

ASPECTOS METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS DA GERMINAÇÃO DE *Parkia multijuga*

Flávia Camila SCHIMPL¹; Larissa Ramos CHEVREUIL²; José Francisco de Carvalho GONÇALVES³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Coorientadora bolsista PCI; ³Orientador/Pesquisador INPA

1. Introdução

O desenvolvimento da semente consiste em importante passo na evolução das plantas terrestres. Atualmente, estudos sobre esse propágulo sexual são fundamentais para atender às necessidades econômicas, assim como, para garantir a conservação da biodiversidade por meio da seleção do material genético das espécies (Bewley e Black, 1994; Borghetti, 2000). Do ponto de vista metabólico, a composição bioquímica das reservas orgânicas e como estas são alteradas refletem o modelo de atividade bioquímica desenvolvido durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas. Em geral, três reservas orgânicas são predominantes nas sementes, os carboidratos, lipídios e proteínas (Nkang *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2005). Durante o processo germinativo essas reservas são intensamente hidrolisadas por enzimas catalíticas, que por sua vez, tem sua atividade regulada por moléculas conhecidas como inibidores, a fim de atenderem a demanda de crescimento do eixo embrionário, de modo a fornecer energia e, em seguida, dando suporte ao estabelecimento da nova planta (Pontes *et al.*, 2002). Além da presença de proteínas como fonte de nitrogênio, as sementes também podem apresentar outros importantes compostos nitrogenados mobilizados durante a germinação, como por exemplo, os ureídeos, com destaque para a alantoína e o ácido alantóico (Quiles *et al.*, 2009). Considerando a complexidade das rotas bioquímicas ativadas durante a germinação de sementes e a necessidade de estudos sobre a germinação versus o metabolismo de espécies tropicais, o objetivo desse estudo foi analisar aspectos metabólicos e bioquímicos durante a germinação de sementes de *Parkia multijuga* a partir da mobilização de diferentes classes de proteínas, ureídeos, carboidratos e a atividade e inibição da enzima α -amilase.

2. Material e Métodos

Sementes de *Parkia multijuga* procedentes da RDS do Uatumã/AM, após quebra de dormência e embebição durante 24 horas, foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita e acondicionadas em câmara de germinação à temperatura constante de 25°C, com fotoperíodo de 12:12 horas. As análises bioquímicas foram realizadas durante a germinação em sementes quiescentes (SQ), em cotilédones após 24h de embebição (EM), em cotilédones quando a radícula atingiu de 2 a 10 mm de comprimento (C10), de 10 a 20 mm (C20), de 20 a 30 mm (C30), maior que 30 mm (>30), emissão da parte aérea (PA) e primeira folha totalmente expandida (F). Após cada coleta, foi realizada a dissecação, separando os cotilédones, do eixo embrionário e tegumento. Os cotilédones foram liofilizados e triturados em moinho analítico (Ika-Werke/M20), até a obtenção de um material finamente pulverizado.

O fracionamento de proteínas foi obtido de acordo com a solubilidade das proteínas, onde o material pulverizado (10 g) foi homogeneizado em solução salina (NaCl 0,5 M), ácida (HCl 0,1 M) e básica (NaOH 0,1 M), extraíndo-se as frações, albuminas e globulinas, glutelinas ácidas e básicas, respectivamente. Os teores de proteínas de cada classe protéica foram estimados segundo Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Os ureídeos foram extraídos em MCA (metanol, clorofórmio e água) e sua concentração foi determinada pela análise colorimétrica de derivados de glioxilato como descrito por Vogel e Van der Drift (1970), a partir de leituras espectrofotométricas a $\lambda=535$ nm, utilizando-se alantoína como padrão.

Para obtenção do perfil protéico foram preparados géis de poliacrilamida, onde o gel de concentração foi preparado a 5% em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, e o gel de separação 12,5%, em tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,8. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10%. Os marcadores de massa molecular utilizados foram BenckMark Protein Ladder (10 kDa - 220 kDa, Promega). Após a corrida os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue.

