de 30°C, no escuro, pelo período de 120 horas. Diariamente foram retiradas amostras, quando as sementes foram dissecadas em cotilédones e eixo embrionário. Determinaram-se os teores de água e de proteína e quantificou-se a atividade da enzima alfa-galactosidase de ambos compartimentos da semente. A extração e quantificação da atividade da enzima foram feitas segundo metodologia descrita por VIANA (2002a). Para tanto, foram tomados 10 embriões ou cinco cotilédones e macerados separadamente em gral de porcelana com 1,0 e 2,0 mL, respectivamente, de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e centrifugadas a 24.000 x g por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi usado para quantificação da atividade da enzima e para determinação do teor de proteína.

Foi utilizado o substrato para-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ -NPGal) como substrato na avaliação da atividade da alfa-galactosidase. A mistura de reação constou de 750 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μ L de solução 2 mM de ρ -NPGal e 10 μ L do extrato enzimático. Os tubos contendo

a solução foram mantidos em banho maria a 37°C por 15 min, sendo interrompida a reação pela adição de 1,0 mL de solução de 0,5 M de Na₂CO₃. Os valores de absorbância medidos no comprimento de onda de 410 nm foram transformados em μ moles de p -nitrofenolato (p -NP), utilizando uma curva padrão construída com 0-0,20 μ moles de p -NP. A unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de proteína necessária para produzir um μ mol de p -NP por minuto nas condições do ensaio.

Para a determinação do pH ótimo da enzima foram conduzidas reações em solução tampão com pHs variando de 4,0 a 8,0 utilizando-se tampões (citrato/fosfato) McIlvaine (McILVAINE, 1921), mantendo-se as mesmas condições de ensaio descritas anteriormente.

Os ensaios de temperatura foram feitos em 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C, utilizando-se tampão McIlvaine pH 5,0.

A termoestabilidade foi testada pela pré-incubação da mistura enzima + tampão por vários tempos na temperatura de 50°C, no pH 5,0. Após a pré-incubação o substrato foi adicionado e o ensaio foi conduzido como já descrito.

Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcares foram avaliados utilizando-se 200 μ L de soluções 10 mM de MgCl₂, CaCl₂, KCl, CuSO₄, NaCl, sódio dodecil sulfato (SDS), β -mercaptoetanol, lactose, D-galactose, D-glicose, sacarose, rafinose, melibiose, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e iodoacetamida. A mistura contendo tampão, enzima e efetor foi pré-incubada por 15 min., a 40°C e, em seguida, foram acrescentados 250 μ L de solução de 2 mM de p -NPGal, sendo conduzido o restante do ensaio da mesma maneira já descrita. O ensaio controle utiliza apenas o substrato p -NPGal sem adição de nenhum efetor.

Os ensaios para determinação de K_M e V_{max} aparentes foram realizados com utilização de diferentes concentrações de p -NPGal. As concentrações usadas foram 0,032, 0,064, 0,118, 0,192, 0,32, 0,64, 0,8, 1,28 e 1,6 mM. Os valores de K_M e V_{max} aparentes foram calculados por meio da curva de velocidade e pela equação do duplo recíproco LINEWEAVER & BURKE, 1934). Foi utilizado o programa Curve Expert, versão 1.3 para Windows (HYAMS, 1997).

A extração de proteínas solúveis foi realizada pelo método descrito por ALFENAS et al. (1991), a qual consistiu em moer os embriões em tampão fosfato de sódio, 0,05M e pH 7,0. A quantificação foi feita conforme descrito por BRADFORD (1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se na Figura 1 a atividade da enzima alfa-galactosidase durante o período de 120 horas de embebição. Há um nítido aumento da atividade no embrião durante todo o tempo de observação, mas em especial a partir de 48 horas, quando há aceleração da atividade, estabilizando-se a partir de 96 horas. BORGES et al. (2001) observaram, em sementes dessa mesma espécie, quando submetidas a estresse hídrico, que a atividade se manifesta mais claramente em 120 horas de embebição, estando o fator, aparentemente, ligado ao nível de embebição, uma vez que no segundo caso a hidratação é mais lenta. Por outro lado, observa-se aumento lento da atividade nos cotilédones durante esse tempo, o que permite concluir que a mobilização de reservas ligadas a galactomanano ocorre primeiro no embrião, gerando substrato para a respiração e formação de estruturas de carbono para o crescimento do embrião.

Os dados relativos à atividade da enzima em relação à variação do pH encontram-se na Figura 2. Percebe-se que as atividades das enzimas do embrião e do cotilédone são maiores na faixa de pH entre 4,5 e 6,0, muito embora as diferenças nas atividades em função do pH para a alfa-galactosidase do embrião sejam mais acentuadas. Trabalhando com sementes de soja, VIANA (2002b) obteve valor máximo de atividade no pH 6,0, muito embora os valores nos pHs 5,0 a 6,0 fossem bastante próximos. GUIMARÃES (2001) trabalhando com

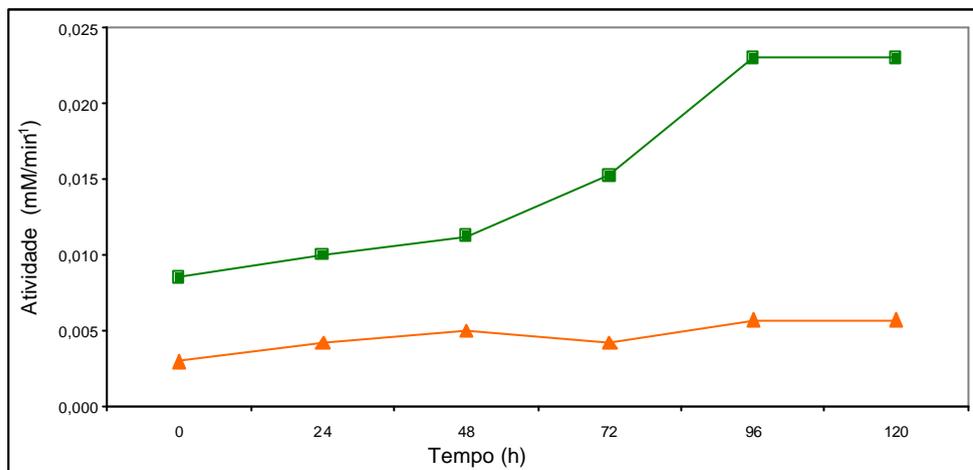


Figura 1 – Atividades das alfa-galactosidases do embrião e dos cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* durante o período de embebição. Embrião: ■, cotilédones: ▲.

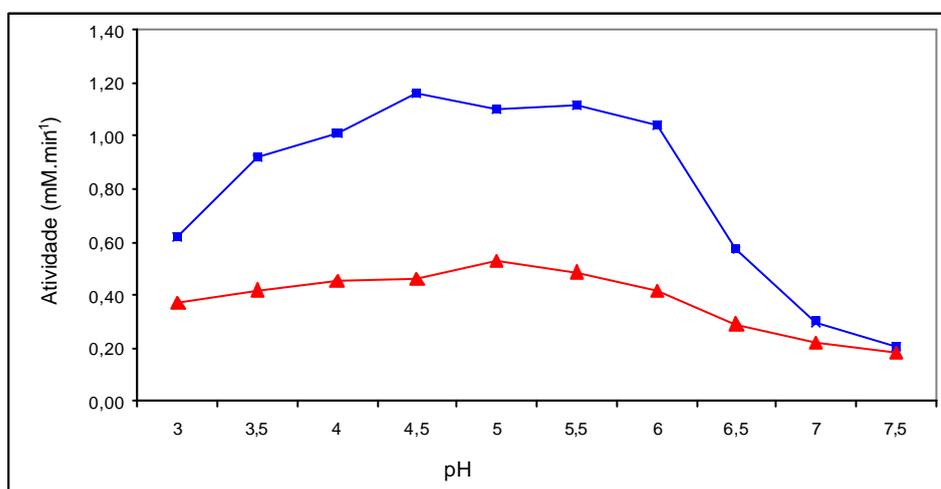


Figura 2 – Atividades das alfa-galactosidase do embrião e dos cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* em diferentes pHs. Embrião: ■, cotilédones: ▲.

sementes de soja identificaram a faixa de pH entre 5,0-5,5 como adequada. DEY (1981) encontrou valores ótimos de atividade de α -galactosidase em sementes de *Castanea sativa* em pHs 4,5 em uma fração e 6,0 em outra.

Observa-se na Figura 3 que as atividades das alfa-galactosidasas do embrião e dos cotilédones aumentam com o aumento nos valores de temperatura. Enquanto a temperatura ótima para a alfa-galactosidase do embrião se situa em 55°C, a do cotilédone está na faixa 50-55°C. Em ambos compartimentos, a atividade decresce na temperatura de 60°C. GUIMARÃES (2001) e VIANA (2002) obtiveram maiores atividades nas faixas 45-50°C e 40-55°C respectivamente, para sementes de soja, variedades Doko e CAC-1.

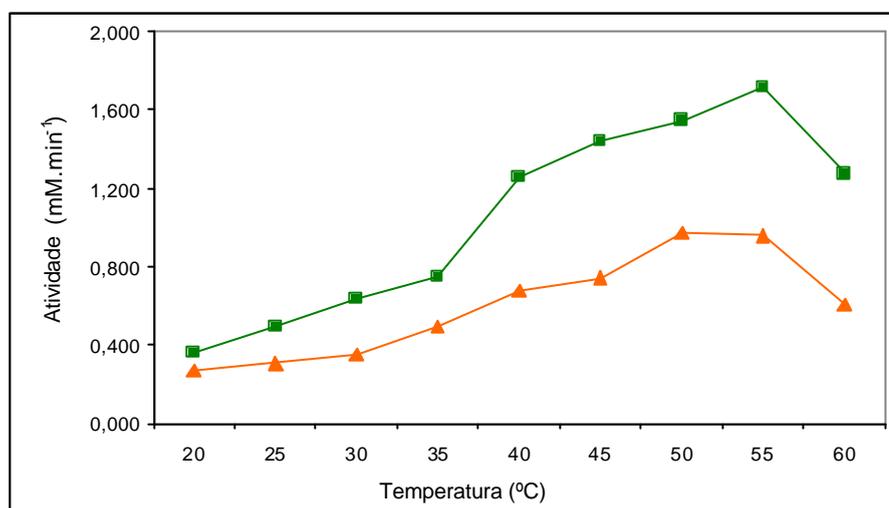


Figura 3 – Atividade das alfa-galactosidasas do embrião e dos cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* em diferentes temperaturas. Embrião: ■, cotilédones: ▲.

