

César Gustavo Serafim Lisboa

**Endo- β -mananase de endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.:
purificação, caracterização e importância na germinação e
desenvolvimento da plântula**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

*César Gustavo Serafim
Lisboa*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof.Dr. Marcos Silveira Buckeridge

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE PL
CHAMADA TRUNICAMP
L681e
EX
COMBO BC/ 57580
PROC 26-117-04
D ✓
PREÇO 11,00
DATA 15/04/2004
Nº CPD

CM00196146-0

BIBID.314853

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Lisboa, César Gustavo Serafim

L681e

Endo-beta-mananase de endosperma de Sesbania Virgata (Cav.) Pers.: purificação, caracterização e importância na germinação e crescimento de plântula/
César Gustavo Serafim Lisboa. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

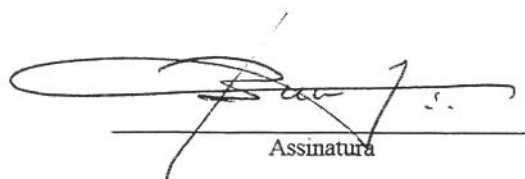
Orientador: Marcos Silveira Buckeridge
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Germinação. 2. Parede celular. I. Buckeridge, Marcos Silveira.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 28 de março de 2003

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)



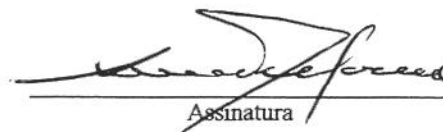
Assinatura

Prof.Dr. Angelo Luiz Cortelazzo



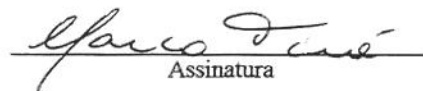
Assinatura

Prof.Dr. Renato de Azevedo Moreira



Assinatura

Prof.Dr. Marco Aurélio Silva Tiné



Assinatura

*“ Como ocorre com toda a atividade
que depende da poesia, a pesquisa está
plenamente aberta, em suas
profundezas mais íntimas, ao infinito
de todos os possíveis e de todos os céus.
Seu acesso é interdito apenas a quem
fechou seus olhos e ouvidos à
natureza, assim como a poesia estará
sempre interdita àqueles que perderam
o contato com o espírito. Em
compensação, o mundo inteiro pode
ser sempre abordado pelos verdadeiros
estudantes da ciência”*

Roger Bacon

Ao meu melhor amigo,
minha gentil sombra,
meu ombro companheiro,
minha mão direita
em todas as horas: meu irmão
Fernando Henrique Lisboa

Ofereço

Ao meu pai, Mario Lisboa . . .
meu amigo . . . meu herói e
a minha querida mãe, Vera Lisboa
minha estrela
meu norte . . . meu amor !!!

Dedico

AGRADECIMENTOS

- Ao meu mestre Dr. Marcos Buckeridge, um querido professor e amigo que me ensinou a ver a vida com outros olhos: *os olhos de um cientista!!*
- Ao meu coorientador Dr. Marco Tiné, que com muita paciência, personalidade e bom senso, orientou-me desde a iniciação científica.
- Aos meus pais Mário e Vera Lisboa, pelo apoio, berço, formação e educação que com muitos esforços e privações puderam me conceder.
- Ao meu amigo, companheiro e irmão Fernando Henrique pelo apoio e ajuda nas horas necessárias além de profundo reconhecimento e admiração.
- Aos amigos e coorientadores indiretos, Dr. Paulo Alcântara, Msc. Clóvis Silva e a minha mãe científica e amiga, Dra. Márcia Braga.
- Ao meu parceiro e irmão científico, Msc. Rodrigo Rahal, pelas discussões de resultados e apoio – *Cé, o limite é o céu!!*, ele certamente diria.
- A minha doce e meiga Paty Pinho, pelo apoio, amizade, carinho e amor: és meu sorriso, minha felicidade, minha inspiração e o meu motivo de viver!
- Aos grandes amigos Fausto Barbo (*traga a minha série*), o conselheiro Claudião, Clóvis Jr, Igor (*pai*), Josi Rondon e a minha irmã Paula Costa. E a querida e carinhosa Mandy, minha amiga e abrigo mais antigos.
- Ao grande Rafa, um gigantesco ombro sempre disposto à salvar-me a pele quando precisei.
- Ao Dr Angelo Cortelazo e ao Dr Renato Moreno pelas sugestões e contribuições fundamentais para a realização deste trabalho.
- À Lilian Panágio e aos professores do departamento de Biologia Celular da UNICAMP, em especial o Prof. Dr. Edson Pimentel.
- Aos professores do departamento de Ciências Biológicas da UMESP, em especial Dr. João Regis, Dra Rose, Dra Waverly e Msc. Vera Estivalleti.
- A todos os meus professores e educadores do Colégio São José, meu primeiro ambiente, *onde aprendi a ser mais gente . . .* e onde pretendo instigar muitos outros ao interesse pelo conhecimento filosófico-científico.
- Aos colegas Namá, Denis, Henrique, Gaya, Maitê, Deby, Lurdes, Marília, Minhoto, Aidar, Fabinho, Dra. Rita, Dra. Solange, Dra Sônia, Dra. Denise, Marcelo, Ivan, Ana Russa, Lili, Claudinha, Kelly, Amanda, Carla, Rodrigo, Rosana e Giovana pela ajuda fornecida, cada qual ao seu modo.
- Às amigas de apoio, as queridas tias Mary, Ana, Cida, Sirley, Amélia, Helena, pelos conselhos e carinho. E aos amigos Lauro Borges, Tonhão, Edson e Waldir.
- Aos amigos distantes: Lilis e família (minha família), Vlamir, Lipe, Léo, Dé Rodrigues, Nando Pelicice, Regis, Ferdi, Minerva, Hélio, Richard, Zuin, Marcão, Vinão, Mau e Gagini que, de alguma forma, também me apoiaram.
- À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro e seus acessores e sugestões.
- A Deus, pelo dom, inteligência e sabedoria necessárias . . . a Quem dedico minha personalidade e fé.

ÍNDICE

RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
1. SEMENTES	12
2. GERMINAÇÃO	12
3. EMBEBIÇÃO	14
4. EXTENSÃO DA RADÍCULA	14
5. PAREDE CELULAR.....	15
6. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE SEMENTES	16
6.1 Grupo dos Xiloglucanos	18
6.2 Grupo dos Galactanos	19
6.3 Grupo dos Mananos	20
6.3.1 Glucomananos	20
6.3.2 Mananos Puros	20
6.3.3 Galactomananos.....	22
6.3.3.1 Definição e estrutura	22
6.3.3.2 Ocorrência, taxonomia e propriedades.....	22
6.3.3.3 Mobilização.....	24
6.3.3.4 Regulação da degradação do galactomanano.....	27
6.3.3.5 Biossíntese.....	29
7. A ESPÉCIE <i>Sesbania virgata</i>	30
7.1 Anatomia da semente de <i>Sesbania virgata</i> e germinação	32
OBJETIVOS.....	35
9. MATERIAL BIOLÓGICO	36
10. MÉTODOS.....	37
10.1 Extração e quantificação dos carboidratos solúveis.....	37
10.1.1 Extração do galactomanano	37
10.1.2 Extração do manano	37
10.1.3 Determinação de carboidratos	38

10. 2 Extração e purificação da endo- β -mananase	38
10.2.1 Preparação do extrato enzimático de sementes com 110 h de germinação	38
10.2.2 Preparação do extrato enzimático no período de germinação até 40 h	38
10.2.3 Determinação de proteínas	39
10.2.4 Ensaio Viscosimétrico	40
10.2.5 Ensaio de atividade da α -galactosidase	40
10.2.6 Cromatografia de troca iônica DEAE-celulose	41
10.2.7 Cromatografia de afinidade Sepharose Concanavalina A	41
10.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
10.3 Caracterização da endo- β -mananase de 110 horas de germinação	43
10.3.1 Detecção de atividade durante e após a germinação	43
10.3.2 Cromatografia de Exclusão Molecular	43
10.3.3 pH ótimo da endo- β -mananase	44
10.3.4 Temperatura ótima da endo- β -mananase	44
10.3.5 Focalização Isoelétrica	44
10.3.6 Estabilidade da endo- β -mananase	45
10.3.7 Efeito do tampão de extração na estabilidade da endo- β -mananase	45
10.3.8 Ação da endo- β -mananase sobre diferentes substratos	45
10.4 Imunolocalização da Endo- β -mananase e possíveis isoformas	46
10.4.1 Dot blot	46
11. RESULTADOS	49
11. 1 Purificação da endo- β -mananase	49
11.1.1 DEAE-celulose	49
11.1.2 Coluna de afinidade Sepharose Concanavalina A	49
11. 2 Caracterização da endo- β -mananase	51
11.2.1 Bio Gel P-60	51
11.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	51
11.2.3 pH ótimo da endo- β -mananase	53
11.2.4 Temperatura ótima da endo- β -mananase	53
11.2.5 Focalização Isoelétrica	53

11.2.6 Estabilidade da endo- β -mananase	53
11.2.7 Otimização da extração da endo- β -mananase	55
11.2.8 Ação da endo- β -mananase sobre diferentes substratos	55
11.3 Localização da endo-mananase na germinação e crescimento de plântula	58
11.3.1 Detecção da mananase na germinação e crescimento inicial da plântula.....	58
11.3.2 Detecção da mananase na germinação em diferentes partes da semente	60
12. DISCUSSÃO.....	62
12.1 Purificação da endo-mananase.....	62
12.1.1 Matriz de Troca iônica - DEAE-celulose	62
12.1.2 Matriz de Afinidade Biológica - Sepharose Concanavalina A.....	63
12.2 Caracterização da endo-mananase	64
12.2.1 Obtenção do peso molecular da mananase em Biogel P-60 e SDS-PAGE	64
12.2.2 pH ótimo da endo-mananase	65
12.2.3 Ponto isoelétrico da endo-mananase.....	66
12.2.4 Temperatura ótima da endo-mananase	71
12.2.5 Estabilidade da endo-mananase.....	71
12.2.6 Otimização de extração da endo-mananase.....	72
12.2.7 Atividade da endo-mananase sobre diferentes substratos	73
12.3 Detecção de atividades tecido-específicas da endo-mananase	77
12.3.1 Atividade mananásica Germinativa e Pós-germinativa.....	77
13. CONCLUSÕES.....	83
14. BIBLIOGRAFIA.....	85

RESUMO

As sementes de muitas plantas possuem endosperma, um tecido especializado com funções tanto de reserva como de constrição mecânica do embrião nas primeiras etapas de desenvolvimento. Em muitas espécies de leguminosas, estes tecidos especializados armazenam como polissacarídeo de reserva, o galactomanano. Este polímero apresenta um cadeia central de manose (β -1,4 ligadas) e ramificações de galactose (α -1,6 ligadas ao esqueleto central). Três enzimas estão envolvidas na hidrólise do galactomanano: a endo- β -mananase, a α -galactosidase e a β -manosidase. Da forma com que a endo-mananase ataca o polímero, inicialmente produz oligossacarídeos galactosilados que, são posteriormente hidrolisados pelas duas últimas exo-enzimas (α -galactosidase e β -mananase) até galactose e manose livres.

Neste trabalho, uma endo- β -mananase foi purificada do endosperma das sementes de *Sesbania virgata*, uma leguminosa nativa. Uma curva de tempo de germinação mostrou que a atividade da mananase aparece inicialmente na região do endosperma próxima à área de protrusão da radícula e, subseqüentemente, aumenta na região lateral do endosperma da semente seguindo o desenvolvimento da plântula. Medindo a atividade em pH 5 a 45°C, o máximo da atividade catalítica correspondeu a 120h de desenvolvimento para, em seguida, decair. Para a purificação da enzima, utilizou-se uma coluna de troca iônica DEAE-celulose seguida de uma coluna de afinidade biológica em Sepharose Concanavalina A.

A mananase purificada é uma glicoproteína de peso molecular de cerca de 30KDa, com pH ótimo entre 3,5 e 5, temperatura ótima de 45°C e ponto isoelétrico 4,5. A caracterização da atividade da endo-mananase sobre diferentes galactomananos com diferentes razões manose:galactose, indicou que a ramificação do polissacarídeo com galactose é o “fator-chave” na modulação da própria ação catalítica dessa enzima.

Com essas observações, foi concluído que, a atividade da endo-mananase, além de estar relacionada com a mobilização de reservas, facilita a emersão da radícula agindo na área próxima à protrusão. Entendendo que a mananase pura não foi capaz de degradar o galactomanano da *Trigonella foenum-graecum* (razão 1:1 de manose/galactose), sugere-se que exista uma relação inversa entre o grau de ramificação e a porcentagem de hidrólise da endo-mananase.

ABSTRACT

Many plant seeds have an endosperm, a tissue specialised either as storage or mechanical constraint to embryo growth. In many legume species, endosperms contain galactomannan. This polyssacharide is composed of a main chain of 1,4- β -mannan branched with variable amounts of 1,6- α -linked galactosyl residues. Three enzymes produced by an aleurone layer are involved in galactomannan hydrolysis: endo- β -mannanase, α -galactosidase and β -mannosidase. The former with mannanase attacks the polymer producing galactosylated oligossacharides which are further hydrolysed by the two last exo-enzymes to free mannose and galactose.

In the present work, an endo- β -mannanase was purified from the endosperm of *Sesbania virgata*, a Brazilian native legume. The time-course shows that the activity of mannanase appears initially in the endosperm cap of seeds prior to radicle emergence and subsequently increases in the remaining lateral endosperm following seedling growth. Measuring the activity at pH 5 and 45°C, endo-mannanase peaked at 120h and then decreased. We used these conditions to perform purification procedures in DEAE-cellulose followed by affinity chromatography with Sepharose Concanavaline-A.

The enzyme is a glycoprotein with an apparent molecular weight of 30Kda, optimum pH at 4.5 and temperature at 45°C, pI at 4.5. The mode of action of the enzyme on different galactomannans indicates the modulation of mannanase activity by the branching patterns of the polymers with galactose. From these observations it was concluded that mannanase activity facilitates radicle protrusion through the surrounding endosperm by weakening it in the area close to the radicle tip.

On the basis that the pure enzyme can not degrade the fenugreek galactomannan (a fully substituted polysaccharide), we suggest that there is an inverse relationship between galactose branching and the degree of hydrolysis.

INTRODUÇÃO

1. SEMENTES

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram estratégias adaptativas que possibilitaram o sucesso reprodutivo e a sobrevivência. Uma das principais estratégias de perpetuação de novos indivíduos nas plantas terrestres foi a produção de esporos resistentes à seca, isto é, as sementes (Raven *et al.*, 1999). Do ponto de vista funcional e anatômico, as sementes são constituídas por casca (cobertura protetora), tecido de reserva (endospermático ou cotiledonar, ou perispermático) e tecido meristemático (eixo embrionário), cada parte apresentando funções específicas (Carvalho & Nakagama, 1988) (**Figura 1**).

Quando madura, a semente é um dos meios pelo qual o indivíduo é disperso e busca sua sobrevivência. E, com isso, a espécie perpetuada ocupa uma posição crítica na história da evolução das plantas, uma vez que contém em seu interior um embrião que dará origem a uma nova planta. Esta unidade de dispersão, encontra-se estrutural e fisiologicamente preparada para desempenhar seu papel, provida de uma reserva alimentar capaz de sustentar o crescimento da plântula até que esta se estabeleça como um organismo autotrófico (Bewley, 1997). No entanto, o sucesso de estabelecimento deste novo indivíduo dependerá diretamente dos fatores fisiológicos e bioquímicos da semente de sua espécie (Bewley & Black, 1994). Mesmo assim, uma semente em processo de germinação é mais exigente, em seu ambiente, do que a própria planta adulta.

2. GERMINAÇÃO

É usual definir a germinação como sendo um fenômeno pelo qual, sob condições apropriadas, o eixo embrionário dá prosseguimento ao seu desenvolvimento. Assim, num sentido fisiológico e bioquímico, a germinação compreende apenas o conjunto de eventos que ocorrem durante a embebição da semente e se estende até a protrusão da radícula (Bewley & Black, 1994).

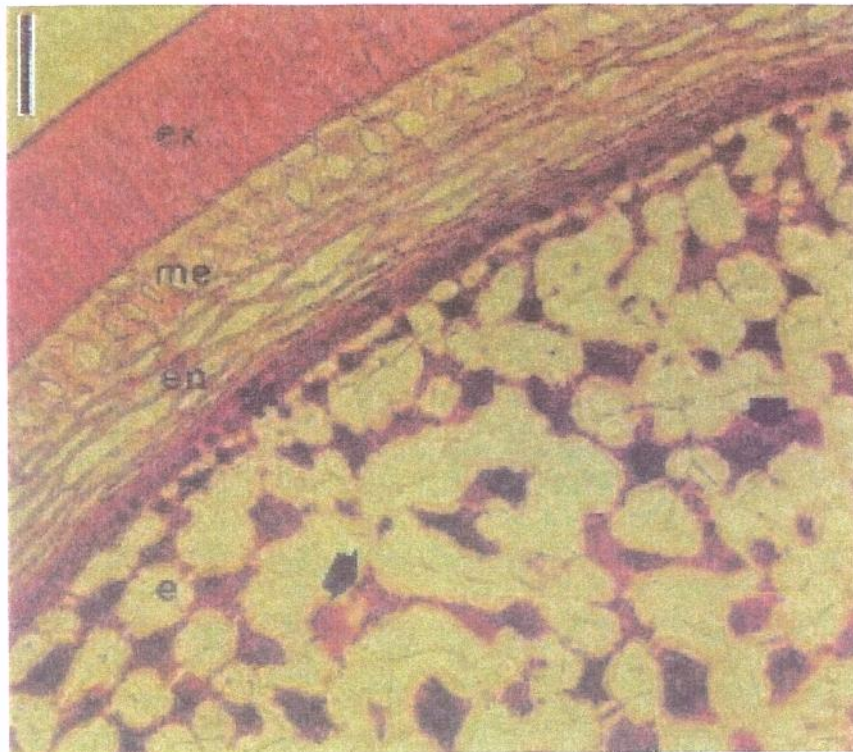


Fig. 1: Microscopia de luz de um corte transversal da semente de *Sesbania virgata* mostrando dois dos três tecidos citados. A *cobertura* ou *casca*, formada por três camadas: exotegumento (**ex**), mesotegumento (**me**) e endotegumento (**en**). O endosperma (**e**) nesta semente acumula um polissacarídeo de reserva, o galactomanano. A estrela mostra uma camada unicelular (camada de aleurona) intermediária entre a casca e o endosperma, supostamente responsável pela síntese das enzimas hidrolíticas que promovem a degradação do galactomanano (descrita adiante). As setas indicam o citoplasma das células endospermicas com corpos protéicos e os espaços claros entre as manchas avermelhadas são espessamentos de parede celular contendo o galactomanano. Barra=84µm. Foto cedida pela bióloga Patricia Pinho Tonini, Departamento de Anatomia e Morfologia do Instituto de Botânica de São Paulo.

Neste contexto, a germinação se encerra quando visivelmente nota-se a completa protrusão da radícula, o que permite sugerir que degradação e mobilização de reservas estão associados com eventos de crescimento da plântula (Labouriau, 1983).

3. EMBEBIÇÃO

Desconsiderando exigências significativas como o fotoperíodo e condição de luminosidade adequada requerida por algumas espécies, bem como a exigência do rompimento de uma testa ou casca resistentes, a causa imediata da germinação, na maioria das plantas, parece ser a simples embebição da semente em água (Fosket, 1994).

Mesmo compreendendo que este processo ocorre independente da semente estar viva, com a embebição, o metabolismo quiescente da semente viável rapidamente se reinicia. Neste caso, uma das primeiras mudanças que se pode observar é um incremento na atividade respiratória. Após este aumento considerável no consumo de oxigênio, a taxa novamente declina até a radícula emergir, atravessando as estruturas da casca para depois se estender e se fixar (Botha *et al.*, 1992).

4. EXTENSÃO DA RADÍCULA

Quando o crescimento da radícula ultrapassa o limite da casca ou testa, compreende-se tratar do final da germinação e inicia-se o crescimento e estabelecimento da plântula. Assim, quando sementes secas e viáveis são embebidas em água, uma cascata de eventos fisiológicos é iniciada, resultando na total protrusão radicular, o que significa que o processo germinativo se encerra bem sucedido (Bewley & Black, 1994). Isso, é claro, se a radícula se estabelecer definitivamente no substrato, definindo assim, o subsequente desenvolvimento da plântula.

Se considerarmos que o crescimento ou alongamento da radícula está diretamente relacionado com a extensibilidade das paredes celulares de suas células, acredita-se que o afrouxamento (para esta extensibilidade) da parede celular estaria diretamente envolvido com a quebra da união das moléculas de hemiceluloses adjacentes às microfibrilas de celulose de sua composição. Desta forma, é possível que esta resistência para a emersão da

radícula esteja relacionada com o endosperma. Este funcionaria como uma estrutura constritora, cuja resistência mecânica seria inversamente proporcional à protrusão desta radícula. Muitos autores têm relacionado esta queda ou diminuição de resistência com a ação de hidrolases ou hemicelulases de parede celular (Nonogaki & Morohashi, 1996; Toorop *et al.*, 1996; Voigt & Bewley, 1996).

No que se refere ao desenvolvimento de sementes de tomate, Groot *et al.* (1988), foi o primeiro a relacionar a atividade hidrolítica de degradação e diminuição da resistência da parede celular rica em manano à ação da endo- β -mananase. Esta, por sua vez, tem sua atividade detectada em eventos de desenvolvimento da semente temporalmente muito distintos entre si. Ou seja, a sua ação hidrolítica é detectada em eventos fisiológicos relacionados à germinação e também, associados à mobilização de reservas. Recentemente, constatou-se em endosperma de tomate, a presença de duas isoformas distintas (inclusive isolando seus respectivos genes) da endo-mananase. Uma delas está relacionada com a degradação do endosperma na área de protusão da radícula (para ceder espaço para esta emergir) e a outra com a degradação e a mobilização deste tecido (Nonogaki *et al.*, 2000).

Sendo assim, considerando a atividade da mananase em diferentes eventos de desenvolvimento da semente, envolvendo a degradação do endosperma a fim de liberar espaço na área de protrusão da radícula e a degradação e mobilização deste no período de desenvolvimento da plântula, acredita-se que, em Leguminosae, este mecanismo possa ser similar ao de sementes de tomate.

5. PAREDE CELULAR

A parede celular é uma estrutura que envolve as células vegetais tendo como funções manter a forma da célula, conferir resistência e dar proteção ao protoplasma contido no seu interior. A visão atual predominante da parede celular é de uma matriz extracelular complexa e espessa com diferentes papéis fisiológicos (Carpita & Gibeau, 1993).

Dois tipos de paredes celulares podem ser encontradas nos vegetais superiores: a parede celular primária e a parede celular secundária. A parede celular primária envolve as células jovens em crescimento, podendo alongar-se e intumescer-se, ao passo que a

secundária, depositada sobre a parede primária, não possui capacidade de crescimento, alongamento e não pode intumescer-se (Hopkins, 1999).

Atualmente o modelo proposto para a parede celular é o arranjo dinâmico-tridimensional das chamadas microfibrilas de celulose (macromolécula orgânica mais abundante da Terra) entrecruzadas por pontes de hidrogênio a uma rede de hemiceluloses (Alberts *et al.*, 1997). Essa rede de hemiceluloses, por sua vez, coexiste com uma matriz de polissacarídeos ricos em ácidos galacturônicos, as pectinas (Cosgrove, 1999) (**Figura 2**). A celulose e a hemicelulose fornecem força tensora, enquanto que a matriz de pectina está relacionada com a resistência à compressão (Jarvis & McCann, 2000).

Ainda em nível estrutural, as proteínas são componentes importantes das paredes celulares representando até 10% das paredes primárias. Esta matriz protéica seria então dividida em proteínas estruturais e enzimas. Estas últimas, têm grande importância na mobilização dos carboidratos de reserva de parede, sendo as principais ferramentas biológicas utilizadas para a descrição da dinâmica fisiológica desta estrutura celular. Talvez esta relação enzima e dinâmica de parede, consista em um excelente motivo para a possível existência de domínios de ligações entre polissacarídeos e proteínas na parede celular descritos por diversos autores, tais como MacCann & Roberts, 1991; Liyama *et al.*, 1994 e Fry, 1995. Nesse contexto, a exemplo da importância das proteínas estruturais citada, as enzimas também poderiam interagir da mesma forma na parede, contribuindo estrutural e funcionalmente.

6. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE SEMENTES

Muitas sementes possuem carboidratos de reserva nas paredes de suas células endospermicas ou cotiledonares. Além da função de reserva, estes polissacarídeos podem estar associados à dureza, às relações hídricas e ao controle de embebição, bem como controle de expansão celular. Em 1996, Buckeridge e Reid, como em 2000, Buckeridge *et al.*, propuseram ainda que a presença de polissacarídeos de reserva em sementes estaria diretamente relacionada ao mecanismo evolutivo de transferência de funções. Este mecanismo pode ter levado as plantas a utilizarem estes polissacarídeos também como fonte de carbono para o crescimento principalmente do embrião de suas sementes, que

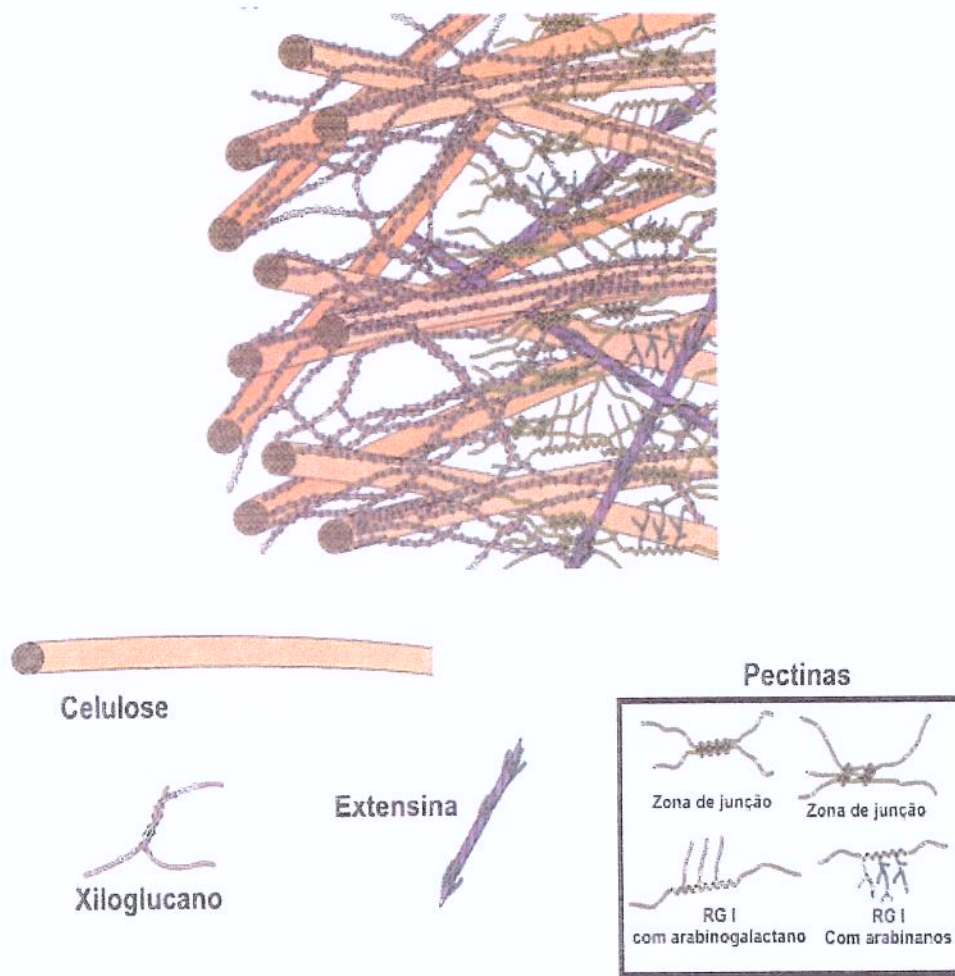


Fig. 2: Modelo esquemático da parede celular de dicotiledôneas proposto por McCann & Carpita (2001).

ainda não apresenta capacidade autotrófica, ou seja, ainda não faz fotossíntese, nem pode absorver do solo nutrientes indispensáveis ao seu estabelecimento.