Os açúcares solúveis foram extraídos a partir do material pulverizado homogeneizado em álcool etílico (80%) e o amido digerido em ácido perclórico 35% (Buckeridge e Dietrich, 1990). Os carboidratos foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico a partir de leituras espectrofotométricas a $\lambda=490$ nm, utilizando-se a glicose como padrão (Dubois *et al.*, 1956; Passos, 1996).

Do material pulverizado (10 g) procedeu-se a extração salina (NaCl 0,15 M) e, após centrifugação (10000 g, 5 min., 4°C) e diálise contra água destilada, o material foi liofilizado para determinação da atividade da enzima α -amilase e do inibidor de α -amilase, de acordo com método descrito por Bezerra *et al.* (2004).

3. Resultados e discussão

As sementes apresentaram rápido desenvolvimento, com germinabilidade (G) de 95%, tempo médio de germinação (TMG) de $5 \pm 0,8$ dias e, emissão da parte aérea (TME) em $12 \pm 0,6$ dias. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi de $2,07 \pm 0,2$ sementes por dia. O comportamento das frações das proteínas solúveis durante a germinação é dado de forma distinta, ressaltando que na classe C>30, de modo geral, houve redução de, aproximadamente, 40% no teor de todas as frações protéicas testadas, em relação a C30. No estágio seguinte (PA) observa-se acréscimo no conteúdo protéico para todas as frações testadas, mantendo-se, no estágio seguinte (classe F), nas glutelinas ácidas e básicas, enquanto as frações albumínicas e globulínicas tiveram seus teores reduzidos duas e nove vezes, respectivamente (Tabela 1), corroborando com a literatura científica, em que essas duas classes protéicas são apontadas como majoritárias em sementes de leguminosas (Buckeridge *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Concentração de proteínas solúveis e ureídeos durante a germinação de *P. multijuga*.

Estádio desenvolvimento	Proteína (%)				Ureídeos (%)
	Albumina	Globulina	Glutelinas		
			Ácida	Básica	
SQ	6,3 \pm 0,2	3,8 \pm 0,1	2,4 \pm 0,0	2,4 \pm 0,1	5,3 \pm 0,4
EM	4,3 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2	4,0 \pm 0,1
C10	6,1 \pm 0,1	7,9 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2	3,0 \pm 0,2	4,0 \pm 0,3
C20	10,0 \pm 0,1	4,8 \pm 0,3	5,3 \pm 0,4	1,9 \pm 0,0	5,3 \pm 0,3
C30	9,9 \pm 0,0	5,5 \pm 0,3	4,7 \pm 0,3	2,8 \pm 0,1	5,7 \pm 0,5
C>30	6,9 \pm 0,0	2,2 \pm 0,0	3,6 \pm 0,4	1,6 \pm 0,0	6,8 \pm 0,3
PA	7,4 \pm 0,2	6,0 \pm 0,4	6,8 \pm 0,1	5,4 \pm 0,2	5,6 \pm 0,1
F	4,0 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	8,0 \pm 0,1	5,8 \pm 0,0	6,3 \pm 0,6

Os ureídeos, nos cotilédones de *P. multijuga*, de modo geral, apresentaram altas percentagens (Tabela 1), sendo superior ao encontrado em *Phaseolus vulgaris*, que durante a germinação apresentou percentuais de 0,1% (w/w). Adicionalmente, durante a germinação de *P. multijuga*, o comportamento do teor de ureídeos também foi semelhante ao encontrado em *Phaseolus vulgaris*, com seu conteúdo aumentando após a emergência da radícula (Quiles *et al.*, 2009). A redução dos teores, observada no estágio de SQ para EM, sugere que a presença de ureídeos em outros tecidos da semente, como tegumento e eixo embrionário, tenham contribuído para a maior percentagem deste metabólito em SQ. Conforme observado em outras espécies, o consumo de ureídeos na fase primária da germinação ocorre para dar apoio inicial a atividade metabólica, assim a síntese do metabólito pode ter ocorrido simultaneamente com o seu consumo (Fait *et al.*, 2006).

