

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

Patrícia Pinho Tonini

**PAPEL DO TEGUMENTO E DO ÁCIDO ABSCÍSIKO NO PROCESSO  
DE DEGRADAÇÃO DO GALACTOMANANO EM SEMENTES DE  
*Sesbania virgata* (CAV.) PERS.**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

**Co-orientador:** Profa. Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros

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

**T614p**

**Tonini, Patrícia Pinho**

Papel do tegumento e do ácido abscísico no processo de degradação do galactomanano em sementes de *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. / Patrícia Pinho Tonini.--  
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge

Co-orientadora: Solange Cristina Mazzoni-Viveiros

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Ácido abscísico. 2. Desenvolvimento. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Mazzoni-Viveiros, Solange Cristina. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 10 de agosto de 2004

**Banca Examinadora**

Prof.Dr. Marcos Silveira Buckeridge  
(Orientador)

---

(Assinatura)

Prof.Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

---

(Assinatura)

Prof.Dr. Cláudio José Barbedo

---

(Assinatura)

Prof.Dr. Paulo Mazzafera

---

(Assinatura)

*“Se você procurar bem, você acaba encontrando,  
Não a explicação (duvidosa) da vida,  
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”*

*Carlos Drummond de Andrade*

Aos meus pais, Marcio e Graça, pelo amor,  
carinho e dedicação e ao meu querido César  
Gustavo, pelo amor e companheirismo.

**Ofereço**

A Deus que me criou e me deu sabedoria,  
saúde e forças para crescer, lutar e conquistar.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter me proporcionado tudo o que tenho, me dando saúde, sabedoria e força, colocando em minha vida oportunidades e pessoas maravilhosas que me ajudam e me completam.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge, pela orientação, incentivo e confiança em meu trabalho, me ajudando a enxergar a ciência de uma outra forma e a crescer cada vez mais!

À Profa. Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, pela orientação, compreensão, amizade e por todo o auxílio, estando ao meu lado em todos os momentos e me ajudando na realização de mais uma conquista.

Aos meus pais, Marcio e Graça, por terem me colocado no mundo e ajudado a me tornar essa pessoa que sou hoje, MESTRE!!!!!!! Obrigada pelo carinho, amor, dedicação, oportunidades...enfim obrigada por tudo!

Ao meu amado César Gustavo...o meu Gú...pelo amor, companheirismo, incentivo e pela orientação! Agradeço a Deus por você existir e estar sempre ao meu lado, na alegria e na tristeza...na saúde e na doença...Obrigada por tudo, sem você seria mais difícil chegar até aqui!

Aos meus avós e todos os familiares que estiveram sempre ao meu lado, desde pequena, me ajudando sempre que possível, em especial à prima e amiga Joyce! E à família do Gú, que já faz parte da minha vida!

À minha querida amiga Paty Gaya, que me colocou neste mundo das plantas e há seis anos vem caminhando junto comigo em todos os momentos...amiga para todas as horas! Gaynha, a estrada ainda vai ser longa...

Às minhas amigas da faculdade Cris e Gisele, pelo companheirismo, compreensão e amizade, mesmo nos momentos de ausência!

Ao pessoal do Singular, meus queridos amigos que desde o colégio vem me acompanhando nos momentos mais importantes da minha vida. Valeu Naila, Vitor, Marcel, Carol, MaFê, Michelle, Karina, Diego e Raquel!

Aos professores do departamento de Biologia Celular da UNICAMP, em especial ao Dr. Angelo Cortelazzo, Dr. Edson Pimentel e Dra. Shirley Recco-Pimentel.

À Líliam Panagio da secretaria do departamento de Biologia Celular da UNICAMP, sem você eu estaria perdida!!!!!! E aos meus amigos de curso, companheiros de mestrado em Campinas, em especial à Ariele, Dani, Gisele e Thaty.

Ao pessoal do Departamento de Botânica da USP, pela ajuda na dosagem de hormônio. Agradeço a Rosete, Rogério, Regina e em especial à Profa. Dra. Helenice Mercier pela oportunidade!

Ao Prof. Dr. Jarbas Giorgini, do Departamento de Biologia da USP (Ribeirão Preto), por ter cedido o anticorpo anti-endo- $\beta$ -mananase utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, Prof. Dr. Cláudio José Barbedo e Prof. Dr. Paulo Mazzafera pelas sugestões e contribuições no presente trabalho.

Ao pessoal da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica por estar ao meu lado e me ajudar sempre que possível. Agradeço a Giovanna (cajazeira!), Maitê, Vanessa, Mandy, Amandona, Marina, Kelly (companheira!), Paulinha, Lourdes, Marília, Ana Russa, Claudinha, Carla, Érika, Josi, Rosana, ao C1 e C2, Tiné, Danilo, Rafa, Minhoto, Igor e Moacyr. Ao pessoal de apoio, Helena, Amélia, Mari, Cida e Sirlei. E a todos os pesquisadores, em especial à Dra. Márcia Braga.

A todos da Seção de Anatomia e Morfologia do Instituto de Botânica pela ajuda nestes últimos anos, em especial a Maria, Telma, Renata, Andréa, Danilo, Eduardo e às pesquisadoras, Dra. Agnes e Dra. Edenise.

À Rose, da Seção de Anatomia e Morfologia, que me forneceu muito dos experimentos e técnicas que já tinha desenvolvido, como o teste de tetrazólio e dosagem enzimática, juntamente com o Clóvis da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica.

À Seção de Dicotiledôneas, por ter cedido o uso do estereomicroscópio e pelo auxílio na obtenção das imagens digitalizadas, e à Seção de Ficologia do Instituto de Botânica, por ter cedido o uso do microscópio de fluorescência.

À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado, e à FAPESP pelo apoio financeiro através do Projeto Biota.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. SEMENTES.....	3
1.1.1. Tegumento .....	4
1.1.2. Endosperma .....	8
1.1.3. Embrião .....	8
1.2. GERMINAÇÃO E PÓS-GERMINAÇÃO .....	9
1.3. PAREDE CELULAR DE RESERVA DAS SEMENTES .....	10
1.4. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE PAREDE CELULAR .....	13
1.5. GALACTOMANANOS .....	14
1.5.1. Estrutura dos galactomananos .....	15
1.5.2. Propriedades dos galactomananos .....	16
1.5.3. Degradação dos galactomananos .....	18
1.5.4. Regulação da degradação dos galactomananos .....	24
1.5.5. Anatomia do endosperma contendo galactomananos.....	27
1.6. A ESPÉCIE <i>Sesbania virgata</i> .....	29
1.6.1. Sinônimos e nomes vulgares .....	29
1.6.2. Origem e distribuição.....	30
1.6.3. Características gerais.....	30
2. OBJETIVOS .....	32
3. MATERIAL .....	33
4. MÉTODOS .....	34
4.1. ANATOMIA.....	36
4.1.1. Análise histológica.....	36
4.1.2. Teste do tetrazólio .....	37
4.2. BIOQUÍMICA.....	37
4.2.1. Atividade das enzimas hidrolíticas do galactomanano .....	37

4.2.2. Localização da endo- $\beta$ -mananase.....	38
4.2.2.1. <i>Tissue Print</i> .....	38
4.2.2.2. <i>Immuno dot blotting</i> .....	39
4.2.2.3. Imunofluorescência .....	40
4.2.3. Dosagem de ABA endógeno .....	41
4.2.4. Dosagem de proteínas, $\alpha$ -galactosidase e açúcares redutores .....	42
5. RESULTADOS .....	45
5.1. ANATOMIA.....	45
5.1.1. Descrição anatômica da espécie.....	45
5.1.2. Teste do tetrazólio no tegumento .....	45
5.1.3. Degradação do galactomanano .....	48
5.2. BIOQUÍMICA.....	49
5.2.1. Atividade das enzimas hidrolíticas do galactomanano .....	49
5.2.2. Localização da endo- $\beta$ -mananase.....	53
5.2.2.1. <i>Tissue printing</i> .....	53
5.2.2.2. <i>Immuno dot blotting</i> .....	56
5.2.2.3. Imunofluorescência .....	58
5.2.3. Dosagem de ABA endógeno .....	59
5.2.4. Papel do tegumento .....	62
5.2.4.1. Mobilização de proteínas solúveis.....	62
5.2.4.2. Atividade de $\alpha$ -galactosidase .....	64
5.2.4.3. Níveis de açúcares redutores.....	66
6. DISCUSSÃO .....	67
6.1. ANATOMIA.....	67
6.1.1. Descrição anatômica da espécie.....	67
6.1.2. Degradação do galactomanano .....	69
6.2. BIOQUÍMICA.....	71
6.2.1. Atividade das enzimas hidrolíticas do galactomanano .....	71
6.2.2. Localização da endo- $\beta$ -mananase.....	75
6.2.2.1. <i>Tissue printing</i> .....	75

6.2.2.2. <i>Immuno dot blotting</i> .....	78
6.2.2.3. Imunofluorescência .....	81
6.2.3. Dosagem de ABA endógeno .....	83
6.2.4. Papel do tegumento .....	85
6.2.4.1. Mobilização de proteínas solúveis.....	86
6.2.4.2. Atividade de $\alpha$ -galactosidase .....	87
6.2.4.3. Níveis de açúcares redutores.....	89
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	92
7.1. Degradação do galactomanano .....	92
7.2. Efeito do ABA .....	92
7.3. Papel do tegumento .....	93
7.4. Modelo sugerido para sementes de <i>Sesbania virgata</i> .....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96

## RESUMO

Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. apresentam o galactomanano como polissacarídeo de reserva de parede celular presente no endosperma, cuja mobilização envolve três enzimas hidrolíticas ( $\alpha$ -galactosidase, endo- $\beta$ -mananase e exo- $\beta$ -manosidase). O ácido abscísico (ABA) tem sido sugerido como envolvido no mecanismo de regulação desse processo, interferindo na produção e atividade das enzimas hidrolíticas, possivelmente relacionado com o tegumento. Neste trabalho, sementes escarificadas, embebidas em água e em solução de ABA  $10^{-4}$  M, foram utilizadas para verificar o efeito do ABA exógeno e endógeno na degradação do galactomanano durante a germinação e pós-germinação, assim como sua possível relação com o tegumento. Na presença do ABA exógeno, as sementes apresentaram retardamento no desarranjo celular do endosperma, com atraso na degradação do galactomanano e no desaparecimento da endo- $\beta$ -mananase no endosperma, sugerindo um atraso de sua atividade na presença do ABA que, conseqüentemente, retardou a degradação do galactomanano. A presença da endo- $\beta$ -mananase no tegumento sugeriu a participação deste tecido na produção, modificação e/ou armazenamento da enzima, assim como das outras enzimas hidrolíticas, que apresentaram atividade no tecido no decorrer do processo de degradação, juntamente com o endosperma. A presença da endo- $\beta$ -mananase e das outras enzimas hidrolíticas no tegumento, juntamente com a detecção de atividade respiratória e presença do ABA endógeno no tegumento, sugerem a participação deste tecido na utilização das enzimas hidrolíticas durante a germinação e pós-germinação e no controle de degradação do galactomanano durante o período pós-germinativo, evitando a produção dos açúcares redutores em excesso, funções possivelmente relacionadas com a presença do hormônio no tecido.

## ABSTRACT

Seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. have an endosperm which accumulates galactomannan as a storage polysaccharide in the cell walls, hydrolysed by three enzymes during its mobilisation ( $\alpha$ -galactosidase, endo- $\beta$ -mannanase and exo- $\beta$ -mannosidase). The abscisic acid (ABA) has been suggested to be involved in the regulation of this process, affecting the hydrolytic enzymes production and activities, possibly together with the seed coat. In this work, scarified seeds, imbibed in water and in  $10^{-4}$  M ABA solution, were used to evaluate the effect of exogenous and endogenous ABA on galactomannan degradation during and after germination, as well as its possible relationship with the seed coat. In the presence of exogenous ABA, the seeds presented a delay in the cellular disassembly of the endosperm, probably due to a delay in the time course of endo- $\beta$ -mannanase in the endosperm with consequent delay in galactomannan degradation. The presence of endo- $\beta$ -mannanase in the seed coat, suggested the participation of this tissue in the production, modification or storage of this enzyme, as well as the others hydrolytic enzymes, which presented activities in the seed coat during the process of degradation, at the same time as in the endosperm. The presence of endo- $\beta$ -mannanase and the others hydrolytic enzymes in the seed coat, together with the presence of respiratory activity and endogenous ABA in this tissue, suggest the participation of the seed coat in the control of utilization of the hydrolytic enzymes during and after the germination and in the control of galactomannan degradation during the post-germinative process, avoiding the excess production of sugars, functions possibly associated with the presence of the hormone in the tissue. Thus, our results add evidence to the hypothesis that the control of galactomannan degradation by seed coat and ABA is an important event in storage mobilization.

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram estratégias adaptativas que possibilitaram o sucesso reprodutivo e a sobrevivência. Uma das estratégias de perpetuação de novos indivíduos nas plantas terrestres foi a produção de esporos resistentes à seca, isto é, sementes tolerantes à desidratação, denominadas sementes ortodoxas (Raven *et al.* 1999, Castro *et al.* 2004). Embora sementes de muitas espécies não sejam tolerantes à dessecação na maturidade, sendo denominadas sementes recalcitrantes (Castro *et al.* 2004).

A semente constitui, portanto, a unidade reprodutiva das espermatófitas (Gimnospermas e Angiospermas), cuja função se relaciona com a dispersão e a sobrevivência das espécies. O embrião, juntamente com as estruturas que o rodeiam, constitui a unidade de dispersão, ou diásporo (Beltrati & Paoli 2003).

Essa unidade de dispersão encontra-se estrutural e fisiologicamente preparada para desempenhar seu papel, provida de uma reserva alimentar capaz de sustentar o crescimento da plântula até que esta se estabeleça como um organismo autotrófico (Bewley 1997). O sucesso de estabelecimento deste novo indivíduo é determinado, portanto, pelos fatores fisiológicos e bioquímicos da semente, dentre outros (Bewley & Black 1994).

### 1.1. SEMENTES

Nas Angiospermas, a semente provém do óvulo como resultado de um processo conhecido como dupla fecundação, em que um dos gametas masculinos se une ao núcleo da oosfera, dando origem ao zigoto diplóide e posteriormente ao embrião, enquanto o outro gameta se funde com os dois núcleos polares do saco embrionário (fusão tripla) dando origem ao endosperma triplóide (Beltrati & Paoli 2003).

As sementes maduras são constituídas pelo embrião, que pode ser envolvido pelo tegumento, tecido diplóide originário da planta-mãe, e endosperma,

de acordo com a espécie (Bewley & Black 1994, Beltrati & Paoli 2003). Na maioria das espécies, o embrião ou este e o endosperma ocupam a maior parte do volume da semente, enquanto os tegumentos, se transformam em revestimento da mesma, sofrendo considerável redução em espessura e desorganização parcial (Esau 1974).

Nas sementes maduras, a micrópila pode ser vista, no ápice de cada tegumento, superficialmente como um pequeno poro, ou pode ser fechada (Beltrati & Paoli 2003). O funículo, todo ou em parte, sofre abscisão, deixando uma cicatriz, o hilo, que atua de duas formas na semente, como uma válvula higroscópica ou como uma região permeável à água (Hyde 1954, Esau 1974, Labouriau 1983).

Diversas variações podem ser encontradas nas sementes, incluindo resistência e permeabilidade do tegumento, tipo, quantidade e localização do material de reserva, assim como o grau de desenvolvimento do embrião (Mayer & Poljakoff-Mayber 1975).

### **1.1.1. Tegumento**

O desenvolvimento dos tegumentos da semente tem início no momento em que ocorre a fecundação, sendo a maneira como se desenvolve importante característica da espécie e o seu conhecimento, essencial para a correta interpretação anatômica da semente madura (Beltrati & Paoli 2003).

Variações na estrutura do tegumento dependem de caracteres específicos do óvulo, especialmente quanto ao número e espessura dos tegumentos e arranjo do tecido vascular, e das modificações sofridas pelo tegumento durante o desenvolvimento e maturação da semente (Esau 1974). A variabilidade anatômica dos tegumentos tem sido utilizada taxonomicamente para distinguir diferentes gêneros e espécies (Prakash 1987, Bewley & Black 1994).

No tegumento ocorre a formação de tecidos diversos, com diferentes tipos de células contribuindo como elementos estruturais dos envoltórios das sementes. Elementos mecânicos que conferem rigidez ao tegumento, como células

esclerenquimáticas, cujas paredes podem ser lignificadas, formam camadas ou se dispõem de maneira esparsa (Beltrati & Paoli 2003).

Nas camadas mais externas das sementes desenvolvem-se, com freqüência, células taníferas, relacionadas à proteção contra predadores e microorganismos, ao aumento da dureza dos tegumentos e à atribuição de cor à semente, podendo ocorrer, ainda, a presença de camadas cuticulares, que auxiliam na proteção e impermeabilidade do tegumento (Esau 1974, Bewley & Black 1994, Beltrati & Paoli 2003). Na região da calaza pode ocorrer uma calota de células com paredes suberificadas, que auxiliam também na impermeabilidade da semente (Beltrati & Paoli 2003).

Em diversas partes dos tegumentos podem estar presentes cristais, geralmente de oxalato de cálcio ou carbonato, relacionados à proteção da semente. Já os tecidos secretores são raros nos tegumentos das sementes, mas células mucilaginosas quando presentes retêm água fornecendo uma barreira em torno da semente (Bewley & Black 1994, Beltrati & Paoli 2003). Em algumas famílias de Angiospermas foram observados estômatos na epiderme externa da testa, que provavelmente facilitam trocas gasosas (Beltrati & Paoli 2003).

Em uma semente bitegmentada estão presentes a testa (tegumento externo) e o tégmen (tegumento interno), enquanto em sementes unitegmentadas considera-se que existe apenas a testa e em alguns casos extremos, as sementes são ategumentadas (Beltrati & Paoli 2003).

Nas sementes de Leguminosae o tegumento interno desaparece ou é freqüentemente amassado durante a ontogênese, não contribuindo para a formação do tegumento na semente madura, ao passo que o externo se diferencia em diversas camadas (Esau 1974, Corner 1976, Prakash 1987). A camada mais externa, a epiderme, permanece unisseriada e origina a camada paliádica, que é constituída de esclereídes - macroesclereídes, ou células de Malpighi, com paredes desigualmente espessadas (Esau 1974, Corner 1976). As células da camada subepidérmica diferenciam-se nas chamadas “células colunares”, também denominadas células em pilar, ampulheta ou osteoesclereídes, dependendo da

distribuição dos espessamentos da parede e formatos das células. O tecido localizado mais profundamente é um parênquima lacunoso com grandes células alongadas tangencialmente na parte externa e células menores e muito ramificadas na interna. Na região do hilo ocorre a presença de duas camadas em paliçada e, ainda, um grupo compacto de traqueídeos (Esau 1974).

A camada paliçada tem sido indicada, especialmente em algumas sementes de leguminosas, como causadora do alto grau de impermeabilidade, devido a sua estrutura, presença de cera e/ou lignina, conseqüentemente afetando a capacidade de germinação (Esau 1974, Melo-Pinna *et al.* 1999). A maior absorção de água deve ocorrer após danificação ou retirada da camada paliçada, possibilitando que ela alcance o endosperma e se inicie o processo de germinação (Melo-Pinna *et al.* 1999).

Essa impermeabilidade tem sido atribuída a diferentes regiões da camada paliçada, possivelmente restrita à região cônica dos macroesclereídes ou à chamada linha lúcida das células paliçadas, que é considerada particularmente como a região impermeável, servindo como barreira à entrada de água, resultante do alto grau de reforço de uma região restrita das paredes da epiderme, especialmente compacta (Coe & Martin 1920, Cavazza 1950, Corner 1951, Werker *et al.* 1973, Esau 1974, Werker 1980, Melo-Pinna *et al.* 1999).

Em muitas espécies sugeriu-se que a principal barreira para entrada de água seria oferecida pelos osteoesclereídes, embora em sementes de soja esta camada tenha um efeito promotor na entrada de água (McDonald *et al.* 1988, Bewley & Black 1994).

A camada parenquimática do tegumento é permeável à entrada, condução e distribuição de água ao redor da semente durante os primeiros estágios de embebição. Assim, após a passagem de água pela camada paliçada, ocorre a sua condução pelas células parenquimáticas do tegumento que, devido à expansão celular, causam o rompimento do tegumento, permitindo a maior entrada de água e a germinação (Santos 2002).

Os tegumentos apresentam, ainda, algumas diferenciações que podem auxiliar a entrada de água e o processo de germinação, podendo possuir regiões mais delgadas, facilitando sua eventual ruptura, falhas na deposição das placas impermeabilizantes de suberina, ou a formação de uma zona de depressão situada ao lado do hilo, em que as células da camada paliçada do tegumento estão em equilíbrio metaestável de tensão, com disposição radial distinta do resto do tegumento, rompendo-se facilmente por qualquer choque nessa região (Crocker & Davis 1914, Hamly 1932, Spurný 1973).

Com base nesses dois efeitos, o tegumento pode ser considerado como um tecido bifuncional, tendo papel na retenção de água, através da camada paliçada, e aceleração de embebição, através da camada parenquimática (Santos 2002). A evolução, portanto, permitiu à semente ortodoxa uma resistência a fortes dessecações, e a ruptura controlada dessa barreira, em virtude da qual a germinação é desencadeada, espalhada no tempo e no espaço (Labouriau 1983).

Além do controle na entrada de água, o tegumento pode fornecer resistência mecânica, interferir nas trocas gasosas entre o embrião e o meio, prevenir a saída de inibidores e os liberar para o embrião, estabelecendo a dormência em sementes (Bewley & Black 1994).

Assim, inibidores da germinação, como ácido abscísico e cumarina, podem estar presentes no tegumento de algumas espécies, como *Arachis hypogaea* L., *Corylus avellana* L., *Eleagnus angustifolia* L., *Rosa canina* L., *Trigonella foenum-graecum* L., *Ceratonia siliqua* L., *Pinus monticola* Dougl. ex D. Don. e *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. (Labouriau 1983, Van Staden *et al.* 1987, Bewley & Black 1994, Kontos & Spyropoulos 1996, Feurtado *et al.* 2004, Frey *et al.* 2004). Foi demonstrado em *Ceratonia siliqua* que o tegumento pode controlar a produção de enzimas hidrolíticas relacionadas à maturação, germinação e mobilização de reservas durante o desenvolvimento das sementes (Kontos & Spyropoulos 1996).

### **1.1.2. Endosperma**

Na maioria das sementes, envolvendo o embrião, há um tecido de reserva denominado endosperma, que pode permanecer até sua maturação ou ser total ou parcialmente consumido pelo embrião em desenvolvimento logo após a sua formação, como ocorre nas espécies em que a reserva é acumulada nos cotilédones volumosos, no eixo hipocótilo-radícula ou em ambos, e o embrião preenche toda a cavidade delimitada pelos envoltórios da semente (Esau 1974, Beltrati & Paoli 2003). Caso o endosperma persista na semente madura, as substâncias de reserva presentes no tecido servirão como fontes nutritivas utilizadas para o desenvolvimento da plântula, sendo degradado durante a germinação (Labouriau 1983, Bewley & Black 1994).

A longevidade do endosperma, sua consistência, tipo e quantidade de reservas são variáveis nas diferentes espécies (Esau 1974, Beltrati & Paoli 2003). Em geral as células têm paredes celulares finas e o material de reserva localiza-se no seu interior, como em endospermas amiláceos, contendo grãos de amido, muitas vezes associados a proteínas em grânulos amorfos ou grãos de aleurona, ou em endospermas oleaginosos, ricos em material lipídico (Beltrati & Paoli 2003). Em alguns casos, o endosperma apresenta como substâncias de reserva, polissacarídeos e hemiceluloses, armazenados nas paredes celulares (Crocker & Barton 1953, Meier 1958, Buckeridge *et al.* 2000b, Beltrati & Paoli 2003). As proteínas e os oligossacarídeos de série rafínósica também são importantes reservas nas sementes (Bewley & Black 1994).

### **1.1.3. Embrião**

O embrião consiste, geralmente, de um eixo embrionário, eixo hipocótilo-radícula, e uma ou duas folhas modificadas, chamadas cotilédones. O eixo embrionário é constituído por uma porção caulinar, o hipocótilo; um rudimento de raiz, a radícula; e pelo meristema ou gema apical do caule, a plúmula (Bewley &

Black 1994, Beltrati & Paoli 2003). Quando dois cotilédones estão presentes (dicotiledôneas), o meristema ou a gema apical do caule (plúmula) encontra-se entre eles e, quando há apenas um cotilédone terminal (monocotiledôneas), a posição da plúmula é considerada lateral. Em sementes de leguminosas, os embriões podem apresentar plúmulas em diversos graus de desenvolvimento, de acordo com o gênero ou espécie (Beltrati & Paoli 2003). O embrião, envolvido pelo tegumento e endosperma, geralmente está protegido da estiagem e de predadores e provido de reserva (Raven *et al.* 1999).

## **1.2. GERMINAÇÃO E PÓS-GERMINAÇÃO**

O início da germinação das sementes ortodoxas ocorre com a entrada de água, embebição, ocorrendo o início de diversos eventos que resultam na retomada do crescimento do embrião, com a emergência da radícula através do tegumento encerrando o processo (Van Staden *et al.* 1987, Bewley & Black 1994, Taiz & Zeiger 2004).

A germinação pode ser dividida em três fases: embebição, aumento da atividade metabólica e iniciação do alongamento e crescimento do eixo embrionário, que resulta na protrusão da radícula (Bewley 1997). Para que a germinação ocorra é necessária, portanto, a hidratação das sementes quiescentes, sob condições favoráveis ao aumento do metabolismo, dependendo de água, temperatura adequada, presença de oxigênio, ausência de substâncias inibidoras e em algumas espécies condição adequada de luminosidade (Bewley & Black 1994, Raven *et al.* 1999, Taiz & Zeiger 2004).

A etapa de hidratação é limitante aos vários outros processos fisiológicos que ocorrem na semente ortodoxa germinante, porém, em alguns casos são necessárias mudanças no tegumento para que ocorra a embebição, a fim de permitir a entrada da água, que causa a expansão do embrião e do endosperma, rompendo o tegumento e facilitando o processo de germinação (Labouriau 1983, Raven *et al.* 1999).

O processo de germinação, desta forma, inclui diversos eventos como embebição, reativação do metabolismo, aumento na atividade respiratória, atividade enzimática e de organelas, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, hidratação das proteínas, mudanças estruturais subcelulares e alongamento celular, que de modo integrado transformam a semente com baixo teor de água e metabolismo reduzido em uma semente com metabolismo vigoroso, culminando no crescimento do embrião (Bewley & Black 1994).

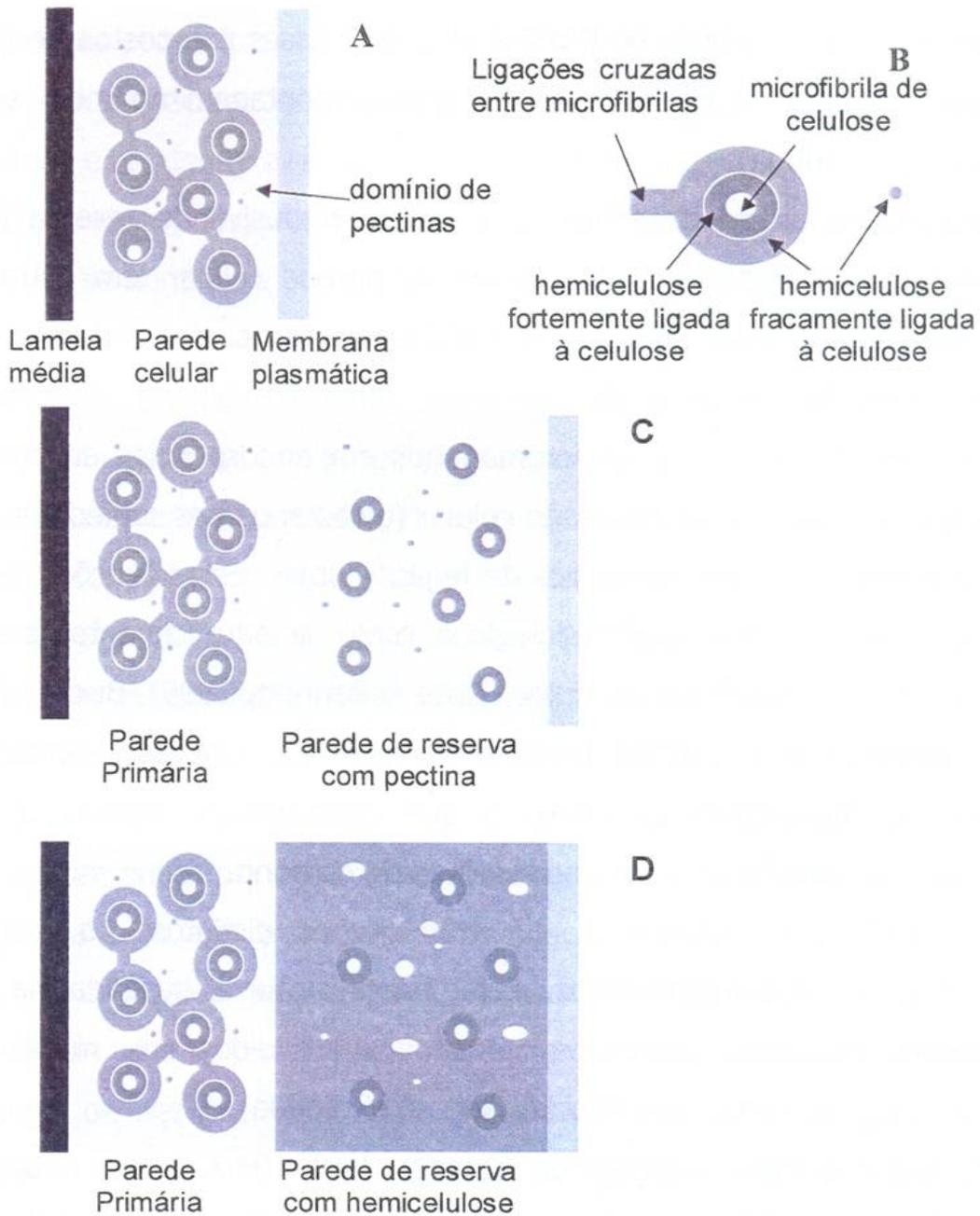
Porém, a mobilização das reservas e o crescimento e desenvolvimento do embrião e da nova plântula começam somente quando a germinação termina, durante o processo chamado de pós-germinação (Bewley & Black 1994).