Os resultados dos ensaios para determinar a meia vida das enzimas do embrião e do cotilédone a 40°C (Figuras 4 e 5) foram ajustadas de acordo com a expressão não linear da variação da velocidade em função do tempo de pré-incubação. Não foi possível atingir a metade da atividade original mesmo após o tempo de 1.500 min de pré-incubação, o que mostra que a enzima apresentou alta termoestabilidade. Ensaio realizado por VIANA (2002) com sementes de soja, na mesma temperatura, não foi possível identificar a metade da atividade da

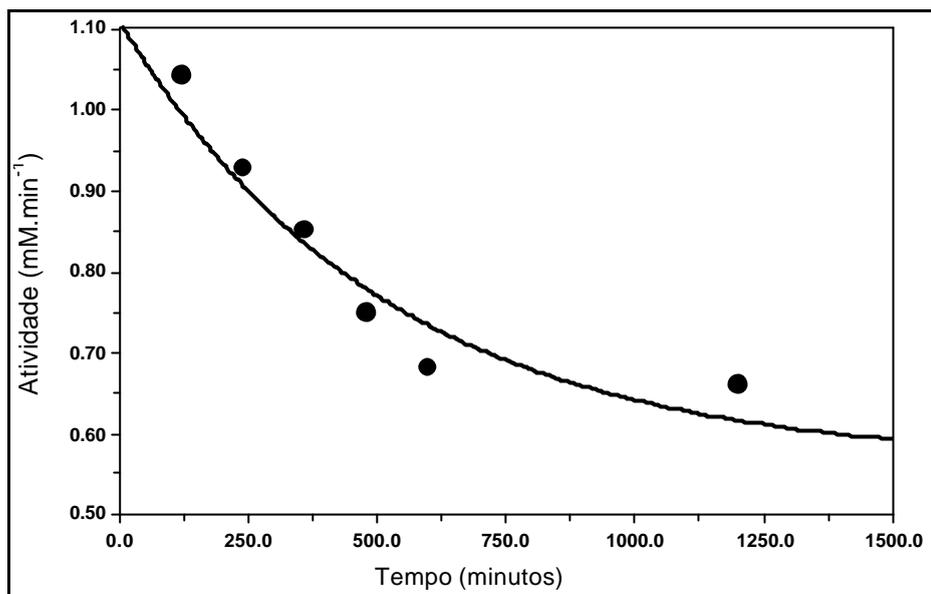


Figura 4 – Estabilidade térmica de alfa-galactosidase de embriões de sementes de *Platymiscium pubescens* a 40°C.

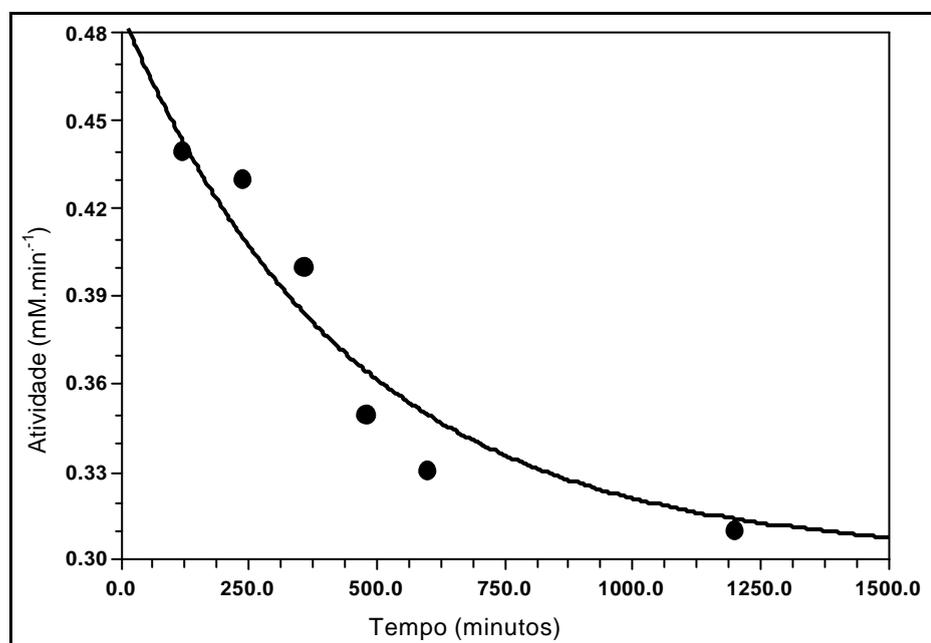


Figura 5 – Estabilidade térmica de alfa-galactosidase de cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* em temperatura de 40°C.

mesma enzima no tempo de 780 minutos. Por outro lado, GUIMARÃES (2001) determinou a meia vida da mesma enzima, em sementes de soja DOKO, na temperatura de 30°C, em 253,95 min e 1.199 min para duas formas distintas da alfa-galactosidase.

Tem-se nas Figuras 6 e 7 as atividades relativas das enzimas provenientes do embrião e dos cotilédones, respectivamente, na presença de diversos íons, açúcares, detergentes, agentes redutores e outros. Verifica-se que os sais de cloretos de magnésio, de potássio, de cálcio e de sódio, sacarose, glicose, beta mercaptoetanol, iodoacetamida, EDTA, lactose, maltose e rafinose, estimularam a atividade da enzima proveniente do embrião.

A galactose teve efeito neutro, uma vez que a sua atividade foi semelhante àquela observada quando o ensaio continha apenas o p -NPGal. Observou-se efeito inibitório da melibiose, sulfato de cobre e do SDS, com efeito mais ativo nessa seqüência. Por outro lado, percebe-se que o comportamento foi modificado quando se trabalhou com extratos do cotilédone, onde galactose, sulfato de cobre e SDS tiveram efeito neutro. O cloreto de cálcio teve efeito inibitório e situou-se em posição intermediária em relação ao outro grupo, cujo efeito inibitório foi maior, constituído de sacarose, cloreto de magnésio, glicose, cloreto de sódio, lactose, mercaptoetanol, maltose e rafinose. Finalmente, o último grupo foi constituído por cloreto de potássio, melibiose, EDTA e iodoacetameida, que apresentou efeito inibitório maior do que os demais. Percebe-se, assim, que há diferença entre a enzima proveniente do embrião e dos cotilédones.

Trabalho realizado por OLIVEIRA (2002) mostrou que o sulfato de cobre foi o agente que promoveu maior inibição da alfa-galactosidase de sementes de *Platymiscium pubescens*, seguido do SDS. O iodoacetamida e o beta-mercaptoetanol tiveram efeito estimulante, semelhante ao obtido com extratos de embrião, mas diferindo dos resultados obtidos com os do cotilédone. O sulfato de cobre provocou efeito distinto para as enzimas estudadas, pois enquanto para o embrião houve efeito inibitório, para os cotilédones não houve maiores alterações.

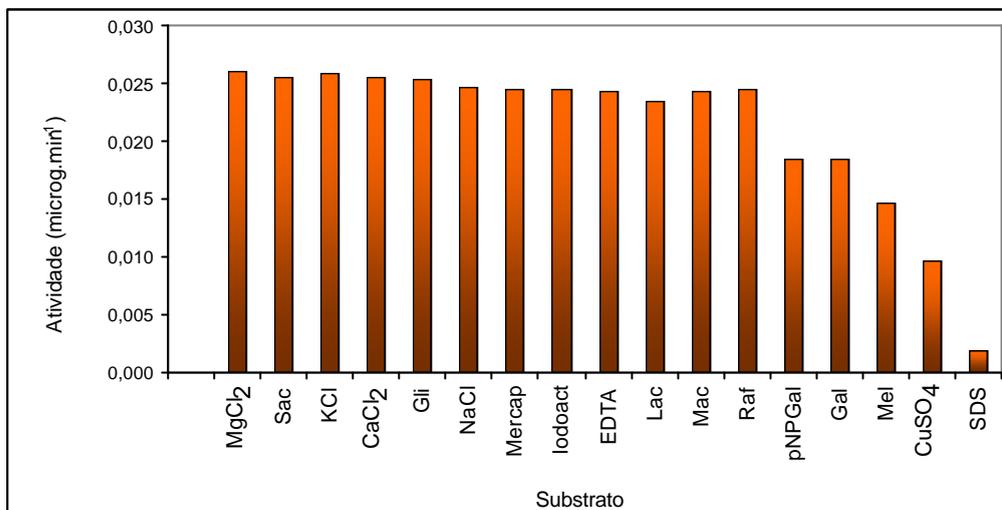


Figura 6 – Atividade específica de alfa-galactosidase de embriões de sementes de *Platymiscium pubescens* em relação a íons, agentes redutores e açúcares.

