

ATIVIDADE AMILOLÍTICA NO MEGAGAMETÓFITO
E NO EMBRIÃO DE **ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA** DURANTE
O PERÍODO DE ESTOCAGEM DO FRUTO

AMYLOLYTIC ACTIVITY IN THE MEGA-GAMETOPHYTE
AND IN THE EMBRYO OF **ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA**
DURING THE FRUIT STORAGE PERIOD

Conegunda Jankovski Diapp (1)

O dissemináculo de **Araucaria angustifolia** (Bert.) O. Ktze. foi estudado sob aspectos morfo-anatômico e bioquímico por HERTEL (1963) e FERREIRA (1977), e os resultados mostraram ser este muito rico em amido, representando 54,7 % do peso seco do embrião e 58,1 % do peso seco do megagametófito. A curta viabilidade deste elemento de dispersão, cujo poder germinativo foi demonstrado por HERTEL (1963), PRANGE (1964), FERREIRA (1977), despertou o interesse que é objeto deste trabalho, onde se pretende verificar a ocorrência de alguma inter-relação entre o conteúdo de água e a atividade amilolítica neste dissemináculo durante o período de estocagem em temperatura ambiente e a 4° C. De acordo ainda com estudos realizados por HERTEL (1959), o pinhão de **A. angustifolia** não corresponde ao conceito tradicional de "sementes de

(1) Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná -- Cx. Postal 19.031 -- 81.504 Curitiba, PR, Brasil.

ginospermas", pois longe de ser nua, é protegida por um envoltório resistente. Trata-se de um fruto primitivo e enquadrado na classe dos protocarpós (HERTEL, 1959).

MATERIAL & MÉTODOS

MATERIAL BOTÂNICO -- Os pinhões maduros foram colhidos do chão, no município de Campo Largo, Paraná (Brasil). Cedidos pelo Instituto de Terras, Cartografia e Florestas de Curitiba. Estes frutos ficaram expostos sobre uma mesa por quatro dias, selecionados os considerados "bons" dos parasitados.

EMBALAGEM E ESTOCAGEM -- Estes frutos foram distribuídos em 13 lotes, a saber: 1 lote de 40 pinhões para análise imediata; 4 lotes de 100 pinhões foram embalados em sacos de anagem e estocados à temperatura ambiente; 4 lotes de 100 pinhões foram acondicionados em sacos plásticos e estocados à temperatura ambiente; 4 lotes de 100 pinhões foram acondicionados em sacos plásticos e estocados a 4° C. Com exceção do primeiro lote, os demais foram estocados por 30, 60, 90 e 120 dias, respectivamente. Cada lote foi utilizado da seguinte forma: 20 pinhões para preparo de pó-cetônico e verificação de peso seco; 20 pinhões utilizados para teste de germinação a 18° C; 60 pinhões para o procedimento da contagem de frutos considerados bons e os parasitados.

PREPARO DOS PINHÕES PARA O PÓ-CETÔNICO E CONTEÚDO DE ÁGUA -- De cada lote foram descascados 20 pinhões, cortados ao meio, separando-se metade de cada megagametófito e de cada embrião para o preparo dos pós-cetônicos e as outras metades foram pesadas separadamente e mantidas a 105° C, até atingirem peso constante. Este procedimento foi repetido cinco vezes, sendo a primeira com pinhões frescos, isto é, não estocados e as demais após

30, 60, 90 e 120 dias de estocagem. O conteúdo de água correspondente à diferença entre o peso total e o peso seco. O pó-cetônico foi preparado segundo LOOMIS (1959). O material obtido foi colocado em recipientes hermeticamente fechados e guardado em "freezer" a -10°C e, posteriormente, analisado.

PREPARO DO EXTRATO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA AMILASE -- Para todas as análises dos megagametófitos e embriões pesou-se um grama de pó-cetônico e dissolveu-se em 25 ml de CaCl_2 a 0,2 %. Agitou-se durante 6 horas e centrifugou-se a 2.000 rpm durante 20 minutos em centrífuga refrigerada Beckman J. 21 B, a 4°C . Dializou-se durante 12 horas a 4°C contra 4 litros de água destilada. Foram tomados 2 ml de extrato; 1 ml de tampão citrato 0,1 M, pH 5,0 e 2,1 ml de H_2O . Colocou-se o sistema em repouso por 10 minutos a 30°C , adicionando-se 0,4 ml de uma solução de amido MERCK a 1 %. O sistema foi incubado a 30°C por 30 minutos e o açúcar redutor foi dosado pelo método de NELSON (1944) e SOMOGYI (1945).

