

FÁBIO REIS DALLE MOLLE

**Atividade de enzimas do catabolismo de sacarose em
plântulas de *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee &
Lang. durante a mobilização do xiloglucano de reserva**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo

2007

FÁBIO REIS DALLE MOLLE

**Atividade de enzimas do catabolismo de sacarose em
plântulas de *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee &
Lang. durante a mobilização do xiloglucano de reserva**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. MARCO AURÉLIO SILVA TINÉ

*Faça tudo, busque o impossível,
Mas meu amigo,
Respeite o mar.
O sábio marinheiro sabe que
Ele jamais venceu uma tormenta,
Apenas e tão-somente apenas,
Foi o mar que deixou
Ele passar.*

Trecho de carta de Hélio ao amigo Amir Klink

Agradecimentos

À Rita e ao Bruno, meus amores.

Aos meus amados pais, Romualdo e Walkíria, pela minha vida e pelo suporte por todos esses anos.

Aos meus irmãos, Gustavo e Diogo, pela convivência, amizade e apoio.

Ao meu orientador Dr. Marco Aurélio Silva Tiné, pela amizade, paciência e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge, do departamento de Botânica (USP) pelo apoio, incentivo e ensinamentos.

A Profa. Dra. Sônia M. C. Dietrich, pelo apoio, simpatia e energia.

A Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade de desenvolver os experimentos.

As pesquisadoras Dra. Marília Gaspar Mais, Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho, Dra. Lílian Penteado Zaidan, Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro pela atenção e amizade.

Aos pesquisadores Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar e Dr. Emerson Alves da Silva pela convivência e ajudas.

Aos professores e coordenadores do curso de pós-graduação do Instituto de Botânica, pela construção de conhecimento e oportunidade.

Aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal (Unicamp), pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos amigos Amanda Asega, Amanda “Top”, Amanda S., Claudinha, Cynthia, Denise, Elaine, Fabiano, Fê K., Ju. Iura, Kelly, Ludmila, Marcelino, Paty Pinho, Paola, Roberta, Rosana, Simone, Sabrina, Tati, Vanessa Rebouças, João, Maraba, Marina, Vanessa Oliveira.

À Mary Monteiro, técnica do laboratório, pelos auxílios.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro

Índice

Introdução.....	1
1. <i>Hymenaea courbaril</i> (jatobá).....	1
2. Tipos de reserva em sementes.....	2
3. Xiloglucano de reserva.....	5
4. Relações fonte-dreno de sacarose.....	6
5. Enzimas do metabolismo de sacarose.....	9
Objetivo.....	12
Material e métodos.....	13
1. Sacarose sintase.....	14
2. Invertase.....	17
3. Análise dos carboidratos.....	22
Resultados.....	24
1. Sacarose sintase.....	24
2. Invertase.....	26
3. Análise de carboidratos.....	33
Discussão.....	35
1. Sacarose sintase.....	35
2. Invertases.....	38
2.1. Invertase insolúvel.....	38
2.2. Invertase solúvel ácida.....	39
2.3. Invertase solúvel neutra.....	41
3. Análise de carboidratos.....	43
Conclusões.....	45
Referências bibliográficas.....	46

Resumo

Quase todas as sementes acumulam carboidratos que são utilizados pela plântula como fonte de carbono durante o seu estabelecimento. No caso de *Hymenaea courbaril* L., uma das reservas da semente é o xiloglucano, um polissacarídeo depositado nas paredes das células cotiledonares. Após a germinação da semente, este polissacarídeo é convertido em sacarose e transportado para outras partes da plântula. A compreensão do metabolismo da sacarose, portanto, é essencial para a compreensão das relações de fonte e dreno entre as partes da plântula em crescimento. As enzimas chave do metabolismo da sacarose são: sacarose fosfato sintase, que catalisa a síntese reversível de sacarose a partir de frutose-6-P e NDP-glucose, a sacarose sintase que catalisa a degradação reversível da sacarose gerando NDP-glucose e frutose e as invertases que catalisam a hidrólise irreversível da sacarose gerando glucose e frutose. Neste trabalho, foi feito um mapeamento espacial da sacarose sintase e espaço-temporal das invertases nos diferentes órgãos de plântulas de *H. courbaril* ao longo de um dia. As sementes foram escarificadas manualmente, embebidas em uma bandeja com vermiculita a 25⁰C. Após a germinação, as sementes foram transferidas para vasos com vermiculita e areia (1:2), cultivadas em casa de vegetação até que os cotilédones mostrassem sinais de murchamento, sinal que está ocorrendo a mobilização do polissacarídeo de reserva. As plântulas foram coletadas em intervalos de 6 horas a partir da 0 hora por 24 horas, com uma coleta intermediária às 2 horas, imediatamente congeladas e armazenadas a -80⁰C até a dosagem de atividade enzimática. Uma amostra dos diferentes órgãos foi coletada nos diferentes horários para a análise dos carboidratos solúveis por HPAEC-PAD. As maiores atividades de sacarose sintase por massa fresca ocorreram em cotilédone e hipocótilo e as menores em metáfilo e eófilo. Os órgãos que apresentaram as maiores atividades específicas foram epicótilo, hipocótilo e metáfilo, enquanto que os cotilédones apresentaram a menor atividade. As três isoformas de invertase estudadas tiveram variação na atividade ao longo do dia nos diferentes órgãos da plântula, com

destaque para o horário das 6 horas para a invertase de parede celular, quando há queda de atividade desta enzima nos cotilédones e eófilos, enquanto que nos demais órgãos há um aumento de atividade nesse horário. Às 12 horas há um pico de atividade específica de invertase solúvel neutra em todos os órgãos, exceto raiz. Às 6 horas há um enorme pico de atividade específica de invertase ácida no eófilo. O mapeamento temporal mostrou que o metabolismo de sacarose parece variar ao longo do dia, coordenando as diferentes fontes de carbono da plântula: o xiloglucano de reserva e a fotossíntese. A análise dos carboidratos solúveis mostrou baixas concentrações destes em cotilédones, diminuição da concentração de sacarose durante o dia no eófilo e altas concentrações de monossacarídeos livres em metafílo e epicótilo. A alta correlação encontrada entre a capacidade de dreno dos órgãos e a atividade de sacarose sintase sugere que o catabolismo de sacarose por essa enzima é um importante elemento no estabelecimento de drenos de carboidratos dentro da plântula e pode ser usado como um marcador das relações fonte-dreno entre os diferentes órgãos da plântula.

Abstract

Almost all seeds accumulate carbohydrates, which are used by the plantlet as carbon source during its establishment. In the case of *Hymenaea courbaril* L., one of the reserves of the seed is the reserve xyloglucan, a polysaccharyde deposited in the walls of cotyledons cells. After the germination of the seed, this polysaccharyde is converted into sucrose and carried to other parts of the plantlet. The understanding of the metabolism of sucrose, therefore, is essential for the understanding of the source-sink relations among parts of the growing plantlet. The key enzymes in the sucrose metabolism are sucrose phosphate synthase, that catalyzes the reversible synthesis of sucrose from fructose-6-P and NDP-glucose, sucrose synthase that catalyzes the reversible degradation of sucrose generating NDP-glucose and fructose and invertases that catalyzes irreversible hydrolysis of sucrose generating glucose and fructose. In this work, a mapping of sucrose synthase and invertases activities in the different organs of *H. courbaril* was performed throughout one day. The seeds were abraded manually, and imbibed in a tray with vermiculite at 25⁰C. After the germination, the seeds were transferred to vases with vermiculite and sand (1:2) and cultivated in greenhouse until the cotyledons showed wilting signals, indicating the mobilization of the reserve polysaccharyde. Plantlets were collected in intervals of 6 hours from the 0:00 during 24 hours, with an intermediate harvest at 2:00 and frozen in liquid N₂ and stored at -80⁰C until use. The highest sucrose synthase activities for fresh mass had occurred in cotyledon and hypocotyl and the lowest in metaphyll and eophyll. The organs that presented the highest specific activities were epicotyl, hypocotyl and metaphyll and the lowest was in cotyledons. The three isoforms of invertase varied their activities along the day in the different plantlet organs, specially at dawn (6:00 am), when the activity of cell wall invertase drops in the cotyledons and eophylls, while rises in the rest of the plantlet. At 12:00 am there is a peak of neutral invertase specific activity in all

organs, except roots. At 6:00 am there is a huge peak of in the acid soluble invertase specific activity in eophyll. The mapping showed that the metabolism of sucrose varies along the day, co-ordinating the different carbon sources of plantlet: the reserve xyloglucan and the photosynthesis. The high correlation found between the organ sink capacity and the sucrose synthase activity suggests that the catabolism of sucrose by this enzyme is an important element in the establishment of carbohydrate sinks inside of plantlet and can be used as a marker of source-sink relations among the different organs of the plantlet.

INTRODUÇÃO

1. *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee & Lang. (jatobá)

O gênero *Hymenaea* surgiu na África a cerca de 65 milhões de anos, espalhou-se e adaptou-se muito bem nas regiões neotropicais gerando muitas espécies. *Hymenaea courbaril* é considerada uma das mais bem-sucedidas espécies deste gênero, com 17 variedades diferentes em florestas tropicais do México até os países tropicais da América do Sul. *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee & Lang. é uma árvore de 20-30 m, com tronco de até 200 cm de diâmetro, ocorre em Floresta Estacional Semi Decidual e Floresta Ombrófila Densa até zonas subtropicais secas e úmidas, tolerando precipitação entre 600 e 4200 mm, temperatura média anual entre 22 e 28 °C e solos com pH entre 4 e 7,5. É típica de floresta madura e primária, sendo considerada espécie secundária tardia (ou clímax) na sucessão florestal (Lee & Langenheim, 1975). Possui sementes grandes com cotilédones globóides não-fotossintetizantes ricos em reservas (Buckeridge & Dietrich, 1990). Tais reservas são importantes na estratégia da espécie para o estabelecimento das plântulas.

As plântulas de *H. courbaril* são consideradas, em relação aos cotilédones de reserva, como fanerocotiledonar, epígea e globóide (Santos & Buckeridge, 2004). Os cotilédones são compostos por 46% de carbono, 9% de proteína e 3,5% de lipídeos. As sementes germinam em sub-bosque da floresta madura, sendo as plântulas tolerantes a sombra. *H. courbaril* é nativa ao longo dos rios em florestas relativamente secas do estado de São Paulo e de partes adjacentes do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Floresce de janeiro a novembro e os frutos estão geralmente maduros em setembro (Lee & Langenheim, 1975).

O estabelecimento das plântulas durante o crescimento heterotrófico envolve o uso metabolicamente controlado das reservas (mobilização e partição dos produtos) até que estas plantas sejam capazes de extrair do ambiente os recursos necessários ao seu crescimento. Esta transição heterotrofia-autotrofia é considerada uma etapa crítica no ciclo de vida das plantas por ser a etapa de maior mortalidade. A compreensão do controle do metabolismo das reservas, portanto, é essencial para entender a estratégia de uso dos recursos disponíveis para as plântulas.

2. Tipos de reserva em sementes

As angiospermas apresentam diferentes estratégias de adaptação aos seus respectivos ambientes, entre as quais encontra-se o acúmulo de certos compostos de reserva em suas sementes. Estas substâncias são mobilizadas após a germinação, durante o desenvolvimento das plântulas, e seus produtos de degradação são usados para diferentes propósitos tais como a geração de energia e a produção de matéria prima (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos) para a construção de novos tecidos e células (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975). Dentre as principais substâncias armazenadas pelas plantas, muitos polímeros de carboidratos foram selecionados durante a evolução. O polissacarídeo de reserva mais abundante, o amido possui a vantagem de ser formado por glucose. Este açúcar é prontamente utilizado pelo metabolismo de geração de energia e também fornece carbono para a biossíntese da maioria das biomoléculas presentes em células vegetais (Buckeridge *et al.*, 2000).

Além dos polímeros de carboidratos, as sementes podem acumular sacarose e oligossacarídeos da série rafínósica para degradação durante a germinação. A principal função da sacarose tem sido atribuída à propriedade das sementes ortodoxas de estabilizarem suas membranas e poderem permanecer secas por um longo período, após

o qual germinam normalmente. Tais sementes podem se manter viáveis por um longo período com um baixo teor de água até que a embebição dispare várias respostas fisiológicas que irão levar à germinação e à mobilização das reservas. Uma parte da sacarose que chega à semente em formação pode ser utilizada para a síntese dos oligossacarídeos da família rafinósica, cuja biossíntese ocorre no vacúolo e leva à adição de uma unidade de galactose ao carbono 6 da molécula de glucose da sacarose na forma de ligação alfa (Buckeridge *et al.*, 2004).

Outra forma de armazenamento de carboidratos é através dos polissacarídeos de reserva de parede celular de sementes, como o galactomanano, o galactano e o xiloglucano, que são reservas para a plântula em desenvolvimento, sendo degradados após a germinação (Buckeridge & Reid, 1996).

Cada um dos principais polissacarídeos de reserva (de parede celular e amido) apresenta características que fazem com que eles sejam mais convenientes para o metabolismo celular em situações específicas. Uma dessas características é o fato de que nenhum deles possui a carbonila do aldeído livre. Esta é uma vantagem quando comparada ao acúmulo de monossacarídeos, uma vez que tais compostos poderiam levar à glicosilação inespecífica de elementos celulares. Outra vantagem é a relativa inatividade osmótica dos polímeros, uma vez que o amido é insolúvel e altamente compactado em organelas celulares específicas (amiloplastos). Por outro lado, os estados de baixa compactação e alta solubilidade dos oligossacarídeos (sacarose e rafinose) estão possivelmente relacionados com uma segunda função desses compostos: controlar o potencial osmótico das células.