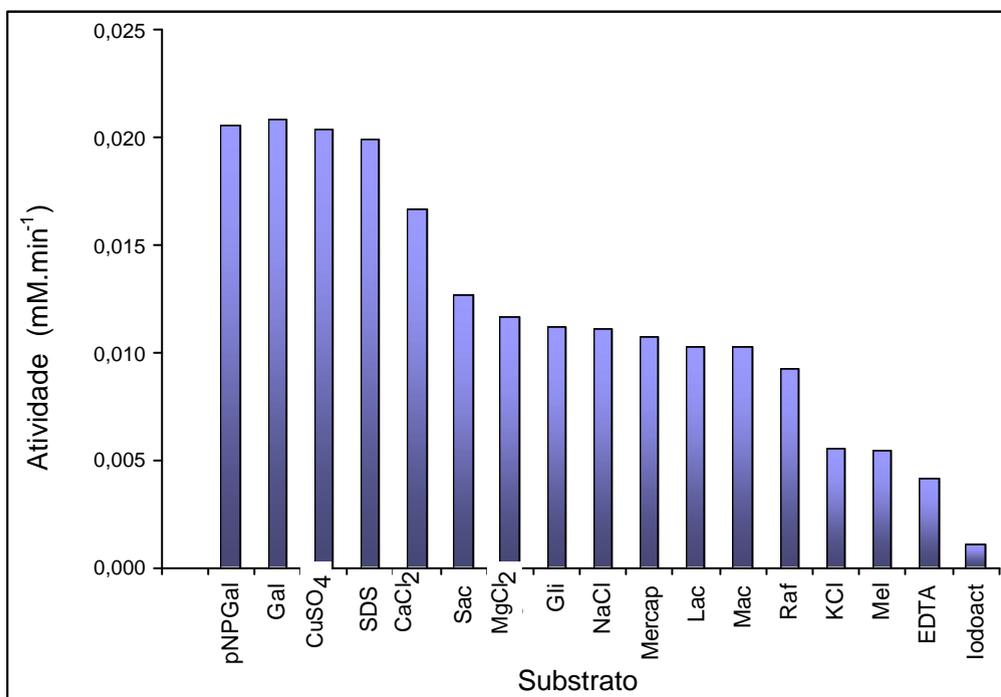


Figura 7 – Atividade específica de alfa-galactosidase de cotilédone de sementes de *Platymiscium pubescens* em relação a íons, agentes redutores e açúcares.

Os efeitos das concentrações do substrato p -NPGal na velocidade de hidrólise do mesmo pelos extratos de alfa-galactosidase de embrião e de cotilédones foram determinados conforme mostrado nas Figuras 8, 9, 10 e 11, respectivamente.

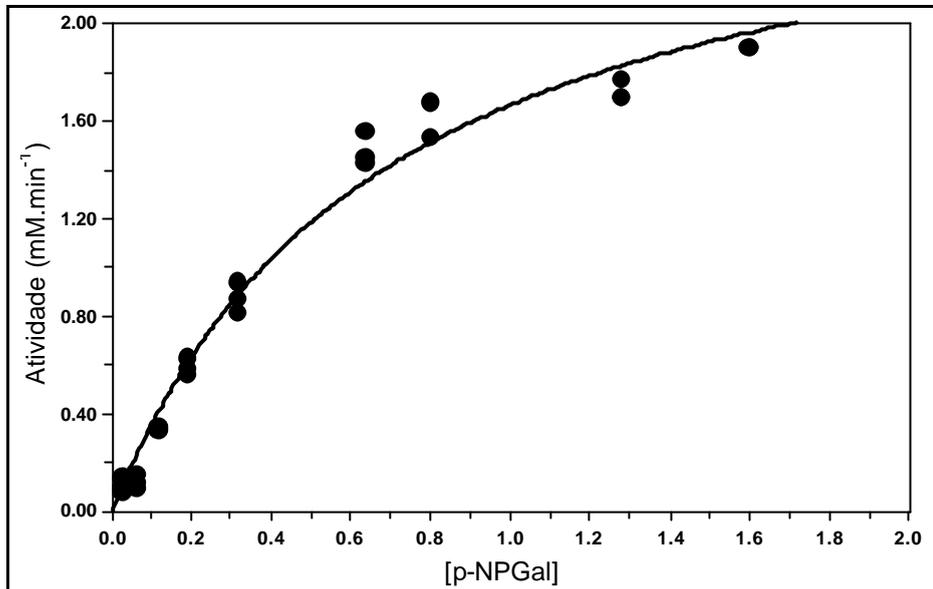


Figura 8 – Gráfico de Michaelis-Menten para hidrólise de p -NPGal pela alfa-galactosidase em embrião de sementes de *Platymiscium pubescens*. Os valores de K_M e V_{max} aparentes obtidos foram $0,26\text{mM}$ e $1,0\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$ respectivamente.

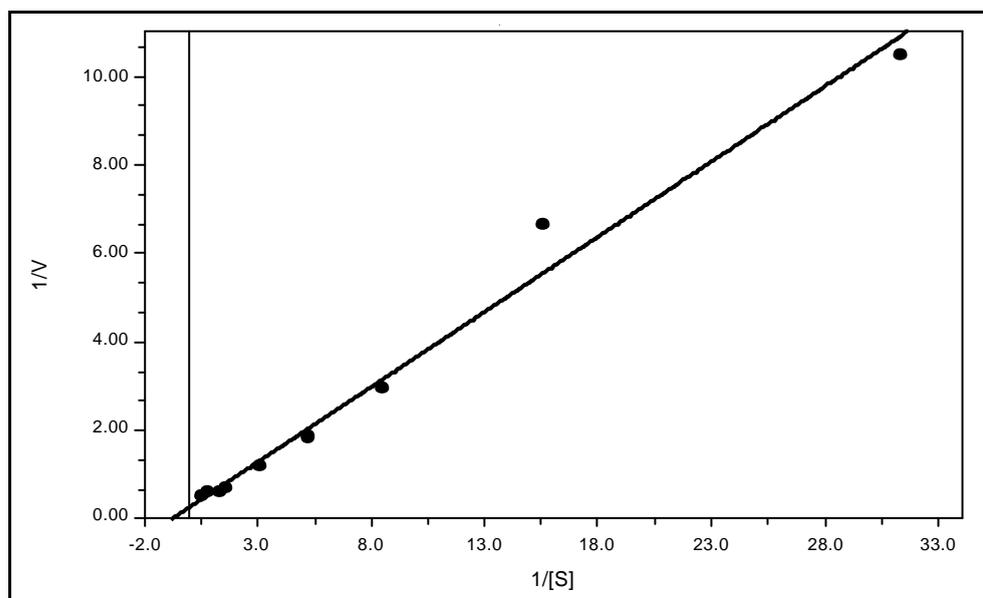


Figura 9 – Gráfico duplo recíproco de alfa-galactosidase em embrião de sementes de *Platymiscium pubescens*.

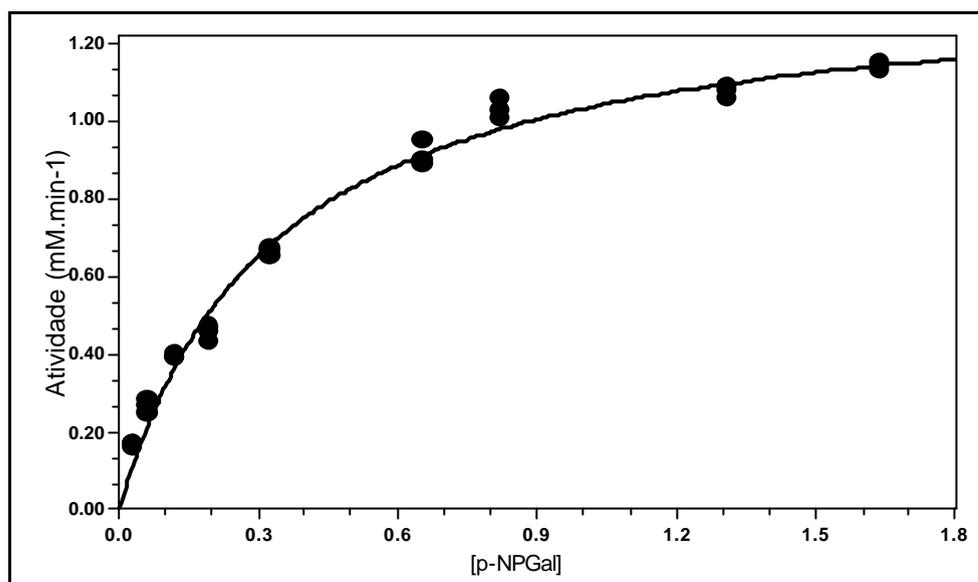


Figura 10 – Gráfico de Michaelis-Menten para hidrólise de p-NPGal pela alfa-galactosidase de cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens*. Os valores de K_M e V_{max} aparentes obtidos foram 3,37mM e 1,28 mM.min⁻¹, respectivamente.

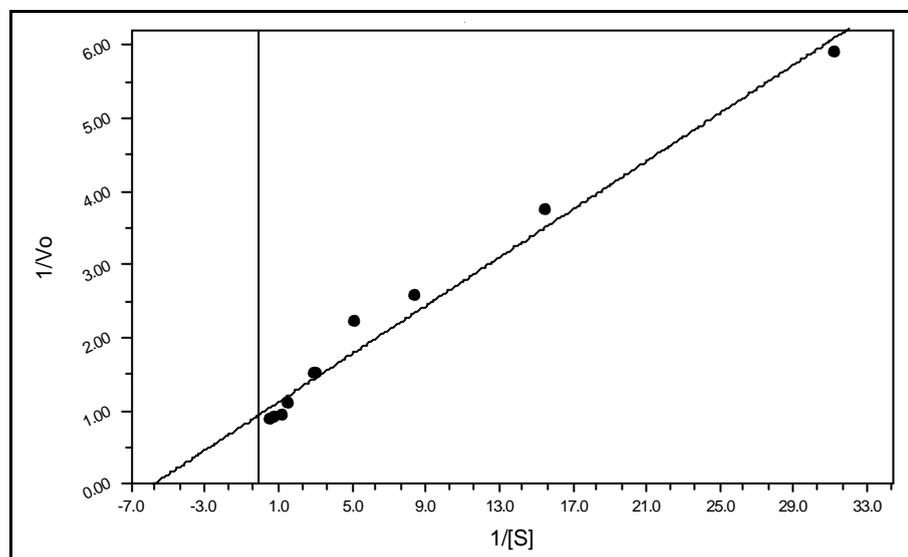


Figura 11 – Gráfico duplo recíproco de alfa-galactosidase em cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens*.

Os valores de K_M para o embrião e para o cotilédone foram 3,37 e 0,26 mM, respectivamente, mostrando que as enzimas nos dois compartimentos das sementes são, provavelmente, enzimas distintas. Os valores encontrados para alfa-galactosidases foram 0,99 mM em sementes de *Pterogine nitens* (REIS, 2003), 0,30 Mm em sementes de *Glycine max* vr. CAC-1 (VIANA, 2002) e 1,57 mM para sementes de *Tachigalia multijuga* (FIALHO et al., 2002b). OLIVEIRA (2002) obteve valores de 0,48 mM e 0,65 Mm nas duas formas de alfa-galactosidase encontradas na purificação de extratos de sementes de *Platymiscium pubescens*.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que:

1. A alfa-galactosidase está presente em sementes secas e aumentam a atividade no embrião durante a embebição.

2. A atividade máxima da alfa-galactosidase foi a 55 °C no eixo embrionário e cotilédones.

3. A atividade da enzima foi maior na faixa de pH de 4,5 a 6,0.

4. A estabilidade térmica da alfa-galactosidase a 40 °C está além de 1.500 min.

5. As alfa-galactosidases do embrião e dos cotilédones têm sensibilidades diferentes a presença de açúcares, íons e agentes redutores.