### **1.3. PAREDE CELULAR DE RESERVA DAS SEMENTES**

As Angiospermas apresentam diferentes estratégias de adaptação aos seus respectivos ambientes, entre as quais se encontra o acúmulo de certos compostos de reserva em suas sementes (Buckeridge *et al.* 2000c). As reservas de polissacarídeos podem estar presentes nas paredes das células dos cotilédones e dos endospermas, denominadas paredes de reserva (Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000c).

Os modelos mais recentes propõem que a parede celular seja uma matriz complexa e espessa com diferentes papéis fisiológicos, formada de dois, ou muitas vezes, três domínios estruturalmente independentes, mas que interagem entre si (McCann & Roberts 1991, Carpita & Gibeaut 1993, Carpita & McCann 2000).

O domínio fundamental da parede celular é formado por microfibrilas de celulose, macromolécula orgânica mais abundante da Terra, envolvidas por hemiceluloses, que podem estar forte ou fracamente ligadas à celulose por pontes de hidrogênio (Alberts *et al.* 1997, Buckeridge *et al.* 2000c, Carpita & McCann 2000) (Fig. 1A e 1B).



**Figura 1.** Representação esquemática da parede celular primária (**A e B**) e das paredes de reserva com pectina (**C**) ou hemicelulose (**D**), em corte transversal. O domínio protéico, que representa menos do que 10% da parede celular, foi omitido (Buckeridge *et al.* 2000c).

O domínio celulose-hemicelulose, interligado por polímeros de hemiceluloses, encontra-se imerso no segundo domínio, formado por uma matriz de polissacarídeos ricos em ácidos galacturônicos, a matriz péctica (Cosgrove 1999, Buckeridge *et al.* 2000c, Carpita & McCann 2000) (Fig. 1A).

A rede de celulose e hemicelulose fornece força tensora, enquanto a rede de pectina está relacionada com a resistência à compressão (Alberts *et al.* 1997, Jarvis & McCann 2000). O terceiro domínio consiste de proteínas estruturais e enzimas, que têm grande importância na mobilização dos carboidratos de reserva de parede (Carpita & McCann 2000).

A parede celular de reserva pode ser vista como variação desse modelo, em que um domínio, ou um de seus polissacarídeos, tenha sido depositado em maior quantidade em relação aos demais (Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000c) (Fig. 1C e 1D). Assim, a parede de reserva constitui, possivelmente, uma adaptação evolutiva das paredes celulares primárias, que desenvolveram a capacidade de armazenar grandes quantidades de carboidratos (Buckeridge & Reid 1996).

A parede de reserva pode acumular polímeros derivados de pectina, como os arabinogalactanos ou de hemiceluloses, como galactomananos e xiloglucanos, apresentando pouca ou nenhuma quantidade de celulose, juntamente com pequenas quantidades de outros polissacarídeos típicos da parede celular (Buckeridge *et al.* 2000c) (Fig. 1C e 1D).

A proporção pequena de celulose presente na parede de reserva facilita o processo de mobilização, o qual seria consideravelmente mais complexo se proporções maiores de celulose estivessem ali presentes (Buckeridge *et al.* 2000b).

Para caracterizar, quantificar e purificar polissacarídeos de reserva e enzimas de parede celular, têm sido feitos estudos utilizando diversas técnicas, como a cromatografia, para caracterizar polissacarídeos (Franco *et al.* 1996) e a eletroforese em gel, para detectar enzimas e isoenzimas (Dirk *et al.* 1995).

Já métodos que envolvem o uso de anticorpos policlonais específicos têm sido utilizados para detectar e localizar os polissacarídeos e as hidrolases presentes na parede celular, como o *immunoblotting*, para detectar enzimas (Sekhar & DeMason 1990, Buckeridge & Reid 1994); *tissue printing*, para localizar hidrolases (Toorop *et al.* 1996, Nonogaki *et al.* 1998, Nonogaki & Morohashi 1999, Nonogaki *et al.* 2000, McCartney & Knox 2002) e métodos imunocitoquímicos, com anticorpos marcados com compostos fluorescentes (Orfila & Knox 2000, Leubner-Metzger 2002) ou com ouro coloidal (Sekhar & DeMason 1990, Buckeridge & Reid 1994, Nikus *et al.* 2000), para localizar tanto polissacarídeos como enzimas.

#### **1.4. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE PAREDE CELULAR**

Os polissacarídeos de reserva presentes na parede celular são denominados polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) (Reid 1985a, Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000b). Esses polissacarídeos são mobilizados após a germinação das sementes, durante o desenvolvimento e estabelecimento das plântulas, período essencial para que o ciclo de vida das plantas seja completado, e seus produtos de degradação são usados para geração de energia e produção de matéria-prima para a construção de novos tecidos e células (Mayer & Poljakoff-Mayber 1975, Reid 1985a).

Os PRPC são relativamente inertes no que concerne à sua reatividade química e apresentam diferentes graus de solubilidade em água. Essas características conferem alta compactação e baixa reatividade ao polímero e tornam possível a existência de um “compartimento celular”, a parede celular, que permite o fluxo de água com um grau de liberdade considerável. Porém, o custo metabólico para produzir tais polímeros é alto, pois estes necessitam de um complexo sistema de biossíntese, secreção e montagem no meio extracelular (Buckeridge *et al.* 2000c).

Esses polissacarídeos, além da função de reserva, desempenham funções paralelas associadas à dureza (mananos em endospermas de sementes de palmeiras, tomate e alface), relações hídricas (xiloglucanos em cotilédones e galactomananos em endospermas de sementes de leguminosas) e no controle da expansão celular (galactanos nos cotilédones de lupino e, em menor proporção, em sementes de feijão e soja) (Buckeridge *et al.* 2000c).

Essas funções secundárias seriam importantes no mecanismo evolutivo que levou as plantas a utilizarem polissacarídeos da parede celular como reserva de carbono (Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000b). Assim, os polissacarídeos de reserva teriam passado por etapas de transferência de funções ao longo da evolução, que seriam importantes nas transformações que levaram à formação da parede de reserva a partir da parede primária (Buckeridge & Reid 1996).

Os polissacarídeos de reserva presentes na parede celular são classificados em três grupos distintos: os mananos, os xiloglucanos e os (arabino) galactanos (Buckeridge *et al.* 2000c). Como a classificação é baseada na estrutura e composição, os mananos são subdivididos em mananos puros, glucomananos e galactomananos (Buckeridge *et al.* 2000a), sendo este último apresentado com maiores detalhes a seguir.

## **1.5. GALACTOMANANOS**

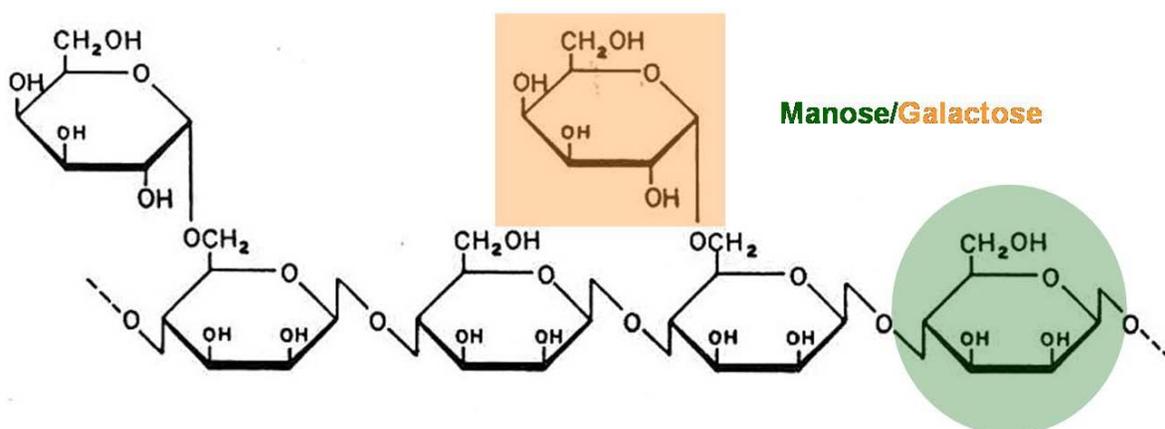
Os galactomananos ocorrem tipicamente na parede celular das células do endosperma de sementes de Leguminosae, mas também estão presentes em sementes de espécies de outras famílias, como Compositae, Convolvulaceae, Annonaceae, Malvaceae, Palmae e Umbelliferae (Tookey *et al.* 1962, Dea e Morrison 1975, Guzmán & Hernandez 1982, Buckeridge *et al.* 2000b).

Os primeiros estudos com espécies que armazenam galactomananos em suas sementes foram realizados por Nadelmann, em 1890. Este autor reportou a presença de galactose e manose em várias espécies, incluindo uma espécie

tropical, *Schizolobium* sp., notificando o galactomanano como uma substância viscosa (Nadelmann 1890, Buckeridge *et al.* 2000a).

### 1.5.1. Estrutura dos galactomananos

Os galactomananos são constituídos de uma cadeia principal formada por unidades de D-manose unidas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), a qual unidades de D-galactose estão unidas através de ligações do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), formando ramificações simples (Moe *et al.* 1947, Unrau 1961, Somme 1968, Manzi & Cerezo 1984) (Fig. 2).



**Figura 2.** Modelo esquemático da estrutura química do galactomanano, mostrando a cadeia linear de unidades de manose e suas ramificações com unidades de galactose.

A razão manose:galactose e a distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia principal do manano variam de espécie para espécie, entre aproximadamente 1:1 e 4:1, sendo geneticamente controladas e importantes para estudos quimiotaxonômicos e evolutivos (Reid & Meier 1970, Bailey 1971,

Edwards *et al.* 1989, Buckeridge & Dietrich 1990, Buckeridge *et al.* 1995b, Buckeridge *et al.* 2000a).

Além de constituir excelente parâmetro para estudos taxonômicos, utilizados para distinguir as três subfamílias de Leguminosae (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae), a razão manose:galactose é, ainda, responsável por muitas das propriedades desse polímero, incluindo sua solubilidade e grau de interação com moléculas de celulose na estrutura da parede celular (Bailey 1971, Buckeridge & Dietrich 1990, Whitney *et al.* 1998).

### **1.5.2. Propriedades dos galactomananos**

Os galactomananos, além de serem polissacarídeos de reserva utilizados para o crescimento da plântula, exercem um papel importante no controle de embebição de água no início da germinação (Reid & Bewley 1979, Buckeridge *et al.* 2000c). Esses polissacarídeos altamente ramificados, por serem solúveis em água, formam dispersões viscosas e estáveis, absorvendo, proporcionalmente, grande quantidade de água e a distribuindo ao redor do embrião (Reid 1985a, Neukom 1989, Buckeridge *et al.* 2000c).

O endosperma embebido protege o embrião contra perda de água através de um efeito conhecido como “tampão de água”, durante períodos de seca após embebição, protegendo-o contra estresse hídrico (Reid & Bewley 1979). Comportamento similar pode ser verificado em leguminosas tropicais, como *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e *Dimorphandra mollis* Benth. (Buckeridge *et al.* 1995a, Buckeridge & Dietrich 1996, Zpevak 1999).

Os galactomananos teriam, ainda, a propriedade de conferir dureza e resistência física ao endosperma no período de germinação, baseado nas duas das principais características dos mananos puros, constrição mecânica à protrusão da radícula e proteção contra injúria mecânica (Buckeridge *et al.* 2000a, Lisboa 2003).

Essas funções seriam tão importantes e significativas quanto as funções de reserva e embebição, sendo que somente após o enfraquecimento do endosperma que circunda o embrião, pela ação de enzimas hidrolíticas, a degradação das paredes celulares aliviaria a barreira mecânica que restringe o alongamento da radícula, ocorrendo a germinação, como observado em tomate (Groot *et al.* 1988, Nonogaki & Morohashi 1996, Toorop *et al.* 1996, Voigt & Bewley 1996), melão (Welbaum *et al.* 1995), tabaco (Leubner-Metzger *et al.* 1995) e cevada (Schuurink *et al.* 1992).

O grau de ramificação dos mananos define suas relações estrutura-função, sendo que quanto menos ramificado o polissacarídeo maior a indicação de que a função biológica está relacionada com a dureza e proteção do embrião, enquanto que galactomananos mais ramificados são mais solúveis e apresentam participação maior em funções como as relações hídricas (Buckeridge *et al.* 2000c).

As funções de reserva e embebição parecem estar associadas quase que exclusivamente às leguminosas, enquanto que em espécies não-leguminosas a função de dureza e proteção do embrião é mais evidente. É possível, no entanto, que a função de dureza esteja ainda preservada em leguminosas, como verificado em sementes de *Sesbania virgata* (Buckeridge *et al.* 2000c, Lisboa 2003).

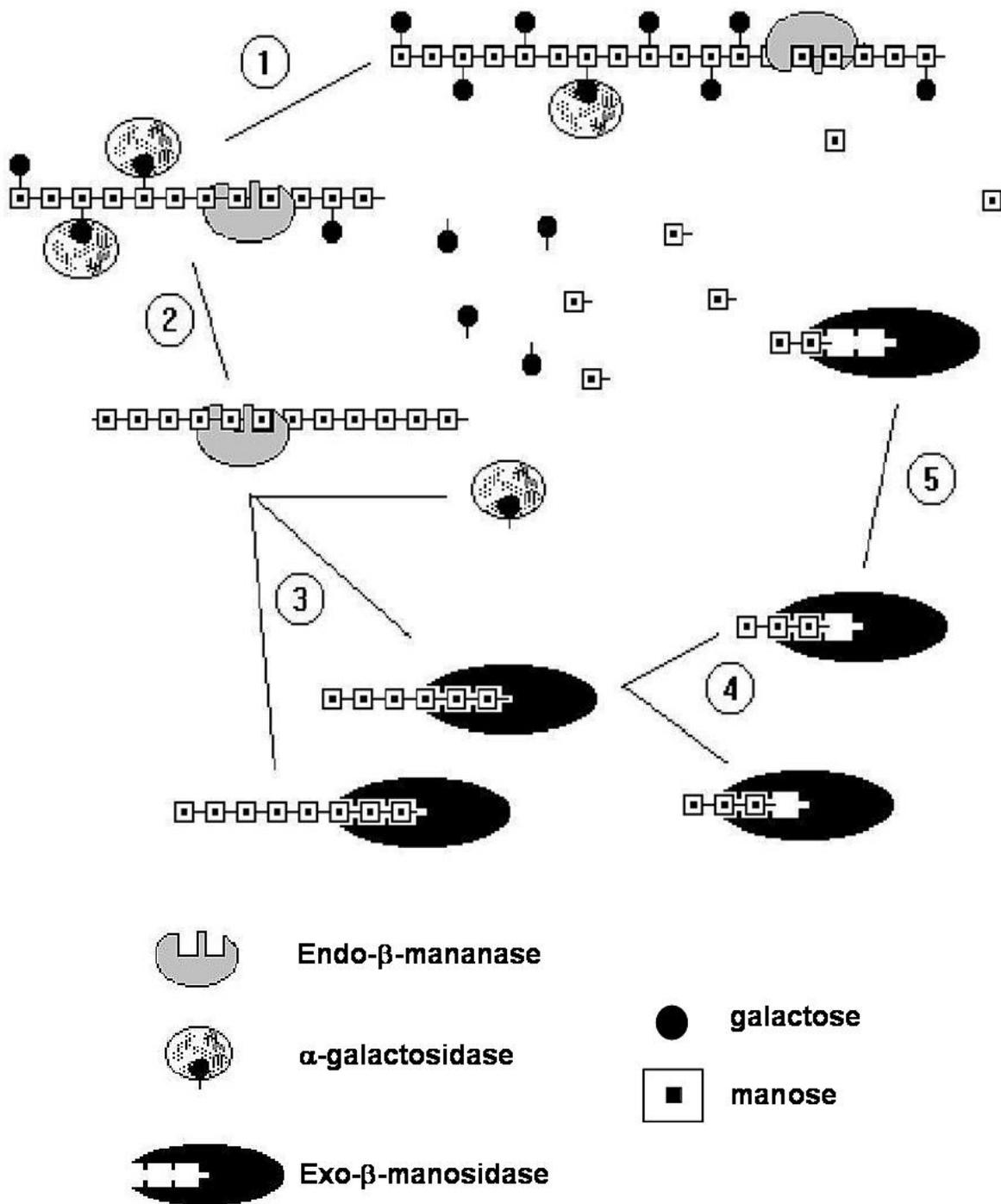
Não se sabe ao certo qual dessas funções é a primária, a de reserva, a de controle de embebição ou a de dureza. Sabe-se, porém, que as moléculas de galactomananos são multifuncionais, desempenhando suas funções durante fases distintas do crescimento e desenvolvimento das plantas (Buckeridge *et al.* 2000c).

Confere-se, portanto, uma importância ecológica a esse polissacarídeo na germinação das sementes e crescimento da plântula, já que as características da semente podem contribuir para diferentes estratégias de adaptação, decorrentes provavelmente de um mecanismo de seleção desempenhado durante a evolução, permitindo a sobrevivência da planta (Potomati 2000). Essa mesma importância ecológica foi atribuída por Reid (1985b) para sementes de leguminosas.

Por suas propriedades físico-químicas, os galactomananos apresentam considerável importância comercial, principalmente no que se refere à solubilidade em água e às soluções viscosas que formam, sendo utilizados em vários setores industriais (Buckeridge *et al.* 2000a, Edwards *et al.* 2002). Entre esses setores se destacam os de alimentos (Glicksmann 1962, Buckeridge *et al.* 2000a), papel e explosivos (Whistler & Smart 1953, Lima *et al.* 2003), cosméticos (Chudzikowski 1971), produtos farmacêuticos (Buckeridge *et al.* 2000a), dentre outros (Dea & Morrison 1975). A goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub.) e a goma caroba (*Ceratonia siliqua*), por exemplo, são usadas na indústria de alimentos como espessantes, estabilizadores e agentes geleificantes, sozinhos ou combinados com outros polissacarídeos (Dea & Morrison 1975, Reid & Edwards 1995). Nesse enfoque, a razão manose:galactose é, também, extremamente importante como fator comercial, já que os galactomananos com maior nível de ramificação favorecem misturas ou interações comerciais com outros polímeros (Dea *et al.* 1977).

### **1.5.3. Degradação dos galactomananos**

A mobilização dos galactomananos é mediada por três enzimas hidrolíticas:  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22) - responsável pela quebra das ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) existentes entre as unidades de galactose e manose; endo- $\beta$ -mananase ou  $\beta$ -1,4-manano-endo-hidrolase (EC 3.2.1.78) - que atua sobre as ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) existentes entre as unidades de manose da cadeia principal, reduzindo o manano a oligossacarídeos; exo- $\beta$ -manosidase ou  $\beta$ -manosidase (EC 3.2.1.25) - específica para a quebra das ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre as unidades de manose dos oligossacarídeos provenientes da ação da endo- $\beta$ -mananase, liberando manoses livres (Reid & Meier 1972, McCleary & Matheson 1976, McCleary *et al.* 1982, McCleary 1983, Buckeridge *et al.* 1995a, Buckeridge & Reid 1996, Ademark *et al.* 1998, Buckeridge *et al.* 2000a, Mo & Bewley 2003) (Fig. 3).



**Figura 3.** Modelo esquemático da degradação do galactomanano, mostrando a atividade das três enzimas hidrolíticas (Buckeridge & Reid 1996).

Como a endo- $\beta$ -mananase em sementes de leguminosas age como a mananase de sementes contendo manano puro, as ramificações de galactose na cadeia principal de manano interferem em sua ação hidrolítica (Reid & Edwards 1995). Dessa forma, em espécies como *Medicago sativa* L. (alfafa), *Cyamopsis tetragonolobus* e *Sesbania virgata*, torna-se importante a ação da  $\alpha$ -galactosidase, desgalactosilando o polímero, anteriormente à ação hidrolítica da endo- $\beta$ -mananase e da exo- $\beta$ -manosidase (McCleary & Mathenson 1975, Buckeridge *et al.* 2000a, Lisboa 2003).

A importância da  $\alpha$ -galactosidase é progressivamente maior em sementes que possuem galactomananos com maior grau de ramificação de galactose, explicando níveis altos de atividade desta enzima durante a mobilização do galactomanano em espécies contendo polímeros altamente ramificados (Buckeridge *et al.* 2000a).

Em sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), que possuem pequena quantidade de galactose no polímero, a  $\alpha$ -galactosidase só pode retirar galactose do produto de ação da endo- $\beta$ -mananase (Leung & Bewley 1983), embora em *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate) a  $\alpha$ -galactosidase esteja presente antes do aumento de atividade da endo- $\beta$ -mananase e da exo- $\beta$ -manosidase (Toorop *et al.* 1996, Feurtado 1999).

Já a ação hidrolítica da  $\alpha$ -galactosidase e da endo- $\beta$ -mananase controlam a ação da exo- $\beta$ -manosidase, que só pode agir sob o produto das duas enzimas, mano-oligossacarídeos desgalactosilados, manobioses e manotrioses, não tendo atividade sobre o polímero (McCleary 1983, Buckeridge *et al.* 2000a, Mo & Bewley 2002, Mo & Bewley 2003).

Até o momento, poucos estudos têm explorado o local onde ocorre a síntese das enzimas hidrolíticas, sua migração e localização durante todo o processo de germinação e pós-germinação. A camada de aleurona tem sido sugerida como suposta responsável pela síntese de enzimas hidrolíticas utilizadas para a degradação do galactomanano no endosperma, como verificado em

sementes de *Trigonella foenum-graecum*, *Cyamopsis tetragonolobus* (Reid 1985c) e em sementes de *Trifolium incarnatum* L. e *Medicago sativa* (Reid & Meier 1972). Já em sementes de *Ceratonia siliqua* verificou-se que as enzimas são provavelmente produzidas nas células endospermicas (Seiler 1977, Buckeridge *et al.* 2000a). Em sementes de *Sesbania virgata*, Buckeridge *et al.* (2000a) propuseram que as enzimas poderiam ser produzidas tanto pela camada de aleurona como pelas células do endosperma.

Quanto à migração e localização das enzimas, sabe-se que a atividade da mananase aparece inicialmente no endosperma que circunda a radícula e, após a emissão da radícula, aumenta no restante do endosperma lateral, estando envolvida tanto no processo de germinação quanto em eventos pós-germinativos em sementes de tomate (Groot *et al.* 1988, Nonogaki *et al.* 1992, Nomaguchi *et al.* 1995, Nonogaki & Morohashi 1996, Nonogaki *et al.* 2000, Mo & Bewley 2002) e de *Sesbania virgata* (Lisboa 2003).

Assim como a endo- $\beta$ -mananase, a exo- $\beta$ -manosidase está presente no endosperma que circunda a radícula durante a germinação e no endosperma lateral após a germinação de sementes de tomate (Mo & Bewley 2002). Essas enzimas parecem ser reguladas similarmente, de maneira temporal (Mo & Bewley 2003). A  $\alpha$ -galactosidase encontra-se, também, presente no endosperma que circunda a radícula, no endosperma lateral e no embrião durante e depois da germinação em sementes de tomate (Feurtado *et al.* 2001).

Nas sementes de alface e *Trigonella foenum-graecum* a atividade da endo- $\beta$ -mananase não é detectada antes da germinação, começando a agir, no entanto, imediatamente após a protrusão da radícula, ocorrendo principalmente na região do endosperma próximo ao eixo embrionário (Dirk *et al.* 1995, Nonogaki & Morohashi 1999).

Devido à presença de múltiplas isoformas da endo- $\beta$ -mananase, espacial e temporalmente distintas durante a germinação e pós-germinação das sementes (Dirk *et al.* 1995), as seqüências e expressões gênicas dessa enzima vêm sendo cuidadosamente reportadas, obtendo-se clones de cDNA da enzima em sementes

de tomate (Bewley *et al.* 1997, Nonogaki *et al.* 2000) e de *Coffea arabica* L. (café) (Marraccini *et al.* 2001).

McCleary & Matheson (1974) detectaram múltiplas isoformas da  $\alpha$ -galactosidase nas sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, embora somente uma isoforma esteja associada com o endosperma, hidrolisando galactoses do galactomanano.

Recentemente, Feurtado *et al.* (2001) sugeriram pelo menos três isoformas da  $\alpha$ -galactosidase nas sementes de tomate e, através da obtenção e seqüenciamento do cDNA da enzima, demonstraram alta homologia da  $\alpha$ -galactosidase do tomate com outras galactosidases, especialmente com as de sementes de café (Zhu & Goldstein 1994). Ainda, em sementes de tomate, a exo- $\beta$ -manosidase também foi clonada recentemente durante e após a germinação (Mo & Bewley 2002).

Os estudos moleculares associados aos bioquímicos permitem comparações entre as atividades das três enzimas hidrolíticas, e a expressão de seus genes (Mo & Bewley 2003).

Em todas as espécies de leguminosas estudadas, a mobilização do galactomanano inicia após a germinação (Buckeridge *et al.* 2000c). Provavelmente essa mobilização seja induzida durante ou depois da germinação por algum fator, já que em endospermas de sementes de *Trigonella foenum-graecum* e *Ceratonia siliqua*, a endo- $\beta$ -mananases para a primeira espécie e  $\alpha$ -galactosidase para ambas as espécies são sintetizadas *de novo* (Reid & Meier 1973, Seiler 1977, Buckeridge *et al.* 2000c).

Pela ação das hidrolases, os galactomananos são desmontados até seus monossacarídeos constituintes (manose e galactose), que são absorvidos pelos cotilédones através de difusão passiva para a galactose e transporte ativo para a manose (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2000c). Os mano-oligossacarídeos produzidos durante a degradação do galactomanano no endosperma podem ser em parte transportados para os cotilédones, onde serão

catabolizados pelas enzimas hidrolíticas, como sugerido em sementes de alface (Bewley & Black 1994) e de *Sesbania virgata* (Buckeridge & Dietrich 1996).

Ao mesmo tempo em que ocorre a degradação do galactomanano, a sacarose é produzida, sendo aparentemente responsável pelo transporte dos produtos de degradação da reserva (carbono e energia) até o embrião em crescimento, onde são utilizados em vários processos bioquímicos (McCleary & Mathenson 1976, McCleary 1983, Buckeridge *et al.* 2000b, Buckeridge *et al.* 2000c).

Analisando o destino dos produtos de degradação do galactomanano de *Cyamopsis tetragonolobus*, foi detectado no endosperma das sementes a atividade das enzimas fosfomanoisomerase e fosfoglucoisomerase, sugerindo a epimerização da manose e galactose em glucose através dessas enzimas, para uso na síntese de sacarose (McCleary & Mathenson 1976, McCleary 1983, Buckeridge *et al.* 2000b).

Paralelamente à degradação dos galactomananos no endosperma, ainda, ocorre produção e acúmulo de amido transitório nos cotilédones, posteriormente degradado durante o crescimento da plântula, servindo como fonte de energia para o embrião (Reid 1971, Buckeridge & Dietrich 1996, Tiné 1997, Buckeridge *et al.* 2000a).

Lisboa (2003) sugere, em sementes de *Sesbania virgata*, que existe um mecanismo que evitaria a produção dos açúcares redutores em excesso e a subsequente produção de grandes quantidades de sacarose e amido transitório, devido à ação espaçada e momentânea da endo- $\beta$ -mananase, que possui pH ótimo e ponto isoelétrico (pI) idênticos.

Esse mecanismo teria um papel importante no controle da degradação do polímero, já que a distribuição e o transporte dos produtos de degradação seria provavelmente mais eficiente, uma vez que pouparia energia e desperdício de material orgânico necessário ao crescimento da plântula (Lisboa 2003). Além disso, há estudos que demonstram que o embrião exerce um papel importante no

controle da hidrólise do galactomanano (Zambou & Spyropoulos 1990, Bewley & Black 1994).

#### **1.5.4. Regulação da degradação dos galactomananos**

O endosperma das sementes de leguminosas provavelmente esteja sob controle indutor das auxinas e giberelinas (Spyropoulos & Reid 1985). A ação da giberelina já foi demonstrada na regulação da germinação de sementes de tomate, induzindo o enfraquecimento do endosperma, embora até o momento não pode ser verificada a ação indutora do ácido giberélico na degradação de galactomananos em Leguminosae, o que sugere que esta família tem um controle metabólico diferente (Groot & Karssen 1987, Buckeridge *et al.* 2000c).

Foi proposto, em sementes de alface (Dulson *et al.* 1988) e *Trigonella foenum-graecum* (Spyropoulos & Reid 1985), a existência de um inibidor(s) solúvel em água, provavelmente relacionado à síntese das hidrolases na camada de aleurona, que de alguma forma é inativado ou degradado durante a germinação, conseqüentemente liberando a mobilização da reserva de parede celular.