Os polissacarídeos de reserva de parede celular são relativamente inertes no que concerne à sua reatividade química e apresentam diferentes graus de solubilidade em água. Essas características conferem vantagens que são similares às do amido (alta

compactação e baixa reatividade) e tornam possível a existência de um “compartimento celular” (a parede celular) que permite o fluxo de água com um grau de liberdade considerável. Por outro lado, o custo para produzir tais polímeros é alto, pois tais compostos necessitam de um complexo sistema de biossíntese (que requer nucleotídeos açúcares como doadores de monossacarídeos), secreção e montagem no meio extracelular (Buckeridge *et al.*, 2000). Outra vantagem potencial destes polímeros é que eles requerem um arsenal específico de enzimas para sua degradação, o que limita o número de predadores capazes de se alimentar das sementes. Portanto, os polissacarídeos de reserva de parede celular têm função principal como reserva (fonte de carbono) para utilização durante o desenvolvimento da plântula e possuem funções secundárias como controle de embebição e propriedades mecânicas dos cotilédones. São classificados em 3 grupos distintos: os mananos, os (arabino)galactanos e os xiloglucanos. Esta classificação é baseada essencialmente na estrutura química desses polímeros (Buckeridge *et al.*, 2000).

Em cotilédones de jatobá, a reserva do polissacarídeo de parede celular é o xiloglucano, que corresponde a 40% da massa seca do órgão. Este polissacarídeo é mobilizado após a germinação e possui concomitância com o desenvolvimento da plântula, configurando uma reserva pós-germinativa (Tiné *et al.*, 2000). A mobilização do xiloglucano é sincronizada com a expansão dos eófilos e primeiros metáfilos da plântula, sendo responsável pelo suporte energético para o início do processo fotossintético e a transição dreno-fonte nestes tecidos (Santos & Buckeridge, 2004).

3. Xiloglucano de reserva

Xiloglucanos são polissacarídeos de parede celular formados por uma cadeia principal de β -D-(1 \rightarrow 4)-glucano ramificada com ligações α -(1 \rightarrow 6) por unidades de D-xilopiranosídeos ou B-D-galactopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)-D-xilopiranosídeos. Exceto pela ausência de terminais fucosil ligados [α -L-(1 \rightarrow 2)] aos grupos β -D-galactosídeos, existe uma grande semelhança entre xiloglucanos de reservas de sementes e xiloglucanos de paredes primárias, em tecidos vegetativos de dicotiledôneas (Hayashi, 1989).

A função de reserva dos xiloglucanos foi demonstrada em cotilédones de sementes de *Tropaeolum majus* (Edwards *et al.*, 1985), *Tamarindus indica* (Reis *et al.*, 1987), *Copaifera langsdorffii* (Buckeridge *et al.*, 1992) e *Hymenaea courbaril* (Tiné *et al.*, 2000, Santos & Buckeridge, 2004), nas quais a mobilização deste polímero foi acompanhada *in vivo* pelo incremento e queda da atividade de quatro hidrolases: β -galactosidase, xiloglucano-endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanase (XET), α -xilosidade e β -glucosidase.

Embora o mecanismo bioquímico do desmonte do xiloglucano já tenha sido estudado, sabe-se pouco sobre o transporte de carbono entre as partes da planta. A ausência de outros oligossacarídeos, além da sacarose, nos cotilédones de *H. courbaril*, sugere que este dissacarídeo seja a forma de transporte de carbono predominante entre o órgão fonte (cotilédone) e os drenos (plântula em desenvolvimento).

Trabalhos anteriores com *H. courbaril* (Santos, 2002; Amaral, 2005) mostraram que os resultados estão fortemente associados ao horário das coletas devido ao ritmo circadiano, já que o metabolismo de carboidratos de reserva durante a noite está intimamente associado ao metabolismo fotossintético durante o dia. No caso de *H.*

courbaril, como a mobilização ocorre em um momento em que algumas folhas já apresentam atividade fotossintética, a mobilização parece ocorrer durante a noite, quando o fluxo de carbono a partir dos órgãos fotossintéticos cessa (Barriga, 2003).

4. Relações fonte-dreno de sacarose

Em *H. courbaril*, a degradação do xiloglucano de reserva ocorre ao mesmo tempo em que a fotossíntese é iniciada nos eófilos, primeiros pares de folhas que emergem da abertura dos cotilédones. Neste caso, a plântula em desenvolvimento possui duas possíveis fontes de carbono simultaneamente: a reserva dos cotilédones e a fotossíntese. No caso da fotossíntese, existe um ritmo circadiano associado à disponibilidade de luz. Por outro lado, foi verificado que a degradação do xiloglucano de reserva ocorre durante a noite (Amaral, 2005). Nos dois casos, a sacarose parece ser a forma de transporte do carbono ao longo da planta. As duas fontes de carbono, portanto, parecem estar finamente sincronizadas de modo que durante o dia, a fotossíntese nas folhas maduras produz a sacarose exportada para o resto da planta. Durante a noite, as reservas de xiloglucano são mobilizadas, o que mantém a disponibilidade de carbono para os tecidos em crescimento durante todo o dia (figura 1). A própria disponibilidade de sacarose nos tecidos poderia funcionar como um sinalizador no processo, uma vez que além de fonte de energia, a própria sacarose pode atuar como um regulador direto ou indireto da expressão gênica (Winter & Huber, 2000).

Santos & Buckeridge (2004) indicaram que o controle da degradação de xiloglucano em *H. courbaril* parece ser exercido pela auxina, devido aos picos de atividade das hidrolases responsáveis pela mobilização deste polímero, que ocorrem paralelamente aos maiores teores de auxina endógena.

Nas plantas, portanto, existem órgãos que atuam como fontes de carboidratos e outros que atuam como drenos. Tais relações fonte-dreno são dinâmicas e variam não apenas ao longo do desenvolvimento da planta como também ao longo de um dia. Órgãos de reserva, por exemplo, atuam como potentes drenos durante o acúmulo das reservas e passam a atuar como fontes quando da mobilização destas reservas. No caso das plântulas de *H. courbaril*, durante a mobilização do xiloglucano de reserva, o modelo atual propõe que as folhas maduras atuariam como fonte durante o período luminoso do dia e à noite, com a redução da capacidade de exportação das folhas, a mobilização do xiloglucano de reserva seria estimulada, aumentando a capacidade de exportação dos cotilédones. Entender o metabolismo e o transporte de sacarose na plântula durante a degradação do polissacarídeo de reserva é, portanto, essencial para a compreensão do uso e da partição dos carboidratos na plântula. Para a melhor compreensão do metabolismo de carboidratos, devem-se direcionar os estudos para os diferentes órgãos da planta durante seu crescimento inicial: raiz, hipocótilo (caule abaixo da inserção cotiledonar), cotilédones, eófilos, epicótilo (caule acima da inserção cotiledonar) e metáfilos (figura 1).

Os órgãos-fonte de sacarose seriam aqueles com função de reserva (como os cotilédones) ou folhas maduras (como os eófilos), capazes de produzir fotossintatos em excesso além de sua própria necessidade. Os órgãos-dreno de sacarose seriam aqueles não fotossintetizantes ou incapazes de produzir fotossintatos em quantidade suficiente para sustentar o próprio crescimento ou necessidade de armazenamento (Taiz & Zeiger, 1998).

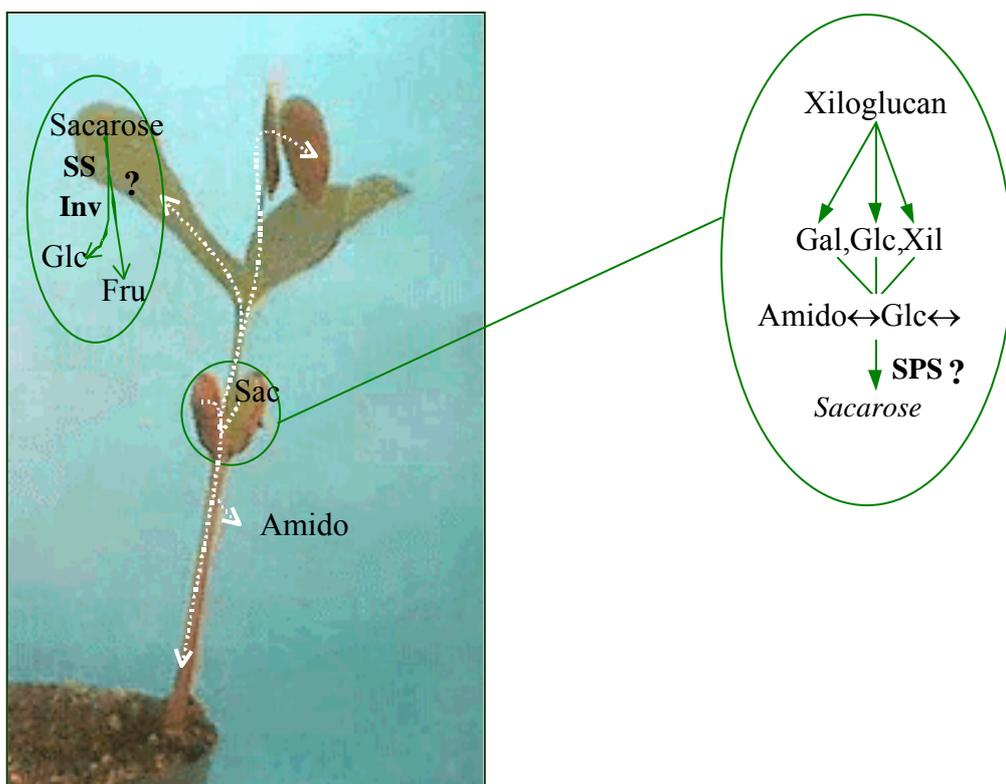


Figura 1. Esquema geral de degradação do xiloglucano de reserva nos cotilédones e o transporte de sacarose para os diferentes órgãos-dreno durante o crescimento inicial de plantas de *Hymenaea courbaril* (jatobá). Em negrito estão mostrados os possíveis locais de atividade das enzimas do metabolismo da sacarose – **SPS** (sacarose fosfato sintase), **SS** (sacarose sintase) e **Inv** (invertase). Os pontos de interrogação indicam que nenhum estudo neste sentido foi realizado, portanto, a detecção destas enzimas nesta espécie deve ser a primeira etapa a ser cumprida (adaptado de Tiné, 1997).

Santos & Buckeridge (2004) injetaram sacarose marcada radioativamente (^{14}C -sacarose) em um dos cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* e acompanharam a distribuição da marcação radioativa após 72 horas (tabela 1). O eófilo neste ponto do desenvolvimento já se encontra fotossinteticamente ativo e já não representa um dreno importante. Embora no cotilédone no qual a radioatividade foi injetada (tratado) a contagem tenha sido alta, a contagem no cotilédone não tratado foi zero, o que mostrou que não houve importação nenhuma de sacarose para aquele órgão. Os órgãos que

apresentaram as maiores contagens por tecido foram metáfilo e epicótilo. A maior parte do carbono exportado do cotilédone teve como destino a parte aérea em expansão.

Tabela 1. Distribuição relativa de [¹⁴C]sacarose entre diferentes tecidos de plântulas de 35 dias de idade de *H. courbaril* (adaptado de Santos *et al.*, 2004).

Tecido	Radioatividade relativa (%)*	
	Contagens por tecido	Força de dreno**
Epicótilo***	15±2,9	41±7,3
Metáfilo	24±6,8	22±8,7
Eófilo	6±2,9	2±1,3
Hipocótilo	14±4,5	7±3,7
Cotilédone não tratado	0±0,0	0±0,0
Cotilédone tratado	30±8,3	20±5,1
Raiz	10±6,2	8±4,2

A sacarose radioativa foi injetada (5µL, 18520 Bq) em um cotilédone (tratado) e a [¹⁴C]cintilação foi lida depois de 72 h.

*Os números representam a média de 9 replicatas (plântulas) ± desvio padrão.

**Porcentagem de contagens por g de massa seca.

*** Região do caule superior à inserção dos cotilédones.

5. Enzimas do metabolismo de sacarose

Os estudos de metabolismo de carboidratos devem ser realizados através da análise de enzimas relacionadas ao metabolismo da sacarose, que regulam a entrada deste dissacarídeo dentro das diferentes rotas bioquímicas, como respiração, biossíntese de parede celular e produção de reservas temporárias (Sturm & Tang, 1999), permitindo o entendimento da partição e utilização dos carboidratos.

A síntese de sacarose é realizada principalmente pela *sacarose fosfato sintase* (SPS) (EC 2.4.1.14), uma enzima alostérica ativada pela glucose-6-fosfato e inibida

pelo ortofosfato (Taiz & Zeiger, 1998). A fosforilação da enzima está sendo considerada como um importante mecanismo de controle da atividade de SPS em resposta a vários sinais endógenos e do ambiente (Winter & Huber, 2000). A degradação da sacarose, e consequentemente, o estabelecimento do dreno, podem ser realizados tanto pela *invertase* (INV) (EC 3.2.1.26) quanto pela *sacarose sintase* (Sus) (EC 2.4.1.13):



Segundo Magel et al. (2000), o estado de ativação da sacarose fosfato sintase pode ser usado como um indicador da taxa de síntese de sacarose e, indiretamente, para a atividade “fonte” de um dado órgão. Ao contrário, a atividade das enzimas que catalizam a quebra da sacarose, invertases e sacarose sintase, servem como indicador do aumento da atividade de “dreno”. Nos drenos, é necessário que a sacarose seja hidrolisada em hexoses. A invertase é uma hidrolase que catalisa a hidrólise irreversível da sacarose até suas hexoses livres (glucose + frutose), e sua atividade tem sido associada à expansão celular (Winter & Huber, 2000). A *sacarose sintase* (SS) é uma glicosil transferase, que, na presença de uridina difosfato (UDP), converte sacarose em UDP-glucose e frutose (Sturm & Tang, 1999), sendo uma reação reversível que retém energia no nucleotídeo-açúcar produzido e sua atividade tem sido associada à biossíntese de parede celular ou produtos de reserva (Winter & Huber, 2000).

Existem pelo menos 2 isoformas de sacarose sintase. São citoplasmáticas, solúveis ou podem apresentar-se fortemente aderidas ao complexo de celulose sintase

na membrana plasmática ou no cito-esqueleto, dependendo do estado de fosforilação (Sturm & Tang, 1999), sendo a forma não fosforilada solúvel.