6. As alfa-galactosidases do embrião e dos cotilédones são diferentes na afinidade em relação ao ρ -NPGal, pois os valores de K_M calculados para esse substrato foram diferentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- BOM, I., WASSENAAR, D.; BOOT, J. Hybrid affinity chromatography of α -galactosidase from *Verbascum thapsus* L. **J. Chromat.**, Oxford, v.808, n.1., p.133-139, 1998.
- BORGES, E.E.L.; PEREZ, S.C.G.A.; BORGES, R.C.G. & REZENDE, S.T. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* (tamboril-da-mata). **Rev. Árvore**, Viçosa, v.26, n.5, p.603-613, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Maryland, v.72, p.248-254, 1976.
- BULPIN, P.V.; GIDLEY, M.J.; JEFFLOAT, R.; UNDERWOOD, D.R. Development of a biotechnological process for the modification of galactomanann polymers with plant α -galactosidase. **Carbon Polymers**, v.12, p.155-168, 1990.
- CAMACHO, L.; SIERRA, C.; CAMPOS, R.; GUZMÁN, E. & MARCUS, E. Nutritional changes caused by germination of staple chilean legumes. **Arch. Latiam. Nut.**, Caracas, v.42, n.3, p.283-290, 1992.
- CHEN, S.H.; LIN-CHU, M. The conversion of group B red blood cells into group B by an alpha-galactosidase from taro (*Colocasia esculenta*). **Carbohidr. Res.**, Oxford, v.217, p.191-200, 1991.

- CRUZ, R.; BATISTELA, J.C.; WOSLACKI, G. Microbial α -galactosidase for soy milk processing. **J. Food Sci.**, Chicago, v.46, n.4, p.1126-1200, 1981.
- DEY, P.M. α -galactosidase from sweet chestnut seeds. **Phytochem.**, Oxford, v.20, p.1493-1496, 1981.
- FEURTADO, J.A.; BANIK, M.; BEWLEY, J.D. The cloning and characterization of alpha-galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.52, n.359, p.1239-1249, 2001.
- FIALHO, L.S.; BORGES, E.E.L.; GUIMARÃES, V.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; MOREIRA, M.A.; REZENDE, S.T. Prospecção e estudo de α -galactosidase em sementes de leguminosas. In: XI SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. A CIÊNCIA: UM PROJETO PARA O BRASIL. 26 a 28 de fevereiro de 2002. UFV, Viçosa, MG, p.250, 2002a.
- FIALHO, L.S.; GUIMARÃES, V.M.; BORGES, E.E.L.; JOSE, I.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; REZENDE, S.T. Partial purification and characterization of α -galactosidase from *Tachigalia multijuga* seeds. In: XXXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR. 18 a 21 de maio 2002b Caxambu, MG, p.124. 2002b.
- 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 oligossacharides. **Phytochem.**, Oxford, v.58, p.67-73, 2001.
- HYAMS, D. **Curve expert 1.3: a comprehensive curve fitting system for Windows.** Copyright^(C). 1997.
- LINEWEAVER, H.; BURKE, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v.56, p.658-666, 1934.
- McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparasons. **J. Biol. Chem.** v.49, p.185-186, 1921.
- OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, V.M.; BORGES, E.E.L.; OLIVEIRA, M.G.A.; REZENDE, S.T. Purification and characterization of α -galactosidases from germinating seeds of *Platymiscium pubescens*. In: XXXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR. Caxambu, MG, 18 a 21 de maio 2002, p.124. 2002.

- REIS, M.R. Produção de α -galactosidases para uso na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em produtos de soja. Relatório de pesquisa. Viçosa: PIBIC/FAPEMIG, UFV, MG, 2003. 29p.
- VIANA, S.F. **Caracterização de α -galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose.** Viçosa, MG: 2002. 65p. Tese(M.S.) – UFV, 2002.
- VIANA, S.F.; GUIMARÃES, V.M.; MOREIRA, M.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; de REZENDE, S.T. Reduction of raffinose oligosaccharides in soymilk by α -galactosidase from germinating soymilk seeds. In: XXXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR. Caxambu, MG, 18 a 21 de maio 2002, p.95. 2002b.
- ZEILINGER, S.; KRISTUFEK, D.; ARISSAN-ATAC, I.; RODITS, R.; KUBICEK, C.P. Condition of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUTC-30. **App. Environ. Microb.** Washington, v.59, n.5, p.1347-1353, 1993.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE E SUA RELAÇÃO COM A GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Caesalpinia peltophoroides* (SIBIPIRUNA)

Resumo: Sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (sibipiruna) foram colocadas para embeber por 144 horas, sendo retiradas amostras para análise de proteína, quantificações da atividade de alfa-galactosidase e de açúcares que compõem a micrópila. A germinação iniciou-se com 96 horas de embebição, sem que houvesse modificações na parede celular da micrópila. Nesta, observou-se maior proporção de arabinose que mostrou tendência de aumento com o decorrer da embebição. A atividade específica da alfa-galactosidase foi detectada em sementes secas, tanto no eixo embrionário, quanto nos cotilédones, aumentando no primeiro a partir de 24 horas de embebição. O aumento da atividade nos cotilédones foi mais lento, sendo mais acentuado a partir de 120 horas de embebição. O teor de proteína decresceu continuamente no eixo embrionário a partir de 24 horas de embebição, enquanto se manteve estável nos cotilédones. A atividade da alfa-galactosidase foi máxima nas temperaturas de 55°C e 50°C para o eixo embrionário e para os cotilédones, respectivamente. O pH que mais estimulou a atividade da enzima foi na faixa de 5,5 a 6,0 para o eixo embrionário e na de 4,5 a 5,0 para os cotilédones. As alfa-galactosidase do eixo embrionário e dos cotilédones foram inibidas por SDS, CuSO₄, galactose e melibiose. Não houve efeito estimulante sobre a atividade da alfa-galactosidase do eixo embrionário por nenhum dos efetores, enquanto o mercaptoetanol estimulou a atividade da enzima dos cotilédones. Os K_M para o substrato p-NPGal para a alfa-galactosidase do embrião e dos cotilédones foram 1,74 e 2,64 mM, respectivamente.

Palavras-chaves: alfa-galactosidase, sementes, *Caesalpinia peltophoroides*.

Summary: *Caesalpinia peltophoroides* (sibipiruna) seeds were placed to hydrate for 144 hours, being removed samples for protein analysis, quantifications of the alfa-galactosidase activity and of micropila sugars composition. The germination began with 96 hours of imbibitions, without modifications in the micropila cellular wall. In this, larger arabinose proportion was observed that showed increase tendency with elapsing of the imbibitions. The specific activity of the alfa-galactosidase was detected in dry seeds, so much in the embryonic axis, as in the cotyledons, increasing in the first starting from 24 hours of imbibitions. The increase in the cotyledons was slower, with increase more accentuated starting from 120 hours of imbibitions. The protein content decreased continuously in the embryonic axis starting from 24 hours of imbibitions, while stayed stable in the cotyledons. The activity of the alfa-galactosidase it was stimulated by the temperature, being the largest stimulation at 55°C for of the embryonic axis and at 50°C for the cotyledons. Enzyme activity was stimulated by pH from 5,5 to 6,0 for the embryonic axis and in 4,5 to 5.0 for the cotyledons. The effectors that inhibited enzyme activity of embryonic axis and cotyledons were SDS, CuSO₄, galactose and melibiose. Mercaptoetanol showed small stimulating effect in the one from cotyledons. The K_M of the embryonic axis and the cotyledons were 1.74 and 2.64, respectively.

Key words: alfa-galactosidase, seeds, *Caesalpinia peltophoroides*

1. INTRODUÇÃO

As alfa-galactosidases, segundo LAHUTA et al. (2000), promovem a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,6 presentes nos oligossacarídeos da rafinose e de polissacarídeos da parede celular. Os oligossacarídeos, de acordo com JIMÉNEZ et al. (1985), são fontes primárias de energia e substrato para a síntese de outros compostos, durante a germinação das sementes. Para HERMAN & SHANONN (1985), a provável função das α -galactosidases dos cotilédones é degradar componentes da família rafinose. A sua ação resulta no aumento na relação manose/galactose em sementes em desenvolvimento pela remoção de resíduos de galactose presentes no galactomanano (EDWARDS et al., 1992). Segundo LAHUTA et al. (2000), sementes maduras possuem diferentes formas de alfa-galctosidase, tanto na atividade, quanto na massa molecular. Desse modo, as formas da enzima podem estar relacionadas ao estágio fisiológico da semente, atuando na hidrólise enzimática de hemicelulose, como galactoglicomananos (ZEILINGER et al., 1993). Para OLIVEIRA (2002) as sementes de *Platymiscium pubescens* possuem duas formas moleculares de α -galactosidase, cuja atividade aumentou substancialmente nestas sementes no período de 24 a 72 horas de embebição. GUIMARÃES et al. (2001) observaram que o teor de rafinose decresceu durante a germinação de *Glycine max*, enquanto a atividade de α -galactosidase e o teor de frutose aumentaram. Esta enzima foi também localizada

em sementes de *Lycopersicon esculentum* durante a germinação, onde estava envolvida na mobilização de carboidratos (BASSEL et al., 2001).

Além da atividade de degradação dos oligossacarídeos da rafinose, a alfa-galactosidase também participa na germinação, tendo sua presença detectada por FEURTADO et al. (2001) no embrião e nas regiões lateral e micropilar do endosperma de sementes de *Lycopersicon esculentum*. A atividade da enzima mostrou-se inalterada mesmo quando a germinação foi evitada pela presença de substância osmótica.