Embora a inibição da degradação do galactomanano em endospermas de sementes de *Trigonella foenum-graecum* seja maior com o aumento do estresse hídrico, as atividades das hidrolases não são afetadas (Spyropoulos & Reid 1988). Dessa forma, esses autores concluíram que a inibição da degradação do galactomanano através do estresse hídrico não ocorre pela inibição da síntese protéica, mas pela inibição do dreno de açúcares redutores, que inibiriam a atividade das hidrolases, embora a síntese da endo- $\beta$ -mananase e exo- $\beta$ -manosidase possam ser inibidas caso o estresse hídrico ocorra antes da degradação do galactomanano.

Sabe-se que o ácido abscísico (ABA) é um potente inibidor da degradação do galactomanano, e está envolvido no mecanismo de regulação dessa mobilização em sementes de *Ceratonia siliqua* (Seiler 1977), alface (Halmer & Bewley 1979), tomate (Groot & Karssen 1992), *Trigonella foenum-graecum* (Reid

& Meier 1973, Malek & Bewley 1991, Kontos & Spyropoulos 1995) e *Sesbania virgata* (Potomati & Buckeridge 2002).

A presença do ABA inibe a degradação do galactomanano, interferindo na atividade das enzimas hidrolíticas e modulando interações bioquímicas e fisiológicas entre o endosperma e embrião durante e após a germinação de sementes (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2000a, Potomati & Buckeridge 2002). Somente quando o hormônio é lixiviado ou metabolizado, a transferência de carbono e energia entre os órgãos pode ser iniciada, sendo assim importante no estabelecimento da espécie no ambiente (Buckeridge *et al.* 2000a).

Sabe-se que o ABA está envolvido, ainda, no mecanismo de dormência das sementes, induzindo um retardamento temporal no processo de germinação ou inibindo a germinação sob condições desfavoráveis, bem como no mecanismo de inibição da germinação precoce e viviparidade (Taiz & Zeiger 2004). Sementes em desenvolvimento raramente germinam e, quando a germinação precoce ocorre, provavelmente há deficiências na produção ou sensibilidade ao ABA (Black 1991, Hilhorst 1995, Karssen 1995).

A presença de ABA no tegumento de algumas espécies sugere a participação conjunta desse hormônio com o tegumento no mecanismo de dormência e no processo de germinação (Bewley & Black 1994). Sementes mutantes de tomate deficientes em ABA apresentam um tegumento menos resistente contribuindo para uma germinação mais rápida do que em sementes selvagens, que respondem diferentemente ao estresse osmótico e à dormência, provavelmente devido à presença de mais camadas no tegumento (Hilhorst & Downie 1996, Downie *et al.* 1999).

Potomati e Buckeridge (2002) observaram efeito do ABA exógeno sobre o processo de germinação e degradação do galactomanano no endosperma de *Sesbania virgata*. Os autores verificaram o retardamento da germinação em presença do hormônio e, utilizando endospermas e embriões isolados, propuseram que o galactomanano funcionaria mais como uma reserva de água do que de carbono para o embrião, e que o efeito do ABA na germinação e pós-

germinação poderia estar relacionado com absorção de água pelo embrião em crescimento.

Além da modulação da absorção de água pelo embrião, todo o processo de degradação do galactomanano e utilização desta reserva pelo embrião seriam modulados pela presença do hormônio, conforme Potomati & Buckeridge (2002). Provavelmente em sementes de *S. virgata*, o ABA seja análogo às saponinas detectadas em sementes de *Trigonella foenum-graecum* (Zambou *et al.* 1993).

Porém, alguns trabalhos divergem quanto ao efeito do ABA na germinação e mobilização de reservas. Berry & Bewley (1991) levantaram uma hipótese de que o potencial osmótico, entre o endosperma e o embrião, é muito mais importante na regulação da germinação do que o ABA, como observado também em grão de bico (Iglesias & Babiano 1997), cevada (Yamada 1984) e arroz (Qin 1990).

A adição de açúcares ou aminoácidos no meio de incubação das sementes de *Arabidopsis sp.* suprimem a ação inibitória do ABA, liberando a germinação (Garcarrubio *et al.* 1997, Finkelstein & Lynch 2000). Apesar de outros autores sugerirem no mesmo gênero que os açúcares modulam os genes de biossíntese de ABA, induzindo a biossíntese do hormônio e o acúmulo de ABA endógeno (Cheng *et al.* 2002, León & Sheen 2003).

O ABA, de qualquer maneira, começa a atuar durante o desenvolvimento das sementes, a fim de promover a sobrevivência da planta, ocorrendo na maioria das espécies desde a maturação da semente, aquisição da tolerância à dessecação, prevenção da germinação precoce até a mobilização de reservas (Potomati 2000).

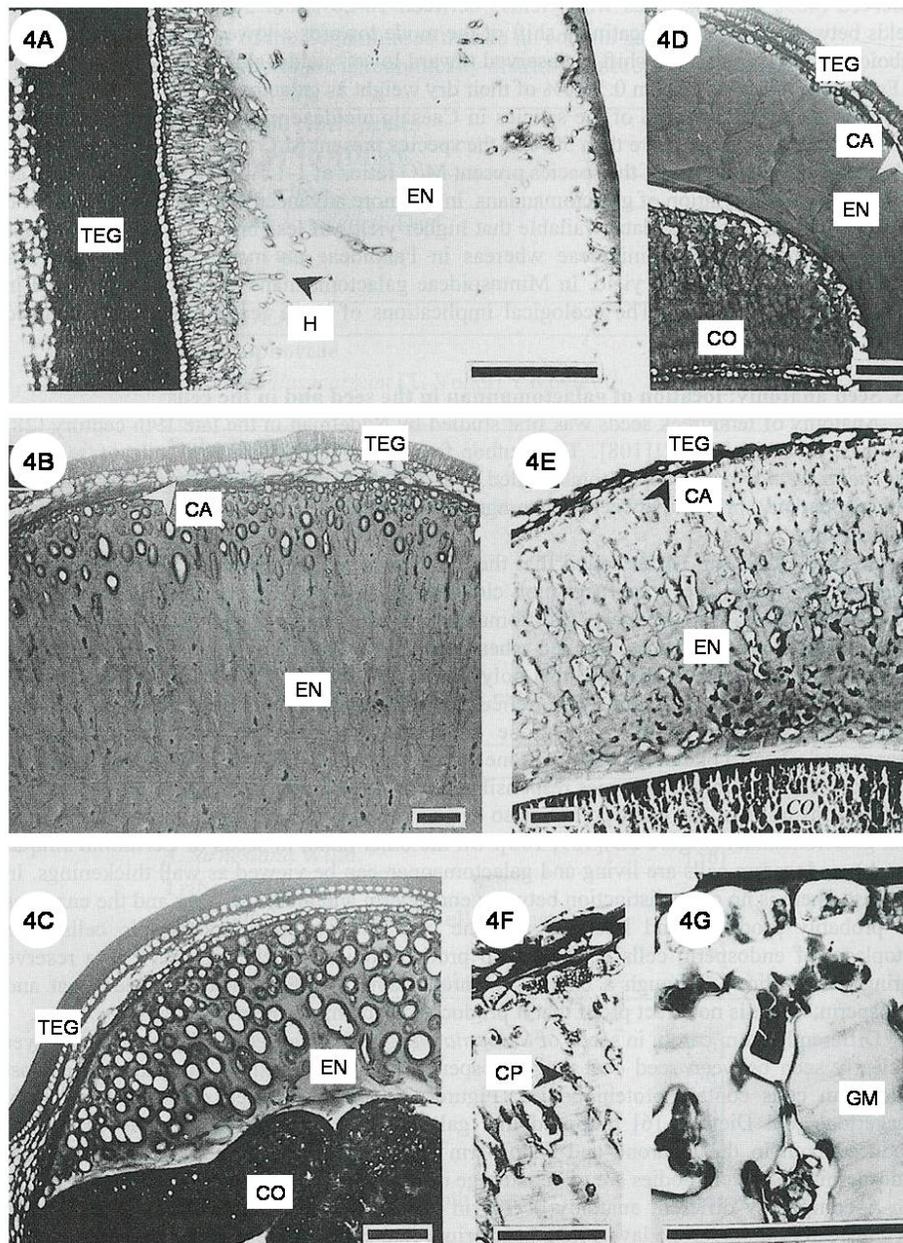
### 1.5.5. Anatomia do endosperma contendo galactomananos

Sementes de leguminosas, contendo galactomanano, apresentam estrutura variada, refletindo diferentes estratégias de utilização da reserva, exercendo papel fundamental na adaptação e estabelecimento de diferentes plântulas nos seus ambientes (Buckeridge & Dietrich 1996).

A anatomia das sementes contendo galactomanano foi primeiramente estudada por Nadelmann, em 1890, em sementes de *Trigonella foenum-graecum*. O endosperma presente nas sementes de leguminosas circunda todo o eixo embrionário, localizando-se entre o embrião (radícula e cotilédone) e o tegumento, podendo variar muito quanto à presença ou ausência da camada de aleurona, células endospérmicas vivas ou não e acúmulo de corpos protéicos ou grãos de aleurona (Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge *et al.* 2000a).

As sementes de *Trigonella foenum-graecum* e *Cyamopsis tetragonolobus* não apresentam corpos protéicos, exceto na camada de aleurona. Além disso, as células endospérmicas não são vivas, sendo o citoplasma reduzido durante a maturação, em função da deposição maciça do galactomanano nas paredes celulares (Reid 1971, Reid & Meier 1972, McClendon *et al.* 1976, Reid 1985c) (Fig. 4B e 4D). Sementes de *Trifolium incarnatum* e *Medicago sativa* apresentam estrutura similar à de *T. foenum-graecum* e *C. tetragonolobus*, apresentando camada de aleurona repleta de corpos protéicos (Reid & Meier 1972).

Por outro lado, nas sementes de *Ceratonía siliqua* as células endospérmicas são vivas, apresentando corpos protéicos no citoplasma, e o galactomanano pode ser visto como um espessamento da parede. Porém, não ocorre distinção clara entre o endosperma e a camada de aleurona (Seiler 1977, Buckeridge *et al.* 2000a). Em sementes de *Sesbania virgata* as células endospérmicas são vivas e ocorre a presença de corpos protéicos tanto no citoplasma das células do endosperma como na camada de aleurona, apresentando anatomia intermediária entre as sementes de *Ceratonía siliqua* e de *Trigonella foenum-graecum* (Buckeridge & Dietrich 1996) (Fig. 4E-G).



**Figura 4.** Secções transversais de endospermas contendo galactomananos, obtidas de Buckeridge *et al.* (2000a). **Fig. 4A.** *Schizolobium parahybum*. **Fig. 4B.** *Cyamopsis tetragonolobus* (guar). **Fig. 4C.** *Senna occidentalis*. **Fig. 4D.** *Trigonella foenum graecum* (fenogregó). **Fig. 4E-G.** *Sesbania virgata*. Barra = 300µm. (CA = camada de aleurona, CO = cotilédones, EN = endosperma, H = haustório, GM = galactomanano, CP = corpos protéicos, TEG = tegumento).

Sementes de *Schyzolobium parahybum* (Vell. Conc.) S.F. Blake. apresentam anatomia completamente diferente: em vez da camada de aleurona, estas sementes apresentam células parecidas com longos haustórios, aparentemente imersas no endosperma contendo galactomanano, provavelmente responsáveis pela produção das enzimas hidrolíticas (Buckeridge *et al.* 2000a) (Fig. 4A). Segundo Nadelmann (1890), sementes de *Gymnocladus canadensis* Lam. apresentam as mesmas características anatômicas.

Sementes de *Senna occidentalis* (L.) Link. apresentam grandes espaços no endosperma, provavelmente preenchidos com gases utilizados no desenvolvimento inicial do embrião em solos inundados, sendo uma adaptação importante para espécies de florestas tropicais (Buckeridge *et al.* 2000a) (Fig. 4C).

## **1.6. A ESPÉCIE *Sesbania virgata***

Dentre as espécies cujas sementes acumulam galactomananos, encontra-se *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., pertencente a família Leguminosae (=Fabaceae), sub-família Faboideae (=Papilionoideae), tribo Robinieae (Lavin 1987, Judd *et al.* 1999, Kissmann & Groth 1999). Entre as plantas fanerógamas, Leguminosae consiste na terceira maior família, depois da Asteraceae (Compositae) e Orchidaceae, com cerca de 670 gêneros e 17.500 espécies (Kissmann & Groth 1999).

### **1.6.1. Sinônimos e nomes vulgares**

A espécie tem como sinônimos *Aeschynomene virgata* Cav., *Coronilla virgata* (Cav.) Willd. e *Sesbania marginata* Benth. (Kissmann & Groth 1999), sendo *Sesbania virgata* o nome taxonomicamente correto, segundo a Lei de Prioridade do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Greuter *et al.* 2003). O nome “virgata”, um adjetivo latino que quer dizer “cheio de varas”, deve-se ao caule cilíndrico e ramificado da planta (Kissmann & Groth 1999).

No entanto, muitos trabalhos que se referem à degradação do galactomanano têm utilizado o nome de *Sesbania marginata* para a espécie estudada (Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge *et al.* 2000a).

Popularmente a espécie tem sido chamada de “angiquinho-grande” ou “angiquinho-gigante”, ou mesmo “feijão-do-mato” no interior do Paraná (Kissmann & Groth 1999, Lisboa 2003).

### **1.6.2. Origem e distribuição**

A Planta é nativa do Paraguai, Uruguai, norte e nordeste da Argentina e do sul do Brasil, onde ainda se encontra presente. Ocorre em locais muito úmidos ou alagados, principalmente em solos modificados e, apesar de sua presença não ter sido muito intensa, desequilíbrios no manejo das áreas podem determinar um aumento no seu número de espécimes (Kissmann & Groth 1999).

### **1.6.3. Características gerais**

Planta infestante, perene, reproduzida por semente, com hábito arbustivo, podendo atingir de 2 a 4 m de altura (Fig. 5A). Pode apresentar o florescimento e frutificação já com 40cm de altura, com diversos surtos de florescimento por ano (Fig. 5B e 5C). Suas flores são pequenas e amarelas (Fig. 5D). Os frutos consistem em legumes indeiscentes, corticosos, subarticulados, com pseudo-septos, e contém de 4-8 sementes reniformes, lateralmente um pouco comprimidas, com tegumento relativamente espesso e embrião axial curvo (Fig. 5E). A unidade de dispersão são os frutos indeiscentes, que flutuam na água (Kissmann & Groth 1999).



**Figura 5.** Espécime de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Fig. 5A.** Vista geral de um arbusto da espécie. **Fig. 5B.** Ramo com flor. **Fig. 5C.** Ramo com frutos maduros. **Fig. 5D.** Detalhe da flor. **Fig. 5E.** Detalhe do fruto maduro com as sementes.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos investigar o papel do tegumento e do ABA durante a germinação e pós-germinação das sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a fim de compreender o mecanismo de controle da degradação do galactomanano. Para tanto buscou:

- Descrever as alterações celulares e bioquímicas envolvidas na degradação do galactomanano durante a germinação e pós-germinação, inclusive aquelas relacionadas à síntese e mobilização da enzima endo- $\beta$ -mananase;
- Relacionar os mecanismos de regulação dessa mobilização ao ABA, identificando seus efeitos sobre o processo de germinação e pós-germinação;
- Detectar a presença do ABA endógeno nos diferentes tecidos da semente ao longo do período de germinação e pós-germinação;
- Investigar o papel do tegumento na degradação do galactomanano, bem como sua relação com a liberação de ABA endógeno na germinação e pós-germinação.

### 3. MATERIAL

Foram utilizadas para o presente trabalho sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. obtidas de frutos colhidos de diversas plantas localizadas na região urbana de São Bernardo do Campo, São Paulo (Fig. 6).



**Figura 6.** Espécime de *S. virgata* na região urbana de São Bernardo do Campo.

Os frutos maduros foram colhidos aproximadamente a partir de 75 dias após a antese, baseando-se na coloração. Os frutos colhidos apresentavam coloração escura, com 3 - 7,5 cm de comprimento por 0,7 - 1 cm de largura, e as sementes apresentavam coloração castanha, com 5 - 7,5 mm de comprimento por cerca de 4 mm de largura e 2,6 - 3mm de espessura, com aproximadamente 7,5% de teor de água e 0,07 g de matéria seca.

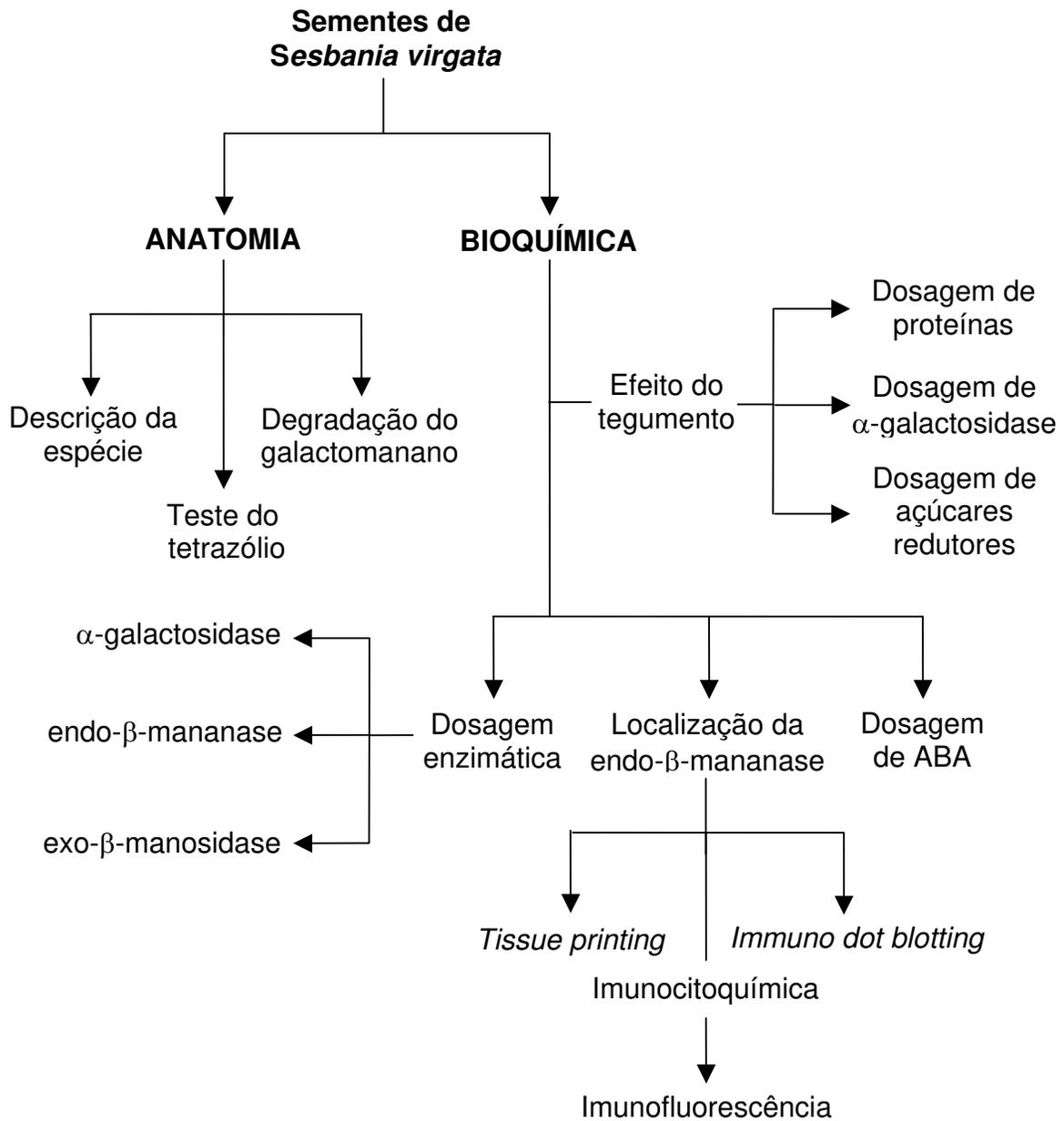
As sementes de *S. virgata* possuem alta longevidade, sendo obtidas altas percentagens de germinação (80%) até 5 anos após a coleta, se as sementes forem armazenadas em sacos de papel a temperatura ambiente.

#### 4. MÉTODOS

As sementes quiescentes foram escarificadas e incubadas sobre papel de filtro em placas de Petri contendo 0,5 ml de solução/semente. Como a quantidade de sementes por placa variou de acordo com o método utilizado, as placas de Petri (5 cm de diâmetro) com 5 sementes foram umedecidas na proporção de 1:12,5 (g de papel : g de solução), enquanto as placas de Petri (9 cm de diâmetro) com 10 e 30 sementes foram umedecidas na proporção de 1:10 e 1:30 respectivamente (g de papel : g de solução). Em parte das placas colocou-se apenas água e na outra solução de ABA  $10^{-4}$  M.

Apesar das sementes de *Sesbania virgata* apresentarem faixa ótima de germinação entre 31 e 34,6°C (Zayat 1996), as sementes foram incubadas em condições de 12h de luz e temperatura de 25°C. Pois, em temperaturas infra-ótimas o processo de germinação e degradação dos galactomananos ocorre de forma mais lenta e todo o processo pode ser verificado com maiores detalhes.

A cada 24 horas de incubação durante seis dias de embebição, período que abrange as fases de germinação e degradação total de galactomananos (Buckeridge & Dietrich 1996, Potomati & Buckeridge 2002), as sementes foram coletadas e submetidas a diferentes análises anatômicas e bioquímicas (Fig. 7). As sementes coletadas que não haviam germinado ou apresentavam desenvolvimento pós-germinativo diferente das demais foram descartadas.



**Figura 7.** Fluxograma dos métodos utilizados para as análises histológicas e bioquímicas.

## **4.1. ANATOMIA**

### **4.1.1. Análise histológica**

Sementes embebidas em água e ABA foram coletadas do segundo ao sexto dia após a embebição (10 sementes/placa) e fixadas em solução de FGAA (formaldeído, glutaraldeído, ácido acético, álcool etílico), segundo Lersten & Curtis (1988). Os materiais fixados foram submetidos a vácuo por aproximadamente 30 minutos permanecendo, posteriormente, por no mínimo 48 horas na geladeira (4°C). Após esse prazo, os materiais foram hidratados a partir de etanol 70%, segundo a série alcoólica etílica decrescente, permanecendo ao final 24 horas em água destilada. Em seguida foram mantidas em estufa a 60°C em Polietilenoglicol 20% (PEG 20%), cuja concentração, após cerca de 48 horas de estufa, atingia o nível de 100%, sendo o material submetido ao emblocamento em PEG puro (Freund 1970, Richter 1981).

As sementes emblocadas foram seccionadas transversalmente em micrótomo de deslize, com espessura de aproximadamente 15 µm, sendo parte das secções obtidas com auxílio de fita adesiva transparente do tipo durex (Richter 1981). Após a retirada do PEG com água destilada, as secções foram submetidas à coloração, com vermelho congo 1% aquoso (Dop & Gautié 1928).

As secções sem fita adesiva foram montadas em água destilada entre lâmina e lamínula vedadas com esmalte. Algumas das secções em fita adesiva foram colocadas entre lâmina e lamínula em resina Permouth, sem a retirada da fita adesiva. Outras foram colocadas em lâminas com Adesivo de Haupt, prensadas com a ajuda de duas lâminas de madeira em uma morça durante 72 horas, posteriormente colocadas em xilol para a retirada da fita e, finalmente, montadas em Permouth (Haupt 1930). As secções foram observadas em microscópio de luz (Jena-Zeiss e Olympus BX50), com luz normal e polarizada, e fotografadas.

#### **4.1.2. Teste do tetrazólio**

Sementes embebidas em água foram coletadas no segundo dia após a embebição e utilizadas para o teste do tetrazólio. As sementes embebidas foram seccionadas transversalmente e as secções submetidas à incubação com cloreto de 2, 3, 5 trifenil - tetrazólio a 30°C, no escuro por 36 horas (Buckeridge 1988). As secções foram observadas em microscópio de luz (Jena-Zeiss) e fotografadas.

### **4.2. BIOQUÍMICA**

#### **4.2.1. Atividade das enzimas hidrolíticas do galactomanano**

Sementes embebidas em água foram coletadas do segundo ao sexto dia após a embebição (5 sementes/placa) e dissecadas, separando-se o endotegumento e o endosperma. Os tecidos foram homogeneizados em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, com adição de NaCl 100 mM, e deixados em repouso por 15 minutos em câmara fria (5°C). Após o repouso, os extratos foram centrifugados a 5°C em 10.000 g e os sobrenadantes submetidos à dosagem de atividade enzimática.

Para a atividade de  $\alpha$ -galactosidase e  $\text{exo-}\beta$ -manosidase, os sobrenadantes foram ensaiados utilizando-se o substrato sintético específico p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo e p-nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosídeo respectivamente (Reid & Meier 1973, Buckeridge & Dietrich 1996). Para as referidas dosagens utilizou-se 5  $\mu$ l de amostra acrescida de 10  $\mu$ l de solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 10  $\mu$ l do substrato específico, incubando-se por 20 minutos em banho-maria a 45°C. As atividades enzimáticas foram interrompidas com 1 ml de solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 N e as leituras das absorbâncias feitas em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 405 nm.

Para análise da atividade da endo- $\beta$ -mananase, os sobrenadantes foram ensaiados utilizando-se o galactomanano a 1% em água destilada como substrato específico. Utilizou-se para a dosagem 50  $\mu$ l de amostra acrescida de 50  $\mu$ l de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 com 750 mM de galactose e 500  $\mu$ l de substrato específico, incubando-se por 20 minutos em banho-maria a 45°C.

A atividade enzimática foi detectada através da estimativa da viscosidade da mistura de incubação, ou seja, pelo tempo de escoamento medido em intervalos de 5 minutos, em um total de 30 minutos, utilizando uma pipeta graduada de 0,2 ml. A viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) de cada tempo foi calculada pela fórmula:  $\eta_{sp} = (t-t_0/t_0)$ ; onde  $t_0$  foi o tempo de escoamento do extrato enzimático mais o tampão, sem o galactomanano. A função logarítmica de  $\eta_{sp}$  foi traçada contra o tempo decorrido, fornecendo uma linha reta que permitiu o cálculo do número de unidades arbitrárias da atividade da endo- $\beta$ -mananase como 10 vezes o número de minutos recíprocos requeridos para  $\eta_{sp}$  dividido pela metade do seu valor inicial (Reid *et al.* 1977, Buckeridge & Dietrich 1996).

## **4.2.2. Localização da endo- $\beta$ -mananase**

### **4.2.2.1. *Tissue Print***

Sementes embebidas em água e ABA foram coletadas do segundo ao quinto dia após a embebição (5 sementes/placa) e cortadas transversalmente na região mediana, com o auxílio de lâmina de barbear. Esses cortes foram, então, pressionados por aproximadamente 15 segundos sobre uma membrana de nitrocelulose carregada positivamente, a fim de imobilizar as proteínas da semente na membrana (Nonogaki *et al.* 2000, Hara *et al.* 2001). Após a remoção do tecido, a membrana “carimbada” passou por todo o processo de imunolocalização descrito a seguir, adaptado de Buckeridge & Reid (1994).

As membranas foram incubadas por 3 horas em solução de bloqueio contendo 0,1% de gelatina, 1% de BSA em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,0, contendo algumas gotas de Tween 20. Posteriormente, foram incubadas durante uma noite em solução contendo anti-endo- $\beta$ -mananase diluído 1:200 em PBS, anticorpo que foi preparado em coelhos contra endo- $\beta$ -mananase de sementes de café, gentilmente cedido pelo Dr. Jarbas Giorgini do Departamento de Biologia da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto).

Depois da incubação com o anticorpo, as membranas foram lavadas com Tris-HCl 50 mM pH 7,4 quatro vezes, por dez minutos cada e, então, incubadas uma hora em solução contendo anti-imunoglobulina de coelho retirado de cabra, conjugado com peroxidase, diluído 1:200 em PBS. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas com Tris-HCl 50 mM pH 7,4 quatro vezes, durante dez minutos cada.

Após a lavagem, as membranas foram mantidas em agitação constante e a elas foi adicionado diaminobenzidina - DAB (0,05 g em 100 ml Tris-HCl 50 mM pH 7,4) seguido pelo peróxido de hidrogênio 0,03%. A reação foi interrompida com lavagem das membranas com água, podendo ser, então, visualizada a reação, caracterizada por granulação de cor acastanhada no tecido, que indica a presença da enzima endo- $\beta$ -mananase. As membranas foram analisadas em estereomicroscópio (Olympus SZ40) e fotografadas.

#### **4.2.2.2. *Immuno dot blotting***

Sementes embebidas em água foram coletadas do primeiro ao sexto dia após a embebição (30 sementes/placa) e dissecadas, separando-se o tegumento, endosperma, cotilédone e a radícula. Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8, filtrados em nylon e centrifugados a 5°C em 13.000 g por 10 minutos, sendo os sobrenadantes submetidos à dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976).

Para a referida dosagem utilizou-se 80 µl de extrato enzimático, 40 µl de reagente (Bio Rad) e 150 µl de água destilada. As leituras das absorbâncias foram feitas em Elisa (3550-UV) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm. A partir da dosagem de proteínas, foi retirado de cada extrato um volume correspondente a 100 µg de proteínas, que foram liofilizados e resuspendidos em 200 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7,8.

Esses extratos foram, então, aplicados a uma membrana de nitrocelulose carregada positivamente, em um volume correspondente à massa de 2 µg de proteínas (sendo para endosperma a concentração reduzida pela metade para facilitar a comparação, já que a atividade neste tecido é maior). A membrana foi incubada por 1 hora em solução de ferrocianeto de potássio 100 mM, para inibir a atividade da peroxidase da semente, e, então, passou por todo o processo de imunolocalização descrito anteriormente para *tissue printing* (item 4.2.2.1), adaptado de Buckeridge & Reid (1994). A reação, caracterizada por coloração acastanhada, indica a presença da enzima endo- $\beta$ -mananase no extrato.