Os polissacarídeos de reserva de parede celular de sementes têm sido subdivididos em três grupos: xiloglucanos, galactanos e mananos (Buckeridge *et al.*, 2000b).

6.1 Grupo dos Xiloglucanos

Estruturalmente, o xiloglucano é formado por um esqueleto central de celulose onde unidades de glucose aparecem ligadas entre si através de ligações glicosídicas tipo β ,1-4, podendo conter nas ramificações laterais, unidades de xilose, xilosil- β ,1-2-galactose e xilosil- β ,1-2-galactosil- α ,1-2-fucose (Kooiman, 1961; York *et al.*, 1990; McCann & Roberts, 1991; Buckeridge *et al.*, 1992 e Dietrich *et al.*, 1998); todos estes tipos substituintes ligam-se às glucoses da cadeia principal através de ligações α ,1-6.

Kooiman (1960), denominou os xiloglucanos amilóides, uma vez que estes reagem na presença de iodo-iodeto de potássio formando complexos de coloração azulada em ensaios colorimétricos semelhantes à reação obtida com o amido.

Em relação a sua ocorrência, sabe-se que o xiloglucano está presente na parede de reserva de muitas plantas, especialmente nas sementes de leguminosas, cuja localização é predominantemente cotiledonar. É o caso do jatobá (*Hymenaea courbaril*) e da copaíba (*Copaifera langsdorffii*), onde a função é de reserva.

No que se refere ao xiloglucano propriamente dito, sabe-se que ele é formado por blocos repetitivos contendo quatro glucoses, três xiloses, uma ou duas moléculas de galactose, sendo que, uma delas pode ainda conter ramificações com fucose (Kooiman, 1961; York *et al.*, 1990; Buckeridge *et al.*, 1992).

Com referência à utilização ou mobilização desta reserva no jatobá, apesar dela já ter sido sugerida em 1960 por Kooiman, seu acompanhamento detalhado só foi realizado 40 anos depois (Tiné *et al.*, 2000). Até o momento sabe-se que quatro enzimas são capazes de hidrolisar o xiloglucano de reserva: a endo- β -glucanase ou xiloglucano-endo- β -transglicosilase (XET), a β -galactosidase, a α -xilosidase e a β -glucosidase. Assim, o mecanismo de desmontagem *in vivo* do xiloglucano proposto em 2000 por Tiné *et al.* é dividido em três partes: transglicosilação, onde o polissacarídeo seria parcialmente

hidrolisado pela XET; desgalactosilação, etapa onde certas unidades de galactose dos produtos da ação anterior da XET seriam hidrolisadas pela β -galactosidase (neste ponto pode haver controle da degradação por pH de forma análoga ao mecanismo de crescimento ácido induzido pela auxina na parede primária conforme detalhada por Tiné *et al.*, 2000) e desmontagem, onde os oligossacarídeos remanescentes da ação da β -galactosidase entrariam no ciclo final de desmontagem na qual a glucose e a xilose seriam atacadas pela β -glucosidase e α -xilosidase para produzir monossacarídeos livres.

6.2 Grupo dos Galactanos

O galactano como polissacarídeo de parede celular foi inicialmente detectado por Hirst *et al.* (1947) nas sementes de *Lupinus albus*. Baseados em estudos químicos-estruturais, incluindo análises por metilação, estes autores concluíram que este polissacarídeo é composto por uma cadeia linear de unidades de galactose unidas por ligações β ,1-4. Um dos representantes mais importantes do grupo dos galactanos, é o arabinogalactano. A estrutura deste polímero é representada pela ligação de unidades de galactose e arabinose com pequenas quantidades de ácidos urônicos (Buckeridge *et al.*, 2000b).

Em 1977, Matheson & Saini reportaram a presença de duas α -arabinosidases e três β -galactosidases em cotilédones de *Lupinus luteus* e suas respectivas atividades permitiram relacionar a importância da mobilização dos galactanos com a expansão cotiledonar. Buckeridge & Reid (1994) isolaram uma $\text{exo-}\beta$ -(1,4)-galactanase dos cotilédones de *Lupinus angustifolius* e, em 1996, propuseram um modelo hipotético de degradação dos galactanos. Este modelo de degradação (Buckeridge *et al.*, 2000b), aponta a $\text{exo-}\beta$ -(1,4)-galactanase como enzima chave da mobilização do galactano. Isto porque esta galactanase é capaz de hidrolisar 82% das unidades de galactose do esqueleto central do galactano, bem como cerca de 63% das mesmas unidades presentes nesse polímero em paredes celulares intactas. *In vivo*, é evidente que outras galactosidases e arabinosidases também atuam degradando o polímero, sendo que, um dos principais produtos, consiste em moléculas de ácido galacturônico. Ainda nesse modelo, Buckeridge *et al.*, 2000b, sugerem que outros produtos da degradação, como a galactose e a arabinose livres, podem ser utilizados na produção de sacarose.

6.3 Grupo dos Mananos

Baseado em sua estrutura e composição, o grupo dos mananos pode ser dividido em três subgrupos: os glucomananos, os mananos puros e os galactomananos (Buckeridge *et al.*, 2000a).

6.3.1 Glucomananos

Dentre os três tipos citados, os glucomananos são os menos estudados. Eles podem ser extraídos com base forte de algumas espécies das famílias Liliaceae (Buckeridge *et al.*, 2000b), como por exemplo *Asparagus officianalis*, *Edymion mutants* e *Scilla nonscripta*; e Iridaceae, como *Iris ochroleuca* e *Iris sibirica*. A estrutura destes polissacarídeos vem sendo determinada por análises de metilação. Assim, eles contêm uma cadeia principal formada por um número proporcionalmente equivalente de unidades de β -glucopiranosídeo e β -manopiranosídeo, todos ligados β -1,4. As vezes pode-se detectar a presença (3 a 6%) de unidades de galactopiranosídeo, provavelmente α -ligados ao esqueleto central (Buckeridge *et al.*, 2000b).

6.3.2 Mananos Puros

Os mananos puros são definidos como contendo mais de 90% de manose, formando uma cadeia linear do tipo β -1,4 sem ramificações, podendo ou não o restante estar ramificado com galactose. Abaixo de 10% de ramificação, os mananos tornam-se insolúveis e precipitam rapidamente em solução aquosa (Dea *et al.*, 1986). Assim, eles são estruturalmente relacionados aos galactomananos, apenas apresentando um grau menor de ramificação com galactose, o que leva a um alto grau de interatividade intermolecular, formando cristais na parede celular, o que confere dureza e diminui sua solubilidade. Podem ser encontrados em endospermas de sementes de espécies de monocotiledôneas (por exemplo *Phoenix dactylifera* e *Phytelephas macrocarpa*) e dicotiledôneas (*Coffea arabica*) (Reid, 1985).

A germinação de sementes de *Phoenix dactylifera* foi estudada por Sachs (1862) e, mais tarde por Keusch (1968). Nestas sementes, um pequeno embrião de forma cônica se

desenvolve lentamente. Seus cotilédones são transformados em haustórios, os quais absorvem os produtos de degradação das reservas do endosperma durante a germinação. A estratégia mais comum de fazer uso de reservas germinativas utilizadas pelas plantas envolve a presença de complexos catalíticos, representados pelas enzimas, principais ferramentas de mobilização. Nessas sementes, uma endo- β -mananase e uma β -manosidase foram detectadas na zona de dissolução próxima ao haustório. Foi proposto (Keusch, 1968) que as enzimas são produzidas também no endosperma, mas suas células necessitam de um sinal proveniente do haustório.

Desta forma, mananos como compostos de reserva já foram detectados em sementes de plantas como pimenta (Watkins *et al.*, 1985), aipo (Jacobsen & Pressmann, 1979), tomate (Groot *et al.*, 1988), alface (Halmer & Bewley, 1979) e café (Wolfron *et al.*, 1961), sendo que em todas elas já foi observada a presença de atividade de endo- β -mananase. A mananase geralmente está envolvida em mecanismos de germinação e mobilização de reservas em sementes de diversas espécies (Watkins *et al.*, 1985; Dutta *et al.*, 1994, 1997; Downie *et al.*, 1997; Sánchez e de Miguel, 1997). Normalmente estas espécies apresentam endospermas menos espessos em relação às sementes de palmeiras (que também acumulam mananos), mas sua presença tem sido correlacionada com a restrição mecânica para a protrusão da radícula.

Uma demonstração direta de que os mananos estão relacionados com a dureza do endosperma foi obtida através da observação de que este carboidrato, presente na região endospermica próxima à extremidade da raiz de tomate, exerce papel crucial na protrusão da radícula (Groot & Karssen, 1987; Groot *et al.*, 1988). Estes autores demonstraram que o amolecimento do endosperma, induzido pela adição de giberelina, facilitou a germinação. Posteriormente, Groot & Karssen (1992) apresentaram evidências de que o efeito promovido pela giberelina podia ser revertido por ácido abscísico. Paralelamente, outros autores afirmam que os mananos presentes em endosperma de sementes de tomate (Toorop *et al.*, 1996) e de café (Takaki & Dietrich, 1980; Giorgini & Comoli, 1996) são completamente degradados após a germinação, sendo, portanto, correto considerá-los como compostos de reserva.

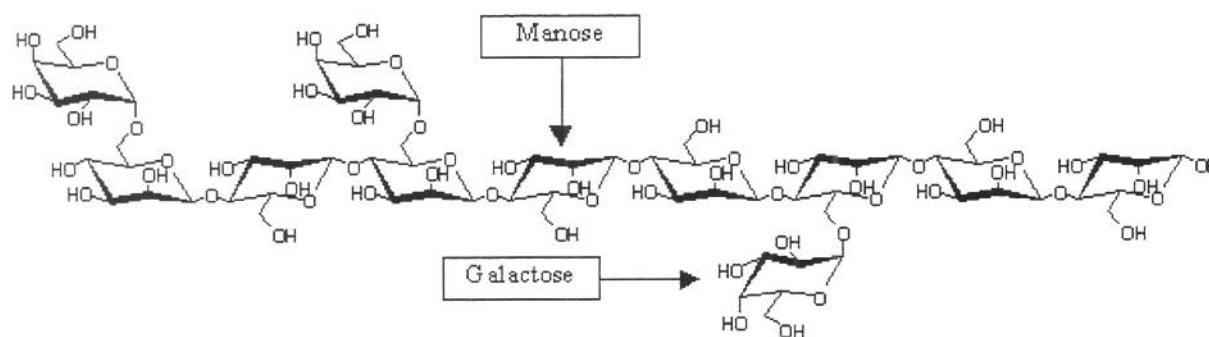
As observações acima sobre os mananos de mono e dicotiledôneas exceto leguminosas, sugerem que este polímero seja uma molécula bifuncional. O manano, nesse

caso, exerceria as funções de constritor e protetor mecânico do embrião e também de polissacarídeo de reserva (Buckeridge *et al.*, 2000a).

6.3.3 Galactomananos

6.3.3.1 Definição e estrutura

Os primeiros estudos com espécies que armazenam galactomananos em suas sementes foram realizados por Nadelmann em 1890, incluindo uma espécie tropical, *Schizolobium* sp. Hoje sabe-se que eles são solúveis em água e formam dispersões viscosas e estáveis absorvendo normalmente grande quantidade de água que, além de se distribuir ao redor do embrião, o protege contra a desidratação (Neukom, 1989; Buckeridge *et al.*, 2000b). São formados por uma cadeia linear de unidades de manose unidas por ligações glicosídicas β ,1-4, à qual unidades de galactose estão unidas por ligações do tipo α ,1-6 (Moe *et al.*, 1947; Unrau, 1961; Somme, 1968; Manzi & Cerezo, 1984):



Modelo Esquemático 1: Modelo esquemático da estrutura do galactomanano, mostrando o esqueleto central de manose e suas ramificações com unidades de galactose.

6.3.3.2 Ocorrência, taxonomia e propriedades

Os galactomananos ocorrem tipicamente em endospermas de sementes de leguminosas, mas eles também estão presentes em sementes de espécies de outras famílias como Asteraceae e Convolvulaceae (Dea & Morrison, 1975; Guzmán & Hernandez, 1982).

Sendo uma das maiores famílias no reino vegetal, Leguminosae (≈ 18.000 espécies) tem o maior número de espécies estudadas até hoje quanto à presença de galactomananos. A razão manose:galactose e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia de manose varia de espécie para espécie, sendo importante para estudos quimiotaxonômicos e evolutivos. Assim, os galactomananos, baseados na razão manose:galactose, variam entre 1:1 e cerca de 3,8:1, e podem ser sistematicamente classificados em dois grupos: os de elevada concentração de galactose (*high gal*) e os de baixa concentração de galactose (*low gal*) (Reid & Meier, 1970; Bailey, 1971).

Ainda no contexto taxonômico, as três subfamílias de Leguminosae (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae), podem ser distinguidas utilizando-se a condição da razão manose:galactose (M/G) desse polímero (para uma revisão ver Buckeridge *et al.*, 2000a). Além de constituir excelente parâmetro para estudos taxonômicos, a razão manose:galactose é também responsável por muitas das propriedades deste polímero, incluindo sua solubilidade e grau de interação com moléculas de celulose na estrutura da parede celular (Whitney *et al.*, 1998).

No que se refere à solubilidade em água, quando isolados, os galactomananos são claramente hidrofílicos, sendo que as soluções viscosas que formam são o principal foco de suas aplicações industriais (Edwards *et al.*, 2002). Por exemplo, a goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e a goma LBG (*Ceratonia siliqua*) utilizadas no presente trabalho, são usadas na indústria de alimentos como espessantes, estabilizadores e agentes geleificantes, sozinhos ou combinados com outros polissacarídeos (Dea & Morrison, 1975; Reid & Edwards, 1995). Neste enfoque, a razão manose:galactose é também extremamente importante como fator comercial, sendo que os galactomananos da categoria *low gal* (cerca de 3,8:1 na razão M/G) favorecem misturas ou interações comerciais com outros polímeros (Dea *et al.*, 1977).

Embora um grande número de espécies tenha sido relatado como acumuladoras de galactomanano em suas sementes (Dea & Morrison, 1975; Buckeridge & Dietrich, 1990; Ganter *et al.*, 1993; Buckeridge *et al.*, 1995a; Anulov *et al.*, 1998; Buckeridge *et al.*, 2000a), apenas algumas delas tiveram seu metabolismo pós-germinativo estudado em detalhe.

6.3.3.3 Mobilização

A importância do estudo da mobilização das hemiceluloses do grupo dos mananos é que, depois de isoladas, algumas das enzimas de degradação (responsáveis pela mobilização das reservas), podem ser utilizadas também como ferramentas na identificação da estrutura fina destes polissacarídeos (Reid & Edwards, 1995; Buckeridge *et al.*, 2000a). Pode-se saber, por exemplo, se o galactomanano estudado pertence à categoria *low gal* ou *high gal*. Neste aspecto, entre as espécies de leguminosas mais estudadas também estão a *Cyamopsis tetragonolobus* (que produz a goma guar) e a *Ceratonia siliqua* (que produz a goma caroba ou LBG), além da *Trigonella foenum-graecum*.

Nas sementes de *T. foenum-graecum* e *C. tetragonolobus* as células endospermicas não são vivas, sendo que, durante a maturação, o citoplasma é reduzido em função da deposição maciça do galactomanano nas paredes celulares (McClendon *et al.*, 1976; Reid, 1971). Estas sementes, como as sementes de *S. virgata*, apresentam uma camada de aleurona (**Figura 1**), a qual acredita-se ser responsável pela produção das enzimas hidrolíticas que promovem a degradação dos polissacarídeos de reserva da parede celular durante a germinação (Reid, 1985). Por outro lado, em sementes de *Ceratonia siliqua*, as células endospermicas são vivas e o galactomanano pode ser visto como um espessamento da parede. Neste caso, não há uma distinção clara entre o endosperma e a camada de aleurona, e as enzimas são, provavelmente, produzidas e liberadas dentro da parede celular pelas próprias células endospermicas.

A mobilização de galactomananos foi também estudada em outras espécies de leguminosas (Reid & Meier, 1972 e 1973; McCleary & Matheson, 1976; McCleary, 1983; Buckeridge *et al.*, 1995b; Buckeridge & Dietrich, 1996), sendo sempre detectada a presença de três enzimas hidrolíticas: a α -galactosidase (EC 3.2.1.22), endo- β -mananase ou β -1,4-manano-endo-hidrolase (EC 3.2.1.78) (Mo & Bewley, 2002) e β -manosidase (EC 3.2.1.25), confirmando que a mobilização do galactomanano ocorre através da hidrólise. Nesta, a α -galactosidase quebra as ligações α -1,6, removendo as unidades de galactose da cadeia lateral e a β -manosidase, hidrolisa os oligossacarídeos de manano, produtos da ação da endo-mananase (McCleary *et al.*, 1982). Em todos os casos estudados, o polissacarídeo é

desmontado até seus monossacarídeos constituintes (manose e galactose) ao mesmo tempo em que há produção de sacarose (Buckeridge *et al.*, 2000b).

No que se refere a estas três enzimas responsáveis pela degradação do galactomanano, na literatura, há mais relatos quanto aos estudos e descrições da endo- β -mananase. Conforme previamente citado, sabe-se, por exemplo, que sua ação controla a ação da β -manosidase, que só pode agir depois da ação hidrolítica da endo-mananase. Isto é, sob seu produto, oligossacarídeos desgalactosilados (mano-oligossacarídeos), clivando o restante da molécula (Mo & Bewley, 2002).

É possível que tal foco de atenção seja devido à ocorrência variada da enzima em múltiplas isoformas nas sementes estudadas em detalhe (Dirk *et al.*, 1995). Assim, a atividade desta enzima vem sendo detectada em regiões diferentes do endosperma das sementes que acumulam mananos e galactomananos e um número grande destas múltiplas isoformas vem sendo descrito em várias espécies tanto de monocotiledôneas como dicotiledôneas (Dirk *et al.*, 1995).

Essas endo-enzimas que hidrolisam mananos puros, vêm sendo apontadas como importantes em eventos germinativos (antes da protrusão da radícula) em sementes de *Lycopersicon esculentum* e em sementes de *Lactuca sativa* (Dirk *et al.*, 1995). Além disso, em eventos pós-germinativos de mobilização (após a protrusão da radícula) em paredes celulares do endosperma de alface e fenogrego (*Lactuca sativa* e *Trigonella foenum-graecum*, respectivamente) (Dirk *et al.*, 1995).

Uma vez necessária a presença de múltiplas isoformas espacial e temporalmente separadas desta enzima no desenvolvimento das sementes e admitindo que sua atividade é tão essencial em eventos germinativos como pós-germinativos, a endo-mananase tem sido aparentemente considerada a enzima mais importante do metabolismo de reserva das sementes que acumulam manano. Assim, na atualidade, suas seqüências e expressões gênicas vêm sendo cuidadosamente reportadas em tomate (LeMAN α , LeMAN 1, LeMAN 2) (Nonogaki *et al.*, 2000) e em café (Marraccini *et al.*, 2001).

Recentemente, um c-DNA da α -galactosidase foi obtido e seqüenciado em sementes de tomate (Feurtado *et al.*, 2001) e esta α -galactosidase apresenta alta homologia com outras galactosidases, especialmente com as de sementes de café (Zhu & Goldstein, 1994). Deste modo, o conhecimento de homologias entre mananases em diferentes grupos de

sementes e fungos é conhecido há mais tempo e em maior número em relação às galactosidases descritas.

Neste caso, a maioria das mananases parece ser funcionalmente homóloga (especialmente em seus modos de ação) às mananases de fungos, por exemplo em relação à preparação enzimática comercial Driselase (*Basidiomycetes* sp) (McCleary, 1980). Ainda sustentando a argumentação quanto ao caráter de homologia funcional entre as enzimas, segue abaixo uma tabela apontando algumas semelhanças no que se refere a ótimos de ação entre mananases de sementes e de fungos:

Tabela 1: Comparações evidenciando homologias entre mananases de diferentes fontes (McCleary, 1983)

Fonte da Mananase	Peso Molecular	P I	PH ótimo	Temperatura Ótima
Semente de Alfafa	41 Kda	4,5	4,5	50° C
<i>Basidiomycetes</i> sp	53 Kda	5,0 / 5,5	3,0	60° C
<i>Aspergillus niger</i>	45 kda	4,0	3,0	70° C
Suco digestivo de moluscos	37 kda	7,0 / 7,7	4,5 / 5,5	50° C
<i>Bacillus subtilis</i>	37 kda	5,1	5,0 / 6,0	50° C

Contrariamente à endo- β -mananase e à α -galactosidase, existe pouca informação sobre a β -manosidase. Sua atividade, que aumenta na presença do hormônio giberelina, foi constatada em sementes de tomate (Groot *et al.*, 1988), caroba e *Honey Locust*¹ (McCleary & Matheson, 1975), asparagus (Williams *et al.*, 2001). Assim, recentemente Mo & Bewley (2002) purificaram, clonaram e caracterizaram a primeira β -manosidase durante e após a

¹ *Gleditsia triacanthos* (Fabaceae) – uma leguminosa que pode chegar a 7 metros de altura que também armazena galactomanano em suas sementes.

germinação em sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), ou seja, a última das enzimas envolvidas na mobilização do galactomanano que faltava nestas sementes. Sendo que as outras duas, endo-mananase e α -galactosidase, já haviam sido isoladas e clonadas na mesma espécie (Nonogaki *et al.*, 2000 e Feurtado *et al.*, 2001, respectivamente). Mesmo assim, quanto à manosidase, pouco ainda se sabe sobre sua atividade em relação à germinação, mobilização e a degradação do galactomanano.

Esta degradação, por sua vez, é responsável pelo enfraquecimento do endosperma adjacente à ponta da radícula no desenvolvimento do embrião também em leguminosas. É possível que, da mesma forma, essas enzimas devam ocorrer a fim de permitir a protrusão da radícula, como observado em tomate (Groot *et al.*, 1988), melão (Welbaum *et al.*, 1995) e tabaco (Leubner-Metzger *et al.*, 1995).

Em todas as espécies de leguminosas estudadas, a mobilização do galactomanano inicia-se após a germinação (protrusão da radícula). Foi demonstrado que em endospermas de sementes de *Trigonella foenum-graecum* e *Ceratonia siliqua*, as enzimas endo- β -mananase para a primeira espécie e α -galactosidase para ambas as espécies são sintetizadas *de novo* (Reid & Meier, 1973; Seiler, 1977).

6.3.3.4 Regulação da degradação do galactomanano

Quando isolados e incubados em volumes relativamente pequenos de água, os endospermas de alface (Dulson *et al.*, 1988) e fenogrego (Spyropoulos & Reid, 1988) não tiveram seu galactomanano completamente degradado. Em contrapartida, observou-se sua completa degradação quando estes foram incubados em volumes significativamente maiores de água. Baseados nessas observações, esses autores sugeriram a existência de “inibidores de embebição”. Estes, de alguma forma, estariam influenciando o mecanismo de germinação, bem como a mobilização dos polissacarídeos de reserva através das hidrolases de parede celular. No entanto, esses mecanismos que controlam a atividade das enzimas hidrolíticas do galactomanano são desconhecidos e provavelmente correspondem ao principal meio de regulação da degradação de galactomanano, influenciando indiretamente os mecanismos germinativos e pós-germinativos.

Há indícios de que o ácido abscísico (ABA) possa estar envolvido na degradação de materiais de reserva durante a germinação de sementes, especialmente *S. virgata* (Potomati & Buckeridge, 2002), exercendo seu papel na inibição da síntese de enzimas relacionadas ao processo de degradação (Higgins *et al.*, 1982; Oishi & Bewley, 1990; Black, 1991; Malek & Bewley, 1991) e tendo um importante papel na germinação e conseqüentemente no estabelecimento da semente no ambiente (Ni & Bradford, 1993).

Atualmente sabe-se que sementes em desenvolvimento raramente germinam e, quando a germinação precoce ocorre, provavelmente há deficiências na produção ou sensibilidade ao ácido abscísico (Black, 1991; Hilhorst, 1995; Karssen, 1995). O acúmulo de ABA endógeno em sementes em desenvolvimento é menor durante os primeiros estágios, aumentando no decorrer do desenvolvimento, quando o galactomanano está sendo sintetizado, e declina quando a semente termina a germinação (Potomati & Buckeridge, 2002).

Hilhorst & Downie (1996) demonstraram, através de um trabalho com mutantes de tomate deficientes em ABA, que o hormônio citado tem a capacidade de prevenir a germinação, sendo que sementes deficientes em ABA apresentam um tegumento menos resistente, contribuindo para uma germinação mais rápida. Neste contexto, o ABA, uma vez que compromete a absorção de água pelo embrião de *S. virgata*, retardando também a ativação da α -galactosidase (Potomati & Buckeridge, 2002) pode inibir o crescimento da radícula (atraso germinativo) e, consecutivamente, a degradação do galactomanano.

Mesmo assim, alguns trabalhos divergem quanto ao efeito do ABA na mobilização do galactomanano. Berry & Bewley, (1991), por exemplo, levantaram uma hipótese de que a diferença de potencial osmótico, entre o endosperma e o embrião, é muito mais importante na regulação da germinação do que o ABA; hipótese confirmada em estudos feitos com grão de bico (Iglesias & Babiano, 1997) e com cevada e arroz (Yamada, 1984; Qin, 1990).

Em relação à giberelina, Groot & Karsen (1987), demonstraram que esse hormônio regula a germinação em sementes de tomate através da indução ao enfraquecimento do endosperma ao passo que, Spyropoulos & Reid (1985), sugeriram que o tecido endospermático, em leguminosas, estaria também sob o controle da giberelina, mas na presença de auxina.

6.3.3.5 Biossíntese

Em contrapartida às duas enzimas já citadas, num contexto histórico, o estudo da α -galactosidase parece ter concentrado enfoque em descrições de seu papel relacionado à biossíntese do galactomanano. A razão M/G é influenciada pela biossíntese deste carboidrato. Em 1989, Edwards *et al.*, demonstraram em extratos com células acumuladoras de galactomanano em suspensão, que duas enzimas, a manosiltransferase e a galactosiltransferase são as responsáveis pela biossíntese deste polímero *in vitro*. Sabe-se que existe uma correlação entre os níveis de manosil e galactosiltransferase e a deposição do galactomanano nas paredes em meio a sua síntese. Este manano puro presente no endosperma das sementes de *Senna occidentalis* (razão M/G 3,3:1), nos primeiros estágios de deposição, apresenta uma razão M/G de 2,3:1, ao passo que, nos últimos estágios desta, a razão rapidamente diminui para depois estabilizar em 3,3:1 (Edwards *et al.*, 1991).

Neste sistema fisiológico detalhadamente descrito por Edwards em 1991, os níveis da α -galactosidase aumentam proporcionalmente à diminuição dos níveis de manosil e galactosiltransferase em meio à biossíntese deste polissacarídeo. No decorrer da formação do galactomanano, precisamente nas últimas camadas de deposição na parede celular, a atividade desta enzima aumenta, sugerindo que o carboidrato é sintetizado e depositado com uma elevada razão M/G para depois diminuir (Edwards *et al.*, 1991). Isto explica as diferenças da razão M/G no decorrer da deposição do polímero na parede, bem como constitui excelente exemplo de “*turn over*” entre enzimas de síntese e de degradação.

Esses autores também estudaram a biossíntese em *T. foenum-graecum* e guar, observando que a remoção das ramificações por uma galactosidase não ocorre nas últimas camadas depositadas como em *Senna occidentalis*. Com base nesse resultados, concluíram que em *T. foenum-graecum* e guar, o controle genético da razão M/G em galactomananos é baseado apenas no mecanismo de biossíntese, enquanto em *S. occidentalis* o galactomanano produzido seria um resultado do mecanismo de biossíntese mais um processo de desramificação parcial do polímero por uma α -galactosidase.

7. A ESPÉCIE *Sesbania virgata*

Dentre as espécies, cujas sementes acumulam galactomananos, cita-se a *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (**Figura 3**), uma planta perene, reproduzida por sementes, cuja ocorrência é preferencialmente de locais úmidos ou alagados, bem como solos modificados (**Figura 3a**).

A *S. virgata*, pertence à família Leguminosae. Entre as famílias de plantas fanerógamas, Leguminosae consiste na terceira maior, depois da Asteraceae (Compositae) e Orchidaceae. Compreende cerca de 670 gêneros e 17500 espécies. A *Sesbania virgata* tem como sinônimos *Aeschynomene virgata* Cav., *Coronilla virgata* (Cav.) Willd. e *Sesbania marginata* Benth., sendo *Sesbania virgata* o nome taxonomicamente correto (Kissmann & Groth, 1999). No entanto, *Sesbania marginata* tem sido o nome mais utilizado nos trabalhos que se referem à degradação dos galactomananos (Buckeridge & Dietrich, 1996 e Buckeridge *et al.*, 2000a).

Popularmente essa espécie é chamada de “angiquinho-grande”, “angiquinho-gigante” ou mesmo “feijão-do-mato” no interior do Paraná. Ocorre em grandes concentrações no Paraguai, Uruguai, norte e nordeste da Argentina, bem como no sul do Brasil. No restante do país, sua distribuição é relativamente restrita, porém desequilíbrios no manejo têm determinado um aumento no número de suas populações (Kissmann & Groth, 1999).

Em relação à morfologia, esse arbusto pode atingir até 4 m de altura, mas geralmente não passa de 2 m. Seu florescimento e frutificação já podem ser notados com 40 cm de altura, sendo que apresenta florescimento anual. Suas flores são curto-pediceladas de cálice capuliforme, com cinco minúsculos dentes subiguais e corola amarela (**Figura 3b**). O caule é cilíndrico e altamente ramificado, daí o nome “virgata”, um adjetivo latino que quer dizer “cheio de varas”. Os frutos consistem em legumes estipitados e subarticulados. Apresentam de 4 a 7,5 cm de comprimento por 0,7 a 1 cm de largura (**Figura 3c**). Cada um desses frutos apresenta de 4 a 8 sementes riniformes (5 a 7,5 mm de comprimento) separadas por pseudo-septos corticosos (Kissmann & Groth, 1999).

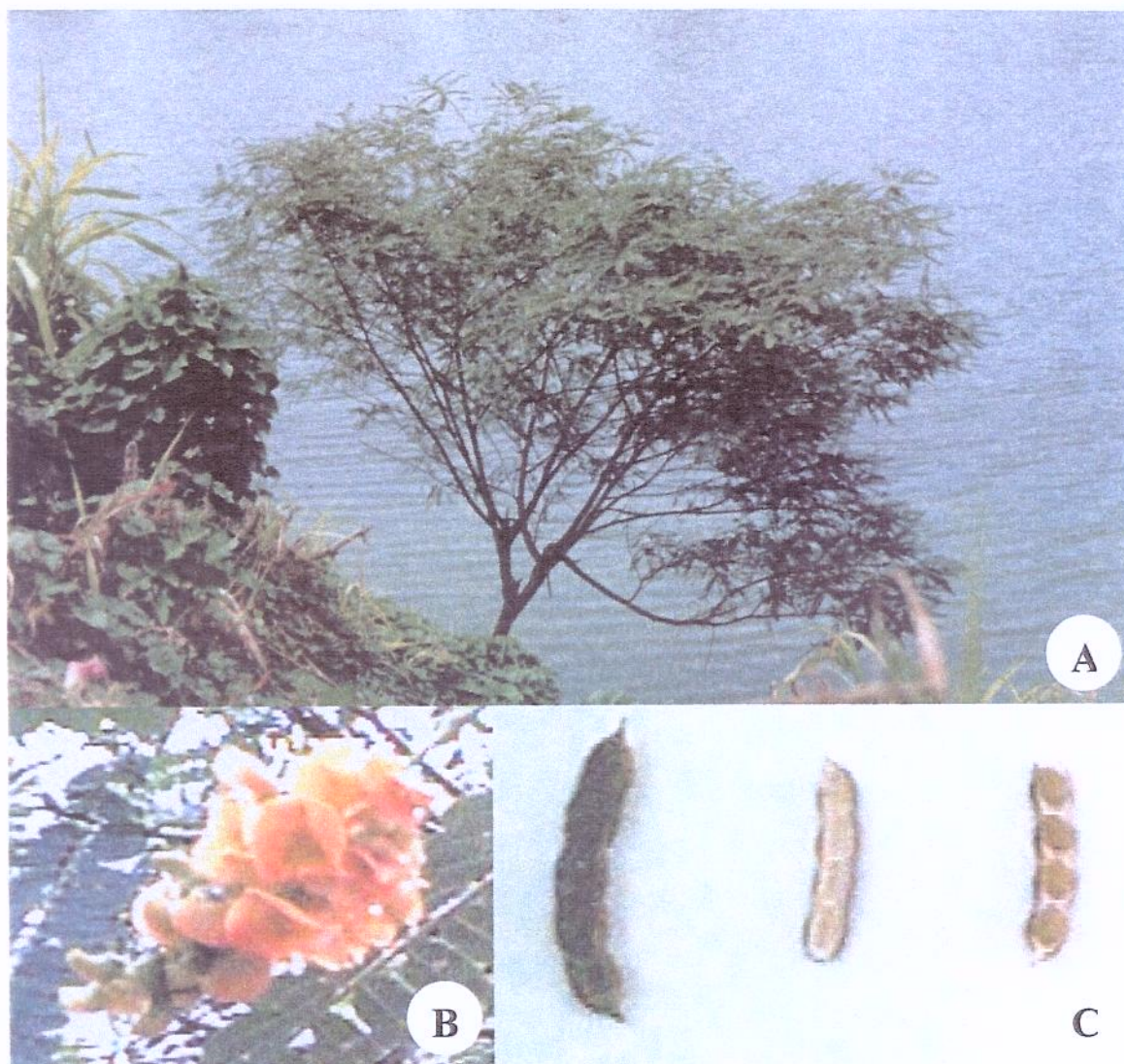


Fig. 3: Vista geral de um arbusto de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (A). Detalhe da flor, cujo aparecimento é anual (B). Detalhe da vagem ou fruto que contém as sementes (C). Na obtenção das sementes para estudo, as vagens são removidas e as sementes separadas.

7.1 Anatomia da semente de *Sesbania virgata* e germinação

A maioria das leguminosas, possui sementes com a cobertura protetora ou casca dividida em três camadas ou tegumentos: exotegumento (mais externo), mesotegumento (mediano) e endotegumento (mais interno) (**Figura 1**). Essa cobertura ou testa, por ser resistente, tem uma ação impermeabilizante, controlando a embebição de água. Essa impermeabilidade tem sido atribuída a diferentes regiões da camada paliçádica, principal camada constituinte desta casca (Cavazza, 1950; Corner, 1951; Werker *et al.*, 1973; Werker, 1980).

Anteriormente ao processo germinativo, a *S. virgata* apresenta tal tegumento impermeável à água. Desse modo, há necessidade de remoção dessa barreira para que a embebição ocorra. Com isso, há a entrada de água até os tecidos internos, inclusive o endosperma (Melo-Pinna *et al.*, 1999) e o início da germinação. *In vitro*, essa remoção é obtida através de processos de escarificação mecânicos, tendo o cuidado de preservar a integridade do embrião.

A resistência mecânica também pode ser exercida (conforme previamente citado no item 4) pelo próprio endosperma (**Figura 1**), que circunda todo o eixo embrionário localizando-se entre o cotilédone e o tegumento (**Figuras 4a e 4b**). No caso da *S. virgata*, o responsável por tal rigidez seria o galactomanano que estas sementes acumulam, principalmente antes de suas primeiras interações com a água.

Conforme acompanhada a anatomia da semente nas **Figuras 1 e 4b**, salienta-se que, como as posteriores discussões deste trabalho terão como parâmetro comparativo o sistema germinativo e pós-germinativo descritos em tomate, criou-se uma terminologia semelhante para discriminar as diferentes partes da semente (*Cap*, *Rad* e *Lat*) conforme Nonogaki *et al.* (2000).

Assim, o enfraquecimento do endosperma, através da degradação do galactomanano, adjacente à ponta da radícula (região *Cap*) deve ocorrer a fim de permitir a emergência da radícula (*Rad*) (**Figura 4a**), como observado em tomate (Groot *et al.*, 1988) e melão (Welbaum *et al.*, 1995). Acredita-se que, após a germinação, o processo de mobilização do galactomanano (não apenas na área *Cap*) ocorra na região *Lat* da semente (**Figuras 4a e 4b**) e o produto desta lenta mobilização seja rapidamente drenado para o embrião, explicando o motivo da localização dos carboidratos neste tecido.

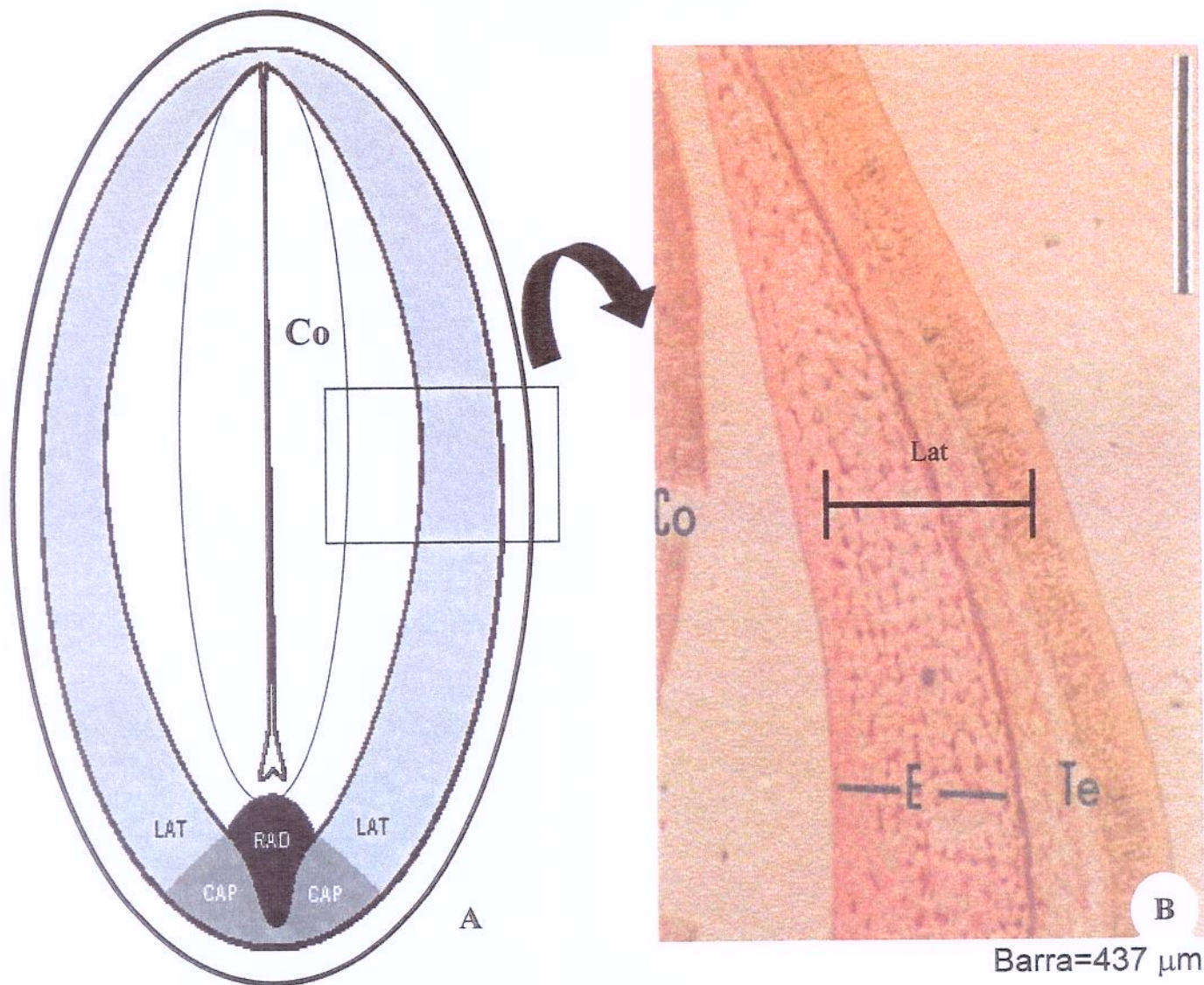


Fig. 4: Estrutura da semente de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **(A)** Modelo esquemático da semente mostrando três regiões distintas que apresentam atividade de endo- β -mananase temporalmente separadas: a região **Cap**, correspondente à área endospermática ao redor da radícula; a região **Rad** ou a ponta da radícula e a região **Lat**, correspondente ao restante do endosperma e testa na lateral da semente. **(B)** Corte transversal em microscopia de luz mostrando, além da região **Lat**, três regiões: **Co** (cotilédone), **Te** (tegumento, testa ou casca) e **E** (endosperma). Barra=437 μ m. Esquema elaborado pelo Dr. Marco Tiné e o Biol. César Lisboa, Departamento de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo e foto cedida pela Dra. Solange Mazzoni-Viveiros, Departamento de Anatomia e Morfologia do Instituto de Botânica de São Paulo.

Em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., certas proteínas se acumulam progressivamente nos vacúolos de células do endosperma transformando-se em corpos protéicos ou grãos de aleurona. Na camada de aleurona (**Figura 1**), há células isodiamétricas de paredes espessas onde muitos corpos protéicos se fragmentam no início da germinação, liberando aminoácidos e peptídeos (Yatsu & Jacks, 1968). Até o momento, acreditamos ser esta camada de aleurona a responsável pela síntese das três enzimas hidrolíticas do galactomanano em sementes de *S. virgata* (conforme citado anteriormente). Sendo que a principal, a endo-mananase, foi purificada, isolada e caracterizada neste trabalho.

Nos últimos anos, as sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) se tornaram um modelo freqüente para a análise de mecanismos fisiológicos e moleculares, bem como para a descrição da biologia celular durante a germinação (Hilhorst *et al.*, 1998; Welbaum *et al.*, 1998; Bradford *et al.*, 2000).

Assim, mesmo reconhecendo não tratar-se de uma leguminosa, neste trabalho usaremos as sementes de tomate, onde a atividade das três enzimas responsáveis pela degradação do galactomanano que essas sementes acumulam, já foram descritas em detalhe, como modelo comparativo. Nesse caso, após detalhar o isolamento e caracterização da endo-mananase de *Sesbania virgata*, não só discutiremos seu modo de ação em diferentes galactomananos, mas também, sua ação e influência na mobilização deste polissacarídeo durante e após a germinação em leguminosas.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como principais objetivos purificar e caracterizar a endo- β -mananase do endosperma de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e estudar seu papel durante a protrusão da radícula. Para atingir esses objetivos as seguintes metas foram estabelecidas:

- 1) detectar e caracterizar a endo- β -mananase em endospermas de sementes de *Sebania virgata*.
- 2) isolar a endo- β -mananase relacionada ao catabolismo do galactomanano após a germinação (110 horas).
- 3) compreender as condições ótimas de atuação hidrolítica da endo- β -mananase.
- 4) caracterizar o modo de ação da endo- β -mananase sobre mananos com diferentes graus de ramificação com galactose.
- 5) averiguar a existência de possíveis isoformas da enzima envolvidas na mobilização de reserva em diferentes locais da semente, relacionando com a germinação e as etapas do desenvolvimento da plântula.

9. MATERIAL BIOLÓGICO

Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foram coletadas de plantas cultivadas no canteiro experimental da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Jardim Botânico de SP, bem como na região urbana de São Bernardo do Campo.

Estas sementes possuem alta longevidade sendo obtidas altas percentagens de germinação (80%) até 4 anos após a coleta se as sementes forem armazenadas em frascos de vidro a temperatura ambiente.

Como fonte de extração de manano foram utilizadas sementes de *Euterpe edulis*, obtidas a partir de plantas cultivadas nos jardins da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Jardim Botânico de São Paulo.

Como fonte de extração de manano foram também utilizadas sementes de café (*Coffea robusta*), cedidas pela Companhia Iguaçu de Café Solúvel S/A.

Sementes de *Trigonella foenum-graecum* foram cedidas pelo professor J. S. Grant Reid da Universidade de Stirling, Escócia.

O anticorpo anti-endo- β -mananase foi preparado em coelhos contra endo- β -mananase de sementes de café e gentilmente cedido pelo professor Jarbas Georgini do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto.

10. MÉTODOS

10.1 Extração e quantificação dos carboidratos solúveis

10.1.1 Extração do galactomanano

Sementes de *Sesbania virgata* foram escarificadas mecanicamente com uma lixa e colocadas para embeber em água destilada, enquanto que as de *Trigonella foenum-graecum* foram colocadas para embeber sem escarificação. Após embebição por 24 horas as sementes de *S. virgata* foram seccionadas e o endosperma separado manualmente, ao passo que as de *T. foenum-graecum*, não tiveram seu endosperma removido e separado pois seu tamanho diminuto não permitiu uma boa separação deste tecido.

Endosperma (*S. virgata*) e semente inteira (*T. foenum-graecum*) foram deixados em estufa por outras 24 horas à temperatura de 50°C. Em seguida estes foram moídos em moinho de facas e extraídos (solução 1%) em água destilada por 4 horas a 70°C. Os homogeneizados foram filtrados em nylon, submetidos à precipitação com etanol (3 volumes) e colocados por 18 horas a 5°C.

A lavagem de ambos os precipitados foi feita inicialmente com etanol puro e depois acetona. Os precipitados lavados foram solubilizados em água a 60 °C, centrifugados e o sobrenadante, liofilizado. Para as dosagens de atividade de endo-mananase, os dois galactomananos liofilizados foram resolubilizados a 1% em água destilada.

Os pós dos galactomananos de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) e *Ceratonia siliqua* (LBG) foram importados da Empresa Sigma e homogeneizados em água destilada em temperatura ambiente na concentração 1%.

10.1.2 Extração do manano

Sementes de *Euterpe edulis* (palmeira) e de *Coffea robusta* (café) foram coletadas, lavadas e colocadas em estufa por 4 horas em uma temperatura de 45°C. Em seguida, esmagadas em prensa, para depois serem trituradas em moinho de facas.

Uma solução a 10% de concentração do pó das sementes em NaOH 4 M foi preparada com uma pitada de boroidreto de sódio para evitar hidrólise alcalina. As soluções

permaneceram agitando por 24 horas em temperatura ambiente, para depois serem submetidas a uma centrifugação a 10000 g por 30 minutos. Ambos os sobrenadantes foram coletados e neutralizados com ácido acético glacial (100%).

As soluções neutralizadas foram dialisadas contra água destilada e, posteriormente, separadas a parte solúvel da parte insolúvel, que foram liofilizadas separadamente.

10.1.3 Determinação de carboidratos

A presença dos açúcares totais dos extratos foi determinada pelo método do fenol-sulfúrico (0,5 ml de extrato; 0,5 ml de fenol 5% e 2,5 ml de ácido sulfúrico P.A.) segundo Dubois *et al.* (1956). Sendo usada glucose (100 µg/ml) como padrão para a quantificação das amostras.

10. 2 Extração e purificação da endo-β-mananase

10.2.1 Preparação do extrato enzimático de sementes com 110 h de germinação

Sementes de *Sesbania virgata*, foram escarificadas e postas a germinar por um período de 110 horas. Após este período, os endospermas e as cascas (testa) foram coletados e os eixos embrionários das sementes removidos e descartados. No gelo, os endospermas junto com as testas foram homogeneizados em solução tampão Tris HCl 20mM pH 7,8. O extrato enzimático bruto também foi preparado pela homogeneização em acetato de sódio e cloreto de sódio pH 5,0 de concentração igual a 50mM.

Ambas as misturas foram filtradas em nylon e centrifugadas a 10000 g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. Sendo que considerou-se o sobrenadante como extrato bruto enzimático, após diálise.

10.2.2 Preparação do extrato enzimático no período de germinação até 40 h

Sementes de *Sesbania virgata*, foram escarificadas e postas a germinar. O experimento se estendeu de 10 a 40 horas de germinação, sendo que os extratos foram preparados a cada 5 horas. Neste experimento, preparou-se três diferentes tipos de extrato, baseados em regiões

distintas na semente. No primeiro, os endospermas e as cascas (testa) foram coletados na lateral da semente (*Lat*). No segundo, homogeneizou-se para a preparação do extrato, apenas o endosperma e a casca na região ao redor do local de protrusão da radícula (*Cap*). No terceiro, os extratos foram preparados com a ponta da radícula da semente (*Rad*) (**Figura 4**).

No gelo, as três diferentes regiões de tecido seccionadas com bisturi, foram homogeneizadas em solução tampão Tris HCl 20mM pH 7,8, da mesma forma. As concentrações (massa de tecido / volume de tampão) no preparo dos diferentes extratos foram as mesmas (0,038 g/ml). Após homogeneização, as três misturas foram filtradas em nylon e centrifugadas a 10000 g por 20 minutos a 5° C. Os sobrenadantes foram então coletados e os precipitados, descartados.

10.2.3 Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi obtida utilizando-se os extratos como amostras a serem dosadas e albumina de soro bovino (BSA) 1 mg/ml como padrão, juntamente com a solução reagente de Comassie Brilliant Blue 0,01% m/v (Bradford, 1976). Preparou-se um tubo controle com o volume correspondente das demais amostras. Com o volume de reagente fixo (40 µl), uma curva de concentração de proteína no padrão foi obtida com massas de 20, 30, 40 e 50 µg respectivamente, sendo que se completou com água até que todos os pontos atingissem o volume final de 200 µl. Para a leitura das amostras, utilizou-se o volume de extrato igual a 80 µl, 40 µl de reagente, completando com água até o volume final (200 µl).

Utilizou-se também como referência para acompanhar as frações com proteína, um método de leitura das amostras diretamente em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm, obedecendo a seguinte relação: quanto maior a absorbância, maior o teor protéico. Este clássico método foi importante porque serviu como referência para acompanhar a coleta das frações de eluição em qualquer uma das colunas utilizadas na purificação, ou seja, as amostras foram coletadas apenas enquanto havia leitura nesse comprimento de onda.

10.2.4 Ensaio Viscosimétrico

A solução para ensaio viscosimétrico foi preparada a partir de 500 µl de substrato galactomanano a 0,5% em água destilada, 50 µl de tampão acetato de sódio 1M pH 4,5 (com ou sem a adição de 62,5 mM de galactose) e 50 µl de extrato enzimático. A atividade enzimática foi detectada através da estimativa da viscosidade da mistura de incubação, ou seja, pelo tempo de escoamento de uma seção de 0,1 ml por uma pipeta graduada de 0,2 ml. A determinação da atividade catalítica, expressa em unidades viscosimétricas, é arbitrariamente definida pela fórmula: $U_{\text{visc}} = (100/t_{0,5})$; onde $t_{0,5}$ corresponde ao tempo necessário para a atividade enzimática reduzir a viscosidade de uma solução a metade de seu valor inicial (Alcântara, 1995).

Para facilitar a manipulação de uma grande quantidade de amostras, a unidade viscosimétrica (arbitrária), também foi calculada através da diferença do tempo de escoamento inicial e final da solução para ensaio (citada acima), no mesmo volume de 0,1 ml de uma pipeta graduada de 0,2 ml durante uma incubação de 20 min a 45°C. Esta diferença aumenta proporcionalmente à medida que existe uma maior atividade hidrolítica da enzima, fornecendo assim, uma estimativa confiável da atividade catalítica na amostra a ser dosada.

10.2.5 Ensaio de atividade da α -galactosidase

Os ensaios de atividade da α -galactosidase foram realizados com substrato sintético pNP- α -D-galactopiranosídeo (Potomati & Buckeridge, 2002), sempre com o objetivo de verificar se a α -galactosidase em algum momento se separaria da endo- β -mananase. As misturas foram incubadas a 45°C por 45 minutos: 10 µl de substrato sintético pNP- α -D-galactopiranosídeo 50 mM, 50 µl de extrato enzimático e 10 µl de tampão acetato de sódio pH 4,5 1 M. Juntamente com esta mistura, foi utilizado um tubo controle que foi incubado paralelamente, contendo 10 µl de substrato sintético e 60 µl de tampão. A incubação foi interrompida com 200 µl de carbonato de sódio (0,1 N). As leituras das absorbâncias foram efetuadas no comprimento de onda de 405 nm. As leituras para a detecção das atividades foram efetuadas no aparelho Elisa modelo 3550-w.

10.2.6 Cromatografia de troca iônica DEAE-celulose

A matriz de DEAE-celulose foi hidratada em tampão Tris HCl 200 mM pH 7,8 e, em seguida, reequilibrada para uma concentração de 20 mM do mesmo tampão. Após cerca de cinco lavagens, a matriz foi depositada em uma coluna de vidro de 250 ml. Um gradiente de concentração de NaCl, variando de 0 a 0,5 M em tampão Tris HCl pH 7,8 na concentração de 20 mM, foi aplicado para a eluição das proteínas retidas.

O experimento foi efetuado em duas colunas de mesmo volume (250 ml), o volume do extrato aplicado também foi o mesmo. Assim aplicou-se 1,7 litros de extrato bruto, sendo que, para a eluição das proteínas retidas, utilizou-se um gradiente de NaCl de volume final igual a 200 ml. Após a eluição das proteínas com o gradiente e coletadas as frações de 4 ml, reuniu-se 130 ml de extrato com atividade de endo-mananase e α -galactosidase (*pool* DEAE). Desta forma, após repetição do passo nas mesmas condições, reuniu-se 260 ml do extrato concentrado com ambas as enzimas.

10.2.7 Cromatografia de afinidade Sepharose Concanavalina A

Na preparação da coluna, o gel de Sepharose Concanavalina A (Sigma Chem. Co) foi suspenso em tampão Tris HCl 20 mM com a adição de cloreto de sódio 1 M, cloreto de magnésio 1 mM, cloreto de cálcio 1 mM e cloreto de manganês 1 mM. Uma coluna de 37 ml foi montada e após a coleta das frações iniciais que eluíram proteínas que não se ligaram à Concanavalina A, passou-se uma concentração de 250 mM de α -metil-glucopiranosídeo, responsável pela eluição da endo-mananase e sua contaminante, a α -galactosidase.

Nessa coluna, foram aplicados 250 ml da reunião das frações da coluna DEAE-celulose após a aplicação do gradiente de NaCl (*pool* DEAE) e coletadas as primeiras 40 frações de 8 ml e as últimas 40, de volume igual a 4 ml por fração. A reunião das frações livres da contaminação pela α -galactosidase totalizou um volume final de 40 ml.

10.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise qualitativa das proteínas foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), bem como β -mercapto-etanol e,

empregando um sistema de tampão descontínuo baseado no método descrito por Laemmli (1970). As eletroforeses foram feitas em mini-géis de 0,75 mm de espessura (9 x 6 cm) contendo 10% de concentração de acrilamida. As corridas foram feitas em equipamentos da Bio Rad (EUA), mantendo corrente de 20 mA por cerca de 1,5 h, tempo necessário para o marcador alcançar a extremidade inferior do gel.

O material proteico foi corado por imersão em solução de Coomassie Brilliant Blue R250 0,1% dissolvido em água:metanol:ácido acético glacial (5:5:2 – v/v/v) durante 30 minutos à temperatura ambiente e sob agitação contínua. Em seguida, o gel foi mantido em solução descolorante contendo metanol 10% e ácido acético glacial 7,5% em volume, sob agitação contínua e trocas freqüentes da solução (Hames, 1990).

A coloração do material protéico também foi efetuada pela impregnação pela prata segundo descrito por Dion & Pometi (1983) e Gottlieb & ChavKo (1986), seguindo as seguintes etapas:

- incubação por 12h em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10% em água deionizada);
- incubação por 15 min. em solução incubadora (6,8 g de acetato de sódio em água, 30 ml etanol 96 GL, 0,4 g de tiosulfato de sódio, 0,52 ml glutaraldeído 25% colocado na hora do uso e 100 ml de água q.s.p.);
- Lavagem com água deionizada, 3 x 10 min;
- incubação em solução de nitrato de prata (0,1 g em 0,020 ml de formaldeído colocado na hora do uso e água deionizada q.s.p. 100 ml) por 20 min;
- incubação em solução reveladora (2,5 g carbonato de sódio, 0,010 ml de formaldeído colocado na hora do uso e água deionizada q.s.p. 100 ml) por cerca de 15 a 20 min;
- incubação em solução “Stop” (1,46 g de EDTA sódico dihidratado e água q.s.p. 100 ml) por 10 min;
- Lavagem em água corrente por 2 h no mínimo;
- Conservação em glicerol 10%;

A determinação do peso molecular das bandas de proteínas do gel foi feita pelo cálculo do Rf da proteína de interesse e sua localização na curva de calibração traçada com os valores das proteínas marcadoras *versus* os logaritmos de seus pesos moleculares, conforme Weber & Osborn (1969). Os marcadores de peso molecular utilizados foram a

fosfatase B (97,7KDa), albumina de soro bovino (66,2 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (31 KDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 KDa) e uma lisosima (14,4KDa), todas adquiridas da Bio Rad.

10.3 Caracterização da endo- β -mananase de 110 horas de germinação

10.3.1 Detecção de atividade durante e após a germinação

Sementes de *Sesbania virgata* foram escarificadas, divididas em grupos de 5 sementes por placa de Petri. Cada placa continha papel de filtro umedecido com 5 ml de água destilada.

Para a extração da mananase pós-germinativa, realizou-se um experimento onde, a cada 24 horas, o lote era coletado, os endospermas e testas eram isolados e submetidos à extração enzimática. As atividades foram determinadas por viscosimetria (item 10.2.4) em cada período e o tempo de 110 h foi adotado para todos os demais procedimentos.

Para a extração da mananase germinativa, do mesmo modo, estabeleceu-se intervalos de 5 h para a coleta e extração da mananase para o material não germinado. Três extratos de concentração equivalente de proteínas foram preparados em tampão Tris-HCl 20mM e pH 7,8, um de endospermas e testas na área da protrusão da radícula (*Cap*), outro também de endospermas e testas na região correspondente à lateral da semente (*Lat*) e o último, preparado com a radícula da semente (*Rad*). As atividades foram determinadas por viscosimetria (item 10.2.4) em cada período de preparo dos extratos.

10.3.2 Cromatografia de Exclusão Molecular

Para a detecção do peso molecular da endo-mananase em gel filtração, utilizou-se a resina resina Bio Gel P-60 (hidratada em tampão Tris HCl 20 mM pH 7,8) em uma coluna de 95 cm altura, 2 cm de diâmetro e volume igual a 245 ml. Aplicou-se 5 ml da reunião das amostras do *pool* DEAE-celulose (após a aplicação do gradiente), sendo que foram coletadas amostras de 3,5 ml.

10.3.3 pH ótimo da endo- β -mananase

O substrato galactomanano de *Sesbania virgata* (item 10.1.1) e o extrato referente a 110 horas de germinação (item 10.2.1) foram incubados a 30° C em diferentes pHs, obtidos com tampão citrato fosfato na concentração de 0,5 M. Para os ensaios de medição de atividade foram utilizados 500µl de galactomanano a 0,5%, 50µl de tampão citrato fosfato e 50µl de extrato referente a 110 horas de germinação. A atividade, dada pela própria queda de viscosidade do galactomanano durante o ensaio viscosimétrico (item 10.2.4), foi medida a cada 4 minutos até um tempo final correspondente a 12 minutos nos diferentes pHs avaliados.

10.3.4 Temperatura ótima da endo- β -mananase

Para as dosagens de atividade, foram utilizados 500 µl de substrato galactomanano de *Sesbania virgata* a 0,5%, 50 µl de tampão acetato de sódio pH 4,5 e 50 µl de extrato correspondente a 110 horas de germinação. A endo- β -mananase foi incubada numa faixa de temperatura de 0 e 55°C.

10.3.5 Focalização Isoelétrica

A focalização isoeletrica foi obtida através do sistema Rotofor (Bio Rad). Uma alíquota de 5 ml do extratos enzimático provenientes das frações coletadas após a aplicação do gradiente NaCl na coluna de troca iônica DEAE-celulose, foi dialisada contra tampão acetato de amônio 5 mM pH 5,0. Adicionou-se 3 ml de solução de anfólinas da BioRad cobrindo a faixa entre 3 e 10 de pH, completando com extrato e água deionizada até 60 ml de volume.

A corrida de eletrofocalização foi realizada com potência constante entre 10 a 20 W, em equipamento refrigerado, monitorando-se a variação de voltagem até estabilização da mesma. Isto aconteceu em cerca de 3 horas de corrida, mantendo o equipamento em funcionamento por mais de 1 hora, o que permitiu uma boa focalização.

Foram determinadas as atividades enzimáticas nas diferentes frações. A identificação dos pontos isoeletricos ou da localização das possíveis hidrolases contaminantes foi efetuada através de substratos específicos (pNP-glicosídeos).

Após a análise de um gráfico de pH das frações do Rotofor, pelas suas atividades enzimáticas, definimos as frações a serem reunidas. Estas, contendo as atividades de interesse, tiveram seu volume completado com água deionizada e foram submetidas a uma segunda focalização isoeletrica. Observando os mesmos critérios da primeira corrida. Este segundo experimento, tornou mais precisa uma definição do ponto isoeletrico das enzimas.

10.3.6 Estabilidade da endo- β -mananase

O extrato enzimático bruto foi incubado em tampão acetato de sódio 1M pH 5,0 e em tampão Tris HCl 0,5M pH 7,8 por 5 dias a 30°C. A cada dia, as atividades eram medidas seguindo o mesmo protocolo, 500 μ l de galactomanano de *Sesbania virgata* a 0,5%, 50 μ l de tampão (acetato de sódio ou Tris HCl) e 50 μ l de extrato.

10.3.7 Efeito do tampão de extração na estabilidade da endo- β -mananase

Em um intervalo de 24 a 168 horas, foram obtidos extratos enzimáticos foram efetuados a cada 24 horas de duas formas distintas. A primeira em tampão Tris-HCl 20mM pH 7,8 e a segunda em tampão acetato de sódio contendo cloreto de sódio, na proporção 1:4 e pH 5,0. Em seguida, as atividades da enzima foram medidas e seu perfil catalítico foi acompanhado e analisado.

10.3.8 Ação da endo- β -mananase sobre diferentes substratos

Alíquotas referentes à reunião de amostras (após a aplicação do gradiente de NaCl) da coluna de troca iônica DEAE-celulose foram incubadas com galactomananos de diferentes graus de ramificação. A razão manose:galactose dos diferentes tipos de galactomananos usados, eram todas conhecidas da literatura. Foram usados o galactomanano de *Trigonella foenum-graecum* (razão M/G 1:1, Reid & Meier, 1970), galactomanano de *Cyamopsis tetragonolobus*² (razão M/G 2,6:1, McCleary, 1983) galactomanano de *Ceratonia siliqua*

² Comercialmente conhecido como Goma Guar.

(Locust bean gum - LBG³) de razão M/G 3,8:1 (Dea & Morrison, 1975), galactomanano de *Sesbania virgata* (razão M/G 2:1, Buckeridge & Dietrich, 1990).

Incubou-se 60µl de extrato combinado (contendo α -galactosidase e endo-mananase) da DEAE-celulose e de extrato contendo a mananase pura (Concanavalina A) com 500µl dos diferentes substratos na concentração de 0,5%. Quando não realizados com a reunião das amostras contendo endo-mananase purificada, os ensaios foram realizados em temperatura e pHs ótimos com e sem adição de 62,5 mM de galactose no ensaio de atividade.

Para a obtenção desta concentração inibitória da α -galactosidase de *S. virgata*, ensaios enzimáticos com substrato sintético pNP- α -galactopiranosídeo foram realizados com as amostras reunidas da coluna DEAE-celulose, num gradiente de concentração de 0 a 62,5 mM de galactose.

As quedas de viscosidade (atividade enzimática), foram detectadas em: 0, 4, 8, 12, 30 e 60 min. Um tubo controle foi incubado paralelamente para certificar que nenhuma alteração viscosimétrica se daria em função do aquecimento prolongado dos substratos.

10.4 Imunolocalização da Endo- β -mananase e possíveis isoformas

10.4.1 Dot blot

Trinta sementes de um experimento que se estendeu do primeiro ao quinto dia de germinação em água, foram coletadas. Estas foram dissecadas, separando-se embrião, cotilédone, endosperma e tegumento. Os materiais obtidos foram homogeneizados separadamente em solução tampão Tris-HCl 50mM pH 7,8. Após a filtração em nylon e centrifugação a 10000 g por 10 minutos, obteve-se um sobrenadante que foi submetido à dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976). De cada extrato foi retirado um volume correspondente a 100µg de proteínas, que foram liofilizados e ressuspensos em 100µl de Tris-HCl 50mM pH 7,8.

Os extratos foram, então, aplicados em uma membrana de nitrocelulose (Wilians *et al.*, 2001), em um volume correspondente de 4 µg de proteínas (sendo para endosperma a

³ Comercialmente conhecido como Goma Caroba.

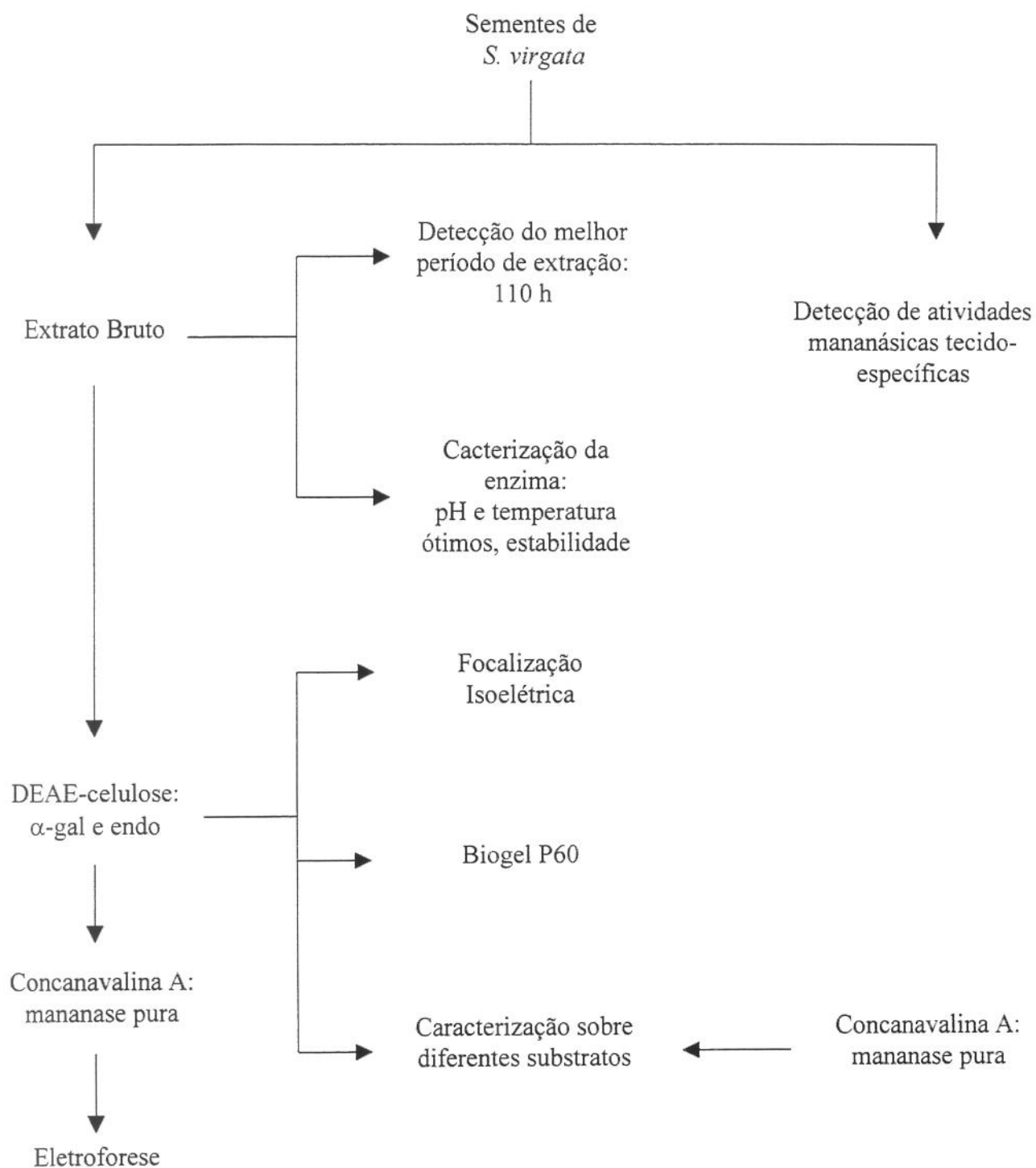
concentração reduzida pela metade). Posteriormente, a membrana passou por todo o processo de imunolocalização descrito abaixo.

As membranas, foram incubadas numa solução de bloqueio contendo 0,1% de gelatina, 1% de BSA (albumina de soro bovino) em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0 contendo algumas gotas de Tween 20, por 3 horas. Após o bloqueio foram incubadas durante uma noite em 3ml de solução contendo anticorpo anti-endo- β -mananase de café, diluído na proporção de 1: 200 em tampão fosfato PBS pH 7,0.

As membranas foram, então, lavadas por dez minutos, por quatro vezes, com 50mM de Tris-HCl, pH 7,4, sendo incubadas por mais uma hora em 3 ml de solução contendo um segundo anticorpo anti-imunoglobulina de coelho, retirados de cabra, conjugado com peroxidase diluído na proporção de 1:200 em tampão fosfato PBS, pH 7,0. As membranas, após a incubação, foram lavadas novamente, quatro vezes por dez minutos, com tampão 50mM Tris-HCl, pH 7,4.

Após todo o processo, foi adicionado às membranas, sob agitação constante, diaminobenzidina – DAB (0,05g em 100 ml 50mM Tris-HCl, pH 7,4) e peróxido de hidrogênio 0.03%. A reação foi interrompida pela lavagem com água. As membranas foram, então, analisadas, sendo que a presença de reação, caracterizada por coloração escura na região de aplicação do extrato, indica a presença da enzima endo- β -mananase ou, possivelmente, a localização de suas isoformas.

Uma noção generalizada dos procedimentos metodológicos relacionados à purificação, caracterização e detecção das atividades da endo- β -mananase em diferentes etapas de desenvolvimento e regiões da semente de *S. virgata*, podem ser acompanhadas pelo **Fluxograma 1**.



Fluxograma 1: Através do fluxograma acima, pode-se acompanhar os procedimentos metodológicos que envolveram a purificação, caracterização e detecção das atividades da endo-β-mananase em diferentes regiões da semente de *Sesbania virgata*.

11. RESULTADOS

11. 1 Purificação da endo- β -mananase

11.1.1 DEAE-celulose

Fez-se uso da técnica cromatográfica de troca iônica DEAE-celulose como primeiro passo de purificação (**Figura 5A**). Aplicando-se o extrato bruto em uma coluna de 250ml de volume, pôde-se notar que a atividade deste (via viscosimetria) se concentra após sua passagem pela coluna (**Tabela 2**). Ainda na tabela, mesmo tendo eliminado parte da endo-mananase, observa-se que esse passo de purificação também eliminou muitas proteínas contaminantes acarretando em um considerável aumento de atividade específica, mesmo considerando o fato da mananase ter eluído em conjunto com sua principal contaminante, a α -galactosidase (**Figura 5A**).

11.1.2 Coluna de afinidade Sepharose Concanavalina A

A **Figura 5B** mostra o perfil de eluição das frações reunidas da DEAE-celulose após a aplicação do gradiente de NaCl (**Figura 5A**) contendo as atividades da endo-mananase e da α -galactosidase após a aplicação direta de α -metil-glucopiranosídeo na concentração de 250mM, a partir da fração 40 (seta vazada).

Observa-se que houve concentração da atividade da α -galactosidase, enquanto a atividade da endo-mananase parece ter se espalhado a ponto de podermos reunir algumas frações livres da contaminação pela α -galactosidase (da fração 60 até a 70, representadas pelas setas pretas da **Figura 5B**). Após quantificação de proteínas, estas frações reunidas foram submetidas a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e uma única banda foi detectada após revelação com prata (**Figura 6B**). Esse passo, apesar de fornecer a banda pura na análise por eletroforese, parece não ter favorecido o aumento de atividade específica (**Tabela 2**).

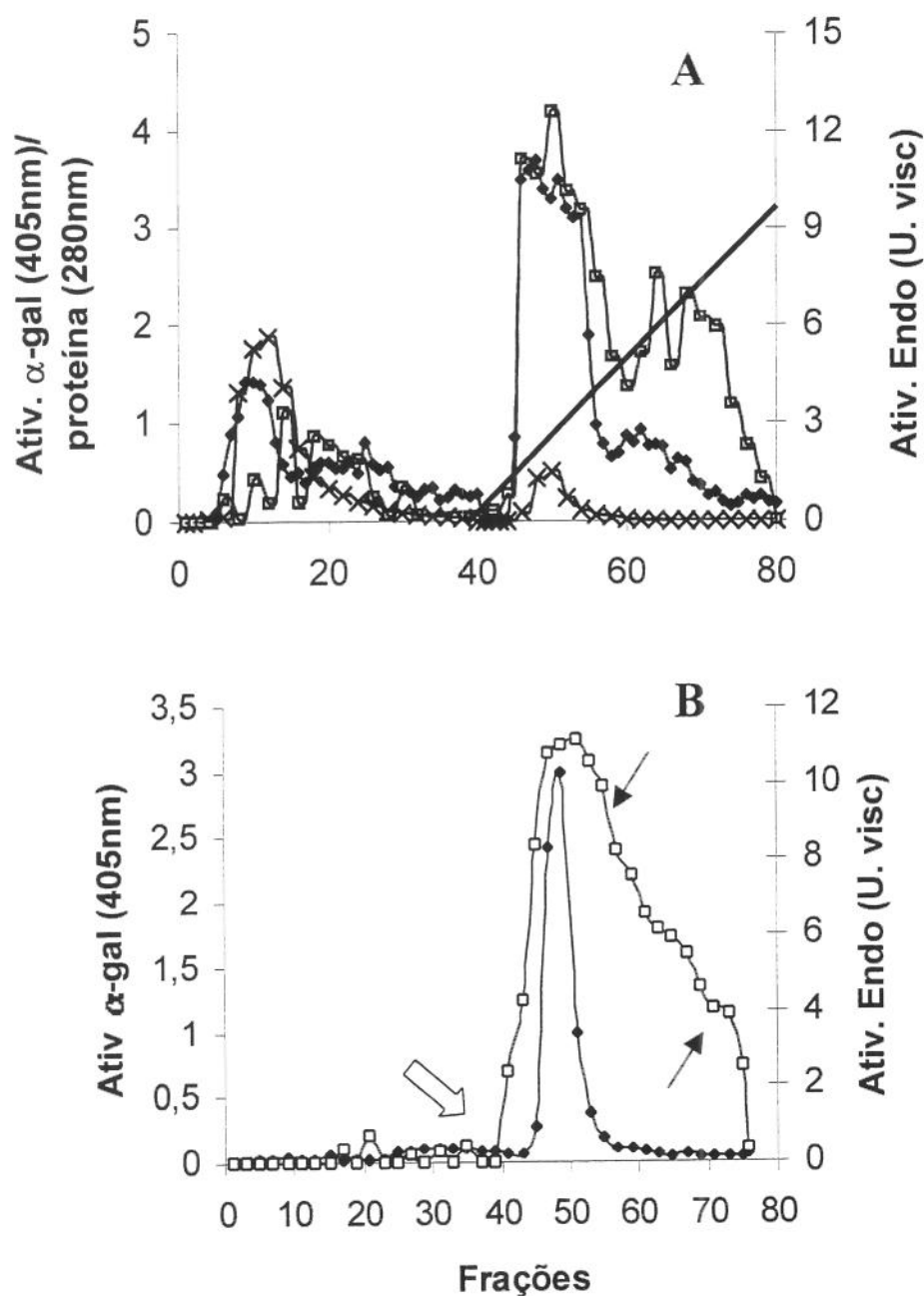


Fig. 5: Passos para a purificação da endo- β -mananase. **A:** Perfil de eluição das atividades de endo-mananase ($\square$) e α -galactosidase ($\blacklozenge$) em coluna de troca iônica DEAE-celulose, bem como o perfil protéico das amostras em leitura a 280 nm ($\times$). A linha inclinada representa um gradiente de concentração de 0 a 0,5 M de NaCl a partir da fração 40. **B:** Perfil de eluição das atividades de endo-mananase ($\square$) e α -galactosidase ($\blacklozenge$) em coluna de afinidade Sepharose-Concanavalina A, onde a seta vazada representa a aplicação de α -metil-glucopiranosídeo na concentração de 250 mM. As frações entre as setas negras foram reunidas e submetidas à eletroforese.

Tabela 2: Purificação da endo-mananase do endosperma das sementes de *Sesbania virgata*

Passos de purificação	Proteína Total (mg)	Ativ. Total (U.visc / vol.)	Ativ. Específica (U.visc / mg prot)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Bruto	11333,33	680000	600	1	100
DEAE	13,88	65000	4683	7,8	9,6
Con A	1,9	8800	4632	7,7	1,3

11. 2 Caracterização da endo- β -mananase

11.2.1 Bio Gel P-60

Foi aplicada a reunião das frações (após aplicação do gradiente de NaCl) provenientes da DEAE-celulose (**Figura 5A**) em uma coluna de exclusão molecular Bio Gel P-60, cuja resina fora hidratada em tampão Tris HCl pH 7,8. A resina foi calibrada com proteínas marcadoras de peso conhecido para a aplicação de 3 ml de extrato concentrado (*pull* DEAE) contendo a endo-mananase e a α -galactosidase.

Na **Figura 6A**, pode-se notar que houve separação das enzimas. Sendo que a α -galactosidase eluiu primeiramente em um volume corresponde a 45 KDa (corroborando com resultados anteriores ainda não publicados, Buckeridge & Dietrich – comunicação pessoal) enquanto que a endo-mananase eluiu logo em seguida num volume correspondente à moléculas com 36 KDa. Isto permitiu o cálculo mais preciso de seus pesos moleculares.

11.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Na **Figura 6B** acompanha-se em **1** o padrão de proteínas da Bio Rad corado com Coomassie Brilliant Blue R250 0,1%. O peso de suas respectivas bandas é encontrado ao lado (Daltons). Em **2** tem-se o resultado da reunião das frações de 60-70 da **Figura**

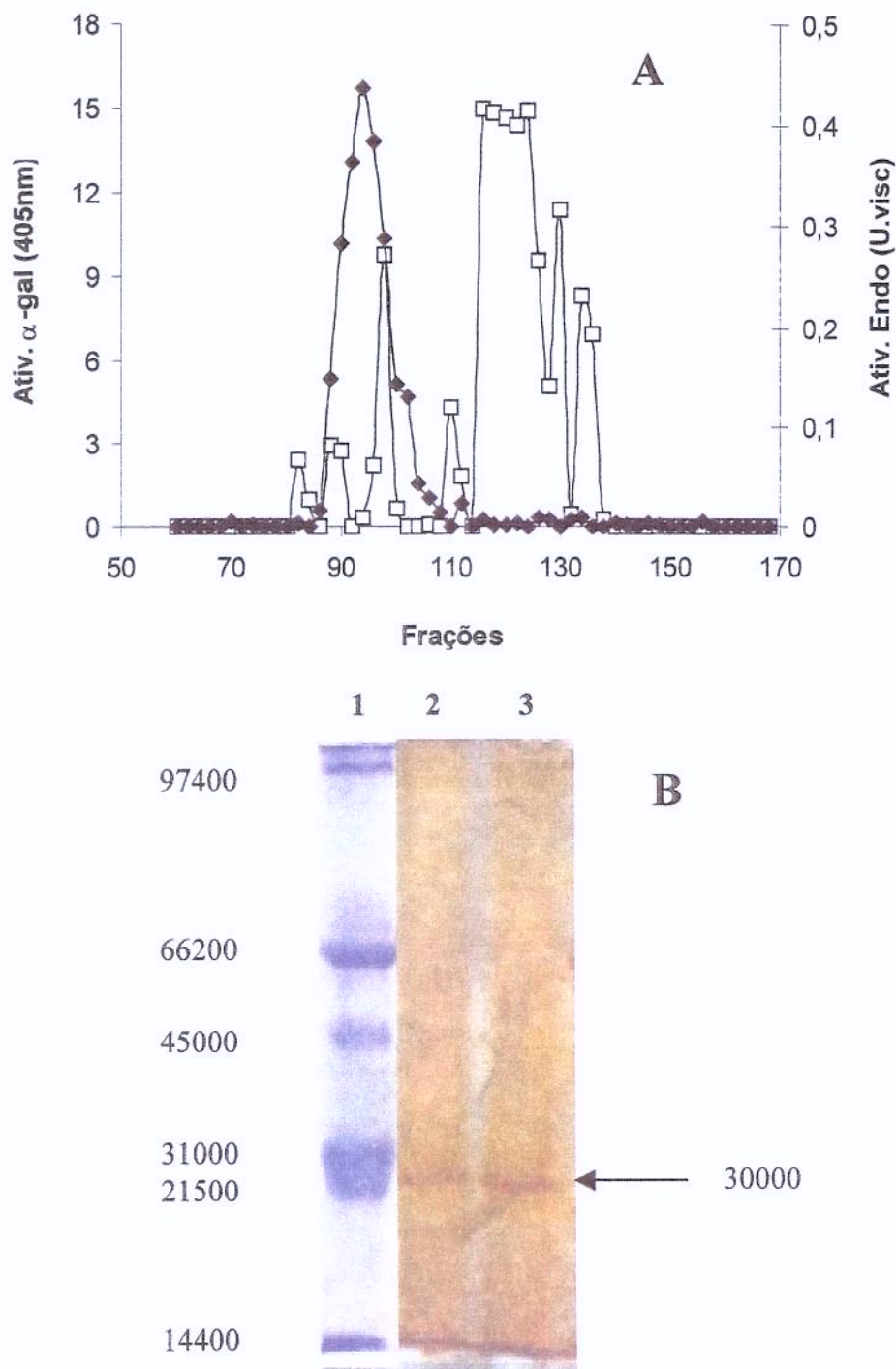


Fig. 6: Determinação do peso molecular (PM) da endo- β -mananase na conformação nativa e desnaturada. **A:** Perfil de eluição das atividades e detecção do PM da endo-mananase ($\square$) e da α -galactosidase ($\blacklozenge$) em coluna de exclusão molecular Bio Gel P-60 calibrada. **B:** Determinação do PM da mananase em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE das amostras reunidas da Figura 5b (setas negras), onde 2 corresponde 100 μ g de proteína na amostra aplicada e 3 corresponde a 150 μ g (impregnação pela prata). Na pista 1, o padrão revelado em solução de Coomassie Brilliant Blue (PMs em Daltons a esquerda).

5B (setas pretas) com quantificação protéica equivalente a 100µg, e, em **3**, a reunião das mesmas frações com quantificação protéica equivalente a 150µg, ambas submetidas à impregnação pela prata.

Em ambos os casos, apenas uma banda foi detectada. Calculados os respectivos Rfs, desnaturada ou em gel de poliacrilamida, a endo-mananase apresentou peso molecular em torno de 30Kda.

11.2.3 pH ótimo da endo-β-mananase

Na **Figura 7A** nota-se que, na faixa de pH estuda, a atividade da endo-mananase aumenta bruscamente entre pH 2,5 e pH 3, sendo que a atividade enzimática mais significativa foi correspondente a um platô que se estende entre os pHs 3,5 e 5.

11.2.4 Temperatura ótima da endo-β-mananase

A **Figura 7B** mostra que a atividade hidrolítica da endo-mananase aumenta ao longo da faixa de temperatura até 50° C utilizada. A temperatura ótima da enzima está em torno de 50°C. Isto favoreceu os demais ensaios de atividade enzimática, que foram efetuados em temperatura ótima ou próxima a ela (45° C) por medida de segurança.

11.2.5 Focalização Isoelétrica

Após análise por focalização isoeletrica preparativa em ROTOFOR (**Figura 7C**), observa-se que tanto a endo-mananase como a α-galactosidase possuem o mesmo ponto isoeletrico em pH 4,5.

11.2.6 Estabilidade da endo-β-mananase

A **Figura 8A** mostra que a endo-mananase em um período de incubação de 5 dias, possui uma maior estabilidade em pH 7,8, enquanto que, durante o mesmo período, em pH 5 após 1 dia de incubação, somente 30% da atividade permaneceu, tendo esta desaparecido do segundo dia em diante. Concluiu-se então que a mananase poderia ser armazenada em pH

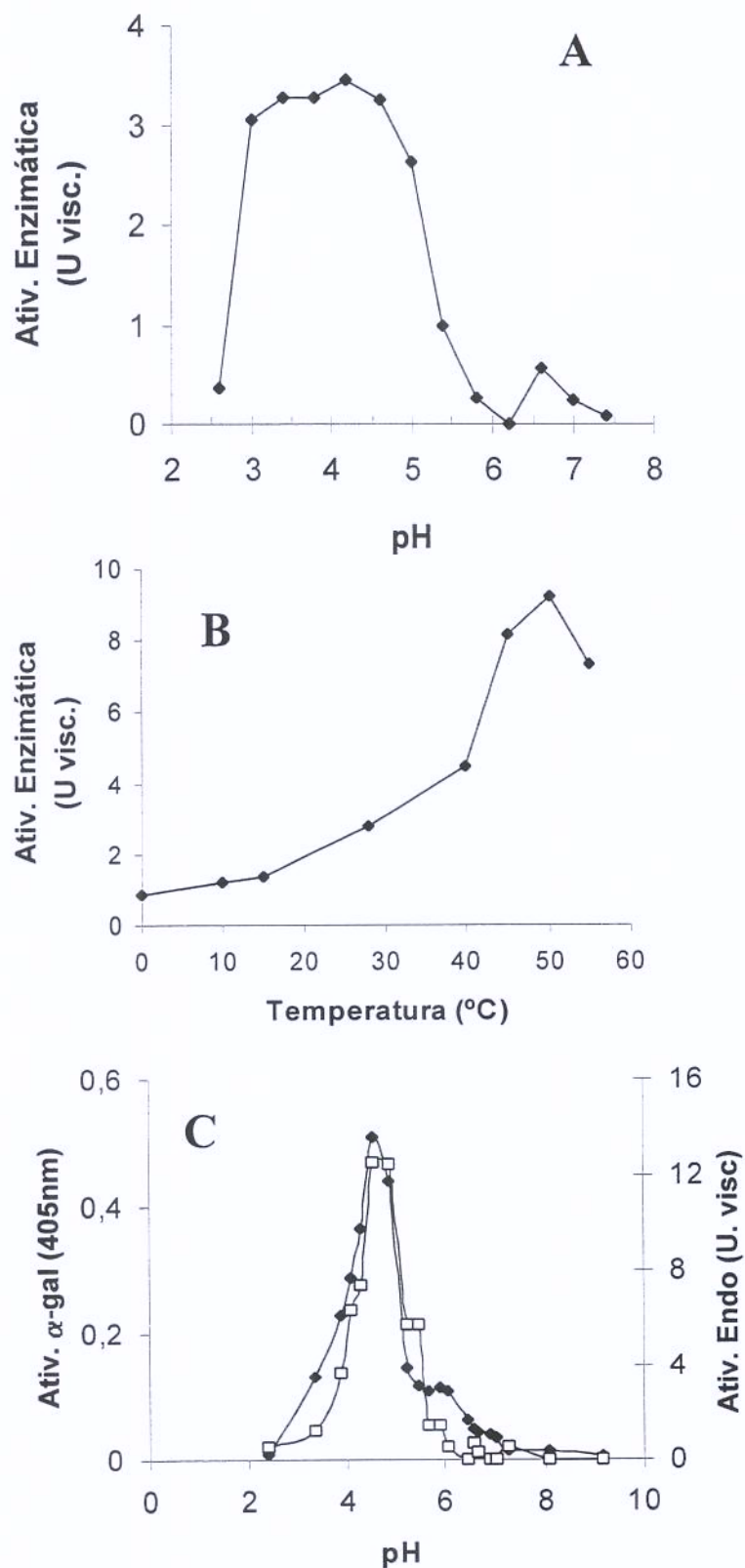


Fig. 7: Caracterização da endo- β -mananase. **A:** pH ótimo (entre 3,5 e 5). **B:** Temperatura ótima (50° C). **C:** Ponto isoelétrico (pH 4,5) da endo-mananase (□) e da α -galactosidase (◆).

7,8 e sua atividade poderia ser detectada na condição máxima apenas convertendo o pH para 5 no momento do ensaio.

11.2.7 Otimização da extração da endo- β -mananase

Em um experimento em que a enzima era extraída a cada 24 horas até um período correspondente de 168 horas de crescimento da plântula (**Figura 8B**) pôde-se notar que em meio a uma extração enzimática em tampão Tris HCl 20mM pH 7,8 a atividade catalítica da endo- β -mananase se mantém mais elevada durante todos os períodos de extração (como era de se esperar devido a sua estabilidade nesse pH). Diferentemente assim, da extração em acetato de sódio e cloreto de sódio 50 mM pH 5 que era utilizada anteriormente a esse resultado.

Através deste modo de extração, houve um rendimento catalítico inferior quando comparado à extração em tampão Tris HCl. Cabe citar que a enzima foi extraída e armazenada em pH 7,8, mas no momento do ensaio viscosimétrico para a detecção de atividade, o pH era corrigido para 5 (próximo ao pH ótimo da enzima).

11.2.8 Ação da endo- β -mananase sobre diferentes substratos

A principal contaminante da endo-mananase, a α -galactosidase (uma exo-enzima desramificadora), pode ser inibida pelo seu próprio produto. No caso, a α -galactosidase desse sistema hidrolítico, é inibida por uma concentração de 62,5 mM de galactose adicionada na incubação no momento do ensaio. Esse perfil de inibição pode ser acompanhado na **Figura 9A**.

Desta forma, quando se desejou obter atividade das duas enzimas (endo-mananase e α -galactosidase) utilizou-se uma alíquota do extrato concentrado proveniente da reunião das frações eluídas pós-gradiente (NaCl) da coluna DEAE-celulose (**Figura 5A**). De modo semelhante, quando se desejou obter atividade exclusiva de mananase, utilizou-se dois tipos de alíquotas: uma proveniente da eluição da coluna DEAE-celulose, com 62,5 mM de galactose adicionados no tampão e outra referente a reunião das frações com atividade exclusiva de mananase eluídas da coluna Sepharose Cancanavalina A (**Figura 5B**).

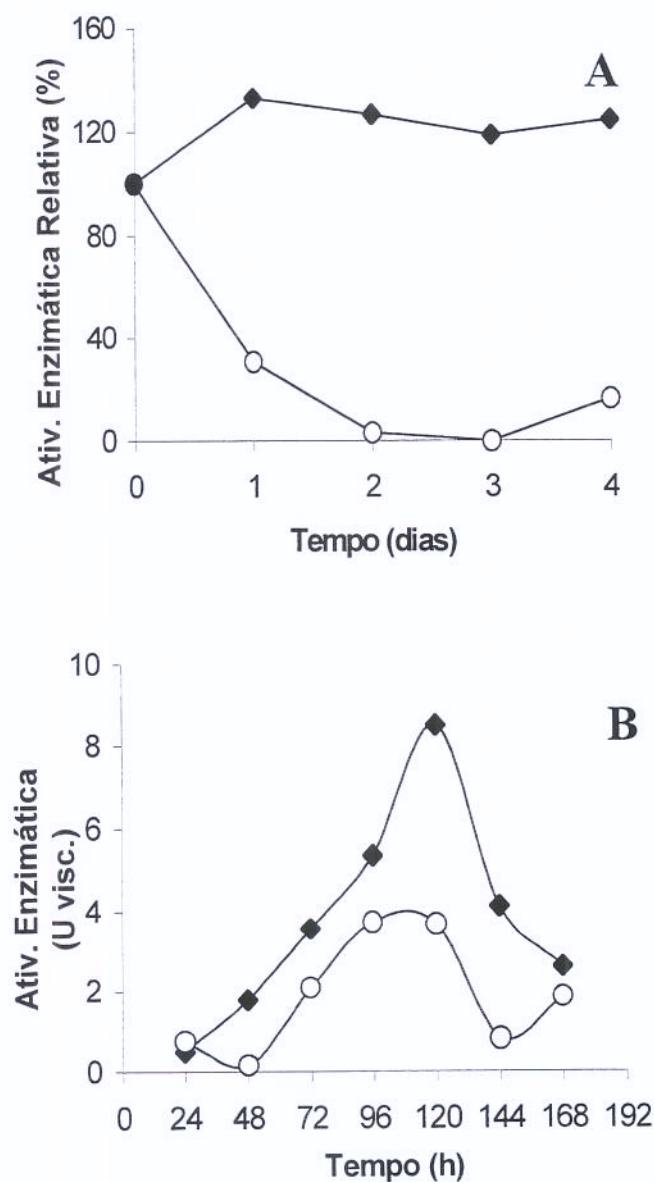


Fig. 8: Estabilidade da endo- β -mananase. **A:** Perfil de atividade da endo-mananase ao longo de 1 semana de incubação em tampão acetato de sódio pH 5 (○) e em tampão Tris HCl pH 7,8 (◆). Após incubação em pH 7,8, apenas no instante da detecção da atividade, o pH foi convertido para 5. **B:** Perfil de atividade da endo-mananase ao longo de um experimento de 168 horas de desenvolvimento de plântula. A cada 24 horas a enzima foi extraída em pH 5 (○) e em pH 7,8 (◆) e sua atividade catalítica foi dosada em condições ótimas (**Figuras 7a e 7b**).

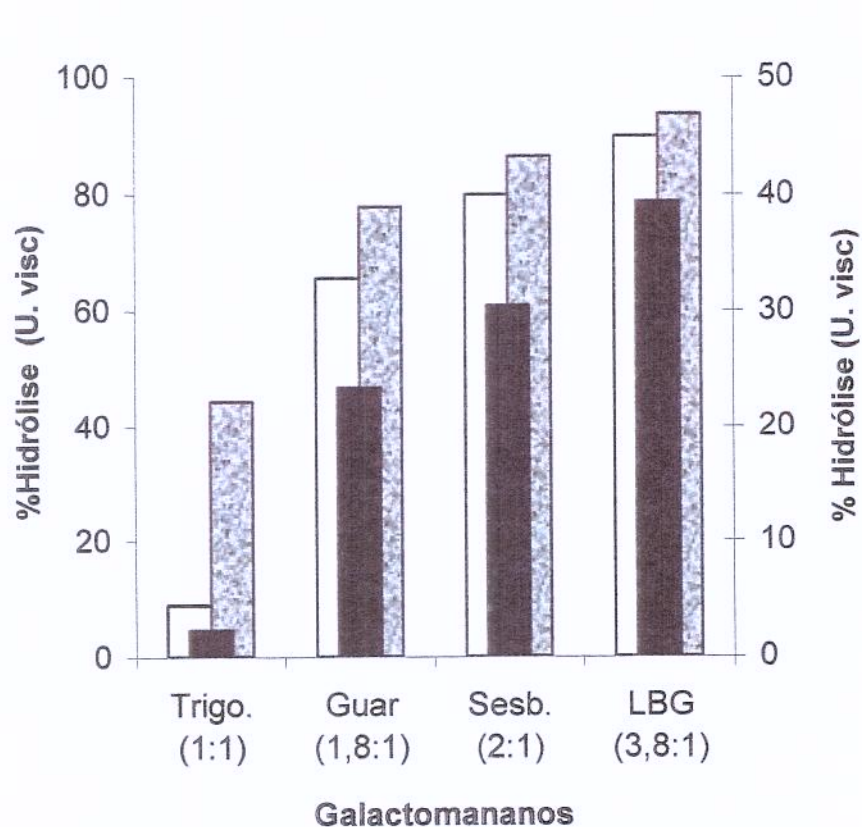
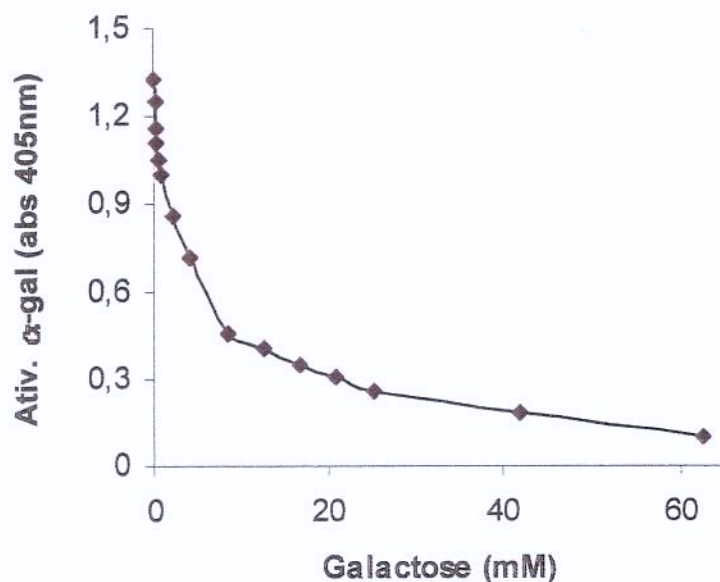


Fig. 9: Perfil de atividade da α -galactosidase em diferentes concentrações de galactose (A). Ação da endo-mananase pura (preto), da mananase com a α -galactosidase (cinza) e da mananase com a α -galactosidase na presença de 62,5 mM de galactose (branco) sobre galactomananos de diferentes razões M/G: *T. foenum-graecum*, *C. tetragonolobus*, *S. virgata* e *C. siliqua*, respectivamente (B).

Na **Figura 9B**, acompanha-se as atividades enzimáticas provenientes da degradação de galactomananos, com diferentes graus de ramificação, incubados com a reunião das amostras após passagem pela DEAE-celulose (**Figura 5A**) (com ou sem inibição com 62,5 mM de galactose) (**Figura 9A**) e pela Concanavalina A (endo-mananase isolada) (**Figura 5B**).

Nessa mesma figura, percebe-se que todos os galactomananos foram hidrolizados quando incubados com ambas as enzimas (extrato DEAE-celulose sem inibição com galactose). A maior porcentagem de degradação correspondeu ao galactomanano de sementes de *Ceratonia siliqua* (ou LBG) e, a menor, ao galactomanano de *Trigonella foenum-graecum*, indicando que a porcentagem de hidrólise, nessas condições, é inversamente proporcional ao grau de ramificação dos substratos utilizados.

Quando utilizado o extrato com a endo-mananase pura ou inibindo-se a α -galactosidase dos extratos provenientes da DEAE-celulose com uma concentração de 62,5 mM de galactose, nota-se que não ocorre hidrólise do galactomanano de *T. foenum-graecum*. Os demais galactomananos são degradados, porém suas respectivas porcentagens de hidrólise são inferiores às porcentagens dos mesmos quando incubados com extrato contendo ambas as enzimas (endo-mananase e α -galactosidase).

11.3 Localização da endo-mananase na germinação e crescimento de plântula

11.3.1 Detecção da endo-mananase na germinação e crescimento inicial da plântula

Na **Figura 10A**, observa-se que a atividade da endo- β -mananase apresenta discreto aumento no final da germinação (24 horas) e, ao longo do período de crescimento inicial da plântula, aumenta significativamente. O período correspondente a uma maior atividade catalítica é o período de 120 horas. Após este período, a atividade começa a declinar até 168 horas.

No experimento de *Dot Blot* (**Figura 10B**), nota-se que houve reação da endo- β -mananase de *Sesbania virgata* com o anticorpo anti-endo- β -mananase de café (reação amarronzada) nos dois tecidos, endosperma e tegumento (testa). No endosperma, não se nota reação durante a germinação, enquanto que, no tegumento, ocorre reação da enzima,

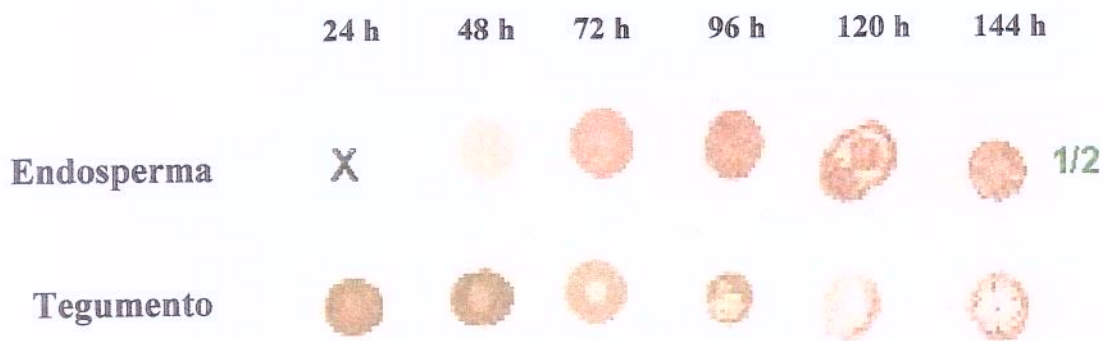
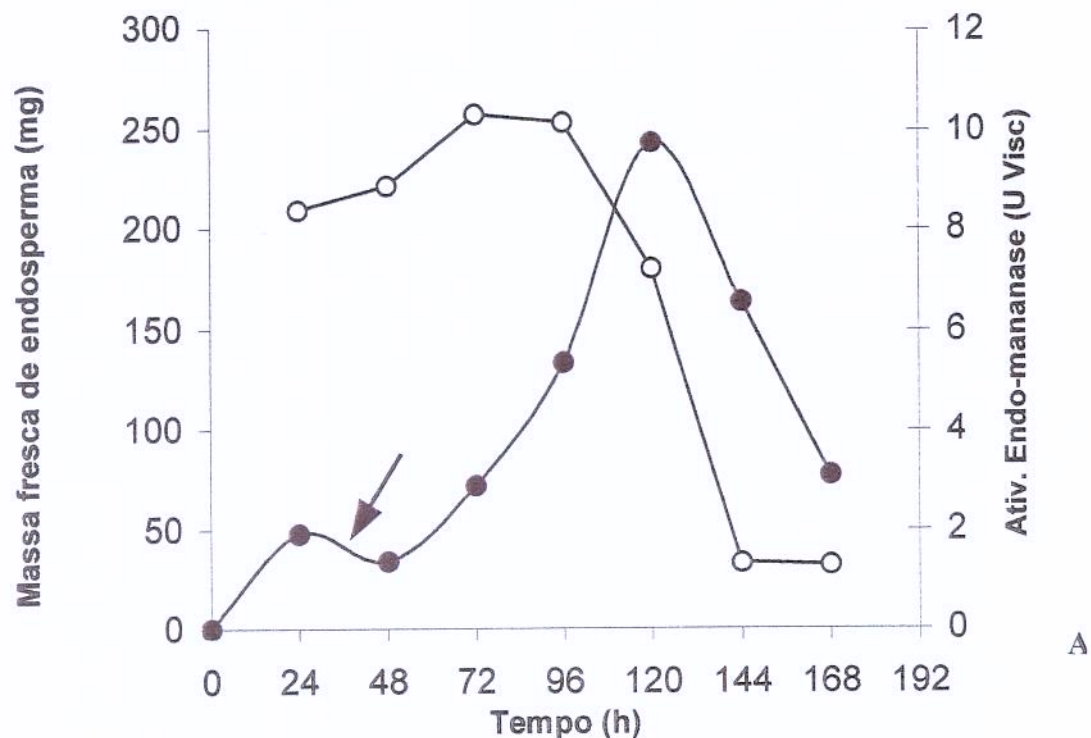


Fig. 10: (A): Atividade da endo- β -mananase na germinação e crescimento plântula de *S. virgata*. A cada 24 h, a enzima foi extraída e sua atividade detectada (●) a medida em que se acompanhou a queda do peso da massa fresca do endosperma promovida por sua degradação (○). A seta representa o início da protrusão da radícula (aprox.30h). **(B):** reação da enzima com anticorpo anti-mananase de café em alicotas de 5 μ l de dois tipos de extrato de diferentes períodos (endosperma e tegumento, isolados) depositadas sobre uma membrana de nitrocelulose. Como a atividade no endosperma é maior do que no tegumento, os extratos foram diluídos $\frac{1}{2}$ para facilitar a comparação.

principalmente durante a germinação. Ainda na **Figura 10B**, nota-se que no endosperma a concentração de endo-mananase, aumenta até 96 horas, sendo que, após este período, sua concentração diminui até 144 horas. No tegumento (casca), as variações na concentração de endo- β -mananase foram inversas ao que ocorreu no endosperma. Sua concentração diminui significativamente durante o desenvolvimento da semente, sendo elevada nos períodos de 24 e 48 horas e baixa nos períodos de 120 e 144 horas.

11.3.2 Detecção da endo-mananase na germinação em diferentes partes da semente

Para melhor compreensão do processo de germinação e objetivando detectar a atividade ou presença de alguma isoforma da endo-mananase em regiões distintas da semente de *S. virgata*, estabeleceu-se um experimento para a detecção da atividade da mananase de 10 a 40 horas de germinação, variando de 5 em 5 horas. Constatou-se então (**Figura 11**) um considerável aumento de atividade de mananase na área próxima da protrusão radicular (*Cap*) em 25 horas.

Ainda na **Figura 11**, em contrapartida, nota-se que o perfil de atividade na ponta da radícula (*Rad*) durante o gradiente é inverso ao perfil de atividade na área correspondente à lateral da semente (*Lat*). Assim, na ponta da radícula, a maior atividade detectada corresponde a 10 horas de germinação, para depois seguir diminuindo até desaparecer em 40 horas. A atividade detectada no local referente à lateral da semente (*Lat*), tendeu a aumentar durante o experimento, sendo que a sua intensidade foi muito baixa no período correspondente à germinação, para aumentar no decorrer do desenvolvimento da semente (**Figura 10A**).

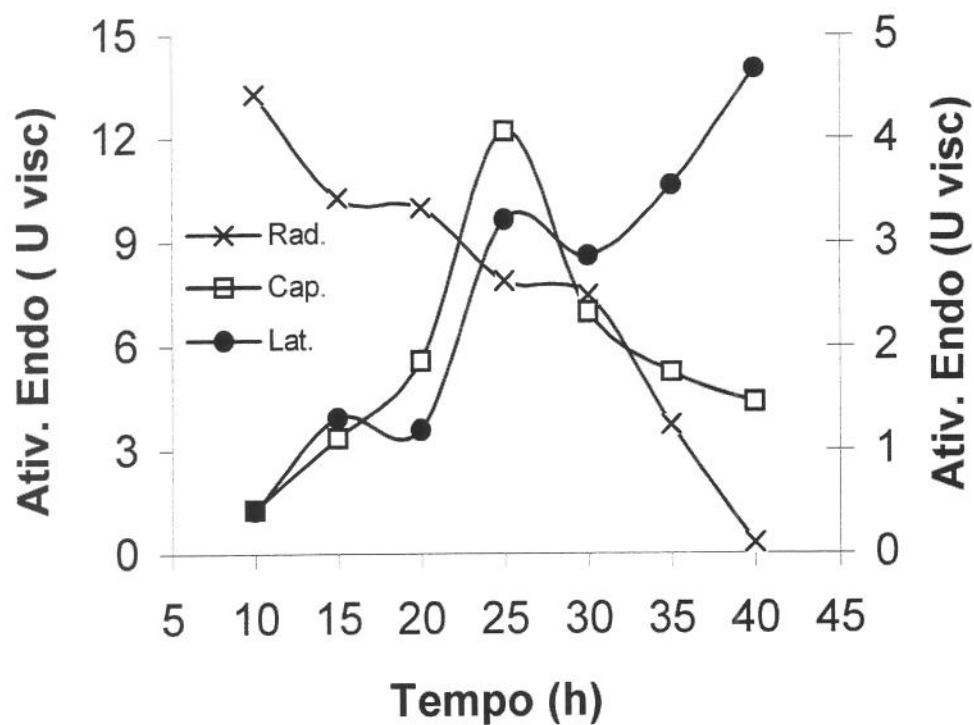


Fig. 11: Atividade da endo-mananase em diferentes partes da semente de *S. virgata*. Os extratos foram preparados em tampão Tris HCl pH 7,8 20mM usando três partes (tecidos) distintas da semente (extratos preparados na mesma relação massa/volume). Os tecidos usados foram: ponta da radícula (*Rad*), lateral da semente incluindo casca e endosperma (*Lat*) e casca e endosperma da área de protrusão da radícula (*Cap*).

12. DISCUSSÃO

12.1 Purificação da endo-mananase

12.1.1 Matriz de Troca iônica - DEAE-celulose

Este passo (**Figura 5A**) pôde ser considerado efetivo uma vez que concentra e purifica significativamente a atividade de ambas as enzimas (endo-mananase e α -galactosidase), apesar de não separá-las (**Tabela 2**). Quando comparadas, as atividades específicas do extrato bruto eram inferiores às atividades das amostras reunidas após a passagem pela coluna DEAE-celulose. Desta forma, no extrato bruto, mesmo partindo de cerca de 11 gramas de proteína, a atividade específica da endo-mananase correspondeu a 600 U.visc/mg de proteína, enquanto que, após a passagem pela DEAE-celulose, esta atividade específica aumentou mais de oito vezes (**Tabela 2**).

Ainda na **Figura 5A**, observa-se pouca atividade da endo-mananase e α -galactosidase nas primeiras 30 frações e uma significativa atividade de ambas nas frações eluídas após a aplicação de um gradiente de NaCl variando de 0 a 0,5 M (a partir da fração 40). Isto mostra que tanto a endo-mananase quanto a α -galactosidase aderem à matriz de DEAE e ambas são eluídas em conjunto. Apesar disso, as atividades detectadas antes da aplicação do gradiente, não são consequência de uma possível saturação da matriz. Isto porque, se considerarmos o perfil das amostras em leitura 280 nm, vemos (**Figura 5A**) após o gradiente que há apenas um pequeno pico, o que quer dizer que a concentração de proteínas retida não é suficiente para saturar a matriz. Nenhum experimento foi feito objetivando detectar possíveis isoformas das duas enzimas que não aderissem à DEAE-celulose, sugerindo que a elevada perda da atividade total da mananase nesse passo (**Tabela 2**) pode ser justificada pela quantidade de enzimas que não aderiram à matriz e, portanto, não foram reunidas.

Considerando a eluição conjunta (depois do gradiente) de ambas as enzimas, pode-se aparentemente sugerir que não existem grandes diferenças iônicas entre elas. O passo de concentração em DEAE-celulose promoveu aumento de atividade da endo- β -mananase e fez com que a atividade específica aumentasse, em virtude da eliminação das proteínas nas

primeiras frações. Além disso, sabe-se que a concentração de extratos enzimáticos normalmente melhora sua estabilidade, uma vez que proteínas contaminantes são eliminadas. Isto porque, boa parte destas proteínas contaminantes podem tratar-se de proteases estas, por sua vez, poderiam influenciar tanto na quantidade como na atividade da mananase em questão.

12.1.2 Matriz de Afinidade Biológica - Sepharose Concanavalina A

O próximo passo foi aplicar o extrato formado pela reunião das frações que aderiram à DEAE-celulose (**Figura 5A**) em uma coluna de afinidade Concanavalina A (**Figura 5B**), uma vez que haviam evidências em nosso laboratório de que a α -galactosidase aderiria a esta matriz (Buckeridge & Dietrich, comunicação pessoal).

Assim, caso a endo-mananase não fosse retida haveria separação de ambas as enzimas, mas nesse caso, ambas interagiram com a matriz da coluna (**Figura 5B**). Mesmo assim, a aplicação de α -metil-glucopiranosídeo na concentração de 250 mM concentrou a atividade da α -galactosidase e dispersou a atividade de mananase de tal forma que pudemos reunir frações de endo-mananase pura. Esse resultado indicou claramente que a α -galactosidase possui uma afinidade menor pela matriz de pectina (Concanavalina A) do que a endo-mananase. Nesse contexto, em purificações futuras poderemos separar e eluir concentradamente as atividades das duas enzimas. Ou seja, com uma concentração menor de α -metil-glucopiranosídeo inicialmente, será suficiente para desprender a α -galactosidase, para depois, subseqüentemente, eluir a endo-mananase com um concentração maior.

Este passo, foi definitivo para a purificação da endo-mananase da região genérica (*Lat*) do endosperma (ver banda pura na **Figura 6B**) e também serviu como contribuição para a caracterização da mesma, isto é, a endo- β -mananase purificada do endosperma das sementes de *S. virgata* (**Figura 5B**), é uma glicoproteína, uma vez que interage com a matriz, contendo manose e/ou glucose na sua estrutura..

Mesmo considerando a efetividade do passo na purificação da endo-mananase para a obtenção da banda pura (**Figura 6B**), de acordo com a **Tabela 2**, houve uma perda significativa da atividade mananásica total e pouca queda na atividade específica. Neste

caso conclui-se que, apesar do passo isolar a endo-mananase definitivamente, não contribuiu para aumento de atividade, muito menos para o rendimento na purificação. Esse resultado também sugeriu que, para um maior rendimento da atividade da endo-mananase, *in vivo*, talvez seja necessária a presença de um cofator para a otimização catalítica da enzima em meio à hidrólise.

12.2 Caracterização da endo-mananase

12.2.1 Obtenção do peso molecular da endo-mananase em Biogel P-60 e SDS-PAGE

Endo- β -mananases e α -galactosidases apresentam uma grande diversidade de pesos moleculares. Os resultados de Mujer *et al.* (1983), por exemplo, reportam o isolamento de duas isoformas distintas de α -galactosidase de endosperma de côco, cujos respectivos pesos moleculares foram 23 KDa e 26,6 KDa enquanto os resultados de Pressey (1989), apontam como 43 KDa para o peso molecular de uma das endo- β -mananases de frutos de tomate.

No caso de *Sesbania virgata*, Buckeridge & Dietrich (resultados não publicados) já haviam observado que a α -galactosidase de suas sementes apresentavam um peso molecular de 45 KDa. Decidiu-se, portanto, utilizar a filtração em gel com Biogel P-60 inicialmente como tentativa de purificação, mas também para conhecer o peso molecular da endo- β -mananase de *Sesbania virgata*.

Na **Figura 6A** pode-se notar que houve separação entre a α -galactosidase e a endo-mananase. Sendo que a α -galactosidase eluiu primeiramente em um volume corresponde a um marcador de 45 KDa (corroborando com resultados não publicados obtidos por Buckeridge & Dietrich) enquanto que a endo-mananase eluiu logo em seguida num volume correspondente a um marcador de 36 Kda, uma vez que fez-se a média entre as frações com maior atividade mananásica. Isto permitiu a detecção, bem como a separação das duas enzimas devido aos seus diferentes pesos moleculares.

Nota-se ainda na **Figura 6A**, que não há qualquer referência ao perfil protéico das frações coletadas, não sendo possível a detecção deste devido a uma perda significativa da quantidade total de proteínas do extrato bruto em relação ao primeiro passo de purificação (**Tabela 2**), seguida de uma maior perda nessa etapa. A atividade das duas enzimas nestas

frações é altamente específica, no sentido de que parece não haver qualquer proteína contaminante, como indica a própria figura. Tentou-se fazer uma eletroforese em SDS-PAGE com a reunião destas frações, mas não havia proteína suficiente para detectarmos as bandas, uma vez que o extrato aplicado nessa coluna foi o proveniente das reuniões das fração da DEAE-celulose. Nesta reunião, conforme a **Tabela 2**, a quantidade de proteína é pequena. Mesmo assim, esse experimento foi eficiente para sabermos o peso molecular da endo-mananase (36KDa), contribuindo ainda mais para a sua caracterização.

Em relação a **Figura 6B**, as frações reunidas da Concanavalina A (**Figura 5B**), foram submetidas à corrida em gel de poliacrilamida e o peso molecular da banda correspondente a endo-mananase é de 30 KDa. A diferença existente entre o peso da enzima considerando ambas as técnicas (de 6 KDa) sugere que o peso da enzima ativa é diferente de seu peso molecular em condições desnaturantes. Observação que pode ser valorizada pela detecção do peso molecular em SDS-PAGE de 30 KDa. Sendo assim, as bandas purificadas da enzima confirmam seu isolamento e fornecem informações sobre seu peso quando atingida a estrutura terciária de sua conformação.

12.2.2 pH ótimo da endo-mananase

Antes de iniciar o procedimento de purificação da endo- β -mananase da região genérica do endosperma (*Lat*), todo um cronograma da caracterização e conhecimento da enzima foi desenvolvido. Daí a importância da detecção do pH ótimo da mesma, que corresponde a uma faixa entre 3 e 5 (**Figura 7A**). Este pH detectado, parece ter se mostrado característico, uma vez que outras mananases, como a endo- β -mananase do endosperma de sementes de *Trigonella foenum-graecum* L. caracterizada por Reid *et al.* (1977), que possui uma faixa de pH ótimo próxima: 4,9.

Considerando que toda enzima possui um pH onde sua atividade catalítica é máxima, o pH ótimo, as curvas de variação de atividade em diferentes valores de pH, refletem o pH no qual importantes grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico estão em estados de ionização adequados para a catálise (Lehninger, 1989). A partir de então, quando esta faixa de pH ótima foi detectada, todos os ensaios de atividade foram efetuados neste pH 4,5 ou 5, o que permitiu máxima detecção de atividade catalítica.

Este resultado possibilitou adquirir o melhor rendimento catalítico da enzima durante os ensaios de sua atividade, o que permitiu concluir que a endo-mananase se trata de uma hidrolase ácida. Outras hidrolases ácidas (mananases) também são encontradas na literatura e as duas enzimas que iniciam o processo de degradação, α -galactosidase e endo-mananase, apresentam curvas de atividades semelhantes numa faixa de pH. Neste caso, pode-se considerar que as mananases, em geral, apresentam um ótimo de atividade (pH) em torno de 4 e 5 (McCleary, 1983), o que corrobora à endo-mananase isolada cujo pH ótimo corresponde a uma faixa entre 3 e 5.

12.2.3 Ponto isoelétrico da endo-mananase

Detectou-se os respectivos pontos isoelétricos da endo- β -mananase e da α -galactosidase (**Figura 7C**). Com este resultado, pode-se mostrar claramente porque o rendimento catalítico da enzima é inferior quando extraído e/ou armazenado em pH 5 (praticamente seu pH ótimo) (**Figuras 8A e 8B**). O que acontece é que, depois de um dado tempo, seja de incubação ou armazenagem, não se detecta mais atividade hidrolítica nos extratos em pH 5 porque simplesmente, a enzima precipita. Isto porque o pH 5 é extremamente próximo ao seu ponto isoelétrico (4,5).

Sabe-se que múltiplas isoformas da endo-mananase são responsáveis pela degradação do endosperma, sendo que estas são relacionadas a eventos germinativos e pós germinativos (Nonogaki *et al.*, 2000; Mo & Bewley, 2002). Neste caso, essas isoformas endosperma-específicas, tanto em monocotiledôneas como dicotiledôneas, podem ser separadas pelos seus respectivos pIs (Dirk *et al.*, 1995). A maioria das isoenzimas de mananases endospermáticas detectadas por Dirk *et al.* (1995), apresentam um ponto isoelétrico entre 4,3 e 4,8. Desta forma, a mananase em questão, cujo pI é 4,5, parece ser semelhante as estas já caracterizadas hidrolases.

Mas fisiologicamente, qual seria a vantagem de uma hidrolase de parede celular tão importante possuir pH ótimo e o pI tão próximos como observado por muitos autores na literatura (**Tabela 3**) ?

Tabela 3: Tabela mostrando a igualdade ou proximidade entre pI ou pH ótimo de outras endo-mananases de diferentes fontes, isoladas por outros autores.

Fonte da Mananase	p I	p H	Referência
Sementes de Alfafa	4,5	4,5	McCleary, 1983
Sementes <i>Medicago sativa</i>	4	4,5	Dirk <i>et al.</i> , 1995
Sementes de Tomate	5	5	Nonogaki & Morohashi, 1996
Sementes de Tomate (isoforma)	5,2	5	Bewley <i>et al.</i> , 1997

Atualmente, muito se conhece a respeito da influência dos hormônios vegetais endógenos em relação ao crescimento e expansão celular. A auxina, por exemplo, causa *expansão nas paredes celulares*, uma expressão empregada para designar as propriedades “elásticas”, das paredes celulares das células tratadas com esse hormônio (Salisbury & Ross, 1992).

Em 1987, Ray descreveu três mecanismos que objetivaram explicar como essa expansão celular ocorre na presença do hormônio em questão. Uma das três hipóteses ficou conhecida como a *Teoria do Crescimento Ácido*, onde a auxina teria a função de induzir as células receptoras à secreção de íons de hidrogênio nas paredes primárias, causando diminuição do pH (acidificação do meio). Presume-se que a diminuição do pH influenciaria a ação de hidrolases de parede que, ao atingir um valor próximo ao seu pH ótimo de ação, trabalhariam com uma maior velocidade em condições totalmente otimizadas. Isto porque, como a endo-mananase caracterizada neste trabalho, a maioria das enzimas de parede celular é inativa ou apresenta baixa atividade em pHs elevados (Rayle & Cleland, 1979; Taiz, 1984; Evans, 1985; Cleland, 1987a e 1987b).

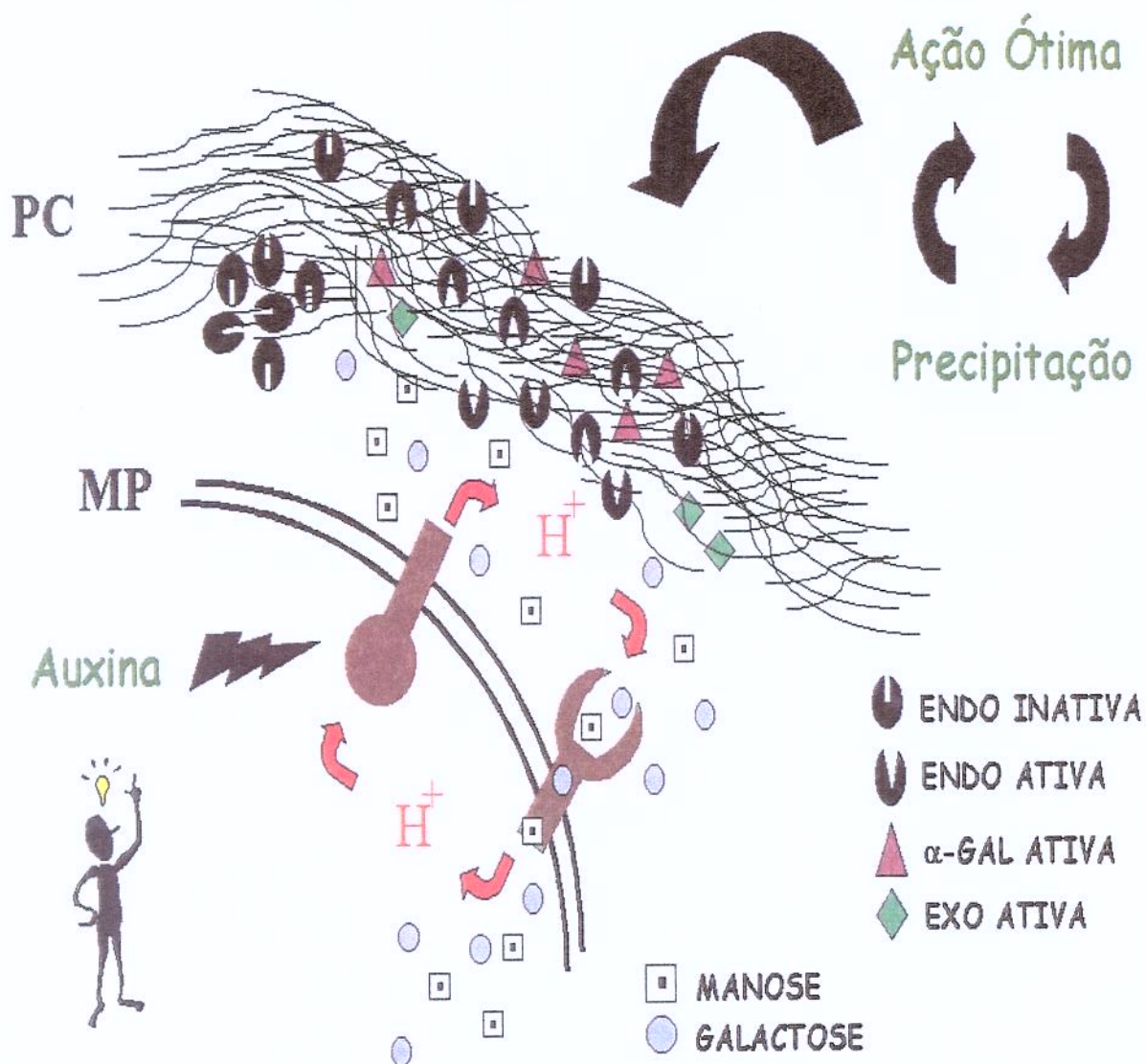
Assim, como a maioria das demais hemicelulases, acredita-se que a endo-manase de sementes de *S. virgata*, só apresenta este ótimo de pH, por tratar-se de um pH extremamente próximo à maioria dos pHs ótimos de enzimas que agem na parede celular. Conforme a **Tabela 3**, muitos autores descreveram essa semelhança entre o pH ótimo e pI

em mananases de diferentes fontes, mas não relataram sua consequência fisiológica. Talvez essa semelhança possa ser explicada pela própria característica de degradação da endo-mananase observada no sistema de mobilização do galactomanano da *Sesbania virgata*.

Quando esta degradação endospermática é acompanhada, através de cortes histológicos tratados com anticorpo anti-mananase de café (Tonini, Lisboa, Mazzoni-Viveiros e Buckeridge, resultados não publicados), percebe-se que ela é completamente irregular. Neste experimento, ao longo da germinação e do período de crescimento inicial da plântula, a presença da endo-mananase é acompanhada através da reação cruzada com o anticorpo anti-mananase de café e a atividade da endo-mananase é observada pelas lacunas na parede celular (provenientes da mobilização). Um motivo provável para essa irregularidade seria a própria característica fisiológica de ação desta mananase em sementes de *S. virgata*, que seria limitada e estaria acontecendo desordenadamente em várias regiões da lateral da semente ao mesmo tempo. Ou seja, em meio ao processo de mobilização, a enzima seria produzida (ou liberada) para uma ação a curto prazo, agindo localmente (próximo ao seu local de síntese) e precipitando em seguida.

Se o sistema de degradação do galactomanano de *S. virgata*, funcionar desta forma, pode-se sugerir um modelo de degradação em *patchiness* ou “em pulsos desordenados ou aleatórios”. Assim, esses “pulsos” de degradação espaçadas e momentâneas, facilitariam a drenagem dos produtos desta mobilização para o embrião. A possibilidade de uma drenagem lenta de substrato para o crescimento da plântula, fisiologicamente seria plausível, pois evitaria o acúmulo de grandes quantidades de produto (sacarose) em algumas regiões do endosperma, contribuindo também para que não haja desperdício do produto da degradação pela mananase. Num sistema de mobilização deste tipo, a distribuição e transporte dos produtos de degradação seria provavelmente mais eficiente, uma vez que pouparia energia e desperdício de material orgânico necessário a esse crescimento.

Pelo **Modelo Esquemático 2**, pode-se imaginar o que poderia estar ocorrendo na degradação do galactomanano na parede celular das células endospermáticas da *S. virgata* em presença da auxina. Assim, no primeiro pulso de degradação, que estaria ocorrendo em condições acidificadas, o pH inicial da parede celular estaria numa faixa em torno de 5.



Modelo Esquemático 2: Idéia de como a degradação em *Patchiness* favorece a drenagem lenta de substrato para o desenvolvimento do embrião que, ao crescer, induziria a produção de auxina. Esta, por sua vez, através do bombeamento de prótons, acidificaria a parede celular atingindo o ótimo de ação da endo- β -mananase promovendo um novo *Patchiness*, até uma precipitação isoeletrica subsequente.

Nessas condições, teríamos, a princípio, a mananase, em conjunto com a galactosidase e a exo-manosidase, hidrolisando a parede de forma otimizada. Em seguida, a endo-mananase precipitaria isoeleticamente. A medida que os produtos de degradação (manose e galactose), juntamente com íons de hidrogênio, vão sendo importados para dentro das células embrionárias, o pH da parede celular temporariamente aumentaria devido ao importe de prótons.

Com o aumento do pH, parte das mananases precipitadas seriam resolubilizadas. Conforme os produtos da degradação forem sendo utilizados para o crescimento do embrião este, ao crescer, induziria produção de auxina. Esse hormônio endógeno, mediante ao consumo de ATP e bombeamento de prótons de hidrogênio promoveria nova acidificação da parede celular. Nesse momento, com um pH em torno de 4,5 ou 5, novamente seriam restabelecidas condições ótimas para a ação da endo-mananase que agiria mais uma vez em seu ótimo-catalítico promovendo um novo pulso de degradação. Assim, ao degradar o galactomanano em condições ótimas, a endo-mananase precipitaria logo em seguida possibilitando uma absorção líquida mais lenta de produto de hidrólise pelas células embrionárias. Baseado nessa descrição hipotética, acreditamos na possibilidade de um evento fisiológico cíclico, ou seja, o mesmo procedimento seria repetido para novos e sucessivos pulsos até hidrólise total do galactomanano da parede celular.

Em relação à α -galactosidase, seu pI corrobora resultados obtidos com sementes de *Phoenix dactylifera* L., cujos extratos endospermáticos apresentaram atividade de três galactosidases. Estas, possuem pIs de 4,4; 4,6 e 4,9 respectivamente (Sekhar & Demanson, 1990), ou seja, pIs extremamente próximos ao da α -galactosidase detectada. Semelhanças com outras galactosidases da literatura também puderam ser observadas. No que se refere à sementes de guar, McCleary em 1983, usando uma coluna de afinidade com uma resina de galactopiranosídeo, encontrou um pico de atividade de α -galactosidases endospermáticas. Estas, por sua vez, quando submetidas à eletrofocalização, apareceram sob a forma de uma grande quantidade de bandas que diferiram entre si segundo seus respectivos pIs, que não variaram além de um intervalo compreendido entre 3,9 e 5,5. Em extratos com sementes de alfafa (*Medicago sativa*), McCleary (1981), purificou outra α -galactosidase, cuja focalização isoeétrica apresentou uma única banda com pI equivalente a 4,6.

12.2.4 Temperatura ótima da endo-mananase

A 50° C, a atividade catalítica da endo-mananase, apesar de não condizer com a situação *in vivo*, é muito mais significativa, e pode ser mais facilmente detectada (**Figura 7B**). Como a endo-mananase isolada do endosperma de sementes de guar, onde o ótimo de atividade também é 50° C (McCleary, 1983), a enzima das sementes de *Sebania virgata* não se mantém estável por mais de 15 minutos nesta condição de incubação.

Fazendo uso desta nova ferramenta que também caracteriza a endo-mananase no extrato bruto, otimizamos ainda mais o ensaio da sua atividade. Esta última, pôde, a partir de então, ser detectada com maior precisão e rendimento.

Mesmo considerando que, em pH ácido e elevadas temperaturas (50° C, por exemplo), geralmente as β -mananases, quando incubadas com galactomanano, induzem a uma rápida diminuição de viscosidade (McCleary, 1983), cabe lembrar que, a queda de viscosidade, (parâmetro determinante da atividade), não é em função do aquecimento prolongado do substrato (galactomanano). Nesse ponto, um tubo controle contendo substrato, enzima desnaturada (extrato fervido) e tampão acetato de sódio proporcional aos volumes dos demais tubos, foi incubado paralelamente e nenhuma queda de viscosidade foi registrada.

12.2.5 Estabilidade da endo-mananase

Numa purificação enzimática clássica de hidrolases de polissacarídeos, normalmente usam-se duas técnicas cromatográficas de troca iônica: DEAE-celulose e CM-celulose. Os pHs de uso de ambas as matrizes são respectivamente 7,8 e 5 (Buckeridge & Reid, 1994). Restava saber se a endo-mananase era estável em ambos os pHs. Por este motivo optamos pela utilização deste experimento que objetivou o conhecimento da estabilidade da enzima. Concluiu-se que a endo- β -mananase é estável em pH 7,8 e instável em pH 5.

Este experimento (**Figura 8A**) serviu para a decisão de ser utilizada a DEAE-celulose como a primeira estratégia ou passo a ser utilizado na purificação, e também para a determinação da estabilidade da endo-mananase. Assim, com estes resultados podemos sugerir que a endo-mananase pode ser incubada em pH 4,5 ou próximo a ele (5), para detectar o ótimo de sua atividade catalítica mas tem que ser armazenada em pH 7,8 para

que se mantenha estável, reduzindo a possibilidade de desnaturação durante o processo de purificação.

12.2.6 Otimização de extração da endo-mananase

Uma vez que fora entendido que a enzima possuía estabilidade em pH 7,8 quando armazenada nestas condições, pensou-se que uma extração também neste pH, pudesse contribuir com um maior rendimento nos ensaios de atividade. Assim, este experimento comparativo foi efetuado utilizando-se duas técnicas distintas de extração (**Figura 8B**).

Com isto, concluiu-se que a endo-mananase pode não só ser armazenada em pH 7,8, mas também extraída nessas condições. Da mesma forma que a atividade da enzima pode ficar estável em temperatura adequada (5°C) e em pH 7,8 por longo tempo, também há possibilidade de detectar o máximo de sua atividade catalítica durante todo o processo de purificação através da simples alteração do pH, no momento do ensaio de atividade, para pH 4,5 ou 5, não sendo necessário, portanto, a sua extração neste pH.

Das três enzimas descritas no mecanismo de degradação e mobilização do galactomanano, a endo- β -mananase é a que precisa de uma menor concentração de sal para ser extraída da parede celular (Mo & Bewley, 2002). Isso explica, além da estabilidade em Tris HCl pH 7,8 observada na **Figura 8A**, o rendimento catalítico durante a extração nessa molaridade (20 mM). Não sendo necessárias elevadas concentrações de sais para extrair esta enzima da parede celular, a enzima pode ser extraída sem riscos de mudanças conformacionais em sua molécula, ocasionadas por intervenções na camada de solvatação proteína-água (Stryer, 1995).

Resultado semelhante pode ser encontrado em McCleary (1983) que, ao purificar as três enzimas de degradação (α -galactosidase, exo-manosidase e endo- β -mananase) em sementes de guar, constatou que, tanto a α -galactosidase quanto a endo- β -mananase apresentam atividades mais significativas quando extraídas em pH 8 num tampão de baixa molaridade de sal.

Cabe ainda salientar que nosso experimento mostrou que o período de 120 horas de germinação correspondeu ao período de maior atividade hidrolítica da endo-mananase (**Figura 8B**), corroborando o outro experimento de caracterização (**Figura 10A**).

12.2.7 Atividade da endo-mananase sobre diferentes substratos

Em geral nos mananos, existe uma relação inversa entre a quantidade de galactoses ligadas e o nível de hidrólise pela endo-mananase (McCleary & Matheson, 1983). Desta forma, acredita-se que o motivo para tal diferença nas porcentagens de hidrólise dos galactomananos esteja relacionado com a ramificação destes polímeros (**Figura 9B**).

O galactomanano de sementes de *Ceratonia siliqua* (LBG) apresentou uma maior susceptibilidade à catálise, isto porque, para cada ramificação de galactose deste carboidrato, há um intervalo médio de cerca de 2,8 monômeros de manose (até a próxima ramificação com galactose). Em termos de espaçamento, tal intervalo torna mais fácil a ação da endo- β -mananase nas ligações do esqueleto central da molécula, podendo degradá-la com maior rapidez. Esse padrão de hidrólise da endo-mananase de *S. virgata*, parece corroborar a ação de mananases já descritas como a do *Bacillus subtilis* (McCleary, 1979), *Trichurus spiralis* (Reese & Shibata, 1965) e sementes germinadas de outras leguminosas (McCleary, 1979) todas elas apresentando ação limitada sobre galactomananos muito ramificados.

Quando analisadas as quedas viscosimétricas exponenciais dos galactomananos utilizados antes de transformá-las em quedas lineares, para depois, pela inclinação destas, atingir a unidade viscosimétrica (item 10.2.4) observam-se muitas diferenças.

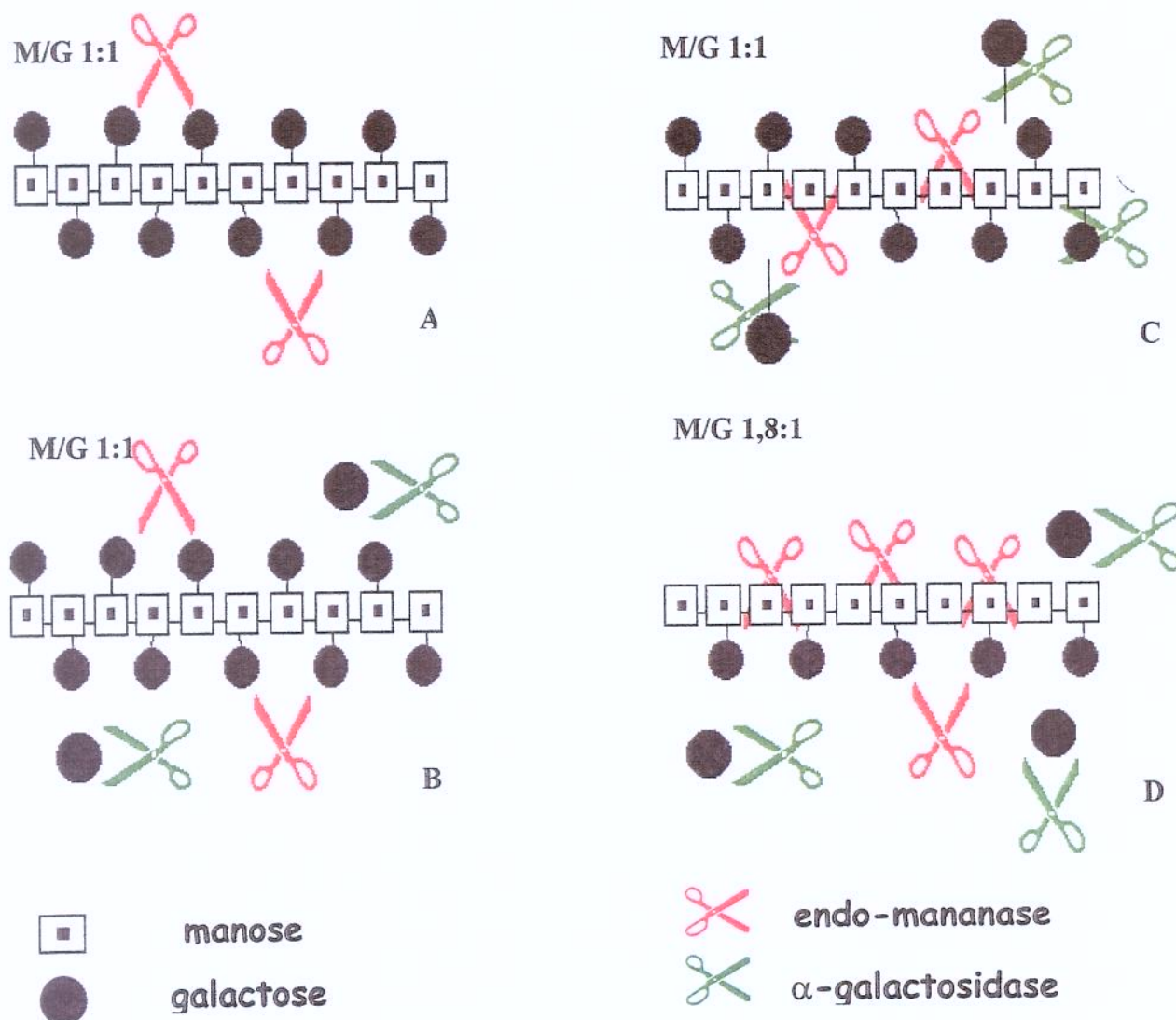
A queda viscosimétrica do galactomanano de *S. virgata* por exemplo, difere da queda do guar porque o seu intervalo de ramificação é ligeiramente maior. Ou seja, para cada ramificação com galactose, há um espaçamento de 1,1 monômeros de manose, ao passo que o espaçamento M/G da goma guar é 1,8:1. Mesmo, a princípio, parecendo uma diferença (espaçamento) não tão significativa, nota-se que o perfil viscosimétrico das duas quedas exponenciais (não mostradas), difere entre si, assim como a própria porcentagem de degradação (**Figura 9B**).

Baseado nestas diferenças de hidrólise, pode-se sugerir que, de alguma forma, a ramificação do polímero modula a ação catalítica das duas enzimas presentes das frações reunidas de DEAE dosado: α -galactosidase e endo- β -mananase.

Quando analisada a queda viscosimétrica referente à degradação do galactomanano de *T. foenum graecum*, percebe-se que a degradação ocorreu, porém de forma mais lenta. Após um tempo de incubação de 120 min, a viscosidade deste galactomanano atingiu o mesmo tempo de escoamento dos demais substratos (resultados não mostrados). Desta forma, pode-se entender porque a porcentagem de hidrólise no polímero desta espécie é inferior às demais. Como citado, a razão M/G deste galactomanano é 1:1, o que explica a dificuldade catalítica da endo-mananase apontada na **Figura 9B**. É possível que a estrutura altamente ramificada deste polímero, mesmo conferindo a ele uma elevada solubilidade, dificulte a ação catalítica da mananase. Este ponto, explica o motivo da necessidade de ação concomitante da endo-mananase e da α -galactosidase na degradação dos mananos puros (Mo & Bewley, 2002).

Assim, comparando as porcentagens de hidrólise deste com os demais carboidratos, sugerimos que a dificuldade de degradação por parte da enzima, se deve à cobertura dos sítios de ação da endo-mananase no esqueleto central da molécula (promovida pela alto grau de ramificação) (**Modelo Esquemático 3A**). Isto faz com que a α -galactosidase aja primeiro para desramificar o galactomanano da *T. foenum graecum*, removendo as galactoses para que, depois disto, a mananase possa desempenhar sua ação (**Modelo Esquemático 3C**).

No mesmo extrato (DEAE-celulose), se inibirmos a α -galactosidase com uma concentração de 62,5 mM de galactose (**Figura 9A**), nota-se uma acentuada diminuição da hidrólise por parte da endo-mananase. Desta forma, como a α -galactosidase permanece inibida pelo seu próprio produto, tendo o seu sítio de ação preenchido por galactoses livres propositalmente adicionadas, ela não consegue desempenhar sua ação. Ou seja, não havendo desramificação do polímero, não pode haver ação da endo- β -mananase, uma vez que ela não consegue clivar a molécula em seu ponto de ação do esqueleto central (**Modelo Esquemático 3B**). Consecutivamente, não há hidrólise do material nestas condições inibitórias da contaminante. Mesmo com a α -galactosidase inibida, os outros substratos foram degradados normalmente (proporcionalmente ao seu grau de ramificação). O espaçamento entre suas ramificações (galactoses), aparentemente permitiram a ancoragem da enzima na cadeia central do carboidrato e ela conseguiu degradar seu substrato (**Modelo Esquemático 3D**).



Modelo Esquemático 3: Atividade da endo- β -mananase na presença e ausência da α -galactosidase sobre galactomananos de diferentes razões M/G. Pode-se observar que a atividade da endo-mananase é modulada pela ramificação do substrato. Desta forma, as cadeias laterais de galactose, não permitem que a endo-mananase pura (A) ou com a α -galactosidase inibida (B) atinja o esqueleto central da molécula e clive as ligações β -1,4. Quando incubada em conjunto com a α -galactosidase, a enzima consegue agir, uma vez que o galactomanano seja desramificado (C). Em galactomananos com razões M/G acima de 1,8:1 na presença, ausência ou com a α -galactosidase saturada por galactose livre, a endo-mananase é capaz de hidrolisar o substrato (D).

Resultado semelhante pode ser acompanhado na mesma **Figura 9B**. Desta vez, os mesmos substratos foram incubados com extrato contendo a endo- β -mananase pura (**Figura 5B**) e parece ter ocorrido um perfil de escoamento semelhante (quedas viscosimétricas não mostradas). Da mesma forma, sem a ação catalítica-desramificadora da α -galactosidase (seja por inibição ou ausência) a endo-mananase não consegue degradar o galactomanano da *T. foenum-graecum* (razão M/G = 1:1) (**Modelo Esquemático 3A e 3B**). Neste caso, como já sugerido, atribui-se a dificuldade de hidrólise ao elevado grau de ramificação. Em sementes de *Gleditsia triacanthos* (“honey locust”), por exemplo, a β -mananase requer, ao menos, duas unidades de manoses não ramificadas com galactose adjacentes no esqueleto central do galactomanano para que a hidrólise ocorra (McCleary *et al.*, 1976).

Estes resultados, favorecem ainda mais a idéia de que as ramificações dos galactomananos modulam a ação das mananases. Assim, a ramificação da cadeia, não permite a clivagem da molécula pela endo-mananase antes que o carboidrato sofra a ação desramificadora da α -galactosidase. Isto é, a α -galactosidase age primeiro para depois trabalhar em conjunto com a mananase, hidrolisando o polímero até oligossacarídeos ainda ramificados ou eventualmente de um tamanho que os tornem solúveis. Se considerarmos como produto da hidrólise da mananase, oligossacarídeos relativamente grandes, o resultado das incubações seria um precipitado branco e insolúvel (o que não foi observado), atribuído ao manano desramificado que é o produto da hidrólise de ambas as enzimas livres da ação final da exo-manosidase (McCleary, 1980).

Esta sugestão de ação difere da mobilização deste polímero no tomate (Mo & Bewley, 2002), onde os autores sugerem que a endo-mananase e a α -galactosidase têm ação concomitante, porque, ao término da incubação, notificam a presença do precipitado insolúvel (manano). Nesse caso, os oligossacarídeos detectados no produto são relativamente grandes, ou seja, desgalactosilados parcial ou totalmente, não possuem tamanho reduzido que lhes confirmam solubilidade.

12.3 Detecção de atividades tecido-específicas da endo-mananase

12.3.1 Atividade mananásica Germinativa e Pós-germinativa

Este experimento (**Figura 10A**) foi de grande importância, uma vez que se objetivava conhecer o período mais conveniente à extração da enzima. Sendo assim, mediante a todas as técnicas de purificação enzimáticas aqui utilizadas, que normalmente promovem aumento de atividade específica à medida que eliminam proteínas contaminantes (Lehninger, 1989), o extrato enzimático bruto utilizado deveria estar em sua máxima atividade hidrolítica.

Mesmo considerando que o período de extração onde encontramos maior atividade é o de 120 horas (**Figura 10A**), para evitar problemas com o possível ataque de proteases relacionadas com a parte final do processo de mobilização, optamos por utilizar extratos em 110 h para os procedimentos de purificação enzimática, que continham alta atividade de mananase. Além disto, este período adotado, coincide com o início da queda do peso fresco do endosperma da semente (**Figura 10A**); que é consequência da mobilização da reserva do endosperma para fornecimento de carbono para a manutenção e desenvolvimento do embrião (Buckeridge & Dietrich, 1996).

Ainda na **Figura 10A**, mesmo antes do início da queda do peso fresco do endosperma e do pico de atividade (120 h), observa-se um significativo aumento da atividade da endo-mananase, característico de períodos pós-germinativos. Porém, este aumento de atividade só é notado em sementes que apresentaram protrusão radicular seguida por seu estabelecimento no substrato antes de iniciar o crescimento da plântula (Mo & Bewley, 2002).

Um ligeiro aumento de atividade em 24 h (período anterior à protrusão da radícula, representado pela seta na figura, nas sementes de *S. virgata*) seguido de sua posterior discreta queda em 48 h, corrobora resultados encontrados durante o desenvolvimento de sementes de tomate (Mo & Bewley, 2002). Nestas sementes, onde se considera o final da etapa de germinação o período de 36 h (protrusão radicular) (Nonogaki, *et al.*, 2000), a atividade da endo- β -mananase também é detectada discretamente pouco antes da protrusão da radícula para depois, após ligeira queda, aumentar bruscamente após a germinação (Toorop *et al.*, 1996; Still & Bradford, 1996).

Na **Figura 11**, a atividade da endo-mananase na ponta da radícula (*Rad*), mostrou-se elevada no período de 10 h de germinação sendo que, após o término deste evento (germinação), diminui até não ser mais detectada no período de 40 h. A atividade elevada neste período, parece estar relacionada com o mecanismo de protrusão da radícula, onde seria necessária a presença da mananase para degradar o endosperma adjacente à ponta desta (*Cap*).

Considerando duas das principais características dos mananos puros, a constrição mecânica e a proteção (Buckeridge *et al.*, 2000a); sugere-se que a atividade enzimática deste período não estaria relacionada com o mecanismo de degradação de reservas, mas sim com um processo de “diminuição da resistência” para a radícula emergir. Entende-se neste ponto que, como em tomate, a radícula não só emerge rompendo a casca (restrição física) por ação mecânica (*puncture force*) em meio à protrusão, como também parece estar claro que, este processo está associado a eventos enzimáticos (Groot & Karssen, 1987). A exemplo disso, observa-se a elevada atividade mananásica na ponta da radícula (*Rad*) no período de 10 h de germinação.

Quando observadas as atividades relacionadas ao endosperma próximo a esta área de protrusão (*Cap*) (**Figura 11**), pode-se constatar que, no período de 10 a 15 h (maior atividade na ponta da radícula) ela encontra-se baixa. Durante o desenvolvimento que se segue, a atividade da endo-mananase tende a aumentar até um máximo de atividade em 25 h, período que coincide com o começo da protrusão radicular da maioria das sementes de *S. virgata* (até 30 h). Esse aumento de atividade neste período (25 h), também pode ser observado na forma do primeiro pico de atividade (24 h) detectada no experimento da **Figura 10A**.

Constatadas as atividades de mananase nestas áreas (em intervalos temporais distintos), pode-se sugerir que, para a protrusão da radícula, num primeiro instante (10-15 h) torna-se necessária, além da força mecânica promovida pelo crescimento do eixo embrionário, a atividade da endo-mananase para uma primeira degradação da área endospermática restritiva adjacente ao local de protrusão. Em seguida, uma vez tendo quase emergido, uma nova atividade mananásica próxima a essa área (*Cap*), apresentará um ótimo de atividade hidrolítica (24 h) para continuar agindo com o objetivo fisiológico de continuar a ceder espaço físico para esta protrusão.

A atividade ao redor da radícula semi-emersa, mobiliza o tecido constritor e esta radícula pode aumentar de calibre sem qualquer limitação física por parte do endosperma. Em tomate, já se sabe que a ação de apenas uma endo-mananase, não é suficiente para que a germinação se complete (Toorop *et al.*, 1996; Mo & Bewley, 2002). Neste ponto se, em *S. virgata*, como em tomate, ocorrem duas isoformas da endo-mananase, as duas estariam presentes ao mesmo tempo durante o período que antecede a protrusão da radícula e o início do processo de mobilização de reservas.

Ainda nessa figura, durante todo o experimento nota-se um aumento de atividade hidrolítica na área lateral da semente (*Lat*). Com base nos dados da **Figura 10A**, pode-se sugerir que esta continuará a aumentar até culminar num ótimo de atividade correspondente a 120 h de desenvolvimento de plântula (**Figura 10A**). Obviamente, esta atividade da mananase está relacionada apenas com eventos pós-germinativos, entre eles, a mobilização da reserva endospermática da semente (galactomanano) (Buckeridge & Dietrich, 1996).

Quando comparadas as atividades da lateral da semente (*Lat*) com a região ao redor da radícula (*Cap*), percebe-se que em 24 h, ambos os tecidos apresentam aumento de atividade enzimática. Considerando que em 120 h (pico de atividade mananásica na lateral do endosperma), a área *Cap* não passa de um mero “resíduo de tecido” já completamente atravessado pela radícula podemos, baseados nestas atividades temporalmente distintas e em diferentes tecidos, especular sobre a existência de outras isoformas (pelo menos considerando tratar-se de outra mananase que apresenta atividade em tecido e eventos temporais de desenvolvimento distintos). É o que observam diversos autores em sementes de *Datura ferox* que também expressam atividade de endo-mananase antes da protrusão da radícula (Sánchez & de Miguel, 1997). Estudos de microscopia destas sementes mostraram que, o galactomanano do endosperma da área próxima ao local de emergência radicular é notadamente degradado antes dos primeiros indícios de protrusão (Sánchez *et al.*, 1990; Mella *et al.*, 1965).

Em sementes de tomate, a atividade da mananase aparece inicialmente no endosperma da região próxima à radícula pouco antes de sua emergência e depois, subsequentemente, após a protrusão, bruscamente aumenta no endosperma da região lateral da semente (Groot *et al.*, 1988; Nonogaki *et al.*, 1992; Nomaguchi *et al.*, 1995; Nonogaki & Morohashi, 1996). Desta forma, se o mecanismo germinativo funcionar de forma

semelhante ao descrito em tomate, é possível que existam, como observado por Nonogaki *et al.* (2000) pelo menos três transcritos gênicos diferentes: um ao redor da área de protrusão e outro na área correspondente à lateral da semente. Nossos resultados discutidos neste item permitem, então, especular ainda sobre a existência de um terceiro transcrito na área referente à ponta da radícula. Sendo assim, apesar de não existirem evidências definitivas é totalmente plausível acreditar na existência de duas isoformas da endo-mananase pós-germinativa (120 h) isolada: a primeira na ponta da radícula (pico de atividade em 10 h) e a segunda na região *Cap* (pico de atividade em 25 h). Do contrário, acredita-se que, evolutivamente falando, não haveria necessidade da existência de atividades mananásicas em eventos de desenvolvimento distintos e, sobretudo, em regiões (tecidos) totalmente diferentes.

Apesar de não mostrado, preparou-se extratos enzimáticos a partir do embrião e, também foram acompanhadas as atividades ao longo da germinação e do crescimento de plântula e, nesse caso, as atividades detectadas foram baixas. Isso estaria de acordo com o fato de que, no tecido embrionário, pelo menos em monocotiledôneas, usualmente é detectada um número muito inferior de isoformas de endo-mananases quando comparado com o tecido endospermático (Dirk *et al.*, 1995).

Ainda não podemos fazer afirmações sobre a ocorrência de isoformas da endo- β -mananase isolada e caracterizada no presente trabalho. Porém, com os resultados deste experimento, podemos especular que, como em tomate, qualquer que seja o número destas possíveis isoproteínas existentes na semente de *S. virgata*, elas podem ser caracterizadas como enzimas tecido-específicas (Toorop *et al.*, 1996).

Não a atividade, mas a presença da endo- β -mananase pôde ser acompanhada durante parte da germinação e o crescimento de plântula através da reação cruzada entre a endo-mananase e o anticorpo anti-mananase de café nos experimentos de *Dot Blot* na **Figura 10B**. Entre os dois tecidos, endosperma e tegumento, observa-se uma concentração de endo-mananase inversa ao longo do desenvolvimento da semente. Entre 24 e 48 h, no endosperma, a concentração de mananase é baixa e aumenta até o período de 144 h de crescimento de plântula, no tegumento (casca), nos primeiros períodos, sua concentração é alta e segue diminuindo até 144 h.

Os extratos foram preparados com os tecidos (endosperma e tegumento) referentes à semente toda, não havendo discriminações de parte específicas. Sendo assim, tais observações sugerem que, pouco antes do término da germinação (24 h), a endo-mananase, em sua maior concentração, permanece na casca e, a medida que o embrião desenvolve, ela parece ser liberada para o endosperma com o objetivo de promover a própria mobilização do galactomanano. Assim, o aumento da concentração da enzima observado neste tecido ao longo do desenvolvimento, provavelmente está relacionado com a detecção da endo-mananase degradando o galactomanano. Afinal, como se observa em 96 h, período em que se nota considerável degradação do endosperma em função da própria queda da massa fresca deste (**ver Figura 10A**), há aumento da concentração da endo-mananase no tecido de reserva enquanto, na casca, cujo total rompimento é visualmente constatado em 96 h, a concentração da enzima já é mínima.

Mesmo considerando que, o que se observa na reação cruzada mananase – anticorpo não se trata de atividade mananásica, mas de sua localização e concentração, o que se pode concluir é que, contrariamente ao que se pensava (Buckeridge & Dietrich, 1996), a camada de aleurona (**Figura 1**) não parece ser a única responsável pela produção da endo- β -mananase em sementes de *S. virgata*. Sendo assim, mesmo que o tegumento não seja, como a camada de aleurona, um local de produção de endo-mananase, certamente não pode ser considerado um tecido morto, cuja função seria apenas proteção e mediador de embebição, mas sim um tecido vivo e diretamente responsável pela mobilização do galactomanano com um papel fisiológico muito importante em relação ao crescimento de plântula.

Os resultados discutidos nesse item (**Figuras 10A e 11**), também contribuíram mais uma vez para evidenciar a qualidade multifuncional do galactomanano (reserva, embebição e dureza) que, poderia ser explicada através do conceito ou *Teoria de Transferência de Funções* proposto, para polissacarídeos de parede celular, por Buckeridge & Reid (1996). Essa teoria sugere que os polissacarídeos de reserva de parede em Leguminosas poderiam ter passado por etapas de *transferências de funções* no decorrer do processo evolutivo, os quais seriam parte das transformações que levaram à formação de uma parede de reserva a partir da parede primária.

O mecanismo geral pelo qual a *transferência de função* poderia ter operado pela evolução foi sugerido por Buckeridge *et al.* (2000a). De acordo com essa hipótese, um

polissacarídeo teria uma função primária e, pelo menos, uma secundária, sendo que essas funções distintas seriam exercidas de forma diferente. Assim, diferentemente das Solanáceas, em Leguminosas, por exemplo, a maioria dos polissacarídeos de reserva teria esta própria função como principal (Buckeridge *et al.*, 2000c), sendo que a de controle da embebição da semente (devido a características de solubilidade desse polímero, até mesmo exploradas na indústria) parece ser considerada a função secundária em termos de importância (Edwards *et al.*, 2002). Mesmo assim, não se pode descartar a possibilidade de que esta função de controle de embebição dos galactomananos (Reid & Bewley, 1979) seja meramente accidental ou, conforme previamente citado, uma simples consequência das propriedades hidrodinâmicas deste polímero.

Em contrapartida, no caso de mananos de não-leguminosas, a retirada (ou não colocação em meio à biossíntese) das galactoses permite interações moleculares ao longo das cadeias principais, conferindo grande dureza ao endosperma (Buckeridge *et al.*, 2000c). Isto está provavelmente relacionado ao fenômeno de pós-maturação que ocorre em *Palmae* e outras espécies, estando ligado ao controle de protrusão da radícula, como no caso do tomate (Nonogaki *et al.*, 2000).

Uma vez comparadas e localizadas as semelhanças entre os eventos germinativos das sementes de tomate e *S. virgata*, este trabalho, pela primeira vez indica a existência e importância da terceira função (dureza) em Leguminosas, uma vez que a restrição física e degradação do endosperma próximo a área de protrusão da radícula é tão evidente quanto em sementes de tomate (exemplo da família Solanácea). Nessas sementes acumuladoras de manano, cujo endosperma é muito mais fino quando comparado ao endosperma de *S. virgata*, esse tecido está muito mais relacionado com restrição física, proteção e dureza do que com mobilização de reservas. Obviamente, pelo menos em *Sesbania virgata*, cuja a importância do endosperma como acumulador de reservas é clara, depois das particularidades aqui discutidas, a propriedade de dureza e resistência física do galactomanano (evidenciada pelas atividades tecido-específicas e temporalmente distintas da área próxima à protrusão da radícula) parece ser tão importante e significativa quanto as funções de embebição e reserva.

13. CONCLUSÕES

- O período onde há maior atividade de endo-mananase, por isso adotado para a extração da enzima, na região genérica do endosperma, corresponde a 110h de desenvolvimento de plântula.
- O pH ótimo da endo-mananase no extrato bruto correspondeu a um platô entre 3 e 5, com um ponto isoelétrico igual a 4,5 e temperatura ótima de 50° C. Essa enzima é uma glicoproteína com atividade estável (por pelo menos três dias) quando armazenada e extraída em pH 7,8.
- A atividade da endo-mananase pode ser concentrada em resina de troca iônica DEAE-celulose sendo que, nesse passo de purificação ocorre aumento de atividade específica e separação de proteínas contaminantes.
- A atividade da α -galactosidase interfere nos ensaios viscosimétricos da atividade da endo-mananase sendo que, pode ser inibida com uma concentração de 62,5 mM de galactose. Neste caso, a ramificação dos diferentes tipos de galactomananos modula a ação das duas enzimas em conjunto, influenciando a degradação.
- Pode-se sugerir que a α -galactosidase, no sistema de degradação dos galactomananos, age primeiro desramificando o polímero para expor os sítios de clivagem para endo- β -mananase na esquelito central do substrato. No caso da endo- β -mananase, na ausência da α -galactosidase, não age sobre substratos com razão G/M menor do que 1,8:1.
- O peso molecular da endo-mananase determinado por gel filtração corresponde a 36 KDa enquanto que, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi 30 KDa.
- O endosperma, o tegumento e o eixo embrionário das sementes de *Sesbania virgata*, estão envolvidos na síntese e distribuição da endo- β -mananase relacionada ao processo de degradação do galactomanano, seja em eventos germinativos ou pós-germinativos.

- Em 144 horas de desenvolvimento de plântula, há decaimento da atividade catalítica da endo-mananase e isto coincide com a diminuição do peso fresco do endosperma.
- A atividade da endo- β -mananase no período referente a 24 horas de germinação está possivelmente relacionada com a degradação do mesmo na região lateral e, especialmente, próxima da radícula. Para o seu desenvolvimento, na semente de *Sesbania virgata* existem *pulsos* de atividade catalítica da mananase em diferentes períodos de desenvolvimento, como por exemplo o de 24 horas (mais discreto) e o de 120 horas. A atividade encontrada no período de 24 horas está relacionada com a remoção do endosperma na região de protusão da radícula, permitindo que esta possa emergir. Em relação à ponta da radícula, a atividade está relacionada com o auxílio para a sua própria protrusão. Sendo que, para a protrusão radicular são necessárias força mecânica (*puncture force*) e eventos enzimáticos.
- A atividade da endo-mananase do período de 120 horas está relacionada com a mobilização completa das reservas para o embrião. Sendo que a enzima pode ser localizada em eventos germinativos temporalmente muito distintos e em tecidos completamente diferentes, o que permite sugerir a presença de isoformas da mesma durante a germinação e desenvolvimento da plântula.

14. BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D.,
Biologia molecular da célula; trad. Simonetti, A (et al.). 3.ed., Porto Alegre: Artes
Médicas (1997).
- ALCANTARA, P.H., Purificação da beta-galactosidase de sementes de *Copaifera
langsdorffii* e suas relações com o metabolismo do xiloglucano. Dissertação de
mestrado em biologia molecular. Universidade federal de São Paulo (1995).
- ANDERSON, E., Endosperm mucilagens of legumes. Ind. Eng. Chem. 41 (1949) 2887-
2890.
- ANULOV O.V., SMIRNOVA N.I., MESTECHKINA N.M., SHCHERBUKHIN V.D.,
Content and composition of nonstarch water-soluble polyssacharides in seeds of some
Fabaceae, Russ. J. Plant Physiol. 45 (1998) 802-804.
- BAILEY, R.W., Polysaccharides in the leguminosae. In HARBORNE, J. B.; BOULTER,
D.; Turner, B. L.; eds, Chemotaxonomy of the leguminosae. Academic Press, London
(1971) 503-541.
- BERRY, T., BEWLEY, J.D., Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which
develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to a
germination mode without a requirement for dessication. Planta 186 (1991) 27-34.
- BEWLEY J.D., Seed germination and dormancy. Plant Cell 9 (1997) 1055-1066.
- BEWLEY J.D. & BLACK M., Seeds: physiology of development and germination. New
York. Plenum Press, 2 ed (1994) 445p.
- BLACK, M., Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. In:
DAVIES, W.J. & JONES, H.G. (eds.). Absciscic acid physiology and biochemistry.
BIOS Scientific Publisher, Lancaster-UK. (1991) p. 99-124.
- BOTHA, F.C.; POTGIETER, G.P. & BOTHA, A.M., Respiratory metabolism and gene
expressoin during seed germination. J. Plant Growth Regul. 11 (1992) 211-224.
- BRADFORD, V.S., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram
quanties of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. Analyt Bioquim. 72
(1976) 248-254.

- BRADFORD, K.J., CHEN F., COOLEY, M.B., DAHAL, P., DOWNIE, B., FUKUNAGA K.K., GEE, O.H., GURUSINGHE, S., MELLA, R.A., NONOGAKI, H., WU C-T., YIM, K-O., Gene expression prior radicle emergence in imbibed tomato seeds. *In* M. BLACK, K.J. BRADFORD, J. VAZQUEZ-RAMOS, eds, Seed Biology Advances Applications. CAB International, Walling-ford, UK, (2000) pp 231-251.
- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C., Galactomannan from *Brasiliam* Legume seeds. *Rev. Brasil. Bot.* 13 (1990) 109-112.
- BUCKERIDGE, M.S., DIETRICH, S.M.C., Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science* 117 (1996) 33-43.
- BUCKERIDGE M.S., DIETRICH S.M.C., LIMA, D.U., Galactomannans as the reserve carbohydrate of legume seeds. *In* GUPTA, A.K. and KAUR, N., ed. Carbohydrate reserve in plants: synthesis and regulations. Amsterdam Elsevier. (2000a) 283-316
- BUCKERIDGE, M.S., PANEGASSI, V.R., DIETRICH, S.M.C., Seeds galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. *Phytochem.* 38 (1995a) 871-875.
- BUCKERIDGE M.S., PANEGASSI V.R., DIETRICH S.M.C., Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination, *Rev. Bras. Bot.* 18 (1995b) 171-175.
- BUCKERIDGE, M.S., REID, J.S.G., Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo- β -(1 4)-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 192 (1994) 502-511
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J. S.G., Major cell wall storage polyssaccharide in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. *Cienc. Cult.* 48 (1996) 153-162.
- BUCKERIDGE, M.S., ROCHA, D.C., REID, J.S.G., DIETRICH, S.M.C., Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savana and forest populations. *Plant Physiol.* 86 (1992) 145-151.
- BUCKERIDGE M.S., SANTOS H.P., TINÉ M.A, Mobilisation of storage cell wall polyssaccharides in seeds, *Plant Physiol. Biochem.* 38 (2000b) 141-156.
- BUCKERIDGE, M.S., TINÉ M.A., SANTOS H.P., LIMA, D.U., Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12 (2000c) 137-162.

- CARPITA, N.C., GIBEAUT, D.M., Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. *The Plant Journal* 3 (1993) 1-30.
- CARPITA, N. C., MACCANN, M., The cell wall. *In* BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., RUSSEL, L.J. 3ed. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Am. Soc. Plant. Phys. Rockville. Maryland. (2001) 52-108.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAMA, J., Sementes: ciência, tecnologia e produção. Campinas. SP. F. Cargill, 3ed (1988) 424p.
- CAVAZZA, L., Recherches sur l' impérmeabilité des graines dures chez les légumineuses. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 60 (1950) 596-610.
- CLELAND, R.E., Auxin and cell elongation. Pages 18-27 *in* P. J. DAVIES (ed.), *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Martinus nijhoff Publishers (1987a) Boston.
- CLELAND, R.E., The mechanism of wall loosening and wall extension. Pages 18-27 *in* D. J. COSGROVE & D. P. KNIEVEL (eds.), *Physiology of cell expansion during plant growth*. American Society of Plant Physiologists (1987b) Rockville, Md.
- CORNER, E.J.H., The leguminous seed. *Phytomorphology* 1 (1951) 117-150.
- COSGROVE, D.J., Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 86 (1999) 391-417.
- DEA I.C.M., CLARK A.H., MCCLEARY B.V., Effect of galactose substitution-pattern on the interaction properties of galactomannans, *Carbohydr. Res.* 147 (1986) 275-294.
- DEA, I.C.M., MORRIS, E.R., REES, D.A., WELSH, E.J., BARNES, H.A., PRICE, J., Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides and related systems. *Carbohydr. Res.* 57 (1977) 249-272.
- DEA I.C.M., MORRISON A, Chemistry and interactions of seed galactomannans, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31 (1975) 241-312.
- DIETRICH, S.M.C., BUCKERIDGE, M.S., TINÉ, M.A.S., YOUNG, M.C.M., BOLZANI, V.S., MARQUES, M. R., Plant cell wall research related to evolution and chemical defenses. *Anais da Acad. Brasil. De Cienc.* 70 (1998) 727-731.

- DION, A.S., POMETI, A.A., Ammoniacal silver estaining of proteins: mechanisms of glutaraldehyde enhancement. *Anal. Biochem.* 129 (1983) 490-496.
- DIRK L.M.A., GRIFFEN, A.M., DOWNIE, B., BEWLEY, J.D., Multiple isozymes of endo- β -mannanase in dry and imbibed seeds. *Phytochemistry* 40 (1995) 1045-1056.
- DOWNIE, B., HILHORST, H.W.M., BEWLEY, J.D., Endo- β -mananase activity during dormancy alleviation and germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Physiol.* 101 (1997) 405-415.
- DUBOIS, M; GILLES, A; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A & SMITH, F., Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 (1956) 350-355.
- DULSON J., BEWLEY J.D., JOHNSON R.H., Absciscic acid is an endogenous inhibitor in the regulation of mannanase production by isolated lettuce endosperms. *Plant Physiol.* 87 (1988) 660-665.
- DUTTA, S., BRADFORD, K.J., NEVINS, D.J., Cell-wall autohydrolysis in isolated endosperms of lettuce (*Lactuca sativa* L.), *Plant Physiol.* 104 (1994) 623-628.
- DUTTA, S., NEVINS, D.J., BRADFORD, K.J., Endo- β -mananase activity present in cell wall extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. *Plant Physiol.* 113 (1997) 155-161.
- EDWARDS, M.E., BULPIN, P.V., DEA, I.C.M., REID, J.S.G., Biosynthesis of legume-seed galactomannans *in vitro*. Cooperative interactions of a guanosine 5'-diphosphate-mannose-linked (1-4)- β -D-mannosyltransferase and uridine 5'-diphosphate-galactose-linked α -D-galctosyltransferase in particulate enzyme preparations from developing endosperms of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub.). *Planta* 178 (1989) 41-51.
- EDWARDS, M.E., MARSHALL, E., GIDLEY, M.J., REID, J.S.G., Transfer specificity of detergent-solubilized fenugreek galactomannan galactosyltransferase. *Plant Physiol.* 129 (2002) 1-7.
- EDWARDS, M., SCOTT, C., GIDLEY, M.J., REID, J.S.G., Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. *Planta* 187 (1991) 67-74.

- EVANS, M.L., The action of auxin on plant cell elongation. CRC Critical Reviews in Plant Sciences 2 (1985) 317-365.
- FEURTADO, J.A., BANIK M., BEWLEY, J.D., The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. J Exp Bot 52 (2001) 1239-1249.
- FOSKET, D.E., Plant Growth and Development: a molecular approach. Academ. Press, Inc. San Diego, California (1994), p.p. 580.
- FRY, S.C., Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46 (1995) 497-520.
- GANTER J.L.M.S., ZAWADZKIBAGGIO S.F., LEITER S.C.S., SIERAKOWSKI M.R., REICHER F., Structural studies on galactomannans from Brazilian seeds, J. Carbohydr. Chem. 12 (1993) 753-767.
- GIORGINI J.F., COMOLI E., Effect of embryo and exogenous GA₃ on endospermic endo- β -mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and earlyseedling growth., Braz. J. Plant Physiol. 8 (1996) 43-49.
- GOTTLIEB, M., CHAVKO, M., Silver staining native and denatured eucaryotic DNA agarose gels. Anal. Biochem. 165 (1986) 33-37.
- GROOT S.P.C., KARSSSEN C.M., Gibberellins regulate seed-germination in tomato by endosperm weakening – a study with gibberellin-deficient mutants, Planta 171 (1987) 525-531.
- GROOT S.P.C., KARSSSEN C.M., Dormancy and germination of abscissic acid-efficient tomato seeds – studies with the sitiens mutant, Plant Physiol. 99 (1992) 952-958.
- GROOT S.P.C., KIELISZEWSKAROKICKA B., VERMEER E., KARSSSEN C.M., Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls and gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion, Planta 174 (1988) 500-504.
- GUZMÁN J.M., HERNANDEZ G.L., Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corumbosa* (L.) Raf., Convolvulaceae, Phytol 42 (1982) 1-8.
- HALMER P., BEWLEY J. D., Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo, Planta 144 (1979) 333-340.

- HAMES, B.D., One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. In HAMES, B.D. & RICKWOOD, D., Editors. 2,ed. New York, Oxford University Press (1990), p. 1-147.
- HIGGINS, T.J.V.; JACOBSEN, J.V., ZWAR, J.A., Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and m-RNA levels in barley aleurone layers. *Plant Molecular Biology* 1 (1982) 191-195.
- HILHORST, H.W.M., A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research* 5 (1995) 61-75.
- HILHORST, H.W.M., DOWNIE, B., Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum*) studies with the sitiens mutant. *Journal of Experimental Botany* 47 (1996) 89-97.
- HILHORST, H.W.M., GROOT, S.P.C., BINO, R. J., The tomato seed as a model system to study seed development and germination. *Act Bot Neerl* 47 (1998) 169-183.
- HIRST, E.L., JONES, J.K.N., WALDER, W.O., Pectic substances. Part 7: the constitution of the galactan from *Lupinus albus*, *J. Chem. Soc.* (1947) 1225-1229.
- HOPKINGS, W.G., Introduction to plant physiology. John Wiley & Sons, Inc. New York. 2 ed (1999) 512p.
- IGLESIAS, R.G., BABIANO, M.J., Endogenous abscisic acid during the germination of chick-pea seeds. *Physiologia Plantarum* 100 (1997) 500-504.
- JACOBSEN J.V., PRESSMANN E.A, Structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L.) seed with emphasis on endosperm breakdown, *Planta* 144 (1979) 241-248.
- JARVIS, M.C., MCCANN, M.C., Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts and methodology, *Plant Physiol. Biochem.* 38 (2000) 1-13.
- KARSSSEN, C.M., Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. In: KIGEL, J. & ALILI, G. (eds.). *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York. (1995) p. 333-350.
- KEUSCH L., Die mobilisierung des reservemannes im Keimend Dattelsamen, *Planta* 78 (1968) 321-350.
- KISSMANN, K.G., GROTH, D., *Plantas Infestantes e Nocivas*. Tomo II. BASF, SP.(1999) p. 947-950.

- KOOIMAN, P., On the occurrence of amyloids in plant seeds. *Act. Bot. Neerl.* 9 (1960) 208-219.
- KOOIMAN, P., The constitution of tamarindus amyloid. *Rev. Trav. Chim.* 80 (1961) 849-865.
- LABOURIAU, L.G., A germinação das Sementes. Washington, D. C. Dep. Ass. Cien. Tecn. da Sec da Org. Est. Amer. (1983) 173.
- LAEMMLI, U.K., Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 223 (1970) 680-685.
- LEHNINGER, A.L. *Princípios da Bioquímica*, trad. W. R. Lodi, A. A. Simões. Ed. Savier. São Paulo, 1989.
- LEUBNER-METZGER, G., FRÜNDT, C., VÖGELI-LANGE, R., MEINS, F. Jr., Class I β -1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol.* 109(1995) 751-759.
- LIYAMA, K., LAM, T.B., STONE, B.A., Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104 (1994) 315-320.
- MACCANN, M.C., ROBERTS, K., Architecture of the primary cell wall. *In* LLOYD, C. W., *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. London, Academic Press: (1991) 109-129.
- MALEK, L., BEWLEY, J.D., Endo- β -mannanase activity and reserve mobilization in excised endosperms of fenugreek is affected by volume of incubation and abscisic acid. *Seed Science Research* 1 (1991) 45-49.
- MANZI, A.E., CERESO, A.S., The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of seed of *Gleditsia triacanthos*. *Carbohydrate Research* 134 (1984) 115-131.
- MARRACCINI, P., ROGERS, W.J., ALLARD, C., ANDRÉ, M-L., CAILLET, V., LACOSTE, N., LAUSANNE, F., MICHAUX, S., Molecular and biochemical characterization of endo β -mannanases from germination coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213 (2001) 296-308.
- MATHESON, N.K., SAINI, H.S., Polysaccharide and oligosaccharide changes in germinating lupin cotyledons. *Phytochem.* 16 (1977) 59-66.

- MCCLENDON J.H., NOLAN W.G., WENZLER H.F., The role of the endosperm in germination of legumes: galactomannan, nitrogen, and phosphorus changes in the germination of guar (*Cyamopsis tetragonolobus*, Leguminosae), *AM J. Bot.* 63 (1976) 790-797.
- MCCLEARY, B.V., Modes of action of β -d-mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannans, *Phytochemistry* 18 (1979) 757-763.
- MCCLEARY, B.V., Hydrolysis of legume seed d-galacto-d-mannans by α -d-galactosidases and β -d-mannanases in *Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization*. Ed. J. J. Marshall (1980). Academic Press, New York, London.
- MCCLEARY, B.V., Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. *Carbohydr. Res.*, 92 (1981) 269-285.
- MCCLEARY, B.V., Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannase, *Phytochemistry* 22 (1983) 649-658.
- MCCLEARY, B.V., MATHESON, N.K., Galactomannan structure and β -mannanase and β -mannosidase activity in germinating legume seeds, *Phytochemistry* 14 (1975) 1187-1194.
- MCCLEARY, B.V., MATHESON, N.K., Galactomannan utilization in germinating legume seeds, *Phytochemistry* 15 (1976) 43-47.
- MCCLEARY, B.V., MATHESON, N.K., Action patterns and substrate-binding requirements of β -mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 119 (1983) 191-219.
- MCCLEARY, B.V., TARVEL, F.R., CHEETHAM, N.W.H., Preparative scale isolation and characterization of 6(1)- α -D-galactosyl-(1-4)- β -D-mannobiose and 6(2)- α -D-galactosyl-(1-4)- β -D-mannobiose *Carbohydr. Res.* 104 (1982) 285-297.
- MELLA, R.A., MALDONALDO, S., SÁCHEZ, R.A., Phytochrome-induced structural changes and protein degradation prior to radicle protrusion in *Datura ferox* seeds. *Can J Bot* 73 (1995) 1371-1378.
- MELO-PINNA, 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). *Revista Brasileira de Botânica* 22 (1999) 375-379.

- MO, B.X., BEWLEY, J.D., Beta-mannosidase (E. C. 3.2.1.25) activity during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. Purification, cloning and characterization. *Planta* 215 (2002) 141-152.
- MOE, O.A.; MILLER, S.E., IWEN, M.H. Investigaton of the reserve carbohydrate of leguminous seeds.I. Periodate oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 2621-2825.
- MUJER *et al.* Coconut α -D-galactosidase isoenzymes: isolation, purification and characterization. *Phytochem.* 23 (1983) 1251-1254.
- NADELMANN, H., Uber die Schleimendosperm der Leguminosen. *Pringsheims Jahrb. Wiss. Bot.* 21 (1890) 1-83.
- NEUKOM, H. Galactomannans: Properties and Aplication. *Lebensmmite I Wissenschaft and Technologie London.* 22 (1989) 4-45.
- NI, B.R., BRADFORD, K.J., Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin and water potential. *Plant Physiology* 101 (1993) 607-617.
- NOMAGUCHI, M., NONOGAKI, H., MOROHASHI, Y., Development of galactomannan-hdrolyzing activity in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior to germination. *Plant Physiol* 94 (1995) 105-109.
- NONOGAKI, H.; GEE, O.H., BRADFORD, K.J., A germination-specific endo-beta-mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology* 123 (2000): 1235-1245.
- NONOGAKI, H., MATSUSHIMA, H., MOROHASHI, Y., Galactomannan hydrolysing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. *Plant Physiol.* 110 (1992) 167-172.
- NONOGAKI, H., MOROHASHI, Y., Na endo- β -mannanase develops exclusiveky in the micropilar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol.* 110 (1996) 555-559.
- OISHI, M.Y., BEWLEY, J.D., Distinction between the responses of developing maize kernels to fluoridone and desiccation in relation to germinability, α -amilase activity, and abscisic acid content. *Plant Physiology* 94 (1990) 592-598.

- POTOMATI, A., BUCKERIDGE, M.S., Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). Rev. Brasil. Bot., 25 (2002) 303-310.
- PRESSEY, R. Endo- β -mannanase in tomato fruit. Phytochem. 28 (1989) 3277-3280.
- QIN, Z.Z., Changes and endogenous abscisic acid levels in rice embryo and endosperm association with development and germination. Acta Botanica Sinica 32 (1990) 448-455.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E., Biology of plants. New York W. H. Freeman and Company, 6 ed. (1999) 944p.
- RAY, P.M., Principles of plant cell growth. Pages 1-17 in D. J. Cosgrove & D. P. Knievel (eds.), Physiology of cell expansion during plant growth. American Society of Plant Physiologists (1987) Rockville, Md.
- RAYLE, D.L., CLELAND, R., Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. Current Topics in developmental Biology 11 (1979) 87-214.
- REESE, E.T., SHIBATA, Y., β -mannanases of fungi, Can. J. Microbiol., 11 (1965) 167-183.
- REID, J.S.G., Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Legum), Planta 100 (1971) 131-142.
- REID, J.S.G., Cell wall storage carbohydrates in seeds. Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses. Adv. Bot. Res. 11 (1985): 125-155.
- REID, J.S.G., BEWLEY, J.D., A dual role for the endosperm and its galactomannan reserve in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) on endospermic leguminous seed. Planta 147 (1979) 145-150.
- REID, J.S.G., DAVIES, C., MEIER, H., Endo- β -mannanase, leguminous leucine layer and storage galactomannan in germinating seeds of *trigonella-foenum-graecum* L. Planta 133 (1977) 219-222.
- REID, J.S.G., EDWARDS, M., Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In AM Stephen, ed, Food polysaccharides and their applications. Marcel Dekker, Inc, New York (1995) 155-186.
- REID J.S.G., MEIER, H., Chemotaxonomic aspects of the reserve galactomannan in leguminous seeds, Z. Pflanzenphysiol. 62 (1970) 89-92.

- REID J.S.G., MEIER, H., The function of the aleurone layer during galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study, *Planta* 106 (1972) 44-66.
- REID J.S.G., MEIER, H., Enzyme activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds, of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidases and β -mannosidases by aleurone layer, *Planta* 112 (1973) 301-308.
- SACHS, J., Zur Keimungsgeschichte der Dattel. *Bot. Zeitung* 20 (1862) 241-246; 249-252.
- SALISBURY, F.B., ROSS, C.W., *Plant Physiology*. 3ed Ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California (1992) 682pp.
- SÁNCHEZ, R.A., DE MIGUEL, L., Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of embryo and gibberellin synthesis, *Seed Sci. Res.* 7 (1997) 27-33.
- SÁNCHEZ, R.A., SUNELL, L., LABAVITCH J.M., BONNER, B.A., Changes in endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protrusion. *Plant Physiol.* 93 (1990) 89-97.
- SEILER, A, Galactomannanabbau in Keimenden Johannisbrotsamen (*Cerotonia siliqua* L.), *Planta* 134 (1977) 209-221.
- SEKHAR, K.N.C., DEMASON, D.A., Identification and immunocytochemical localization of α -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181 (1990) 53-61.
- SOMME, R. The structure of a galactomannan from *Medicago lupulina*. L. *Acta. Chem. Scand* 22 (1968) 537-545.
- SPYROPOULOS, C.G., REID, J.S.G., Regulation of α -galactosidase activity and the hydrolases of galactomannan in the endosperm of the fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed. *Planta* 166 (1985) 271-275.
- SPYROPOULOS, C.G., REID, J.S.G., Water stress and galactomannan breakdown in germinated fenugreek seeds. Stress affects the production and activities *in vivo* of galactomannan hydrolysing enzymes. *Planta* 179 (1988) 403-408.

- STILL, D.W., BRADFORD, K.J., Endo- β -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta* 200 (1996) 153-158.
- STRYER, L., Bioquímica. Ed. Guanabara Koogan S. A. R.J (1995).
- TAIZ, L., Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant Physiology* 35 (1984) 585-657.
- TAKAKI, M., DIETRICH, S.M.C., Effect of GA3 and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds, *J. Exp. Bot.* 31 (1980) 1643-1649.
- TINÉ, M.A., CORTELAZZO, A.L., BUCKERIDGE, M.S., Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae - Caesalpinoideae). *Plant Sci.* 154 (2000) 117-126.
- TOOROP, P.E., BEWLEY, J.D., HILHORST, H.W.M., Endo-mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination, *Planta* 200 (1996) 153-158.
- UNRAU, A.M. The constitution of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala*. *J. Org. Chem.* 26 (1961) 3097-3101.
- VOIGT, B., BEWLEY, J.D., Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and post-germinative endo- β -mannanase. Responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. *Planta* 200 (1996) 71-77.
- WATKINS, J.T., CANTLIFFE, D.J., HUBER, D.J., NELL, T.A., Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper, *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110 (1985) 61-65.
- WEBER, K., OSBORN, M., The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 4406-4412.
- WELBAUM, G.E.; BRADFORD, K.J.; YIM, K-O. BOOTH, D.T.; OLUACH, M.O., Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Sci Res* 8 (1998) 161-172.
- WELBAUM, G.E., MUTHUI, W.J., WILSON, J.H., GRAYSON, R.I., FELL, R.D. Weakening of muskmelon perisperm envelope tissue during germination. *J. Exp. Bot.* 46 (1995) 391-400.
- WERKER, E., Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. *Israel Journal of Botany* 29 (1980) 22-44.

- WERKER, E., DAFNI, A., NEGBI, M., Variability in *Prosopis farcata* in Israel: anatomical features of the seed. Botanical Journal of the Linnean Society 66 (1973) 223-239.
- WHITNEY, S.E.C., BRIGHAM, J.E., DARKE, A.H., REID, J.S.G., GIDLEY, M.J., Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose. Carbohydr. Res. 307 (1998) 299-309.
- WILLIAMS H.A., BEWLEY J.D., GREENWOOD J.S., BOURGAULT R., MO, B., The cell walls of the endosperm of *Asparagus officinallis* seeds during development and following germination. Seed Sci Res 11 (2001) 305-316.
- WOLFRON, M.L., LAVER, M.L., PATIN, D.L., Carbohydrates of the coffee bean. Isolation and characterization of mannan, J. Org. Chem 26 (1961) 4533-4531.
- YAMADA, K., Changes in the level of endogenous abscisic acid in barley during germination and use of abscisic acid in malting. Journal of the America Society of Brewing Chemists 42 (1984) 79-84.
- YATSU, L.Y., JACKS, T.J., Association of lysosomal activity with aleurona grains in plant seeds. Archives of Biochemistry and Biophysics 124 (1968) 466-471.
- YORK, W.S., VAN HALBEEK, H., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P., Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by 1-H-n.m.r. spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. Carbohydr. Res. 200 (1990) 9-31.
- ZHU A., GOLDSTEIN J., Cloning and functional expression of DNA encoding coffee bean α -galactosidase. Gene 140 (1994) 227-231.