Não há informações na literatura técnica a respeito do comportamento fisiológico ou bioquímico das sementes durante a embebição ou mesmo durante a germinação. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação das alterações que ocorrem na parede celular da micrópila e na atividade da alfa-galactosidase, com sua caracterização bioquímica durante a embebição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Sementes de *Caesalpinia peltophoroides* foram classificadas no intervalo de peso entre 0,20 e 0,30 g e colocadas para embeber sobre duas folhas de papel Germitest umedecidas com água, colocadas em caixa plástica tipo gerbox, em temperatura de 25°C, no escuro, pelo período de 144 horas. Diariamente foram retiradas amostras, quando as sementes foram dissecadas em tegumento, região da micrópila, região central dos cotilédones e eixo embrionário. Utilizou-se o mesmo critério para sementes germinadas e não germinadas na retirada do tegumento. Foram removidos os fragmentos de cotilédones presos ao eixo embrionário. Foram determinados os teores de proteína e a atividade da enzima alfa-galactosidase no eixo embrionário, micrópila e cotilédones.

A extração e quantificação da atividade da enzima foram feitas segundo metodologia descrita por VIANA (2002). Para tanto, tomaram-se 100 mg de embriões e cotilédones secos em liofilizador e macerados em gral de porcelana com 1,0 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e centrifugadas a 24.000 x g por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi usado para quantificação da atividade da enzima e para determinação do teor de proteína.

Foi utilizado o substrato para-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ -NPGal) como substrato na avaliação da atividade da alfa-galactosidase. A mistura de reação constou de 750 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μ L de solução 2 mM de ρ -NPGal e 10 μ L do extrato enzimático. Os tubos contendo a solução foram mantidos em banho maria a 37°C por 15 min., sendo interrompida a reação pela adição de 1,0 mL de solução de 0,5 M de Na₂CO₃. Os valores de absorvância medidos no comprimento de onda de 410 nm foram transformados em μ moles de ρ -nitrofenolato (ρ -NP), utilizando uma curva padrão construída com 0-0,20 μ moles de ρ -NP. A unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de proteína necessária para produzir um μ mol de ρ -NP por minuto nas condições do ensaio.

Para a determinação do pH ótimo da enzima foram conduzidas reações em solução tampão com pHs variando de 4,0 a 8,0 utilizando-se tampões (citrato/fosfato) McIlvaine (McILVAINE, 1921), mantendo-se as mesmas condições de ensaio descritas anteriormente.

Os ensaios de temperatura foram feitos em 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C, utilizando-se tampão McIlvaine com pH 5,0.

A termoestabilidade foi testada pela pré-incubação da mistura enzima + tampão por vários tempos na temperatura de 50°C, no pH 5,0. Após a pré-incubação o substrato foi adicionado e o ensaio foi conduzido como já descrito.

Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcar foram avaliados utilizando-se 200 μ L de soluções 10 mM de MgCl₂, CaCl₂, KCl, CuSO₄, NaCl, sódio dodecil sulfato (SDS), β -mercaptoetanol, melibiose, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e iodoacetamida. A mistura contendo tampão, enzima e efetor foi pré-incubada por 15 min, a 40°C e, em seguida, foram acrescentados 250 μ L de solução de 2 mM de ρ -NPGal, sendo conduzido o restante do ensaio da mesma maneira já descrita. O ensaio controle utiliza apenas o substrato ρ -NPGal sem adição de nenhum efetor.

Os ensaios para determinação de K_M e V_{max} foram realizados com utilização de diferentes concentrações de ρ -NPGal. As concentrações usadas

foram 0,1, 0,125, 0,143, 0,2, 0,4, 0,6, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 mM. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados por meio da curva de velocidade, em função da concentração de substrato, curva de Michaelis-Menten (LINEWEAVER e BURKE, 1934). Foi utilizado o programa Curve Expert, versão 1.3 para Windows (HYAMS, 1997).

A extração de proteínas solúveis foi realizada pelo método descrito por ALFENAS et al. (1991), a qual consistiu em moer os embriões em tampão fosfato de sódio, 0,05M e pH 7,0. A quantificação foi feita conforme descrito por BRADFORD (1976).

As quantificações dos açúcares da parede celular do tegumento, da micrópila e da camada de galactomanano foram feitas pela digestão com ácido trifluoracético 2M. Em seguida, a solução foi neutralizada com hidróxido de amônia e preparado o alditol acetato para quantificação em cromatógrafo a gás, conforme metodologia descrita por ENGLYST & CUMMINGS (1984), sendo injetados em cromatógrafo a gás, conforme descrito por BORGES et al. (2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vê-se na Figura 1 que a germinação das sementes ocorre somente a partir do quarto dia de embebição. A partir daí o aumento foi de, aproximadamente, 50 pontos percentuais.

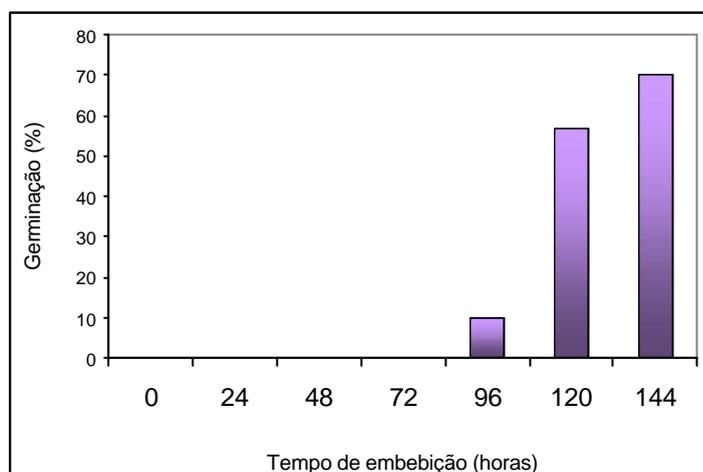


Figura 1 – Porcentagem de germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

As modificações na estrutura da parede celular do tecido da micrópila, com relação à composição de açúcares encontram-se na Figura 2. Há predominância da arabinose na composição da parede, com pequeno aumento durante a embebição. Os demais açúcares mostram-se sem variação durante a embebição. Dessa forma, pode-se inferir que a germinação da semente não

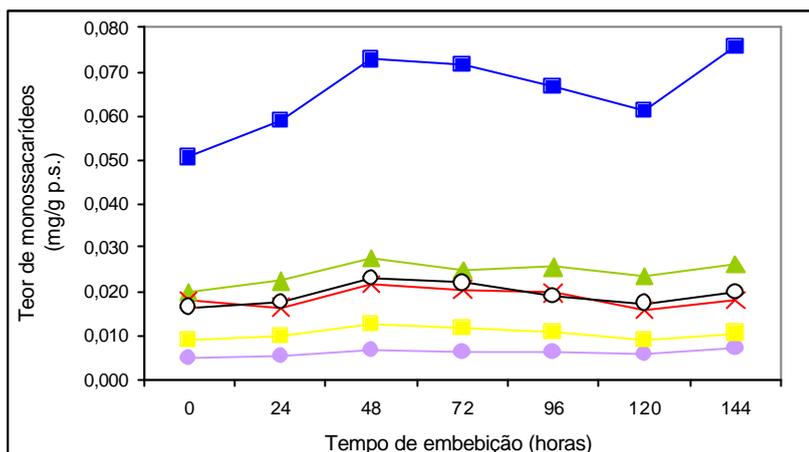


Figura 2 – Composição de monossacarídeos da micrópila durante a embebição de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Ramnose: ● , arabinose: ■, xilose: ▲ , manose: × , galactose: ■ , glicose: ○ . (Valores de erro-padrão da média menores do que 0,01).

envolve a degradação ou alteração na estrutura física da parede da micrópila. Esta percepção fica mais clara quando se observam na Figura 3 os dados da atividade específica da alfa-galactosidase. Percebe-se que a enzima está ativa antes mesmo da embebição. Com o decorrer da embebição a atividade aumenta, mais no eixo embrionário do que nos cotilédones. Nestes, o aumento é mais acentuado no sexto dia.

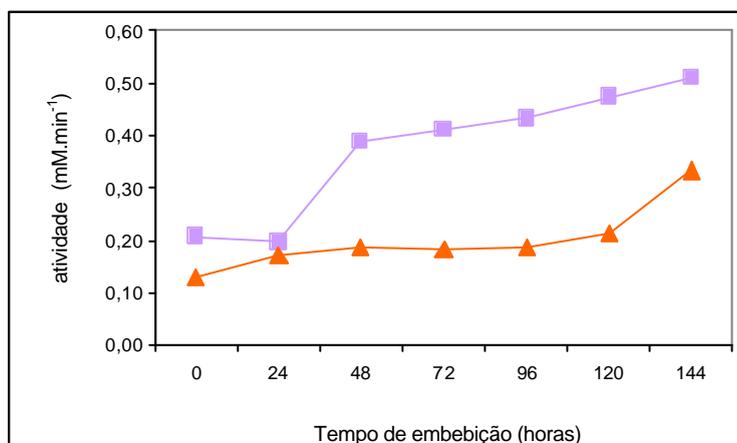


Figura 3 – Atividade específica das alfa-galactosidasas do embrião e dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* durante a embebição. Embrião: ■, cotilédones: ▲.

Muito embora a germinação somente ocorra com 96 horas, a atividade é anterior a ela, o que demonstra a sua participação no metabolismo da semente, provavelmente na mobilização da rafinose. Segundo DEY e PRIDHAM (1972) e MODI (2000), essa reserva é acumulada durante a formação da semente e degradada durante a germinação. OLIVEIRA (2002) trabalhando com sementes de várias leguminosas observou diferentes comportamentos entre elas. As maiores atividades foram observadas nas sementes de *Platymiscium pubescens* e *Senna macranthera*, que diferentemente da atividade específica detectada no presente trabalho, decresceram em 96 horas de embebição.

As variações nos teores de proteína encontram-se na Figura 4, onde se percebe a queda acentuada da mesma, no embrião, durante a embebição, situando-se em quantidades menores do que aqueles observados nos cotilédones, em 144 horas. Observa-se que os teores de proteína nos cotilédones permanecem constantes no decorrer do período de embebição. Trabalho realizado com *Cedrela fissilis* por PONTES et al. (2002) indica um aumento significativo no teor de proteína nos cotilédones, enquanto permaneceu estável no embrião, durante a embebição.