#### **4.2.2.3. Imunofluorescência**

Sementes embebidas em água foram coletadas no terceiro dia após a embebição (10 sementes) e fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído e glutaraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio), segundo Karnovsky (1965). Os materiais fixados foram submetidos a vácuo por aproximadamente 30 minutos permanecendo, posteriormente, por no mínimo 48 horas na geladeira (4°C). Após esse prazo, os materiais foram hidratados a partir de etanol 70%, segundo a série alcoólica etílica decrescente, permanecendo ao final 24 horas em água destilada. Em seguida foram mantidas em estufa a 60°C em Polietilenoglicol 20% (PEG 20%), cuja concentração, após cerca de 48 horas de estufa, atingia o nível de 100%, sendo o material submetido ao emblocamento em PEG puro (Freund 1970, Richter 1981).

As sementes emblocadas foram seccionadas transversalmente em micrótomo de deslize, com espessura de aproximadamente 15 µm e 25 µm, sendo parte das secções obtidas com auxílio de fita adesiva transparente do tipo durex (Richter 1981). Após a retirada do PEG com água destilada, as secções foram submetidas à técnica de imunofluorescência, adaptada de Buckeridge & Reid (1994), Orfila & Knox (2000) e Willats *et al.* (2001). Esta técnica foi similar ao processo de imunolocalização descrito anteriormente para *tissue printing* (item 4.2.2.1), porém as secções foram incubadas em solução contendo anti-imunoglobulina conjugado com fluoresceína, diluído 1:320 em PBS, e não houve adição de diaminobenzidina seguido pelo peróxido de hidrogênio 0,03% no final do processo. A reação, caracterizada por fluorescência verde no tecido, indica a presença da enzima endo-β-mananase.

Como controle, algumas secções passaram pelo processo de bloqueio, porém foram incubadas somente em anti-imunoglobulina, para detecção de possíveis ligações não específicas do segundo anticorpo. Outras secções foram submetidas à mesma técnica, porém sem nenhum anticorpo, substituindo-se a incubação do mesmo por incubação em solução de bloqueio, visando detectar possível autofluorescência no material.

As secções foram analisadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axioplan 2 - MC80DX), através de luz normal e do filtro 9 (azul), e fotografadas.

#### **4.2.3. Dosagem de ABA endógeno**

Sementes embebidas em água foram coletadas no primeiro e terceiro dias após a embebição (30 sementes/placa) e dissecadas, separando-se o tegumento, endosperma e embrião (cotilédone + radícula). Os tecidos separados foram submetidos à técnica de determinação da concentração de ABA endógeno pelo teste de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), adaptado de Peres (1998) e Santos *et al.* (2004).

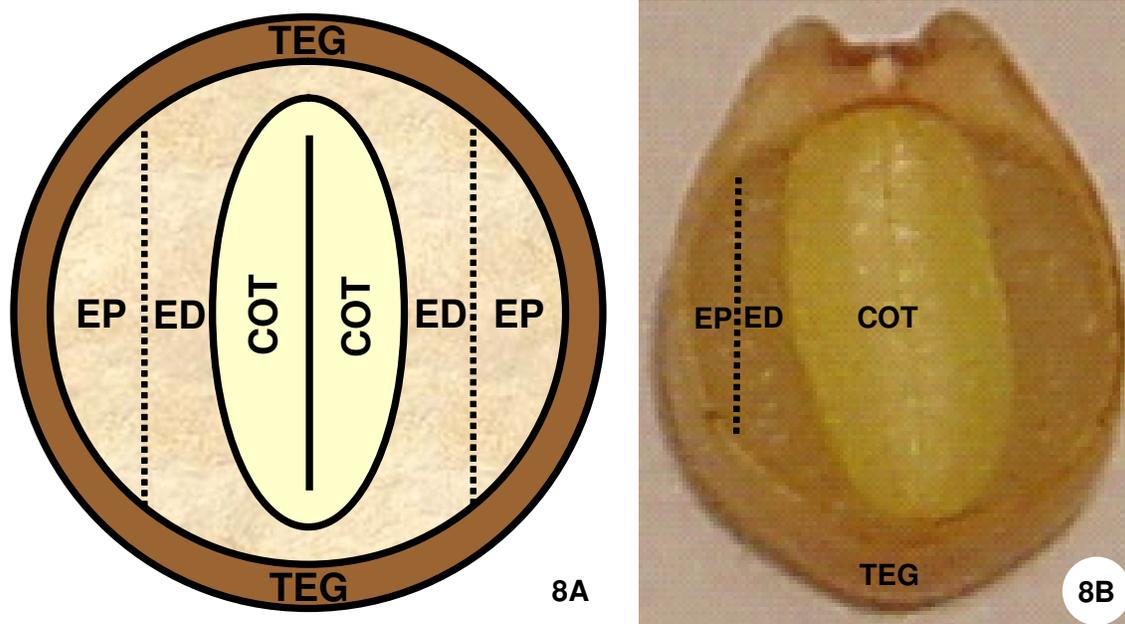
As amostras, com no mínimo 1g, foram individualmente pulverizadas usando nitrogênio líquido e submetidas à extração com álcool, com adição de 3 ml de metanol por amostra e agitação por 60 horas no escuro a 4°C. Nessa etapa da extração foram adicionados, para cada amostra, 100 µl de ABA radiativo, como um padrão interno utilizado para determinar rentabilidade da extração e da purificação do ABA. Os extratos foram filtrados em nitrocelulose, seguidos por filtração em coluna Sep-Pak C-18, previamente ativada com 80% de metanol. Os extratos filtrados foram secos, suspensos em água “Milli-Q” contendo 0,2 ml.L<sup>-1</sup> de ácido fórmico pH 3,0 e submetidos à purificação do ABA pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) numa coluna C-18 usando um gradiente de eluição com água “Milli-Q” contendo 0,2 ml.l<sup>-1</sup> de ácido fórmico pH 3,0 e metanol por 45 minutos. As frações radioativas correspondentes ao ABA foram reunidas, secas, metiladas com diazometano, resuspendidas em água “Milli-Q” contendo 0,2 g.l<sup>-1</sup> de azida (NaN<sub>3</sub>) e distribuídas numa microplaca de espectrofotômetro ELISA pré-condicionada com o anticorpo específico para ABA, gentilmente cedido pela Dra. Helenice Mercier do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo. A concentração de ABA endógeno foi calculada usando a curva padrão do ABA e sua densidade óptica relativa.

#### **4.2.4. Dosagem de proteínas, α-galactosidase e açúcares redutores**

Sementes embebidas em água, com e sem o tegumento, foram coletadas do primeiro ao quarto dia após a embebição (5 sementes/placa, com três repetições por tratamento). Como a retirada do tegumento para o tratamento das sementes embebidas sem o tecido só pode ser possível após algumas horas de embebição, a coleta das sementes embebidas sem tegumento ocorreu somente a partir do segundo dia.

As sementes coletadas foram dissecadas, separando-se o endosperma proximal (próximo ao tegumento), o endosperma distal (próximo ao cotilédone) e o tegumento das sementes embebidas com o tecido durante o experimento (Fig. 8).

Por esse motivo, as sementes foram coletadas somente até o quarto dia após a embebição, já que a degradação intensa do endosperma a partir deste período tornou impossível a dissecação deste tecido em proximal e distal.



**Figura 8.** Semente de *Sesbania virgata* demonstrando a dissecação do endosperma em proximal e distal. **Fig. 8A.** Modelo esquemático de um corte transversal da semente. **Fig. 8B.** Secção transversal da semente. (TEG = tegumento, EP = endosperma proximal, ED = endosperma distal, COT = cotilédone).

Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,8 e deixados em repouso por 30 minutos em câmara fria (5°C). Após o repouso, os extratos foram filtrados, centrifugados a 13.000 g por 5 minutos e os sobrenadantes submetidos à dosagem de proteínas,  $\alpha$ -galactosidase e açúcares redutores.

Para a dosagem de proteína, utilizou-se 100 µl de amostra, 200 µl de reagente (Bio Rad) e 700 µl de água destilada. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm (Bradford 1976).

Para a análise da atividade de  $\alpha$ -galactosidase, os sobrenadantes foram ensaiados utilizando-se o substrato sintético específico p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (Reid & Meier 1973, Buckeridge & Dietrich 1996). Para a referida dosagem utilizou-se 10 µl de amostra acrescida de 10 µl de solução tampão acetato de sódio 1 M pH 5,0 e 10 µl do substrato específico, incubando-se por 20 minutos em banho-maria a 45°C. A atividade enzimática foi interrompida com 1 ml de solução Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 N e as leituras das absorbâncias feitas em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 405 nm.

Para quantificação de açúcares redutores, utilizou-se 70 µl ou 200 µl de amostra, dependendo do extrato, completando o volume com água para 500 µl e adicionando 500 µl de solução Somogyi, incubando-se por 15 minutos em banho-maria a 100°C. Após fervura, foi acrescentado 500 µl de reagente Nelson e 1 ml de água e as leituras das absorbâncias feitas em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 520 nm. A quantificação de açúcares redutores foi determinada pela quantidade de glucose liberada (Somogyi 1945).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANATOMIA

#### 5.1.1. Descrição anatômica da espécie

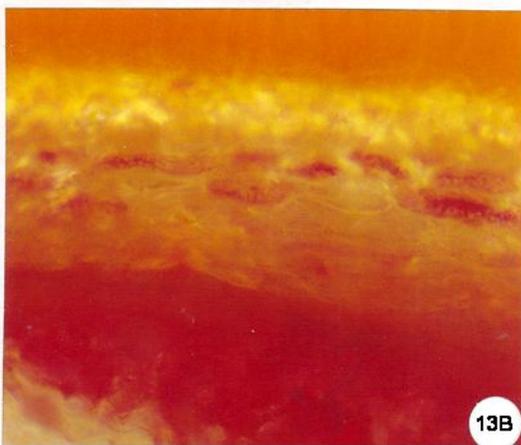
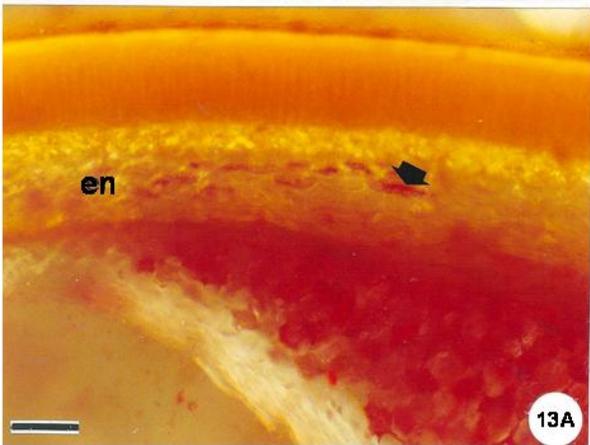
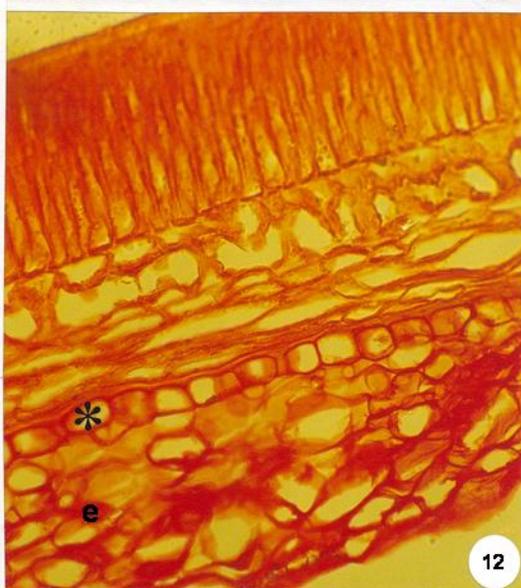
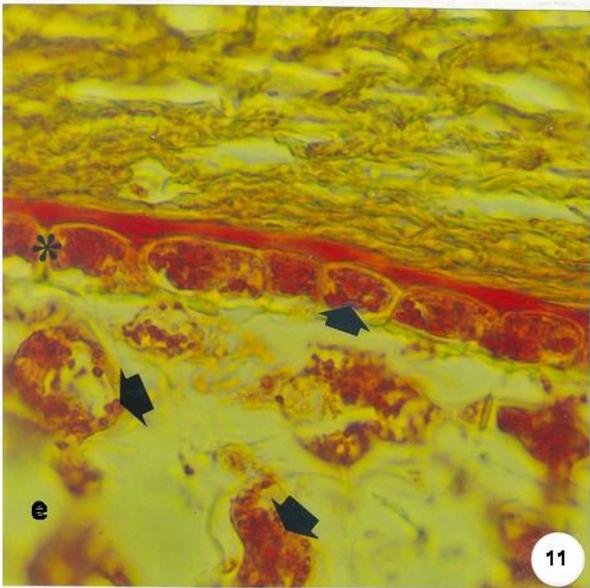
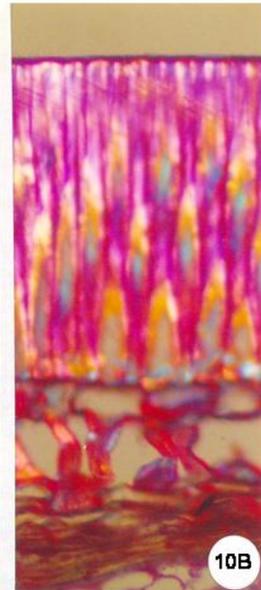
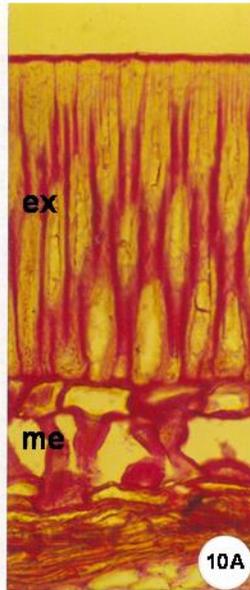
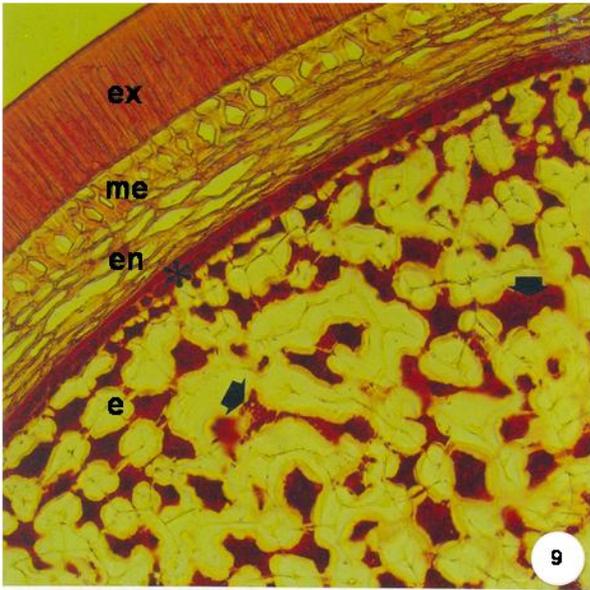
Sementes de *Sesbania virgata* apresentam o tegumento dividido em três diferentes estratos: **exotegumento**, que apresenta uma camada paliçádica formada por macroesclereídes alongados; **mesotegumento**, que apresenta uma camada de células colunares com as extremidades distais dilatadas e constrição mediana, denominadas osteoesclereídes; **endotegumento**, que apresenta um número variável de camadas de células parenquimáticas, alongadas periclinamente à superfície (Fig. 9 e 10).

Internamente ao tegumento encontra-se a camada mais externa do endosperma, a camada de aleurona, com células isodiamétricas (Fig. 9, 11 e 12). Os demais estratos celulares do endosperma apresentam células com paredes espessas devido ao acúmulo de galactomanano (Fig. 9 e 11). Corpos protéicos podem estar presentes na camada de aleurona e nas demais células do endosperma, conferindo ao citoplasma um aspecto denso, dependendo da fase em que a semente se encontra durante o processo de germinação e pós-germinação (Fig. 9, 11 e 12). O embrião encontra-se internamente ao endosperma (dado não apresentado).

#### 5.1.2. Teste do tetrazólio no tegumento

Através do resultado do teste do tetrazólio detectou-se a presença de células vivas no endotegumento das sementes da espécie em estudo (Fig. 13). A coloração vermelha indica a presença de desidrogenase da cadeia respiratória e, portanto, que o tecido correspondente está vivo (Delouche *et al.* 1962).

**Figura 9 a 13.** Fotomicrografias de secções transversais de sementes de *Sesbania virgata* coradas com Vermelho Congo. **Fig. 9.** Tegumento, apresentando o exotegumento (ex), o mesotegumento (me) e o endotegumento (en), camada de aleurona (\*) e demais estratos celulares do endosperma (e), apresentando corpos protéicos (➡) e paredes espessas. **Fig. 10.** Detalhe do tegumento, destacando os macroesclereídes no exotegumento (ex) e os osteoesclereídes no mesotegumento (me), em luz normal (Fig. 10A) e luz polarizada (Fig. 10B). **Fig. 11 e 12.** Detalhe da camada de aleurona (\*) e do endosperma (e) em diferentes fases da pós-germinação, com presença (Fig. 11) ou ausência (Fig. 12) de corpos protéicos (➡). **Fig. 13.** Detalhe do tegumento destacando resultado positivo do tetrazólio (➡) em células do endotegumento (en). Barra = 84 µm (Fig. 9). Barra = 34 µm (Fig. 10). Barra = 22 µm (Fig. 11). Barra = 40 µm (Fig. 12). Barra = 86 µm (Fig. 13A). Barra = 42 µm (Fig. 13B).



### 5.1.3. Degradação do galactomanano

Os resultados mostraram que até o terceiro dia após a embebição, em água ou ABA, o endosperma apresentou-se praticamente intacto, com paredes celulares espessas devido à presença do galactomanano e conteúdo citoplasmático corado intensamente devido à presença de corpos protéicos, tanto na camada de aleurona como nos demais estratos de células do endosperma (Fig. 14 a 17).

A partir do terceiro dia a degradação do galactomanano teve início em sementes embebidas em água, sendo intensa no quarto dia após a embebição com presença de espaços intracelulares e desestruturação do endosperma em todas as camadas deste tecido, até mesmo perto da camada de aleurona, onde o conteúdo citoplasmático já se encontra hialino pela ausência de corpos protéicos assim como no endosperma (Fig. 18). Entretanto, sob o efeito do ABA exógeno a degradação da reserva não foi intensa como em água no quarto dia após a embebição, ocorrendo apenas o início da formação de espaços celulares nas camadas do endosperma, podendo-se visualizar, ainda, citoplasma densamente corado devido à presença de corpos protéicos, inclusive na camada de aleurona (Fig. 19).

No quinto dia após a embebição, tanto em água como em ABA, a degradação do galactomanano foi intensa, com ausência de corpos protéicos por todo o tecido, inclusive na camada de aleurona, não ocorrendo mais diferenças estruturais entre as sementes embebidas nesses dois meios (Fig. 20 e 21). Como decorrência desse processo, total degradação das paredes das células do endosperma foi observada no sexto dia, com desestruturação e redução da espessura deste tecido (Fig. 22 e 23).

## 5.2. BIOQUÍMICA

### 5.2.1. Atividade das enzimas hidrolíticas do galactomanano

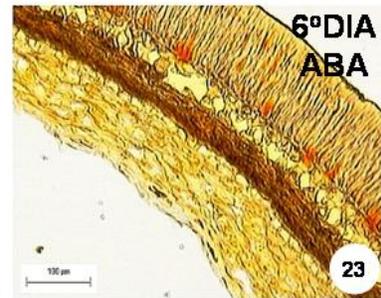
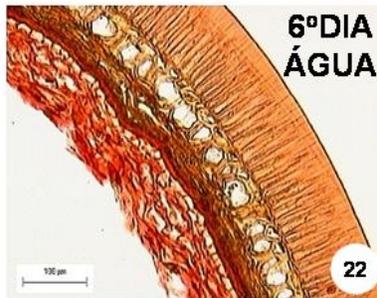
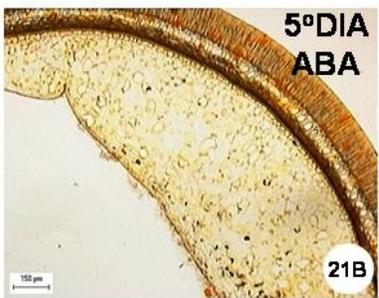
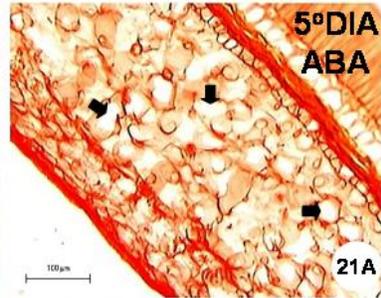
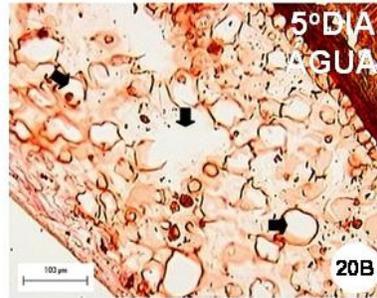
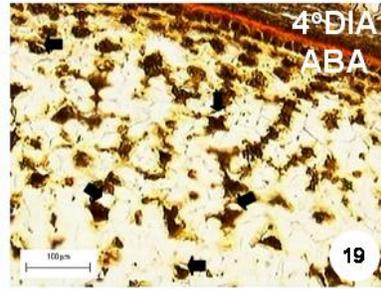
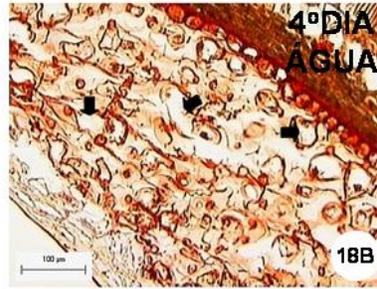
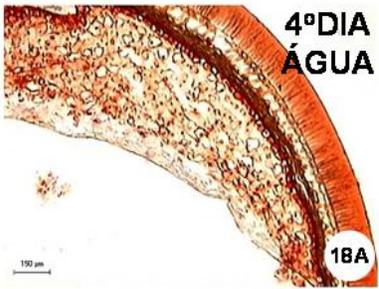
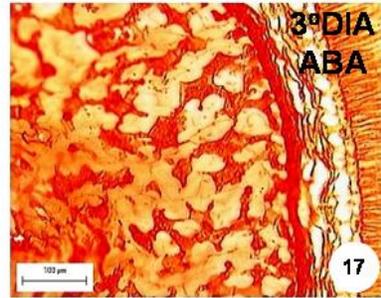
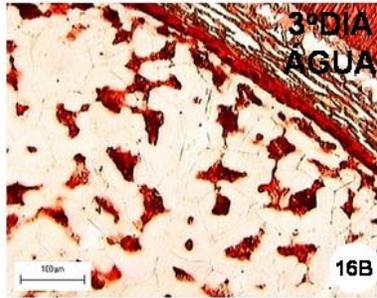
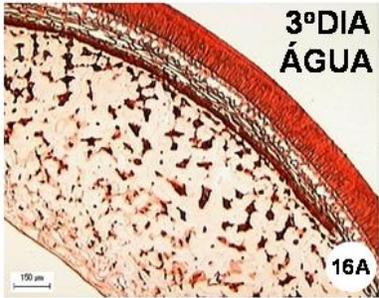
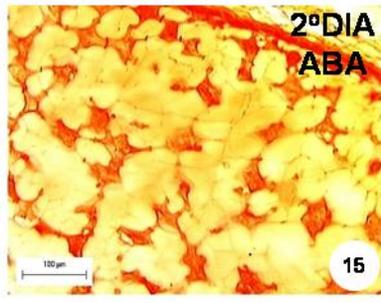
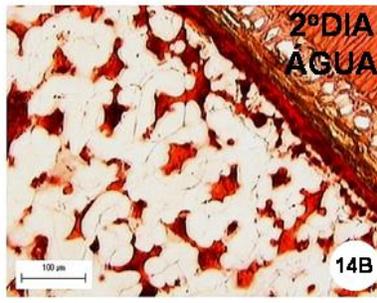
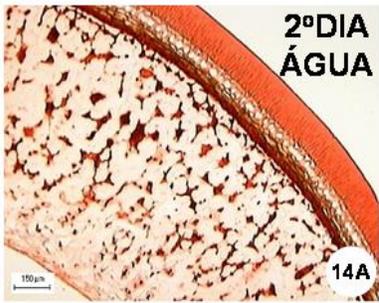
No endotegumento a atividade da  $\alpha$ -galactosidase se apresentou elevada no segundo dia após a embebição, com um pequeno aumento no terceiro dia seguido por diminuição da atividade durante o decorrer dos dias (Fig. 24A).

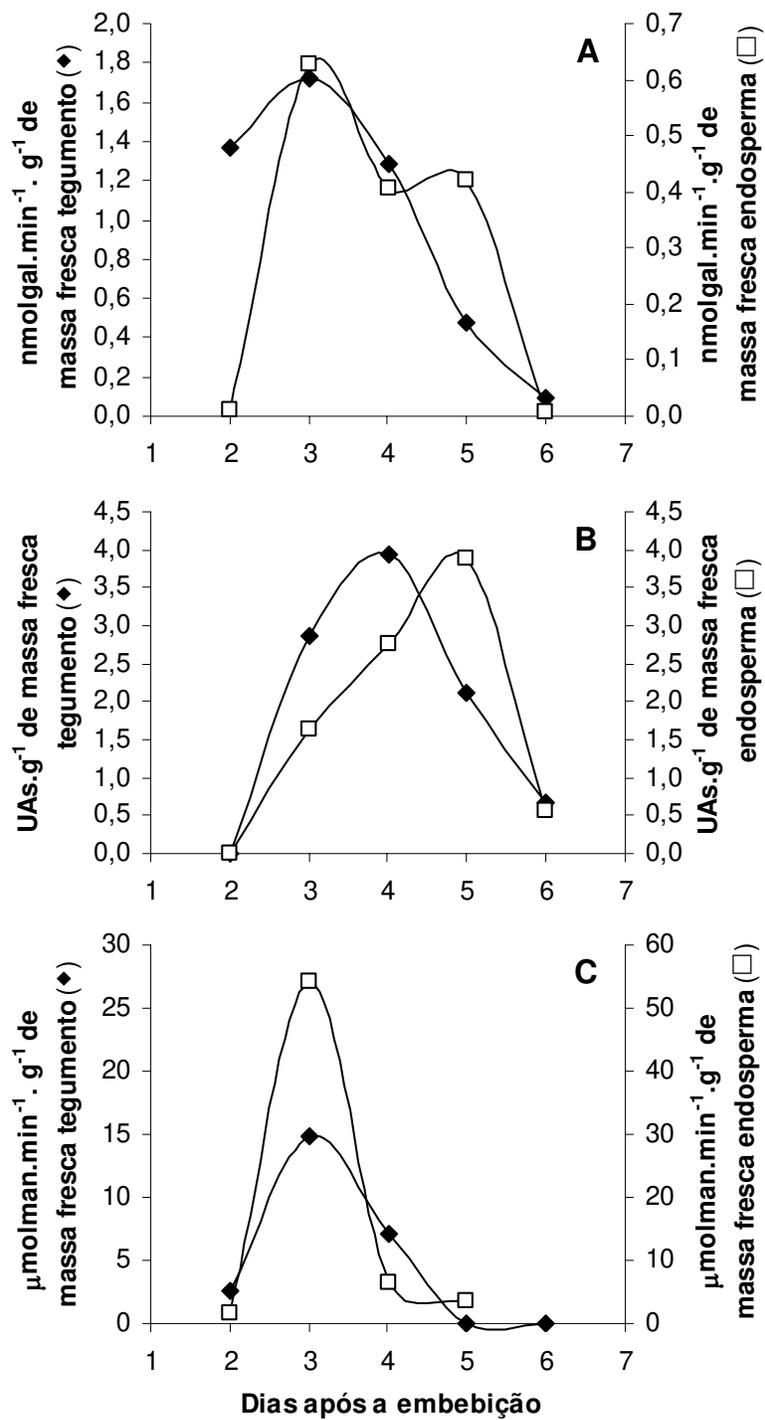
No endosperma a atividade da enzima apresentou-se nula no segundo dia após a embebição, seguida por um pico de atividade no terceiro dia, que decresceu e se manteve constante do quarto ao quinto dias, tornando-se nula novamente no sexto dia após a embebição, como no endotegumento (Fig. 24A). As atividades da  $\alpha$ -galactosidase no endotegumento e no endosperma apresentaram, dessa forma, diferenças significativas principalmente até o quarto dia após a embebição, com taxas maiores de atividade da  $\alpha$ -galactosidase no endotegumento (Fig. 24A).

As curvas de atividade da endo- $\beta$ -mananase no endotegumento e no endosperma, diferentemente da  $\alpha$ -galactosidase, foram similares (Fig. 24B). Em ambos os tecidos a atividade da enzima apresentou-se nula no segundo dia após a embebição, aumentando durante o decorrer dos dias, ocorrendo somente um pequeno atraso na curva de atividade da enzima no endosperma, que apresentou pico de atividade ao redor do quinto dia, enquanto o endotegumento apresentou pico ao redor do quarto dia após a embebição (Fig. 24B).

Devido ao atraso da curva de atividade no endosperma, o endotegumento apresentou maior atividade da endo- $\beta$ -mananase até o quarto dia, enquanto o endosperma apresentou maior atividade que o endotegumento somente no quinto dia após a embebição (Fig. 24B). No sexto dia após a embebição, a atividade da endo- $\beta$ -mananase foi similar em ambos os tecidos, apresentando baixa atividade (Fig. 24B).