Existem pelo menos 3 isoformas de invertase nos tecidos que diferem entre si pela localização celular e propriedades catalíticas. Uma das isoformas está localizada no vacúolo, é solúvel em tampão e possui pH ótimo em torno de 4,6. Outra isoforma está presente na parede celular, é insolúvel e também possui pH ótimo em torno de 4,6. A terceira isoforma está localizada no citoplasma, é solúvel e possui pH ótimo em torno de 7,0. Aparentemente, as atividades dessas invertases são independentes e possuem funções distintas, sendo que cada célula pode apresentar as diferentes isoformas em diferentes proporções. Em estudos com plantas transgênicas de cenoura, as atividades das diferentes enzimas do metabolismo de sacarose foram alteradas por expressão antisense (Sturm & Tang, 1999). Tais mutações geraram redução do acúmulo de carboidratos, redução do crescimento do órgão de reserva e alteração da razão raiz/parte aérea, sugerindo profundas alterações nas relações de fonte e dreno da planta.

OBJETIVOS

Como contribuição ao estudo do metabolismo de carboidratos em *Hymenaea courbaril*, o presente trabalho se propõe a:

1. mapear nos diferentes órgãos da plântula as atividades das enzimas de degradação de sacarose durante a mobilização do xiloglucano de reserva;
2. mapear nos diferentes órgãos da plântula as atividades das isoformas de invertase ao longo de um dia durante a mobilização do xiloglucano de reserva.

MATERIAL E MÉTODOS

Aproximadamente 1,0 kg de sementes de *Hymenaea courbaril* foram adquiridas no Instituto Florestal. As sementes de *Hymenaea courbaril* foram escarificadas mecanicamente e embebidas em bandejas com papel de filtro em câmaras de crescimento a 30 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após a germinação, as sementes foram colocadas em vasos com mistura vermiculita-quartzo (1:2) e mantidas em casa de vegetação por cerca de 40 dias até a coleta, quando a mobilização do polissacarídeo de reserva atingiu sua taxa máxima, evidenciada pelo enrugamento dos cotilédones.

Para o mapeamento espaço-temporal das atividades das invertases e dos teores de carboidratos solúveis foram utilizadas plântulas coletadas às 0:00, 2:00, 6:00, 12:00 e 18:00 horas. 3 plântulas foram coletadas por horário, levando-se em conta parâmetros de semelhança entre elas como tamanho e estágio de desenvolvimento, imediatamente congeladas e mantidas a -80°C. A coleta intermediária das 2:00 horas foi feita porque dados de Amaral (2005) indicaram este como sendo o horário de máxima atividade das enzimas de degradação e, portanto, o provável horário de máxima mobilização. As diferentes partes das plântulas (raiz, hipocótilo, cotilédones, eófilo, metáfilo e epicótilo) (figura 2) foram separadas e processadas de forma independente. As partes separadas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o preparo dos extratos enzimáticos.

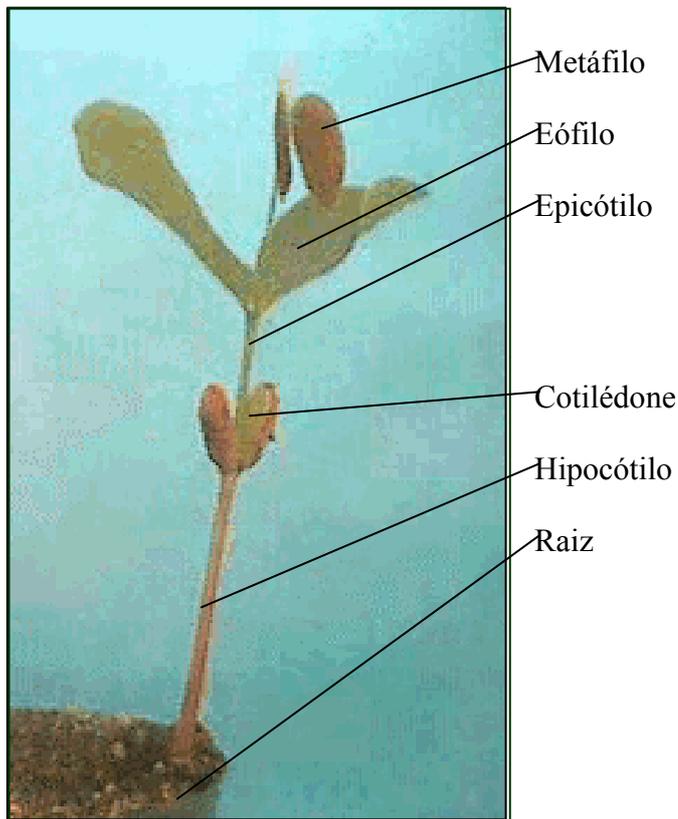


Figura 2. Plântula de *Hymenaea courbaril* e seus diferentes órgãos.

1. Sacarose sintase (EC 2.4.1.13)

A quantificação da atividade de sacarose sintase foi feita no sentido de síntese de sacarose. A literatura foi consultada para delinear uma estratégia de como seriam efetuados a extração e o ensaio enzimático.

A metodologia utilizada para o ensaio consistiu de três etapas: I-síntese de sacarose pela Sus; II- hidrólise da sacarose formada por invertase e; III- quantificação da glucose livre pelo método da glucose oxidase-peroxidase (LabTest).

As partes da plântula foram homogeneizadas em gelo em tampão Tris HCl 100 mM pH 7,5 com 50mM NaCl, 0,2mM PMSF, 5mM oxalato de amônio, 10 mM cloreto de magnésio, na proporção de 5 mL por grama de matéria fresca. O extrato bruto foi centrifugado a 10000g por 10 minutos a 4°C. A fração solúvel foi dialisada contra tampão Tris HCl 25 mM pH 7,5 com 50mM NaCl, 2mM MgCl₂. A diálise teve duração

de 2 horas com a troca da solução tampão de 30 em 30 minutos a 4°C. No final da diálise foram medidos os volumes dos extratos enzimáticos dos diferentes órgãos da plântula.

O ensaio de Sus foi constituído por 3 etapas descritas a seguir:

I – Ensaio de Sus: 300 µL de extrato enzimático, 300 µL de tampão de ensaio contendo tampão Tris-HCl 25mM pH 7,5, MgCl₂ 40mM, frutose 30 mM e UDP-glucose 20mM. Este sistema foi incubado a 30 °C por 20 minutos.

II – Hidrólise da sacarose formada após a incubação anterior: foram adicionados ao sistema de ensaio 50 µL de ácido acético 0,5 M e 150 µL invertase Sigma (1mg/mL). O ácido acético foi adicionado nesta etapa para que houvesse o ajuste do pH para o ótimo de atividade da invertase Sigma, que hidrolisa a sacarose formada na reação I. Uma curva de tempo foi feita para esta etapa e verificou-se que o tempo suficiente de incubação foi de 10 minutos, tempo utilizado para o ensaio (figura 3A).

III – Dosagem de glucose livre: após a incubação da invertase, a glucose livre produzida pela ação da invertase foi quantificada pela adição de 100 µL de tampão Tris HCl 1,0M pH 8,0, 600 µL de solução de dosagem de glicose (LabTest). Foi feita uma curva de tempo (figura 3B) e verificou-se que o tempo ótimo de incubação foi de 10 minutos. A absorbância foi determinada a 505 nm e comparada com a de uma curva-padrão de sacarose.

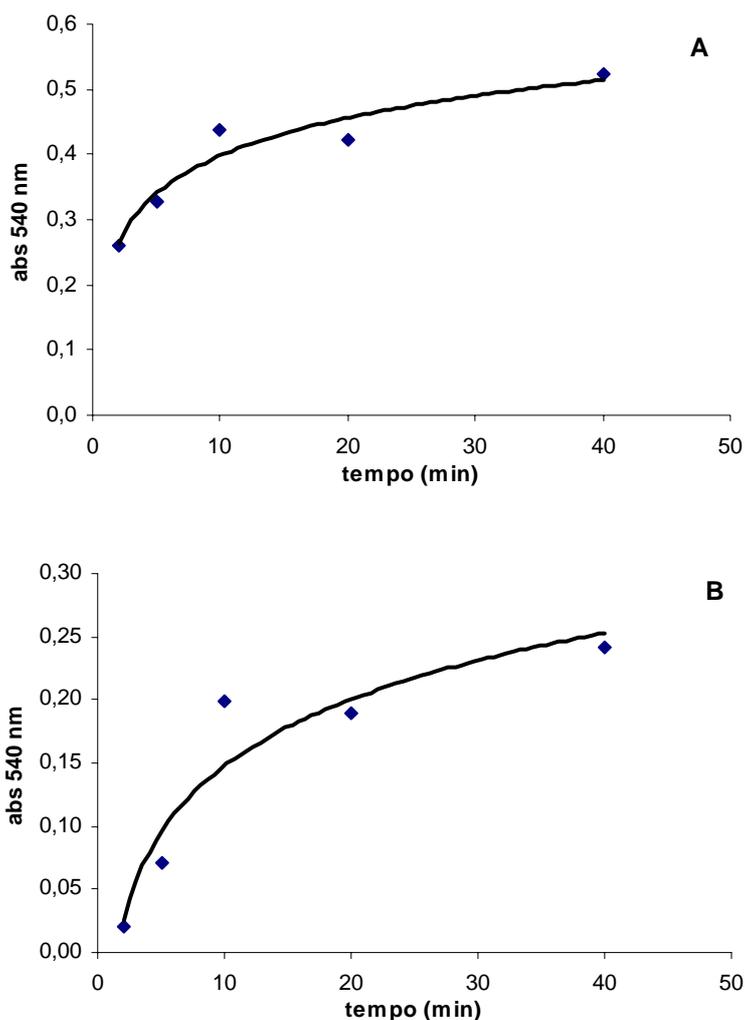


Figura 3. Otimização dos tempos de incubação de Invertase (A) e glucose oxidase (B) no ensaio de sacarose sintase.

Para que a quantificação da atividade (etapa I) seja correta, portanto, é necessário que as duas reações subseqüentes consumam totalmente o substrato disponível, enquanto na primeira reação o limitante seja a disponibilidade de enzima e não o substrato. Uma curva de concentração de sacarose (figura 4) feita a partir da etapa “II”, ou seja, com incubação de sacarose com invertase e depois com o sistema GOD-POD, mostrou uma relação linear entre concentração e absorbância. Esta relação valida a metodologia usada mostrando que é possível quantificar a sacarose formada pelo método proposto. O fato de a curva não passar pela origem do gráfico, sugere a

presença de glucose não ligada na solução de sacarose utilizada, algo que tem sido repetidamente observado em nosso laboratório, principalmente quando as soluções ficam estocadas muito tempo, mesmo que congeladas. Tal artefato poderia levar à superestimação da atividade de Sus, mas isso pode ser facilmente compensado com o uso de um controle com extrato enzimático fervido. As curvas de tempo feitas (figura 3) mostram que nas condições utilizadas, 10 minutos de incubação são suficientes para as etapas “II” e “III” do ensaio.

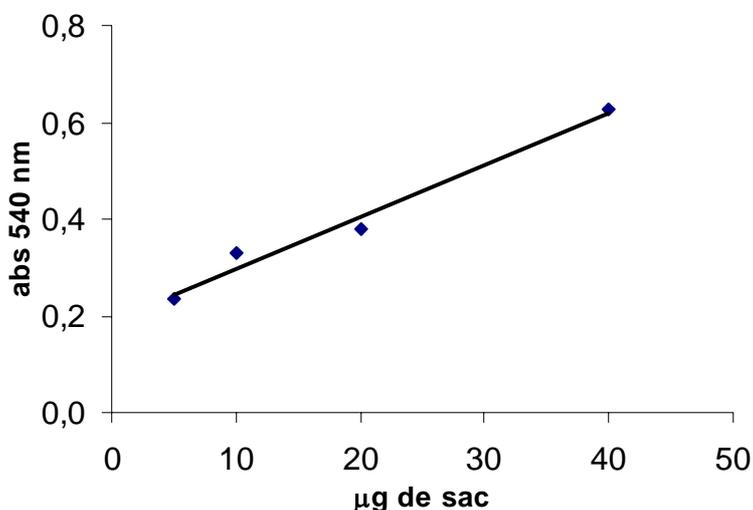


Figura 4. Curva de concentração de sacarose (sac). A curva mostra a linearidade da resposta do ensaio de sacarose sintase (Sus) a diferentes concentrações de sacarose adicionadas na etapa I da dosagem de Sus, onde a sacarose é sintetizada.

2. Invertase (EC 3.2.1.26)

Assim como ocorreu com a sacarose sintase, foi necessária uma otimização das metodologias de extração e ensaio das isoformas de invertase. A escolha do tampão foi feita levando em consideração um ensaio de interferência dos tampões no nosso ensaio (tabela 2). Devido ao alto valor de absorbância do controle (branco) em alguns ensaios, foram realizados testes para averiguação de possível interferência que alguns tampões

poderiam causar na leitura espectrofotométrica. Seria necessário comparar os valores de absorvância dos tampões em diferentes concentrações, na ausência e presença de glucose. Os tampões utilizados no teste foram: Fosfato, Hepes e Tris, nas concentrações 5 e 20 mM em pH 7,5, em virtude da boa capacidade tamponante de todos neste pH, condição apropriada para o ensaio da glucose oxidase-peroxidase.

Os ensaios foram efetuados da seguinte maneira: em 200 µL dos tampões, tanto naqueles em que a glucose (20µg) foi adicionada quanto naqueles sem glucose, foram adicionados 500 µL de solução de dosagem de glicose (Labtest). Também foram feitos ensaios com água no mesmo volume, também com glucose ausente e presente. Após o tempo de incubação deste ensaio (10 min.), as absorvâncias foram determinadas a 505 nm e as leituras foram comparadas.