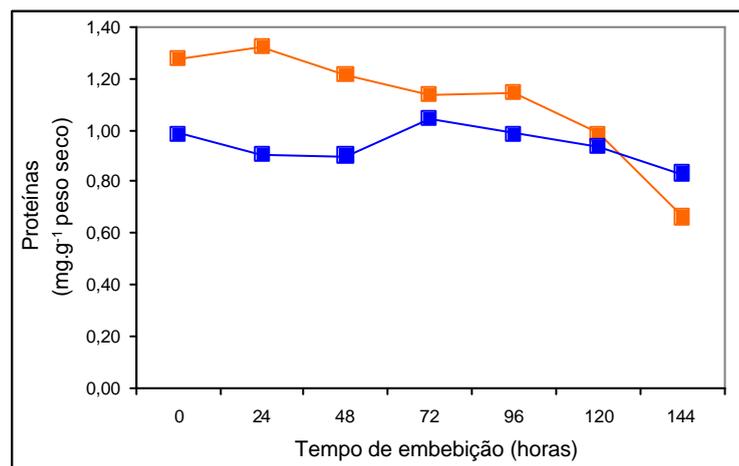


Figura 4 – Teores de proteína em embrião e cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* durante a embebição. Embrião: ■, cotilédones: ■.

A temperatura de 55°C estimulou a atividade da alfa-galactosidase ao máximo, vindo a decair em seguida (Figura 5). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por OLIVEIRA (2002) para sementes de *Platymiscium pubescens*, muito embora aqueles tenham sido medidos em extratos de sementes. A atividade da enzima de origem cotiledonar foi mais estimulada na temperatura de 50°C.

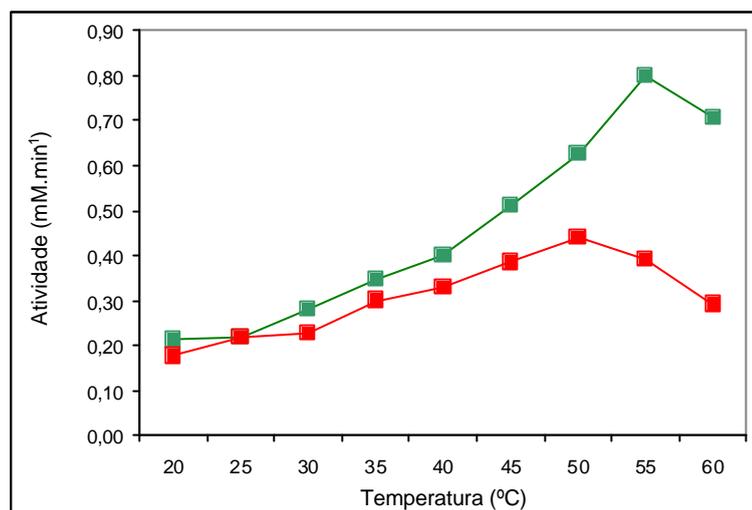


Figura 5 – Efeito da temperatura nas atividades de alfa-galactosidas do embrião e dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Embrião: ■, cotilédones: ■.

Os resultados aqui observados estão próximos àqueles obtidos por BRYANT & RAO (2001) para sementes de *Arachis hypogaea* ou mesmo para enzimas provenientes do fungo *Aspergillus fumigatus*, por REZENDE e FELIX (1999).

Os dados mostrados na Figura 6 demonstram que a faixa de pH entre 5,5 a 6,0 foi a de maior atividade da enzima alfa-galactosidase no embrião, decrescendo em seguida. Por outro lado, a faixa pH entre 4,0 a 5,0 foi a mais adequada para a enzima proveniente dos cotilédones.

OLIVEIRA (2002) concluiu, para sementes de *Platymiscium pubescens*, que o pH 5,5 foi o mais adequado, enquanto GUIMARÃES et al. (2001) obtiveram pH ótimo na faixa de 5,0 a 5,5 para alfa-galactosidase de sementes de soja. DEY (1981) purificou alfa-galactosidase de sementes de *Castanea sativa*, obtendo um pico de atividade em pH 4,5 para uma fração e em pH 6,0, em outra fração.

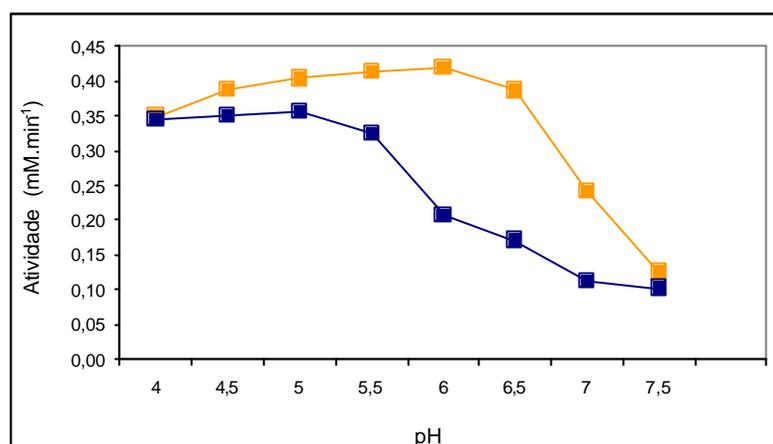


Figura 6 – Efeito do pH na atividade das alfa-galactosidases do embrião e dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Embrião: ■, cotilédones: ■.

A atividade da alfa-galactosidase não foi estimulada em embrião de *C. peltophoroides* por nenhum dos efetores, enquanto nos cotilédones o estímulo da atividade foi proporcionado por mercaptoetanol. Em ambas enzimas houve inibição por SDS, CuSO₄, galactose e melibiose (Figuras 7 e 8). As duas frações protéicas separadas por OLIVEIRA (2002) em sementes de *Platymiscium pubescens* também foram inibidas pelos mesmos efetores que a *C. peltophoroides*.

GUIMARÃES et al. (2001) demonstraram que a galactose é um forte inibidor competitivo da α -galactosidase. Segundo OLIVEIRA (2002), por não haver redução de atividade desta enzima em presença de EDTA e iodoacetamida indica que, provavelmente, não há dependência de íons metálicos para a atividade catalítica no grupo SH livre na molécula da enzima, que não é essencial à catálise.

Os valores de meia-vida da alfa-galactosidase do eixo embrionário e cotilédones encontram-se nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Não foi possível atingir a metade da atividade inicial nas enzimas provenientes do embrião, mesmo após 60 horas de pré-incubação a 50°C. Por outro lado, os valores encontrados para aquelas dos cotilédones foram menores que a metade, neste mesmo tempo. A enzima de *C. peltophoroides* mostrou-se mais resistente a essa temperatura do que a de *P. pubescens*, conforme verificado por OLIVEIRA (2002).

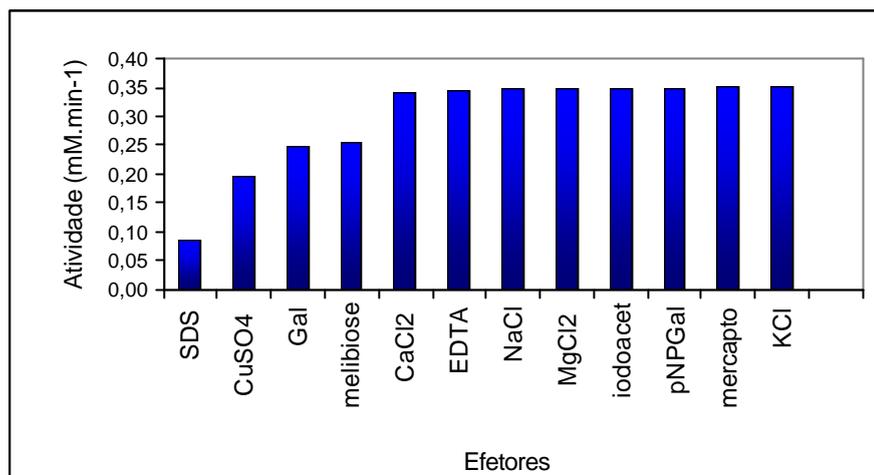


Figura 7 – Efeito de íons e agentes redutores na atividade da alfa-galactosidase dos embriões de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

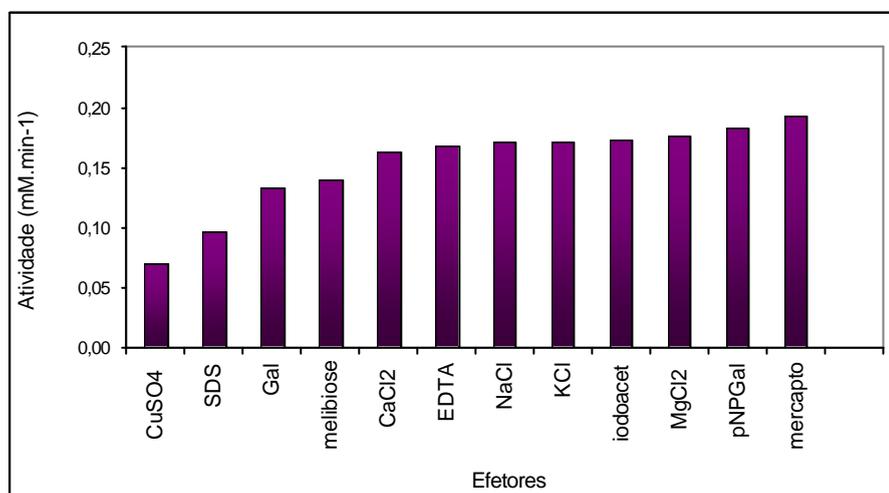


Figura 8 – Efeito de íons e agentes redutores na atividade da alfa-galactosidase nos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