PODER DE GERMINAÇÃO -- Em germinadora a 18°C foram colocados, sobre placas de Petri, forradas com algodão constantemente umedecido com água destilada, 20 pinhões frescos e 20 pinhões de cada período de estocagem, isto é, com 30, 60, 90 e 120 dias, conforme descrito acima. Foram considerados germinados, até 90 dias, aqueles frutos cuja radícula ficou exposta fora da casca.

RESULTADOS

Ficou constatado que dos pinhões coletados do chão e expostos ao ar por quatro dias, 90 % foram considerados bons e 10 % parasitados.

A Tabela 1 mostra a percentagem de pinhões que se apresentaram em condições normais, não bichados, extraídos dos lotes de 100 unidades cada. Na última coluna da Tabela estão registrados os percen-

tuais dos pinhões germinados de cada lote.

Tabela 1. Percentagem de pinhões (*Araucaria angustifolia*) normais, considerados bons (100 pinhões), e dos que germinaram (lotes de 20 pinhões).

Tratamento	dias	pinhões "bons"	germinação até 90 dias
frescos		100,0	95,0
em sacos plásticos a 4°C	30	100,0	100,0
	60	100,0	100,0
	90	83,0	85,0
	120	92,5	85,0
em sacos plásticos à temperatura ambiente	30	87,5	90,0
	60	90,0	100,0
	90	87,5	65,5
	120	85,0	90,0
em sacos de aniagem a temperatura ambiente	30	80,0	70,0
	60	77,5	70,0
	90	76,0	5,0
	120	82,5	5,0

Conforme demonstra a tabela acima, os maiores percentuais de frutos parasitados aparecem nos lotes embalados em sacos de aniagem. Da mesma forma os percentuais de pinhões germinados são bem menores neste tipo de acondicionamento que em sacos plásticos. Todavia, como a verificação do poder germinativo foi realizada com amostras pequenas, de 20 pinhões, os resultados expressam apenas uma aproximação daquilo que pode ocorrer. Com relação aos resultados de 5 % de germinação aos 90 e 120 dias de estocagem, alguns destes pinhões foram atacados por fungos durante o tempo de germinação.

ATIVIDADE AMILOLÍTICA

NO MEGAGAMETÓFITO -- Através da Tabela 2, ve-

Tabela 2. Conteúdo de água (% em relação ao peso seco) e atividade amilolítica (em nmoles de açúcar redutor) em pinhões de *Araucaria angustifolia*.

TRATAMENTO	MEGAGAMETÓFITO		EMBRIÃO	
	Cont. água	Ativ.ami-lolítica	Cont. água	Ativ.ami-lolítica
frescos	45,3	12,9	44,7	32,4
30 dias				
sacos de aniagem	44,0	--	49,2	59,1
s.plásticos TA(*)	46,0	26,1	50,4	88,0
s.plásticos 4°C	45,2	8,6	51,7	41,3
60 dias				
sacos de aniagem	41,4	7,2	41,5	73,0
s.plásticos TA	45,9	29,9	49,9	43,1
s.plásticos 4°C	44,7	8,4	49,3	50,2
90 dias				
sacos de aniagem	38,3	6,0	40,1	47,8
s.plásticos TA	45,5	9,6	49,9	49,0
s.plásticos 4°C	46,2	7,2	50,8	39,5
120 dias				
sacos de aniagem	37,7	3,6	40,5	57,4
s.plásticos TA	45,0	10,8	52,7	55,6
s.plásticos 4°C	45,6	10,8	50,5	51,4

(*) temperatura ambiente.

Nota -- Para determinar o percentual do conteúdo de água das vinte metades de megagametófitos e das vinte metades dos embriões, foi procedido o seguinte cálculo:

$$CA = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

Onde CA é o conteúdo de água; PF, o peso fresco e PS, o peso seco.

rifica-se que ocorreu perda maior da atividade amilolítica quando a estocagem foi feita em sacos de aniagem. Com 90 dias de estocagem a perda de atividade foi de 53,5 % e com 120 dias foi de 72,1 %. Em sacos plásticos tanto à temperatura ambiente como a 4° C o decréscimo da atividade foi bem menor.

NO EMBRIÃO -- Não houve decréscimo na atividade desta enzima, houve sim incremento.

PERDA DE ÁGUA DURANTE A ESTOCAGEM

NO MEGAGAMETÓFITO -- Verificamos, pela Tabela 2, que no megagametófito não ocorreu perda de água até 120 dias quando os pinhões foram estocados em sacos plásticos a temperatura ambiente e a 4° C. Em sacos de aniagem ocorreu uma pequena perda após 90 dias e 120 dias, que aproximou-se a 16 % em relação ao conteúdo de água no pinhão fresco.

NO EMBRIÃO -- Aparentemente houve absorção de água durante os primeiros 30 dias de estocagem nos três procedimentos adotados. Em sacos plásticos não ocorreu perda de água, porém em sacos de aniagem houve uma perda de aproximadamente 17,7 % aos 120 dias de estocagem em relação aos 30 dias e de 9,4 % em relação ao pinhão fresco.

DISCUSSÃO

Pelas observações realizadas neste trabalho, ficou constatado que os pinhões são bastante susceptíveis à larva de *Laspeyresia araucariae*, determinada por HERTEL (1963). O percentual de frutos contendo larvas, desde a sua coleta até 120 dias de estocagem, atingiu 34 %. Esses resultados aproximam-se daqueles obtidos por FERREIRA (1977).

Com relação a germinabilidade, os pinhões estocados em sacos plásticos conservaram melhor o

seu poder germinativo. Em sacos de aniagem, embora nos lotes com 90 e 120 dias alguns pinhões tenham sido atacados por fungos, nas amostras com 30 e 60 dias, apenas 70 % germinaram, conforme foi mostrado na Tabela 1.

A atividade amilolítica, tanto no megagametófito como no embrião já havia sido constatada por FERREIRA (1977), que detectou, além da alfa-amilase a presença da beta-amilase nesta espécie vegetal. Todavia, em trabalhos realizados por CARDEMIL & REINERO (1981) com *Araucaria araucana* foi detectada apenas alfa-amilase. Como o objetivo do presente trabalho foi de verificar a existência de alguma inter-relação entre a atividade amilolítica e o conteúdo de água nestes frutos, não nos detivemos na separação das amilases.

Nos megagametófitos de pinhões estocados em sacos plásticos não houve perda de água mas houve pequeno declínio da atividade amilolítica. Já nos megagametófitos dos pinhões acondicionados em sacos de aniagem, embora tenha ocorrido pequena perda de água, cerca de 16 % aos 90 e 120 dias, a atividade enzimática diminuiu em torno de 53,5 % e 72,1 %, respectivamente.

Quanto aos embriões, aparentemente, nos primeiros 30 dias de estocagem ocorreu alguma absorção de água. Porém, aqueles acondicionados em sacos de aniagem, com 90 e 120 dias de estocagem, apresentaram também pequena perda de água, representando cerca de 10 % em relação ao pinhão fresco, mas a atividade amilolítica não decresceu.

Ficou constatado que a atividade amilolítica, nas três modalidades de acondicionamento, é sensivelmente menor no megagametófito que no embrião em cerca de 3 vezes em pinhões frescos, aumentando esta diferença durante o período de estocagem. REINERO, BALBOA & CARDEMIL (1983) também detectaram em frutos frescos, sem embebição, em *Araucaria araucana* uma atividade de aproximadamente três vezes menor no megagametófito, o que conduziu CARDEMIL & VARNER (1984) a pesquisarem a fosforilase como outra enzima degradadora do amido na mesma espécie

de *Araucaria*.

Conforme pode ser verificado, a estocagem em sacos plásticos foi a que melhor preservou o conteúdo de água e a atividade amilolítica, considerando apenas o megagametófito, já que no embrião não ocorreu alteração significativa. Quando os frutos foram acondicionados em sacos de aniagem, houve grande decréscimo desta atividade, em torno de 72 % e também alguma perda de água, cerca de 16 % aos 120 dias de estocagem. Assim, embora a atividade amilolítica permaneça ativa aos 120 dias, nas três modalidades de estocagem, e apesar de não existir uma inter-relação entre a perda de água e o decréscimo da atividade desta enzima, pelos resultados obtidos quanto ao poder germinativo, atividade aminolítica e perda de água nos megagametófitos, pode ser sugerida, como a mais eficaz, a estocagem em sacos plásticos em vez de aniagem, no que diz respeito aos três fatores acima analisados.

AGRADECIMENTOS

À Professora Muriel Mourão Vieira, pela valiosa colaboração nas análises bioquímicas, ao Professor Ralph J.G. Hertel, *in memoriam*, pelo constante incentivo ao estudo de *Araucaria angustifolia*, ao Professor Raul J.M. de Oliveira, pela revisão do texto e aos Professores Olavo Araujo Guimarães e Regina Rosa Fernandes, pela tradução resumo em francês e inglês, respectivamente.

RESUMO

Frutos de *Araucaria angustifolia*(Bert.) O.Ktze foram estocados a temperatura ambiente e a 4°C durante 120 dias e, no decorrer deste período, foram analisados a atividade amilolítica e o conteúdo de água. A atividade amilolítica permaneceu ativa aos 120 dias de estocagem dos pinhões, em saco de

aniagem e plásticos. Ocorreu maior decréscimo da atividade desta enzima, em torno de 72 %, nos megagametófitos, quando os frutos foram acondicionados em sacos de aniagem, enquanto a perda de água foi cerca de 16 %, não existindo uma inter-relação entre a perda de água e o decréscimo da atividade enzimática. Nos embriões não houve alteração significativa. Quanto ao poder germinativo, a atividade amilolítica e a perda de água, os melhores resultados obtidos foram em pinhões estocados em sacos plásticos.

PALAVRAS CHAVE: *Araucaria-angustifolia*, germinação, atividade-amilolítica.

SUMMARY

Fruits of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. were stored during 120 days at room temperature, and at 4° C. During this period the amylolytic activity of the fruits was analysed as well as the water content. The amylolytic process remained active during 120 days of the fruits storage either into burlap sacks or into plastic bags at room temperature, and at 4° C. A higher decrease of the enzyme activity was observed, around 72 %, in the mega-megatophyte, when the fruits were stored into burlap sacks while the loss of water was about 16 %. No correlation between the loss of water and the decrease of enzyme activity was detected. Also, no significant changes in the embryos were observed. The best results in relation to the germination power, amylolytic activity, and the loss of water were obtained with the fruits which had been stored into plastic bags.

KEY WORDS: *Araucaria-angustifolia*, germination, amylolytic-activity.

RÉSUMÉ

Fruits d'*Araucaria angustifolia*(Bert.) O.Ktze. ont été conservés pendant 120 jours a la temperature ambiante et a 4° C. Dans ce periode ont été analysés leur activité amilolitique et leur contenu d'eau. L'activité amilolitique a persisté pendant les 120 jours dans sacs d'emballages en plastiques. On a observés une diminution de la activité de cette enzyme, autour de 72 % sur les megacitofites, quand les fruits ont été conservés dans sacs d'amballages, et dans ce cas la diminution de l'eau a été presque 16 %. On n'a pas observé une relation entre la perte d'eau et la diminution de la activité enzymatique. Dans les embrions on a pas observés alterations significatives. Quant a la capacité geminative, a l'activité amilolitique et a la diminution d'eau, les meilleurs resultados obtenus ont été avec les fruits conservés dans sacs plastiques.

MOTS CLÉS: *Araucaria angustifolia*, germination, activites-amilolitique.

BIBLIOGRAFIA

- CARDEMIL, L. & A. REINERO. 1981. Changes on *Araucaria araucana* seed reserves during germination and early seedling growth. *Can. J. Bot.* 60: 1629-1638.
- CARDEMIL, L. & J. VARNER. 1984. Starch degradation. Metabolism toward sucrose synthesis in germinating *Araucaria araucana* seeds. *Plant Physiol.* 76: 1047-1054.
- FERREIRA, G. 1977. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Germinação da semente e desenvolvimento da plântula. 123 pp Tese de doutorado. Instituto de Biociências da U.S.P.; São Paulo.
- HERTEL, R.J.G. 1959. Contribuição para a fitologia

teórica. II. Alguns conceitos na carpologia.
Humanitas, Curitiba, 4 (4): 1-43.

HERTEL, R.J.G. 1963. Estudos sobre **Araucaria angustifolia**. I. Descrição morfológica do fruto; a germinação; lista bibliográfica. **Bol. Inst. Hist. Nat.**, Curitiba, 4: 1-30.

HERTEL, R.J.G. 1976. Estudos sobre **Araucaria angustifolia**. II. A constituição do estróbilo. **Acta Biol. Par.**, Curitiba, 5 (3-4): 3-25.

LOOMIS, W.D. 1959. Amide metabolism in higher plants III. Distribution of glutamyl transferase and glutamine synthetase activity. **Plant Physiol.** 34: 541-546.

NELSON, N.A. 1944. Aphotometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-389.

PRANGE, P.W. 1964. Estudo da conservação do poder germinativo das sementes de **Araucaria angustifolia** (Bert.) O.Ktze. **An. Brasil. Econ. Florestal** 16: 41-53.

REINERO, A.; O. BALBOA & CARDEMIL, A. 1983. Characterization of the amylolytic activity of **Araucaria araucana** (Mol.) Koch germinating seeds. **Plant & Cell Physiol.** 24 (3): 457-465.

SOMOGYI, M. 1945. A new method for the determination of sugars. **J. Biol. Chem.** 160: 61-68.