Tabela 2. Absorvância do ensaio de glucose oxidase-peroxidase na presença de diferentes tampões. Duas concentrações de cada tampão foram utilizadas, sempre em pH 7,5. s/= sem glicose (branco com tampão), c/= com 20 µg de glicose. n=3.

Água		Fosfato				Tris				Hepes			
		10 mM		50 mM		5 mM		20 mM		5 mM		20mM	
s/	c/	s/	c/	s/	c/	s/	c/	s/	c/	s/	c/	s/	c/
0	0.576	0	0.910	0.152	1.082	0	0.693	0	0.763	0	0.863	0	0.797

Todos os tampões ensaiados aumentaram a absorvância quando comparados com o ensaio realizado apenas com água (OD=0,576). O tampão fosfato foi o que causou maior interferência, aumentando a absorvância mesmo do branco, onde não foi adicionada glucose (OD=0.152) e dobrando a absorvância do controle na maior concentração (OD=1.082). A interferência foi dependente da concentração, pois para

todos os tampões a maior concentração causou a maior interferência. O tampão Tris foi o que menos apresentou interferência no resultado final de leitura de glucose. A diálise anteriormente feita contra tampão fosfato 50mM pH 7,5 passou a ser feita contra tampão tris 10 mM pH 6,5.

Durante a etapa de otimização também foi feita uma curva de atividade em diferentes temperaturas (figura 5). Para o ensaio foram preparados banhos com temperaturas variando de 8 a 45°C onde os sistemas foram incubados por 20 minutos e logo após fervido por 2 minutos. Foram adicionados 500 μ L de solução de dosagem de glucose (LabTest) e o sistema foi incubado por mais 10 minutos. As absorbâncias foram determinadas a 505 nm e as leituras foram comparadas com uma curva padrão de glicose. A curva mostrou um ótimo de atividade em 30 °C. Embora a diferença em relação à atividade feita a 40 °C seja pequena, o desvio padrão foi maior, o que pode ser efeito da desnaturação da enzima, que causa perda de atividade em algumas frações. Para evitar este problema de perda de atividade, mantivemos a temperatura de ensaio a 30 °C.

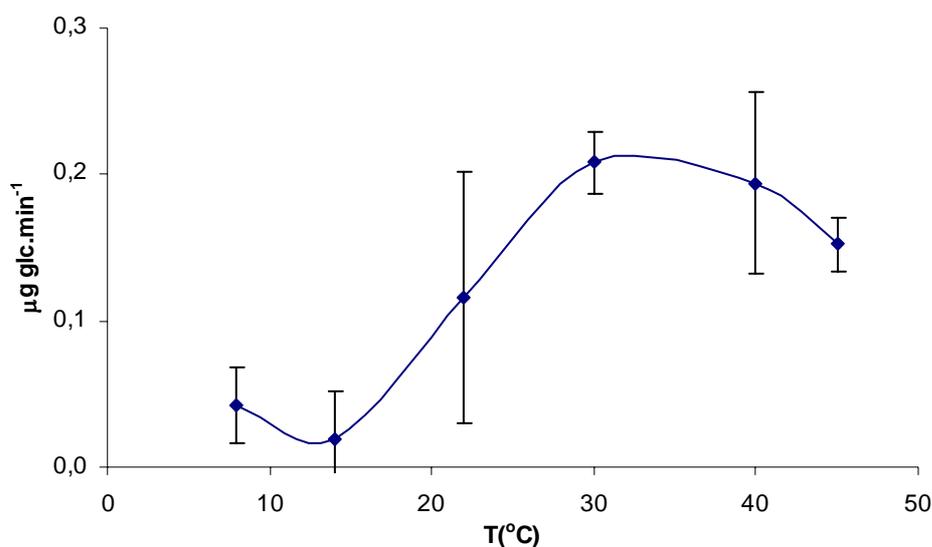


Figura 5. Curva de temperatura da invertase alcalina extraída de eófilo de *Hymenaea courbaril* (n=3).

Devido à dificuldade de dosar a atividade específica das isoformas insolúveis, foi feita uma tentativa de solubilizá-las, com lavagens sucessivas do precipitado com NaCl 0,5M em tampão acetato 50mM pH 4,6. Não apenas as sucessivas solubilizações não reduziram a atividade enzimática a zero (figura 6), como também uma grande parte da atividade permaneceu insolúvel, associada ao sedimento após a centrifugação. Diante disso, foi mantido o procedimento de lavar 3 vezes o sedimento com tampão NaAc 50 mM pH4,6 para remover o material solúvel, seguido de ensaio com o sedimento.

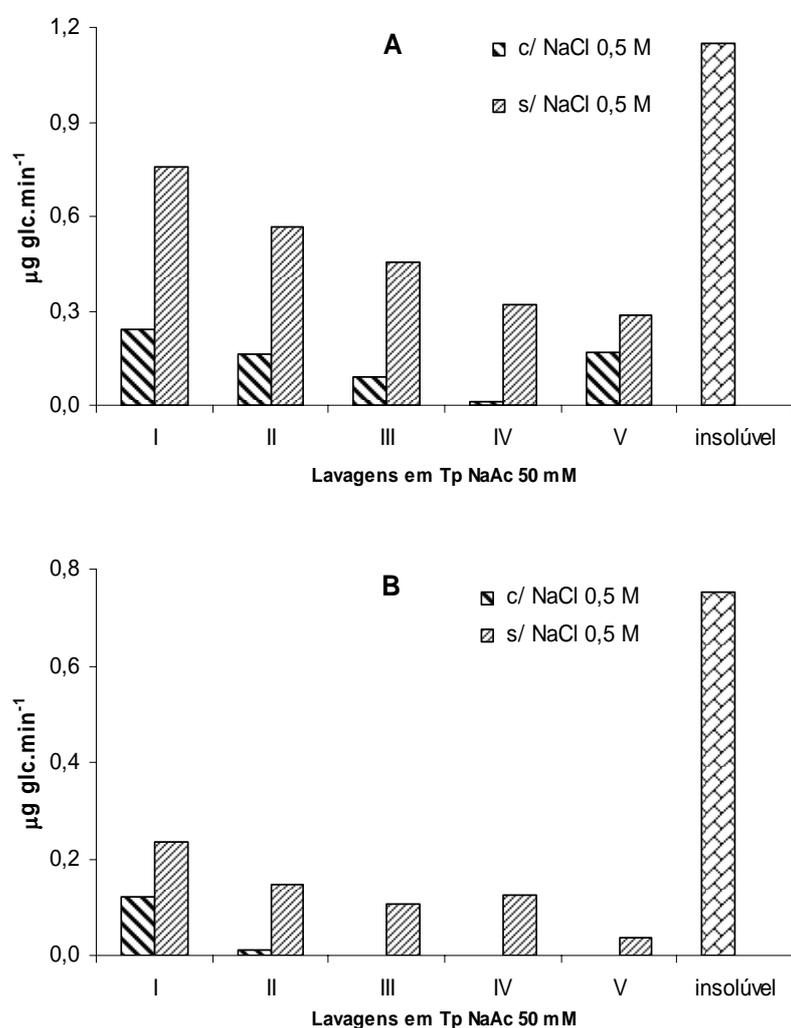


Figura 6. Atividade de invertase insolúvel em cotilédones (A) e eófilos (B) de plântula de *Hymenaea courbaril* após 5 lavagens sucessivas em tampão NaAc 50 mM com e sem NaCl 0,5 M. A última coluna refere-se à atividade que permaneceu insolúvel, associada ao sedimento da centrifugação.

Após a etapa de otimização nas condições de extração e ensaio, a extração de invertase foi feita com homogeneização dos tecidos em gelo com tampão tris-HCl 10 mM pH 6,5 na proporção de 5 mL por grama de matéria fresca. Após a homogeneização, o extrato bruto foi centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm, para separação da fração solúvel da insolúvel. O extrato bruto solúvel foi dialisado contra tampão Tris 10 mM pH 6,5 durante 4 horas, com troca de tampão de hora em hora. No final da diálise o volume dos extratos enzimáticos dos diferentes órgãos da plântula foi medido. O sedimento insolúvel foi lavado 3 vezes com 500µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,6 e o sedimento foi usado para determinação da atividade de invertase insolúvel.

As condições de ensaio da invertase solúvel alcalina foram: 200 µL de extrato enzimático, 80 µL sacarose 0,6M. Este sistema foi incubado a 30⁰C por 10 minutos e logo após foi fervido por 2 minutos. Foram adicionados 500 µL de solução de dosagem de glucose (LabTest) e o sistema foi incubado por mais 10 minutos. Depois a absorbância foi determinada a 505nm e a quantidade de glicose liberada foi quantificada por comparação com uma curva padrão de glucose.

As condições de ensaio da invertase solúvel ácida foram as seguintes: 200 µL de extrato enzimático, 10 µL ácido acético 0,05 M, 80 µL sacarose 0,6M. O volume de ácido acético a ser adicionado foi determinado previamente de modo a levar o pH do ensaio a 4,5. Este sistema foi incubado a 30 °C por 20 minutos e fervido por 2 minutos. Foram adicionados 40 µL de tampão Tris 100 mM pH 8,0 e 500 µL de solução de dosagem de glucose (LabTest). Novamente, a quantidade de tampão a ser adicionada foi determinada em ensaios preliminares para que a condição de ensaio fosse apropriada para a glucose oxidase-peroxidase (pH 7,5). O sistema foi incubado por mais 10 minutos. O procedimento de dosagem de glucose é o mesmo descrito acima.

As condições de ensaio da invertase insolúvel foram: 75 mg de sedimento insolúvel, 250 µL tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,6, 80 µL sacarose 0,6M. O sistema foi incubado a 30⁰C por 20 minutos. Após fervura por dois minutos, 250 µL do sistema foram transferidos para um tubo contendo 625 µL de tampão tris 100 mM pH 8,0 e 500 µL de solução de dosagem de glucose (LabTest). O procedimento de dosagem de glucose foi o mesmo descrito acima.

Os teores de proteína dos extratos de SS e invertase foram determinados usando 50 µL de extrato enzimático, 750 µL de água e 200 µL de solução de Bradford (BioRad). A absorvância foi determinada a 595nm. A quantidade de proteína foi determinada por comparação com uma curva padrão de albumina bovina sérica.

As análises estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) utilizando o Winstat para Excel. O teste de diferença entre as médias foi o “least significant differences” (LSD) com p=0,05.

3. Análises de carboidratos

Para a análise de carboidratos, amostras das partes congeladas das plântulas foram liofilizadas, maceradas, colocadas em eppendorf de 2,0 mL e pesadas. A extração dos açúcares foi feita com 400 µL de etanol 80%, em banho a 80⁰C por 10 minutos, seguida por centrifugação e retirada do sobrenadante. Este procedimento foi repetido 5 vezes, perfazendo 2,0 mL de sobrenadante submetido a posterior secagem em baixa pressão com centrifugação (Hetovac). O material seco foi retomado em 1000 microlitros de água e o teor de açúcares foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al*, 1956). Em um tubo de vidro foram acrescentados uma alíquota da amostra a ser dosada e água para um volume final de 0,5mL, 0,5mL de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico com

homogeneização vigorosa, para posterior leitura de absorbância a 490 nm. A quantificação de açúcar foi feita por comparação com curva padrão de glucose.

Os monossacarídeos e oligossacarídeos presentes nas frações de material solúvel em etanol foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alta performance associada à detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) com coluna Carbo-Pac PA1 em eluição isocrática com NaOH 150mM por 20 minutos. Os carboidratos foram identificados e quantificados por comparação com os perfis de eluição de padrões comerciais.

RESULTADOS

1. Sacarose sintase (Sus) (EC 2.4.1.13)

A dosagem de sacarose sintase foi realizada em plântulas coletadas às duas da manhã. Como este é o horário de maior atividade das enzimas de degradação do xiloglucano, acredita-se que este seja o horário de maior mobilização do xiloglucano. Como a atividade de praticamente todas as outras enzimas, os dados podem ser apresentados como atividade por massa fresca (figura 7) ou como atividade específica (figura 8). A expressão dos dados nas duas formas leva a interpretações distintas. Quando expressos na forma de atividade por massa fresca, o órgão com maior atividade é o cotilédone, embora este seja o órgão da plântula que possui maior massa. Como o órgão possui uma grande quantidade de proteínas de reserva, porém, a atividade específica é a mais baixa. O órgão que apresenta a maior atividade específica é o epicótilo. O hipocótilo apresenta uma alta atividade nas duas formas de expressão dos dados. Sendo que o metáfilo apresenta uma atividade muito semelhante a este último órgão apenas em atividade específica. A raiz e o eófilo estão entre as atividades mais baixas nas duas formas de expressão dos dados.

No presente trabalho os órgãos foram macerados inteiros e não foi feito nenhum tipo de separação dos vários tecidos que compõem cada um dos órgãos. Em todas as análises dos dados é importante lembrar que o resultado obtido é um resultado médio dos diversos tecidos que compõem cada um dos órgãos: parênquima, xilema, floema, epiderme, etc. Por se tratarem de tecidos distintos, é bem provável que cada um deles tenha um metabolismo próprio e, portanto, tenham demandas de carboidrato e atividade das enzimas distintas e nas discussões de resultados apresentadas será ignorado o transporte de carbono dentro do órgão, ou seja, a relação entre os tecidos.

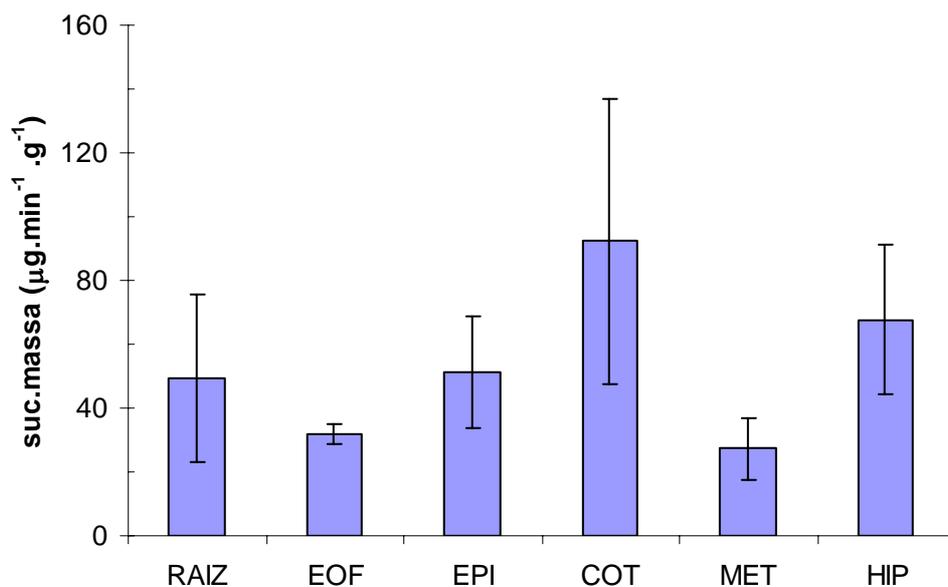


Figura 7. Atividade de sacarose sintase às 2h da manhã em órgãos de plântula de *Hymenaea courbaril* ($\mu\text{g sacarose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g matéria fresca}^{-1}$). EOF: eófilo, EPI: epicótilo, COT: cotilédone, MET: metáfilo, HIP: hipocótilo. n=3. Barras verticais representam o desvio padrão.

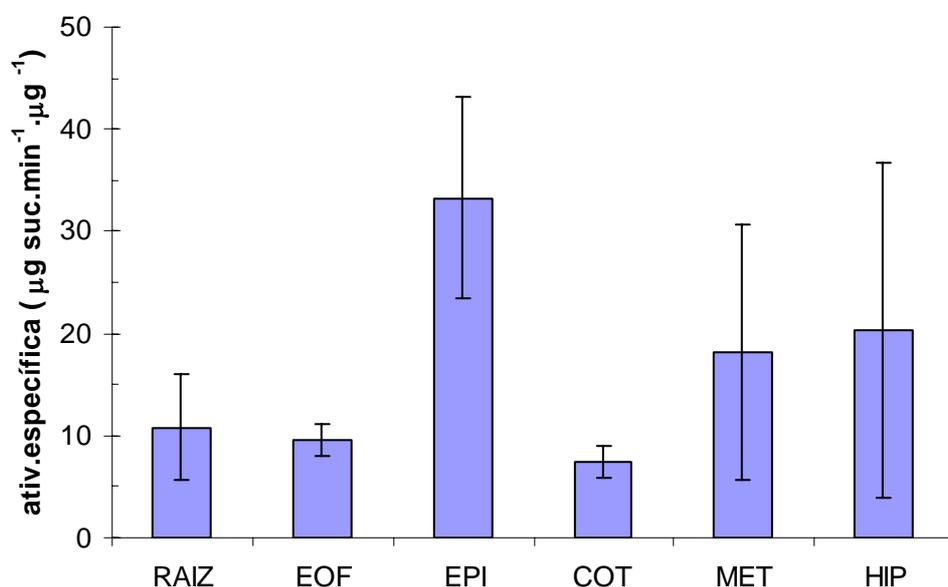


Figura 8. Atividade específica de sacarose sintase as 2h da manhã em órgãos de plântula de *Hymenaea courbaril* ($\mu\text{g sacarose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g proteína}^{-1}$). EOF: eófilo, EPI: epicótilo, COT: cotilédone, MET: metáfilo, HIP: hipocótilo. n=3. Barras verticais representam o desvio padrão.

2. Invertase (EC 3.2.1.26)

Para as isoformas de invertase, foi feito o acompanhamento da atividade das 0 às 18 horas. A determinação da atividade de invertase insolúvel mostrou variação da atividade em alguns órgãos ao longo do dia (figura 9). Por ser uma enzima insolúvel, não é possível determinar o teor de proteína solúvel, razão pela qual não é possível expressar a atividade em atividade específica. O único órgão que não apresentou variação significativa na atividade foi a raiz, embora haja uma queda na atividade às 6 horas. Em hipocótilo, epicótilo e metáfilo foi observado um pico de atividade às 6:00 horas, acompanhado de um decréscimo gradativo. Entre esses, o metáfilo apresentou a maior atividade dessa enzima em toda a planta, enquanto o epicótilo apresentou a menor atividade. Atividade igualmente baixa foi encontrada no eófilo, embora seu comportamento tenha sido inverso, com uma queda na atividade às 6:00 horas. Também em cotilédone ocorreu o mesmo padrão, com uma variação simetricamente inversa com os outros órgãos: a atividade desta enzima diminui até os valores mais baixos às 6:00 horas. Após esse horário a atividade cresce gradativamente.

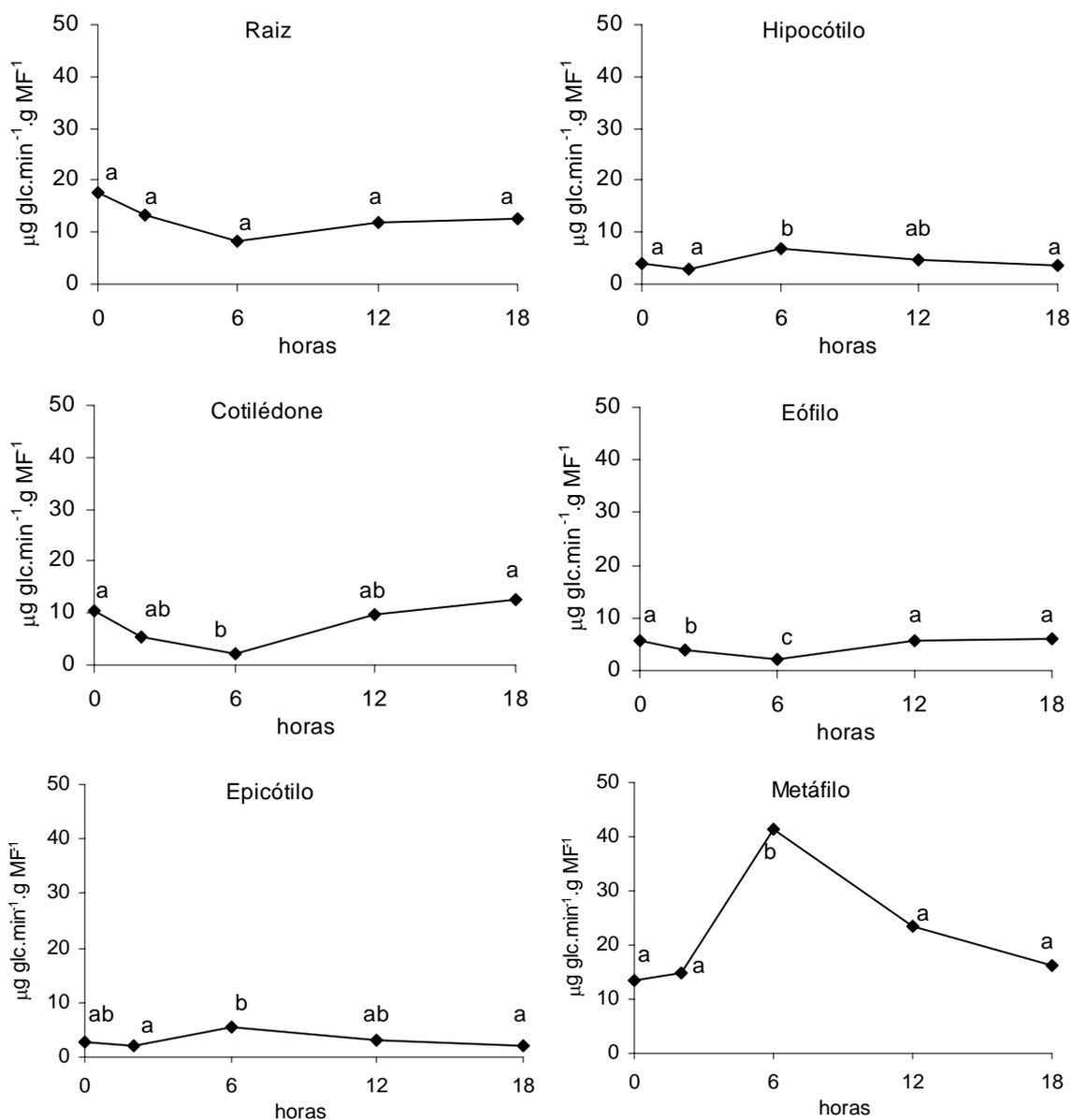


Figura 9. Atividade de invertase insolúvel nos órgãos de plântulas de *Hymenaea courbaril* (em μg de glucose liberada. $\text{min}^{-1}.\text{g}$ massa fresca $^{-1}$) ao longo do dia. Letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p=0,05$) $n=3$.

A dosagem de invertase solúvel ácida ao longo do dia mostrou um pico de atividade às 2 horas em todos os órgãos (figura 10). Logo em seguida ao pico há uma queda na atividade que permanece em um nível basal até a próxima madrugada. A única

exceção são os cotilédones, cuja atividade continuou crescendo ao longo do dia e não baixou aos níveis do início do experimento.

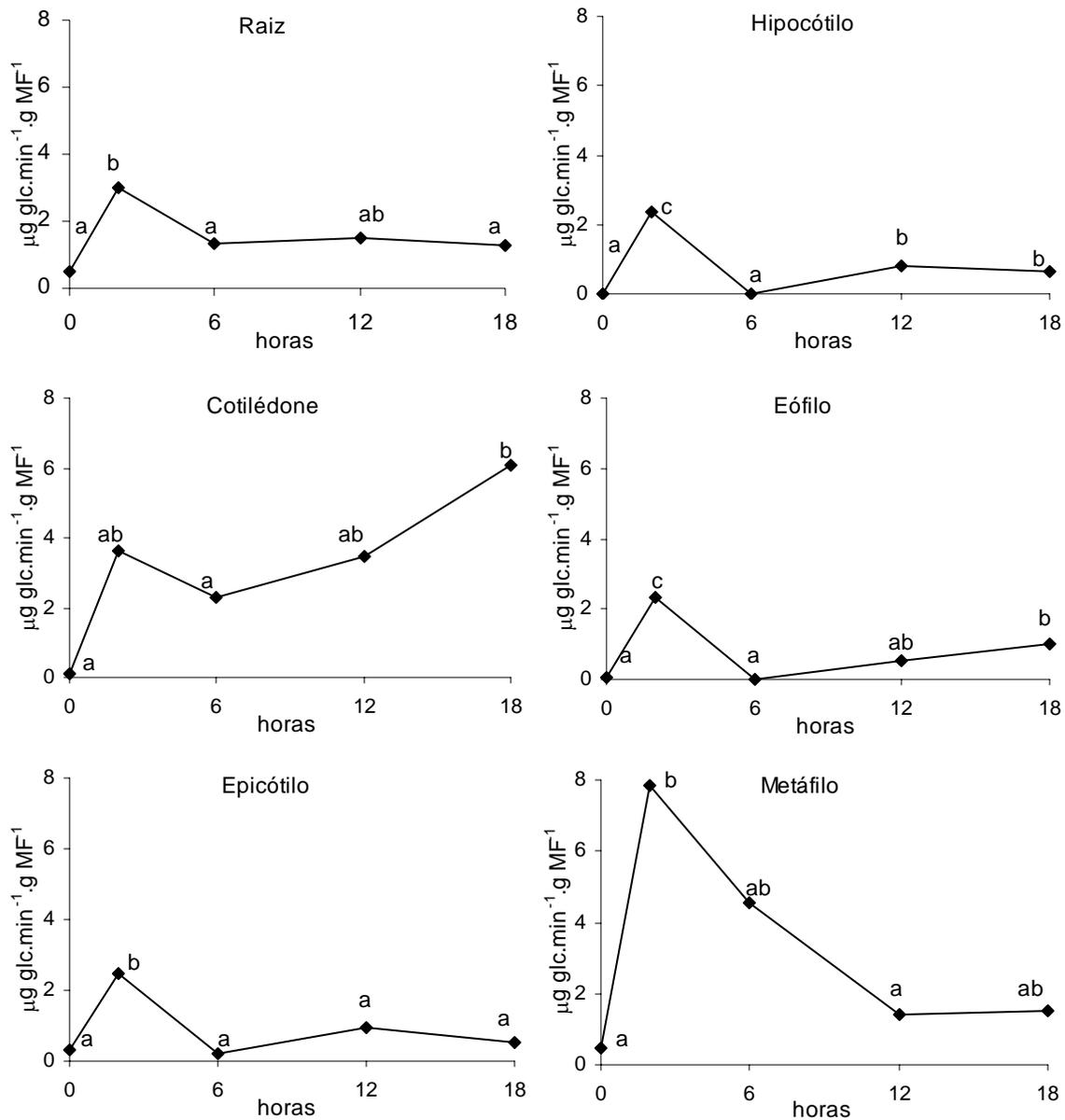


Figura 10. Atividade de invertase solúvel ácida nos órgãos de plântulas de *Hymenaea courbaril* (em μg de glucose liberada. $\text{min}^{-1}.\text{g}$ massa fresca $^{-1}$) ao longo do dia. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p=0,05$) $n=3$.

Quando a atividade é expressa na forma de atividade específica (Figura 11), o padrão de atividade se torna menos claro. O perfil obtido nos cotilédones, por outro

lado, se aproxima padrão do observado anteriormente (um pico às 2 horas). Na raiz, no hipocótilo e no epicótilo, a atividade varia ao longo do dia com um pico às 2 horas e outro ao meio dia. No eófilo, há apenas um pico ao amanhecer (6 horas), enquanto no metáfilo, não há uma variação significativa ao longo do dia, embora exista uma tendência ao aumento da atividade durante a madrugada.

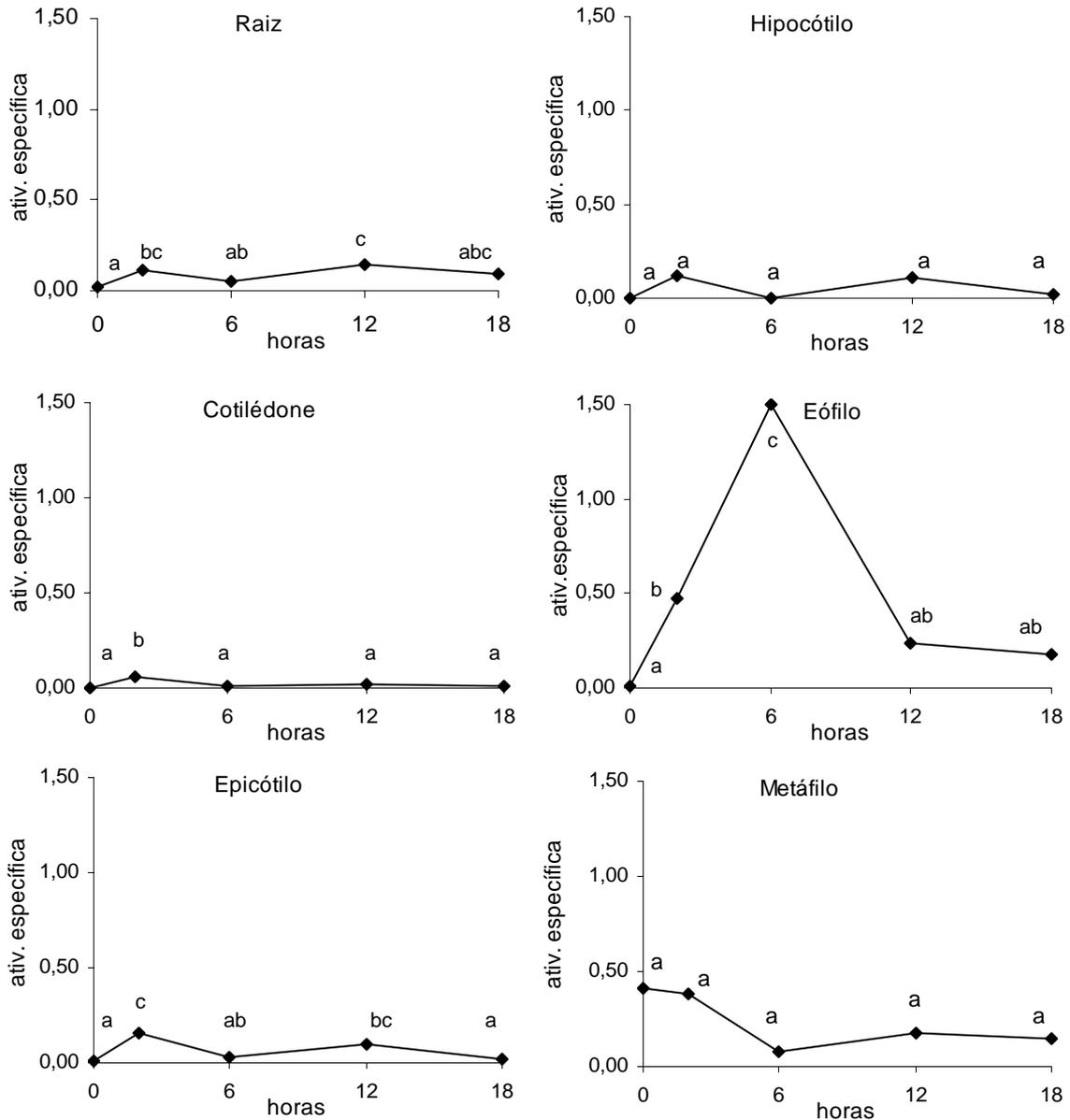


Figura 11. Atividade específica ($\mu\text{g suc. min}^{-1} \cdot \mu\text{g ptn}^{-1}$) de invertase solúvel ácida nos órgãos de plântulas de *H. courbaril* ao longo do dia. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p=0,05$) $n=3$.

O perfil de atividade ao longo do dia da invertase solúvel neutra foi diferente das demais enzimas (figuras 12 e 13). No geral, as maiores atividades foram observadas durante o dia. Na raiz, tanto na atividade específica quanto na atividade por massa fresca, não houve variação significativa na atividade ao longo do dia, embora o gráfico mostre uma tendência a uma queda no fim do dia, seguido de um aumento de madrugada que se mantém durante o dia. O hipocótilo apresentou um pico de atividade no fim da tarde, mas ao calcularmos a atividade específica, o pico de atividade aparece claramente no fim do dia. O cotilédone apresentou um aumento gradual de atividade ao longo do dia, mas o cálculo da atividade específica também mostrou um pico no fim da tarde. Um pequeno pico de atividade específica aparece às duas horas. O eófilo apresentou um grande pico de atividade ao meio dia. O epicótilo e o metáfilo apresentaram um aumento gradual da atividade específica de invertase solúvel neutra durante a manhã com um pico ao meio dia.

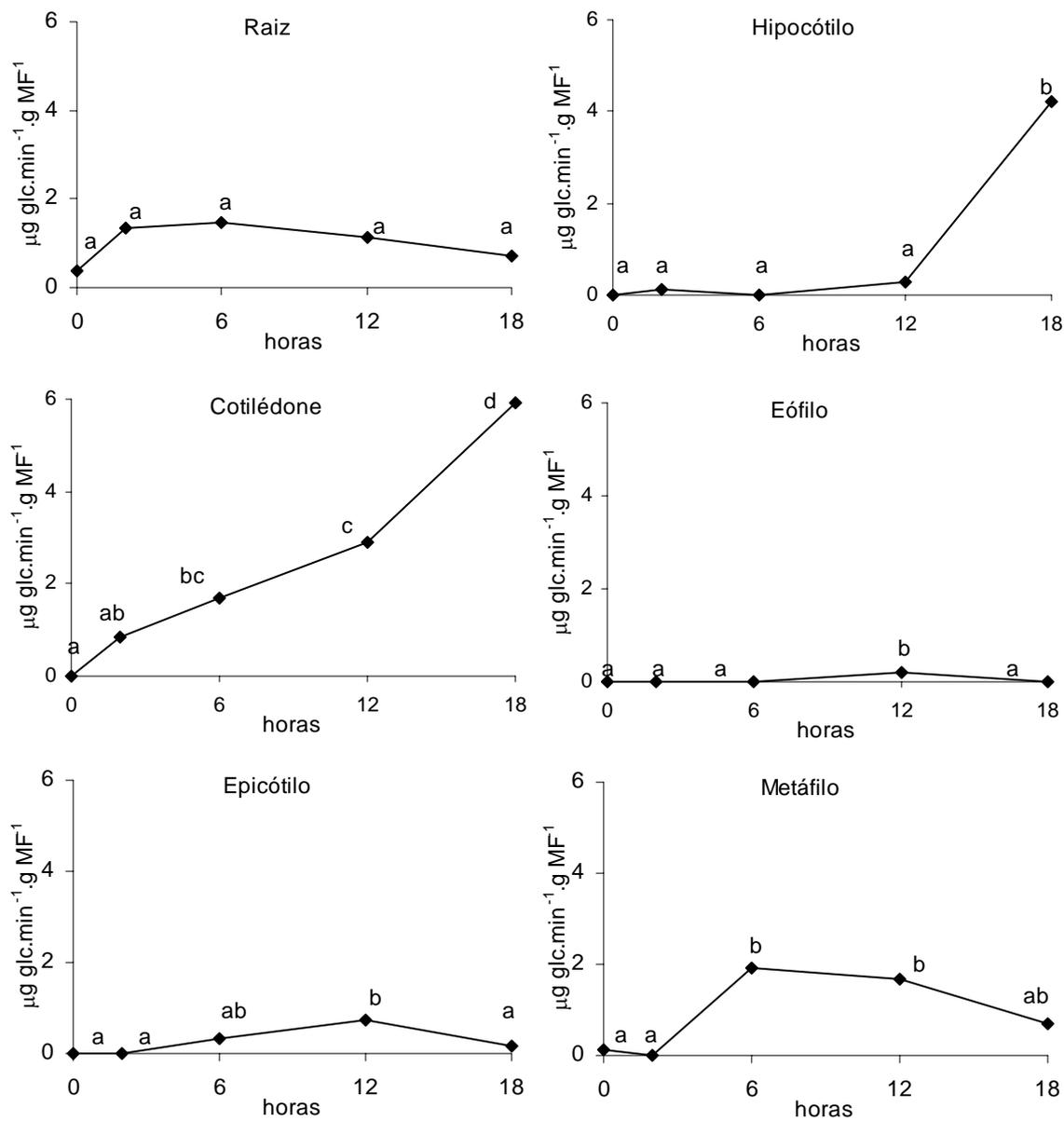


Figura 12. Atividade de invertase solúvel neutra (em μg de glucose liberada. $\text{min}^{-1}\cdot\text{g}$ massa fresca $^{-1}$) nos órgãos de plântulas de *Hymenaea courbaril* ao longo do dia. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p=0,05$) $n=3$.

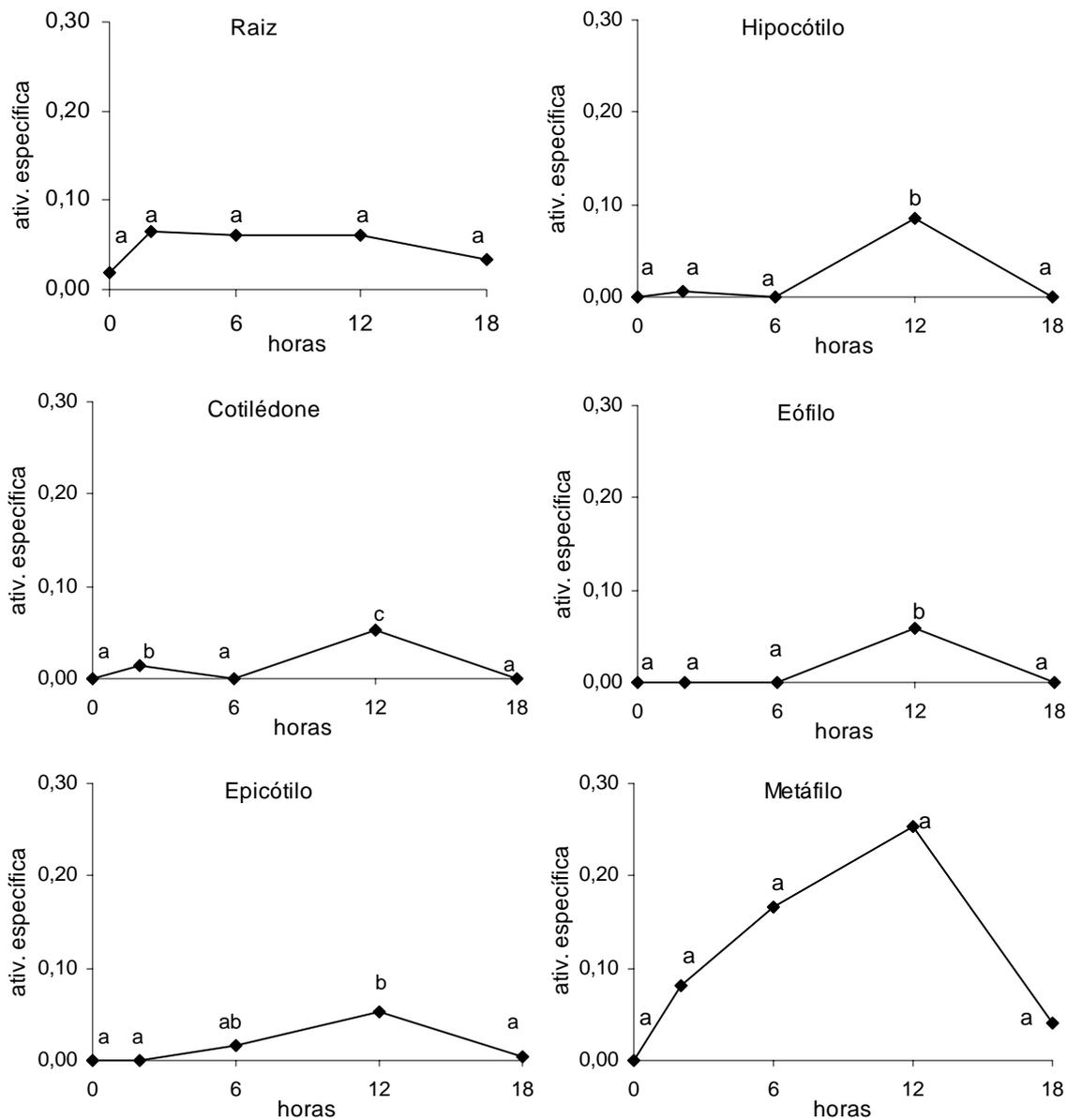


Figura 13. Atividade específica ($\mu\text{g suc. min}^{-1} \cdot \mu\text{g ptn}^{-1}$) de invertase solúvel neutra nos órgãos de plântulas de *H. courbaril* ao longo do dia. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p=0,05$) $n=3$.

3. Análise dos carboidratos

Na raiz, as concentrações de monossacarídeos permaneceram constantes. A concentração de sacarose foi constante durante a madrugada, mas caiu às 12:00 horas, queda que foi seguida de um aumento significativo. As concentrações de monossacarídeos também não variaram no hipocótilo mas ao amanhecer, houve uma queda na concentração de sacarose, seguida por um aumento ao longo do dia com um pico no fim da tarde (figura 14) (tabela 3).

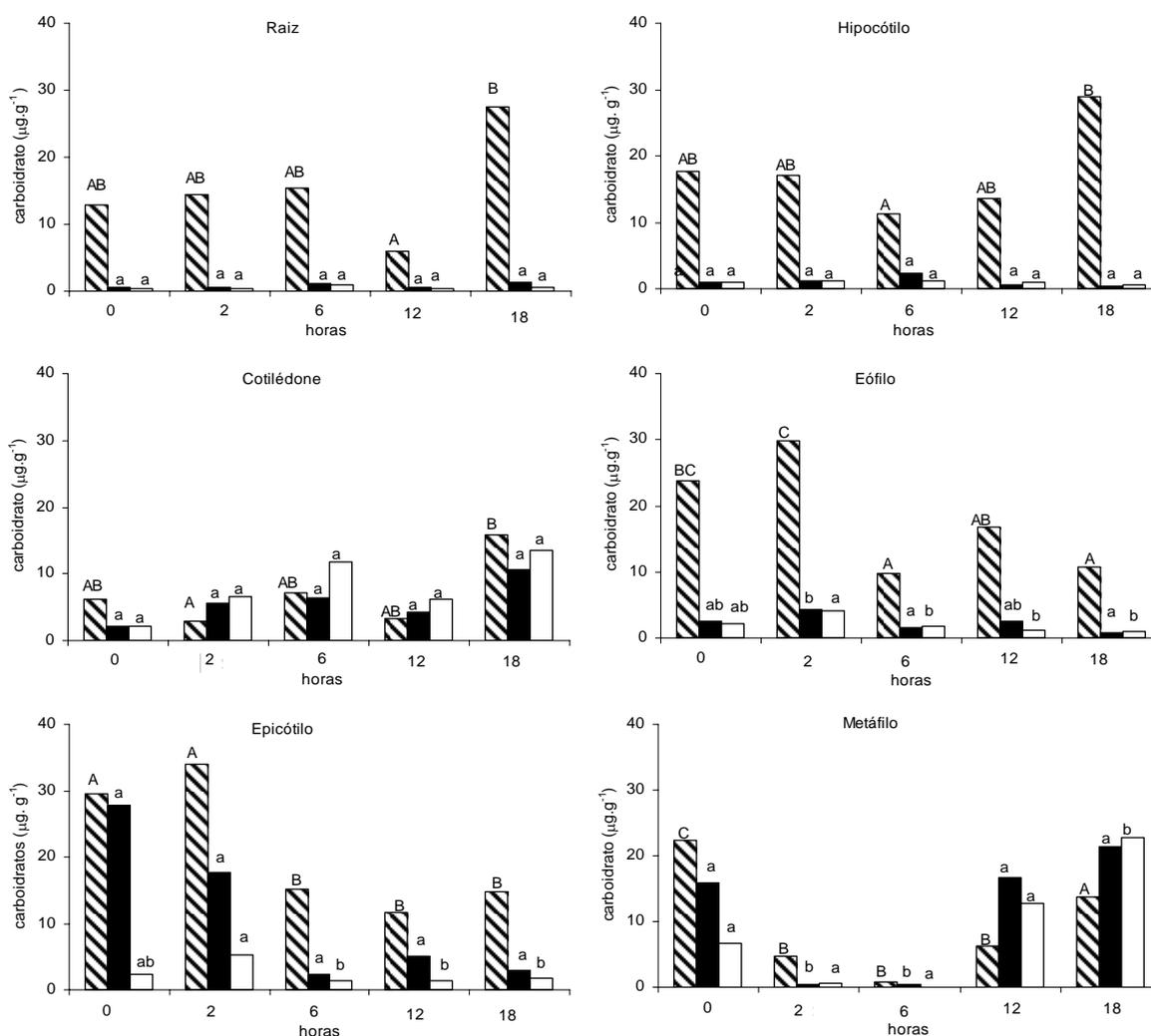


Figura 14. Análise qualitativa de carboidratos solúveis por HPAEC-PAD nos diferentes órgãos de plântulas de *H. courbaril* ao longo do dia. Colunas hachuradas = sacarose, colunas pretas = glucose, colunas brancas = frutose. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os horários de cada carboidrato ($p=0,05$) $n=3$.

O cotilédone foi o órgão que apresentou as concentrações mais baixas de sacarose. A concentração mais baixa foi às 2:00, havendo um pico às 18:00. Neste mesmo horário, também há tendência de aumento de monossacarídeos, o que faz com que este seja o horário de maior concentração de açúcares livres neste órgão. Já no eófilo e no epicótilo, as concentrações de sacarose são bem mais altas, principalmente à noite. Os dois órgãos apresentaram picos de sacarose de madrugada seguidos de uma queda no período de luz. No caso do eófilo, as concentrações de monossacarídeos são ligeiramente maiores à noite, mas no epicótilo o aumento de glucose de madrugada é bastante conspícuo, com concentrações próximas às da sacarose. No metáfilo, há uma queda na concentração de açúcares livres às 2:00 e às 6:00, seguido de um aumento nos horários seguintes. Tanto a concentração de sacarose como a de monossacarídeos aumenta, sendo que no fim da tarde a concentração de monossacarídeos é maior que a de sacarose (figura 14) (tabela 3).

Tabela 3. Razão sacarose/monossacarídeo nos diferentes órgãos da plântula nos diferentes horários do dia.

	0	2	6	12	18
Raiz	13,68	16,30	7,27	6,26	14,11
Hipocótilo	9,45	7,84	3,20	8,70	30,24
Cotilédone	1,47	0,24	0,40	0,31	0,65
Eófilo	5,08	3,50	2,90	4,44	6,46
Epicótilo	0,98	1,47	4,12	1,82	3,25
Metáfilo	0,99	4,27	2,00	0,21	0,31

DISCUSSÃO

1. Sacarose sintase (Sus) (EC 2.4.1.13)

A determinação da atividade de sacarose sintase mostrou que a forma de apresentação dos resultados pode influenciar a interpretação. Quando os dados são apresentados na forma de atividade por massa fresca (figura 7), os cotilédones aparecem como sendo o órgão de maior atividade, com atividade muito acima das folhas (eófilo e metáfilo). No entanto, quando os dados são expressos como atividade específica (figura 8) a maior atividade é a do epicótilo (parte do caule acima do ponto de inserção dos cotilédones) e o cotilédone aparece como a menor atividade específica. Essa diferença é especialmente importante em sistemas de reserva (cotilédones, tubérculos, xilopódios, etc), onde a mobilização de proteínas de reserva pode alterar o teor de proteínas alterando a atividade específica. Como os demais órgãos não possuem reservas típicas de proteínas, a comparação entre eles pode ser feita através da atividade específica.

Embora o hipocótilo não seja um órgão de crescimento intenso, a alta atividade de Sus pode estar associada à síntese de amido transitório observado neste órgão (Tiné, 1997). O hipocótilo acumula amido no parênquima e este amido é mobilizado após o esgotamento das reservas cotiledonares. Uma das funções deste armazenamento seria manter a força de dreno para o transporte dos carboidratos exportados pelos cotilédones mesmo que o resto da parte aérea não tenha a demanda suficiente. Com isso, seria garantida a transferência dos carboidratos sem que houvesse um acúmulo de sacarose nos cotilédones, o que poderia interferir no processo de desmonte e mobilização do xiloglucano de reserva.

O epicótilo apresentou alta atividade específica. Desde o trabalho de Santos (2002), sabe-se que a reserva de carboidratos dos cotilédones de *Hymenaea courbaril* é

importante para o crescimento da parte aérea, para onde a maior parte do carbono é mobilizada. Esta informação está de acordo com a alta atividade específica de Sus encontrada na parte aérea da plântula, em contraste com a atividade menor nas raízes, outro órgão com intensa taxa de crescimento. Neste ponto, é importante salientar que o experimento foi realizado em vasos, o que poderia ter limitado o crescimento das raízes, alterando sua taxa metabólica. O eófilo apresentou uma baixa atividade, compatível com sua posição de fonte de carboidratos (via fotossíntese) dentro da plântula. Embora neste horário (de madrugada) não haja luz para fotossíntese, as folhas fotossinteticamente ativas acumulam amido temporário durante o dia e não precisam importar carboidratos de outras fontes durante a noite.

Comparando os dados de atividade específica de Sus com os dados de força de dreno, que é a porcentagem de contagens de cintilações por grama de matéria seca, em plântulas de *Hymenaea courbaril* disponíveis na literatura (Santos & Buckeridge, 2004), foi possível calcular a correlação entre a capacidade de dreno dos órgãos e a atividade de Sus (figura 15). O coeficiente de correlação foi de 0,91, um excelente resultado considerando que são dois experimentos independentes realizados com plantas nativas, onde se espera uma grande variabilidade dos dados. A alta correlação encontrada sugere que o catabolismo de sacarose pela Sus é um importante elemento no estabelecimento de drenos de carboidratos dentro da plântula e pode ser usado como um marcador das relações fonte-dreno entre os diferentes órgãos da plântula. Na literatura, é sugerido que alta atividade desta enzima é indicativa de dreno ativo de sacarose (Sung *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1993). O fato da atividade de Sus ter sido maior em metáfilo do que em eófilo corrobora com os dados de Buczynski *et al* (1993): folhas maduras são relativamente destituídas de Sus.

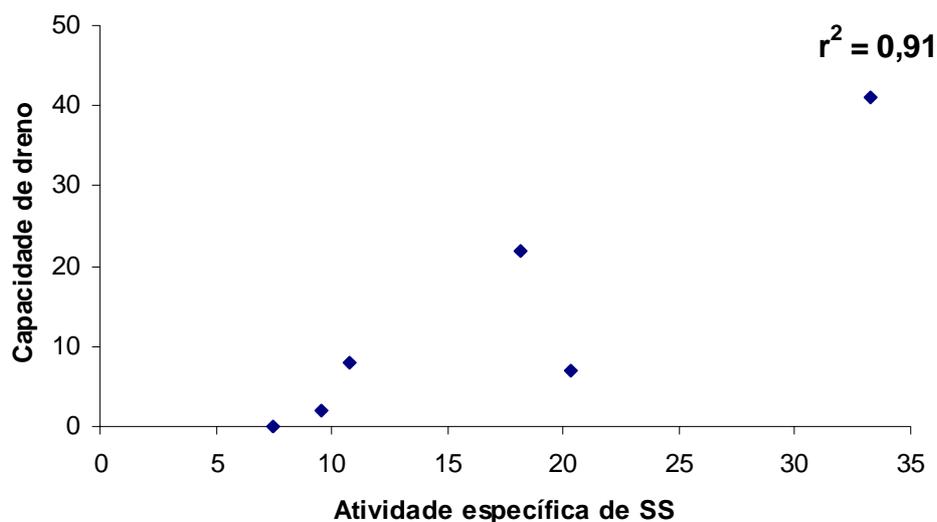


Figura 15. Correlação entre capacidade de dreno (tabela 1) e atividade específica de sacarose sintase em plântulas coletadas às duas horas (figura 8). Cada ponto corresponde a um órgão de plântula de *Hymenaea courbaril*.

Dois elementos também devem ser levados em consideração na interpretação dos dados obtidos: os “ciclos fúteis” e a compartimentalização celular. Sabe-se que existem ciclos de síntese e degradação de sacarose dentro das células, sendo a sacarose exportada do citosol para o vacúolo, onde é hidrolisada e os monossacarídeos resultantes são novamente exportados para o citosol onde são usados na biossíntese de sacarose novamente (Nguyen-Quoc & Foyer, 2001). A compartimentalização das enzimas no interior das células pode criar uma situação onde, embora a atividade medida da enzima seja alta, os substratos não estão disponíveis para a enzima *in vivo*. De fato, dificilmente as enzimas estarão em uma condição de saturação de substrato e baixa concentração de produto dentro das células. Esses dois elementos fazem com que a atividade medida seja sempre um potencial e não a atividade que realmente ocorre nas células. É possível que todas as atividades medidas estejam superestimadas, mas tais

restrições se aplicam a todas metodologias de determinação da atividade enzimática *in vitro* e atualmente não dispomos de metodologias que possam suplantar essas limitações inerentes aos trabalhos bioquímicos.

2. Invertases (EC 3.2.1.26)

2.1. Invertase insolúvel

O nascimento do sol (início da fotossíntese) leva às alterações no metabolismo de carbono que se refletem no padrão de atividade da invertase insolúvel. A única exceção é a raiz cuja atividade não apresenta variações estatisticamente significativas, embora haja uma ligeira queda às 6:00 horas. Considerando que praticamente todos os outros órgãos apresentaram alterações de atividade neste horário, é possível que não tenha sido obtida uma diferença significativa apenas pelo uso de uma amostra pequena. Apesar de este ser o único órgão da planta que não fica exposto às variações de disponibilidade de luz, espera-se que o órgão perceba as variações metabólicas que ocorrem nas outras partes da planta, seja através de sinalização específica com reguladores de crescimento, seja através de variações na disponibilidade de carboidratos, uma vez que tais moléculas podem atuar como sinalizadores (“sugar sensing”). Neste último caso, é importante lembrar que o modelo de mobilização de reservas proposto para *H. courbaril* prevê a disponibilidade de sacarose vindo da parte aérea durante todo o dia, pela exportação das folhas fotossinteticamente ativas (durante o dia) ou pela mobilização das reservas cotiledonares (durante a noite). Essa sincronia dos dois metabolismos pode levar ao fornecimento ininterrupto de sacarose para a raiz, o que poderia explicar a pequena variação dessa invertase ao longo do dia.

Entre as invertases cuja atividade varia ao longo do dia, podemos separar os órgãos em dois grandes grupos: os que apresentam um aumento ao amanhecer

(hipocótilo, epicótilo e metáfilo) e os que apresentam uma redução ao amanhecer (cotilédone e eófilo). É interessante notar que o segundo grupo é formado pelos dois órgãos que correspondem às duas fontes de carbono na planta. Como essas duas fontes funcionam em momentos distintos, no entanto, esperaríamos que o padrão de atividade dos eófilos e dos cotilédones fosse inverso, uma vez que estes órgãos exportam sacarose em momentos distintos do dia. Outros processos fisiológicos tais como expansão celular (Winter & Huber, 2000), partição de sacarose e transdução de sinais de estresse (Sturm, 1999) poderiam, portanto, estar associados a tais variações de atividade. Quais fatores levariam às alterações na atividade observadas, no entanto, não estão claros e no momento, ainda não é possível interpretar o significado biológico dessas variações.

2.2. Invertase solúvel ácida

As dosagens de invertase solúvel ácida mostram uma clara diferença entre o metabolismo noturno e o diurno. Aparentemente, há uma grande alteração no metabolismo de carboidratos em todos os órgãos às 2 horas, o que coincide com o período observado para o pico de atividade das enzimas de degradação do xiloglucano (Amaral, 2005). Embora o vacúolo não esteja diretamente ligado ao desmonte do xiloglucano e à conversão de seus monossacarídeos constituintes em sacarose, esta organela participa diretamente do metabolismo de carbono, sendo um importante elemento tanto no armazenamento quanto na compartimentalização dos produtos de degradação (Nguyen-Quoc & Foyer, 2001). A existência de diferentes tipos de vacúolos é evidenciada por diferentes isoformas das proteínas intrínsecas do tonoplasto, que podem ser utilizadas como marcadores de função desses vacúolos (Jauh *et al*, 1999).

Ao analisarmos os dados de atividade específica, vemos que a maioria dos órgãos apresenta uma queda de atividade às 6 horas (cotilédones, epicótilo, metáfilo,

hipocótilo e raiz), enquanto o eófilo apresenta o seu pico de atividade exatamente neste período no qual a fotossíntese está começando neste órgão. Nos órgãos fonte, portanto, o pico de atividade desta enzima parece estar ligado à alta disponibilidade de carboidratos na célula. Neste caso, a alta capacidade hidrolítica no vacúolo pode estar ligada a desvios no metabolismo quando a disponibilidade de sacarose é maior do que a capacidade de exportação da célula. Ou seja, em caso de haver um acúmulo de sacarose no interior da célula, o dissacarídeo seria importado pelo vacúolo e o carbono desviado para outras vias metabólicas como síntese de amido ou mesmo o armazenamento no vacúolo. Órgãos dreno como epicótilo, hipocótilo e raiz, embora também tenham picos de atividade de madrugada, têm picos de atividade no fim da tarde, o que compõe um cenário mais complexo.

O fato de o padrão de atividade das diferentes isoformas de invertase ser distinto indica que tais enzimas podem estar associadas a diferentes processos metabólicos (Sturm, 1999). Isso evidencia a importância dessas enzimas em diferentes aspectos do metabolismo de sacarose além das relações de fonte e dreno como regulação osmótica e crescimento celular (Sturm & Tang, 1999). Além disso, ao considerarmos que os carboidratos atuam não apenas como substrato para o metabolismo, mas também como moléculas sinalizadoras afetando a expressão de diversos genes (Rolland *et al*, 2002, Blässing *et al*, 2005), a importância dessas atividades de enzimas do catabolismo de sacarose pode ser estendida a diversos outros processos por possibilitar a alteração das concentrações locais de carboidratos e da razão entre sacarose e monossacarídeos.

A forma de apresentação dos dados pode influenciar a interpretação, pois nem sempre o horário de maior atividade por grama de matéria fresca coincide com o de maior atividade específica. A baixa atividade específica nos cotilédones pode ser devido à presença de proteínas de reserva no órgão, o que dificulta a comparação entre os

órgãos. No caso dos cotilédones, a atividade específica mostra um grande pico de atividade durante a degradação do polissacarídeo de reserva, diferente da interpretação dada aos dados apresentados na forma de atividade por massa (figura 10).

Embora a forma mais amplamente utilizada na literatura científica para expressar os dados de atividade enzimática seja a atividade específica, ainda não está clara qual a melhor forma de expressar os dados nesse trabalho. Dois problemas podem ser resolvidos no caso da expressão por massa e não por proteína: (1) a atividade da invertase insolúvel só pode ser expressa por massa, já que a dosagem de proteínas é inviável e; (2) um dos órgãos é um órgão de reserva de proteínas (cotilédone) e a expressão dos dados na forma de atividade específica pode dificultar a interpretação por sobrepor dois processos distintos: a mobilização de carboidratos e a mobilização de proteínas.

O órgão que apresentou a maior atividade específica foi o eófilo, que possui um grande pico às 6:00 horas, seguido de declínio. Esse padrão corrobora o trabalho de Kim *et al.* (2000a), que relatou uma atividade máxima de invertase vacuolar e nível de transcrito *Ivr2*, um dos genes que codificam isoformas vacuolares, no início do período de luz e seus declínios durante o dia em folhas de milho. O pico de atividade no início do período de alta disponibilidade de carbono reforça a idéia de que esta enzima não está associada ao estabelecimento de um dreno de sacarose.

2.3. Invertase solúvel neutra

O perfil de atividade desta isoforma foi distinto de todos os padrões obtidos com as outras enzimas. Exceto pela raiz, todos os órgãos apresentam um pico de atividade ao meio dia. O hipocótilo apresentou um pico de atividade por massa no fim do dia, mas a quantificação de proteínas mostrou que o pico de atividade específica é ao meio dia,

mostrando que naquelas amostras de 18 horas houve uma alta solubilização de enzimas que levou ao aumento da atividade absoluta. O mesmo efeito de extração de enzimas ocorre nos cotilédones.

Por ser o principal órgão fotossintético, é razoável supor que o metabolismo do eófilo esteja intimamente ligado à fotossíntese. Dados de nosso laboratório sobre fotossíntese em eófilos de *H. courbaril* mostram que geralmente existe uma depressão na taxa de assimilação fotossintética ao meio dia, possivelmente devido à fotoinibição pela alta irradiação neste horário ou pela queda na umidade relativa do ar que força o fechamento estomático. A relação desta fotoinibição com o aumento da atividade de invertase neutra não está clara e dificilmente uma relação direta poderá ser estabelecida, mas ambos os fenômenos devem ser levados em consideração nos estudos futuros de metabolismo de carbono em folhas de *H. courbaril*.

Esta isoforma apresentou um padrão de atividade completamente distinto das demais. Isso reforça a idéia de que as isoformas de invertase têm funções distintas e são reguladas de forma independente. Ao contrário das outras isoformas, em geral o aumento da atividade da invertase citossólica se dá à tarde. Esta alteração ocorre em praticamente todos os órgãos, independente de eles estarem naquele horário atuando como fonte ou dreno de sacarose. Assim como para as isoformas anteriores, portanto, não há uma relação clara entre a atividade dessas enzimas e o transporte de sacarose entre os órgãos. Essa multiplicidade de funções das invertases reflete a diversidade de funções da sacarose dentro da fisiologia das plantas e é um passo no sentido de entender a necessidade de tantos genes para codificar isoenzimas que hidrolisam sacarose. Diversos fatores interferem na força de dreno. Isso impossibilita reduzir toda a capacidade de dreno do órgão a uma única enzima, uma vez que todo o metabolismo

subseqüente interfere no transporte de carboidratos, assim como carregadores específicos, o metabolismo posterior dos carboidratos, carregamento dos vasos, etc.

3. Análise dos carboidratos

Nossos resultados mostraram grandes quantidades de sacarose na maioria dos órgãos da plântula de *Hymenaea courbaril*: raiz, hipocótilo, eófilo e epicótilo. A presença de grandes quantidades de sacarose geralmente indica que há alguma fonte de energia importante em ação na planta (Buckeridge *et al*, 2004), que nesta fase do ciclo de vida da plântula de *H. courbaril* pode ser o cotilédone ou o eófilo.

As pequenas concentrações dos carboidratos solúveis no cotilédone dão força ao fato de que os monossacarídeos originados da mobilização do xiloglucano de reserva já seriam transformados em sacarose, para imediata exportação, ou em amido transitório, que funciona como um “tampão” de carboidratos, evitando o aumento excessivo da concentração citoplasmática de monossacarídeos (Tiné, 1997). Ao contrário do esperado, portanto, o metabolismo deste órgão parece estar voltado para a manutenção da concentração baixa de sacarose.

No eófilo, há uma queda na concentração de sacarose durante o dia. Considerando que este é o período fotossintético da folha e neste período há uma alta disponibilidade de carbono, inclusive com exportação de sacarose, podemos dizer que a tendência nos órgãos fonte em *H. courbaril*, é a queda na concentração de sacarose livre durante a exportação de carbono.

É importante notar que apenas as concentrações instantâneas foram medidas. Não é possível inferir nada sobre o fluxo de carbono nestes órgãos. Ou seja, a concentração local de sacarose poderia estar baixa como uma consequência da alta taxa de exportação do órgão. Por outro lado, em órgãos dreno como hipocótilo, que

apresenta baixas taxas de crescimento, mas acumula amido temporário, a alta concentração de sacarose pode ser importante para desviar o metabolismo de carbono para a síntese de nucleotídeos-açúcares, que são substratos para a síntese de amido. Outros drenos como o metáfilo e o epicótilo, que apresentam altas taxas de crescimento mas não acumulam amido, apresentam resultados qualitativamente diferentes, com altas concentrações de monossacarídeos livres. De fato, o metáfilo apresentou as mais altas atividades de invertase insolúvel e neutra entre todos os órgãos (figuras 9 e 13). De forma semelhante, a alta atividade de invertase vacuolar de madrugada no epicótilo, coincide com uma alta concentração de monossacarídeos livres.

CONCLUSÕES

1. O padrão de atividade de invertases ao longo do dia não se correlaciona claramente com as relações fonte-dreno observadas entre os órgãos de plântulas de *Hymenaea courbaril* durante a mobilização do xiloglucano de reserva. A interpretação dos dados é dificultada pela existência de “ciclos fúteis” dentro da célula, pela compartimentalização da sacarose e pela multiplicidade de funções das isoformas de invertases. Aparentemente as invertases parecem mais correlacionadas com outros eventos que não o estabelecimento de drenos de sacarose, o que mostra a importância dos estudos futuros que a correlacionam com estresses hídricos e ao frio.
2. A alta correlação encontrada entre a capacidade de dreno dos órgãos e a atividade de Sus sugere que o catabolismo de sacarose por esta enzima é um importante elemento no estabelecimento de drenos de carboidratos dentro da plântula, embora seja impossível reduzir toda a capacidade de dreno do órgão a uma única enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, L. M. V.** 2005. Metabolismo de carboidratos estruturais e de reserva em cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. (JATOBÁ). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo 123p.
- Barriga, M. L.** 2003. Fitomonitoração e modelagem de fotossíntese em jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) com redes neurais artificiais. Tese (Doutorado) - ESC POLITECNICA, Universidade de São Paulo, 188 p.
- Blässing, O.E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W. & Stitt, M.** 2005. Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17: 3257-3281.
- Buckeridge, M. S., Aida, M. P. M., Santos, H. P., Tiné, M. A. S.** 2004. Acúmulo de reserva. In: Ferreira, A. G. & Borghetti, F. orgs. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. 31-50.
- Buckeridge, M. S. & Dietrich S. M. C.** 1990. Galactomannan from Brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica*, 13: 109–112.
- Buckeridge, M. S. & Reid, J. S. G.** 1996. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. *Cienc. Cult.*, 48: 153-162.
- Buckeridge, M. S., Rocha, D. C., Reid, J. S. G. & Dietrich, S. M. C.** 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savana and forest populations. *Physiologia Plantarum*, 86:145-151.
- Buckeridge, M. S., Tiné, M. A. S., Santos, H. P., Lima, D. U.** 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 137-162.

- Buczinski, S. R., Thom, M., Chourey, P. & Maretzki, A.** 1993. Tissue distribution and characterization of sucrose synthase isozymes in sugarcane. *Journal Plant Physiology*, 142: 641-646.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rerbers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-355.
- Edwards, M.E., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V. & Reid, J.S.G.** 1985. Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. *Planta*, 163:133-140.
- Hayashi, T.** 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40:139-168.
- Jauh, G. Y., Phillips, T.E., Rogers, J.C.** 1999. Tonoplast Intrinsic Protein Isoforms as Markers for Vacuolar Functions. *The Plant Cell*, 11: 1867–1882.
- Kim, J. Y., Mahé, A., Brangeon, J. & Prioul, J. L.** (2000a). A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology*, 124: 71-84.
- Lee, Y. & Langenheim, J. H.** 1975. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). Berkeley: University of California publications in Botany, 69.
- Magel, E., Einig, W. & Hampp, R.** 2000. Carbohydrates in tree. In: Gupta, A.K. & Kaur, N. Carbohydrate reserves in plants. Synthesis and regulation. Elsevier, v. 26, p.317-336.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A.** 1975. The germination of seeds. Exeter, Pergamon Press.

- Nguyen-Quoc, B. & Foyer, C. H.** 2001. A role for futile cycles involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52: 881-889.
- Reis, D., Vian, B., Darzens, D. & Roland, J. C.** 1987. Sequential patterns of intramural digestion of galactoxyloglucan in tamarind seedlings. *Planta*, 170:60-73.
- Rolland, F., Moore, B. & Sheen, J.** 2002. Sugar sensing and signalling in plants. *The Plant Cell (suplemento)*:185-205.
- Santos, H. P.** 2002. Importância ecofisiológica da reserva de xiloglucano e o controle de sua mobilização em cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 123p.
- Santos, H. P. & Buckeridge, M. S.** 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany*, 94: 819-830.
- Sturm, A.** 1999. Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. *Plant Physiology*, 121: 1–7.
- Sturm, A. & Tang, G.Q.** 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in plant science*, 4(10):401-407.
- Sung, S. S., Xu, D. P. & Black, C. C.** 1989. Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiology*, 89: 1117-1121.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 1998. *Photosynthesis: Carbon Reactions in: Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 195-226.
- Tiné, M. A. S.** 1997. Mobilização de xiloglucano de reserva em sementes de *Hymenaea courbaril* L. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 85p.

- Tiné, M. A. S., Cortelazzo, A. L. & Buckeridge, M. S.** 2000. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Plant Science*, 154: 117-126.
- Wang, F., Sanz, A., Brenner, M. L. & Smith, A.** 1993. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiology*, 101: 321-327.
- Winter, H., Huber, S.C.** 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19: 31-67.