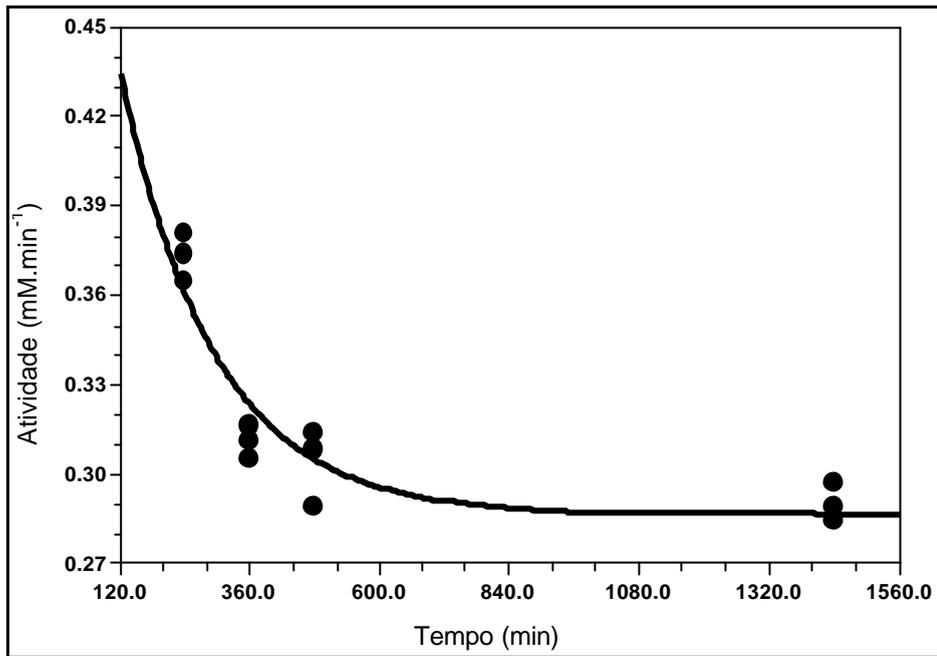


Figura 9 – Meia-vida de alfa-galactosidase de embrião de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* na temperatura de 50°C.

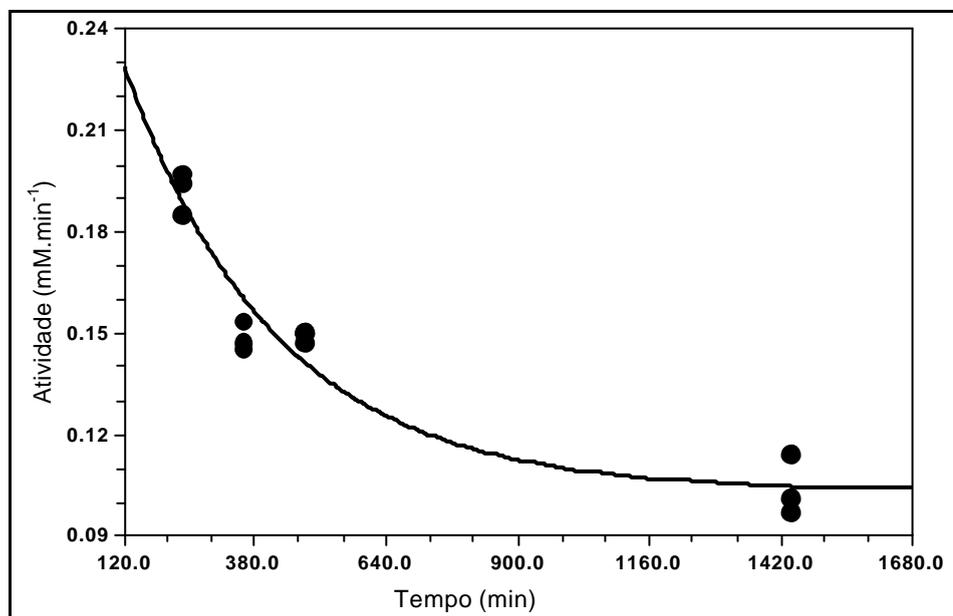


Figura 10 – Meia-vida de alfa-galactosidase de cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* na temperatura de 50°C.

DUFFAUD et al. (1997) determinaram a meia-vida desta enzima em *Thermomyces lanuginosus* como sendo de três horas a 65°C.

Os dados correspondentes às concentrações do substrato ρ -NPGal *versus* a velocidade de sua hidrólise pelas alfa-galactosidases de embrião e de cotilédones foram determinados conforme mostrado nas Figuras 11, 12, 13 e 14, respectivamente.

Os K_M da alfa-galactosidase do embrião e dos cotilédones mostraram-se diferentes na afinidade pelo substrato ρ -NPGal, indicando serem provavelmente enzimas distintas. REIS (2003) obteve valores de 0,99 mM para sementes de *Pterogine nitens*, bem distinto dos valores encontrados para a *C. peltophoroides*.

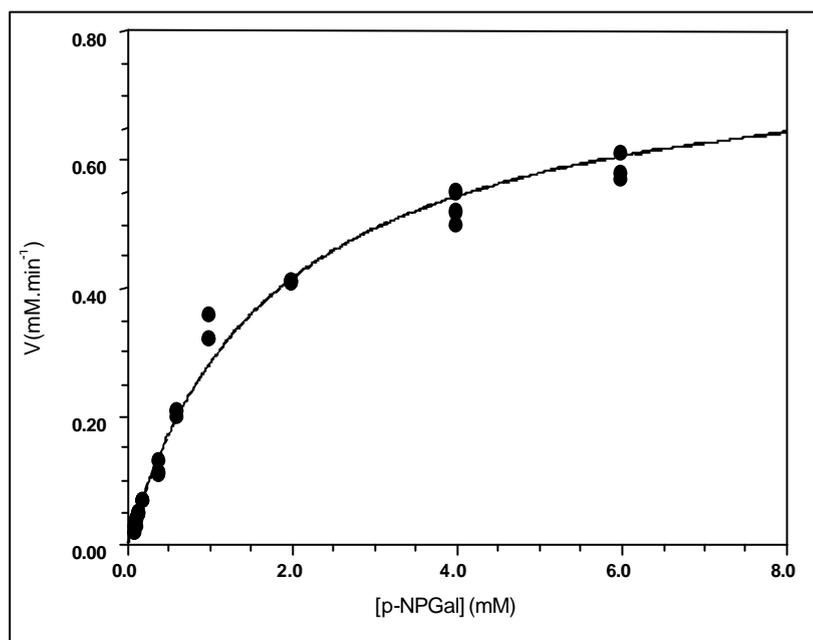


Figura 11 – Gráfico de Michaelis-Menten para hidrólise de ρ -NPGal pela alfa-galactosidase em embrião de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Os valores de K_M e V_{max} aparentes obtidos foram 1,74 mM e 0,78 mM.min⁻¹, respectivamente.

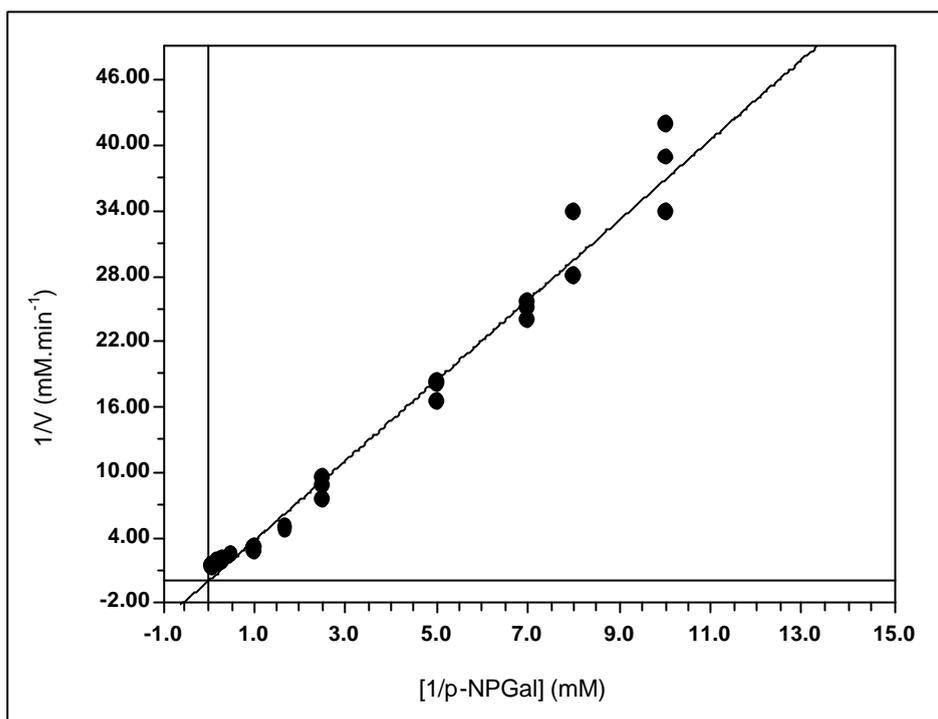


Figura 12 – Gráfico de duplo recíproco de alfa-galactosidase em embrião de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

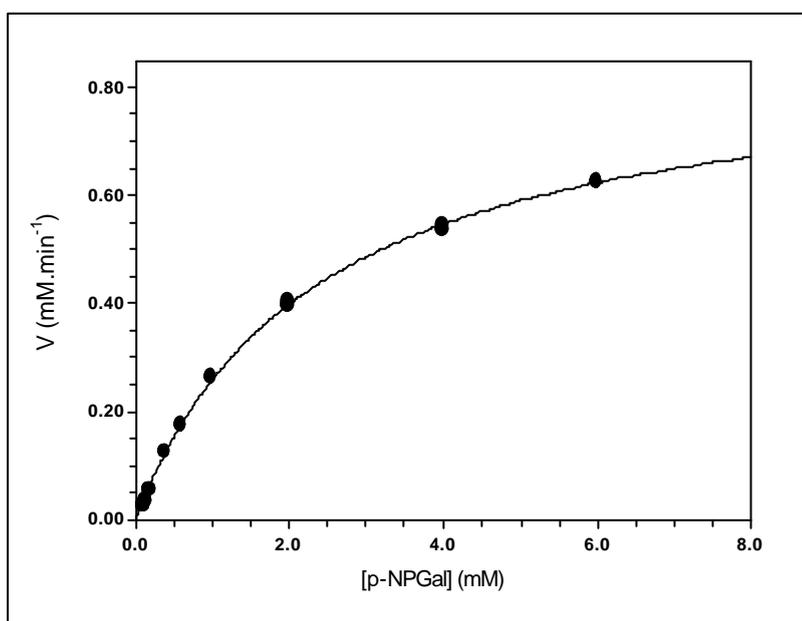


Figura 13 – Gráfico de Michaelis-Menten para hidrólise de p-NPGal pela alfa-galactosidase em cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Os valores de K_M e V_{max} aparentes obtidos foram 2,64 mM e 0,91 mM.min⁻¹, respectivamente.