**Figura 14 a 23.** Imagens digitalizadas de secções transversais de sementes de *Sesbania virgata* coradas com Vermelho Congo. **Fig. 14 e 15.** Segundo dia após a embebição em água (Fig. 14A e 14B) e em ABA (Fig. 15). **Fig. 16 e 17.** Terceiro dia após a embebição em água (Fig. 16A e 16B) e em ABA (Fig. 17). **Fig. 18 e 19.** Quarto dia após a embebição em água (Fig. 18A e 18B) e em ABA (Fig. 19). **Fig. 20 e 21.** Quinto dia após a embebição em água (Fig. 20A e 20B) e em ABA (Fig. 21A e 21B). **Fig. 22 e 23.** Sexto dia após a embebição em água (Fig. 22) e em ABA (Fig. 23). Barra = 150  $\mu\text{m}$  (Fig. 14A, 16A, 18A, 20A, 21B). Barra = 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 14B, 15, 16B, 17, 18B, 19, 20B, 21A, 22, 23). (➡ = espaços celulares).





**Figura 24.** Atividade da  $\alpha$ -galactosidase **(A)**, endo- $\beta$ -mananase **(B)** e exo- $\beta$ -manosidase **(C)** no endotegetamento (◆) e no endosperma (□) de sementes de *Sesbania virgata*, do segundo ao sexto dia após a embebição em água.

A atividade da exo- $\beta$ -manosidase também foi baixa no segundo dia após a embebição, tanto no endotegumento como no endosperma, apresentando um aumento de atividade em ambos os tecidos até o terceiro dia, com pico de atividade bem maior no endosperma do que no endotegumento (Fig. 24C).

A partir do terceiro dia a atividade da exo- $\beta$ -manosidase diminuiu em ambos os tecidos, porém no endotegumento a atividade tornou-se nula no quinto e sexto dias após a embebição, enquanto no endosperma a baixa atividade da enzima se manteve constante a partir do quarto dia (Fig. 24C). Assim, a atividade da exo- $\beta$ -manosidase apresentou um comportamento similar e paralelo entre o endotegumento e o endosperma, diferentemente da  $\alpha$ -galactosidase e da endo- $\beta$ -mananase, apresentando somente uma atividade maior no endosperma em alguns dias (Fig. 24C).

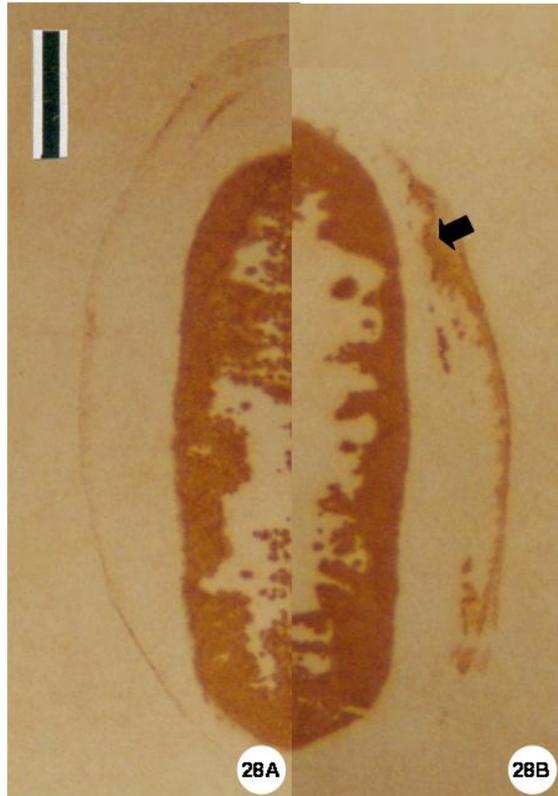
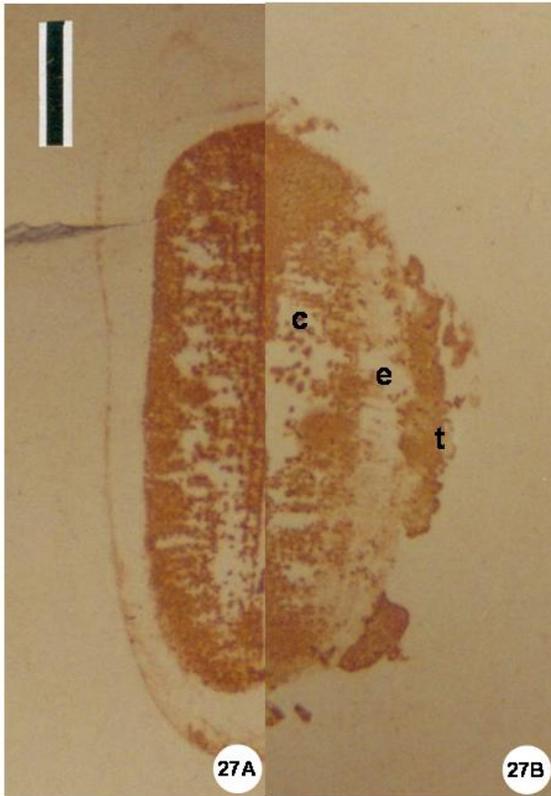
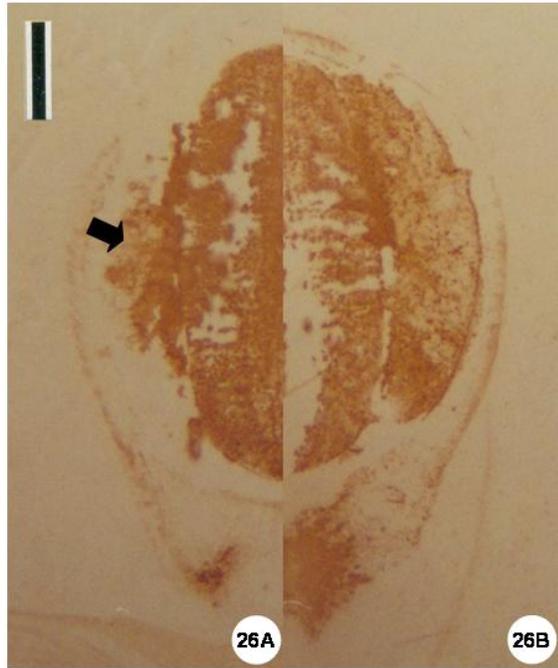
## **5.2.2. Localização da endo- $\beta$ -mananase**

### **5.2.2.1. *Tissue printing***

A enzima pode ser localizada através da reação cruzada entre o anticorpo anti-endo- $\beta$ -mananase de café e a endo- $\beta$ -mananase de *Sesbania virgata*, caracterizada por granulação de cor acastanhada (Fig. 25 a 28).

No segundo dia após a embebição, tanto em água como em ABA, a enzima foi localizada em todos os tecidos da semente, apresentando reação acentuada e distribuída por todo o cotilédone, endosperma e tegumento (Fig. 25). No terceiro dia após a embebição, tanto em água como em ABA, a endo- $\beta$ -mananase ocorreu principalmente nos cotilédones, com pouca localização no tegumento (Fig. 26). Já no endosperma ocorreu diminuição da enzima em sementes embebidas em água, estando presente somente em parte do tecido, enquanto em presença do ABA exógeno esta pode ser localizada praticamente por todo o endosperma (Fig. 26).

**Figura 25 a 28.** *Tissue printing* de cortes transversais de sementes de *Sesbania virgata*, localizando a endo- $\beta$ -mananase. **Fig. 25.** Segundo dia após a embebição em água (Fig. 25A) e em ABA (Fig. 25B). **Fig. 26.** Terceiro dia após a embebição em água (Fig. 26A) e em ABA (Fig. 26B). **Fig. 27.** Quarto dia após a embebição em água (Fig. 27A) e em ABA (Fig. 27B). **Fig. 28.** Quinto dia após a embebição em água (Fig. 28A) e em ABA (Fig. 28B). Barra = 1mm (Fig. 25 a 28). (c = cotilédone, e = endosperma, t = tegumento,  $\blacktriangleright$  = reação que caracteriza a presença da endo- $\beta$ -mananase).



A endo- $\beta$ -mananase continuou presente no quarto dia após a embebição nos cotilédones, tanto em água como em ABA, e ainda em parte do tegumento (Fig. 27). No endosperma a diferença entre sementes embebidas em água e em ABA pode ser observada novamente, já que em água a enzima praticamente desapareceu no tecido, enquanto na presença do ABA a reação se apresentou praticamente como no terceiro dia, podendo ser visualizada a presença da enzima por todo o endosperma (Fig. 27).

No quinto dia após a embebição a endo- $\beta$ -mananase continuou presente nos cotilédones, tanto em água como em ABA, assim como em parte do tegumento, apresentando apenas reação um pouco maior no tegumento em presença do ABA exógeno (Fig. 28). No endosperma não ocorreram mais diferenças significativas entre as sementes embebidas em água e em ABA, ocorrendo diminuição drástica da endo- $\beta$ -mananase no endosperma de sementes embebidas em ABA (Fig. 28).

#### **5.2.2.2. *Immuno dot blotting***

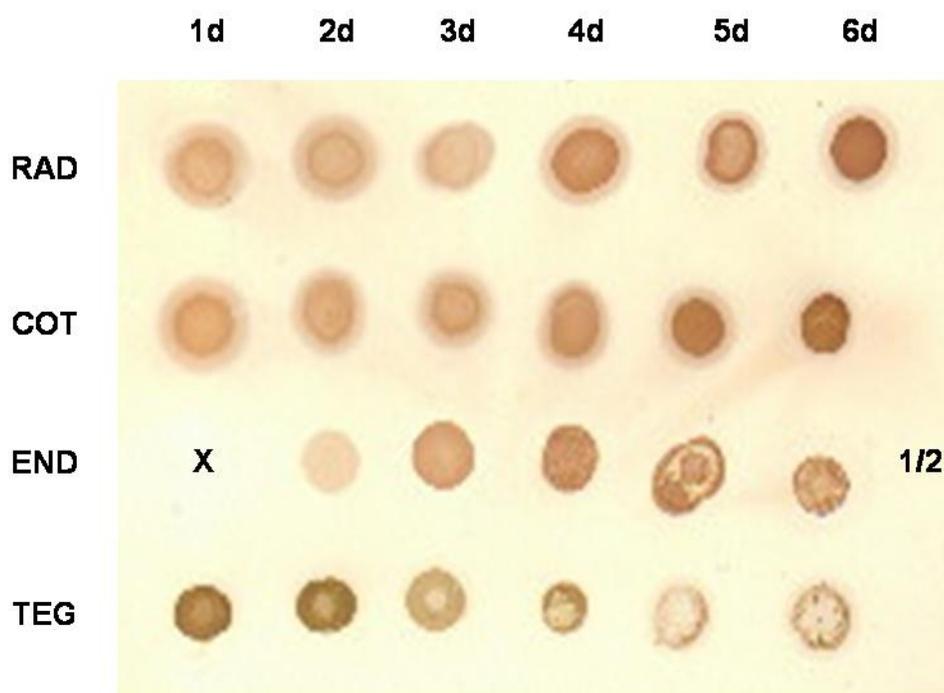
Da mesma maneira como no *tissue printing*, a endo- $\beta$ -mananase foi localizada através da reação cruzada entre o anticorpo anti-endo- $\beta$ -mananase de café e a endo- $\beta$ -mananase de *Sesbania virgata*, caracterizada por coloração acastanhada (Fig. 29).

A endo- $\beta$ -mananase esteve presente na radícula e no cotilédone desde o primeiro dia até o sexto dia após a embebição, apresentando um aumento da enzima a partir do quarto dia, com grande intensidade no sexto dia após a embebição em ambos os tecidos (Fig. 29).

No endosperma não foi possível a detecção da endo- $\beta$ -mananase no primeiro dia após a embebição, já que o extrato do tecido referente a este período não pode ser aplicado na membrana de nitrocelulose devido ao problema de viscosidade causado pela presença do galactomanano no tecido. Dessa forma, a

enzima só pode ser detectada no endosperma a partir do segundo dia após a embebição, embora primeiramente com baixa intensidade (Fig. 29). No terceiro e quarto dias após a embebição a presença da endo- $\beta$ -mananase aumentou, principalmente no quarto dia, mantendo uma intensidade alta no quinto e sexto dias após a embebição (Fig. 29).

No tegumento a presença da endo- $\beta$ -mananase foi maior no primeiro e segundo dias após a embebição, apresentando uma diminuição gradual do terceiro dia até o sexto dia após a embebição, quando praticamente desaparece (Fig. 29).



**Figura 29.** *Immuno dot blotting* da radícula, cotilédone, endosperma e tegumento de sementes de *Sesbania virgata*, localizando a endo- $\beta$ -mananase do primeiro ao sexto dia após a embebição em água. (X = não pode ser aplicado o extrato devido à viscosidade da amostra, 1/2 = concentração reduzida pela metade).

### 5.2.2.3. Imunofluorescência

Assim como no *tissue printing* e *immuno dot blotting*, a endo- $\beta$ -mananase foi localizada através da reação cruzada entre o anticorpo anti-endo- $\beta$ -mananase de café e a endo- $\beta$ -mananase de *Sesbania virgata*, porém caracterizada por fluorescência verde presente no tecido (Fig. 30 a 32).

Para se ter certeza da presença da enzima nos tecidos através da imunofluorescência, foi utilizado um controle sem qualquer tipo de anticorpo para verificar possível autofluorescência nos tecidos. Através desse controle observou-se que todas as camadas celulares do endosperma, inclusive a camada de aleurona, apresentaram autofluorescência nos corpos protéicos presentes no citoplasma das células, o que impossibilitou a localização da enzima neste tecido (Fig. 30).

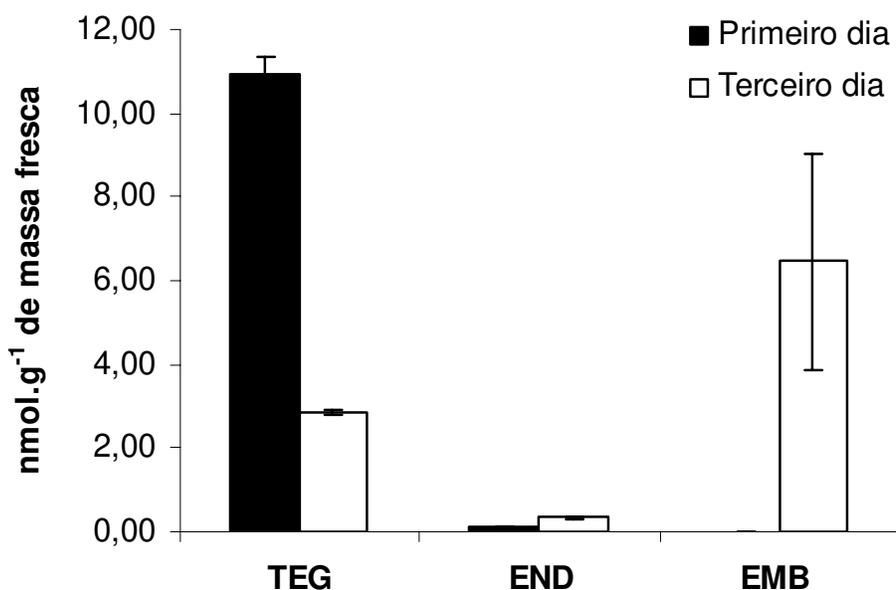
Como o tegumento foi o único tecido que não apresentou essa autofluorescência, a endo- $\beta$ -mananase pode ser localizada no tecido, estando presente praticamente em todos os estratos do tegumento, associada à parede celular dos macroesclereídes do exotegumento, osteoesclereídes do mesotegumento e células parenquimáticas do endotegumento (Fig. 30 a 32).

Entretanto, a localização da enzima foi mais abundante no mesotegumento, estando presente na superfície das paredes celulares da maioria dos osteoesclereídes, voltada para as cavidades presentes no tecido, ocorrendo em grande intensidade próximo ao exotegumento (Fig. 31 e 32).

Além do controle já mencionado a presença da enzima no tegumento pode ser confirmada através de um segundo controle, utilizando-se somente o anticorpo conjugado com a substância fluorescente para verificar possíveis ligações não específicas do anticorpo, que não ocorreram no tecido (dado não apresentado).

### 5.2.3. Dosagem de ABA endógeno

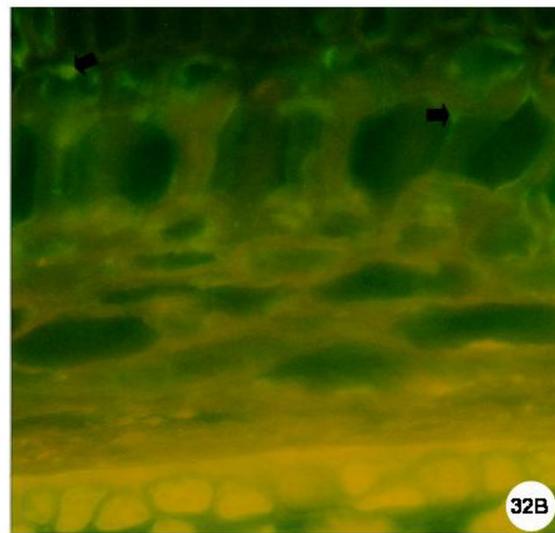
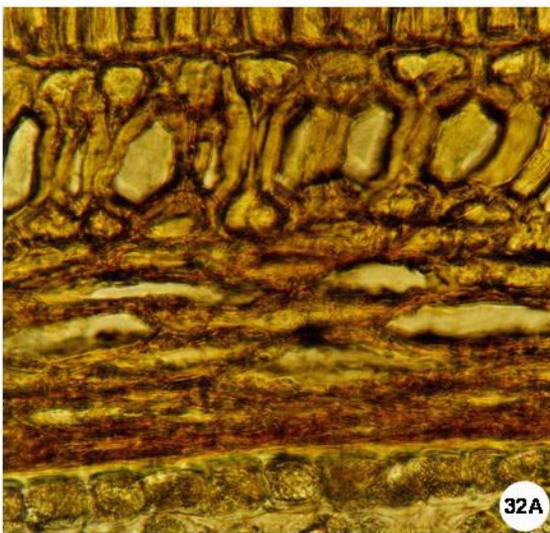
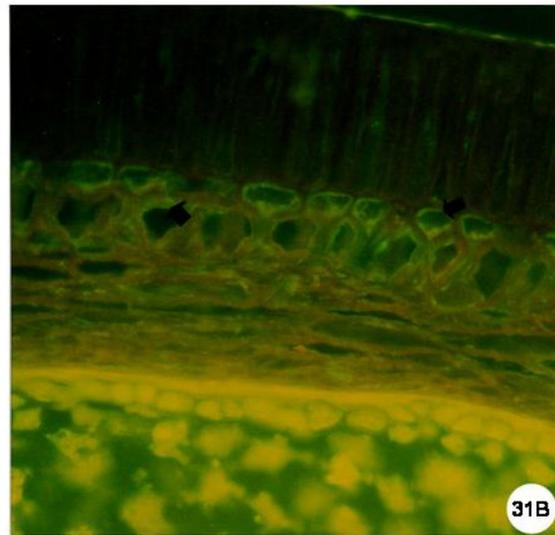
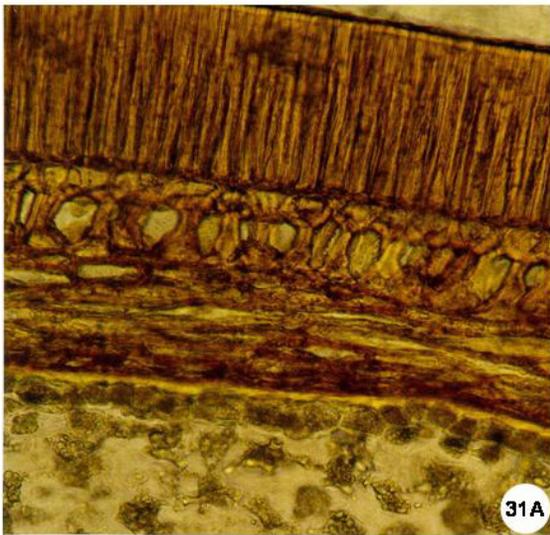
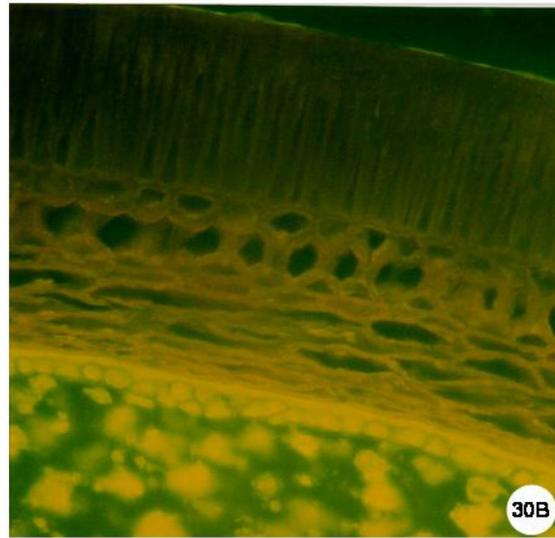
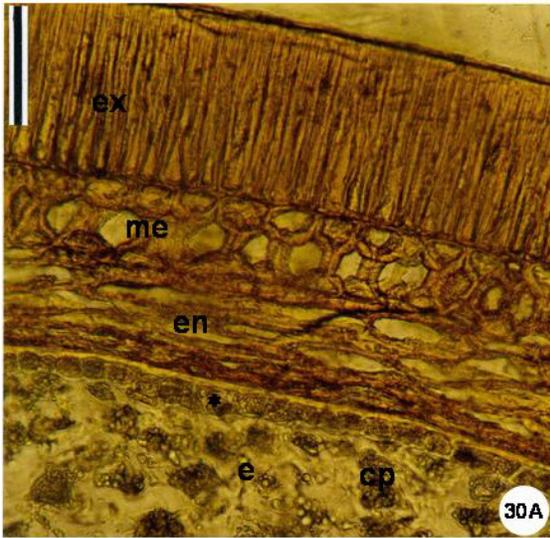
No primeiro dia após a embebição, o tegumento apresentou a maior concentração de ABA endógeno quando comparado com os outros tecidos, em torno de  $10,95 \text{ nmol.g}^{-1}$  de massa fresca, sendo o embrião o tecido com menor concentração do hormônio, em torno de  $0,01 \text{ nmol.g}^{-1}$  de massa fresca (Fig. 33).



**Figura 33.** Dosagem de ABA endógeno ( $\text{nmol.g}^{-1}$  de massa fresca) em diferentes tecidos da semente de *Sesbania virgata* no primeiro e terceiro dia após embebição em água. (TEG = tegumento, END = endosperma, EMB = embrião). As barras representam  $\pm$  erro padrão da média de duas repetições da mesma amostra.

Já no terceiro dia após a embebição, a concentração do hormônio aumentou no embrião, que obteve a maior concentração de ABA endógeno quando comparado com os outros tecidos, em torno de  $6,46 \text{ nmol.g}^{-1}$  de massa fresca, embora aparentemente menor do que a concentração encontrada no tegumento no primeiro dia (Fig. 33).

**Figura 30 a 32.** Imunofluorescência de secções transversais de sementes de *Sesbania virgata*, localizando a endo- $\beta$ -mananase no terceiro dia após a embebição em água. **A.** Luz normal. **B.** Fluorescência. **Fig. 30.** Controle sem nenhum anticorpo. **Fig. 31 e 32.** Tratamento com os dois anticorpos, com detalhe do tegumento (Fig. 32). Barra = 87  $\mu$ m (Fig. 30 e 31). Barra = 43  $\mu$ m (Fig. 32). (cp = corpos protéicos, e = endosperma, en = endotegumento, ex = exotegumento, me = mesotegumento, \* = camada de aleurona,  $\blacktriangleright$  = reação que caracteriza a presença da endo- $\beta$ -mananase).



No tegumento a concentração do hormônio diminuiu, ficando ao redor de  $2,83 \text{ nmol.g}^{-1}$  de massa fresca, enquanto no endosperma ocorreu apenas um pequeno aumento na concentração de ABA, aproximadamente de 0,1 para 0,3  $\text{nmol.g}^{-1}$  de massa fresca, sendo o tecido com menor concentração do hormônio no terceiro dia (Fig. 33).

A diferença de concentração do ABA entre os tecidos foi maior no primeiro dia após a embebição, devido à alta concentração de hormônio presente no tegumento e baixa concentração no embrião (Fig. 33). Já a concentração total de hormônio na semente entre os dias de embebição não apresentou muita diferença, ficando ao redor dos  $10 \text{ nmol.g}^{-1}$  de massa fresca.

#### **5.2.4. Papel do tegumento**

##### **5.2.4.1. Mobilização de proteínas solúveis**

No primeiro e segundo dias após a embebição, tanto o endosperma proximal como o distal de sementes embebidas com o tegumento, apresentaram teores de proteínas similares (Tabela 1). Porém, no terceiro dia após a embebição o endosperma proximal apresentou teores de proteínas mais altos que o endosperma distal, atingindo valores similares a este tecido somente no quarto dia, onde ambos os endospermas sofreram diminuição nos teores protéicos (Tabela 1).

Os teores de proteínas no tegumento das sementes embebidas com este tecido apresentaram-se praticamente constante durante todo o decorrer do processo, com pequeno aumento entre o primeiro e segundo dias após a embebição (Tabela 1).

**Tabela 1.** Dosagem de proteínas (mg de proteína.g<sup>-1</sup> de massa fresca), atividade de  $\alpha$ -galactosidase ( $\mu$ mol de galactose.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de massa fresca) e quantificação de açúcares redutores (mg de equivalente em glucose.g<sup>-1</sup> de massa fresca) em diferentes tecidos da semente de *Sesbania virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água com e sem tegumento. (TEG = tegumento, ENDp = endosperma proximal, ENDd = endosperma distal, — = não determinado).

Dias após a embebição	EMBEBIÇÃO COM TEGUMENTO			EMBEBIÇÃO SEM TEGUMENTO	
	TEG	ENDp	ENDd	ENDp	ENDd
<b>proteínas</b>					
1	1,65aA	2,48aB	2,65aB	—	—
2	1,97aB	3,15bC	3,09bB	3,68bB	3,30bB
3	2,27cB	3,73dC	2,30cB	1,77bA	1,22aA
4	2,35bB	1,13aA	0,91aA	1,31aA	0,77aA
<b><math>\alpha</math>-galactosidase</b>					
1	0,13aB	0,47bA	0,68cA	—	—
2	0,10aA	0,30aA	0,34aA	1,67bA	1,73bA
3	0,21aC	5,50cB	5,24bB	6,82dB	7,71dB
4	0,26aC	10,81cC	7,18bB	16,59dC	11,91cC
<b>açúcares redutores</b>					
1	0,32bA	0,03aA	0,05aA	—	—
2	0,24bA	0,03aA	0,02aA	0,11aA	0,11aA
3	0,29aA	0,55bB	0,48bB	1,93cB	2,10cB
4	0,29aA	0,66bB	0,75bC	2,36cC	2,17cB

Os valores representam a média de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de LSD a 0,5%.

Nas sementes embebidas sem o tegumento o endosperma proximal e o distal apresentaram variação similar do teor de proteínas no decorrer dos dias, apresentando diminuição significativa dos teores protéicos já no terceiro dia após a embebição (Tabela 1). Assim como nas sementes embebidas com tegumento, o endosperma proximal apresentou um valor mais alto de proteínas do que o distal somente no terceiro dia após a embebição, porém com teores protéicos bem menores, apresentando aproximadamente metade da quantidade de proteínas verificada nos endospermas das sementes embebidas com tegumento (Tabela 1).

Dessa forma, sementes embebidas com tegumento e sem tegumento não apresentaram uma variação no teor de proteínas muito diferente entre o endosperma proximal e o distal, exceto no terceiro dia após a embebição, quando o endosperma distal apresentou quantidades menores de proteínas do que o endosperma proximal, principalmente nas sementes embebidas com tegumento (Tabela 1). Ainda no terceiro dia, as sementes embebidas sem tegumento apresentaram teores protéicos bem menores do que os do endosperma de sementes embebidas com tegumento, sugerindo um adiantamento da mobilização na ausência do tecido, com quantidades similares de proteínas entre os tratamentos somente no quarto dia após a embebição (Tabela 1).

#### **5.2.4.2. Atividade de $\alpha$ -galactosidase**

Para verificar o efeito do tegumento na degradação do galactomanano através das enzimas hidrolíticas, a atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi utilizada como marcadora, por apresentar atividade anterior a endo- $\beta$ -mananase e a exo- $\beta$ -manosidase, iniciando o processo de degradação, e devido à dosagem de sua atividade ser de fácil obtenção quando comparada com a da endo- $\beta$ -mananase.

No primeiro dia após a embebição, as sementes embebidas com tegumento apresentaram atividade da  $\alpha$ -galactosidase maior na região distal do endosperma do que na proximal, atingindo atividade similar à encontrada no endosperma proximal somente no segundo dia após a embebição (Tabela 1). No terceiro dia

após a embebição ambos os tecidos apresentaram aumento da atividade de  $\alpha$ -galactosidase, porém o endosperma proximal apresentou atividade maior que o endosperma distal (Tabela 1). Essa diferença entre os endospermas foi maior no quarto dia após a embebição, já que a atividade da  $\alpha$ -galactosidase aumentou ainda mais no endosperma proximal (Tabela 1).

O tegumento apresentou variação similar à do endosperma proximal e distal, embora as taxas de atividade tenham sido bem menores que as encontradas no endosperma (Tabela 1). A atividade da  $\alpha$ -galactosidase nesse tecido foi alta no primeiro dia, seguida por diminuição no segundo dia e aumento de atividade no terceiro, onde permaneceu constante até o quarto dia após a embebição (Tabela 1).