Analisando o perfil protéico durante a germinação, observa-se que as albuminas apresentam bandas protéicas em diferentes faixas de massa molecular, destacando-se o aumento de intensidade de algumas bandas durante a germinação na faixa de 25 kDa e 50 kDa (Figura 1). Ao passo que na fração das globulinas houve uma concentração de bandas protéicas nas faixas abaixo de 20, 35 e 50 kDa (Figura 1).

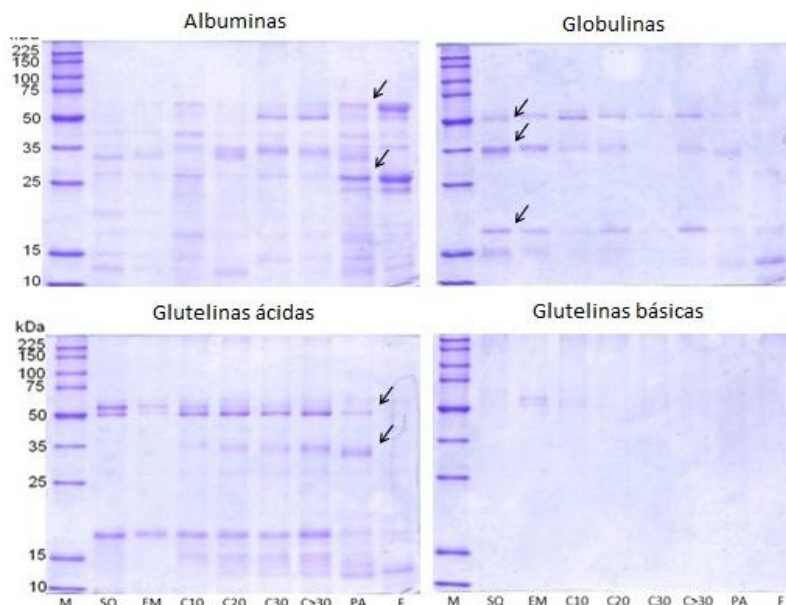


Figura 1 - Perfil eletroforético das frações protéicas em diferentes estádios de germinação *P. multijuga*.

Nas glutelinas ácidas observou-se a diminuição da intensidade de bandas na faixa de 50 kDa, em contraste com o aumento da intensidade de outras bandas na faixa de 35 kDa, sugerindo a degradação e síntese de proteínas (Figura 1). Quanto às glutelinas básicas visualizou-se bandas apenas nos estádios EM e C10 da germinação (Figura 1). Estudos envolvendo o fracionamento protéico de *Parkia nitida* também demonstram a presença duas bandas pouco visíveis, com massas moleculares na faixa de 50 a 60 kDa para a classe das glutelinas básicas (Macedo *et al.*, 2002).

Sementes de *P. multijuga* apresentam baixas variações no conteúdo de amido durante os diferentes estádios germinação, sendo acumulado nos momentos iniciais, até C20 e, posteriormente consumidos até a fase final da germinação, retornando aos níveis próximos ao encontrado nos cotilédones embebidos (EM) (Figura 2A). Quanto aos açúcares solúveis totais (AST), observou-se acréscimo do conteúdo de, aproximadamente, duas vezes em PA, que pode ser resultante da degradação do amido nos estádios anteriores (Figura 2B). Quanto ao conteúdo inicial de carboidratos em *P. multijuga*, observou-se maiores teores de amido comparado ao AST nos cotilédones, corroborando ao encontrado para outra leguminosa arbórea, *Schizolobium parahyba*, que também apresenta esse perfil de estocagem dos carboidratos, no entanto, os teores de amido para esta espécie são, aproximadamente, 100 vezes maiores que os encontrados em *P. multijuga* (Weidlich *et al.*, 2010).

A atividade enzima α -amilase inicialmente foi baixa nas sementes quiescentes de *P. multijuga*, tendo sua atividade aumentada em, aproximadamente, duas vezes a partir da embebição (EM) até C20, momento caracterizado pela diminuição na atividade enzimática até próximo de zero (Figura 2C). Esse comportamento pode ser explicado pela presença de proteólises durante o processo de germinação, onde as enzimas (proteases) atuam no estágio inicial (início da hidrólise) degradando proteínas de reserva e liberando aminoácidos que são utilizados para a síntese de novas enzimas envolvidas em diferentes processos, como por exemplo, a degradação de reservas (α -amilase). Após a atuação das enzimas, estas também podem ser hidrolisadas por proteases, liberando novamente aminoácidos que irão dar suporte ao processo de germinação (Savelkoul *et al.*, 1992).