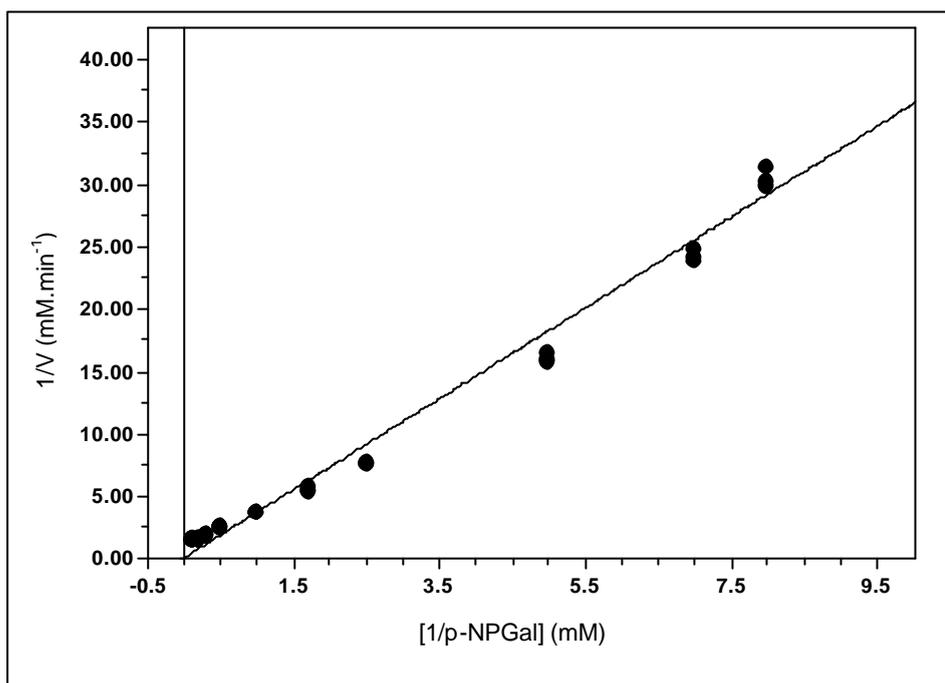


Figura 14 – Gráfico de duplo recíproco de alfa-galactosidase em cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

4. CONCLUSÕES

Em face dos resultados apresentados pode-se concluir que:

1. A arabinose é o principal componente da parede celular da micrópila.
2. A atividade da alfa-galactosidase foi detectada em sementes secas no embrião e nos cotilédones.
3. O teor de proteína decresceu no eixo embrionário durante a embebição.
4. As atividades da alfa-galactosidase do eixo embrionário e nos cotilédones foram máximas nas temperaturas de 55°C e 50°C, respectivamente.
5. A atividade da alfa-galactosidase foi máxima na faixa de pH de 5,5 a 6,0 para o eixo embrionário e na faixa de 4,5 a 5,0 para os cotilédones.
6. As atividades da alfa-galactosidase do eixo embrionário e dos cotilédones foram inibidas por SDS, CuSO₄, galactosidase e melibiose.
7. As enzimas do eixo embrionário e dos cotilédones são diferentes na afinidade pelo p-NPGal.
8. A estabilidade térmica foi diferente entre as enzimas provenientes do embrião e dos cotilédones na temperatura de 50°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforesede proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- BASSEL, G.W.; MULLEN, T.T.; BEWLEY, J.D. Alpha-galactosidase is synthesized in tomato seeds during development and is localized in the protein storage vacuoles. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v.79, n.12, p.1417-1424, 2001.
- BORGES, E.E.L.; R.C.G. BORGES; M.S. BUCKRIDGE. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de jacarandá-da-bahia osmocondicionadas. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, Lavras, v.12, n.1, p.10-16, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Maryland, v.72, p.248-254, 1976.
- BRYAN, R.J.; RAO, D.R. Purification and characterization of alpha-galactosidase from peanuts. **J. Food Biochem.**, Westport, v.25, p.139-156, 2001.
- DEY, P.M. α -galactosidase from sweet chestnut seeds. **Phytochem.**, Oxford, v.20, p.1493-1496, 1981.
- DEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. **Adv. Enzimol.** New York, v.36, p.91-130, 1972.

- DUFFALD, G.D.; McCUTCHEN, C.M.; LEDUC, P.; PARKER, K.N.; KELLY, R.M. Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *thermoplasma neaplitanum* 5068. **Appl. Environ. Microb.**, v.63, p.167-177, 1997.
- EDWARDS, M.; SCOTT, C.; GIDLEY, M.J.; REID, J.S.G. Control of mannose galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. **Planta**, Berlin, v.8, p.67-74, 1992.
- ENGLYST, E.N.; CUMMINGS, J.H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, Herts, v.19, p.937-942, 1984.
- FEURTADO, J.A.; BANIK, M.; BEWLEY, J.D. The cloning and characterization of alpha-galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seed. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.52, n.359, p.1239-1249, 2001.
- 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. **Phytochem.**, Oxford, v.58, p.67-73, 2001.
- HERMAN, E.M. & SHANNON, L.M. Accumulation and subcellular localization of α -galactosidase-hemagglutinin in developing soybean cotyledons. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.77, p.886-890, 1985.
- HYAMS, D. **Curve expert 1.3: a comprehensive curve fitting system for Windows**. Copyright^(C). 1997.
- JIMÉNEZ, M.J.M.; ELIAS, L.G.; BRESSANI, R.; NAVARRETE, D.A.; GÓMEZ-BRENES, R.; MOLINA, M.R. Estudios bioquímicos y nutricionales de la semilla germinada de soya. **Arch. Latinoam. de Nutrición**, Caracas, v.35, n.3, p.480-490, 1985.
- LAHUTA, L.; GORECKI, R.J.; MICHALCZYK, D.; PIOTROWICZ-CIESLAK, A.L.C. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Electronic J. Polish Agric. Univers.**, v.3, p.1-10, 2000.
- LEIZINGER, S.; KRISTUFEK, K.; ARISAN-ATAC, I.; HODITS, R.; KUBICEK, C.P. Conditions of formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei*. RUT C-30. **Appl. Environ. Microb.**, Washington, v.59, p.1347-1353, 1993.

- LINEWEAVER, H.; BURKE, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v.56, p.658-666, 1934.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparasions. **J. Biol. Chem.** v.49, p.185-186, 1921.
- MODI, A.T.; McDONALD, M.B.; STREETER, J.G. Soluble carbohydrates in soybean seeds during development and imbibition. **Seed Sci. & Technol.**, Zürich, v.28, p.115-127, 2000.
- OLIVEIRA, G. **Purificação parcial e caracterização bioquímica-cinética de alfa-galactosidase de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*)**. Viçosa-MG: UFV, 2002, 63p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- PONTES, C.A.; BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; SOARES, C.P.B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Rev. Árvore**, Viçosa, v.26, n.5, p.593-601, 2002.
- PUCHAT, V.; VRSANSKA, M.; BHAT, M.K.; BIELY, P. Purification and characterization of α -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Bioch. Biophys Acta**, Amsterdam, v.1524, p.27-37, 2000.
- REIS, M.R. **Produção de α -galactosidas para uso na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em produtos de soja**. Relatório de pesquisa. Viçosa: PIBIC/FAPEMIG, UFV, MG, 2003. 29p.
- REZENDE, S.T.; FELIX, C.R. Production and characterization of raffinose-hydrolyzing and invertase activities of *Aspergillus fumigatus*. **Folia Microbiologica**, London, v.44, p.191-195, 1999.
- VIANA, S.F. **Caracterização de α -galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose**. Viçosa, MG: 2002. 65p. Tese(M.S.) – UFV, 2002.
- ZEILINGER, S.; KRISTUFEK, K.; ARISAN-ATAC, I.; HODITS, R.; KUBICEK, C.P. Conditions of formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Applied Environ. Microb.**, Washington, v.59, p.1347-1353, 1993.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os teores de monossacarídeos das membranas que envolvem os embriões de *Platymiscium pubescens* e de *Tachigalia multijuga* são alterados durante a embebição.

2. Os teores de proteínas decrescem significativamente durante a embebição em meio osmótico ou em água em todas as espécies estudadas.

3. A enzima alfa-galactosidase apresenta atividade mesmo em sementes secas, aumentando a sua atividade durante a embebição.

4. As atividades da alfa-galactosidase do eixo embrionário e do cotilédone foram máximas no intervalo de pH entre 4,5 e 6,0.

5. A atividade máxima da alfa-galactosidase está no intervalo de temperatura de 50 a 55°C.

6. Os K_M 's da alfa-galactosidase indicaram que as enzimas dos cotilédones e dos embriões de *Platymiscium pubescens* e de *Caesalpinia peltophoroides* são diferentes entre si e entre ambas espécies.

7. As alfa-galactosidasas dos eixos embrionários de sementes de *Platymiscium pubescens* e de *Caesalpinia peltophoroides* são inibidas por melibiose, $CuSO_4$ e por SDS.

8. A alfa-galactosidase dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* é inibida por galactose, SDS e CuSO₄, ao contrário da alfa-galactosidase de cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens*.

9. As alterações observadas na membrana e na parede celular do eixo embrionário das sementes de *Platymiscium pubescens* durante o osmocondicionamento não estão relacionadas à atividade de alfa-galactosidase.

10. As alterações nos teores de oligossacarídeos de reserva são independentes das alterações nos monossacarídeos da parede celular de embrião de sementes de *Platymiscium pubescens*.

11. A água quente utilizada na superação da dormência de sementes de *Tachigalia multijuga* provoca alterações nas atividades das enzimas alfa-galactosidase e beta-mananase.

12. Não há ligação aparente entre as atividades das enzimas alfa-galactosidase e beta-galactosidase com as alterações nos monossacarídeos da membrana que recobre o embrião de sementes de *Tachigalia multijuga*.