Nas sementes embebidas sem o tegumento, a atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi crescente durante os dias após a embebição, tanto no endosperma proximal como no distal (Tabela 1). Ambos os tecidos apresentaram atividades similares no segundo dia e terceiro dia após a embebição, enquanto no quarto dia a atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi bem maior no endosperma proximal quando comparada com o endosperma distal (Tabela 1).

Essa diferença de atividade da  $\alpha$ -galactosidase entre o endosperma proximal e distal no quarto dia após embebição, com maior atividade no endosperma proximal, foi maior nas sementes embebidas sem o tegumento (Tabela 1). Assim como a atividade da enzima em ambos os tecidos foi mais alta durante todos os dias após a embebição na ausência do tegumento, principalmente no segundo dia, onde os endospermas das sementes embebidas sem tegumento apresentaram atividades da  $\alpha$ -galactosidase cinco vezes maiores do que naquelas embebidas com tegumento, sugerindo controle do tegumento na atividade da enzima (Tabela 1).

#### **5.2.4.3. Níveis de açúcares redutores**

No primeiro e segundo dias após a embebição, as sementes embebidas com tegumento apresentaram quantidades de açúcares redutores constantes e similares entre os endospermas proximais e distais (Tabela 1). No terceiro dia após a embebição, os endospermas apresentaram um aumento nessa quantidade, tanto no endosperma proximal como no distal, não ocorrendo novamente diferenças significativas entre os tecidos (Tabela 1). Essa quantidade de açúcares redutores se manteve praticamente constante até o quarto dia após a embebição, apresentando apenas um pequeno aumento no endosperma distal, que apesar disso continuou com quantidade de açúcar similar à região proximal (Tabela 1).

A quantidade de açúcar redutor presente no tegumento se manteve constante durante todos os dias após a embebição, com quantidades menores que nos endospermas a partir do terceiro dia após a embebição (Tabela 1).

Nas sementes embebidas sem o tegumento a quantidade de açúcares redutores também foi similar entre o endosperma proximal e o distal no segundo dia após a embebição, apresentando valores similares, inclusive, àqueles dos endospermas das sementes embebidas com tegumento (Tabela 1). No terceiro dia após a embebição também ocorreu o aumento de açúcares redutores, tanto no endosperma proximal como no distal, que se manteve praticamente constante no quarto dia após a embebição, com pequeno aumento somente no endosperma proximal, que apesar disso continuou com quantidade de açúcar similar ao endosperma distal (Tabela 1).

Assim, a quantidade de açúcares redutores foi similar entre o endosperma proximal e distal durante todos os dias após a embebição, tanto nas sementes embebidas com tegumento como nas sementes embebidas sem tegumento (Tabela 1). Por outro lado, o aumento de açúcares redutores no terceiro dia foi maior nos endospermas das sementes embebidas sem o tegumento, com níveis de açúcares aproximadamente quatro vezes maiores do que naquelas sementes

embebidas com tegumento, inclusive no quarto dia após a embebição, sugerindo a participação do tegumento no controle de degradação do galactomanano (Tabela 1).

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1. ANATOMIA**

#### **6.1.1. Descrição anatômica da espécie**

A anatomia do tegumento e endosperma da semente de *Sesbania virgata* descrita nesse trabalho tornou-se necessária não apenas para ampliar e aprofundar o conhecimento anterior mas, também, para auxiliar a compreensão dos diversos processos relacionados às etapas de degradação do galactomanano, como mecanismos enzimáticos e mecanismo de controle hormonal, auxiliando, inclusive, na avaliação do papel dos tecidos nesses processos durante o período de germinação e pós-germinação das sementes.

Sementes de *Sesbania virgata* haviam sido descritas anteriormente por Buckeridge & Dietrich (1996) e Potomati & Buckeridge (2002), principalmente com detalhes do endosperma e camada de aleurona, mas o tegumento ainda não havia sido descrito como foi feito no presente trabalho. Entretanto, em outras espécies de leguminosas, esse tecido já foi descrito por Beltrati & Paoli (1989), Aqüila (1995), Melo-Pinna *et al.* (1999) e Santos (2002). Morfologias semelhantes àquela de *S. virgata* foram encontradas nessas espécies, com o tegumento dividido em três diferentes estratos (exotegumento, mesotegumento e endotegumento) (Fig. 9 e 10).

Baseado na anatomia do tegumento e de acordo com o teste do tetrazólio, as células do endotegumento da espécie em estudo estão vivas (Fig. 13). A atividade respiratória encontrada em parte do tegumento foi uma importante descoberta nessa espécie, já que as células do endosperma e da camada de

aleurona haviam sido confirmadas como vivas por Buckeridge & Dietrich (1996), mas as células do tegumento eram tidas como mortas por Buckeridge (1988).

Em algumas espécies já tem sido verificada a expressão de genes no tegumento, principalmente durante o desenvolvimento, o que indica a presença de células vivas no tecido dessas espécies (Tranbarger & Misra 1996, Devic *et al.* 1999, Percy *et al.* 1999, Dong *et al.* 2004). Em sementes de *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) sugere-se, inclusive, a presença de uma camada parenquimática viva no tegumento interno, através do estudo com um gene promotor da expressão de GUS no tecido (Matzke *et al.* 1993).

O endosperma de sementes de *Sesbania virgata* apresentou o galactomanano presente na parede celular (Fig. 9 e 11), como observado também por Buckeridge & Dietrich (1996) e Potomati & Buckeridge (2002). Os primeiros autores sugeriram esse polissacarídeo como sendo a principal reserva do endosperma, mas demonstraram que outros compostos de reserva, os oligossacarídeos da série rafínósica e os corpos protéicos estavam presentes no endosperma, porém no citoplasma das células. Segundo os mesmos autores os corpos protéicos podem ser visualizados tanto no citoplasma de células do endosperma como na camada de aleurona, porém esta presença depende da fase em que a semente se encontra durante o processo de germinação e pós-germinação, como pode ser observado na Fig. 11 e 12.

Morfologia semelhante ao endosperma foi observada em outras leguminosas, como em *Ceratonia siliqua*, embora não apresente distinção clara entre a camada de aleurona e o endosperma (Seiler 1977, Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge *et al.* 2000a). Por outro lado, há espécies que apresentaram anatomia diferente, como *Trigonella foenum-graecum* e *Cyamopsis tetragonolobus*, com células não-vivas, completamente preenchidas com galactomanano e sem corpos protéicos, com exceção da camada de aleurona (Reid 1971, McClendon *et al.* 1976). Potomati & Buckeridge (2002) afirmaram que a morfologia de sementes de *Sesbania virgata* seria mais parecida com a de *Trigonella foenum-graecum* e *Cyamopsis tetragonolobus* do que com a *Ceratonia*

*siliqua*, devido à ausência de distinção entre a camada de aleurona e o endosperma na última espécie. Outras leguminosas, ainda, apresentaram anatomia completamente distinta da apresentada em *S. virgata*, como *Schyzolobium parahybum*, *Gymnocladus canadensis* e *Senna occidentalis* (Nadelmann 1890, Buckeridge *et al.* 2000a).

Desse modo, as sementes de leguminosas que contêm galactomananos no endosperma podem apresentar ou não a camada de aleurona, as células endospermicas podem estar vivas ou não, bem como podem apresentar diferentes mecanismos de degradação de tais açúcares (Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge *et al.* 2000b). Essas características anatômicas variadas parecem refletir diferentes estratégias de utilização da reserva e adaptações das espécies em diferentes condições do ambiente durante seu estabelecimento (Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge *et al.* 2000a).

### **6.1.2. Degradação do galactomanano**

Analisando anatomicamente as sementes de *Sesbania virgata* durante o período germinativo e pós-germinativo, foi possível entender melhor o processo de degradação do galactomanano, observando as diferenças anatômicas existentes durante esses períodos inclusive sob o efeito do ABA. Torna-se necessário ressaltar que em um contexto fisiológico e bioquímico, a germinação compreende apenas o conjunto de eventos que ocorre durante a embebição da semente e se estende até a protrusão da radícula, que ocorre em sementes de *S. virgata* até o segundo dia após a embebição (Bewley & Black 1994, Potomati & Buckeridge 2002).

Verificou-se que o início da degradação do galactomanano ocorreu somente no período pós-germinativo, entre o terceiro e quarto dias após a embebição em água, sendo a degradação intensa no quarto dia com desaparecimento dos corpos protéicos inclusive na camada de aleurona (Fig. 16 e 18). Segundo McCleary (1983), Buckeridge & Dietrich (1996) e Buckeridge *et al.*

(2000b) o galactomanano é completamente hidrolisado somente após a germinação (protrusão da radícula), sendo observado por Buckeridge & Dietrich (1996) que a degradação intensa do galactomanano em sementes de *Sesbania virgata* ocorre entre o terceiro e quarto dias após a embebição, o que corrobora as observações feitas nesse trabalho.

Em presença do ABA exógeno observou-se um retardamento no processo de degradação do galactomanano, que teve seu início somente a partir do quarto dia, com degradação intensa no quinto dia após a embebição (Fig. 19 e 21). Segundo Potomati & Buckeridge (2002), o ABA aplicado exogenamente retarda a degradação do galactomanano, o que corrobora as observações feitas no presente trabalho. A degradação intensa no quinto dia após a embebição, observada no endosperma de sementes embebidas com o hormônio, assemelhou-se às sementes embebidas em água, não ocorrendo mais diferenças anatômicas a partir desse período em presença do ABA, provavelmente porque o hormônio deve ter sido lixiviado ou metabolizado, permitindo o processo de degradação (Fig. 20 a 23).

Como decorrência da degradação completa do galactomanano, no sexto dia após a embebição, ocorreu desestruturação total e redução da espessura do endosperma, permitindo o crescimento e desenvolvimento do embrião (Fig. 22 e 23). Em sementes de *Trigonella foenum-graecum* observou-se também redução do endosperma após a degradação completa do polímero (Reid 1971).

Como observado nas secções histológicas, a degradação do galactomanano ocorreu por todo o endosperma irregularmente, não corroborando com as observações feitas por Reid (1971) em sementes de *Trigonella foenum-graecum*. Nessas sementes a mobilização do endosperma ocorre inicialmente na região próxima ao tegumento, junto à camada de aleurona, dirigindo-se posteriormente à região do embrião, sugerindo a secreção das enzimas hidrolíticas, ou de seus ativadores, pela camada de aleurona (Reid 1971).

Esse padrão de degradação do galactomanano, observado em sementes de *T. foenum-graecum*, ocorre provavelmente devido à ausência de células vivas

no endosperma, não sendo possível a degradação irregular por todo o tecido como nas sementes de *Sesbania virgata*, já que as enzimas são liberadas somente pelas células vivas da camada de aleurona causando a zona de dissolução do polissacarídeo no endosperma (Reid 1971).

## **6.2. BIOQUÍMICA**

### **6.2.1. Atividade das enzimas hidrolíticas do galactomanano**

Para compreender melhor a degradação do galactomanano, o mecanismo enzimático e investigar os tecidos provavelmente responsáveis pela produção das enzimas relacionadas à degradação, foram acompanhadas as atividades das três enzimas hidrolíticas durante a germinação e pós-germinação, paralelamente no tegumento (endotegumento) e no endosperma, sendo o último supostamente responsável pela síntese das enzimas hidrolíticas.

A atividade da  $\alpha$ -galactosidase apresentou-se elevada no endotegumento no período germinativo, enquanto no endosperma a atividade foi nula, ocorrendo o início de atividade somente a partir do segundo dia após a embebição, durante o processo pós-germinativo, onde ocorre a degradação do galactomanano e, portanto, ação da enzima no endosperma (Fig. 24A).

O pico de atividade da enzima, tanto no endotegumento como no endosperma, ocorreu no terceiro dia após a embebição durante o processo pós-germinativo (Fig. 24A). Buckeridge & Dietrich (1996) detectaram na mesma espécie o alcance máximo de atividade da  $\alpha$ -galactosidase no quinto dia após a embebição, só que em endosperma com o tegumento, não podendo ser comparado com a atividade detectada no presente trabalho, que utilizou o tegumento e o endosperma separadamente.

A presença de atividade máxima da  $\alpha$ -galactosidase no endosperma ao redor do terceiro dia deve estar relacionada com o início da degradação do galactomanano que ocorre entre o terceiro e quarto dias após a embebição, como

sugerido por Buckeridge & Dietrich (1996) e observado nas seções histológicas (Fig. 16, 18 e 24A). Já a atividade constante da enzima encontrada no endosperma, entre o quarto e quinto dias após a embebição, deve estar relacionada com a degradação intensa do galactomanano observada nas seções histológicas neste mesmo período (Fig. 18, 20 e 24A).

A endo- $\beta$ -mananase, assim como a  $\alpha$ -galactosidase no endosperma, apresentou o início da atividade a partir do segundo dia após a embebição, durante o período pós-germinativo, apresentando picos de atividade ao redor do quarto e quinto dias após a embebição, no endotegumento e no endosperma respectivamente (Fig. 24A e 24B). Buckeridge & Dietrich (1996) também verificaram baixa atividade dessa mesma enzima no segundo dia e ação máxima no quinto dia de embebição, porém em endosperma com tegumento.

Esse aumento de atividade da endo- $\beta$ -mananase ao longo do período pós-germinativo, com pico de atividade ao redor do quinto dia no endosperma, coincidiu com a degradação intensa do endosperma, observada no mesmo período nas análises histológicas (Fig. 18, 20 e 24B).

O pico de atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi anterior ao da endo- $\beta$ -mananase, provavelmente devido à necessidade de retirar as ramificações de galactose da cadeia principal de manano que, segundo Lisboa (2003), impedem a ação hidrolítica da endo- $\beta$ -mananase sobre a cadeia principal de manose em sementes de *Sesbania virgata*. Assim, torna-se importante à ação da  $\alpha$ -galactosidase, desgalactosilando o polímero, anteriormente à ação hidrolítica da endo- $\beta$ -mananase (McCleary & Mathenson 1975, Buckeridge *et al.* 2000a).

A atividade da exo- $\beta$ -manosidase também foi baixa no período germinativo, tanto no endotegumento como no endosperma, como observado por Buckeridge e Dietrich (1996) na mesma espécie (Fig. 24C). Apesar da atividade baixa no segundo dia, os picos de atividade da enzima ocorreram no terceiro dia após a embebição, tanto no endotegumento como no endosperma, diminuindo no decorrer do processo pós-germinativo (Fig. 24C). Buckeridge & Dietrich (1996)

verificaram ação máxima dessa enzima ao redor do quarto dia após a embebição, porém em endosperma com tegumento, não podendo ser comparada com a atividade detectada no presente trabalho, que utilizou o tegumento e o endosperma separadamente.

As atividades baixas das três enzimas no sexto dia após a embebição, tanto no endotegumento como no endosperma, coincidiram com a degradação total do galactomanano no endosperma, observada nas secções histológicas (Fig. 22 e 24).

Segundo McCleary (1983), Buckeridge *et al.* (2000a) e Mo & Bewley (2003), a  $\alpha$ -exo- $\beta$ -manosidase hidrolisa somente os mano-oligossacarídeos (oligossacarídeos desgalactosilados), manotrioses e manobioses, provenientes da ação da  $\alpha$ -galactosidase e da endo- $\beta$ -mananase, clivando o restante da molécula a partir de seu terminal redutor.

Apesar do pico de atividade da  $\alpha$ -exo- $\beta$ -manosidase em sementes de *Sesbania virgata* ter ocorrido paralelamente ao da  $\alpha$ -galactosidase no endosperma e anteriormente ao da endo- $\beta$ -mananase, a atividade dessa última foi crescente durante todo o período de ação da  $\alpha$ -exo- $\beta$ -manosidase, assim como a atividade da  $\alpha$ -exo- $\beta$ -manosidase permaneceu constante no restante do período pós-germinativo, permitindo o sincronismo entre as enzimas durante a degradação do galactomanano, com ação da  $\alpha$ -exo- $\beta$ -manosidase sobre os mano-oligossacarídeos desgalactosilados (Fig. 24).

Entretanto, esses resultados devem ser interpretados com cuidado, já que a afinidade das enzimas pelo galactomanano não pode ser avaliada nessas situações, onde outros substratos além do galactomanano foram utilizados para detectar a atividade das enzimas, o que poderia explicar a atividade elevada da  $\alpha$ -exo- $\beta$ -manosidase no terceiro dia após a embebição.

A diferença de atividade das enzimas entre o endotegumento e o endosperma sugere hipóteses quanto aos tecidos responsáveis pela produção dessas enzimas. Como a atividade da  $\alpha$ -galactosidase e da endo- $\beta$ -mananase

foram maiores primeiramente no endotegumento, inclusive durante a germinação para a primeira enzima, sugere-se que essas enzimas hidrolíticas devem ser produzidas, modificadas ou armazenadas no tegumento, sendo transportadas posteriormente para o endosperma durante a degradação do galactomanano (Fig. 24A e 24B). É possível, ainda, que a produção da  $\alpha$ -galactosidase e da endo- $\beta$ -mananase inicie no tegumento e posteriormente aumente também no endosperma durante a degradação do galactomanano.

Já a exo- $\beta$ -manosidase foi encontrada em ambos os tecidos durante os mesmos períodos, porém com maior intensidade no endosperma, o que sugere que esta enzima deve ser produzida principalmente no endosperma durante o processo pós-germinativo (Fig. 24C). Porém, essa enzima pode ser inclusive produzida, modificada ou apenas armazenada, pelo tegumento durante o processo pós-germinativo, com subsequente transporte para o endosperma.

A sugestão do endosperma como tecido responsável pela produção das enzimas hidrolíticas corrobora as observações feitas em sementes de *Ceratonia siliqua*, onde se verificou que as enzimas são provavelmente produzidas nas células endospermicas (Seiler 1977, Buckeridge *et al.* 2000a). Apesar da semelhança anatômica do endosperma com as sementes de *C. siliqua*, as sementes de *Sesbania virgata* possuem camada de aleurona claramente distinta do endosperma podendo-se sugerir, ainda, a camada de aleurona presente no endosperma como suposta responsável pela síntese das enzimas hidrolíticas, como observado em sementes de *Trifolium incarnatum* e *Medicago sativa* (Reid & Meier 1972) e em sementes de *Trigonella foenum-graecum* e *Cyamopsis tetragonolobus* (Reid 1985c).

Segundo Potomati & Buckeridge (2002), a morfologia de sementes de *Sesbania virgata* seria similar a de *Trigonella foenum-graecum* e *Cyamopsis tetragonolobus*, o que permite sugerir a camada de aleurona como responsável pela síntese das enzimas hidrolíticas. Entretanto Buckeridge *et al.* (2000a) sugeriram que as enzimas hidrolíticas em *S. virgata* podem ser produzidas tanto

pela camada de aleurona como pelas células do endosperma, apresentando anatomia intermediária entre *Trigonella foenum-graecum* e *Ceratonia siliqua*.

Através dos resultados deste trabalho, não foi possível definir especificamente se a camada de aleurona, somente o endosperma ou ambos os tecidos são responsáveis pela síntese das enzimas, mas pode-se sugerir a participação do tegumento no processo enzimático, através da síntese, modificação e/ou armazenamento das enzimas, funções que seriam possíveis devido à presença de células vivas no endotegumento (Fig. 13).

## **6.2.2. Localização da endo- $\beta$ -mananase**

### **6.2.2.1. *Tissue printing***

Procurando compreender melhor quais os tecidos e os estágios durante a germinação e pós-germinação estariam relacionados à produção ou apenas presença das enzimas, inclusive sob o efeito do ABA, buscou-se a localização de uma das enzimas hidrolíticas, a endo- $\beta$ -mananase, através da técnica do *tissue printing*.

A endo- $\beta$ -mananase pode ser localizada em todos os tecidos da semente, no tegumento, endosperma e cotilédone, variando em presença e intensidade durante o processo germinativo e pós-germinativo, e sob o efeito do ABA (Fig. 25 a 28). No tegumento, a enzima esteve presente praticamente em todos os dias após a embebição, tanto em água como em ABA, porém com intensidade maior durante o período germinativo, no segundo dia após a embebição (Fig. 25 a 28). A presença mais acentuada da enzima durante a germinação provavelmente está relacionada à síntese, modificação e/ou armazenamento de mananase anteriormente discutido, que deve ocorrer principalmente durante a germinação para conseqüente degradação do endosperma durante o processo pós-germinativo, a partir do terceiro dia após a embebição, onde não se observou a

presença intensa dessa enzima no tegumento como anteriormente (Fig. 16 a 23 e 25 a 28).

No cotilédone, a endo- $\beta$ -mananase também esteve presente em todos os dias após a embebição, sempre com a mesma intensidade tanto em água como em ABA (Fig. 25 a 28). A presença da enzima nesse tecido durante todo o período germinativo e pós-germinativo pode ter ocorrido devido à existência de supostas isoformas que podem estar presentes na espécie em estudo.

A presença de múltiplas isoformas da endo- $\beta$ -mananase ocorre em sementes de diversas espécies (Dirk *et al.* 1995), como em café, que apresentam isoformas da enzima nos grãos (Marraccini *et al.* 2001), em sementes de alface, que apresentam diferentes isoformas da mananase no endosperma (Nonogaki & Morohashi 1999), e em tomate, que apresentam diferentes isoformas da enzima durante a germinação e pós-germinação (Voigt & Bewley 1996, Nonogaki *et al.* 2000) e, ainda, isoformas diferentes entre o cotilédone e o endosperma (Toorop *et al.* 1996, Nonogaki *et al.* 1998).

Já no endosperma, a enzima não esteve presente durante todos os dias após a embebição como nos outros tecidos, ocorrendo praticamente até o terceiro dia em sementes embebidas em água e até o quarto dia em sementes embebidas em ABA (Fig. 25 a 28). Porém, em ambos os tratamentos, a presença da endo- $\beta$ -mananase no endosperma ocorreu inicialmente distribuída por todo o tecido, coincidindo com a degradação do galactomanano observada nas seções histológicas tanto em água como em ABA, que ocorreu por todo o endosperma irregularmente e ao mesmo tempo (Fig. 18 a 21, 25 e 26B). A reação da endo- $\beta$ -mananase não pode ser observada por todo o endosperma da semente embebida em ABA como em água, provavelmente devido à falhas durante o pressionamento da semente à membrana (Fig. 25).

A permanência maior da endo- $\beta$ -mananase no endosperma em presença do ABA pode estar relacionada ao efeito indireto deste hormônio sobre a atividade da enzima, já que a atividade da mananase é inibida em presença de ABA em sementes de tomate, antes e depois da germinação (Leviatov *et al.* 1995,

Nomaguchi *et al.* 1995, Nonogaki & Morohashi 1996, Toorop *et al.* 1999, Toorop *et al.* 2000), e de café, depois da protrusão da radícula (Giorgini & Comoli 1996). O atraso no desaparecimento da endo- $\beta$ -mananase no endosperma pode estar relacionado, ainda, ao efeito do ABA sobre a produção da  $\alpha$ -galactosidase, já que em sementes de *Sesbania virgata* ocorre efeito parcial do ABA sobre a atividade da  $\alpha$ -galactosidase, e esta enzima deve agir sobre o polímero antes da endo- $\beta$ -mananase (Potomati & Buckeridge 2002, Lisboa 2003).

Como não foi verificado efeito do ABA exógeno sobre o conteúdo de teor de água das sementes durante e após a germinação (dado não apresentado), o retardamento no desaparecimento da endo- $\beta$ -mananase no endosperma não poderia estar relacionado com um efeito modulador do ABA sobre a absorção de água e, conseqüentemente, sobre a ativação desta enzima hidrolítica, o que confirma a hipótese de que o ABA deve estar agindo sobre a produção e atividade da endo- $\beta$ -mananase e/ou da  $\alpha$ -galactosidase da espécie em estudo.

Como conseqüência dessa maior permanência da endo- $\beta$ -mananase no endosperma em presença do ABA e, possivelmente, retardamento da sua ação, ocorre atraso na degradação do galactomanano em presença do ABA, observado por Potomati & Buckeridge (2002) na mesma espécie e nas secções histológicas, embora os períodos de retardamento não coincidam (Fig. 16 a 21 e 25 a 28). Acredita-se que uma possível explicação para a não coincidência entre os dois experimentos poderia estar relacionada a diferenças de temperatura durante a embebição das sementes utilizadas para o *tissue printing*. Tem sido observado empiricamente que a germinação pode ser adiantada significativamente quando experimentos são feitos a temperaturas mais altas (p.ex. 30°C), embora isto não tenha sido sistematicamente estudado nessa espécie até o momento.

A partir do quinto dia após a embebição, não ocorreram mais diferenças na localização da enzima em presença do hormônio, sugerindo que as diferenças significativas existentes em presença do ABA exógeno ocorrem somente até o quarto dia após a embebição, como observado inclusive nas secções histológicas,

quando ocorre o desencadeamento do processo de degradação do galactomanano e desenvolvimento do embrião no tratamento, e as sementes tanto em água como em ABA assemelham-se estruturalmente e bioquimicamente (Fig. 20 a 23 e 28).

Dessa forma, a presença do ABA inibe a degradação do galactomanano somente até determinado período quando, provavelmente, o hormônio acaba sendo lixiviado ou metabolizado, e o processo de degradação do galactomanano e a transferência de açúcares entre os órgãos pode ser iniciada.

Como a endo- $\beta$ -mananase foi localizada em todos os tecidos no período germinativo, tanto em água como na presença do ABA exógeno, ocorrendo praticamente na mesma intensidade e com a mesma distribuição, sugere-se que o ABA não esteja interferindo na produção da endo- $\beta$ -mananase durante a germinação, agindo somente no período pós-germinativo (Fig. 25 a 28). Segundo Dahal *et al.* (1997), durante a germinação provavelmente o ABA não interfere no acúmulo inicial da endo- $\beta$ -mananase.

#### **6.2.2.2. *Immuno dot blotting***

Para ampliar e auxiliar a compreensão dos resultados obtidos através do *tissue printing* buscou-se localizar a enzima endo- $\beta$ -mananase separadamente nos diferentes tecidos durante a germinação e pós-germinação, a fim de entender quais os tecidos e os estágios que poderiam estar relacionados à produção ou apenas à presença da endo- $\beta$ -mananase.

A endo- $\beta$ -mananase, como no *tissue printing*, pode ser localizada em todos os tecidos da semente, inclusive na radícula, variando em presença e intensidade durante o processo germinativo e pós-germinativo (Fig. 29).

Na radícula e no cotilédone a enzima esteve presente durante todo o período germinativo e pós-germinativo, com aumento após a germinação, a partir do quarto dia após a embebição (Fig. 29). A presença da endo- $\beta$ -mananase no

cotilédone por todos os dias após a embebição pode ser verificada, também, através do *tissue printing* (Fig. 25A, 26A, 27A e 28A). Além disso, a presença da enzima no cotilédone ocorreu paralelamente à presença da mesma na radícula apresentando, inclusive, aumento nos mesmos dias no período pós-germinativo, sugerindo a participação conjunta dos dois tecidos durante a protrusão da radícula e desenvolvimento do embrião (Fig. 29).

No endosperma, a presença da endo- $\beta$ -mananase ocorreu com maior intensidade no período pós-germinativo, assim como na radícula e cotilédone, apresentando intensidade alta a partir do terceiro dia após a embebição, coincidindo com o início e intensa degradação do galactomanano e com a atividade da enzima encontrada no endosperma (Fig. 16, 18, 20, 22, 24B e 29).

Porém, a presença da enzima no *tissue printing* foi maior no segundo dia após a embebição, diminuindo no terceiro dia e desaparecendo no tecido já a partir do quarto dia após a embebição, diferentemente da presença da endo- $\beta$ -mananase observada no *immuno dot blotting* no mesmo tecido (Fig. 25A, 26A, 27A, 28A e 29). Como a presença da endo- $\beta$ -mananase no endosperma, através do *immuno dot blotting*, coincidiu em maiores detalhes com as observações anatômicas durante a degradação do galactomanano, acredita-se, novamente, que alterações de temperatura podem ter sido responsáveis pelas diferenças observadas durante a embebição das sementes utilizadas para o *tissue printing*, causando adiantamento na utilização da enzima no endosperma e, conseqüentemente, na degradação do galactomanano.

No tegumento, a presença da endo- $\beta$ -mananase foi maior no período germinativo, no primeiro e segundo dias após a embebição, diferentemente dos outros tecidos que apresentaram a presença da enzima principalmente durante a pós-germinação (Fig. 29). Essa presença maior da enzima no período germinativo pode ser observada, também, através do *tissue printing*, que mostrou a presença da endo- $\beta$ -mananase por todo o tecido com maior intensidade no segundo dia após a embebição (Fig. 25A).

A presença maior da enzima no tegumento durante a germinação foi inversa à encontrada no endosperma, que apresentou maior intensidade no período pós-germinativo, assim como observado na atividade da enzima, que ocorreu primeiramente no tegumento (Fig. 24B e 29). Essas observações sugerem, mais uma vez, que a presença mais acentuada da enzima no tegumento, nos primeiros dias após a embebição, provavelmente esteja relacionada à síntese, modificação e/ou armazenamento de mananase, que deve ocorrer principalmente no início da germinação para conseqüente degradação no endosperma durante o processo pós-germinativo, onde se observou a presença intensa dessa enzima no endosperma e não mais no tegumento como anteriormente (Fig. 29).