Outro fato é que, as enzimas hidrolíticas, durante a germinação, podem ter suas atividades reguladas pelo acúmulo do produto de sua atuação, ou seja, para α -amilase, o acúmulo de AST, como observado no estágio PA pode ter contribuído para a manutenção da baixa atividade da enzima nesse estágio (Sun e Henson, 1990). Contudo, proteínas inibidoras de α -amilase são as maiores responsáveis pela regulação da atividade enzimática.

Durante a germinação de *P. multijuga*, os inibidores de α -amilase apresentaram comportamento inverso ao da enzima, indicando uma possível regulação da atividade da α -amilase (Figura 2D). No decorrer do processo germinativo e formação da plântula, a inibição da α -amilase é reduzida, com aumento expressivo no último estágio (classe F), sugerindo

sua função de defesa contra insetos e microorganismos, conferindo maior resistência à plântula (Kadozawa, 2010).

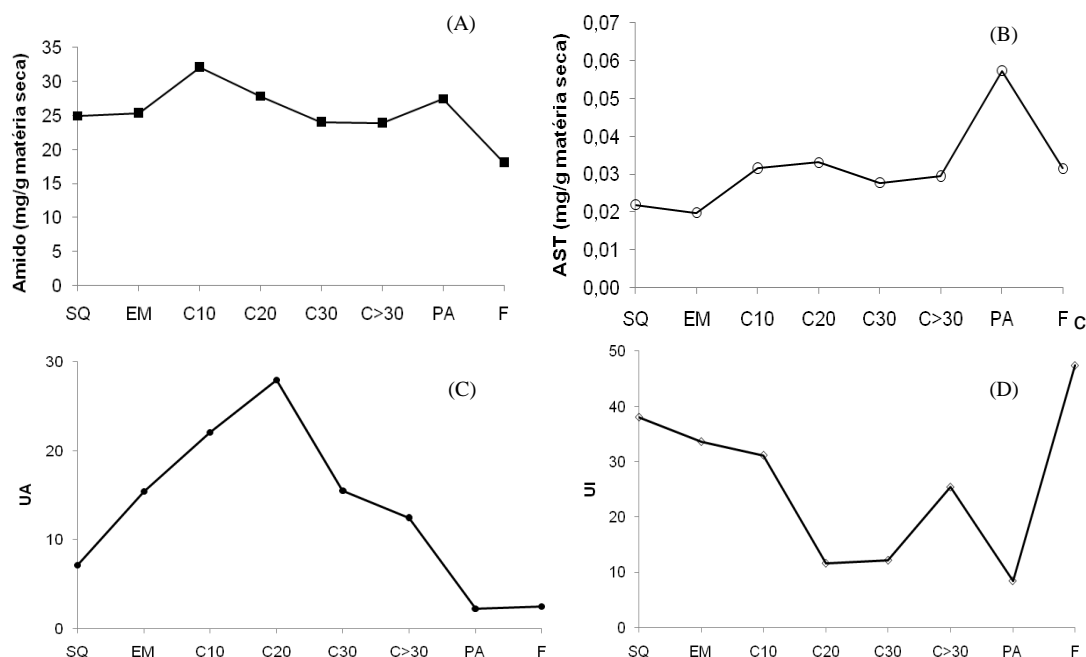


Figura 2 - A - Mobilização de amido (■); B - açúcares solúveis (○); C - Mobilização da enzima α -amilase (●); D - inibidor da enzima α -amilase (◇) durante a germinação de *P. multijuga*.

4. Conclusão

Em sementes de *P. multijuga* a classe de proteína majoritária é a albumina, seguida da globulina, não havendo um padrão na mobilização das diferentes classes protéicas, ao passo que os ureídeos tendem a ser sintetizados após a emissão da radícula.

Durante o processo de germinação e desenvolvimento das plântulas, proteínas de diferentes massas moleculares aparentes, pertencentes às classes albuminas e glutelinas ácidas foram consumidas, ao passo que outras foram sintetizadas.

Após a emissão da radícula, o conteúdo de amido tende a diminuir, ao passo que os níveis de açúcares solúveis aumentam a partir da embebição.

A inibição da atividade da enzima α -amilase ocorre nos momentos de desenvolvimento da plântula aumentando expressivamente no último estágio, sugerindo a função de defesa vegetal dos inibidores de α -amilase.

5. Referências

Bezerra, I.W.L.; Teixeira, F.M.; Oliveira, A.S.; Araújo, C.L.; Leite, E.L.; Queiroz, K.C.S.; Sales, M.P. 2004, α -amilase inhibitors from *Ficus sp.* Seeds and their activities towards Coleopteran sect pests. *Protein and Peptide Letters*, 11(2):181-187.

Bewley, J. D.; Black, M. 1994. *Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York, p. 255.

Borghetti, F. 2000. Ecofisiologia da germinação das sementes. *Universa*, 8(1): 149 – 180.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

Buckeridge, M. S.; Dietrich, S.M.C. 1990. Galactomanans from Brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica*, 13: 109-112.

Buckeridge, M.S.; Aidar, M.P.M.; Santos, H.P. dos; Tine, M.A.S. 2004. Acúmulo de reservas. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (Orgs). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 31-50.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smit, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annalical Chemistry*, 28: 350-356.

Fait Angelovici, R.A.; Less, H.; Ohad, I.; Urbanczyk-Wochniak, E.; Fernie, A.R.; Galili, G. 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.*, 142:839-854.

Fu, Q.; Wang, B.C.; Jin, X.; Li, H.B.; Han, P.; Wei, K.H.; Zhang, X.M.; Zhu, Y.X. 2005. Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating Arabidopsis seeds and young seedlings. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 6: 650-660.

Kadozawa, P. 2002. *Inibidores de enzimas e compostos de defesa do milho (Zea mays) contra Fusarium verticillioides durante a germinação*. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) Departamento de Ciências Agrárias, Londrina: UEL, 42p.

Macedo, N.M.R ; Nagano, C.S.; Nascimento, K.S.; Goersch, G.V.; Aragao, K.S.; Castellon, R.E.R.; Gadelha, C.A.A.; Souza, L.A.G.; Cavada, B.S.; Santos, C.F. 2002. Determinação do teor de proteínas solúveis, atividade hemaglutinante e perfil eletroforético das frações protéicas de sementes de *Parkia nitida* (LEGUMINOSAE, MIMOSACEAE). *Anais da VII Semana Universitária da UECE*, Fortaleza - CE: 14-27.

Nkang, A.; Omokaro, D.; Egbe, A.; Amanke, G. 2003. Variations in fatty acid proportions during desiccation of *Telfairia occidentalis* seeds harvested at physiological and agronomic maturity. *African Journal of Biotechnology*, 2 (2):33-39.

Passos, L. P. *Métodos analíticos e laboratoriais em Fisiologia Vegetal*. Embrapa, Coronel Pacheco, MG: Embrapa-CNPGL, 223 p. 1996.

Pontes, C.A.; Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G.; Soares, C.P.B. 2002. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, 26(5): 593-601.

Quiles, F.A; Raso, M.J.; Pineda, M.; Piedras, P. 2009. Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum*, 135: 19-28.

Savelkoul, F.H.M.G.; Van Der Poel, A.F.B.; Tamminga, S. 1992. The presence and inactivation of trypsin inhibitor, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42:71-85.

Sun, Z. Henson, C.A. 1990. Degradation of native starch granules by barley α -glucosidases. *Plant physiology*, 94:320-327

Vogel, G.D.; Van Der Drift, C., 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry*, 33: 143-157.

Weidlich, E.W.A.; Pescador, R.; Uhlmann A. 2010. Alocação de recursos (carboidratos) no desenvolvimento inicial de plântulas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake (Fabaceae - Caesalpinioideae). *Revista Árvore*, 34(4):627-635.