Na radícula, a presença da endo- $\beta$ -mananase durante a germinação provavelmente esteja relacionada ao enfraquecimento do endosperma ao redor do tecido para conseqüente germinação da semente, já que se sabe que além da força mecânica promovida pelo crescimento do eixo embrionário, torna-se necessário o enfraquecimento do endosperma, pela ação das enzimas hidrolíticas, para a emergência da radícula (Groot *et al.* 1988, Leubner-Metzger *et al.* 1995, Welbaum *et al.* 1995, Lisboa 2003), sendo inclusive detectada atividade da endo- $\beta$ -mananase na radícula durante a germinação na mesma espécie (Lisboa 2003).

A presença da enzima no cotilédone e na radícula durante o período pós-germinativo, inclusive em maior intensidade, provavelmente está relacionada à degradação do galactomanano nas áreas distais do endosperma e/ou à transferência dos açúcares do endosperma para o desenvolvimento do embrião, já que os produtos de degradação do galactomanano são transferidos para os cotilédones e embrião, servindo como fonte de energia (Reid 1985a, Buckeridge & Dietrich 1996).

Assim, a endo- $\beta$ -mananase presente no embrião pode estar relacionada à hidrólise de mano-oligossacarídeos presentes neste tecido, já que em sementes de *Sesbania virgata* parte dos mano-oligossacarídeos produzidos durante a degradação do galactomanano no endosperma podem ser transportados para os

cotilédones, onde são hidrolisados pela exo- $\beta$ -manosidase (Buckeridge & Dietrich 1996). Nas sementes de *S. virgata*, a  $\alpha$ -galactosidase também está presente no cotilédone junto com a exo- $\beta$ -manosidase (Buckeridge & Dietrich 1996), assim como nas sementes de alface (Bewley & Black 1994).

### 6.2.2.3. Imunofluorescência

Apesar da localização da endo- $\beta$ -mananase nos diferentes tecidos da semente durante a germinação e pós-germinação, através do *tissue printing* e *immuno dot blotting*, tornou-se necessário determinar mais especificamente a localização desta enzima nos tecidos, inclusive na camada de aleurona, tecido supostamente responsável pela síntese das enzimas hidrolíticas utilizadas para a degradação do galactomanano no endosperma de algumas espécies (Reid & Meier 1972, Reid 1985c).

Como métodos imunocitoquímicos, através de fluorescência, têm sido utilizados com sucesso para detectar e localizar polissacarídeos e as enzimas envolvidas no processo de degradação dos mesmos (Sugimoto *et al.* 1998, Orfila & Knox 2000, Leubner-Metzger 2002), optou-se por utilizar tal metodologia para localização da endo- $\beta$ -mananase em secções histológicas. As sementes escolhidas para a aplicação de imunofluorescência foram àquelas coletadas no terceiro dia após a embebição, que correspondem ao período pós-germinativo, a partir do qual ocorre a degradação do galactomanano da parede das células do endosperma e, portanto, a presença e ação da enzima (Buckeridge & Dietrich 1996).

Porém, diferentemente do *tissue printing* e *immuno dot blotting*, a endo- $\beta$ -mananase não pode ser localizada em todos os tecidos, devido à autofluorescência apresentada pelo endosperma e pela camada de aleurona (Fig. 30). A autofluorescência ocorreu, provavelmente, devido à presença de aminoácidos aromáticos nos corpos protéicos presentes nos citoplasmas das

células dos dois tecidos (Fig. 9, 11 e 30). Segundo Serrato-Valenti *et al.* (2000), a autofluorescência presente em sementes de *Phacelia tanacetifolia* Benth. indica a distribuição de compostos fenólicos nos tecidos. Sementes de diversas espécies apresentam autofluorescência em seus tecidos, como *Cucumis melon* L. (Yim & Bradford 1998) e *Nicotiana tabacum* (Leubner-Metzger 2002).

A localização da endo- $\beta$ -mananase só foi possível, dessa maneira, no tegumento, que não apresentou autofluorescência, provavelmente por não apresentar corpos protéicos como o endosperma (Fig. 30 a 32).

A enzima foi observada por todos os estratos do tegumento, mas ocorreu principalmente no mesotegumento, associada às paredes celulares dos osteoesclereídes (Fig. 31 e 32). Como somente as células do endotegumento apresentaram-se vivas através do tetrazólio, provavelmente o mesotegumento não seja capaz de sintetizar a endo- $\beta$ -mananase presente no tecido (Fig. 13, 31 e 32).

Dessa forma, como a enzima esteve presente também nas paredes celulares das células parenquimáticas mais próximas ao mesotegumento, o endotegumento poderia ser em parte responsável pela produção da enzima, que seria então transferida para o mesotegumento para um possível armazenamento temporário desta (Fig. 31). Outra possibilidade seria que a endo- $\beta$ -mananase poderia estar sendo sintetizada na camada de aleurona ou no endosperma, como sugerido na literatura, durante a maturação da semente ou germinação (Reid & Meier 1972, Seiler 1977, Reid 1985c, Buckeridge *et al.* 2000a), e transferida para o tegumento para uma possível transformação no endotegumento e/ou armazenamento no mesotegumento.

Como a enzima esteve presente, inclusive, nas paredes celulares dos macroesclereídes do exotegumento, principalmente nas paredes próximas ao mesotegumento, esse tecido pode estar relacionado ao armazenamento da endo- $\beta$ -mananase, juntamente com o mesotegumento (Fig. 31).

A presença da endo- $\beta$ -mananase no tegumento, também observada pelo *tissue printing* e *immuno dot blotting*, juntamente com a presença das outras enzimas no tecido e a descoberta de que há tecido vivo no endotegumento,

sugerem a participação deste tecido no processo de degradação do galactomanano, estando relacionado à produção, modificação e/ou armazenamento das enzimas no tecido (Fig. 13, 24, 25 a 29, 31 e 32).

### **6.2.3. Dosagem de ABA endógeno**

Para compreender melhor a participação do tegumento e dos outros tecidos durante a germinação e degradação do galactomanano, bem como sua relação com o ABA, foi efetuada a dosagem de ABA endógeno nos diferentes tecidos da semente no primeiro dia e no terceiro dia após a embebição. Estes dias correspondem ao período de germinação e pós-germinação respectivamente.

Durante a germinação, o tegumento apresentou a maior concentração de ABA quando comparado com os outros tecidos, sendo a concentração máxima desse hormônio durante toda a dosagem, já que nenhum outro tecido atingiu essa concentração, nem no primeiro dia nem no terceiro dia de embebição (Fig. 33). Em algumas espécies, concentrações relativamente altas de inibidores da germinação, incluindo o ABA, já haviam sido detectadas no tegumento (Bewley & Black 1994).

Essa presença do hormônio no tegumento, inclusive em concentrações elevadas, sugere que o ABA possa estar sendo sintetizado por este tecido ou transferido de algum tecido de síntese para o tegumento. Segundo Nambara & Marion-Poll (2003), a maior parte do ABA presente na semente é sintetizada durante a fase de maturação, primeiramente nos tecidos da planta mãe e, posteriormente, em quantidades mais baixas no endosperma e embrião. Em sementes de *Nicotiana plumbaginifolia*, acredita-se que durante a maturação o ABA possa ser sintetizado também pelo tegumento (Frey *et al.* 2004).

Assim, a concentração alta de hormônio no tegumento durante a germinação pode ter ocorrido devido à síntese do ABA no próprio tecido durante a maturação e/ou transferência do ABA dos tecidos da planta mãe, do endosperma e do embrião para o tegumento durante o desenvolvimento da semente. Sabendo

que o ABA está presente na planta mãe e no tegumento durante a maturação, contribuindo para a regulação do desenvolvimento do embrião e maturação (McCarty 1995, Finkelstein *et al.* 2002), tanto a síntese como a transferência de ABA para o tegumento neste período torna-se possível. Por outro lado se sabe que em algumas sementes dormentes ocorre síntese *de novo* do ABA durante a embebição (Le Page-Degivry & Garello 1992, Wang *et al.* 1995, Debeaujon & Koornneef 2000).

Nos vegetais superiores os sítios de síntese hormonal não são tão bem definidos estruturalmente e localizados, sugerindo-se que nos vegetais não existem órgãos especializados para biossíntese hormonal, embora possam existir diferenças na capacidade biossintética de cada órgão, como verificado em *Tillandsia recurvata* L. e *Campylocentrum burchellii* Cogn. (Trewavas 1981, Peres *et al.* 1997).

No período pós-germinativo, a concentração do ABA diminui no tegumento e o embrião foi o tecido que apresentou a maior concentração de ABA, embora não maior que a concentração encontrada no tegumento no primeiro dia, apresentando uma grande variação entre os dias de embebição, já que durante a germinação foi o tecido que obteve a menor concentração do hormônio (Fig. 33). Essa presença maior do hormônio no embrião, no terceiro dia após a embebição, sugere que o ABA endógeno esteja se concentrando no tegumento durante a germinação e seja deslocado para o embrião durante o período pós-germinativo, e/ou que o hormônio seja sintetizado pelo embrião após o início do processo pós-germinativo, onde ocorre a transferência de açúcares do endosperma para o tecido.

Como o endosperma foi o único tecido que não apresentou grandes variações na concentração de ABA entre o primeiro e terceiro dias após a embebição, sugere-se sua participação apenas no suposto transporte do hormônio entre o tegumento e o embrião após a germinação ou na degradação do hormônio no tecido, permitindo a degradação do galactomanano e transferência de carbono e energia entre os órgãos (Fig. 33).

A alta concentração de ABA no tegumento durante a germinação, assim como sua presença no tecido durante o período pós-germinativo, pode estar envolvida na síntese, modificação e/ou armazenamento das enzimas hidrolíticas presentes no tecido e nas regiões do endosperma próximas ao tegumento, a fim de modular a degradação do galactomanano através das enzimas hidrolíticas. Esse mecanismo teria um papel importante no controle de degradação do galactomanano e enfraquecimento do endosperma em torno da radícula, necessária para que ocorra a germinação e na degradação do endosperma lateral, evitando a produção desses açúcares redutores em excesso.

Dessa forma, a dosagem de ABA serviu como uma complementação dos estudos, fornecendo informações sobre o conteúdo hormonal endógeno envolvido no processo de germinação e degradação do galactomanano. Tal conhecimento é de extrema importância, pelo fato de os estudos do papel dos hormônios vegetais, através de aplicação dos mesmos nos tecidos das plantas, estarem sujeitos a limitações, tais como falta de conhecimento quanto à absorção, transporte e metabolismo do hormônio aplicado e das alterações que o mesmo pode provocar no nível hormonal endógeno (Label *et al.* 1989, Etienne *et al.* 1993).

#### **6.2.4. Papel do tegumento**

A presença da endo- $\beta$ -mananase e do ABA no tegumento sugeriram a participação do tecido no controle do enfraquecimento do endosperma durante a germinação e degradação do galactomanano no período pós-germinativo. A fim de compreender melhor o papel do tegumento no controle de degradação do endosperma e, ainda, comparar a mobilização do galactomanano e das proteínas solúveis entre o endosperma proximal (próximo ao tegumento) e distal (próximo ao cotilédone) sob a influência deste tecido, efetuou-se a dosagem de proteínas,  $\alpha$ -galactosidase e açúcares redutores nessas duas regiões do endosperma de sementes embebidas com e sem tegumento, durante e após a germinação.

#### 6.2.4.1. Mobilização de proteínas solúveis

Durante a germinação, não foi observado efeito do tegumento sobre a mobilização de proteínas, tanto no endosperma proximal como no distal, já que os teores protéicos foram similares entre as sementes embebidas com e sem tegumento, provavelmente por que a mobilização dos corpos protéicos e a degradação do galactomanano no endosperma lateral ocorrem somente após a germinação, como observado nas secções histológicas (Fig. 16, 18, 20 e Tabela 1).

Já no início do processo pós-germinativo, a quantidade de proteínas foi maior nas sementes embebidas com tegumento, com diminuição significativa dos teores protéicos no endosperma das sementes embebidas sem tegumento, sugerindo a participação deste tecido no controle de mobilização das proteínas, provavelmente junto com o ABA presente no tecido (Tabela 1). Segundo Garcarrubio *et al.* (1997), o ABA previne a degradação das proteínas de reserva em sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., assim como observado nas secções histológicas neste trabalho, o que torna possível a ação conjunta do tegumento com o ABA na mobilização das proteínas em sementes de *Sesbania virgata* (Fig. 16 a 21).

O tegumento estaria, dessa forma, controlando a utilização das proteínas enzimáticas, estruturais e a degradação das proteínas de reserva no endosperma, já que a mobilização das proteínas foi anterior nas sementes embebidas na sua ausência (Tabela 1).

A diminuição significativa dos teores de proteínas das sementes embebidas com tegumento ocorreu somente no quarto dia após a embebição, tanto no endosperma proximal como no distal, coincidindo com o desaparecimento dos corpos protéicos e a degradação intensa do galactomanano por todo o endosperma, observada nas secções histológicas (Fig. 18 e Tabela 1).

Como o endosperma proximal apresentou teores protéicos maiores do que o distal no início do processo pós-germinativo, sugere-se ainda que as proteínas

de reserva são degradadas mais rapidamente no endosperma distal, principalmente na presença do tegumento que, provavelmente, controla mais a mobilização na região proximal nesse período, coincidindo com a presença de menor quantidade de corpos protéicos nas camadas distais do endosperma, observadas nas secções histológicas no terceiro dia após a embebição (Fig. 16 e Tabela 1).

#### **6.2.4.2. Atividade de $\alpha$ -galactosidase**

Durante o processo germinativo a  $\alpha$ -galactosidase apresentou inicialmente atividade mais alta no endosperma distal do que no endosperma proximal de sementes embebidas com o tegumento (Tabela 1). A atividade maior da enzima no endosperma distal no início da germinação, especificamente no primeiro dia após a embebição, provavelmente deve estar relacionada ao enfraquecimento do endosperma que circunda a radícula, necessário para que ocorra a protrusão da radícula e, portanto, a germinação (Lisboa 2003). Sabe-se que em sementes de tomate a  $\alpha$ -galactosidase encontra-se presente nessa região do endosperma durante a germinação (Feurtado *et al.* 2001).

No segundo dia após a embebição a atividade da enzima no endosperma distal não apresentou mais diferenças significativas quando comparado com o proximal, provavelmente devido ao final da germinação, que ocorre ao redor do segundo dia, como observado por Potomati & Buckeridge (2002), não sendo mais necessária sua ação específica no endosperma distal para o enfraquecimento em torno da radícula.

Sementes embebidas sem o tegumento também não apresentaram diferenças significativas na atividade da  $\alpha$ -galactosidase entre o endosperma proximal e distal no mesmo período, mas apresentaram atividade enzimática cinco vezes maior que as sementes embebidas com tegumento, sugerindo uma forte influência deste tecido no controle da atividade da enzima já durante a germinação (Tabela 1).

No processo pós-germinativo onde ocorre a degradação do galactomanano no endosperma lateral através da máxima atividade das enzimas hidrolíticas, a atividade da  $\alpha$ -galactosidase aumentou gradualmente no endosperma proximal e distal, tanto em sementes embebidas com tegumento como nas sementes embebidas sem o tegumento (Fig. 16, 18, 20, 24 e Tabela 1).

Porém, a atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi maior no endosperma proximal do que no endosperma distal, tanto na presença como na ausência do tegumento durante a embebição, sugerindo a presença de galactomananos mais ramificados na região proximal do endosperma (Tabela 1). Em espécies contendo galactomananos altamente ramificados a atividade da  $\alpha$ -galactosidase, desgalactosilando o polímero, encontra-se em níveis altos durante a mobilização do polímero (Buckeridge *et al.* 2000a).

Como na presença do tegumento durante a embebição a atividade da enzima foi maior no endosperma proximal do que no endosperma distal já a partir do terceiro dia, enquanto na ausência do tecido esta diferença ocorreu somente no quarto dia após a embebição, o tegumento parece estar influenciando a ação maior da  $\alpha$ -galactosidase no endosperma proximal no início do processo pós-germinativo, possivelmente em combinação com o ABA presente no cotilédone, que estaria controlando a produção da enzima no endosperma distal no mesmo período (Tabela 1).

Mas, apesar dessa influência do tegumento na atividade da enzima no endosperma proximal, o tegumento estaria controlando a ação da  $\alpha$ -galactosidase tanto no endosperma proximal como no distal, possivelmente junto com o ABA presente no tecido, já que sementes embebidas sem o tegumento apresentaram atividade maior da enzima nos endospermas desde a germinação, inclusive com diferença maior de atividade entre o endosperma proximal e distal no quarto dia após a embebição (Tabela 1).

Segundo Kontos & Spyropoulos (1996) sementes de *Ceratonia siliqua* em desenvolvimento apresentam ação inibitória do tegumento sobre a produção de  $\alpha$ -

galactosidase, assim como sementes maduras da mesma espécie e de *Trigonella foenum-graecum* possuem a produção de  $\alpha$ -galactosidase regulada por substâncias inibitórias presentes no endosperma e/ou no tegumento.

Essa influência do tegumento na atividade da enzima no endosperma proximal e no controle de ação da  $\alpha$ -galactosidase no endosperma durante todo o processo pós-germinativo, pode estar relacionada ao mecanismo de controle de degradação do galactomanano sugerido por Lisboa (2003), que parece evitar a produção de açúcares redutores em excesso.

Além disso, a detecção de atividade da  $\alpha$ -galactosidase no tegumento, inclusive acompanhando as atividades do endosperma proximal e distal, juntamente com a detecção específica no endotegumento, sugerem novamente a participação deste tecido no processo de degradação do galactomanano, estando relacionado à produção, modificação e/ou armazenamento dessa enzima no tecido, controlando a ação da  $\alpha$ -galactosidase (Tabela 1).

#### **6.2.4.3. Níveis de açúcares redutores**

No processo germinativo e pós-germinativo o tegumento apresentou níveis constantes de açúcares redutores que, embora presentes em quantidades pequenas, sugerem a presença de atividade respiratória nas células do tegumento, especificamente no endotegumento, como observado pelo teste de tetrazólio (Fig. 13 e Tabela 1).

Durante o processo de germinação o endosperma proximal e o distal apresentaram, também, quantidades pequenas de açúcares redutores, tanto nas sementes embebidas com tegumento como nas sementes embebidas sem o tegumento, que se deve provavelmente ao enfraquecimento do endosperma somente em torno da radícula, para que ocorra a germinação (Lisboa 2003) (Tabela 1).

No processo pós-germinativo, assim como durante a germinação, as sementes embebidas com tegumento e sem tegumento não apresentaram

diferenças significativas na quantidade de açúcares redutores entre o endosperma proximal e o distal, sugerindo que a degradação do galactomanano ocorra de forma irregular e desordenada por todo o tecido, corroborando as observações histológicas e a presença da endo- $\beta$ -mananase distribuída por todo o endosperma (Fig. 16, 18, 20, 25 e Tabela 1).

Porém, a quantidade de açúcares redutores aumentou durante o processo pós-germinativo, nos endospermas das sementes embebidas com e sem tegumento, já que a degradação do galactomanano no endosperma lateral ocorre após a germinação, como sugerido por Buckeridge *et al.* (2000c) e verificado nas secções histológicas (Fig. 16, 18, 20 e Tabela 1). Esse aumento de açúcares redutores no endosperma, entretanto, ocorreu somente no terceiro dia, permanecendo praticamente constante a quantidade de açúcares no quarto dia após a embebição, mesmo com a degradação intensa do endosperma observada nas secções histológicas (Fig. 18 e Tabela 1).

Provavelmente essa intensa degradação do galactomanano por todo o endosperma, observada nas secções, esteja acontecendo espaçadamente e desordenadamente, para que a liberação de açúcar redutor não ocorra em excesso (Fig. 18 e Tabela 1). Foi sugerido em sementes de *Sesbania virgata* um mecanismo que evitaria a produção desses açúcares redutores em excesso através da ação espaçada e momentânea da endo- $\beta$ -mananase, que agiria localmente, precipitaria isoeletricamente e resolubilizaria em seguida, acontecendo desordenadamente em várias regiões do endosperma ao mesmo tempo, facilitando a drenagem dos produtos desta mobilização para o embrião, que ocorre rapidamente entre o endosperma e o embrião (Buckeridge & Dietrich 1996, Lisboa 2003).

Como a quantidade de açúcares redutores no endosperma é bem maior na ausência do tegumento durante a embebição, sugere-se a participação do tegumento nesse mecanismo de controle da degradação do galactomanano através da endo- $\beta$ -mananase (Tabela 1). Dessa forma, o tegumento estaria interferindo na ação desordenada e espaçada da endo- $\beta$ -mananase no

endosperma, possivelmente através da produção, modificação e/ou armazenamento da enzima.

Sementes maduras e em desenvolvimento de *Ceratonia siliqua* e tomate apresentam ação inibitória do tegumento sobre a produção de endo- $\beta$ -mananase, assim como sementes maduras de *Trigonella foenum-graecum* possuem a produção de endo- $\beta$ -mananase regulada por substâncias inibitórias presentes no endosperma e/ou no tegumento (Kontos & Spyropoulos 1996).

Como conseqüência desse mecanismo de controle, provavelmente a degradação do galactomanano ocorre em “ondas desordenadas”, como sugerido por Lisboa (2003), corroborando a quantidade similar de açúcares redutores entre o endosperma proximal e distal, a distribuição da endo- $\beta$ -mananase por todo o endosperma, observada através do *tissue printing*, e coincidindo com a degradação observada nas secções histológicas, que ocorreu por todas as camadas do tecido (Fig. 16, 18, 20, 25 e Tabela 1).

A influência do tegumento nos níveis de açúcares redutores e no teor de proteínas no endosperma não pode ser observada no período de germinação, provavelmente porque a degradação do galactomanano ocorre somente ao redor da ponta da radícula e o desaparecimento dos corpos protéicos ocorre somente no período pós-germinativo (Fig. 14, 16, 18, 20 e Tabela 1).

Mas como a presença da endo- $\beta$ -mananase ocorre no tegumento principalmente no primeiro e segundo dias após a embebição e a atividade da  $\alpha$ -galactosidase é controlada pelo tecido também durante o período germinativo, sugere-se que o tegumento possa estar interferindo na produção, modificação e/ou armazenamento e utilização das enzimas hidrolíticas já durante a germinação, possivelmente junto com o ABA presente no tecido (Fig. 25, 29, 33 e Tabela 1).

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **7.1. Degradação do galactomanano**

Através dos dados histológicos e bioquímicos conclui-se que o desaparecimento dos corpos protéicos e a degradação do galactomanano ocorram durante o período pós-germinativo por todo o endosperma, com ação conjunta das três enzimas hidrolíticas ( $\alpha$ -galactosidase, endo- $\beta$ -mananase e exo- $\beta$ -manosidase) sobre este último.

A atividade das três enzimas hidrolíticas encontradas no tegumento e no endosperma durante a germinação e pós-germinação, sugere que a síntese destas enzimas possa ocorrer no endosperma, embora não tenha sido possível definir precisamente se somente a camada de aleurona, somente o endosperma ou ambos os tecidos são responsáveis pela síntese das enzimas. Além disso, sugere a participação do tegumento no processo enzimático, através da síntese, modificação e/ou armazenamento das enzimas, especificamente da endo- $\beta$ -mananase que esteve presente por todos os estratos do tecido, principalmente no mesotegumento.

### **7.2. Efeito do ABA**

O ABA exógeno desempenha um efeito desacelerador na degradação do galactomanano, promovendo um retardamento no desaparecimento dos corpos protéicos e na desestruturação das paredes celulares. Ainda, interfere indiretamente na utilização da endo- $\beta$ -mananase, principalmente durante o período pós-germinativo, conseqüentemente, retardando a desintegração do endosperma.

A presença de concentrações elevadas de ABA endógeno no tegumento durante e após a germinação das sementes pode estar interferindo na síntese, modificação e/ou armazenamento das enzimas hidrolíticas presentes no tecido e

nas regiões do endosperma próximas ao tegumento, a fim de modular a degradação do galactomanano, através das enzimas hidrolíticas.

### **7.3. Papel do tegumento**

A detecção de células vivas no endotegumento e a presença da endo- $\beta$ -mananase, da  $\alpha$ -galactosidase, da exo- $\beta$ -manosidase e do ABA endógeno no tecido, sugerem que o tegumento esteja exercendo um papel importante durante o processo germinativo e pós-germinativo em sementes de *Sesbania virgata*, possivelmente junto com o ABA:

- interferindo na produção, modificação e/ou armazenamento das enzimas hidrolíticas, controlando a ação dessas hidrolases durante a germinação e pós-germinação;
- controlando o processo de degradação das proteínas de reserva no endosperma;
- controlando o processo de degradação do galactomanano por todo o endosperma, possivelmente através da ação desordenada e espaçada da endo- $\beta$ -mananase, evitando a produção dos açúcares redutores em excesso durante o período pós-germinativo.

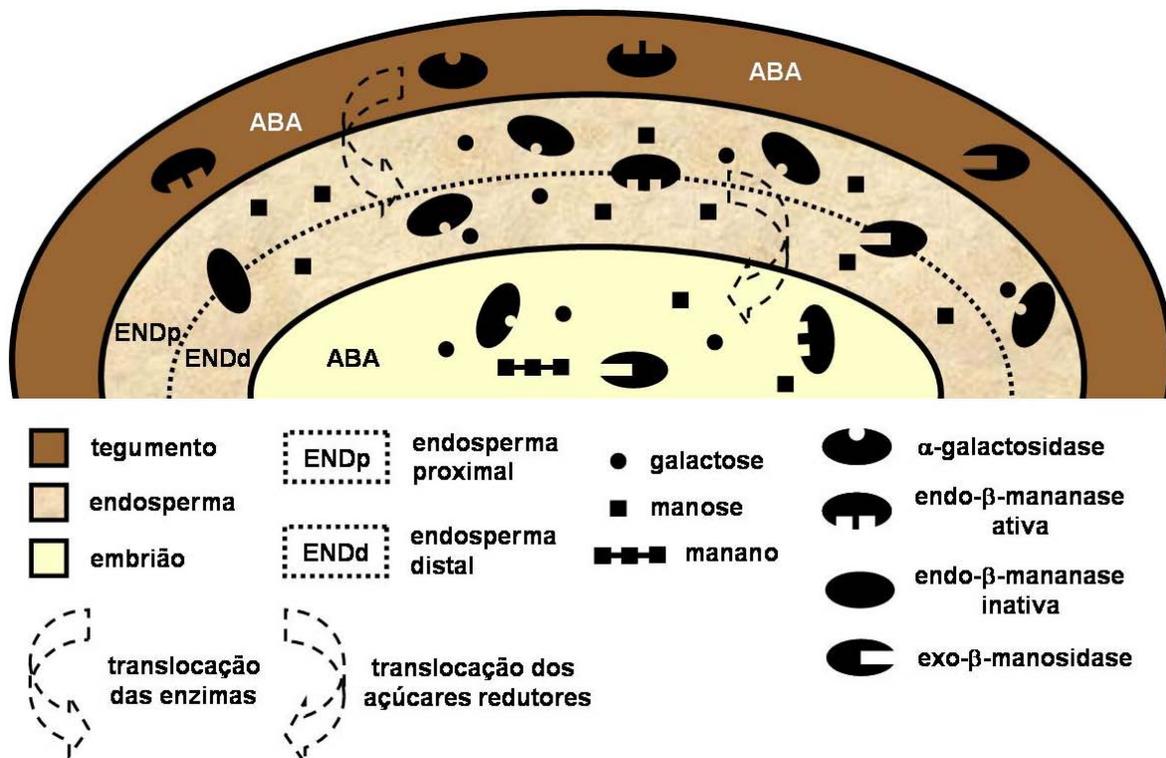
#### 7.4. Modelo sugerido para sementes de *Sesbania virgata*

Em sementes de *Sesbania virgata*, como o ABA, a endo- $\beta$ -mananase, a  $\alpha$ -galactosidase e a exo- $\beta$ -manosidase encontram-se presentes no tegumento durante e após a germinação, pode-se sugerir que este tecido esteja interferindo na produção, modificação e/ou armazenamento das enzimas hidrolíticas durante a germinação e degradação do galactomanano, controlando indiretamente a ação dessas enzimas no endosperma, possivelmente junto com o ABA (Fig. 34).

Pela ação conjunta das enzimas hidrolíticas, liberadas pelo tegumento e, inclusive, produzidas no endosperma, ocorre a degradação do galactomanano por todo o endosperma no período pós-germinativo. Apesar dessa degradação intensa por todas as camadas do endosperma, não ocorre excesso de açúcares redutores no tecido, sugerindo um mecanismo de controle da degradação do galactomanano, que estaria relacionado ao tegumento e, possivelmente, ao ABA (Fig. 34).

Como Lisboa (2003) sugere, na mesma espécie, um mecanismo de controle de degradação do galactomanano através da ação espaçada e momentânea da endo- $\beta$ -mananase, que precipitaria isoeletricamente e resolubilizaria em seguida, de forma desordenada e concomitantemente em várias regiões do endosperma, possivelmente o controle do tegumento sobre a degradação do polímero estaria relacionado a esse mecanismo, interferindo na ação da endo- $\beta$ -mananase, que se encontra presente no tecido (Fig. 34).

Os açúcares redutores liberados durante a degradação do polissacarídeo seriam, dessa forma, transportados e absorvidos pelo embrião eficientemente, sendo utilizados para o crescimento da plântula. Como a endo- $\beta$ -mananase, além das outras enzimas hidrolíticas, podem estar presentes inclusive no cotilédone, parte dos mano-oligossacarídeos podem ser transportados do endosperma para o embrião, onde serão hidrolisados e utilizados diretamente pelo tecido (Fig. 34).



**Figura 34.** Modelo esquemático do controle de degradação do galactomanano através do tegumento e do ABA em sementes de *S. virgata*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMARK, P.; VARGA, A.; MEDVE, J.; HARJUNPÄ, V. & TORBJÖRN, D. 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a  $\beta$ -mannanase. *Journal of Biotechnology* 63:199-210.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. 1997. *Biologia molecular da célula*. Tradução: SIMONETTI, A.B.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; CASIRI, L.C.J.; CORÇÃO, G.; PASQUALI, G.; FERREIRA, H.B.; RODRIGUES, J.J.S.; LIMA, M.C.; VAINSTEIN, M.; MACHADO, R.S.; FARIAS, S.E.; GAIESKY, V.L.S.V.; SCHMITT, V.M. & RAVAZZOLO, A.P. 2<sup>o</sup> ed. Artes Médicas, Porto Alegre. 1294p.
- AQUILA, M.E.A. 1995. Galactomanano e outros açúcares relacionados ao crescimento e morfo-anatomia durante o desenvolvimento do fruto e da semente de *Senna macronthera* (Colladon) var. *nervosa* (Vogel) Irwin & Barneby (Leguminosae). Dissertação de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP.
- BAILEY, R.W. 1971. Polysaccharides in the Leguminosae. *In*: HARBORNE, J.B.; BOULTER, D. & TURNER, B.L. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic Press, Londres. p. 503-541.
- BELTRATI, C.M. & PAOLI, A.A.S. 1989. Morfologia, anatomia e desenvolvimento das sementes e plântulas de *Bauhinia forticata* Link. (Leguminosae - Caesalpinoidea). *Revista Brasileira de Biologia* 49:583-590.
- BELTRATI, C.M. & PAOLI, A.A.S. 2003. Semente. *In*: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. *Anatomia vegetal*. Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 399-424.
- BERRY, T. & BEWLEY, J.D. 1991. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to a germination mode without a requirements for desiccation. *Planta* 186:27-34.
- BEWLEY J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055-1066.

- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. 2<sup>o</sup>ed. Plenum Press, New York. 445p.
- BEWLEY, J.D.; BURTON, R.A.; MOROHASHI, Y. & FINCHER, G.B. 1997. Molecular cloning of a cDNA encoding a (1-4)- $\beta$ -mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta* 203:454-459.
- BLACK, M. 1991. Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. *In: DAVIES, W.J. & JONES, H.G. Abscisic acid physiology and biochemistry.* BIOS Scientific Publisher, Lancaster-UK. p. 99-124.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of rotein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- BUCKERIDGE, M.S. 1988. Galactomananos de sementes de Leguminosas nativas brasileiras: ocorrência e metabolismo. Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, SP.
- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1990. Galactomannan from Brazilian seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13:109-112.
- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science* 117:33-43.
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1994. Purification and properties of a novel  $\beta$ -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 192:502-511.
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1996. Major cell wall polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. *Ciência e Cultura* 48:153-162.
- BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. & LIMA, D.U. 2000a. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. *In: GUPTA, A.K. & KAUR, N. Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation.* Elsevier Science, Amsterdam. p. 283-317.

- BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R. & DIETRICH, S.M.C. 1995a. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. *Revista Brasileira de Botânica* 18:171-175.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2000b. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:141-156.
- BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R.; ROCHA, D.C. & DIETRICH, S.M.C. 1995b. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. *Phytochemistry* 38:871-875.
- BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P. & LIMA, D.U. 2000c. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Edição Especial*, p.137-162.
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. *The Plant Journal* 3:1-30.
- CARPITA, N.C. & McCANN, M.C. 2000. The cell wall. *In*: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. & RUSSEL, R.J. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 3<sup>rd</sup>ed. American Society of Plant Physiologists, Rockville. p. 52-108.
- CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre. p. 51-67.
- CAVAZZA, L. 1950. Recherches sur l'impérmeabilité des graines dures chez les legumineuses. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 60: 596-610.
- CHENG, W-H; ENDO, A.; ZHOU, L.; PENNEY, J.; CHEN, H-C; ARROYO, A.; LEÓN, P.; NAMBARA, E.; ASAMI, T.; MITSUNORI, S.; KOSHIBA, T. & SHEEN, J. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* abscisic acid biosynthesis and glucose signaling. *Plant Cell* 14:2723-2743.

- CHUDZIKOWISKI, R.J. 1971. Guar gum and its applications. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 22:43-60.
- COE, H.S. & MARTIN, J.N. 1920. Sweet - clover seed. US Department of Agricultural Bulletin. 844.
- CORNER, E.J.H. 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology* 1:117-150.
- CORNER, E.J.H. 1976. The seeds of Dicotyledons. Vol. 1 e 2. Cambridge University Press, Cambridge. 311/552p.
- COSGROVE, D.J. 1999. Enzymes and others agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:391-417.
- CROCKER, W.J. & BARTON, L.V. 1953. Physiology of seeds. An introduction to the experimental study of the seed and germination problems. Volume 29. Waltham, Mass., Chronica Botanica Company.
- CROCKER, W.J. & DAVIS, W.E. 1914. Delayed Germination in seeds of *Alisma plantago*. *Botanical Gazette* 58:285-321.
- DAHAL, P.; NEVINS, D.J. & BRADFORD, K. 1997. Relationship of endo- $\beta$ -mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates. *Plant Physiology* 113:1243-1252.
- DEA, I.C.M. & MORRISON, A. 1975. Chemistry and Interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 31:241-312.
- DEA, I.C.M.; MORRIS, E.R.; REES, D.A.; WELSH, E.J.; BARNES, H.A. & PRICE, J. 1977. Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides and related systems. *Carbohydrate Research* 57:249-272.
- DEBEAUJON, I. & KOORNNEEF, M. 2000. Gibberellin requirement for arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology* 122:415-424.

- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPPERT, M. & LIENHARD, M. 1962. The tetrazolium test seed viability. Mississippi Agricultural and Forestry Experimental Station Technical Bulletin 51:1-63.
- DEVIC, M.; GUILLEMINOT, J.; DEBEAUJON, I.; BECHTOLD, N.; BENSUADE, E.; KOORNNEEF, M.; PELLETIER, G. & DELSENY, M. 1999. The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *The Plant Journal* 19:387-398.
- DIRK, L.M.A.; GRIFFEN, A.M.; DOWNIE, B. & BEWLEY, J.D. 1995. Multiple isozymes of endo- $\beta$ -D-mannanase in dry and imbibed seeds. *Phytochemistry* 40:1045-1056.
- DONG, J.; KELLER, W.A.; YAN, W. & GEORGES, F. 2004. Gene expression at early stages of *Brassica napus* seed development as revealed by transcript profiling of seed-abundant cDNAs. *Planta* 218:483-491.
- DOP, P. & GAUTIÉ, A. 1928. *Manuél de technique botanique*. 2<sup>o</sup>ed. Journal of Lamarre, Paris. 591p.
- DOWNIE, B.; GURUSINGHE, S. & BRADFORD, K.J. 1999. Internal anatomy of individual tomato seeds: relationship to abscisic acid and germination physiology. *Seed Science Research* 9:117-128.
- DULSON J.; BEWLEY J.D. & JOHNSON R.H. 1988. Abscisic acid is an endogenous inhibitor in the regulation of mannanase production by isolated lettuce endosperms. *Plant Physiology* 87:660-665.
- EDWARDS, M.; BULPIN, P.V.; DEA, I.C.M. & REID, J.S.G. 1989. Biosynthesis of legume-seed galactomannans in vitro. *Planta* 178:41-51.
- EDWARDS, M.; MARSHALL, E.; GIDLEY, M.J. & REID, J.S.G. 2002. Transfer specificity of detergent-solubilized fenugreek galactomannan galactosyltransferase. *Plant Physiology* 129:1-7.
- ESAU, K. 1974. *Anatomia das plantas com sementes*. Tradução: MORRETES, B.L. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 293p.
- ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E. & CARRON, M.P. 1993. Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-

- acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Science* 88:91-96.
- FEURTADO, J.A. 1999.  $\alpha$ -Galactosidase and  $\beta$ -mannoside mannohydrolase in tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Trust). Tese de Mestrado. University of Guelph, Canada.
- FEURTADO, J.A.; BANIK, M. & BEWLEY, J.D. 2001. The cloning and characterization of  $\alpha$ -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *Journal of Experimental Botany* 52:1239-1249.
- FEURTADO, J.A.; AMBROSE, S.J.; CUTLER, A.J.; ROSS, A.R.S.; ABRAMS, S.R. & KERMODE, A.R. 2004. Dormancy termination of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds is associated with changes in abscisic acid metabolism. *Planta* 218:630-639.
- FINKELSTEIN, R.R. & LYNCH, T.J. 2000. Abscisic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiology* 122:1179-1186.
- FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L. & ROCK, C.D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14:S15-S45.
- FRANCO, T.T.; RODRIGUES, N.R.; SERRA, G.E.; PANEGASSI, V.R. & BUCKERIDGE, M.S. 1996. Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legume seeds and the formation of aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 680: 255-261.
- FREUND, H. 1970. *Handbuch der mikroskopie in der technik*. Band V. Tell 1. Frankfurt.
- FREY, A.; GODIN, B.; BONNET, M.; SOTTA, B. & MARION-POLL, A. 2004. Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 218:958-964.

- GARCIARRUBIO, A.; LEGARIA, J.P. & COVARRUBIAS, A.A. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203:182-187.
- GIORGINI, J.F. & COMOLI, E. 1996. Effect of embryo and exogenous GA<sub>3</sub> on endospermic endo-β-mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8:43-49.
- GLICKSMANN, M. 1962. Utilization of natural polysaccharide gums in the food industry. *Advances in Food Research* 11:109-200.
- GREUTER, W.; McNEILL, J.; BARRIE, F.R.; BURDET, H.M.; DEMOULIN, V.; FILGUEIRAS, T.S.; NICOLSON, D.H.; SILVA, P.C.; SKOG, J.E.; TREHANE, P.; TURLAND, N.J. & HAWKSWORTH, D.L. 2003. Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Código de Saint Louis). Tradução: PRADO, J. & BICUDO, C.E.M. Instituto de Botânica, International Association for Plant Taxonomy, Sociedade Botânica de São Paulo, São Paulo. 162p.
- GROOT, S.P.C. & KARSSSEN, C.M. 1987. Gibberellins regulate seed-germination in tomato by endosperm weakening - a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* 171:525-531.
- GROOT, S.P.C. & KARSSSEN, C.M. 1992. Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds - studies with the *sitiens* mutant. *Plant Physiology* 99:952-958.
- GROOT, S.P.C.; KIELISZEWSKA-ROKICKIA, B.; VERMEER, E. & KARSSSEN, C.M. 1988. Gibberellins-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle emergence. *Planta* 174:500-504.
- GUZMÁN, J.M. & HERNANDEZ, G.L. 1982. Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corumbosa* (L.) Raf., Convolvulaceae. *Phyton* 42:1-8.
- HALMER, P. & BEWLEY, J.D. 1979. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. *Planta* 144:333-340.
- HAMLY, D.H. 1932. Softening of the seed of *Melilotus alba*. *Botanical Gazette* 93:345-375.

- HARA, M.; ETO, H. & KUBOI, T. 2001. Tissue printing for myrosinase activity in roots of turnip and Japanese radish and horseradish: a technique for localizing myrosinases. *Plant Science* 160:425-431.
- HAUPT, A.W. 1930. A gelatin fixative for paraffin sections. *Stain Technology* 5:97-98.
- HILHORST, H.W.M. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research* 5:61-75.
- HILHORST, H.W.M. & DOWNIE, B. 1996. Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum*) studies with the *sitiens* mutant. *Journal of Experimental Botany* 47:89-97.
- HYDE, E.O.C. 1954. The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and permeability of the testa. *Annals of Botany N.S.* 18:241-256.
- IGLESIAS, R.G. & BABIANO, M.J. 1997. Endogenous abscisic acid during the germination of chick-pea seeds. *Physiologia Plantarum* 100:500-504.
- JARVIS, M.C. & MCCANN, M.C. 2000. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts and methodology. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:1-13.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A. & STEVENS, P.F. 1999. *Plant Systematics. A phylogenetic approach.* Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 464p.
- KARNOVISKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-13.
- KARSSEN, C.M. 1995. Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. *In: KIGEL, J. & ALILI, G. Seed Development and Germination.* Marcel Dekker, New York. p. 333-350.
- KISSMANN, K.G. & GROTH, D. 1999. *Plantas infestantes e nocivas.* Tomo II. BASF, São Paulo. p. 947-950.
- KONTOS, F. & SPYROPOULOS, C.G. 1995. Production and secretion of  $\alpha$ -galactosidase and endo- $\beta$ -mannanase activity by carob (*Ceratonia siliqua* L.) in the endosperm protoplast. *Journal of Experimental Botany* 46:577-583.

- KONTOS, F. & SPYROPOULOS, C.G. 1996. Seed coat inhibits the production of  $\alpha$ -galactosidase and endo- $\beta$ -mannanase in the endosperm of developing carob seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 34:787-793.
- LABEL, P.; SOTTA, B. & MIGINIAC, E. 1989. Endogenous levels of abscisic acid and indole-3-acetic acid during in vitro rooting of wild cherry explants produced by micropropagation. *Plant Growth Regulators* 8:325-333.
- LABOURIAU, L.G. 1983. A germinação das sementes. Secretaria-geral da Organização dos Estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Washington. 173p.
- LAVIN, M. 1987. A cladistic analysis of the tribe Robinieae (Papilionoideae, Leguminosae). *In*: STIRTON, C.H. Advances in legume systematics. Parte 3. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 31-64.
- LEÓN, P. & SHEEN, J. 2003. Sugar and hormone connections. *TRENDS in Plant Science* 8:110-116.
- LE PAGE-DEGIVRY, M.T. & GARELLO, G. 1992. *In situ* abscisic acid synthesis: a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* 98:1386-1390.
- LERSTEN, W.R. & CURTIS, J.D. 1988. Secretory reservoirs (ducts) of two kinds in giant ragweed (*Ambrosia trifida* - Asteraceae). *American Journal of Botany* 75:1313-1323.
- LEUBNER-METZGER, G. 2002. Seed after-ripening and over-expression of class I  $\beta$ -1,3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta* 215:959-968.
- LEUBNER-METZGER, G.; FRUNDT, C.; VOGELI-LANGE, R. & MEINS, F.Jr. 1995. Class I  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiology* 109:751-759.
- LEUNG, D.W.M. & BEWLEY, J.D. 1983. A role for  $\alpha$ -galactosidase in the degradation of the endosperm cell walls of lettuce seeds, cv. Grand Rapids. *Planta* 157:274-277.

- LEVIATOV, S.; SHOSEYOV, O. & WOLF, S. 1995. Involvement of endo mannanase in the control of tomato seed germination under low temperature conditions. *Annals of Botany* 76:1-6.
- LIMA, D.U.; OLIVEIRA, R.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2003. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking. *Carbohydrate Polymers* 52:367-373.
- LISBOA, C.G.S. 2003. Endo- $\beta$ -mannanase de endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.: purificação, caracterização e importância na germinação e desenvolvimento da plântula. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- MALEK, L. & BEWLEY, J.D. 1991. Endo- $\beta$ -mannanase activity and reserve mobilization in excised endosperms of fenugreek is affected by volume of incubation and abscisic acid. *Seed Science Research* 1:45-49.
- MANZI, A.E. & CERESO, A.S. 1984. The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of seed of *Gleditsia triacanthos*. *Carbohydrate Research* 134:115-131.
- MARRACCINI, P.; ROGERS, W.J.; ALLARD, C.; ANDRÉ, M-L.; CAILLET, V.; LACOSTE, N.; LAUSANNE, F. & MICHAUX, S. 2001. Molecular and biochemical characterization of endo- $\beta$ -mannanases from germination coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213:296-308.
- MATZKE, A.J.M.; STOGER, E.M. & MATZKE, M.A. 1993. A zein gene promoter fragment drives GUS expression in a cell layer that is interposed between the endosperm and the seed coat. *Plant Molecular Biology* 22:553-554.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975. The germination of seeds. 2<sup>o</sup> ed. Pergamon Press, Oxford. 192p.
- McCANN, M.C. & ROBERTS, K. 1991. Architecture of the primary wall. *In*: LLOYD, C.W. The cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic Press, Londres. p. 109-129.

- McCARTNEY, L. & KNOX, P. 2002. Regulation of pectin polysaccharide domains in relation to cell development and cell properties in the pea testa. *Journal of Experimental Botany* 53:707-713.
- McCARTY, D.R. 1995. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46:71-93.
- McCLEARY, B.V. 1983. Enzymic interaction in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- $\beta$ -mannanase. *Phytochemistry* 22:649-658.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1974.  $\alpha$ -D-galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 13:1747-1757.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1975. Galactomannan structure and  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase activity in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 14:1187-1194.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1976. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 15:43-47.
- McCLEARY, B.V.; TARVEL, F.R. & CHEETHAM, N.W.H. 1982. Preparative isolation and characterization of 6(1)- $\alpha$ -D-galactosyl-(1-4)- $\beta$ -D-mannobiose and 6(2)- $\alpha$ -D-galactosyl-(1-4)- $\beta$ -D-mannobiose *Carbohydrate Research* 104:285-297.
- McCLENDON, J.H.; NOLAN, W.G. & WENZLER, H.F. 1976. The role of the endosperm in the germination of legumes: galactomannan, nitrogen, and phosphorus changes in the germination of guar (*Cyamopsis tetragonolobus*, Leguminosae). *American Journal of Botany* 63:790-797.
- McDONALD, M.B.Jr.; VERTUCCI, C.W. & ROOS, E.E. 1988. Seed coat regulation of soybean seed imbibition. *Crop Science* 28:987-992.
- MEIER, H. 1958. On the structure of cell walls and cell walls mannans from ivory nuts from dates. *Biochemica et Biophysica Acta* 28:229-240.

- MELO-PINNA, G.F.A.; NEIVA, M.S.M. & BARBOSA, D.C.A. 1999. Estrutura do tegumento seminal de quatro espécies de Leguminosae (Caesalpinioideae), ocorrentes numa área de caatinga (PE-Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 22:375-379.
- MO, B. & BEWLEY, J.D. 2002.  $\beta$ -mannosidase (E. C. 3.2.1.25) activity during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. Purification, cloning and characterization. *Planta* 215:141-152.
- MO, B. & BEWLEY, J.D. 2003. The relationship between  $\beta$ -mannosidase and endo- $\beta$ -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of populations and individual seeds. *Journal of Experimental Botany* 54:2503-2510.
- MOE, O.A.; MILLER, S.E. & IWEN, M.H. 1947. Investigation of the reserve carbohydrate of leguminous seeds. I. Periodate oxidation. *Journal of the American Chemical Society* 69:2621-2825.
- NADELMANN, H. 1890. Über die Schleimendosperme der Leguminosen. *Pringsheims Jahrb Wissenschaft Botany* 21:1-83.
- NAMBARA, E. & MARION-POLL, A. 2003. ABA action and interactions in seeds. *TRENDS in Plant Science* 8:213-217.
- NEUKOM, H. 1989. Galactomannans: properties and applications. *Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie* 22:41-45.
- NIKUS, J.; DANIEL, G. & JONSSON, L.M.V. 2000. Subcellular localization of  $\beta$ -glucosidase in rye, maize and wheat seedlings. *Physiology Plantarum* 111:466-472.
- NOMAGUCHI, M.; NONOGAKI, H. & YUKIO, M. 1995. Development of galactomannan-hydrolyzing in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior germination. *Physiologia Plantarum* 94:105-109.
- NONOGAKI, H. & MOROHASHI, Y. 1996. An endo- $\beta$ -mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiology* 110:555-559.

- NONOGAKI, H. & MOROHASHI, Y. 1999. Temporal and spatial pattern of the development of endo- $\beta$ -mannanase activity in germinating and germinated lettuce seeds. *Journal of Experimental Botany* 50:1307-1313.
- NONOGAKI, H.; GEE, O.H. & BRADFORD, K.J. 2000. A germination-specific endo- $\beta$ -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology* 123:1235-1245.
- NONOGAKI, H.; MATSUSHIMA, H. & MOROHASHI, Y. 1992. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. *Physiologia Plantarum* 85:167-172.
- NONOGAKI, H.; NOMAGUCHI, M.; MOROHASHI, Y. & MATSUSHIMA, H. 1998. Development and localization of endo- $\beta$ -mannanase in the embryo of germinating and germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany* 49: 1501-1507.
- ORFILA, C. & KNOX, J.P. 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiology* 122:775-782.
- PERCY, J.D.; PHILIP, R. & VODKIN, L.O. 1999. A defective seed coat pattern (Net) is correlated with the post-transcriptional abundance of soluble proline-rich cell wall proteins. *Plant Molecular Biology* 40:603-613.
- PERES, L.E.P. 1998. Relações hormonais endógenas envolvidas na conversão direta de ápices radiculares isolados de *Cataetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) em protocormóides. Dissertação de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP.
- PERES, L.E.P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. & ZAFFARI, G.R. 1997. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 9:169-176.
- POTOMATI, A. 2000. Efeito do ácido abscísico sobre a mobilização de galactomanano e o desenvolvimento do embrião em sementes de *Sesbania*

- marginata* Benth.. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- POTOMATI, A. & BUCKERIDGE, M.S. 2002. Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:303-310.
- PRAKASH, N. 1987. Embryology of the Leguminosae. *In*: STIRTON, C.H. *Advances in legume systematics. Parte 3.* Royal Botanic Gardens, Kew. p. 241-262.
- QIN, Z.Z. 1990. Changes and endogenous abscisic acid levels in rice embryo and endosperm association with development and germination. *Acta Botanica Sinica* 32:448-455.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. 1999. *Biology of plants.* 6<sup>o</sup>ed. W.H. Freeman and Company, New York. 944p.
- REID, J.S.G. 1971. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). *Planta* 100:131-142.
- REID, J.S.G. 1985a. Cell wall storage carbohydrates in seeds. *Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses.* *Advances in Botanical Research* 11:125-155.
- REID, J.S.G. 1985b. Galactomannans. *In*: DEY, P.M. & DIXON, R.A. *Biochemistry of storage carbohydrate in green plants.* Academic Press, London. p. 265-288.
- REID, J.S.G. 1985c. Structure and function in legume-seed polysaccharides. *In*: BRETT, C. & HILMAN, J.R. *Biochemistry of plant cell walls.* Cambridge University Press, Cambridge. p. 259-268.
- REID, J.S.G. & BEWLEY, J.D. 1979. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserve in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic leguminous seed. *Planta* 147:145-150.
- REID, J.S.G. & EDWARDS, M. 1995. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. *In*: STEPHEN, A.M. *Food polysaccharides and their applications.* Marcel Dekker, New York. p. 155-186.

- REID, J.S.G. & MEIER, H. 1970. Chemotaxonomic aspects of the reserve galactomannan in leguminous seeds. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 62:89-92.
- REID, J.S.G. & MEIER, H. 1972. The function of the aleurone layer during galactomannan mobilization in germination seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta* 106:44-60.
- REID, J.S.G. & MEIER, H. 1973. Enzymic activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of  $\alpha$ -galactosidases and  $\beta$ -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112:301-308.
- REID, J.S.G.; DAVIES, C. & MEIER, H. 1977. Endo- $\beta$ -mannanase, the leguminous aleurone layer and the storage galactomannan in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. *Planta* 133:219-222.
- RICHTER, H.G. 1981. Wood and bark anatomy of Lauraceae. I. *Aniba* Aublet. *IAWA Bulletin n.s.* 2:79-87.
- SANTOS, H.P. 2002. Importância ecofisiológica da reserva de xiloglucano e o controle de sua mobilização em cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. Dissertação de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- SANTOS, H.P.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. & BUCKERIDGE, M.S. 2004. The control of storage xyloglucan mobilization in cotyledons of *Hymenaea courbaril*. *Plant Physiology* 135:287-299.
- SCHUURINK, R.C.; SEDEE, N.J.A. & WANG, M. 1992. Dormancy of the barley grain is correlated with gibberellic acid responsiveness of the isolated aleurone layer. *Plant Physiology* 100:1834-1839.
- SEILER, A. 1977. Galaktomannanabbau in keimenden Johannisbrotsamen (*Cerantonia siliqua* L.). *Planta* 134:209-221.
- SEKHAR, K.N.C. & DeMASON, D.A. 1990. Identification and immunocytochemical localization of  $\alpha$ -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181:53-61.

- SERRATO-VALENTI, G.; CORNARA, L.; MODENESI, P.; PIANA, M. & MARIOTTI, M.G. 2000. Structure and histochemistry of embryo envelope tissues in the mature dry seed and early germination of *Phacelia tanacetifolia*. *Annals of Botany* 85:625-634.
- SOMME, R. 1968. The structure of a galactomannan from *Medicago Lupulina* L.. *Acta Chemica Scandinavica* 22:537-545.
- SOMOGYI, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160:61-63.
- SPURNÝ, M. 1973. The imbibition process. In: HEYDECKER, W. *Seed ecology*. Butterworths, Londres. 578p.
- SPYROPOULOS, C.G. & REID, J.S.G. 1985. Regulation of  $\alpha$ -galactosidase activity and the hydrolases of galactomannan in the endosperm of the fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed. *Planta* 166:271-275.
- SPYROPOULOS, C.G. & REID, J.S.G. 1988. Water stress and galactomannan breakdown in germinated fenugreek seeds. Stress affects the production and activities *in vivo* of galactomannan hydrolysing enzymes. *Planta* 179:403-408.
- SUGIMOTO, N.; TAKEDA, G.; NAGATO, Y. & YAMAGUCHI, J. 1998. Temporal and spatial expression of the  $\alpha$ -amylase gene during seed germination in rice and barley. *Plant Cell Physiology* 39:323-333.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. Tradução: SANTARÉM, E.R.; MARIATH, J.E.A.; ASTARITA, L.V.; DILLENBURG, L.R.; ROSA, L.M.G. & OLIVEIRA, P.L. 3<sup>o</sup>ed. Artmed, Porto Alegre. 719p.
- TINÉ, M.A.S. 1997. Mobilização do xiloglucano de reserva em sementes de *Hymenaea courbaril* L. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- TOOKEY, H.L.; LOHMAR, R.L. & WOLFF, I.A. 1962. New sources of seed mucilages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 10:131-133.
- TOOROP, P.E.; BEWLEY, J.D. & HILHORST, H.W.M. 1996. Endo- $\beta$ -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta* 200:153-158.

- TOOROP, P.E.; VAN, A.A.C. & HILHORST, H.W.M. 2000. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germinations is under control of ABA. *Journal of Experimental Botany* 51:1371-1379.
- TOOROP, P.E.; BEWLEY, J.D.; ABRAMS, S.R. & HILHORST, H.W.M. 1999. Structure-activity studies with ABA analogs on germination and endo- $\beta$ -mannanase activity in tomato and lettuce seeds. *Journal of Plant Physiology* 154:679-685.
- TRANBARGER, T.J. & MISRA, S. 1996. Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotzain) from Douglas fir. *Gene* 172:221-226.
- TREWAVAS, A. 1981. How do plant growth substances work? *Plant, Cell and Environment* 4:203-228.
- UNRAU, A.M. 1961. The constitution of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Organic Chemistry* 26:3097-3101.
- VAN STADEN, J.; MANNING, J.C. & DICKENS, C.W.S. 1987. A phylogenetic analysis of the role of plant hormones in the development and germination of legume seeds. *In*: STIRTON, C.H. *Advances in legume systematics*. Parte 3. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 387-432.
- VOIGT, B. & BEWLEY, J.D. 1996. Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and post-germinative endo- $\beta$ -mannanase: responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. *Planta* 200:71-77.
- WANG, M.; HEIMOVAARA-DIJKSTRA, S. & VAN DUIJN, B. 1995. Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta* 195:586-592.
- WELBAUM, G.E.; MUTHUI, W.J.; WILSON, J.H.; GRAYSON, R.I. & FELL, R.D. 1995. Weakening of muskmelon perisperm envelope tissue during germination. *Journal of Experimental Botany* 46:391-400.

- WERKER, E. 1980. Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. *Israel Journal of Botany* 29:22-44.
- WERKER, E.; DAFNI, A. & NEGBI, M. 1973. Variability in *Prosopis farcata* in Israel: anatomical features of the seed. *Botanical Journal of the Linnean Society* 66:223-239.
- WHISTLER, R.L. & SMART, C.L. 1953. Polysaccharide. Chemistry Academic Press, New York.
- WHITNEY, S.E.C.; BRIGHAM, J.E.; DARKE, A.H.; REID, J.S.G. & GIDLEY, M.J. 1998. Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose. *Carbohydrate Research* 307:299-309.
- WILLATS, W.G.T.; MCCARTNEY, L. & KNOX, J.P. 2001. In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 213:37-44.
- YAMADA, K. 1984. Changes in the level of endogenous abscisic acid in barley during germination and use of abscisic acid in malting. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 42:79-84.
- YIM, K.O. & BRADFORD, K.J. 1998. Callose deposition is responsible for apoplastic semipermeability of the endosperm envelope of muskmelon seeds. *Plant Physiology* 118:83-90.
- ZAMBOU, K. & SPYROPOULOS, C.G. 1990. D-Galactose uptake by fenugreek cotyledons. Effect of water stress. *Plant Physiology* 93:1417-1421.
- ZAMBOU, K.; SPYROPOULOS, C.G.; CHINO, I. & KONTOS, F. 1993. Saponin-like substances inhibit  $\alpha$ -galactosidase production in the endosperm galactomannan degradation. *Planta* 189:207-212.
- ZAYAT, A.G. 1996. Termibiologia da germinação de sementes de *Sesbania virgata* (Fabaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, SP.
- ZHU, A. & GOLDSTEIN, J. 1994. Cloning and functional expression of DNA encoding coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. *Gene* 140:227-231.

ZPEVAK, F.A. 1999. Efeitos de diferentes condições hídricas na embebição, germinação e crescimento inicial de *Dimorphandra mollis* Benth. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP.