



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PATRÍCIA PINHO TONINI

CONEXÃO ENTRE OS PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO DAS
RESERVAS DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS E O EFEITO
DOS HORMÔNIOS E AÇÚCARES EM SEMENTES DE
Sesbania virgata (CAV.) PERS.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PATRÍCIA PINHO TONINI
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Campinas, 2008

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

T614c

Tonini, Patrícia Pinho

Conexão entre os processos de degradação das reservas de proteínas e carboidratos e o efeito dos hormônios e açúcares em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. / Patrícia Pinho Tonini. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ácido abscísico. 2. Etileno. 3. Glucose. 4. Galactomanano. 5. Proteínas de reserva. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Connection between storage proteins and carbohydrates degradation and the effects of hormones and sugars in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

Palavras-chave em inglês: Absciscic acid; Ethylene; Glucose; Galactomannan; Storage proteins.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Marcos Silveira Buckeridge, Claudio José Barbedo, Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Marco Aurélio Silva Tiné, Angelo Luiz Cortelazzo.

Data da defesa: 05/12/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

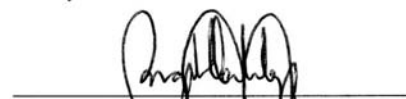
Campinas, 05 de dezembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

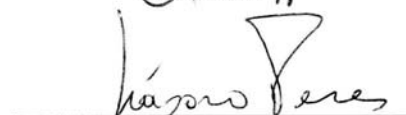
Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)


Assinatura

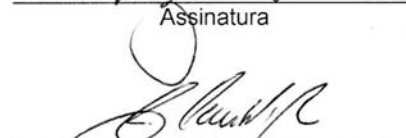
Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo


Assinatura

Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Jose Barbedo


Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Silva Tiné


Assinatura

Profa. Dra. Helenice Mercier

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos

Assinatura

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos." Albert Einstein

Aos meus pais, Marcio e Graça, pelo amor,
carinho, dedicação e principalmente paciência e
compreensão nos momentos difíceis.

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!

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

Aos meus avós e todos os familiares que estiveram sempre ao meu lado, me ajudando sempre que possível, em especial à prima e amiga Joyce!

Às minhas amigas da faculdade Patrícia Gaya, Elaine Cristina 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, sem ao menos entender o que faço!

Aos meus amigos e companheiros do Colégio ESI São José, agradeço a todos os professores, coordenadoras e diretora pela ajuda e confiança!

Às minhas companheiras que conheci nesta estrada científica e se tornaram grandes amigas pessoais, me apoiando em todos os momentos: Kelly e Aline.

Ao pessoal do Departamento de Botânica da USP, que apesar do pouco tempo de convivência, sempre estiveram dispostos a me ajudar. Agradeço a Alessandra

Aline Bertinatto, Ana Maria, Auri, Camila, Cássia, Cíntia, Flávia, Ingrid, Laura, Lia, Luciano e Thaís.

Ao pessoal dos intermináveis e proveitosos chábaveros, ao “Buck`s group”: Adriana Grandis, Adriana Yepes, Aline Cavalari, Amanda, Andréa, Giovanna, Ivan, Leila, Marabá, Mari, Simone, Wanderley e aos novos alunos que estão entrando agora.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto por toda a ajuda cedida durante o doutorado, disponibilizando seu laboratório para as dosagens de ABA e etileno e contribuindo cientificamente na elaboração da tese.

Ao pessoal da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica por estar ao meu lado e me ajudar sempre que possível. Agradeço ao Fabinho, Fernanda M., Fernanda K., Juliana, Kelly, Ludmila, Marina, Rodrigo, Tatiana, Vanessa e muitos outros! Ao pessoal de apoio, D. Helena, Mari, Cida e Sirlei. E a todos os pesquisadores, em especial ao Dr. Marco Aurélio Tiné, à Dra. Marília Gaspar e à Dra. Márcia Braga.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, aos professores do departamento de Biologia Celular e em especial à Lília Panagio, da secretaria do mesmo departamento!

Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, Prof. Dr. Marco Aurélio Tiné e Prof. Dr. Ricardo Azevedo pelas sugestões e contribuições no presente trabalho.

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

SUMÁRIO

ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	18
1. SEMENTES.....	18
1.1. Tegumento	19
1.2. Endosperma	22
1.3. Embrião	22
2. GERMINAÇÃO E PÓS-GERMINAÇÃO	23
3. RESERVA DAS SEMENTES	24
3.1. PROTEÍNAS.....	25
3.2. CARBOIDRATOS.....	28
4. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE PAREDE CELULAR	31
5. GALACTOMANANOS	32
5.1. Estrutura dos galactomananos.....	33
5.2. Propriedades dos galactomananos	34
5.3. Degradação dos galactomananos	36
6. REGULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS.....	42
6.1. Efeito do ABA	43
6.2. Efeito do etileno.....	45
6.3. Efeito dos açúcares	46
6.4. Interação entre as vias de sinalização.....	48
7. A ESPÉCIE <i>Sesbania virgata</i>	51
7.1. Sinônimos e nomes vulgares	53
7.2. Origem e distribuição.....	53
7.3. Características gerais.....	55
7.4. Justificativa para o uso da espécie.....	55
OBJETIVOS	56

CONEXÃO ENTRE OS PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS EM SEMENTES DE *Sesbania virgata* (CAV.)

PERS.	57
1. Resumo	58
2. Introdução	59
3. Material.....	62
4. Métodos.....	62
4.1. Efeito de inibidores de transcrição e tradução sobre a degradação das reservas, produção e atividade das hidrolases (α -galactosidase).....	63
4.1.1. Determinação do peso seco do endosperma	63
4.1.2. Extração e determinação das proteínas totais e da atividade das hidrolases (α -galactosidase)	63
4.1.3. Detecção das hidrolases (α -galactosidase).....	64
4.1.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	65
4.1.3.2. <i>Western immunoblotting</i>	66
5. Resultados/ Discussão	67
5.1. Efeito de inibidores de transcrição e tradução sobre a degradação das reservas.....	67
5.2. Efeito de inibidores de transcrição e tradução sobre a degradação das proteínas totais, produção e atividade das hidrolases (α -galactosidase)	73
5.2.1. Degradação das proteínas totais.....	73
5.2.2. Atividade das hidrolases (α -galactosidase).....	76
5.2.3. Detecção das hidrolases (α -galactosidase).....	80
6. Conclusões.....	86
7. Referências bibliográficas	89
EFEITO DO ABA E ETILENO DURANTE O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS EM SEMENTES DE <i>Sesbania virgata</i> (CAV.) PERS.	101
1. Resumo	102

2. Introdução	103
3. Material.....	105
4. Métodos.....	106
4.1. Efeito do ABA e etileno sobre os teores de proteínas totais e atividade das hidrolases (α -galactosidase)	107
5. Resultados/Discussão	108
5.1. Efeito do ABA e etileno sobre os teores de proteínas totais e atividade das hidrolases (α -galactosidase)	108
5.1.1. Teores de proteínas totais.....	112
5.1.2. Atividade das enzimas hidrolíticas (α -galactosidase).....	115
6. Conclusões.....	119
7. Referências bibliográficas	122
EFEITO DOS AÇÚCARES SOBRE O ABA E O ETILENO DURANTE O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS EM SEMENTES DE <i>Sesbania virgata</i> (CAV.) PERS.	131
1. Resumo	132
2. Introdução	133
3. Material.....	136
4. Métodos.....	136
4.1. Efeitos dos açúcares nos níveis endógenos de etileno	136
4.2. Efeitos dos açúcares nos níveis endógenos de ABA	137
4.3. Níveis endógenos de glucose e sacarose nas sementes.....	138
5. Resultados/Discussão	139
5.1. Efeitos dos açúcares nos níveis endógenos de ABA	139
5.2. Efeitos dos açúcares nos níveis endógenos de etileno	147
5.3. Níveis endógenos de glucose e sacarose nas sementes.....	151
6. Conclusões.....	153
7. Referências bibliográficas	155
DISCUSSÃO GERAL	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169

RESUMO

Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. acumulam suas reservas de carbono no endosperma na forma de um polissacarídeo de parede celular, o galactomanano. A mobilização deste ocorre após a germinação e envolve três enzimas hidrolíticas, dentre elas a α -galactosidase. Além da reserva de carbono, há uma grande quantidade de corpos protéicos, no citoplasma das células endospermicas, que constituem a principal reserva de nitrogênio nestas sementes. Para que ocorra a correta distribuição dos produtos de degradação das reservas deve haver sincronização entre os processos de degradação das reservas de carbono e nitrogênio, porém para compreender tais mecanismos, é necessário estudar aspectos do controle da produção e ação das enzimas responsáveis pela hidrólise das reservas. Buscando determinar em que ponto do metabolismo a semente de *S. virgata* se encontra em relação à produção destas enzimas hidrolíticas, durante e após a germinação, e supostamente os tecidos envolvidos nesta produção, sementes desta espécie foram embebidas em actinomicina-D (inibidor de transcrição) e cicloheximida (inibidor de tradução) e os efeitos destes inibidores verificados através da atividade e detecção da α -galactosidase no tegumento e endosperma destas sementes. Além disso, buscando verificar e relacionar o efeito do ácido abscísico, do etileno e dos açúcares na degradação das reservas após a germinação de *S. virgata*, sementes desta espécie foram embebidas em ABA, etileno, glucose e sacarose, e os efeitos destes foram verificados através dos teores protéicos, da atividade da α -galactosidase e da produção endógena de ABA e etileno nestas sementes. Como a presença de actinomicina-D e cicloheximida não inibiram a produção e a atividade da α -galactosidase no endosperma durante e após a germinação, sugere-se que a produção desta enzima ocorra principalmente durante a maturação da semente. Aparentemente, a partir do período pós-germinativo, a enzima pré-formada seria processada e ativada, para conseqüente degradação dos galactomananos, através de um processo proteolítico. Em contrapartida, como a presença de

actinomicina-D e cicloheximida inibiram a degradação das proteínas de reserva no tegumento e endosperma e, inclusive, induziram a atividade da α -galactosidase nestes tecidos no final do processo de degradação dos galactomananos, sugere-se a síntese *de novo* de proteases durante e após a germinação e a relação íntima destas enzimas com a degradação das proteínas de reserva e da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos. Quanto aos hormônios, a presença de ABA exógeno retardou o início da degradação das proteínas de reserva no endosperma, assim como diminuiu a atividade da α -galactosidase no mesmo tecido no final do processo de degradação do galactomanano, sugerindo um efeito modulador deste hormônio durante a degradação das reservas, reprimindo a ação das enzimas hidrolíticas. A presença de etileno exógeno, entretanto, aumentou a atividade da α -galactosidase no endosperma e, inclusive, no tegumento no final do processo de degradação do galactomanano, sugerindo um efeito indutor deste hormônio na ativação e ação das enzimas hidrolíticas. De fato, analisando a produção endógena de ABA e etileno, observou-se um aumento brusco dos hormônios no período de mobilização das reservas, que pode estar relacionado à influência destes hormônios na atividade das enzimas hidrolíticas em sementes de *S. virgata*. Ainda, como ocorreram mudanças na produção de ABA e etileno endógeno na presença de glucose e sacarose, sugere-se uma relação íntima entre a via de sinalização destes hormônios e a dos açúcares, a fim de controlar o processo de degradação das reservas. Desta forma, estas evidências sugerem que o ABA e o etileno controlariam antagonicamente a mobilização de reservas em sementes de *S. virgata*, juntamente com os açúcares, através da ativação e ação das enzimas hidrolíticas, a fim de controlar o processo de degradação das proteínas e dos galactomananos, evitando a produção dos açúcares redutores e de sacarose em excesso durante o período pós-germinativo e garantindo o afluxo eficiente de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento da plântula.

ABSTRACT

Seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. have an endosperm which accumulates galactomannan as a storage polysaccharide in the cell walls that is hydrolysed after germination by three enzymes (α -galactosidase, endo- β -mannanase and exo- β -mannosidase). Besides the storage of carbon, there is a great amount of protein bodies in the cytoplasm of endospermic cells, which play the major role as a nitrogen reserve in this seed. It is likely that a synchronisation between the process of galactomannan and protein degradation occurs for a more efficient distribution and use of the storage degradation products. However, to understand these mechanisms, it is necessary to study aspects of the production and action control of the hydrolytic enzymes responsible for the mobilisation of these reserves. Aiming to determine in which point of the metabolism the seed of *S. virgata* is in relation to the production of the hydrolytic enzymes, during and after germination, and the supposed tissues involved in this production, seeds of this specie were imbibed in actinomycin-D (transcription inhibitor) and cycloheximide (translation inhibitor), and the effects of these inhibitors verified through the α -galactosidase activity and detection in the testa and endosperm of these seeds. Besides of this, for to verify and relate the effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the reserves degradation after germination of the *S. virgata*, seeds of this specie were imbibed in ABA, ethylene, glucose and sucrose, and the effects of these were verified through the protein content, α -galactosidase activity and endogenous production of ABA and ethylene in this seeds. In the presence of actinomycin-D and cycloheximide, the production and activity of the α -galactosidase were not inhibited during and after germination, suggesting that the production of this enzyme occurs principally during the maturation of the seed. Apparently, after the germination, this enzyme is processed by proteolysis, so that it becomes activated to perform galactomannan degradation. On the other hand, the presence of actinomycin-D and cycloheximide inhibited the protein degradation in the testa and endosperm and at the same time induced the α -galactosidase

activity in the same tissues at the final steps of the galactomannan degradation process. This suggests the existence of synthesis *de novo* of the proteases during and after germination and a possible relationship between the storage protein and galactomannan mobilisation. Regarding the hormones, the presence of exogenous ABA retarded the beginning of the storage protein degradation in the endosperm and also decreased α -galactosidase activity in the same tissue at the end of galactomannan degradation. This suggests that there is a regulator effect of this hormone during the storage degradation, repressing the enzymes action. In the presence of exogenous ethylene an increase in the α -galactosidase activity in the endosperm and in the testa were observed at the end of galactomannan degradation, suggesting an inducing effect of this hormone on the hydrolytic enzymes. The finding of endogenous ABA and ethylene production, observed during the period of the storage mobilisation, give support to the above raised hypothesis that the two hormones participate in the control of the hydrolytic enzyme activities in seeds of *S. virgata*. Furthermore, the changes observed in the endogenous ABA and ethylene production in the presence of glucose and sucrose, suggested a relation between the signaling pathway of these hormones and the sugars signaling, controlling the process of storage degradation. Thus, our results add evidence to suggest that ABA and ethylene antagonistically control the storage mobilisation in seeds of *S. virgata*, together with the sugars, through the hydrolytic enzymes activation, controlling the process of storage protein and galactomannan degradation, in order to avoid the excess production of reductor sugars and sucrose during the post-germinative period and assuring the efficient afflux of the carbon and nitrogen to the seedling development.

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). Contudo, sementes de muitas espécies não são tolerantes à dessecação na maturidade, sendo denominadas sementes recalcitrantes, as quais podem manter o conteúdo de água relativamente elevado, em torno de 60 a 70% de seu peso fresco, dependendo da espécie (Castro & Hilhorst 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. 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. 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).

Em uma semente bitegumentada estão presentes a testa (tegumento externo) e o tégmen (tegumento interno), enquanto em sementes unitegumentadas 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 paliçádica, 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 paliçádica 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 paliçádica, 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 paliçádica, possivelmente restrita à região cônica dos macroesclereídes ou à chamada linha lúcida das células paliçádicas, 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 *Glycine max* (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 paliçádica, 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).

Com base nesses dois efeitos, o tegumento pode ser considerado como um tecido bifuncional, tendo papel na retenção de água, através da camada paliçádica, e aceleração de embebição, através da camada parenquimática (Santos 2002). A evolução, portanto, permitiu à semente ortodoxa uma resistência a fortes dessecaamentos, 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*, *Corylus avellana*, *Eleagnus angustifolia*, *Rosa canina*, *Trigonella foenum-graecum*, *Ceratonia siliqua*, *Pinus monticola*, *Nicotiana plumbaginifolia* e *Sesbania virgata* (Labouriau 1983, Van Staden *et al.* 1987, Bewley & Black 1994, Kontos & Spyropoulos 1996, Feurtado *et al.* 2004, Frey *et al.* 2004, Tonini *et al.* 2006). Foi demonstrado, em *Ceratonia siliqua*, que o tegumento pode controlar, durante o desenvolvimento das sementes, a produção de enzimas hidrolíticas relacionadas à maturação, germinação e mobilização de reservas (Kontos & Spyropoulos 1996) e, em sementes de *Lycopersicon esculentum* (tomate), um efeito inibitório na produção da endo- β -mananase durante o desenvolvimento das sementes (Nonogaki *et al.* 1992, Nomaguchi *et al.* 1995).

1.2. Endosperma

Na maioria das sementes, há um tecido de reserva envolvendo o embrião, 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).

1.3. 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).

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 início 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). Além destas condições, o aumento do metabolismo, assim como a duração desta fase, depende do potencial hídrico da semente, que varia entre as diferentes espécies (Castro & Hilhorst 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 intensa 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).

3. 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). Estas reservas têm basicamente duas funções, que se relacionam com a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula que apresente a capacidade de se manter de forma autotrófica (Buckeridge *et al.* 2004a).

Há enorme variação na composição de sementes, mas as substâncias armazenadas em grande quantidade constituem os carboidratos, os lipídeos e as proteínas (Buckeridge *et al.* 2004a). Os dois primeiros servem como fonte de energia para manter processos metabólicos em funcionamento e como fonte de carbono para a construção de novos tecidos e células que irão constituir a plântula, enquanto as proteínas têm como função armazenar principalmente nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e

compostos secundários na plântula em crescimento (Mayer & Poljakoff-Mayber 1975, Buckeridge *et al.* 2004a).

3.1. PROTEÍNAS

Leguminosas são conhecidas por serem ricas em nitrogênio, estratégia que é desenvolvida no início do seu ciclo de vida e que requer desde cedo, grande quantidade desse nutriente, tendo influenciado os tipos de germinação adotados por essas espécies, que por sua vez, estão muito relacionadas às estratégias de estabelecimento da plântula (Mickey 1994). Dessa forma, as leguminosas são conhecidas pelas sementes freqüentemente ricas em nitrogênio, que pode ser estocado como proteínas de reserva convencionais ou proteínas tóxicas, aminoácidos não protéicos ou outros compostos nitrogenados de defesa. Nesse grupo podemos incluir *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., com cerca de 45% do peso seco da semente em proteínas (Buckeridge *et al.* 2004b).

As proteínas de sementes podem ser divididas em quatro grandes grupos, com base na sua solubilidade, de acordo com a classificação de Osborne (1924). As **albuminas**, solúveis em água e diluídas em tampões com pH neutro, coaguláveis por aquecimento, apresentam-se em pequenas quantidades em algumas sementes, incluindo cereais e legumes. As **globulinas**, insolúveis em água e solúveis em soluções salinas, estão presentes em muitas sementes e podem ser facilmente obtidas em forma cristalina. As **prolaminas**, solúveis em álcool (60-90%), mas não em água e nem em soluções salinas. As **glutelinas**, insolúveis em soluções aquosas neutras ou salinas e em álcool, mas podem ser extraídas em soluções básicas (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2004a).

Classificações mais modernas, baseadas na função e relações bioquímicas e moleculares, dividem as proteínas em três classes principais. As proteínas de reserva, cuja função é armazenar nitrogênio, carbono e enxofre. As proteínas estruturais e metabólicas, essenciais para o crescimento e estrutura da semente. As proteínas de proteção, que podem conferir resistência a patógenos

microbianos, invertebrados ou dessecação (Buckeridge *et al.* 2004a). Em alguns casos, a proteína pode apresentar tanto a função de reserva como a de proteção (Bewley 2001).

Os principais grupos de proteínas de reserva (PR) incluem as quatro frações de solubilidade de Osborne. As prolaminas são as principais proteínas de reserva em cereais e gramíneas selvagens, as glutelinas estão presentes no trigo, milho e em outros cereais, estando relacionadas estruturalmente as prolaminas, enquanto as albuminas e globulinas são os principais componentes de reserva da maioria das dicotiledôneas (Buckeridge *et al.* 2004a). Estas últimas são classificadas, ainda, em dois grupos que diferem quanto à massa molecular e ao coeficiente de sedimentação (S), as vicilinas (7-8S) e leguminas (11-12S) (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2004a). As leguminas ocorrem geralmente junto com as albuminas (2S) (Buckeridge *et al.* 2004a). Nas sementes de leguminosas, o conteúdo de globulina atinge até 70% da reserva total de nitrogênio da semente (Bewley & Black 1994).

As proteínas de reserva estão usualmente presentes em vacúolos de reserva, denominados corpos protéicos, na maioria das sementes de dicotiledôneas e gimnospermas (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2004a). Os corpos protéicos podem conter somente um tipo de proteína de reserva, como por exemplo em leguminosas, que apresentam corpos protéicos contendo somente albumina, vicilina, ou legumina, embora muitos parecem conter tanto vicilina quanto legumina. Várias enzimas podem estar presentes também nos corpos protéicos, e durante a mobilização de reservas outras enzimas podem ser adicionadas (Bewley & Black 1994).

De forma similar aos demais compostos de reserva, a mobilização de proteínas inicia com o desenvolvimento do embrião, normalmente suportando o crescimento da plântula até que ela se torne autotrófica. Por serem os únicos compostos de reserva em sementes que possuem nitrogênio em sua composição, as proteínas de reserva ocorrem e são essenciais provavelmente na maioria das espécies que possuem sementes (Buckeridge *et al.* 2004b).

A hidrólise das proteínas de reserva aos seus aminoácidos constituintes é realizada por proteases, as quais podem hidrolisar totalmente as proteínas ou produzirem pequenos polipeptídeos que são degradados posteriormente por peptidases (Bewley & Black 1994). Dessa forma, as proteases podem ser classificadas de acordo com sua atividade hidrolítica, em relação à maneira com que hidrolisam o substrato (Fig. 1). As endopeptidases atacam ligações peptídicas internas ao polipeptídeo, produzindo oligopeptídeos que são reduzidos aos seus aminoácidos constitutivos pelas peptidases, aminopeptidases, que atacam o terminal amino (N), e carboxipeptidases que atacam o terminal carboxílico (C) do peptídeo (Bewley & Black 1994, Müntz *et al.* 2001). Tanto as aminopeptidases quanto as carboxipeptidases são exopeptidases (Bewley & Black 1994).

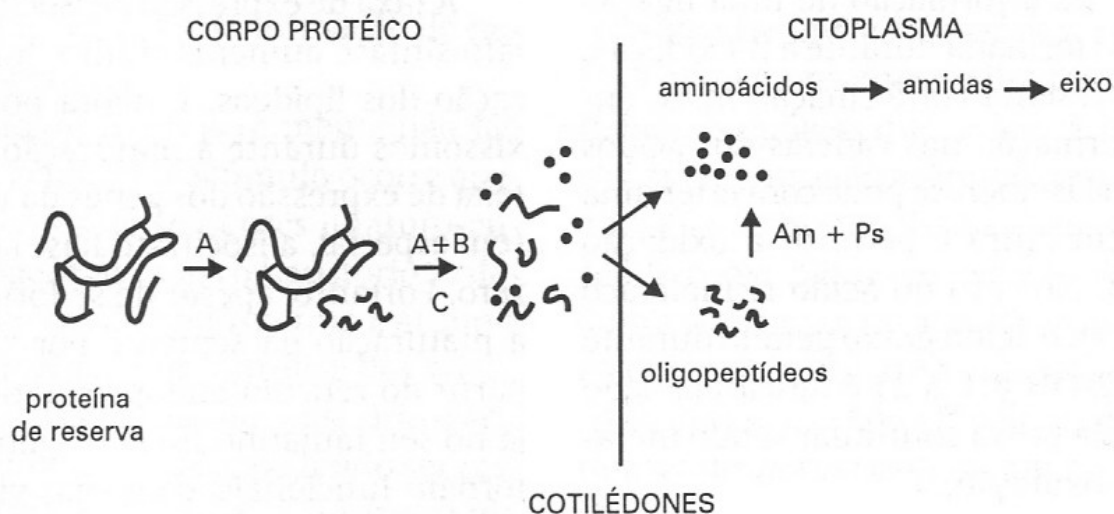


Figura 1. Generalização da via de mobilização de proteínas de reserva nos corpos protéicos em sementes de dicotiledôneas. A proteína (legumina) é inicialmente atacada pelas proteinases A,B (endopeptidases) e C (carboxipeptidase) para produzir peptídeos menores e mais solúveis e, finalmente, aminoácidos que são transportados para o citoplasma. Oligopeptídeos no citoplasma são atacados por aminopeptidases (Am) e peptidases (Ps) produzindo aminoácidos. Estes últimos são convertidos a amidas (glutamina e asparagina), as quais são transportadas para o eixo em crescimento (Buckeridge *et al.* 2004b).

Em sementes de dicotiledôneas, a hidrólise enzimática das proteínas de reserva inicia-se nos corpos protéicos, onde leguminas e vicilinas são primeiramente atacadas pelas endopeptidases e carboxipeptidases para produzir polipeptídeos menores e mais solúveis e aminoácidos, que são transportados para o citoplasma. Oligopeptídeos no citoplasma são atacados por aminopeptidases e peptidases (di e tripeptidases) produzindo mais aminoácidos (Osborne 1924, Wilson 1986, Bewley & Black 1994, Bewley 2001, Buckeridge *et al.* 2004b). Estes últimos são convertidos a amidas (glutamina e asparagina) e então transportados para o eixo em crescimento. Em leguminosas, o principal aminoácido exportado é geralmente a asparagina (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2004b) (Fig. 1).

Com o fim da proteólise, os corpos protéicos vazios são fundidos formando grandes vacúolos, onde uma variedade de hidrolases é secretada, transformando-se em vesículas autofágicas responsáveis pela senescência e degradação dos tecidos de reserva (Bewley & Black 1994, Thomas *et al.* 1996, Shewry & Casey 1999).

3.2. CARBOIDRATOS

As reservas de polissacarídeos podem estar presentes na parede celular dos cotilédones e dos endospermas das sementes, sendo denominadas polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) (Reid 1985a, 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).

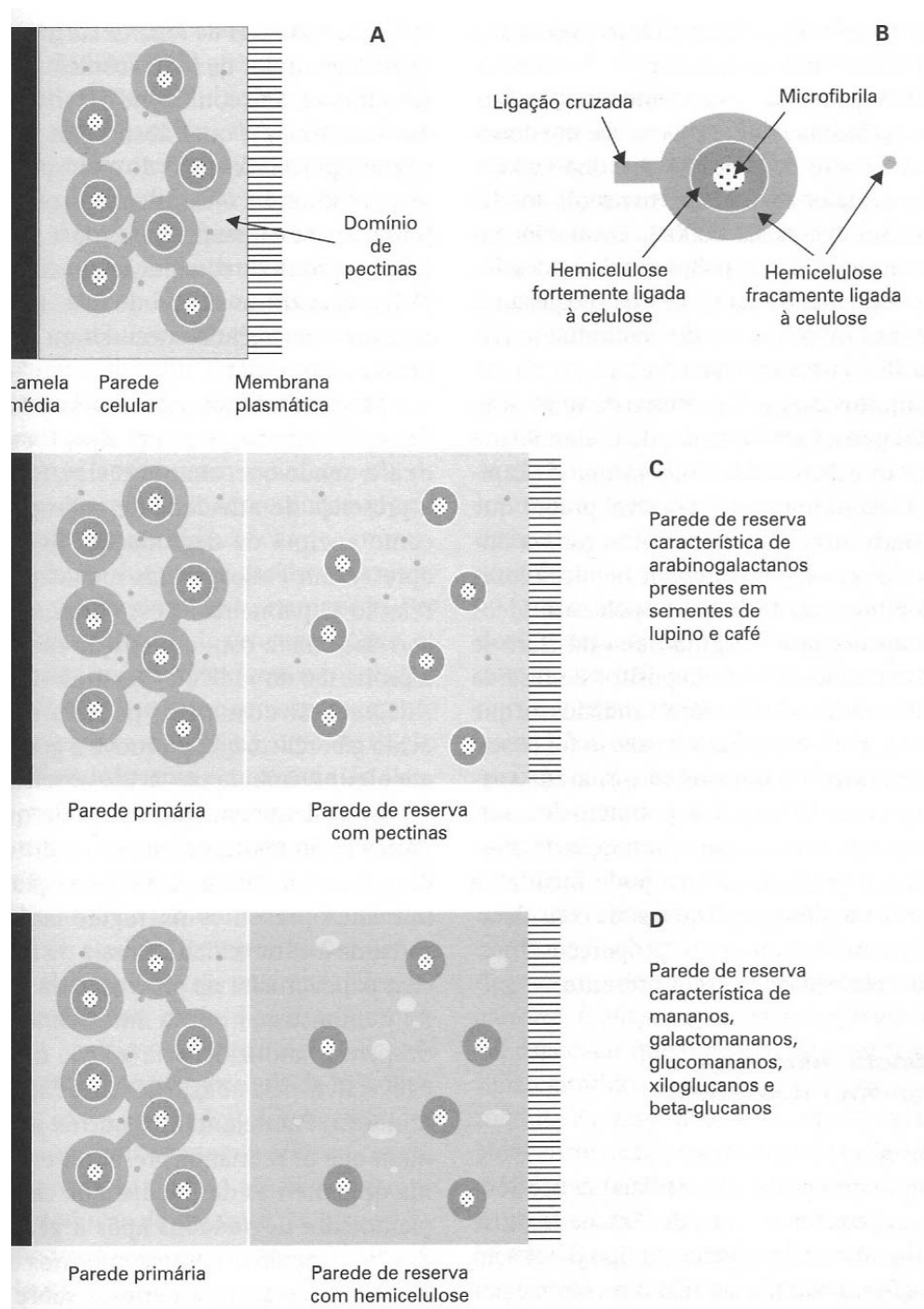


Figura 2. Representação esquemática da parede celular primária (**A e B**) e das paredes de reserva com pectina (**C**) ou hemicelulose (**D**), em corte transversal. O domínio protéico, que representa menos do que 10% da parede celular, foi omitido (Buckeridge *et al.* 2000c).

O domínio 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. 2A e 2B).

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. 2A).

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. 2C e 2D). 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. 2C e 2D).

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, Lisboa *et al.* 2006); *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 *et al.* 2005, Nikus *et al.* 2000), para localizar tanto polissacarídeos como enzimas.

4. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE PAREDE CELULAR

Os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) (Reid 1985a, Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000b) 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, Buckeridge *et al.* 2000b).

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.

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).

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 β -(1 $\rightarrow$ 4), a qual unidades de D-galactose estão unidas através de ligações do tipo α -(1 $\rightarrow$ 6), formando ramificações simples (Moe *et al.* 1947, Unrau 1961, Somme 1968, Manzi & Cerezo 1984) (Fig. 3).

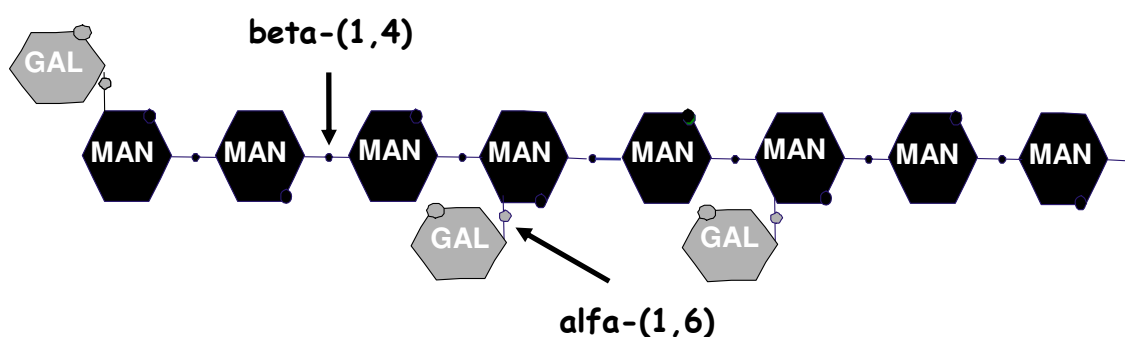


Figura 3. Modelo esquemático da estrutura química do galactomanano, mostrando a cadeia linear de unidades de manose e suas ramificações com unidades de galactose (MAN = manose, GAL = galactose) (Buckeridge *et al.* 2008).

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).

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* e *Dimorphandra mollis* (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 *Lycopersicon sculentum* (tomate) (Groot *et al.* 1988, Nonogaki & Morohashi 1996, Toorop *et al.* 1996, Voigt & Bewley 1996), *Cucumis melo* (melão) (Welbaum *et al.* 1995), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Leubner-Metzger *et al.* 1995) e *Hordeum vulgare* (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 *S. 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*) 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). Os galactomananos de reserva de sementes de espécies brasileiras têm sido estudados também do ponto de vista das aplicações biotecnológicas e vêm gerando processos e patentes para uso nas indústrias de papel e alimentos (Panegassi *et al.* 2000, Lima *et al.* 2003, Lisboa 2008).

5.3. Degradação dos galactomananos

A mobilização dos galactomananos é mediada por três enzimas hidrolíticas: α -galactosidase (EC 3.2.1.22) - responsável pela quebra das ligações α -(1→6) existentes entre as unidades de galactose e manose; endo- β -mananase ou β -1,4-manano-endo-hidrolase (EC 3.2.1.78) - que atua sobre as ligações do tipo β -(1→4) existentes entre as unidades de manose da cadeia principal, reduzindo o manano a oligossacarídeos; exo- β -manosidase ou β -manosidase (EC 3.2.1.25) - específica para a quebra das ligações β -(1→4) entre as unidades de manose dos oligossacarídeos provenientes da ação da endo- β -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. 4).

Como a endo- β -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* (alfafa), *Cyamopsis tetragonolobus* e *Sesbania virgata*, torna-se importante a ação da α -galactosidase, desgalactosilando o polímero, anteriormente à ação hidrolítica da endo- β -mananase e da exo- β -manosidase (McCleary & Mathenson 1975, Buckeridge *et al.* 2000a, Lisboa *et al.* 2006).

A importância da α -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* (alface), que possuem pequena quantidade de galactose no polímero, a α -galactosidase só pode retirar galactose do produto de ação da endo- β -mananase (Leung & Bewley 1983), embora em tomate a α -galactosidase esteja presente antes do aumento de atividade da endo- β -mananase e da exo- β -manosidase (Toorop *et al.* 1996, Feurtado 1999).

Já a ação hidrolítica da α -galactosidase e da endo- β -mananase controlam a ação da exo- β -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).

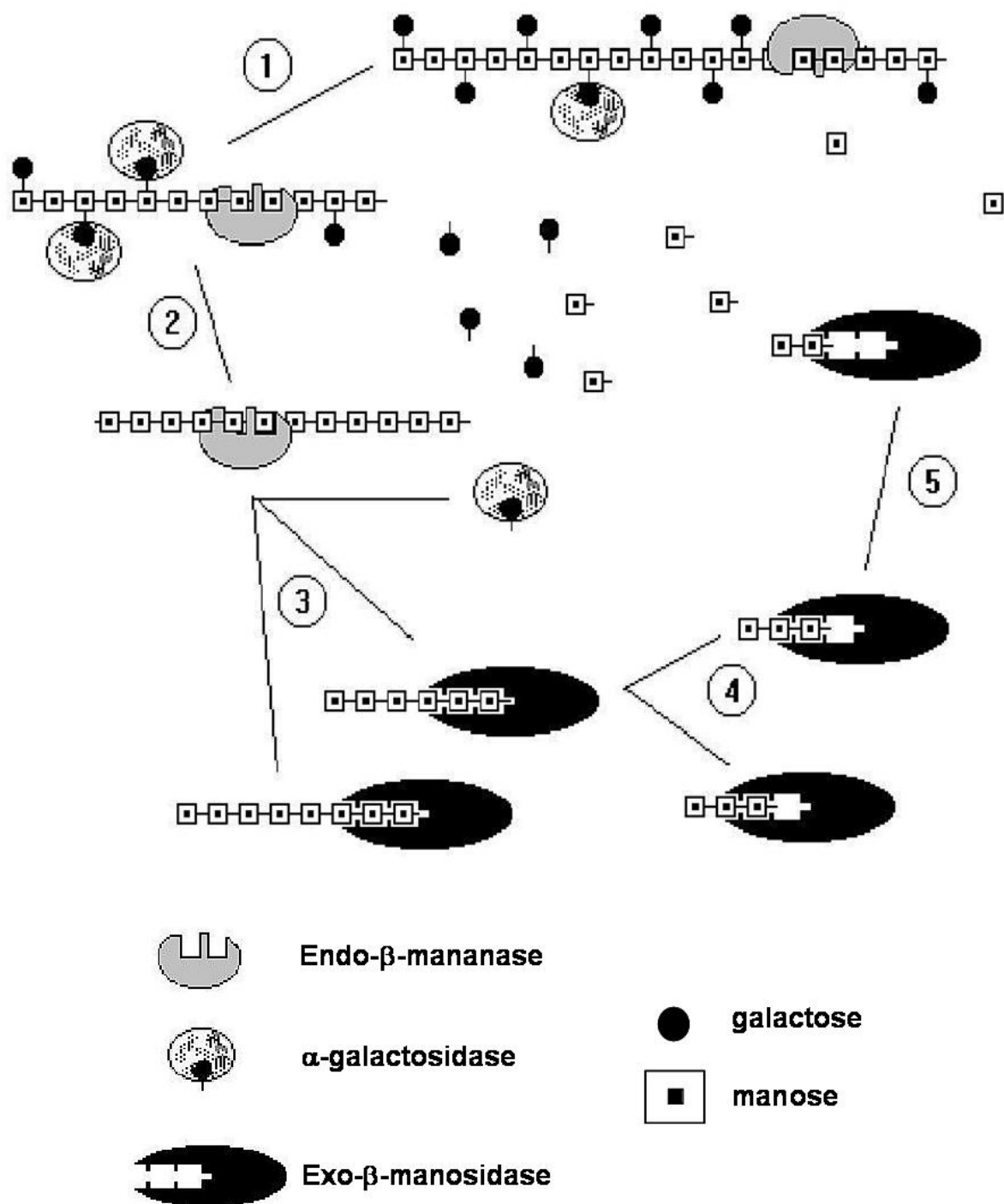


Figura 4. Modelo esquemático da degradação do galactomanano, mostrando a atividade das três enzimas hidrolíticas (Buckeridge & Reid 1996).

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* e alfafa (Reid & Meier 1972). Já em sementes de *Ceratonis siliqua* verificou-se que as enzimas são provavelmente produzidas nas células endospermicas (Seiler 1977, Buckeridge *et al.* 2000a). Em sementes de *S. 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 *S. virgata* (Lisboa *et al.* 2006).

Assim como a endo- β -mananase, a exo- β -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 α -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 alfafa e *Trigonella foenum-graecum* a atividade da endo- β -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- β -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* (café) (Marraccini *et al.* 2001).

McCleary & Matheson (1974) detectaram múltiplas isoformas da α -galactosidase nas sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, embora somente uma isoforma esteja associada com o endosperma, hidrolisando galactoses do galactomanano (Overbeeke *et al.* 1989). Assim como DeMason *et al.* (1992) detectaram quatro isoformas da enzima durante o desenvolvimento do endosperma de sementes de palmeira.

Feurtado *et al.* (2001) sugeriram a existência de pelo menos três isoformas da α -galactosidase nas sementes de tomate e, através da obtenção e seqüenciamento do cDNA da enzima, demonstraram alta homologia da α -galactosidase do tomate com outras galactosidases, especialmente com as de sementes de café (Zhu & Goldstein 1994). Ainda, em sementes de tomate, a exo- β -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- β -mananases para a primeira espécie e α -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 manooligossacarídeos 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 *S. 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 *et al.* (2006) sugerem, em sementes de *S. 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- β -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 *et al.* 2006). 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).

6. REGULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS

É crucial para o ciclo de vida das plantas a utilização efetiva das reservas das sementes durante a germinação e estabelecimento da plântula (Cernac *et al.* 2006).

O endosperma das sementes de leguminosas provavelmente está 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).

Sabe-se que o ABA previne a degradação das proteínas de reserva em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Garciaarrubio *et al.* 1997), ao passo que citocininas causam aumento na atividade das enzimas proteolíticas e na mobilização das proteínas em sementes de *Cicer arietinum* (grão-de-bico) e *Cucurbita moschata*. Em sementes de *Ricinus communis* (mamona), a hidrólise das proteínas de reserva aumenta em presença de giberelina e auxina (Bewley & Black 1994).

Além do mecanismo hormonal, observou-se que o acúmulo de aminoácidos no tecido de reserva, em sementes de *Cucumis sativus* (pepino), pode inibir a atividade de aminopeptidases prevenindo, conseqüentemente, a degradação das proteínas, o que torna o embrião importante na regulação da mobilização de proteínas de reserva, servindo como dreno dos produtos de degradação, evitando assim a inibição da atividade proteolítica através de um mecanismo de feedback negativo (Slack *et al.* 1977, Davies & Chapman 1980, Bewley & Black 1994).

6.1. Efeito do ABA

Além de prevenir a degradação das proteínas de reserva, 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 *Ceratonía 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, Tonini *et al.* 2006).

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). Em sementes de café e tomate, observou-se que a atividade da endo- β -mananase é inibida em presença de ABA, antes e depois da germinação (Leviatov *et al.* 1995, Nomaguchi *et al.* 1995, Giorgini & Comoli 1996, Nonogaki & Morohashi 1996, Toorop *et al.* 1999, Toorop *et al.* 2000, Amaral da Silva *et al.* 2004).

Potomati e Buckeridge (2002) observaram efeito do ABA exógeno sobre o processo de degradação dos galactomananos no endosperma de *S. virgata*, onde a utilização desta reserva pelo embrião seria modulada pela presença do hormônio, que teria um efeito parcial sobre a atividade da α -galactosidase. 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 ácido abscísico 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, Kontos & Spyropoulos 1996, Feurtado *et al.* 2004, Frey *et al.* 2004, Tonini *et al.* 2006). 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 1995, Downie *et al.* 1999). Ainda, foi demonstrado para sementes de *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).

Apesar da influência do ABA ocorrer na maioria das espécies desde a maturação da semente, aquisição da tolerância à dessecação, prevenção da germinação precoce até a mobilização de reservas (Garciaarrubio *et al.* 1997, Finkelstein & Lynch 2000), 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 *Oryza sativa* (arroz) (Qin 1990).

6.2. Efeito do etileno

O etileno é produzido por todas as partes das plantas superiores, sendo a taxa de produção dependente do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento (Colli 2004). O etileno apresenta a capacidade de quebrar a dormência e iniciar a germinação em algumas espécies (Taiz & Zeiger 2004).

Além deste efeito na dormência, o etileno aumenta a taxa de germinação de sementes de várias espécies, modulando o metabolismo celular de maneira a promover o alongamento embrionário, como observado em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Beaudoin *et al.* 2000), *Amaranthus caudatus* (Kepczynski & Karssen 1985, Kepczynski & Kepczynska 1997, Bialecka & Kepczynska 2003), *Arachis hypogea* (amendoim) (Ketring & Morgan 1971, 1972), *Avena fatua* (aveia) (Adkins & Ross 1981), *Brassica rapa* (Puga-Hermida *et al.* 2006), *Chenopodium album* (Saini *et al.* 1985 a, b), grão-de-bico (Gallardo *et al.* 1994), *Hyphaene thebaica* (Moussa *et al.* 1998), alface (Steward & Freebairn 1969, Negm & Smith 1978, Abeles 1986, Saini *et al.* 1989, Nascimento *et al.* 2004), tabaco (Khalil 1992), arroz (Gianinetti *et al.* 2007), *Pisum sativum* (ervilha) (Gorecki *et al.* 1991, Petruzzelli *et al.* 1995), *Schoenoplectus hallii* (Baskin *et al.* 2003), *Spergula arvensis* (van Staden *et al.* 1973), *Tagetes erecta* (Lalonde & Saini 1992), *Trifolium subterraneum* (Esashi & Leopold, 1969) e *Xanthium strumarium* (carrapicho) (Sato *et al.* 1984).

O envolvimento do etileno na promoção da germinação foi observado, inicialmente, na década de 20 em algumas espécies de mono e dicotiledôneas. Em sementes de alface, por exemplo, a utilização de inibidores da síntese de etileno, reduz a taxa de germinação, efeito este revertido, por sua vez, com a aplicação deste gás (Colli 2004). Já em sementes de *Amaranthus caudatus* e *Cucumis anguria*, o etileno é detectado antes da protrusão da radícula, havendo um pico de produção visivelmente associado à germinação (Cardoso 2004). De fato, na germinação, há um aumento na taxa de produção de etileno durante a protrusão de radícula e o desenvolvimento da plântula (Colli 2004).

Sabe-se que o etileno e o ABA partilham elementos de transdução de sinal, e que o etileno regula negativamente o grau de dormência por suprimir a expressão de genes envolvidos na sinalização do ABA (Beaudoin *et al.* 2000, Borghetti 2004). Além disso, verificou-se que o etileno promove a síntese de uma proteinase durante a germinação inibida por ABA (Cervantes *et al.* 1994). Assim, Borghetti *et al.* (2002) demonstraram que a quebra de dormência por etileno envolve proteólise seletiva mediada por um complexo multicatalítico proteasoma. Dessa forma, tanto o silenciamento de genes envolvidos na dormência como a remoção de polipeptídeos inibidores da germinação fazem parte do processo de remoção da dormência em sementes (Borghetti 2004). Além disso, tem sido sugerido que o etileno estimule a germinação através da inativação do ABA (Chiwocha *et al.* 2005, Vandenbussche & Van Der Straeten 2007).

Além disso, acredita-se que o etileno possa agir estimulando a síntese ou controlando a atividade de enzimas relacionadas à degradação do endosperma, dentre estas a α -galactosidase em sementes de *Amaranthus caudatus* (Bialecka & Kepczynska 2007) e a endo- β -mananase em sementes de alface (Cardoso 2004, Nascimento *et al.* 2004, Nascimento *et al.* 2005) e tomate (Pirrello *et al.* 2006).

6.3. Efeito dos açúcares

Açúcares como glucose, sacarose e frutose têm uma função essencial no metabolismo das plantas (Smeekens 2000). Desta forma, os açúcares atuam como fontes de energia e componentes estruturais da célula, afetando uma grande variedade de processos, desde o crescimento e desenvolvimento até a expressão de diversos genes (Rook & Bevan 2003, Dekkers *et al.* 2008).

Como as funções metabólicas e estruturais requerem quantidades apropriadas de fontes de carbono, diferentes organismos têm desenvolvido a habilidade de “sentir” níveis internos de açúcares, conseqüentemente ajustando suas atividades metabólicas e celulares (Price *et al.* 2003). Os mecanismos pelos quais as plantas determinam a disponibilidade de carboidratos (sensibilidade ao

açúcar) e regulam as respostas aos açúcares (sinalização dos açúcares), são fundamentais durante toda a vida da planta (Rognoni *et al.* 2007). Desta forma, além do papel metabólico, os açúcares parecem ter uma função parecida com a dos hormônios (Smeekens 2000, León & Sheen 2003, Rolland *et al.* 2006, Dekkers *et al.* 2008).

Embora já tenha sido demonstrado que os açúcares agem como moléculas sinalizadoras, pouco se sabe sobre os mecanismos pelo quais as plantas respondem a estes (Rognoni *et al.* 2007).

Aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares têm sido utilizados para estudar as respostas das plantas aos açúcares (Smeekens 2000, Rolland *et al.* 2002) e algumas das estratégias genéticas aplicadas são baseadas no efeito inibitório dos açúcares sobre o desenvolvimento pós-germinativo de *Arabidopsis thaliana*. Altas concentrações de açúcares exógenos atrasam a germinação e interrompem o desenvolvimento inicial da plântula, prevenindo a expansão dos cotilédones e o desenvolvimento de folhas verdadeiras e um sistema de raízes extensas (Rognoni *et al.* 2007).

O atraso no desenvolvimento da plântula causado pelos altos níveis de açúcares pode ser visto como uma regressão do metabolismo, o qual cessa a mobilização de reservas das sementes (Gazzarrini & McCurt 2001, Rook *et al.* 2001). De fato, sabe-se que a glucose pode retardar a degradação das reservas nas sementes (Lu & Hills 2002, To *et al.* 2002).

Análises cuidadosas de diversos mutantes sensíveis aos açúcares revelam que o atraso no desenvolvimento da plântula causado pelos açúcares é amplamente independente do componente osmótico criado pelo tratamento com açúcares exógenos. Além disto, estudos recentes têm demonstrado que os processos relacionados à sensibilidade aos açúcares não estão associados ao papel destes como nutrientes (Rognoni *et al.* 2007).

Através de diversos estudos foram encontrados pelo menos três tipos de mecanismos de transdução de sinais pela glucose nas plantas: vias dependentes da hexoquinase (Jang *et al.* 1997, Xiao *et al.* 2000), vias independentes da

hexoquinase (Xiao *et al.* 2000) e vias dependentes da glicólise, que dependem da atividade catalítica da hexoquinase (Xiao *et al.* 2000). Além disso, sabe-se que proteínas como quinases e fosfatases estão envolvidas no mecanismo de sinalização dos açúcares (Smeekens 2000).

Desta forma, a sensibilidade aos açúcares pode ser definida pela interação entre uma molécula de glucose e uma proteína de tal maneira que um sinal é gerado. Este sinal inicia uma cascata de tradução de sinais que resulta em respostas celulares como alteração na expressão dos genes e atividades enzimáticas (Smeekens 2000). A transdução de sinais induzidos pelos açúcares controla a expressão de genes, através de diversos mecanismos, que incluem transcrição, tradução, modificação de mRNA e estabilidade de proteínas (Rolland *et al.* 2006).

Dentro deste contexto, o papel dos açúcares como moléculas sinalizadoras altera os programas de germinação e desenvolvimento da plântula, integrados em uma complexa rede de fatores ambientais, metabólicos e hormonais (Rognoni *et al.* 2007).

6.4. Interação entre as vias de sinalização

A via de sinalização dos açúcares não opera isoladamente, mas é parte de uma rede de regulação celular. Recentes estudos claramente demonstram uma interação entre sistemas de sinalização, especialmente entre açúcares e fitohormônios (Smeekens 2000).

Como os açúcares influenciam respostas do desenvolvimento e, ao mesmo tempo, como estes se relacionam aos diferentes hormônios regulando diversos processos é uma questão importante (Rognoni *et al.* 2007).

Tem sido sugerido que entre os fitohormônios, o ABA é o de maior importância para a resposta das plantas aos açúcares (Rognoni *et al.* 2007). Dentro deste contexto, as respostas aos açúcares seriam diretamente mediadas pelo ABA, pela via de indução da sua biossíntese e pela ativação de alguns genes

de sinalização do ABA (Arenas-Huertero *et al.* 2000, Chen *et al.* 2006). Apesar disso, alguns autores acreditam que o ABA não está diretamente envolvido na sinalização dos açúcares, mas na regulação da maneira como os tecidos respondem aos açúcares (Rook *et al.* 2001). Outros autores acreditam, ainda, que a glucose não age pela via de biossíntese do ABA (Dekkers *et al.* 2004), sugerindo que este açúcar pode retardar a germinação por atrasar o declínio da concentração de ABA endógeno (Price *et al.* 2003), afetando a estabilidade do ABA (Dekkers *et al.* 2004).

Entretanto, de uma maneira geral, a inibição da germinação das sementes de algumas espécies, como *Arabidopsis thaliana* (Zhou *et al.* 1998, Price *et al.* 2003, Dekkers *et al.* 2004, Cernac *et al.* 2006), causada pelos açúcares, seria relacionada à indução dos genes de sinalização ou de biossíntese do ABA pelos mesmos açúcares (Cheng *et al.* 2002, León & Sheen 2003, Dekkers & Smeekens 2007). Conseqüentemente, os tratamentos com açúcares em sementes de *Arabidopsis*, que causam a interrupção do desenvolvimento pós-germinativo da semente, também seriam relacionados à via de sinalização do ABA (Dekkers *et al.* 2008). De uma maneira independente, os açúcares e o ABA estariam envolvidos ainda no controle da mobilização das reservas (Smeekens 2000).

Um estudo realizado por Li *et al.* (2006) demonstrou que 14% dos genes regulados positivamente pelo ABA eram induzidos em resposta a glucose, aproximadamente 100 genes, incluindo genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio e carbono. Outro grupo de aproximadamente 40 genes era reprimido tanto pelo ABA quanto pela glucose.

Portanto, existem evidências genéticas para uma interação entre a via de sinalização do ABA e a via de sinalização de açúcares, bem como de outras classes de hormônios vegetais, sendo as respostas ao ABA reguladas provavelmente por mais de uma via de transdução de sinal (Taiz & Zeiger 2004). Assim, uma complexa rede de regulação integra a sinalização de hormônios e nutrientes, onde vários exemplos já foram descritos de interações entre açúcares e hormônios, como a auxina (Dewald *et al.* 1994), citocinina (Jang *et al.* 1997,

Havelange *et al.* 2000), etileno (Zhou *et al.* 1998, León & Sheen 2003, Yanagisawa *et al.* 2003, Gagne *et al.* 2004) e ácido abscísico (Huijser *et al.* 1999, Finkelstein e Lynch 2000).

No caso do etileno, acredita-se que este hormônio também interage com a via de sinalização dos açúcares, porém antagonicamente, controlando o desenvolvimento da plântula (Zhou *et al.* 1998, Gazzarrini & McCourt 2001, Rognoni *et al.* 2007). Além disso, o etileno antagoniza o efeito inibitório da glucose durante a germinação das sementes, tendo um papel opositor ao ABA durante a germinação (Beaudoin *et al.* 2000, Price *et al.* 2003).

Entretanto, os efeitos do etileno podem ser explicados pelo fato deste hormônio agir negativamente como um regulador da ação do ABA, promovendo a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula (Beaudoin *et al.* 2000, Ghassemian *et al.* 2000). A via de sinalização do etileno parcialmente reprime a biossíntese do ABA ou regula negativamente a sinalização deste hormônio, diminuindo a sensibilidade ao ABA endógeno (Ghassemian 2000, Cheng *et al.* 2002). Desta forma, a glucose antagoniza a via de sinalização do etileno por ativar os genes relacionados a biossíntese e sinalização do ABA (Cheng *et al.* 2002), modulando as respostas ao etileno, de uma maneira dependente do ABA (León & Sheen 2003).

Recentes análises moleculares revelaram diretamente um controle da glucose sobre a biossíntese do ABA e sobre os genes de sinalização que parcialmente antagonizam a sinalização do etileno durante o desenvolvimento inicial da plântula (León & Sheen 2003). Durante a germinação, o ABA pode inibir a expressão dos genes relacionados a biossíntese do etileno e a própria produção do hormônio (Spollen *et al.* 2000, Hermann *et al.* 2007). A diminuição das respostas ao ABA e aos açúcares é geralmente acompanhada por um aumento na síntese e respostas ao etileno (Finkelstein & Gibson 2001). É possível, também, que a glucose possa inibir a via de sinalização do etileno diretamente (Rolland *et al.* 2002).

A interação entre as vias de sinalização, particularmente entre ABA, açúcares e etileno, é discutida em muitas revisões (Coruzzi & Zhou 2001; Gazzarrini & McCourt 2001; Eckardt 2002, Rognoni *et al.* 2007). Nesta interação, os açúcares respondem a dois hormônios – ABA e etileno – de maneiras opostas, o etileno agindo como um antagonista às respostas aos açúcares, enquanto o ABA promove estas respostas (León & Sheen 2003).

Sabendo que em sementes de *Sesbania virgata* o ácido abscísico está presente no tegumento e, ainda, que existe um mecanismo de controle da degradação das proteínas de reserva e dos galactomananos através deste tecido, evitando a produção de açúcares redutores em excesso (Tonini *et al.* 2006, 2007), levantou-se a hipótese de que as vias de sinalização do ABA e dos açúcares poderiam estar relacionadas nas sementes desta espécie (Fig. 5). Além disso, foi proposto que deveria ocorrer uma via de sinalização de etileno, relacionada à via de sinalização dos açúcares, antagonizando a ação do ABA (Fig. 5).

7. 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).

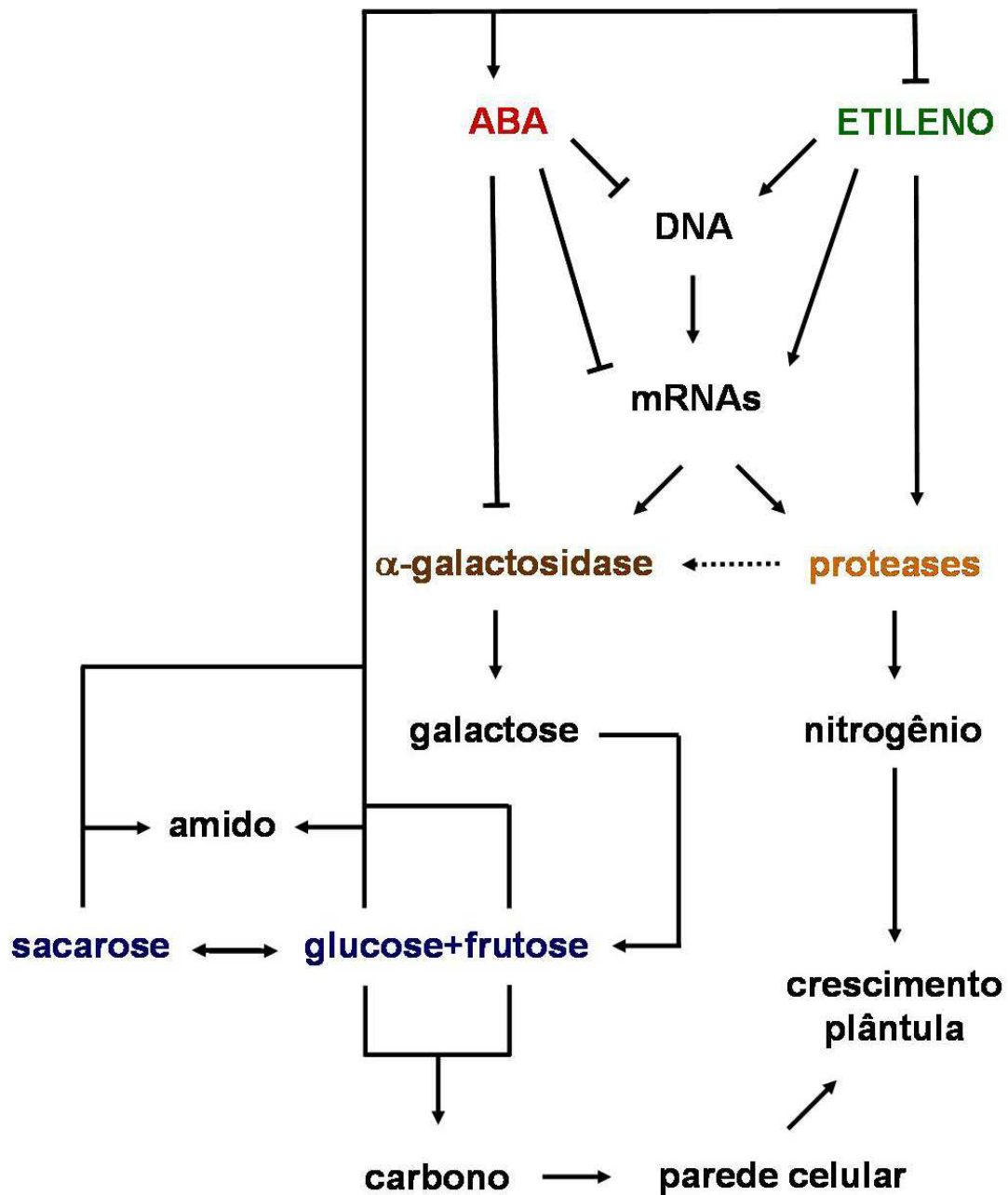


Figura 5. Hipótese de ação dos hormônios (ABA e etileno), relacionada à via de sinalização dos açúcares (glucose, frutose e sacarose), sobre a degradação dos galactomananos e das proteínas através das enzimas hidrolíticas em sementes de *Sesbania virgata*.

7.1. Sinônimos e nomes vulgares

A espécie tem como sinônimos *Aeschynomene virgata* Cav., *Coronilla virgata* (Cav.) Willd. e *Sesbania marginata* Benth. (Kissmann & Groth 1999), sendo *S. 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 *S. 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).

7.2. 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).



Figura 6. Espécime de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Fig. 6A.** Vista geral de um arbusto da espécie. **Fig. 6B.** Ramo com flor. **Fig. 6C.** Ramo com frutos maduros. **Fig. 6D.** Detalhe da flor. **Fig. 6E.** Detalhe do fruto maduro com as sementes.

7.3. Características gerais

Planta pioneira, infestante, perene, reproduzida por semente, com hábito arbustivo, podendo atingir de 2 a 4 m de altura (Fig. 6A). Pode apresentar o florescimento e frutificação já com 40cm de altura, com diversos surtos de florescimento por ano (Fig. 6B e 6C). Suas flores são pequenas e amarelas (Fig. 6D). 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. 6E). A unidade de dispersão são os frutos indeiscentes, que flutuam na água (Kissmann & Groth 1999).

7.4. Justificativa para o uso da espécie

Além de serem de grande importância ecológica e comercial, as sementes de *S. virgata* são um modelo bastante conveniente para o estudo da germinação e degradação dos galactomananos devido à praticidade de trabalhar com sementes que podem ser armazenadas por anos sem a perda de viabilidade, podendo ser embebidas a qualquer momento em que se deseje realizar um experimento; a grande quantidade de sementes produzidas por indivíduo, o que propicia uma grande quantidade de material para trabalhar; a grande regularidade de comportamento observada em diversas teses e experimentos realizados em nosso grupo de pesquisa, algo pouco comum entre sementes de plantas nativas; o tamanho das sementes, que são pequenas o suficiente para permitir a realização de experimentos em placas de Petri e, ao mesmo tempo, são grandes o suficiente para permitir a manipulação individual para a separação dos diferentes tecidos.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito do ácido abscísico e do etileno, juntamente com o tegumento, sobre a degradação das proteínas de reserva e dos galactomananos e investigar possíveis relações que estes hormônios possam ter com a via de sinalização dos açúcares, a fim de compreender os mecanismos de controle durante e após a germinação de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Para tanto buscou:

- Determinar em que ponto do metabolismo a semente se encontra em relação à produção das enzimas hidrolíticas, especificamente da α -galactosidase (há mRNAs prontos? Proteínas?), durante a degradação das reservas, e supostamente os tecidos envolvidos nesta produção;
- Relacionar a síntese *de novo* ou a ativação da α -galactosidase à ação do ABA e do etileno durante a degradação das reservas;
- Relacionar a ação do ABA e do etileno ao controle do tegumento durante a degradação das reservas através das enzimas hidrolíticas;
- Detectar os níveis de ácido abscísico e etileno endógeno nos diferentes tecidos sob influência dos açúcares durante a germinação e degradação das reservas, relacionando a via de sinalização dos hormônios à via de sinalização de açúcares;
- Detectar o nível endógeno de glucose e sacarose nas sementes durante a germinação e degradação das reservas, relacionando à concentração de ABA e etileno endógeno das sementes.

CAPÍTULO 1

CONEXÃO ENTRE OS PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS EM SEMENTES DE *Sesbania virgata* (CAV.) PERS.

1. Resumo

Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. acumulam suas reservas de carbono no endosperma na forma de um polissacarídeo de parede celular, o galactomanano. A mobilização deste ocorre após a germinação e envolve três enzimas hidrolíticas (α -galactosidase, endo- β -mananase e exo- β -manosidase). Além da reserva de carbono, há uma grande quantidade de corpos protéicos, no citoplasma das células endospermicas, que constituem a principal reserva de nitrogênio nestas sementes. Para que ocorra a correta distribuição dos produtos de degradação das reservas deve haver sincronização entre os processos de degradação das reservas de carbono e nitrogênio, porém para compreender tais mecanismos, é necessário estudar aspectos do controle da produção e ação das enzimas responsáveis pela hidrólise das reservas. Buscando determinar em que ponto do metabolismo a semente de *S. virgata* se encontra em relação à produção destas enzimas hidrolíticas, durante e após a germinação, e supostamente os tecidos envolvidos nesta produção, sementes desta espécie foram embebidas em actinomicina-D (inibidor de transcrição) e cicloheximida (inibidor de tradução) e os efeitos destes inibidores verificados através da atividade e detecção da α -galactosidase no tegumento e endosperma destas sementes. Como a presença de actinomicina-D e cicloheximida não inibiram a produção e a atividade da α -galactosidase no endosperma durante e após a germinação, sugere-se que a produção desta enzima ocorra principalmente durante a maturação, sendo supostamente armazenada nos corpos protéicos presentes no endosperma até o período pós-germinativo. Aparentemente, a partir deste período a enzima pré-formada seria processada e ativada, para conseqüente degradação dos galactomananos, através de um processo proteolítico, visto que foram detectadas diversas isoformas da α -galactosidase, com pesos moleculares e distribuição temporal distintos durante e após a germinação. Ainda, como a presença de actinomicina-D e cicloheximida não inibiram o processamento proteolítico da α -galactosidase, pelo contrário, intensificaram a produção de isoformas da enzima,

sugere-se a participação de proteases também formadas durante a maturação, que seriam ativadas no período germinativo, e auxiliariam na regulação da atividade da α -galactosidase durante e após a germinação. Em contrapartida, como a presença de actinomicina-D e cicloheximida inibiram a degradação das proteínas de reserva no tegumento e endosperma e, inclusive, induziram a atividade da α -galactosidase nestes tecidos no final do processo de degradação dos galactomananos, sugere-se a síntese *de novo* de proteases durante e após a germinação e a relação íntima destas enzimas com a degradação das proteínas de reserva e da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos, a fim de evitar o excesso de açúcares redutores no tecido e a produção de sacarose. Estas evidências sugerem que a mobilização de reservas de carbono (galactomananos) no endosperma de sementes de *S. virgata* deve estar relacionada à mobilização das reservas de nitrogênio (proteínas) no mesmo tecido, possivelmente garantindo o afluxo sincrônico de compostos carreadores dos dois macronutrientes (C e N) para o desenvolvimento da plântula.

2. Introdução

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). Há enorme variação na composição de sementes, mas as substâncias armazenadas em grande quantidade constituem os carboidratos e as proteínas (Buckeridge *et al.* 2004a).

As sementes de leguminosas são conhecidas por serem ricas em proteínas de reserva. Nesse grupo podemos incluir *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., com cerca de 45% do peso seco da semente em proteínas (Buckeridge *et al.* 2004b). *S. virgata* é uma planta com hábito arbustivo que ocorre principalmente em regiões úmidas ou alagadas, como na galeria de florestas de regiões Neotropicais, e está associada com os primeiros estágios da sucessão ecológica (Kissmann & Groth 1999, Potomati & Buckeridge 2002).

As proteínas de reserva estão usualmente presentes em vacúolos de reserva, denominados corpos protéicos, na maioria das sementes de dicotiledôneas e gimnospermas (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2004a, Tonini *et al.* 2006). Além disso, várias enzimas podem estar presentes também nos corpos protéicos, e durante a mobilização de reservas outras enzimas podem ser adicionadas (Bewley & Black 1994).

A hidrólise das proteínas de reserva aos seus aminoácidos constituintes é realizada por proteases, as quais podem hidrolisar totalmente as proteínas ou produzirem pequenos polipeptídeos que são degradados posteriormente por peptidases (Bewley & Black 1994). Além de possuírem a função de reserva, as proteínas podem ser essenciais para o metabolismo e estrutura da semente e, ainda, conferir resistência a patógenos microbianos, invertebrados ou dessecação (Buckeridge *et al.* 2004a).

Quanto às reservas de carboidratos, sementes de diversas espécies de leguminosas são conhecidas por acumular galactomananos na parede celular dos endospermas das sementes, sendo denominados polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) (Reid 1985a, Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000b, Buckeridge *et al.* 2004a).

Além de serem polissacarídeos de reserva, exercem um papel importante no controle de embebição de água no início da germinação, absorvendo proporcionalmente grande quantidade de água e a distribuindo ao redor do embrião, protegendo-o contra a perda de água (Reid & Bewley 1979, Buckeridge *et al.* 2000c). Ainda, conferem dureza e resistência física ao endosperma no período de germinação, sendo importante na modulação da constrição mecânica à protrusão da radícula (Buckeridge *et al.* 2000a, Lisboa *et al.* 2006).

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

Em todas as espécies de leguminosas estudadas, a mobilização do galactomananos inicia após a germinação (Buckeridge *et al.* 2000c, Tonini *et al.* 2006), sendo mediada por três enzimas hidrolíticas: α -galactosidase (EC 3.2.1.22), endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) e exo- β -manosidase (EC 3.2.1.25) (Reid & Meier 1972, McCleary & Matheson 1976, Buckeridge & Dietrich 1996).

Como as ramificações de galactose na cadeia principal interferem na ação hidrolítica da endo- β -mananase sobre a cadeia de manano, torna-se importante a ação da α -galactosidase, desglicosilando o polímero, anteriormente à ação hidrolítica da endo- β -mananase, e mesmo da exo- β -manosidase (Reid & Edwards 1995, Buckeridge *et al.* 2000a, Lisboa *et al.* 2006).

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 1985b) e em sementes de *Trifolium incarnatum* e *Medicago sativa* (alfafa) (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 *S. virgata*, Buckeridge *et al.* (2000a) propuseram que as enzimas poderiam ser produzidas tanto pela camada de aleurona como pelas células do endosperma.

Ainda, nessa mesma espécie, o tegumento parece ter um papel importante durante a mobilização das reservas, provavelmente controlando a produção, modificação e/ou armazenamento das enzimas hidrolíticas (Tonini *et al.* 2007). Kontos & Spyropoulos (1996) sugeriram que o tegumento pode controlar a produção de enzimas hidrolíticas, como a α -galactosidase e a endo- β -mananase, no endosperma de sementes de *Ceratonia siliqua*. Assim, como em sementes de *Lycopersicon esculentum* (tomate), na qual verificou-se um efeito inibitório do tegumento na produção da endo- β -mananase (Nonogaki *et al.* 1992, Nomaguchi *et al.* 1995).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar em que ponto do metabolismo a semente de *S. virgata* se encontra em relação à produção das proteínas, especificamente à da α -galactosidase (transcrição do gene ou tradução do mRNA), antes da germinação e durante a degradação dos galactomananos no período pós-germinativo, e supostamente os tecidos envolvidos nesta produção.

3. Material

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

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, quando as sementes forem armazenadas em sacos de papel a temperatura ambiente.

4. Métodos

Após o beneficiamento dos frutos, as sementes quiescentes foram escarificadas mecanicamente com lixa e incubadas sobre papel de filtro em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 0,5 mL de solução/semente, em condições de 12h de luz e temperatura de aproximadamente 25 °C. As sementes foram embebidas em água, em solução de actinomicina-D $0,2 \cdot 10^{-4}$ M (Ketelaar *et al.* 2002) e em solução de cicloheximida $0,5 \cdot 10^{-4}$ M (Gubler *et al.* 1995, Brandstatter & Kieber 1998).

4.1. Efeito de inibidores de transcrição e tradução sobre a degradação das reservas, produção e atividade das hidrolases (α -galactosidase)

As sementes embebidas em água (controle), actinomicina-D (inibidor de transcrição) e cicloheximida (inibidor de tradução) foram coletadas 15 horas após a embebição, período germinativo no qual a semente apresenta aproximadamente 20% de teor de água, e do segundo ao quinto dia após a embebição, período pós-germinativo no qual a semente apresenta aproximadamente de 45 a 60% de teor de água e que abrange o início e a degradação intensa das reservas. Essas sementes coletadas foram dissecadas, separando o tegumento e/ou o endosperma, e os tecidos submetidos aos experimentos descritos a seguir.

4.1.1. Determinação do peso seco do endosperma

Os endospermas isolados das sementes coletadas (5 sementes por tratamento a cada dia, com três repetições) foram secos em estufa a 80 °C até peso constante, a fim de comparar através do peso seco a degradação dos galactomananos durante o período de germinação e pós-germinação sob a influência dos inibidores mencionados.

4.1.2. Extração e determinação das proteínas totais e da atividade das hidrolases (α -galactosidase)

O tecidos isolados, tegumento e endosperma, das sementes coletadas (10 sementes por tratamento a cada dia, com três repetições) foram macerados usando nitrogênio líquido, 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 centrifugados a 13.000 g por 5 minutos e o sobrenadante submetido à dosagem de proteínas e de atividade da α -galactosidase.

Para a dosagem de proteína, utilizou-se 20 ou 40 μL de amostra, dependendo do extrato, e 200 μL de reagente (Bio Rad), completando o volume com água destilada para 1 mL. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201) no comprimento de onda (λ) de 595 nm (Bradford 1976).

Para a análise da atividade de α -galactosidase, os sobrenadantes foram ensaiados utilizando-se o substrato sintético específico p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (Reid & Meier 1973). Para a referida dosagem utilizou-se 5, 10 ou 20 μL de amostra, dependendo do extrato, 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_2CO_3 0,1 N e as leituras das absorbâncias feitas em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201) no comprimento de onda (λ) de 405 nm.

4.1.3. Detecção das hidrolases (α -galactosidase)

Os endospermas isolados das sementes coletadas (30 sementes por tratamento a cada dia) foram macerados usando nitrogênio líquido, 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 centrifugados a 13.000 g por 5 minutos e o sobrenadante submetido à dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976).

A partir da dosagem de proteínas, foram retirados de cada extrato volumes que continham o equivalente a 50 μg de proteínas, que foram dialisados, liofilizados e resuspensores em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer), específico para eletroforese, com adição de β -mercaptoetanol.

As amostras resuspensores foram aquecidas em banho-maria a 95 °C por 5 minutos, centrifugadas a 13.000 g por 2 minutos e, então, submetidas à

eletroforese em SDS-PAGE (Laemmli 1970, Hames 1990, Weber & Osborn 1969). As proteínas obtidas através da eletroforese foram transferidas para membranas de nitrocelulose, para detecção da α -galactosidase por *Western Immunoblotting* (Buckeridge & Reid 1994).

4.1.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise qualitativa das proteínas foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), empregando-se um sistema descontínuo, baseado no método descrito por Laemmli (1970).

As eletroforeses foram feitas em mini-géis de 0,75 mm de espessura (9 X 6 cm), contendo 12% de acrilamida, montados em cuba vertical de eletroforese modelo mini-protean (Bio-Rad). Durante a corrida foi mantida corrente constante de 60 mA por cerca de 120 minutos, tempo necessário para o marcador alcançar a extremidade inferior do gel.

Para revelação das proteínas, após a corrida, o gel foi imerso em solução de Coomassie Brilliant Blue R250 0,1% dissolvido em ácido acético:metanol:água (1:4:5 - v/v/v), durante 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação contínua. Em seguida, o gel foi mantido em solução descorante, ácido acético:metanol:água (1:4:5 - v/v/v), sob agitação contínua e trocas freqüentes da solução (Hames 1990).

A determinação do peso molecular das bandas de proteínas do gel foi feita pelo cálculo do R_f da proteína de interesse e sua localização na curva de calibração traçada com os valores de R_f das proteínas marcadoras versus o $\log$ de seus pesos moleculares, conforme Weber & Osborn (1969). Os marcadores de peso molecular utilizados foram a miosina (195 kDa), β -galactosidase (111,6 kDa), albumina de soro bovino (59,4 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (24,7 kDa), lisozima (12,5 kDa) e aprotinina (6,4 kDa), adquiridos da Bio-Rad.

4.1.3.2. *Western immunoblotting*

Depois da separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 2 a 4 horas em solução de transferência, contendo Tris-glicina em tampão metanol (20%) 40 mM pH > 8,0, usando corrente constante de 400 mA. Após a transferência das proteínas, a membrana foi incubada por uma hora em solução de ferrocianeto de potássio 100 mM, para inibir a atividade da peroxidase da semente (Guéra & Sabater 2002), e, então, 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) 0,1M pH 7,0, contendo algumas gotas de Tween 20. Posteriormente, foram incubadas durante uma noite em solução contendo anti- α -galactosidase, diluído 1:200 em PBS, anticorpo que foi preparado em coelhos contra α -galactosidase de sementes de guar. Em testes preliminares determinou-se que há reação cruzada do anticorpo com as enzimas de sementes de *S. virgata*.

Depois da incubação com o anticorpo, as membranas foram lavadas com Tris-HCl 50 mM pH 7,4 quatro vezes, por 10 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 10 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 de 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 as bandas da α -galactosidase, caracterizada por coloração acastanhada.

5. Resultados/ Discussão

5.1. Efeito de inibidores de transcrição e tradução sobre a degradação das reservas

Para comparar a degradação dos galactomananos, durante e após a germinação, entre as sementes embebidas em água (controle), em actinomicina-D e em cicloheximida, foi avaliada a taxa de germinação, através da protrusão da radícula, a massa fresca das sementes intactas e a massa fresca e seca do endosperma dessas sementes.

Analisando a porcentagem de germinação ao longo do período, observou-se que a germinação completa das sementes ocorreu somente no segundo dia após a embebição, tanto no controle como nos tratamentos, não havendo aparentemente influência dos inibidores de transcrição e tradução sobre o processo germinativo (Fig. 1). Sabe-se que em um contexto fisiológico e bioquímico, a germinação compreende o conjunto de eventos que ocorre durante a embebição da semente e se estende até a protrusão da radícula (Bewley & Black 1994), e que o processo germinativo em sementes de *Sesbania virgata* ocorre até o segundo ou terceiro dias após a embebição (Buckeridge & Dietrich 1996, Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2007).

Quanto à variação de massa fresca das sementes ao longo do mesmo período, observou-se um aumento gradativo nos valores de massa fresca das sementes durante e após a germinação, tanto no controle como nos tratamentos, apesar das sementes embebidas em cicloheximida terem apresentado massa fresca menor, quando comparadas com as sementes embebidas em água e em actinomicina-D, no segundo dia após a embebição (Fig. 2A).

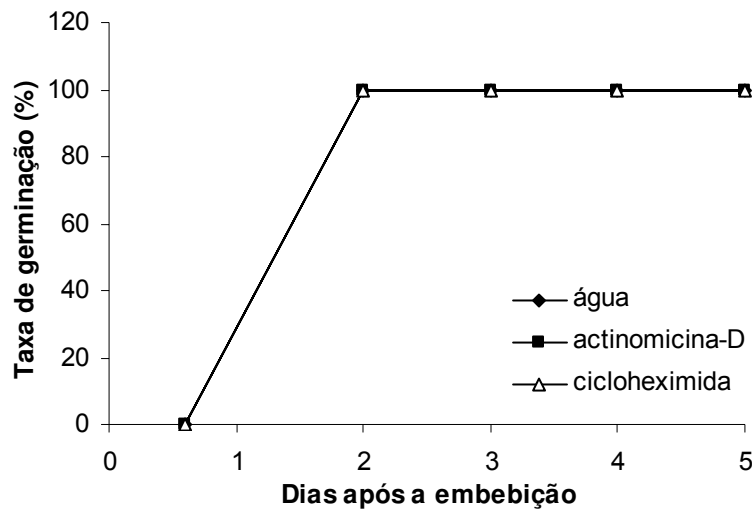


Figura 1. Taxa de germinação em sementes de *S. virgata*, após 15 horas de embebição e do segundo ao quinto dia após a embebição em água (controle), actinomicina-D ($0,2 \cdot 10^{-4}$ M) e cicloheximida ($0,5 \cdot 10^{-4}$ M). Os valores representam a média de três repetições.

Em contrapartida, o endosperma apresentou um aumento nos valores de massa fresca somente até o segundo dia após a embebição em água e actinomicina-D e até o terceiro dia após a embebição em cicloheximida (Fig. 2B). Na presença de cicloheximida, observou-se um retardamento no aumento da massa fresca do endosperma, que se refletiu no segundo dia após a embebição (Fig. 2B). A partir do terceiro dia ocorreu uma diminuição gradativa nos valores de massa fresca do endosperma das sementes embebidas com actinomicina-D e cicloheximida, enquanto no controle a diminuição significativa destes valores ocorreu somente a partir do quarto dia após a embebição (Fig. 2B). Apesar desta diferença, os valores de massa fresca foram significativamente semelhantes entre os tratamentos no terceiro, quarto e quinto dias após a embebição (Fig. 2B).

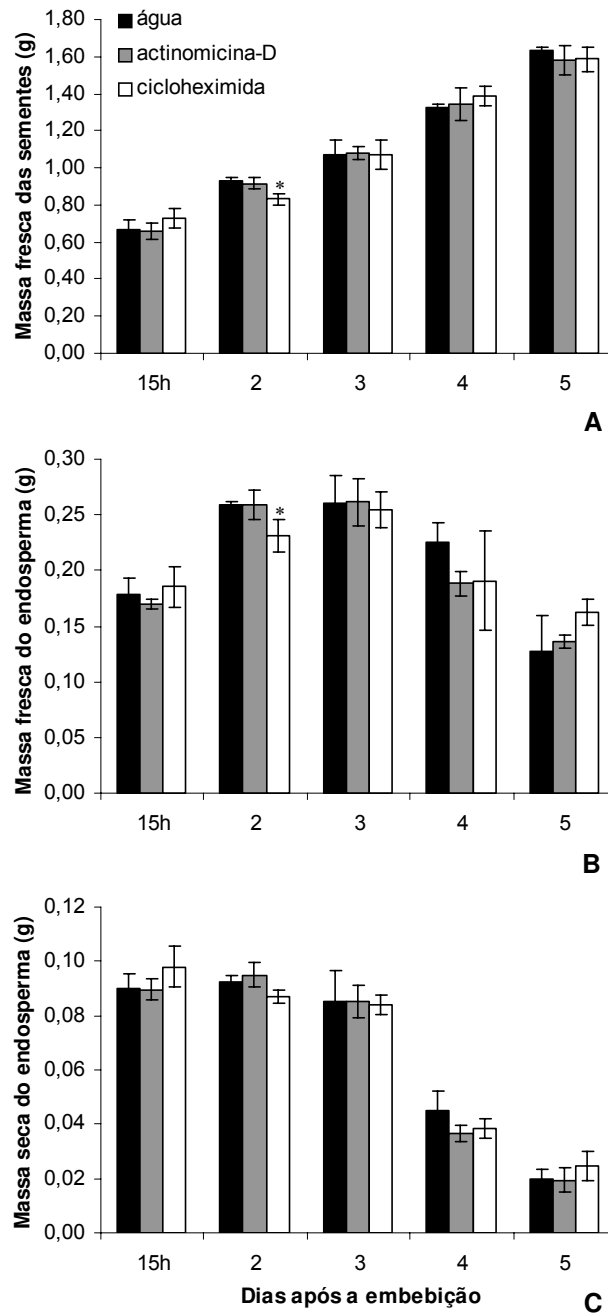


Figura 2. Massa fresca (g) das sementes íntegras **(A)** e massa fresca **(B)** e seca (g) **(C)** dos endospermas isolados de sementes de *S. virgata*, após 15 horas de embebição e do segundo ao quinto dia após a embebição em água (controle), actinomicina-D ($0,2 \cdot 10^{-4}$ M) e cicloheximida ($0,5 \cdot 10^{-4}$ M). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

As diferenças entre os tratamentos também foram observadas nos valores de massa seca do endosperma durante a germinação (Fig. 2C). Enquanto o endosperma de sementes embebidas em água e actinomicina-D manteve massa seca constante até o terceiro dia após a embebição, a massa seca do endosperma das sementes embebidas em cicloheximida apresentou uma diminuição no segundo dia após a embebição (Fig. 2C).

Dessa forma, o endosperma das sementes embebidas após dois dias em cicloheximida apresentou massa seca menor do que aquelas do endosperma das sementes embebidas em água e em actinomicina-D, assim como observado na massa fresca das sementes intactas e do endosperma (Fig. 2). A partir do terceiro dia após a embebição, todos os tratamentos apresentaram diminuição gradativa da massa seca do endosperma, atingindo valores próximos a zero no quinto dia após a embebição (Fig. 2C).

Esta diminuição nos valores de massa seca do endosperma a partir do terceiro dia após a embebição (Fig. 2C), está diretamente relacionada com a degradação dos galactomananos presentes neste tecido. Já que 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), e que a degradação intensa dos galactomananos em sementes de *S. virgata* ocorre entre o terceiro e quinto dias após a embebição (Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge *et al.* 2000b, Tonini *et al.* 2006).

Como a diminuição dos valores de massa fresca do endosperma também ocorreu a partir do terceiro dia (Fig. 2B), relaciona-se esta diminuição a perda de massa seca do tecido e, conseqüentemente, a degradação dos galactomananos, não podendo ser relacionado à perda de água pela semente. Já o aumento de massa fresca das sementes intactas durante todo o período germinativo e pós-germinativo (Fig. 2A), deve estar relacionado à absorção de água durante a germinação e crescimento do embrião durante e após a germinação. Sabe-se que o aumento nos valores de massa fresca das sementes se deve à absorção de

água durante a germinação e ao alongamento e crescimento do embrião durante e após a germinação (Bewley & Black 1994, Taiz & Zeiger 2004).

Quanto à influência dos inibidores de transcrição e tradução, sugere-se que a presença de cicloheximida tenha induzido a degradação do endosperma e, conseqüentemente, dos galactomananos durante a germinação, causando a diminuição de massa seca do endosperma já no segundo dia após a embebição, que se refletiu nos valores de massa fresca do endosperma e da semente como um todo (Fig. 2).

Sabendo que a auxina, em leguminosas, e a giberelina, no caso de cereais, estão envolvidas no controle de mobilização de reservas do endosperma de diversas sementes, ativando a transcrição dos genes que originam as hidrolases (Taiz & Zeiger 2004, Buckeridge *et al.* 2004b), e que a expressão de diversos genes primários de resposta a estes hormônios podem ser induzidos por cicloheximida (Theologis *et al.* 1985, Van Der Zaal *et al.* 1987, Franco *et al.* 1990, Li *et al.* 1994, Abel *et al.* 1995, Gubler *et al.* 1995, Koshiba *et al.* 1995, Abel & Theologis 1996, Roux & Perrot-Rechenmann 1997, Hsieh *et al.* 2000, Laskowsky *et al.* 2002), sugere-se que a presença de cicloheximida durante a embebição das sementes de *S. virgata* possa ter induzido a produção ou ativação das enzimas hidrolíticas relacionadas à degradação das proteínas de reserva e dos galactomananos durante a germinação, através da indução de genes primários relacionados à via de sinalização da auxina e/ou giberelina.

Como concentrações idênticas à utilizada neste trabalho foram capazes de induzir a expressão de um gene relacionado a giberelina em sementes de *Hordeum vulgare* (cevada) (Gubler *et al.* 1995), seria possível em sementes de *S. virgata* um efeito similar da cicloheximida sobre a expressão dos genes primários, estimulando a produção ou ativação das enzimas.

A síntese *de novo* de enzimas seria possível mesmo na presença de cicloheximida, já que a concentração utilizada do hormônio não é capaz de bloquear totalmente a síntese das proteínas. Em estudos com alfafa, foi demonstrado que somente uma concentração de cicloheximida três vezes maior

do que a utilizada neste trabalho é capaz de inibir 90% da tradução dos mRNAs (Monroy *et al.* 1993).

Embora o mecanismo de indução por cicloheximida, sobre a expressão de diversos genes, ainda não tenha sido muito explorado em plantas, diversas hipóteses já foram levantadas a partir de estudos com células animais. A presença de cicloheximida pode aumentar a estabilidade dos mRNAs, através da inibição da síntese das enzimas relacionadas à degradação dos mRNAs (Pontecorvi *et al.* 1988). Alternativamente, podem proteger os mRNAs de ribonucleases citoplasmáticas, através dos polissomos (Cochran *et al.* 1983, Edwards & Mahadevan 1992). Para os genes autorepressivos, a inibição da tradução de seus produtos pode levar a uma superindução do gene (Sassone-Corsi *et al.* 1988).

A cicloheximida pode ativar a transcrição através da diminuição de reguladores negativos (Li *et al.* 2001). Pode induzir o desacoplamento do DNA em replicação e da cromatina agregada, prevenindo a formação de uma estrutura de cromatina repressora (Cesari *et al.* 1998). Alternativamente, pode induzir o desacoplamento do DNA em replicação e dos genes repressores específicos, induzindo o desacoplamento da cromatina repressora da transcrição (Li *et al.* 2001). Por fim, a cicloheximida pode ativar diretamente a transcrição, por estimular sinais associados à cromatina (Mahadevan *et al.* 1991), ou por modificações bioquímicas que levam à ativação ou desativação de fatores positivos ou negativos de transcrição (Li *et al.* 2001).

De modo geral, o fenômeno de superindução por cicloheximida tem sido atribuído à diminuição da degradação dos mRNAs (Cleveland & Yen 1989, Franco *et al.* 1990, Shen *et al.* 1993, Li *et al.* 1994, Berberich & Kusano 1997, Bostock *et al.* 1999, Meighan-Mantha *et al.* 1999, Nakagawa *et al.* 1999, Hershko *et al.* 2004), à estimulação de sinais intracelulares (Mahadevan & Edwards 1991, Edwards & Mahadevan 1992, Hershko *et al.* 2004) e/ou ao aumento da transcrição de genes (Lusska *et al.* 1992, Sensel *et al.* 1994, Berberich & Kusano 1997, Newton *et al.* 1997, Meighan-Manth *et al.* 1999, Nakagawa *et al.* 1999, Hershko *et al.* 2004, Joiakim *et al.* 2004). Estudos recentes sugerem que os mecanismos pelos quais

os inibidores de síntese protéica estimulam a superindução podem variar entre diferentes tipos de células e podem ser diferentes dependendo do tipo de gene induzido (Hershko *et al.* 2004).

Diferentemente do processo germinativo, não foi observado aparentemente nenhum efeito dos inibidores de transcrição e tradução sobre a massa fresca e seca das sementes e do endosperma após a germinação, durante o processo de degradação das reservas (Fig. 2).

5.2. Efeito de inibidores de transcrição e tradução sobre a degradação das proteínas totais, produção e atividade das hidrolases (α -galactosidase)

5.2.1. Degradação das proteínas totais

Analisando o teor de proteínas totais no tegumento, observou-se que a diminuição significativa na quantidade de proteínas ocorreu principalmente no período pós-germinativo, a partir do terceiro dia após a embebição, tanto em água como em actinomicina-D e cicloheximida (Fig. 3A).

Porém, na presença de actinomicina-D a diminuição nos teores protéicos ao longo do período pós-germinativo não foi tão significativa como nos outros tratamentos, já que a quantidade de proteínas foi igual ou até maior, no quarto dia após a embebição, quando comparado com as sementes embebidas em água e cicloheximida (Fig. 3A).

No endosperma, a degradação das proteínas começou durante a germinação, embora a diminuição dos teores protéicos tenha sido maior no período pós-germinativo, tanto no controle como nos tratamentos (Fig. 3B). Em sementes de *S. virgata*, demonstrou-se anatomicamente que a degradação das proteínas de reserva dos corpos protéicos ocorreu a partir do terceiro dia após a embebição, no período pós-germinativo (Tonini *et al.* 2006).

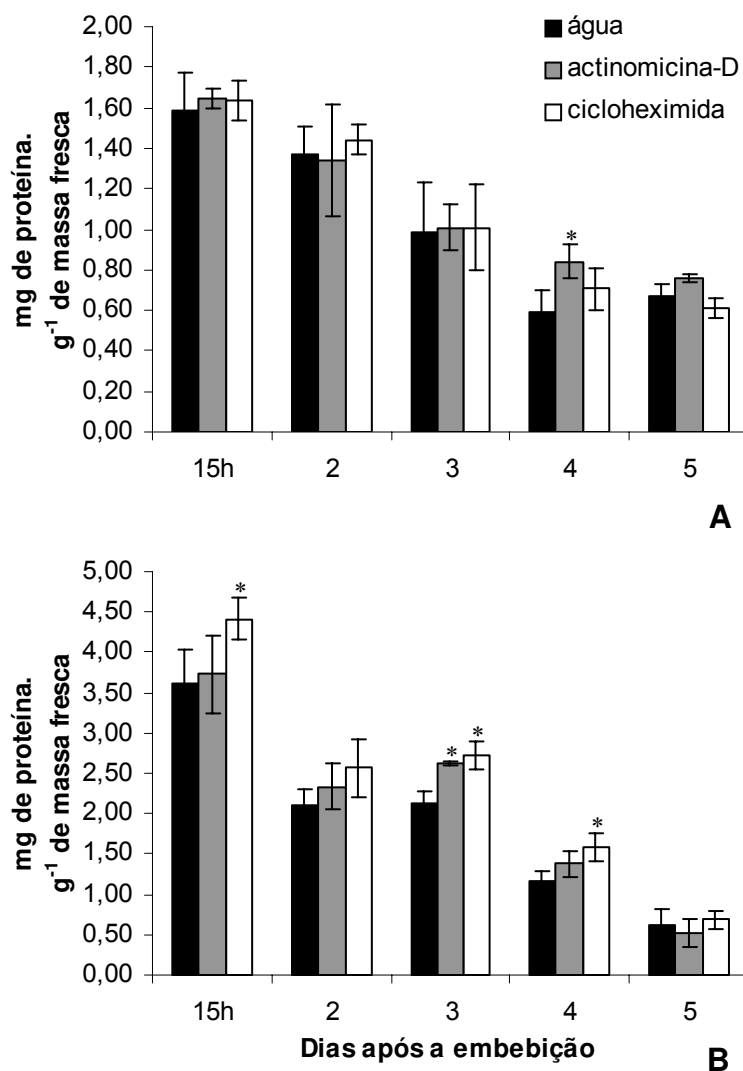


Figura 3. Teor de proteína total nos tegumentos (**A**) e nos endospermas (**B**) de sementes de *S. virgata*, após 15 horas de embebição e do segundo ao quinto dia após a embebição em água (controle), actinomicina-D ($0,2 \cdot 10^{-4}$ M) e cicloheximida ($0,5 \cdot 10^{-4}$ M). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

A presença de actinomicina-D e, principalmente, de cicloheximida no endosperma também inibiu parcialmente a degradação das proteínas, já que os teores protéicos destas sementes foram maiores em 15 horas após a embebição e

no terceiro e quarto dias após a embebição, quando comparado com as sementes embebidas em água. Além disso, aparentemente, a presença destes hormônios estimulou a síntese *de novo* de proteínas no terceiro dia após a embebição (Fig. 3B).

Dessa forma, a actinomicina-D e a cicloheximida estariam inibindo a degradação de proteínas no tegumento e endosperma, como consequência da inibição da síntese *de novo* de proteases. Sabe-se que proteases estão envolvidas na hidrólise das proteínas de reserva e que muitas destas enzimas proteolíticas são sintetizadas *de novo* durante e após a germinação (Cervantes *et al.* 1994, Bewley 1997, Asano *et al.* 1999, Buckeridge *et al.* 2004b, Zakharov *et al.* 2004). Em sementes de tomate, a actinomicina-D mostrou-se efetiva em inibir a atividade de proteases durante o período pós-germinativo (Mathan 1965).

Porém, como a degradação das proteínas não foi totalmente inibida em presença da actinomicina-D e cicloheximida, apenas retardada, sugere-se também a presença e atividade de proteases pré-formadas durante a maturação de sementes, assim como a síntese de proteases através da utilização de mRNAs pré-formados durante a maturação, o que explicaria um efeito inibidor maior da cicloheximida sobre a degradação das proteínas de reserva no endosperma.

Sabe-se que enzimas proteolíticas ácidas, cuja função é hidrolisar proteínas na fase pós-germinativa, suportando o desenvolvimento inicial da plântula, são sintetizadas durante a maturação, sendo armazenadas em vacúolos líticos (Buckeridge *et al.* 2004a).

Algumas proteases são formadas durante a maturação de sementes de diversas espécies, como em *Vicia sativa*, *Ricinus communis* (mamona), *Arachis hypogaea* (amendoim), *Canavalia gladiata*, *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Vigna mungo* e *Cucurbita moschata* (Hara-Nishimura *et al.* 1982, Hiraiwa *et al.* 1993, Bewley & Black 1994, Okamoto *et al.* 1996, Kang *et al.* 1997, Schlereth *et al.* 2001). Estas proteases podem ser sintetizadas na forma de precursores, pró-enzimas inativas, que serão processados através de proteólise limitada, transformando-se em proteases ativas (Müntz 1996). Durante a germinação de

sementes de *Vigna mungo*, proteases são ativadas através de processamentos pós-traducionais (Okamoto & Minamikawa 1995). Já em sementes de *Fagopyrum esculentum*, proteases armazenadas durante a maturação são ativadas pela dissociação dos seus inibidores no período germinativo (Belozersky *et al.* 1990, Elpidina *et al.* 1991, Bewley & Black 1994).

Além disso, a síntese de proteínas pode ocorrer durante a germinação através da utilização de mRNAs pré-formados durante a maturação (Castro & Hilhorst 2004, Rajjou *et al.* 2004, Nakabayashi *et al.* 2005). Em sementes de cevada, acredita-se que a mobilização das proteínas nos tecidos de reserva ocorra tanto através de proteases armazenadas desde a maturação quanto através de proteases sintetizadas *de novo* (Sreenivasulu *et al.* 2008).

5.2.2. Atividade das hidrolases (α -galactosidase)

Analisando a atividade total da α -galactosidase no tegumento, observou-se que a enzima já estava ativa após 15 horas de embebição, tanto no controle como nos tratamentos, embora a presença de cicloheximida tenha induzido uma maior atividade da α -galactosidase neste período (Fig 4A).

No segundo dia após a embebição, observou-se uma diminuição na atividade da enzima em todos os tratamentos, permanecendo constante até o terceiro dia após a embebição (Fig. 4A). Já a partir do terceiro dia, observou-se um aumento significativo na atividade da α -galactosidase em todos os tratamentos, principalmente no quarto dia em sementes embebidas em água e actinomicina-D e no quinto dia após a embebição em cicloheximida (Fig. 4A).

A presença de actinomicina-D e cicloheximida parece ter induzido a atividade da enzima no período pós-germinativo, já que a atividade da α -galactosidase foi maior no tegumento das sementes embebidas com os tratamentos do terceiro ao quinto dia após a embebição quando comparado com as do controle no mesmo período (Fig. 4A).

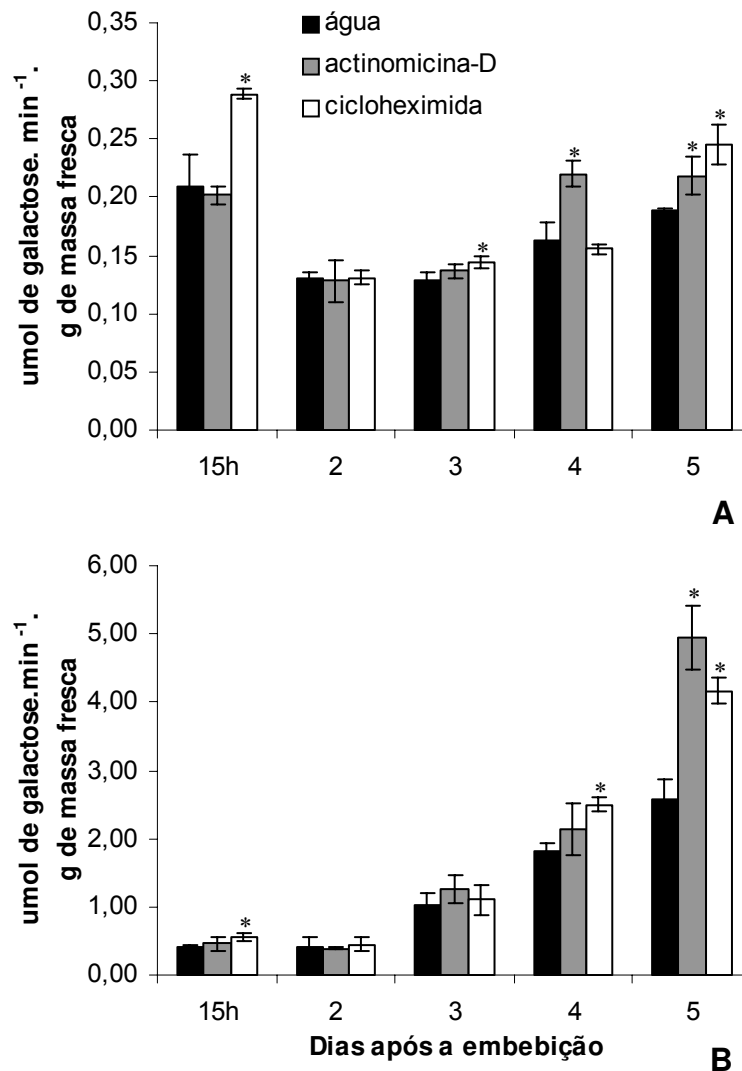


Figura 4. Atividade total da α -galactosidase nos tegumentos **(A)** e nos endospermas **(B)** de sementes de *S. virgata*, após 15 horas de embebição e do segundo ao quinto dia após a embebição em água (controle), actinomicina-D ($0,2 \cdot 10^{-4}$ M) e cicloheximida ($0,5 \cdot 10^{-4}$ M). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

No endosperma, a atividade total da α -galactosidase após 15 horas de embebição foi baixa, porém pode-se observar assim como no tegumento uma atividade maior da enzima nas sementes embebidas em cicloheximida (Fig. 4).

Desta forma, sugere-se que a presença de cicloheximida tenha induzido a degradação do endosperma e, conseqüentemente, dos galactomananos durante a germinação, através da indução da atividade da α -galactosidase (Fig. 4B), causando a diminuição de massa seca do endosperma já no segundo dia após a embebição observada na Fig 3C, que se refletiu nos valores de massa fresca do endosperma e da semente como um todo (Fig. 3).

Após 15 horas de embebição, a atividade da enzima permaneceu constante até o segundo dia após a embebição, aumentando gradativamente após este período, tanto no controle como nos tratamentos (Fig. 4B). Apesar deste aumento ter ocorrido em todos os tratamentos, a presença de actinomicina-D e cicloheximida parece ter induzido a atividade da enzima no quarto e quinto dia após a embebição, já que a atividade da α -galactosidase foi praticamente o dobro no endosperma das sementes embebidas com os tratamentos no quinto dia após a embebição quando comparado com as do controle no mesmo período (Fig. 4B).

O efeito indutor dos inibidores de transcrição e tradução já havia sido observado em feijão e em sementes de cevada, onde a presença de actinomicina-D superinduziu a atividade de enzimas, inclusive agindo em conjunto com a giberelina no caso das sementes de cevada (Jones & Northcote 1981, Panagiotidis *et al.* 1982).

Panagiotidis *et al.* (1982) sugeriu que a actinomicina-D poderia aumentar o nível do ativador da enzima e, assim, superinduzir sua atividade. O fenômeno de superindução por actinomicina-D foi primeiramente observado em sistemas animais, como em fígado de rato e em uma variedade de cultura de células mamárias (Russel & Snyder 1969, Tomkins *et al.* 1972, Clark 1974, Yamasaki & Ichihara 1976).

Segundo Jones & Northcote (1981) existem duas hipóteses para o mecanismo de superindução por actinomicina-D: diminuição da degradação ou aumento na síntese da enzima, em ambos a inibição da transcrição de mRNAs menos estáveis suprime a competição entre os mRNAs, resultando na superindução da atividade da enzima.

Sabendo que a presença de actinomicina-D e cicloheximida inibiram a síntese *de novo* das proteases, como mencionado anteriormente, a indução da α -galactosidase deve ter ocorrido devido à inibição da degradação da enzima, principalmente no fim do processo pós-germinativo, no quinto dia após a embebição.

No crescimento de hipocótilos de feijão, demonstrou-se uma correlação entre as atividades da β -galactosidase e das proteases, já que as atividades da primeira diminuíram conforme as atividades das proteases aumentaram (Gómez *et al.* 1995).

Como a presença de actinomicina-D e cicloheximida não inibiram a atividade da α -galactosidase no tegumento e endosperma, é possível que esta enzima seja pré-formada durante a maturação, sendo supostamente armazenada nos corpos protéicos presentes no endosperma até o período pós-germinativo, onde ocorre a degradação dos galactomananos. Em sementes de tomate, alface e *Phoenix dactylifera* (palmeira), sabe-se que a síntese de α -galactosidase ocorre no endosperma durante o desenvolvimento das sementes (DeMason *et al.* 1992, Bewley & Black 1994, Feurtado *et al.* 2001).

Porém, para que tal hipótese seja confirmada, serão necessários experimentos de localização *in situ* da enzima, de forma a encontrá-la pronta antes da germinação, nos corpos protéicos.

Além disso, parte da α -galactosidase presente no endosperma pode ter sido sintetizada no tegumento durante a maturação ou apenas armazenada neste tecido, sendo posteriormente transportada para o endosperma durante a degradação dos galactomananos. Tonini *et al.* (2007) já havia sugerido a participação do tegumento na produção, modificação e/ou armazenamento das enzimas hidrolíticas, controlando a ação dessas hidrolases durante e após a germinação, possivelmente junto com o ABA presente no tecido.

5.2.3. Detecção das hidrolases (α -galactosidase)

Para comparar qualitativamente as proteínas totais e a detecção da α -galactosidase entre as sementes embebidas em água, actinomicina-D e cicloheximida, foi realizada a separação das proteínas no endosperma, através de eletroforese, e detecção da α -galactosidase através da técnica de *western immunoblotting*.

Analizando a separação das proteínas do endosperma das sementes embebidas em água, foi possível visualizar 17 bandas protéicas, com pesos moleculares de 94 a 12 kDa (Fig. 5A, Tabela 1). As proteínas de 81, 52, 48 e 14 kDa, aparentemente, estavam presentes apenas em 15 horas e do segundo ao terceiro dias após a embebição, sugerindo a participação destas proteínas durante o processo germinativo (Fig. 5A).

Ainda, como em sementes de *S. virgata* demonstrou-se que a degradação das proteínas de reserva dos corpos protéicos ocorre a partir do terceiro dia após a embebição, no período pós-germinativo (Tonini *et al.* 2006), pode-se sugerir que estas proteínas teriam papel de reserva para o crescimento do embrião e posterior estabelecimento da plântula.

Outras proteínas, como as de 94, 44, 35, 23, 19, 13 e 12 kDa, foram detectadas apenas a partir do terceiro dia após a embebição, ou seja, no período pós-germinativo (Fig. 5A e Tabela 1). Como as proteínas de 94, 44, 19 e 12 kDa estavam presentes apenas no quarto e quinto dias após a embebição (Fig. 5A e Tabela 1), sugere-se que estas estejam diretamente relacionadas com o processo de degradação das proteínas de reserva e/ou dos galactomananos presentes neste tecido.

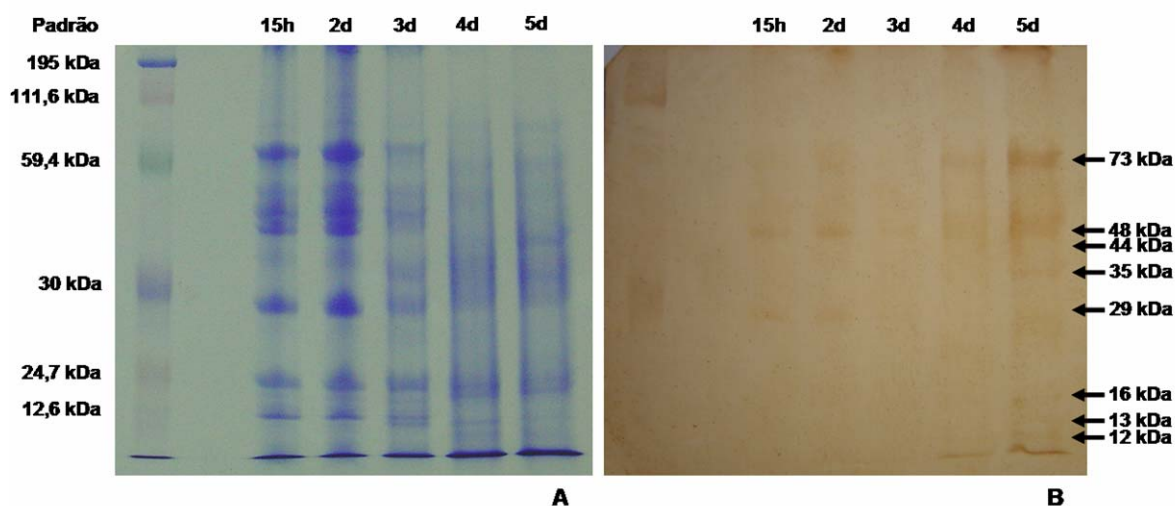


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida **(A)** e *Western immunoblotting* para detecção da α -galactosidase **(B)** nos endospermas de sementes de *S. virgata*, após 15 horas de embebição e do segundo ao quinto dia após a embebição em água, com cerca de 50 μ g de proteína nas amostras aplicadas. **A.** Gel corado com Coomassie Brilliant Blue. **B.** Membrana revelada com DAB, seguido por peróxido de hidrogênio. (setas = reação que caracteriza a presença de α -galactosidase).

As proteínas de 73, 61, 39, 29, 17 e 16 kDa estiveram presentes em todos os dias após a embebição, sugerindo a participação destas tanto no processo germinativo como no processo pós-germinativo (Fig. 5A e Tabela 1). Como as proteínas de 73 e 16 kDa ocorreram aparentemente em maiores concentrações no quarto e quinto dias após a embebição (Fig. 5A), sugere-se que estas sejam componentes intermediários do processo de degradação de reservas, que ocorre no endosperma após a germinação.

Dentre todas estas proteínas, foi possível detectar 8 bandas que apresentaram reação cruzada com o anticorpo contra α -galactosidase, com pesos moleculares de 73, 48, 44, 35, 29, 16, 13 e 12 kDa (Fig. 5B, Tabela 1). Como a presença destas bandas variou entre os dias após a embebição e, ainda, como os pesos moleculares destas variaram bastante (Fig. 5B), sugere-se a existência de

um processo proteolítico da α -galactosidase ao longo do período germinativo e pós-germinativo.

Tabela 1. Peso molecular das proteínas e dos peptídeos que apresentam reação cruzada com o anticorpo anti- α -galactosidase de guar nos endospermas de sementes de *S. virgata* embebidas em água (controle), actinomicina-D ($0,2 \cdot 10^{-4}$ M) (ACT) e cicloheximida ($0,5 \cdot 10^{-4}$ M) (CICLO). (– = não detectado).

Proteínas (kDa)			α -galactosidase (kDa)		
ÁGUA	ACT	CICLO	ÁGUA	ACT	CICLO
94	94	94	–	–	–
81	81	81	–	–	–
73	73	73	73	73	73
61	61	61	–	61	61
52	52	52	–	–	–
48	48	48	48	48	48
44	44	44	44	44	44
39	39	39	–	–	–
35	35	35	35	35	35
29	29	29	29	29	29
23	23	23	–	23	23
19	19	19	–	–	–
17	17	17	–	17	17
16	16	16	16	16	16
14	14	14	–	–	14
13	13	13	13	13	13
12	12	12	12	–	12

Dessa forma, para que a α -galactosidase pudesse agir sobre os galactomananos no período pós-germinativo, a enzima pré-formada durante a

maturação teria que ser ativada, possivelmente através do processo proteolítico sugerido acima no endosperma.

Sabe-se que proteases são responsáveis por modificações pós-traducionais de proteínas, com ação proteolítica limitada a regiões específicas, necessárias para o processamento e maturação de enzimas pré-formadas e controle da atividade destas (Schaller 2004). Em sementes de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) e cevada, a enzima α -galactosidase e β -amilase respectivamente podem ser ativadas através de digestão por enzimas proteolíticas (Overbeeke *et al.* 1989, Guerin *et al.* 1992).

Baseado nesta hipótese, as proteínas de peso mais alto (73, 48 e 29 kDa), que apareceram durante e após a germinação, seriam α -galactosidases pré-formadas durante a maturação, e as de baixo peso molecular (44, 35, 16, 13 e 12), que apareceram somente no período pós-germinativo, seriam isoformas da enzima ativada e os produtos de sua degradação.

Buckeridge & Dietrich (resultados não publicados) e Lisboa *et al.* (2006) observaram que a α -galactosidase das sementes de *S. virgata* apresenta peso molecular em torno de 45 kDa, o que reafirma a hipótese de que a banda com 44 kDa seja uma das isoformas da enzima ativa.

Feurtado *et al.* (2001) sugeriram pelo menos três isoformas da α -galactosidase durante e após a germinação de sementes de tomate e, através da obtenção e seqüenciamento do cDNA da enzima, demonstraram alta homologia da forma ativa da α -galactosidase do tomate (40 kDa) com outras galactosidases, especialmente com as de sementes de *Coffea arabica* (café) (Zhu & Goldstein 1994). Como apenas um gene para a α -galactosidase foi identificado em sementes de tomate, as isoformas aparentemente se formam a partir de modificações pós-traducionais (Feurtado *et al.* 2001).

McCleary & Matheson (1974) também detectaram múltiplas isoformas da α -galactosidase, nas sementes de *Cyamopsis tetragonoloba*, embora apenas uma delas (40 kDa) está associada com o endosperma (Overbeeke *et al.* 1989).

DeMason *et al.* (1992) detectaram quatro isoformas da enzima durante o desenvolvimento do endosperma de sementes de palmeira.

Em sementes de alfafa, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Ceratonia siliqua*, soja, palmeira, café, feijão, *Lupinus angustifolius* (lupino) e *Trifolium repens* pelo menos duas isoformas da α -galactosidase estão presentes, com massas moleculares variando entre 17-57 kDa (Courtois & Petek 1966, McCleary & Mathenson 1974, Williams *et al.* 1978, Itoh *et al.* 1979, Plant & Moore 1982, Chandra Sekhar & DeMason 1990, Dhar *et al.* 1994).

Recentemente Soh *et al.* (2006) detectaram três isoformas da α -galactosidase no fruto de *Carica papaya* (mamão papaia), com pesos moleculares de 170, 57 e 29 kDa, o que reafirma a hipótese de que a banda com 29 kDa seja uma das isoformas da enzima pré-formada durante a maturação, já que a isoenzima do mamão, com o mesmo peso molecular, foi detectada durante o amadurecimento do fruto. Durante o desenvolvimento de frutos de *Cucumis melo* (melão), três isoformas da α -galactosidase também foram detectadas, uma delas com peso molecular em torno de 27 kDa (Gao & Schaffer 1999).

O perfil protéico do endosperma das sementes embebidas em actinomicina-D foi similar ao do endosperma das sementes embebidas em água, apresentando 17 bandas protéicas, com os mesmos pesos moleculares (Tabela 1) e semelhante variação no decorrer dos processos germinativos e pós-germinativos descritos acima para o controle (resultado não mostrado).

Aparentemente, as únicas diferenças foram quanto à concentração da proteína de 73 kDa, que diminuiu no quarto e quinto dias após a embebição ao invés de aumentar como em água, e à concentração das proteínas de 23 e 19 kDa, que foi maior no endosperma das sementes tratadas com actinomicina-D (resultado não mostrado). Como a actinomicina-D é capaz de induzir o acúmulo e atividade de determinadas enzimas (Jones & Northcote 1981, Panagiotidis *et al.* 1982), pode ser que estas proteínas de 23 e 19 kDa exerçam um papel hidrolítico durante o processo pós-germinativo.

Em relação à detecção da α -galactosidase, observou-se a presença de 10 bandas com reação cruzada ao anticorpo contra a enzima em estudo, com pesos moleculares de 73, 61, 48, 44, 35, 29, 23, 17, 16 e 13 (Tabela 1). Comparando os pesos moleculares destas bandas com as encontradas no controle, observou-se a presença de algumas bandas (61, 23 e 17 kDa) que não estavam presentes nas sementes embebidas em água (Tabela 1), sugerindo que o processamento proteolítico da enzima no endosperma das sementes embebidas em actinomicina-D seja diferente ao do controle.

Assim como em actinomicina-D, o endosperma das sementes embebidas em cicloheximida apresentou 17 bandas protéicas, com os mesmos pesos moleculares encontrados e descritos no controle (Tabela 1). Além disso, a variação destas proteínas foi similar à encontrada nas sementes embebidas em água, durante e após a germinação, ocorrendo apenas uma concentração maior das proteínas de 23 e 19 kDa, como em actinomicina-D (resultado não mostrado).

Quanto à detecção da α -galactosidase nas sementes embebidas em cicloheximida, observou-se a presença de 11 bandas referentes à enzima, com pesos moleculares de 73, 61, 48, 44, 35, 29, 23, 17, 16, 14, 13 e 12 kDa (Tabela 1). Do mesmo modo que em actinomicina-D, ocorreu no endosperma a presença de algumas bandas, com 61, 23 e 17 kDa, que não foram detectadas no controle (Tabela 1).

No endosperma de *Cocos nucifera* (coco) foram detectadas duas isoformas da α -galactosidase, uma delas com peso molecular de 23 kDa (Mujer *et al.* 1984), o que corrobora a hipótese de que a banda com 23 kDa seja uma das isoformas da enzima.

Como o endosperma das sementes embebidas em actinomicina-D e cicloheximida apresentaram um número maior de bandas referentes à α -galactosidase quando comparado ao controle (Tabela 1), sugere-se que a presença destes inibidores de transcrição e tradução esteja de alguma forma modificando o processamento proteolítico da α -galactosidase.

É possível que proteases pré-formadas estejam envolvidas no processamento proteolítico da α -galactosidase, sendo sua ativação induzida na presença dos inibidores de transcrição e tradução. Baseado nesta hipótese, o processamento proteolítico da α -galactosidase pré-formada, em presença de actinomicina-D e cicloheximida, seria mais intenso que no controle, com produção de mais duas isoformas da enzima ativa, de 23 e 17 kDa, que apareceram principalmente no período pós-germinativo, juntamente com as outras de baixo peso molecular (44, 35, 16, 13 e 12 kDa).

Sabendo que a actinomicina-D e a cicloheximida podem induzir a expressão de diversos genes primários de resposta à auxina e giberelina e a atividade de enzimas em conjunto com a giberelina (Jones & Northcote 1981, Panagiotidis *et al.* 1982, Theologis *et al.* 1985, Van Der Zaal *et al.* 1987, Franco *et al.* 1990, Li *et al.* 1994, Abel *et al.* 1995, Gubler *et al.* 1995, Koshiba *et al.* 1995, Abel & Theologis 1996, Roux & Perrot-Rechenmann 1997, Hsieh *et al.* 2000, Laskowsky *et al.* 2002), a presença destes inibidores pode ter induzido a ativação destas proteases no endosperma, através da via de sinalização da auxina, da giberelina e/ou de outros hormônios.

6. Conclusões

Baseado em todos estes resultados, sugere-se que a produção da α -galactosidase ocorra principalmente durante a maturação das sementes, sendo supostamente armazenada nos corpos protéicos presentes no endosperma até o período germinativo. A partir deste período até o pós-germinativo, onde ocorre a degradação dos galactomananos, a enzima pré-formada seria processada e ativada, através de um processo proteolítico, que envolveria principalmente proteases também formadas durante a maturação, que seriam ativadas possivelmente através da via de sinalização de hormônios (Fig. 6).

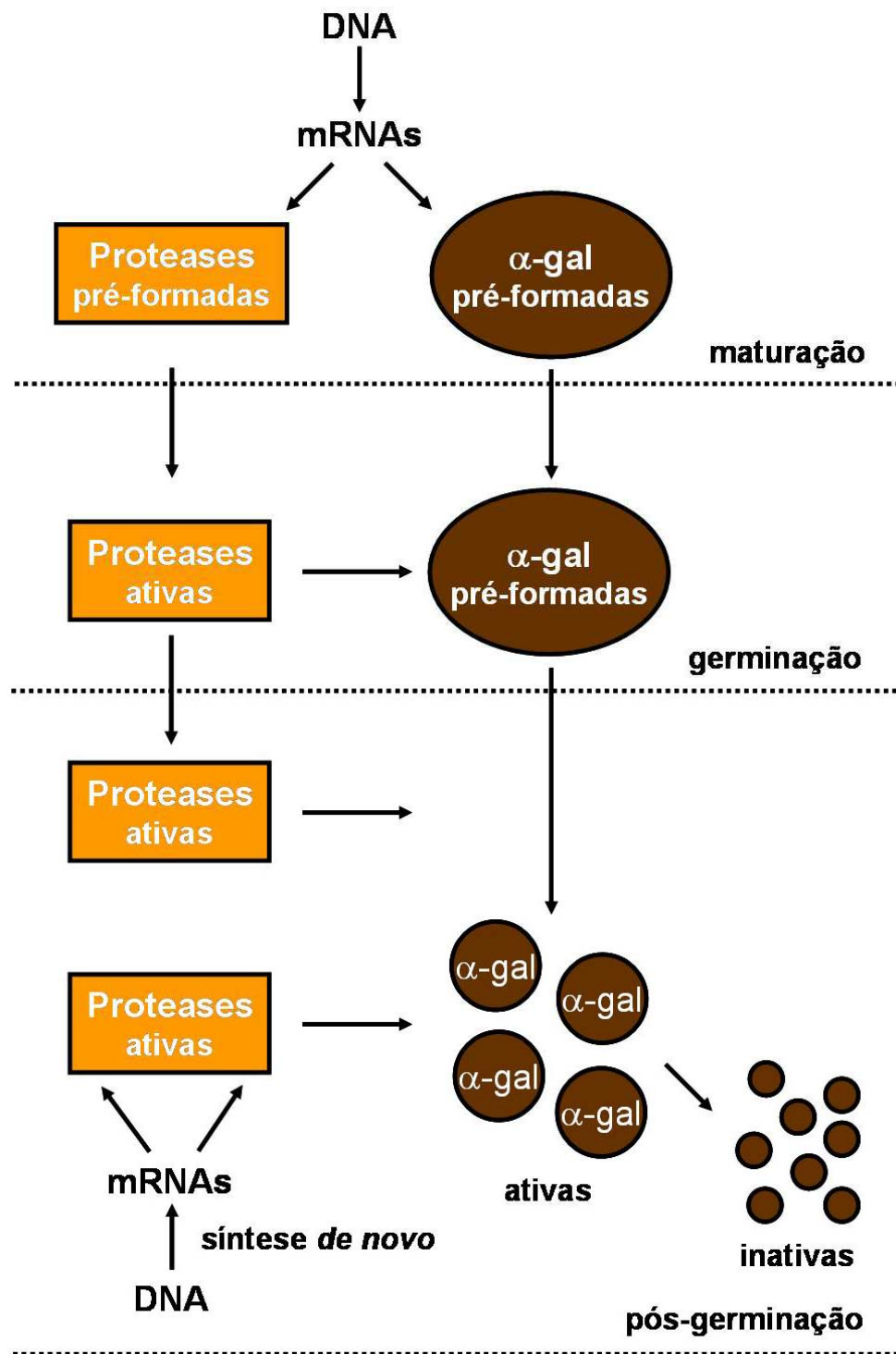


Figura 6. Modelo esquemático do mecanismo de controle da α -galactosidase no endosperma de sementes de *S. virgata*, através do processamento proteolítico durante e após a germinação.

Além disto, como foi sugerida a síntese *de novo* de diversas proteases durante e após a germinação e uma relação íntima destas enzimas com a degradação das proteínas de reserva e da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos. Podemos sugerir que além do controle proteolítico mencionado acima durante e após a germinação, ocorre um processo de regulação da α -galactosidase no final do período pós-germinativo, após atividade intensa da enzima sobre os galactomananos. Neste processo, as proteases estariam novamente envolvidas, porém estas seriam sintetizadas *de novo* após a germinação, sendo responsáveis pela degradação da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos, a fim de evitar o excesso de açúcares redutores no tecido e a produção de sacarose (Fig. 6).

Dessa forma, é possível especular que as proteases envolvidas no controle das atividades destas enzimas seriam sintetizadas tanto durante a maturação, quanto sintetizadas *de novo* durante e após a germinação, com papéis funcionais e temporalmente distintos no processo de regulação das enzimas hidrolíticas. Como estas proteases estariam envolvidas, ainda, no controle do processo de degradação das proteínas de reservas, sugere-se que a mobilização de reservas de carbono (galactomananos) no endosperma de sementes de *S. virgata* deve estar relacionada à mobilização das reservas de nitrogênio (proteínas) no mesmo tecido, possivelmente garantindo o afluxo sincrônico de compostos carreadores dos dois macronutrientes (C e N) para o desenvolvimento do embrião e estabelecimento da plântula.

7. Referências bibliográficas

- ABEL, S. & THEOLOGIS, A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiology* 111:9-17.
- ABEL, S.; NGUYEN, M.D. & THEOLOGIS, A. 1995. The *PSIAA* 4:5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology* 251:533-549.
- ASANO, M.; SUZUKI, S.; KAWAI, M.; MIWA, T.; SHIBAI, H. 1999. Characterization of novel cysteine proteinases from germinating cotyledons of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Biochemistry* 126:296-301.
- BECK, W.T.; BELLANTONE, R.A. & CANELLAKIS, E.S. 1973. Puromycin stimulation of rat liver ornithine decarboxylase activity. *Nature* 241:275-277.
- BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E. & VOSKOBOYNIKOVA, E. 1990. Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Biochemical Journal* 272:677-682.
- BERBERICH, T. & KUSANO, T. 1997. Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize. *Molecular and General Genetics* 254:275-283.
- 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^o ed. Plenum Press, New York. 445p.
- BOSTOCK, R.M.; GERTTULA, S. & QUATRANO, R.S. 1999. Superinduction of the *Em* gene in rice suspension cells in the presence of ABA and Cycloheximide. *Plant Cell Reports* 18:848-852.
- 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.
- BRANDSTATTER, I. & KIEBER, J.J. 1998. Two Genes with Similarity to Bacterial Response Regulators Are Rapidly and Specifically Induced by Cytokinin in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10:1009-1019.

- 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 β -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -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, Paris. p. 283-317.
- 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.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2004a. Acúmulo de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 31-50.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. & AIDAR, M.P.M. 2004b. Mobilização de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 163-185.
- 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.
- CASTRO, R.D. & HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 149-162.

- CERVANTES, E.; RODRIGUEZ, A. & NICOLÁS, G. 1994. Ethylene regulates the expression of a cysteine proteinase gene during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Molecular Biology* 25:207-215.
- CESARI, M.; HELIOT, L.; MEPLAN, C.; PABION, M. & KHOCHBIN, S. 1998. S-phase-dependent action of cycloheximide in relieving chromatin-mediated general transcriptional repression. *Biochemical Journal* 336:619-24.
- CHANDRA SEKHAR, K.N. & DEMASON, D.A. 1990. Identification and immunocytochemical localization of α -galactosidase in resting and germinating date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181:53-61.
- CLARK, J.L. 1974. Specific induction of ornithine decarboxylase in 3T3 mouse fibroblasts by pituitary growth factors: cell density-dependent biphasic response and alteration of half-life. *Biochemistry* 13:4668-4674.
- CLEVELAND, D.W. & YEN, T.J. 1989. Multiple determinants of eukaryotic mRNA stability. *New Biology* 1:121-126.
- COCHRAN, B.H.; REFFEL, A.C. & STILES, C.D. 1983. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 33:939-947.
- COURTOIS, J.E. & PETEK, F. 1966. α -Galactosidase from coffee beans. *Methods in enzymology* 8:565-670.
- DEMASON, D.A.; MADORE, M.A.; SEKHAR, K.N.C. & HARRIS, M.J. 1992. Role of α -galactosidase in cell wall metabolism of date palm (*Phoenix dactylifera*) endosperm. *Protoplasma* 166:177-186.
- DHAR, M.; MITRA, M.; HATA, J.; BUTNARIU, O. & SMITH, D. 1994. Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris* α -D-galactosidase isoenzymes. *Biochemistry and Molecular Biology International* 34:1055-1062.
- EDWARDS, D.R. & MAHADEVAN, L.C. 1992. Protein synthesis inhibitors differentially superinduce *c-fos* and *c-jun* by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO Journal* 11:2415-2424.
- ELPIDINA, E.N.; VOSKOBOYNIKOVA, N.E.; BELOZERSKY, M.A. & DUNAEVSKY, Y.E. 1991. Localization of a metalloproteinase and its inhibitor in the protein bodies of buckwheat seeds. *Planta* 185:46-52.

- FEURTADO, J.A.; BANIK, M. & BEWLEY, J.D. 2001. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *Journal of Experimental Botany* 52:1239-1249.
- FRANCO, A.; GEE M.A. & GUILFOYLE T.J. 1990. Induction and superinduction of auxin-responsive genes with auxin and protein synthesis inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 265:15845-15849.
- GAO, Z. & SCHAFFER, A.A. 1999. A novel alkaline α -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. *Plant Physiology* 119:979-987.
- GÓMEZ, L.D.; CASANO, L.M.; BRAGA, M.R. & BUCKERIDGE, M.S. 1995. Changes in extracellular β -galactosidase and protease activities during bean hypocotyl growth. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 7:1-6.
- GUBLER, F.; KALLA, R.; ROBERTS, J.K. & JACOBSEN, J.V. 1995. Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for myb transactivation of a high-pl α -amylase gene promoter. *The Plant Cell* 7:1879-1891.
- GUÉRA, A. & SABATER, B. 2002. Changes in the protein and activity levels of the plastid NADH-plastoquinone-oxidoreductase complex during fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:423-429.
- GUERIN, J.R.; LANCE, R.C.M. & WALLACE, W. 1992. Release and activation of barley β -amylase by malt endopeptidases. *Journal of Cereal Science* 15:5-14.
- HAMES, B.D. 1990. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *In*: HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. Editors. 2^o ed. Oxford University Press, New York. p. 1-147.
- HARA-NISHIMURA, I.; NISHIMURA, M.; MATSUBARA, H. & AZAKAWA, R. 1982. Suborganellar localization of proteinase catalysing the limited proteolysis of pumpkin globulin. *Plant Physiology* 70:699-703.
- HIRAIWA, N.; TAKEUCHI, Y.; NISHIMURA, M. & HARA-NISHIMURA, I. 1993. A vacuolar processing enzyme in maturing and germinating seeds: its distribution

- and associated changes during development. *Plant Cell Physiology* 34:1197-1204.
- HSIEH, H.-L.; OKAMOTO, H.; WANG, M.; ANG, L.-H.; MATSUI, M.; GOODMAN, H. & DENG, X.W. 2000. *FIN219*, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Genes & Development* 14:1958-1970.
- ITOH, T.; SHIMURA, S. & ADACHI, S. 1979. α -Galactosidase from alfalfa seeds (*Medicago sativa* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* 43:1499-1504.
- JOIAKIM, A.; MATHIEU, P.A.; ELLIOTT, A.A. & REINERS JR., J.J. 2004. Superinduction of *CYP1A1* in MCF10A cultures by cycloheximide, anisomycin, and puromycin: A process independent of effects on protein translation and unrelated to suppression of aryl hydrocarbon receptor proteolysis by the proteasome. *Molecular Pharmacology* 66:936-947.
- JONES, D.H. & NORTHCOTE, D.H. 1981. Induction by hormones of phenylalanine ammonia-lyase in bean-cell suspension cultures. Inhibition and superinduction by actinomycin D. *European Journal of Biochemistry* 116:117-125.
- KANG, H.; PARK, S.J. & CHO, Y.D. 1997. Identification of γ -glutamylamine cyclotransferase, as the preform enzyme at the dormant stage, from soybean (*Glycine max*) seeds. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 30:438-442.
- KETELAAR, T.; FAIVRE-MOSKALENKO, C.; ESSELING, J.J.; RUIJTER, N.C.A.; GRIERSON, C.S.; DOGTEROM, M. & EMONS, A.M.C. 2002. Positioning of Nuclei in *Arabidopsis* Root Hairs: An Actin-Regulated Process of Tip Growth. *The Plant Cell* 14:2941-2955.
- KISSMANN, K.G. & GROTH, D. 1999. Plantas infestantes e nocivas. Tomo II. BASF, São Paulo. p. 947-950.
- KONTOS, F. & SPYROPOULOS, C.G. 1996. Seed coat inhibits the production of α -galactosidase and endo- β -mannanase in the endosperm of developing carob seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 34:787-793.

- KOSHIBA, T.; BALLAS, N.; WONG, L.-M. & THEOLOGIS, A. 1995. Transcriptional regulation of *PS-IAA 4:5* and *PS-IAA 6* early gene expression by indoleacetic acid and protein synthesis inhibitors in pea (*Pisum sativum*). *Journal of Molecular Biology* 252:396-413.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 223:680-685.
- LASKOWSKY, M.J.; DREHER, K.A.; GEHRING, M.A.; ABEL, S.; GENSLER, A.L. & SUSSEX, I.M. 2002. *FQR1*, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiology* 128:578-590.
- LI, G.; BISHOP, K.J. & HALL, T.C. 2001. *De novo* activation of the β -phaseolin promoter by phosphatase or protein synthesis inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 276:2062-2068.
- LI, Y.; STRABALA, T.J.; HAGEN, G. & GUILFOYLE, T.J. 1994. The soybean SAUR open reading frame contains a *cis* element responsible for cycloheximide-induced mRNA accumulation. *Plant Molecular Biology* 24:715-723.
- LISBOA, C.G.S. 2003. Endo- β -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.
- LISBOA, C.G.S.; TONINI, P.P.; TINÉ, M.A.S. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Endo-beta-mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(2): 269-280.
- LUSSKA, A.; WU, L. & WHITLOCK Jr., J.P. 1992. Superinduction of *CYP1A1* transcription by cycloheximide. *The Journal of Biological Chemistry* 267:15146-15151.
- MAHADEVAN, L.C. & EDWARDS, D.R. 1991. Signalling and superinduction. *Nature* 349:747-748.

- MAHADEVAN, L.C.; WILLIS, A.C. & BARRAT, M.J. 1991. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65:775-83.
- MANZI, A.E. & CEREZO, A.S. 1984. The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of seed of *Gleditsia triacanthos*. *Carbohydrate Research* 134:115-131.
- MATHAN, D.S. 1965. Phenylboric acid, a chemical agent stimulating the effect of lanceolate gene in the tomato. *American Journal of Botany* 52:185-192.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975. The germination of seeds. 2^oed. Pergamon Press, Oxford. 192p.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1974. α -D-galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 13:1747-1757.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1976. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 15:43-47.
- MEIGHAN-MANTHA, R.L.; HSU, D.K.W.; GUO, Y.; BROWN, S.A.N.; FENG, S-L. Y.; PEIFLEY, K.A.; ALBERTS, G.F.; COPELAND, N.G.; GILBERT, D.J.; JENKINS, N.A.; RICHARDS, C.M. & WINKLES, J.A. 1999. The mitogen-inducible *gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *The Journal of Biological Chemistry* 274:33166-33176.*
- 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.
- MONROY, A.F.; SARHAN, F. & DHINDSA, R.S. 1993. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression. *Plant Physiology* 102:1227-1235.
- MUJERT, C.V.; RAMIREZ, D.A. & MENDOZA, E.M. 1984. Coconut α -D-galactosidase isoenzymes: isolation, purification and characterization. *Phytochemistry* 23:1251-1254.

- MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A. & TIEDEMANN, J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52:1741-1752.
- NAKABAYASHI, K.; OKAMOTO, M.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y. & NAMBARA, E. 2005. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant Journal* 41:697-709.
- NAKAGAWA, C.W.; YAMADA, K. & MUTOH, N. 1999. Identification of the catalase gene promoter region involved in superinduction in *Schizosaccharomyces pombe* caused by cycloheximide and hydrogen peroxide. *FEMS Microbiology Letters* 173:373-378.
- NEWTON, R.; STEVENS, D.A.; HART, L.A.; LINDSAY, M.; ADCOCK, I.M. & BARNES, P.J. 1997. Superinduction of COX-2 mRNA by cycloheximide and interleukin-1 β involves increased transcription and correlates with increased NF- κ B and JNK activation. *FEBS Letters* 418:135-138.
- 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.; MATSUSHIMA, H. & MOROHASHI, Y. 1992. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. *Physiologia Plantarum* 85:167-172.
- OKAMOTO, T. & MINAMIKAWA, T. 1995. Purification of a processing enzyme (VmPE-I) that is involved in posttranslational processing of a plant cysteine endopeptidase (SH-EP). *European Journal of Biochemistry* 231:300-305.
- OKAMOTO, T.; IURA-IZU, Y.; ISHII, S. & MINAMIKAWA, T. 1996. Asparaginyl endopeptidase in development and germinating legume seeds: immunological detection and quantification. *Plant Science* 115:49-57.
- OVERBEEKE, N.; FELLINGER, A.J.; TOONEN, M.Y.; VAN WASSENAAR, D. & VERRIPS, C.T. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the α -galactosidase

- cDNA from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar). Plant Molecular Biology 13:541-550.
- PANAGIOTIDIS, C.A.; GEORGATSOS, J.G. & KYRIAKIDIS, D.A. 1982. Superinduction of cytosolic and chromatin-bound ornithine decarboxylase activities of germinating barley seeds by actinomycin D. Febs Letters 146:193-196.
- PLANT, A.R. & MOORE, K.G. 1982. α -D-Mannosidase and α -D-galactosidase from proteins bodies of *Lupinus angustifolius* cotyledons. Phytochemistry 21:985-989.
- PONTECORVI, A.; TATA, JR; PHYLLAIER, M. & ROBBINS, J. 1988. Selective degradation of mRNA: the role of short-lived proteins in differential destabilization of insulin-induced creatine phosphokinase and myosin heavy chain mRNAs during rat skeletal muscle L6 cell differentiation. EMBO Journal 7:1489-1495.
- 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.
- RAJJOU, L.; GALLARDO, K.; DEBEAUJON, I.; VANDEKERCKHOVE, J.L.; JOB, C. & JOB, D. 2004. the effect of α -amanitin on the arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. Plant Physiology 134:1598-1613.
- 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. 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 foenun-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, Inc, New York. p. 155-186.
- 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. Enzyme activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidases and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112:301-308.
- ROUX, C. & PERROT-RECHENMANN, C. 1997. Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA Nt-gh3, related to GH3. *FEBS Letters* 419:131-136.
- RUSSEL, D.H. & SNYDER, S.H. 1969. Amine synthesis in regenerating rat liver: extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase. *Molecular Pharmacology* 5:253-262.
- SASSONE-CORSI, P.; SISSON, J.C. & VERMA, I.M. 1988. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos*. *Nature* 334:314-319.
- SCHALLER, A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183-197.
- SCHLERETH, A.; STANDHARDT, D.; MOCK, H.P. & MÜNTZ, K. 2001. Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta* 212:718-727.
- SEILER, A. 1977. Galaktomannanabbau in keimenden Johannisbrotsamen (*Cerantonia siliqua* L.). *Planta* 134:209-221.
- SENSEL, M.G.; BINDER, R.; LAZIER, C.B. & WILLIAMS, D.L. 1994. Reactivation of apolipoprotein II gene transcription by cycloheximide reveals two steps in the

- deactivation of estrogen receptor-mediated transcription. *Molecular and Cellular Biology* 14:1733-1742.
- SHEN, Q.; UKNES, S.J. & HO, T-H. D. 1993. Hormone response complex in a novel abscisic acid and cycloheximide-inducible barley gene. *The Journal of Biological Chemistry* 268:23652-23660.
- SOH, C-P; ALI, Z.M. & LAZAN, H. 2006. Characterisation of an α -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. *Phytochemistry* 67:242-254.
- SOMME, R. 1968. The structure of a galactomannan from *Medicago Lupulina* L. *Acta Chemica Scandinavica* 22:537-545.
- SREENIVASULU, N.; USADEL, B.; WINTER, A.; RADCHUK, V.; SCHOLZ, U.; STEIN, N.; WESCHKE, W.; STRICKERT, M.; CLOSE, T.J.; STITT, M.; GRANER, A. & WOBUS, U. 2008. Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new mapman/pageman profiling tools. *Plant Physiology* 146:1738-1758.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3^oed. Artmed, Porto Alegre. 719p.
- THEOLOGIS, A.; HUYNH, T.V. & DAVIS, R.W. 1985. Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *Journal of Molecular Biology* 183:53-68.
- TOMKINS, G.M.; LEVINSON, B.B.; BAXTER, J.D. & DETHLEFSEN, L. 1972. Further evidence for posttranscriptional control of inducible tyrosine aminotransferase synthesis in cultured hepatoma cells. *Nature New Biology* 239:9-14.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees: structure and function* 20:669-678.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; SILVAI, C.O.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Testa is involved in the control of storage

- mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees: structure and function* 21:13-21.
- UNRAU, A.M. 1961. The constitution of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Organic Chemistry* 26:3097-3101.
- VAN DER ZAAL, E.J.; MEMELINK, J.; MENNES A.M.; QUINT, A. & LIBBENGA, K.R. 1987. Auxin-induced mRNA species in tobacco cell cultures. *Plant Molecular Biology* 10:145-157.
- WEBER, K. & OSBORN, M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biology Chemistry* 244:4406-4412.
- WILLIAMS, J.; VILLARROYA, H. & PETEK, F. 1978. α -Galactosidases II, III and IV from seeds of *Trifolium repens*. Purifications, physiochemical properties and mode of galactomannan hydrolysis *in vitro*. *Biochemical Journal* 175:1069-1077.
- YAMASAKI, Y. & ICHIHARA, A. 1976. Induction of ornithine decarboxylase in cultured mouse L cells. I. Effects of cellular growth, hormones, and actinomycin D. *Journal of Biochemistry* 80:557-562.
- ZAKHAROV, A.; CARCHILAN, M.; STEPURINA, T.; ROTARI, V.; WILSON, K. & VAINTRAUB, I. 2004. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. *Journal of Experimental Botany* 55:2241-2249.
- ZHU, A. & GOLDSTEIN, J. 1994. Cloning and functional expression of DNA encoding coffee bean α -galactosidase. *Gene* 140:227-231.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DO ABA E ETILENO DURANTE O PROCESSO DE
DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS DE PROTEÍNAS E
CARBOIDRATOS EM SEMENTES DE *Sesbania virgata* (CAV.)
PERS.**

1. Resumo

Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. acumulam suas reservas de carbono no endosperma na forma de um polissacarídeo de parede celular, o galactomanano. A mobilização deste ocorre após a germinação e envolve três enzimas hidrolíticas (α -galactosidase, endo- β -mananase e exo- β -manosidase). Além da reserva de carbono, há uma grande quantidade de corpos protéicos, no citoplasma das células endospermicas, que constituem a principal reserva de nitrogênio nestas sementes. Para que ocorra a correta distribuição dos produtos de degradação das reservas deve haver mecanismos eficientes de controle nos processos de degradação das reservas de carbono e nitrogênio, porém para compreender tais mecanismos é necessário estudar aspectos do controle da ação das enzimas responsáveis pela hidrólise das reservas. Buscando verificar e relacionar o efeito do ácido abscísico e do etileno na degradação das reservas após a germinação de *S. virgata*, sementes desta espécie foram embebidas em água, ABA (10^{-4} M) e etileno ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$, $10 \mu\text{L.L}^{-1}$, $100 \mu\text{L.L}^{-1}$), e os efeitos destes foram verificados através dos teores protéicos e da atividade da α -galactosidase. Como a presença de ABA exógeno retardou o início da degradação das proteínas de reserva no endosperma, assim como diminuiu a atividade da α -galactosidase no mesmo tecido no final do processo de degradação do galactomanano, sugere-se um efeito modulador deste hormônio durante a degradação das reservas, reprimindo a ação das enzimas hidrolíticas. Em contrapartida, a presença de etileno exógeno aumentou a atividade da α -galactosidase no endosperma e, inclusive, no tegumento no final do processo de degradação do galactomanano, sugerindo um efeito indutor deste hormônio na ação das enzimas hidrolíticas. Desta forma, estas evidências sugerem que o ABA e o etileno controlariam antagonicamente a mobilização de reservas em sementes de *S. virgata*, a fim de controlar o processo de degradação dos galactomananos, evitando a produção dos açúcares redutores e de sacarose em excesso durante o período pós-

germinativo e garantindo o afluxo eficiente de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento da plântula.

2. Introdução

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). Há enorme variação na composição de sementes, mas as substâncias armazenadas em grande quantidade constituem os carboidratos e as proteínas (Buckeridge *et al.* 2004a).

As sementes de leguminosas são conhecidas por serem ricas em proteínas de reserva. Nesse grupo podemos incluir *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., com cerca de 45% do peso seco da semente em proteínas (Buckeridge *et al.* 2004b). *S. virgata* é uma planta com hábito arbustivo que ocorre principalmente em regiões úmidas ou alagadas, como na galeria de florestas de regiões Neotropicais, e está associada com os primeiros estágios da sucessão ecológica (Kissmann & Groth 1999, Potomati & Buckeridge 2002).

As proteínas de reserva estão usualmente presentes em vacúolos de reserva, denominados corpos protéicos, na maioria das sementes de dicotiledôneas e gimnospermas (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2004a, Tonini *et al.* 2006). Além disso, várias enzimas podem estar presentes também nos corpos protéicos, e durante a mobilização de reservas outras enzimas podem ser adicionadas (Bewley & Black 1994).

A hidrólise das proteínas de reserva aos seus aminoácidos constituintes é realizada por proteases, as quais podem hidrolisar totalmente as proteínas ou produzirem pequenos polipeptídeos que são degradados posteriormente por peptidases (Bewley & Black 1994).

Quanto às reservas de carboidratos, sementes de diversas espécies de leguminosas são conhecidas por acumular galactomananos na parede celular dos endospermas das sementes, sendo denominados polissacarídeos de reserva de

parede celular (PRPC) (Reid 1985, Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000b, Buckeridge *et al.* 2004a).

Além de serem polissacarídeos de reserva, exercem um papel importante no controle de embebição de água no início da germinação, absorvendo proporcionalmente grande quantidade de água e a distribuindo ao redor do embrião, protegendo-o contra a perda de água (Reid & Bewley 1979, Buckeridge *et al.* 2000c). Ainda, conferem dureza e resistência física ao endosperma no período de germinação, sendo importante na modulação da constrição mecânica à protrusão da radícula (Buckeridge *et al.* 2000a, Lisboa *et al.* 2006).

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

Em todas as espécies de leguminosas estudadas, a mobilização do galactomananos inicia após a germinação (Buckeridge *et al.* 2000c, Tonini *et al.* 2006), sendo mediada por três enzimas hidrolíticas: α -galactosidase (EC 3.2.1.22), endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) e exo- β -manosidase (EC 3.2.1.25) (Reid & Meier 1972, McCleary & Matheson 1976, Buckeridge & Dietrich 1996).

Como as ramificações de galactose na cadeia principal interferem na ação hidrolítica da endo- β -mananase sobre a cadeia de manano, torna-se importante a ação da α -galactosidase, desgalactosilando o polímero, anteriormente à ação hidrolítica da endo- β -mananase, e mesmo da exo- β -manosidase (Reid & Edwards 1995, Buckeridge *et al.* 2000a, Lisboa *et al.* 2006).

Além de prevenir a degradação das proteínas de reserva (Garciaarrubio *et al.* 1997), 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), *Lactuca sativa* (alface) (Halmer & Bewley 1979), *Lycopersicon sculentum* (tomate) (Groot &

Karssen 1992), *Trigonella foenum-graecum* (Reid & Meier 1973, Malek & Bewley 1991, Kontos & Spyropoulos 1995) e *S. virgata* (Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2006), interferindo na atividade das enzimas hidrolíticas (Buckeridge *et al.* 2000a, Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2006).

A presença de ácido abscísico no tegumento de sementes de *S. virgata* sugere a participação conjunta desse hormônio com o tegumento no mecanismo de controle da degradação das proteínas de reserva e dos galactomananos (Tonini *et al.* 2006, Tonini *et al.* 2007). Kontos & Spyropoulos (1996) sugeriram que o tegumento pode controlar a produção de enzimas hidrolíticas, como a α -galactosidase e a endo- β -mananase, no endosperma de sementes de *Ceratonia siliqua*. Assim, como em sementes de tomate, na qual verificou-se um efeito inibitório do tegumento na produção da endo- β -mananase (Nonogaki *et al.* 1992, Nomaguchi *et al.* 1995).

Acredita-se, ainda, que o etileno possa agir estimulando a síntese ou a atividade de enzimas relacionadas à degradação do endosperma, dentre estas a α -galactosidase em sementes de *Amaranthus caudatus* (Bialecka & Kepczynska 2007) e a endo- β -mananase em sementes de alface (Cardoso 2004, Nascimento *et al.* 2004, Nascimento *et al.* 2005) e tomate (Pirrello *et al.* 2006).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar e relacionar os efeitos do ABA e do etileno à degradação das proteínas e dos galactomananos e, supostamente, os tecidos envolvidos neste processo, a fim de compreender os mecanismos de controle durante e após a germinação de sementes de *S. virgata*.

3. Material

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

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

Após o beneficiamento dos frutos, as sementes quiescentes foram escarificadas mecanicamente com lixa e incubadas sobre papel de filtro em erlenmeyers de 250 mL (8 cm de diâmetro), fechados com rolhas de borracha, contendo 0,5 mL de solução/semente, em condições de 12h de luz e temperatura de aproximadamente 25 °C. Para o tratamento com ABA, as sementes foram embebidas em água e em solução de ABA (10^{-4} M) (concentração definida através de estudos preliminares realizados por Potomati & Buckeridge 2002). Para o tratamento com etileno, as sementes foram embebidas em água e diferentes quantidades de etileno ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$, $10 \mu\text{L.L}^{-1}$ ou $100 \mu\text{L.L}^{-1}$) foram injetadas com seringa, através dos septos das rolhas de borracha (Stewart & Freebairn 1969, Negm & Smith 1978, Schonbeck & Egley 1981, Abeles 1986, Esashi *et al.* 1988, Saini *et al.* 1989, Leubner-Metzer *et al.* 1998, Kepczynski *et al.* 1999, Sugimoto *et al.* 2003, Wu & Bradford 2003).

4.1. Efeito do ABA e etileno sobre os teores de proteínas totais e atividade das hidrolases (α -galactosidase)

As sementes embebidas em água (controle), ABA (10^{-4} M) e etileno ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$, $10 \mu\text{L.L}^{-1}$ ou $100 \mu\text{L.L}^{-1}$) foram coletadas do segundo ao quinto dia após a embebição, período pós-germinativo que abrange o início e a degradação intensa das reservas.

Os tecidos isolados, tegumento e endosperma, das sementes coletadas (10 sementes por tratamento a cada dia, com três repetições) foram macerados usando nitrogênio líquido, 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 centrifugados a $13.000 g$ por 5 minutos e o sobrenadante submetido à dosagem de proteínas e de atividade da α -galactosidase.

Para a dosagem de proteína, utilizou-se 10 ou 20 μL de amostra, dependendo do extrato, e 200 μL de reagente (Bio-Rad). As leituras das absorbâncias foram feitas em elisa Thermo Lab Systems (Multiskan EX) no comprimento de onda (λ) de 595 nm (Bradford 1976).

Para a análise da atividade de α -galactosidase, os sobrenadantes foram ensaiados utilizando-se o substrato sintético específico p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (Reid & Meier 1973). Para a referida dosagem utilizaram-se 10 ou 20 μL de amostra, dependendo do extrato, acrescidos 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_2CO_3 0,1 N e as leituras das absorbâncias feitas em espectrofotômetro Pharmacia Biotech (Ultrospec 3000) no comprimento de onda (λ) de 405 nm.

5. Resultados/Discussão

5.1. Efeito do ABA e etileno sobre os teores de proteínas totais e atividade das hidrolases (α -galactosidase)

Primeiramente foi comparada a taxa de germinação, a massa fresca das sementes intactas e a massa fresca do tegumento e do endosperma, entre as sementes embebidas em água (controle), ABA e etileno.

Analisando a porcentagem de germinação ao longo do período, observou-se que a germinação completa das sementes ocorreu somente no segundo dia após a embebição, tanto no controle como nos tratamentos, não havendo aparentemente influência dos hormônios sobre o processo germinativo (Fig. 1).

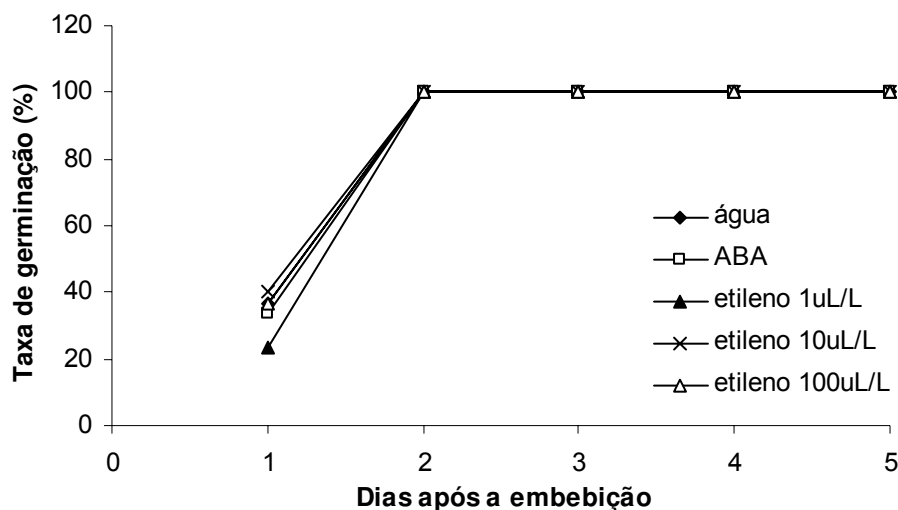


Figura 1. Taxa de germinação em sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quinto dia após a embebição em água (controle), ABA (10^{-4} M) e etileno ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$, $10 \mu\text{L.L}^{-1}$, $100 \mu\text{L.L}^{-1}$). Os valores representam a média de três repetições.

Em um contexto fisiológico e bioquímico, a germinação compreende o conjunto de eventos que ocorre durante a embebição da semente e se estende

até a protrusão da radícula (Bewley & Black 1994). Desta forma, o processo germinativo em sementes de *Sesbania virgata* ocorre até o segundo dia após a embebição, como já observado por Buckeridge & Dietrich (1996), Potomati & Buckeridge (2002) e Tonini *et al.* (2007).

Apesar do ABA estar envolvido no mecanismo de dormência de diversas espécies de 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), este hormônio, aparentemente, não teve nenhuma influência sobre a taxa de germinação em sementes de *S. virgata* (Fig. 1).

Quanto à ação do etileno, sabe-se que este hormônio induz, estimula ou acelera a germinação de diversas espécies, como *Arabidopsis thaliana* (Beaudoin *et al.* 2000), *Amaranthus caudatus* (Kepczynski & Karssen 1985, Kepczynski & Kepczynska 1997, Bialecka & Kepczynska 2003), *Lactuca sativa* (alface) (Steward & Freebairn 1969, Negm & Smith 1978, Abeles 1986, Saini *et al.* 1989, Nascimento *et al.* 2004), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Khalil 1992), *Pisum sativum* (ervilha) (Gorecki *et al.* 1991, Petruzzelli *et al.* 1995), dentre outras.

Porém, o papel deste hormônio na germinação continua controverso. Alguns autores afirmam que a produção do etileno é uma consequência da germinação, enquanto outros sugerem que a produção de etileno seja necessária à germinação (Abeles *et al.* 1992, Matilla 2000). Além disso, dentre as sementes que requerem etileno para germinar, algumas são extremamente sensíveis enquanto outras requerem altas quantidades do gás (Esashi 1991, Kepczynski & Kepczynska 1997, Matilla 2000).

Em sementes de *S. virgata*, o etileno não apresentou nenhum efeito significativo sobre a germinação (Fig. 1), o que é possível, já que em alguns casos a presença deste gás inibe ou não afeta a germinação (Kepczynski & Kepczynska 1997, Matilla 2000).

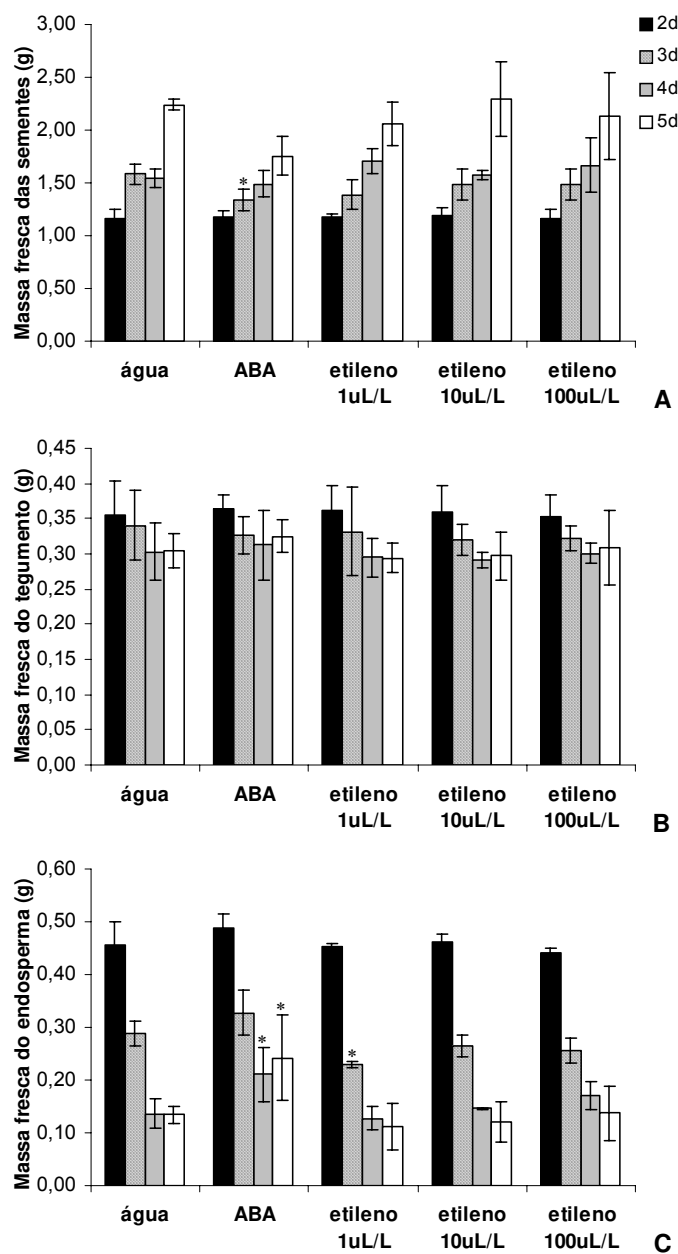


Figura 2. Massa fresca das sementes íntegras **(A)**, dos tegumentos **(B)** e dos endospermas isolados **(C)** de sementes de *S. virgata*, do segundo ao quinto dia após a embebição em água (controle), ABA (10^{-4} M) e etileno ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$, $10 \mu\text{L.L}^{-1}$, $100 \mu\text{L.L}^{-1}$). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

Quanto à variação de massa fresca das sementes ao longo do mesmo período, observou-se um aumento gradativo nos valores de massa fresca das sementes, tanto no controle como nos tratamentos, apesar das sementes embebidas em ABA terem apresentado massa fresca menor, quando comparadas com as sementes embebidas em água, no terceiro dia após a embebição (Fig. 2A).

Este aumento de massa fresca das sementes intactas durante o período germinativo e pós-germinativo deve estar relacionado à absorção de água durante a germinação e ao alongamento e crescimento do embrião principalmente após a germinação. Desta forma, sugere-se que a presença de ABA tenha diminuído a absorção de água pela semente no segundo dia após a embebição, que se refletiu no valor de massa fresca da semente (Fig. 2A), apesar de não ter influenciado o processo germinativo, que foi similar ao controle (Fig. 1). Potomati & Buckeridge (2002) sugeriram que o efeito do ABA poderia estar relacionado com absorção de água pelo embrião em crescimento.

No tegumento, observou-se que os valores de massa fresca desse tecido permaneceram praticamente constantes por todo o período, tanto no controle como nos tratamentos, não ocorrendo diferenças significativas entre eles (Fig. 2B).

Analisando o endosperma, observou-se uma diminuição gradativa nos valores de massa fresca deste tecido, tanto no controle como nos tratamentos (Fig. 2C). Entretanto, na presença de ABA, o endosperma apresentou massa fresca maior no quarto e quinto dias após a embebição, quando comparada com a do endosperma das sementes embebidas em água (Fig. 2C), indicando inibição na degradação do endosperma. Em contrapartida, na presença de etileno a $1 \mu\text{L.L}^{-1}$ observou-se massa fresca menor do endosperma, quando comparadas com as do controle, no terceiro dia após a embebição (Fig. 2C), indicando que nesta concentração, o etileno promoveu uma leve indução da degradação do tecido, conseqüente da mobilização das reservas.

Em sementes de *S. virgata*, a mobilização das proteínas de reserva e dos galactomananos 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, Tonini *et al.* 2006). Nesse período, a degradação intensa das proteínas de reserva e dos galactomananos presentes no endosperma ocorre entre o terceiro e quinto dias após a embebição, sendo retardada na presença do ABA (Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge *et al.* 2000b, Tonini *et al.* 2006).

Desta forma, sugere-se que o ABA tenha parcialmente inibido a degradação das reservas e, conseqüentemente, do endosperma durante o período pós-germinativo, enquanto o etileno, na concentração de $1 \mu\text{L.L}^{-1}$, tenha induzido no início do período pós-germinativo a degradação das reservas.

Apesar destes resultados, deve-se levar em consideração o efeito dos hormônios sobre os teores de proteínas totais e atividade das enzimas hidrolíticas, para se sugerir algo mais consistente.

5.1.1. Teores de proteínas totais.

Analisando o teor de proteínas totais no tegumento, observou-se uma diminuição significativa na quantidade de proteínas no terceiro dia após a embebição em água e etileno a $1 \mu\text{L.L}^{-1}$ e no quarto dia após a embebição em ABA (Fig. 3A). Desta forma, a presença do ABA estaria retardando a degradação e/ou mobilização das proteínas no tegumento, enquanto o etileno aparentemente não teria nenhum efeito sobre o processo de mobilização protéica no tecido durante o período pós-germinativo.

Na presença de etileno, em concentrações mais altas, também não foi observada variações significativas quanto aos teores de proteínas totais ao longo do período observado. Embora as sementes embebidas em etileno a $100 \mu\text{L.L}^{-1}$ apresentaram conteúdos menores de proteínas totais no segundo dia após a embebição em relação ao controle (Fig. 3A). Provavelmente, estas sementes embebidas na presença do etileno, apresentaram uma diminuição nos teores protéicos anterior ao controle, entre o primeiro e segundo dia após a embebição, o

que acarretaria teores mais baixos no segundo dia, sugerindo um efeito indutor do etileno sobre a degradação e/ou mobilização de proteínas no tegumento durante o processo germinativo.

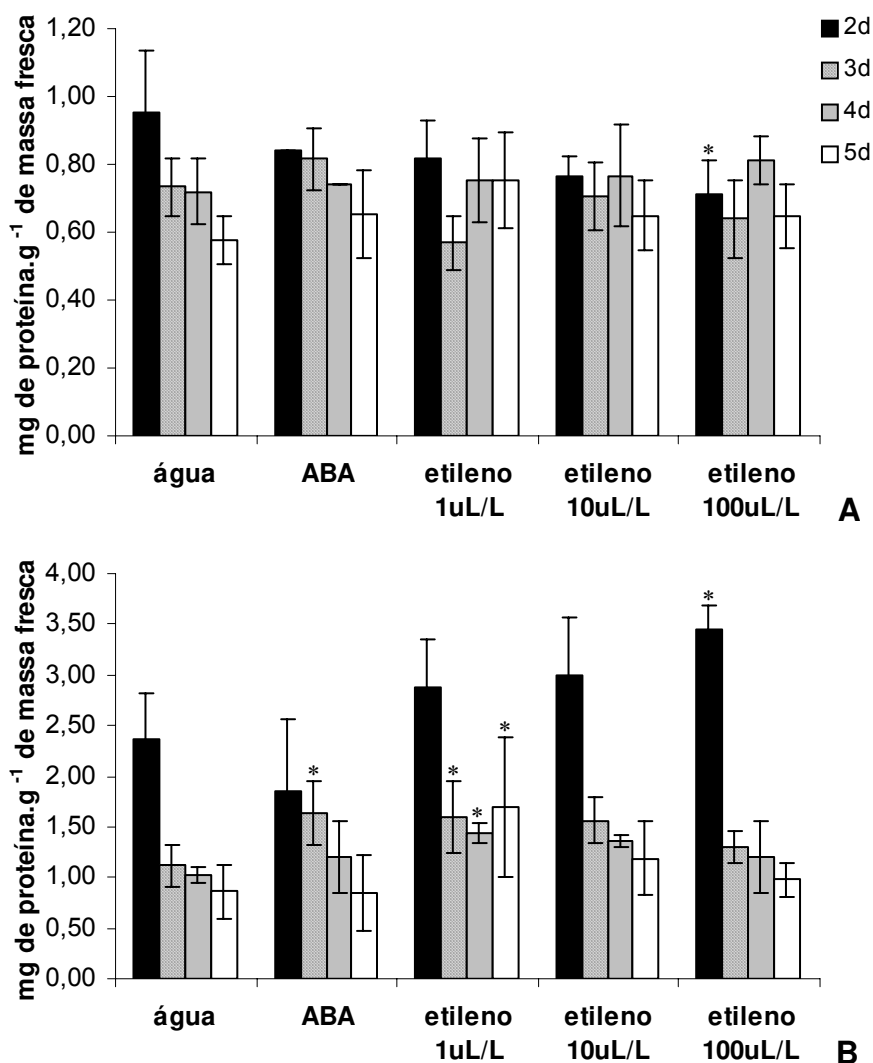


Figura 3. Teores de proteínas nos tegumentos **(A)** e nos endospermas **(B)** de sementes de *S. virgata*, do segundo ao quinto dia após a embebição em água (controle), ABA (10^{-4} M) e etileno ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$, $10 \mu\text{L.L}^{-1}$, $100 \mu\text{L.L}^{-1}$). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

No endosperma, a diminuição na quantidade de proteínas totais ocorreu no terceiro dia após a embebição em todos os tratamentos, com exceção das sementes embebidas em ABA, que apresentaram diminuição significativa dos teores protéicos apenas no quinto dia após a embebição (Fig. 3B). Em sementes de *S. virgata*, demonstrou-se que a degradação das proteínas de reserva dos corpos protéicos ocorreu a partir do terceiro dia após a embebição em água, enquanto em presença do ABA, a degradação significativa ocorreu somente no quinto dia após a embebição (Tonini *et al.* 2006). Além disso, sabe-se que o ABA previne a degradação das proteínas de reserva em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Garciaarrubio *et al.* 1997).

Dessa forma, a presença de ABA estaria retardando a degradação de proteínas no endosperma, sendo observado diferença significativa nos teores protéicos entre as sementes embebidas em água e em ABA já no terceiro dia após a embebição (Fig. 3B). Este efeito inibidor do ABA sobre o início da degradação das proteínas de reserva deve estar relacionado a um efeito inibitório deste hormônio sobre a síntese *de novo* de proteases ou ativação de proteases pré-formadas. Em diversas espécies de sementes, foi verificado o efeito inibidor do ABA sobre proteases, como em sementes de *Hordeum vulgare* (cevada) (Cercós *et al.* 1999), *Malus domestica* (maça) (Ranjan & Lewak 1995), arroz (Shintani *et al.* 1997), *Phaseolus vulgaris* (feijão) (Domash *et al.* 2006). Além disso, no Capítulo 1, foi sugerida a síntese *de novo* de diversas proteases após a germinação de sementes de *S. virgata* e a relação íntima destas enzimas com a degradação das proteínas de reserva.

Apesar de não ter sido observado aparentemente um efeito promotor do etileno na degradação das proteínas de reserva, observou-se que do terceiro ao quinto dia após a embebição, as sementes embebidas a $1 \mu\text{L.L}^{-1}$ apresentaram teores protéicos maiores que os do controle (Fig. 3B), sugerindo síntese *de novo* de proteínas neste tecido em presença do etileno a baixas concentrações. As novas proteínas sintetizadas poderiam ser proteínas estruturais relacionadas ao

crescimento e desenvolvimento da nova plântula ou enzimas relacionadas à degradação das proteínas e/ou dos galactomananos.

Sabendo que a produção da α -galactosidase ocorre durante a maturação das sementes e que a enzima pré-formada deve ser processada e ativada, através de um processo proteolítico, possivelmente modulado através da via de sinalização de hormônios (Capítulo 1), sugere-se que estas novas proteínas sintetizadas pela ação do etileno sejam proteases relacionadas à ativação da α -galactosidase. Neste contexto, o ABA também poderia estar envolvido indiretamente na ativação da α -galactosidase pré-formada durante a maturação, agindo contrariamente ao etileno, inibindo a síntese *de novo* de proteases ou a ativação de proteases pré-formadas relacionadas à ativação da α -galactosidase.

5.1.2. Atividade das enzimas hidrolíticas (α -galactosidase)

Analisando a atividade total da α -galactosidase no tegumento, observou-se que o pico de atividade da enzima ocorreu entre o terceiro e quarto dias após a embebição em água e etileno a $1 \mu\text{L.L}^{-1}$, enquanto nas sementes embebidas em etileno a 10 e $100 \mu\text{L.L}^{-1}$ o pico de atividade ocorreu somente no quarto dia após a embebição (Fig. 4A).

Apesar do pico de atividade da enzima ter ocorrido somente no quarto dia após a embebição em etileno a 10 e $100 \mu\text{L.L}^{-1}$, a presença deste hormônio nestas concentrações parece ter induzido a atividade da enzima, já que a atividade da α -galactosidase foi praticamente o dobro no tegumento das sementes embebidas em etileno a 10 e $100 \mu\text{L.L}^{-1}$ quando comparado com as do controle (Fig. 4A).

Esta indução sobre a atividade da α -galactosidase no quarto dia após a embebição também pode ser observada nas sementes embebidas em etileno a $1 \mu\text{L.L}^{-1}$ e, inclusive, observou-se que as sementes embebidas em etileno a $10 \mu\text{L.L}^{-1}$ apresentaram maior atividade enzimática já no terceiro dia após a embebição quando comparada ao controle (Fig. 4A).

Nas sementes embebidas em ABA, o pico de atividade da enzima também esteve ao redor do terceiro e quarto dias após a embebição, não apresentando diferenças significativas quanto à atividade enzimática quando comparadas ao controle (Fig. 4A).

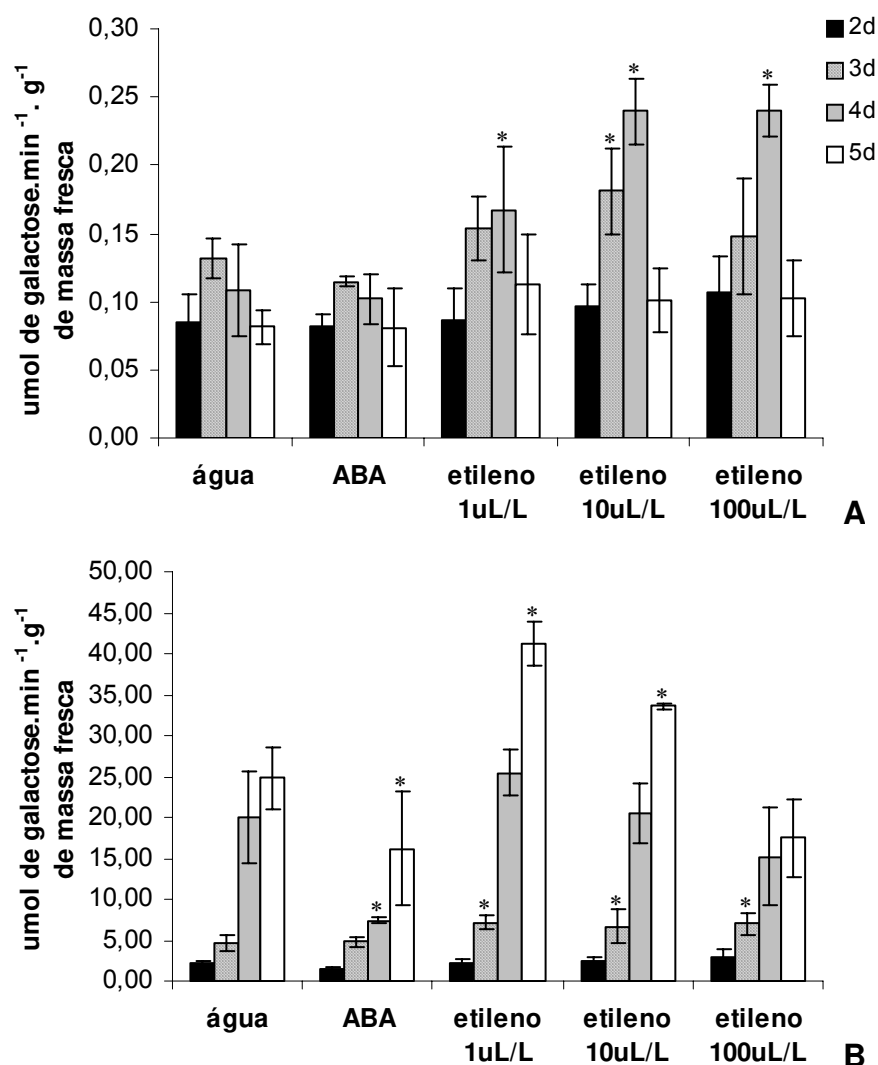


Figura 4. Atividade total da α -galactosidase nos tegumentos (A) e nos endospermas (B) de sementes de *S. virgata*, do segundo ao quinto dia após a embebição em água (controle), ABA (10^{-4} M) e etileno ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$, $10 \mu\text{L.L}^{-1}$, $100 \mu\text{L.L}^{-1}$). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

No endosperma, a atividade total da α -galactosidase aumentou gradativamente, apresentando pico de atividade ao redor do quarto e quinto dia após a embebição, em todos os tratamentos (Fig. 4B). Em sementes de *S. virgata*, demonstrou-se que a degradação dos galactomananos ocorreu a partir do terceiro dia após a embebição em água, sendo intensa no quinto dia após a embebição (Tonini *et al.* 2006).

Apesar do pico de atividade da enzima ter sido no mesmo período entre o controle e os tratamentos, a presença de etileno, em todas as concentrações, parece ter induzido a atividade da α -galactosidase, já que a atividade da enzima foi bem maior no terceiro dia após a embebição e, inclusive, no quinto dia após a embebição nas sementes embebidas em etileno a 1 e 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ quando comparada com as do controle (Fig. 4B).

Sabendo que a produção da α -galactosidase ocorre durante a maturação das sementes (Capítulo 1), sugere-se que o etileno esteja envolvido, no início do período pós-germinativo, na ativação da α -galactosidase pré-formada, possivelmente através do processo proteolítico mencionado acima. Desta forma, o etileno estaria estimulando a síntese ou a ativação de proteases relacionadas a ativação da α -galactosidase.

Ainda no capítulo 1, foi sugerida a síntese *de novo* de enzimas relacionadas ao controle da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos, através de sua degradação ou desativação, a fim de evitar o excesso de açúcares redutores e sacarose. Neste contexto, no final do processo de degradação dos galactomananos, modulando a atividade da α -galactosidase, sugere-se que o etileno estaria reprimindo a síntese *de novo* de proteases.

Nas sementes embebidas em ABA a atividade total da α -galactosidase apresentou pico somente no quinto dia, apresentando uma atividade enzimática menor, praticamente a metade quando comparada ao controle, no quarto e quinto dia após a embebição (Fig. 4B). Em sementes de *S. virgata*, demonstrou-se que a

degradação dos galactomananos ocorreu a partir do terceiro dia após a embebição em água, enquanto em presença do ABA, a degradação intensa ocorreu somente no quinto dia após a embebição (Tonini *et al.* 2006).

Sabendo que em presença do ABA ocorre um retardamento na degradação dos galactomananos, pode-se sugerir que a menor atividade total da α -galactosidase observada no quarto dia após a embebição, quando comparada a do controle, esteja relacionada ao efeito inibidor do ABA, no início do período pós-germinativo, sobre a ativação da α -galactosidase pré-formada, possivelmente através do processo proteolítico, já que o ABA teve efeito modulador nos teores de proteínas totais, supostamente inibindo a síntese ou a ativação de proteases e, conseqüentemente, a degradação das proteínas no início do processo pós-germinativo (Fig. 3B).

Além disto, pode-se sugerir que a menor atividade total da α -galactosidase observada no quinto dia após a embebição, quando comparado a do controle (Fig. 4B), esteja relacionada ao efeito indutor do ABA sobre a degradação ou desativação da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos, possivelmente através da indução da síntese *de novo* de proteases no final do processo, modulando a atividade da enzima.

Desta forma, observou-se que o etileno apresentou um efeito indutor na atividade total da α -galactosidase, tanto no tegumento quanto no endosperma, enquanto o ABA apresentou um efeito modulador desta atividade, diminuindo-a no endosperma. Este efeito modulador do ABA sobre a degradação das reservas em sementes de *S. virgata* já havia sido observado por Tonini *et al.* (2006), que sugeriu uma relação de causa e efeito entre o ABA e a ação das enzimas hidrolíticas.

Além disto, sabe-se que o etileno pode regular a atividade de diversas enzimas, como a α -galactosidase durante a germinação de sementes de *Amaranthus caudatus* (Bialecka & Kepczynska 2007) e a endo- β -mananase durante a germinação de sementes de alface (Cardoso 2004, Nascimento *et al.* 2004, Nascimento *et al.* 2005) e de tomate (Pirrello *et al.* 2006).

Como estes hormônios agem de forma antagônica sobre a atividade da α -galactosidase, um balanço ideal entre o etileno e o ABA permite que a degradação de reservas ocorra eficientemente em sementes de *S. virgata*. Neste processo, o ABA e o etileno estariam regulando a atividade de proteases, que seriam responsáveis pela ativação da α -galactosidase no início do processo pós-germinativo e pela desativação da enzima no final do processo de degradação intensa dos galactomananos, a fim de evitar o excesso de açúcares redutores no tecido e a produção de sacarose.

Em diversas espécies já foi demonstrada uma interação antagônica entre as vias de sinalização do etileno e do ABA; como em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Beaudoin *et al.* 2000, Ghassemian *et al.* 2000, León & Sheen 2003, Cernac *et al.* 2006), *Arachis hypogaea* (amendoim) (Kepczynski & Kepczynska 1997), *Cicer arietinum* (Gallardo *et al.* 1992, Gallardo *et al.* 1994; Matilla 2000), cevada (Chen & An 2006), maçã (Kepczynski & Kepczynska 1997), tabaco (Leubner-Metzger *et al.* 1998) e tomate (Pirrello *et al.* 2006).

Pode-se ainda sugerir que parte da α -galactosidase utilizada no endosperma seja modificada e/ou apenas armazenada no tegumento antes de sua utilização na degradação dos galactomananos, o que explicaria a presença da enzima no tecido e o pico anterior de α -galactosidase no tegumento quando comparado ao endosperma (Fig. 4). Tonini *et al.* (2007) já havia sugerido a participação do tegumento na modificação e/ou armazenamento das enzimas hidrolíticas em sementes de *S. virgata*, controlando a ação dessas hidrolases durante e após a germinação.

6. Conclusões

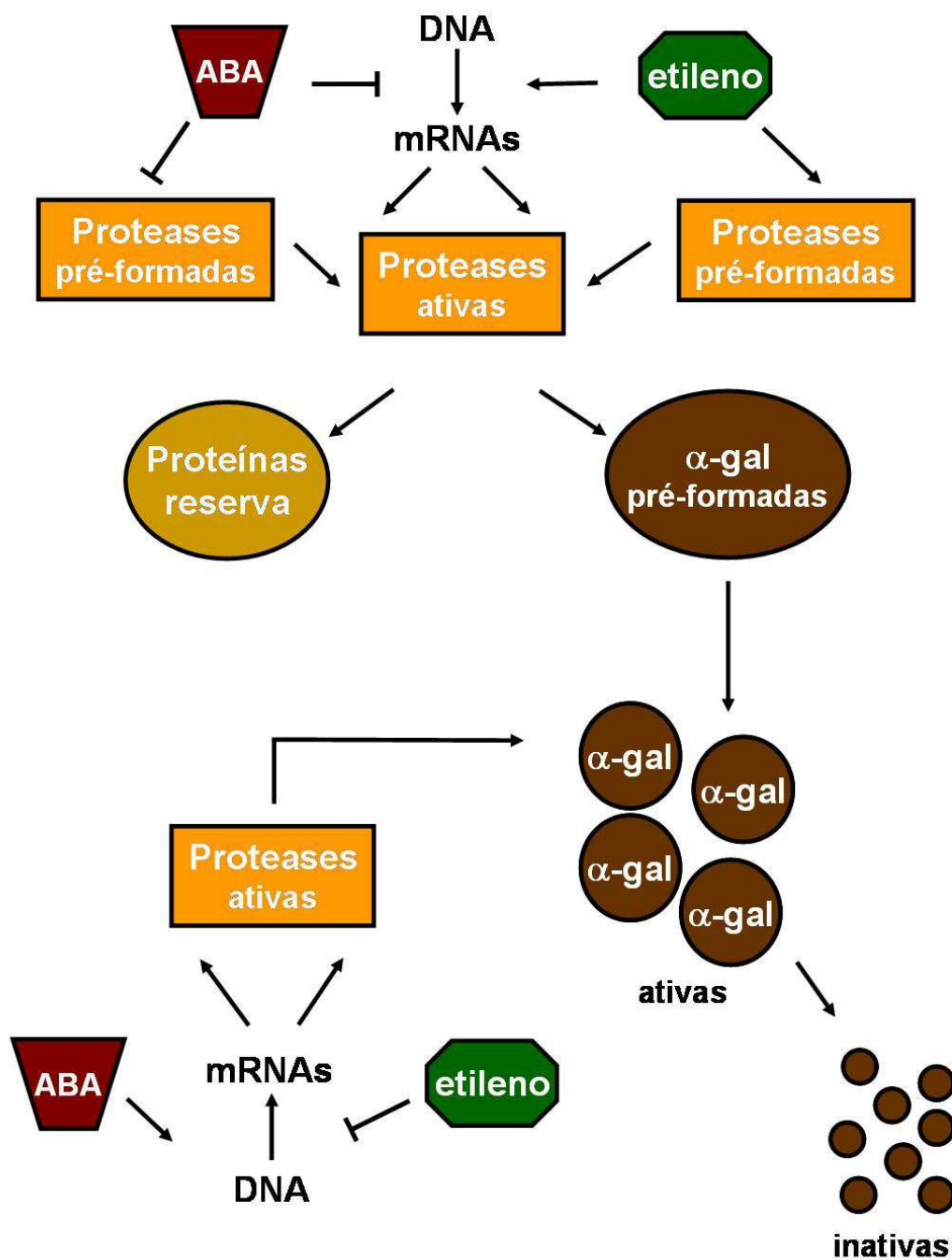
Com base nos resultados obtidos sugere-se que no período pós-germinativo, quando ocorre a degradação dos galactomananos, a α -galactosidase pré-formada durante a maturação seria ativada, possivelmente, através de um processo proteolítico que envolveria proteases sintetizadas *de novo* ou pré-

formadas durante a maturação, produzidas ou ativadas, respectivamente, através da via de sinalização dos hormônios. Dentro deste contexto, sugere-se que a síntese ou ativação das proteases possa ser induzida pela via de sinalização do etileno e/ou reprimidas pela do ABA (Fig. 5).

Além do controle proteolítico mencionado acima no início do período pós-germinativo, sugere-se um processo de regulação da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos, após atividade intensa da α -galactosidase, através da via de sinalização do ABA e do etileno. Neste processo, o ABA e o etileno estariam antagonicamente induzindo ou reprimindo, respectivamente, a síntese *de novo* de proteases, que seriam responsáveis pela desativação da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos (Fig. 5).

Desta forma, para que a degradação de reservas ocorra eficientemente em sementes de *S. virgata*, a fim de evitar o excesso de açúcares redutores no tecido e a produção de sacarose, torna-se necessário um balanço ideal entre o etileno e o ABA durante e após a degradação dos galactomananos.

Ainda, como as proteases citadas no controle da atividade da α -galactosidase e, conseqüentemente, na degradação dos galactomananos estariam envolvidas também no controle do processo de degradação das proteínas de reservas (Fig. 5), sugere-se que a mobilização de reservas de carbono (galactomananos) no endosperma de sementes de *S. virgata* deve estar relacionada à mobilização das reservas de nitrogênio (proteínas) no mesmo tecido, possivelmente garantindo o afluxo sincrônico de compostos carreadores dos dois macronutrientes (C e N) para o desenvolvimento do embrião e estabelecimento da plântula. Desta forma, mesmo utilizando abordagens diferentes, em que se consideram as ações hormonais sobre a degradação de reservas das sementes de *S. virgata*, chega-se à mesma conclusão que aquela formulada no capítulo anterior.



germinação e pós-germinação

Figura 5. Modelo esquemático do mecanismo de controle da α -galactosidase no endosperma de sementes de *S. virgata* durante e após a germinação.

7. Referências bibliográficas

- ABELES, F.B. 1986. Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv 'grand rapids' seed germination. *Plant Physiology* 81:780-787.
- ADKINS, S.W. & ROSS, J.D. 1981. Studies in wild oat seed dormancy. I. The role of ethylene in dormancy breakage and germination of wild oat seeds (*Avena fatua* L.). *Plant Physiology* 67:358-362.
- BASKIN, C.C; BASKIN, J.M.; CHESTER, E.W. & SMITH, M. 2003. Ethylene as a possible cue for seed germination of *Schoenoplectus hallii* (Cyperaceae), a rare summer annual of occasionally flooded sites. *American Journal of Botany* 90:620-627.
- BEAUDOIN, N.; SERIZET, C.; GOSTI, F. & GIRAUDAT, J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell* 12:1103-1115.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2^o ed. Plenum Press, New York. 445p.
- BIALECKA, E.J. & KEPCZYNSKI, J. 2003. Regulation of α -amylase activity in *Amaranthus caudatus* seeds by methyl jasmonate, gibberellin A₃, benzyladenine and ethylene. *Plant Growth Regulation* 39:51-56.
- BIALECKA, E.J. & KEPCZYNSKI, J. 2007. Changes in concentrations of soluble carbohydrates during germination of *Amaranthus caudatus* L. Seeds in relation to ethylene, gibberellin A₃ and methyl jasmonate. *Plant Growth Regulation* 51:21-31.
- 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. & 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. 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, Paris. p. 283-317.
- 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.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2004a. Acúmulo de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 31-50.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. & AIDAR, M.P.M. 2004b. Mobilização de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 163-185.
- 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.
- CARDOSO, V.J.M. 2004. Etileno *In*: KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 386-408.
- CERCO, M.; GOMEZ-CADENAS, A. & HO, T-H.D. 1999. Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *The Plant Journal* 19:107-118.
- CERNAC, A.; ANDRE, C.; HOFFMANN-BENNING, S. & BENNING, C. 2006. WRI1 is required for seed germination and seedling establishment. *Plant Physiology* 141:745-757.

- CHEN, K. & AN, Y-Q. C. 2006. Transcriptional Responses to Gibberellin and Absciscic Acid in Barley Aleurone. *Journal of Integrative Plant Biology* 48:591-612.
- DOMASH, V.I.; PROTSKO, R.F.; VASYUK, V.A.; SHUMIKHIN, S.V.; ERMOLITSKAYA, L.V. & SHARPIO, T.P. 2006. The content of absciscic acid and the activities of proteinases and trypsin inhibitory proteins, in the germinating seed of common beans under water stress conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42:97-100.
- ESASHI, Y. 1991. Ethylene and seed germination. *In*: MATTOO, A.K. & SUTTLE, J.C. The plant hormone ethylene. CRC Press, Boca Raton. p. 133-157.
- ESASHI, Y. & LEOPOLD, A.C. 1969. Dormancy regulation in subterranean clover seeds by ethylene. *Plant Physiology* 44:1470-1472.
- ESASHI, Y.; KAWABE, K.; SUZUGAWA, K. & ISHIZAWA, K. 1988. Interrelations between carbon dioxide and ethylene on the stimulation of cocklebur seed germination. *Plant Physiology* 86:39-43.
- FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L. & ROCK, C.D. 2002. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 14:S15-S45.
- GALLARDO, M.; MATILLA, A. & SÁNCHEZ-CALLE, I.M. 1992. Effects of spermine, absciscic acid and temperature upon ethylene production in *Cicer arietinum* L. seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 30:19-27.
- GALLARDO, M.; DE RUEDA, P.M.; MATILLA, A. & SÁNCHEZ-CALLE, I.M. 1994. The relationships between ethylene production and germination of *Cicer arietinum* seeds. *Biologia Plantarum* 36:201-207.
- GARCIARRUBIO, A.; LEGARIA, J.P. & COVARRUBIAS, A.A. 1997. Absciscic acid inhibits germination of mature Arabidopsis seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203:182-187.
- GHASSEMIAN, M.; NAMBARA, E.; CUTLER, S.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y. & MCCOURT, P. 2000. Regulation of absciscic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* 12:1117-1126.

- GORECKI, R.J.; ASHINO, H.; SATOH, S. & ESAHI, Y. 1991. Ethylene production in pea and cocklebur seeds of differing vigour. *Journal Experimental Botany* 42: 407-414.
- 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.
- HALMER, P. & BEWLEY, J.D. 1979. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. *Planta* 144:333-340.
- KEPCZYNSKI, J. & KARSSSEN, C.M. 1985. Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of *Amaranthus caudatus*. *Physiologia Plantarum* 63:49-52.
- KEPCZYNSKI, J. & KEPCZYNSKA, E. 1997. Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum* 101:720-726.
- KEPCZYNSKI, J.; BIALECKA, B. & KEPCZYNSKA, E. 1999. Ethylene biosynthesis in *Amaranthus caudatus* seeds in response to methyl jasmonate. *Plant Growth Regulation* 28:59-65.
- KERMODE, A.R. 2005. Role of Absciscic Acid in Seed Dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24:319-344.
- KETRING, D.L. & MORGAN, P.W. 1971. Physiology of oil seeds. II. Dormancy release in Virginia-type peanut seeds by plant growth regulators. *Plant Physiology* 47:488-492.
- KETRING, D.L. AND MORGAN, P.W. 1972. Physiology of oil seeds. IV. Role of endogenous ethylene and inhibitory regulators during natural and induced afterripening of dormant Virginia-type peanut seeds. *Plant Physiology* 50:382-387.
- KHALIL, M.K. 1992. Nature of growth regulators effects on *Nicotiana tabacum* seed germination. *Angewandte Botanik* 66:106-108.
- 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 α -galactosidase and endo- β -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 α -galactosidase and endo- β -mannanase in the endosperm of developing carob seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 34:787-793.
- LALONDE, S. & SAINI, H.S. 1992 Comparative requirement for endogenous ethylene during seed germination. *Annals of Botany* 69:423-428.
- LAURIE, S. & HALFORD, N.G. 2001. The role of protein kinases in the regulation of plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 34:253-265.
- LEÓN, P. & SHEEN, J. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science* 8:110-116.
- LEUBNER-METZGER, G.; PETRUZZELLI, L.; WALDVOGEL, R.; VÖGELI-LANGE, R. & MEINS, F. Jr. 1998. Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I β -1,3-glucanase during tobacco seed germination. *Plant Molecular Biology* 38:785-795.
- LISBOA, C.G.S.; TONINI, P.P.; TINÉ, M.A.S. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Endo-beta-mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 269-280.
- MALEK, L. & BEWLEY, J.D. 1991. Endo- β -mannanase activity and reserve mobilization in excised endosperms of fenugreek is affected by volume of incubation and abscisic acid. *Seed Science Research* 1:45-49.
- MANZI, A.E. & CERESO, A.S. 1984. The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of seed of *Gleditsia triacanthos*. *Carbohydrate Research* 134:115-131.
- MATILLA, A.J. 2000. Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research* 10:111-126.

- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1976. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 15:43-47.
- 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.
- MOUSSA, H.; MARGOLIS, H.A.; DUBE, P.A. & ODONGO, J. 1998. Factors affecting the germination of doum palm (*Hyphaene thebaica* Mart.) seeds from the semi-arid zone of Niger, West Africa. *Forest Ecology and Management* 104: 27-41.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J.& HUBER, D.J. 2004. Ethylene evolution and endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature *Scientia Agricola* 61:156-163.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J. & HUBER, D.J. 2005. SEED aging affects ethylene production and endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature, *Seed Science Technology*. 33:11-17.
- NEGM, F.B. & SMITH, O.E. 1978. Effects of ethylene and carbon dioxide on the germination of osmotically inhibited lettuce seed. *Plant Physiology* 62 473-476.
- 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.; MATSUSHIMA, H. & MOROHASHI, Y. 1992. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. *Physiologia Plantarum* 85:167-172.
- PETRUZZELLI, L., HARREN, F., PERRONE, C. AND REUSS, J. 1995. On the role of ethylene in seed germination and early root growth of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* 145:83-86.
- PIRRELLO, J.; JAIMES-MIRANDA, F.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; TOURNIER, B.; KHALIL-AHMAD, Q.; REGAD, F.; LATCHE, A.; PECH, J.C. & BOUZAYEN, M. 2006. SI-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiology* 47:1195-1205 .

- 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.
- PUGA-HERMIDA, M.I.; GALLARDO, M.; RODRIGUEZ-GACIO, M.C. & MATILLA, A.J. 2006. Polyamine contents, ethylene synthesis, and *BrACO2* expression during turnip germination. *Biologia Plantarum* 50:574-580.
- RANJAN, R. & LEWAK, S. 1995. Interaction of jasmonic and abscisic acid in the control of lipases and proteases in germinating apple embryos. *Physiologia Plantarum* 93:421-426.
- REID, J.S.G. 1985. Cell wall storage carbohydrates in seeds. *Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses*. *Advances in Botanical Research* 11:125-155.
- 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, Inc, New York. p. 155-186.
- 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. Enzyme activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidases and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112:301-308.
- SAINI, H.S.; BASSI, P.K. & SPENCER, M.S. 1985a. Seed germination in *Chenopodium album* L.: Relationships between nitrate and the effects of plant hormones. *Plant Physiology* 77:940-943.

- SAINI, H.S.; BASSI, P.K. & SPENCER, M.S. 1985b. Seed germination in *Chenopodium album* L.: further evidence for the dependence of the effects of growth regulators on nitrate availability. *Plant Cell and Environment* 8: 707–711.
- SAINI, H.S.; CONSOLACION, E.D.; BASSI, P.K. & SPENCER, M.S. 1989. Control processes in the induction and relief of thermoinhibition of lettuce seed germination. *Plant Physiology* 90:311-315.
- SATOH, S.; TAKEDA, Y. & ESASHI, Y. 1984. Dormancy and impotency of cocklebur seeds. IX. Changes in ACC ethylene conversion activity and ACC content of dormant and non dormant seeds during soaking. *Journal of Experimental Botany* 35:1515-1524.
- SCHONBECK, M.W. & EGLEY, G.H. 1981. Phase-sequence of redroot pigweed seed germination responses to ethylene and other stimuli. *Plant Physiology* 68: 175-179.
- SEILER, A. 1977. Galaktomannanabbau in keimenden Johannisbrotsamen (*Ceratonia siliqua* L.). *Planta* 134:209-221.
- SHINTANI, A.; KATO, H. & MINAMIKAWA, T. 1997. Hormonal regulation of expression of two cysteine endopeptidase genes in rice seedlings. *Plant Cell Physiology* 38:1242-1248.
- SOMME, R. 1968. The structure of a galactomannan from *Medicago Lupulina* L. *Acta Chemica Scandinavica* 22:537-545.
- STEWART, E.R. & FREEBAIRN, H.T. 1969. Ethylene, Seed Germination, and Epinasty. *Plant Physiology* 44:955-958.
- SUGIMOTO, Y.; ALIA, A.M.; YABUTAA, S.; KINOSHITAA, H.; INANAGAA, S. & ITAIB, A. 2003. Germination strategy of *Striga hermonthica* involves regulation of ethylene biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 119:137-145.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3^o ed. Artmed, Porto Alegre. 719p.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of

- Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). Trees: structure and function 20:669-678.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; SILVAI, C.O.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. Trees: structure and function 21:13-21.
- UNRAU, A.M. 1961. The constitution of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala*. Journal of Organic Chemistry 26:3097-3101.
- VAN STADEN, J.; OLATOYE, S.T. & HALL, M.A. 1973. Effect of light and ethylene upon cytokinin levels in seed of *Spergula arvensis*. Journal of Experimental Botany 24:662-671.
- WU, C-T & BRADFORD, K.J. 2003. Class I chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. Plant Physiology 133:263-273.

CAPÍTULO 3

**EFEITO DOS AÇÚCARES SOBRE O ABA E O ETILENO DURANTE
O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS EM
SEMENTES DE *Sesbania virgata* (CAV.) PERS.**

1. Resumo

Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. acumulam suas reservas de carbono no endosperma na forma de um polissacarídeo de parede celular, o galactomanano. Além da reserva de carbono, há uma grande quantidade de corpos protéicos, no citoplasma das células endospérmicas, que constituem a principal reserva de nitrogênio nestas sementes. Para que ocorra a correta distribuição dos produtos de degradação das reservas deve haver mecanismos eficientes de controle nos processos de degradação das reservas de carbono e nitrogênio. Sabe-se que o ABA, além de prevenir a degradação das proteínas de reserva, inibe a degradação do galactomanano, interferindo na atividade das enzimas hidrolíticas. Em contrapartida, o etileno estimula a síntese e/ou a atividade de enzimas relacionadas à degradação do endosperma, antagonicamente ao ABA. Buscando verificar e relacionar o efeito do ácido abscísico e do etileno aos açúcares na degradação das reservas após a germinação de *S. virgata*, sementes desta espécie foram embebidas em água, glucose (0,05 M) e sacarose (0,025 M) e os efeitos destes foram verificados através da produção endógena de etileno e ABA destas sementes. Analisando a produção endógena de ABA, observou-se que este hormônio esteve presente em altas quantidades no primeiro e no quarto dia após a embebição, ou seja, no início do período germinativo e durante a degradação das reservas. A alta concentração de ABA principalmente no tegumento durante a germinação, assim como sua presença no tecido durante o período pós-germinativo, deve 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 das reservas através das enzimas hidrolíticas. Quanto à produção endógena de etileno, observou-se um aumento brusco do hormônio durante o período de mobilização das reservas, mais especificamente no quarto dia após a embebição, que pode estar relacionado à influência do etileno na atividade das enzimas hidrolíticas em sementes de *S. virgata*. Ainda, como ocorreram mudanças

na produção de ABA e etileno endógeno na presença de glucose e sacarose, sugere-se uma relação entre a via de sinalização destes hormônios e a dos açúcares, que parece controlar o processo de degradação das proteínas e dos galactomananos, evitando a produção dos açúcares redutores e a produção de sacarose em excesso durante o período pós-germinativo. A influência da glucose e sacarose no controle da produção de ABA e etileno endógeno torna-se possível *in vivo*, já que estes açúcares estão disponíveis endogenamente nas sementes durante a produção destes hormônios. Desta forma, estas evidências sugerem que o ABA e o etileno controlariam antagonicamente a mobilização de reservas em sementes de *S. virgata*, juntamente com os açúcares, a fim de garantir o afluxo eficiente de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento da plântula.

2. Introdução

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). Há enorme variação na composição de sementes, mas as substâncias armazenadas em grande quantidade constituem os carboidratos e as proteínas (Buckeridge *et al.* 2004a).

As sementes de leguminosas são conhecidas por serem ricas em proteínas de reserva. Nesse grupo podemos incluir *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., com cerca de 45% do peso seco da semente em proteínas (Buckeridge *et al.* 2004b). *S. virgata* é uma planta com hábito arbustivo que ocorre principalmente em regiões úmidas ou alagadas, como na galeria de florestas de regiões Neotropicais, e está associada com os primeiros estágios da sucessão ecológica (Kissmann & Groth 1999, Potomati & Buckeridge 2002).

As proteínas de reserva estão usualmente presentes em vacúolos de reserva, denominados corpos protéicos, na maioria das sementes de dicotiledôneas e gimnospermas (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2004a, Tonini *et al.* 2006). Além disso, várias enzimas podem estar presentes também

nos corpos protéicos, e durante a mobilização de reservas outras enzimas podem ser adicionadas (Bewley & Black 1994).

A hidrólise das proteínas de reserva aos seus aminoácidos constituintes é realizada por proteases, as quais podem hidrolisar totalmente as proteínas ou produzirem pequenos polipeptídeos que são degradados posteriormente por peptidases (Bewley & Black 1994).

Quanto às reservas de carboidratos, sementes de diversas espécies de leguminosas são conhecidas por acumular galactomananos na parede celular dos endospermas das sementes, sendo denominados polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) (Reid 1985, Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000b, Buckeridge *et al.* 2004a).

Em todas as espécies de leguminosas estudadas, a mobilização do galactomananos inicia após a germinação (Buckeridge *et al.* 2000c, Tonini *et al.* 2006), sendo mediada por três enzimas hidrolíticas: α - galactosidase (EC 3.2.1.22), endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) e exo- β -manosidase (EC 3.2.1.25) (Reid & Meier 1972, McCleary & Matheson 1976, Buckeridge & Dietrich 1996).

Além de prevenir a degradação das proteínas de reserva (Garcarrubio *et al.* 1997), 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 diversas espécies de sementes (Seiler 1977, Halmer & Bewley 1979, Groot & Karssen 1992, Reid & Meier 1973, Malek & Bewley 1991, Kontos & Spyropoulos 1995), como em *S. virgata* (Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2006), interferindo na atividade das enzimas hidrolíticas (Buckeridge *et al.* 2000a, Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2006).

Antagonicamente ao ABA, acredita-se que o etileno possa agir estimulando a síntese e/ou a atividade de enzimas relacionadas à degradação do endosperma (Bialecka & Kepczynska 2007, Nascimento *et al.* 2005, Pirrello *et al.* 2006).

A presença de ácido abscísico no tegumento de sementes de *S. virgata* sugere a participação conjunta desse hormônio com o tegumento no mecanismo de controle da degradação das proteínas de reserva e dos galactomananos

(Tonini *et al.* 2006, Tonini *et al.* 2007). Kontos & Spyropoulos (1996) sugeriram que o tegumento pode controlar a produção de enzimas hidrolíticas no endosperma de sementes de *Ceratonia siliqua*, assim, como em sementes de tomate, (Nonogaki *et al.* 1992, Nomaguchi *et al.* 1995).

Além disto, sabendo que os açúcares atuam como moléculas sinalizadoras e que a via de sinalização dos açúcares não opera isoladamente (Smeekens 2000, Rognoni *et al.* 2007), existem evidências genéticas para uma interação entre a via de sinalização do ABA e a via de sinalização de açúcares, bem como de outras classes de hormônios vegetais (Taiz & Zeiger 2004).

Dentro deste contexto, as respostas aos açúcares seriam diretamente mediadas pelo ABA, pela via de indução da sua biossíntese e pela ativação de alguns genes de sinalização do ABA (Arenas-Huertero *et al.* 2000, Chen *et al.* 2006). Apesar de alguns autores acreditarem que o ABA não está diretamente envolvido na sinalização dos açúcares, mas na regulação da maneira como os tecidos respondem aos açúcares (Rook *et al.* 2001). Outros autores acreditam, ainda, que a glucose não age pela via de biossíntese do ABA (Dekkers *et al.* 2004), sugerindo que este açúcar pode retardar a germinação por atrasar o declínio da concentração de ABA endógeno (Price *et al.* 2003), afetando a estabilidade do ABA (Dekkers *et al.* 2004).

No caso do etileno, acredita-se que este hormônio interage com a via de sinalização dos açúcares, porém antagonicamente, controlando o desenvolvimento inicial da plântula (Zhou *et al.* 1998, Gazzarrini & McCourt 2001, Rognoni *et al.* 2007).

Desta maneira, a glucose antagoniza a via de sinalização do etileno por ativar os genes relacionados a biossíntese e sinalização do ABA (Cheng *et al.* 2002), modulando as respostas ao etileno, de uma maneira dependente do ABA (León & Sheen 2003). A diminuição das respostas ao ABA e aos açúcares é geralmente acompanhada por um aumento na síntese e respostas ao etileno (Finkelstein & Gibson 2001). É possível, também, que a glucose possa inibir a via de sinalização do etileno diretamente (Rolland *et al.* 2002).

O objetivo deste trabalho foi verificar os níveis de ácido abscísico e etileno endógeno nos diferentes tecidos sob influência dos açúcares, buscando relacionar a via de sinalização destes hormônios à via de sinalização dos açúcares, a fim de compreender os diversos mecanismos de controle durante e após a germinação de sementes de *S. virgata*.

3. Material

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

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

4.1. Efeitos dos açúcares nos níveis endógenos de etileno

Após o beneficiamento dos frutos, as sementes quiescentes foram escarificadas mecanicamente com lixa e incubadas sobre papel de filtro em erlenmeyers de 125 mL (6 cm de diâmetro), fechados com rolhas de borracha, contendo 0,5 mL de solução/semente, em condições de 12h de luz e temperatura de aproximadamente 25 °C. As sementes foram embebidas em água (controle),

solução de glucose (0,05 M) e sacarose (0,025 M) (Price *et al.* 2003, Tiné & Buckeridge - resultados não publicados). A cada 24 horas de incubação, do primeiro ao quinto dia após a embebição, período germinativo e pós-germinativo que abrange o início e a degradação intensa das reservas, foi efetuada a dosagem de etileno endógeno (10 sementes por tratamento a cada dia, com três repetições).

A análise de etileno foi realizada pela injeção de amostras do ar do interior dos frascos em um cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard (GC-6890). A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm), equipada com detector por ionização de chama. O volume de injeção foi de 1 ou 10 mL, dependendo da amostra, empregando o modo de injeção *pulsed splitless*. As condições de injeção empregadas foram: pressão de 20 psi por 2 minutos, fluxo de ventilação de 5 mL.min⁻¹ após 30 segundos de injeção e temperatura do injetor em 200 °C. As demais condições cromatográficas empregadas foram: corrida isotérmica a 30 °C, empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1 mL.min⁻¹, temperatura do detector em 250 °C, fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450 mL.min⁻¹ e 40 mL.min⁻¹, respectivamente. A estimativa da quantidade de etileno produzida pelas sementes foi feita em relação à injeção de 10 µL de um padrão de 100 µL.L⁻¹ de etileno em ar sintético da Air Liquid.

4.2. Efeitos dos açúcares nos níveis endógenos de ABA

Após o beneficiamento dos frutos, as sementes quiescentes foram escarificadas mecanicamente e incubadas sobre papel de filtro em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 0,5 mL de solução/semente, em condições de 12h de luz e temperatura de aproximadamente 25 °C. As sementes foram embebidas em água (controle), solução de glucose (0,05 M) e sacarose (0,025 M) (Price *et al.* 2003, Tiné & Buckeridge - resultados não publicados). A cada 24 horas de incubação, do primeiro ao quinto dia após a embebição, as sementes foram coletadas (30 sementes por tratamento a cada dia, com três repetições) e

dissecadas, separando-se o tegumento e o endosperma. Os tecidos separados foram submetidos à técnica de determinação da concentração de ABA endógeno pelo GC-SIM-MS, adaptado de Chen *et al.* (1988) e Santos *et al.* (2004).

Os tecidos isolados, com no mínimo 500 mg, foram macerados usando nitrogênio líquido e submetidos à extração com álcool, com adição de 4 mL de metanol 80% (com BHT 40mg.L⁻¹) por amostra e agitação por 20 horas no escuro a 4 °C. Nessa etapa da extração foram adicionados, para cada amostra, 10 µL de ABA radiativo (1µg) , como um padrão interno utilizado para determinar rentabilidade da extração e da purificação do ABA. Os extratos foram filtrados em lã de vidro, seguidos por filtração em coluna Sep-Pak C-18, previamente ativada com 80% de metanol. Os extratos filtrados foram secos, metilados com 1 mL de diazometano em éter por 30 min, secos em fluxo de nitrogênio, resuspendidos em 100 µL de metanol e analisados por cromatógrafo de gás-líquido da Agilent (GC-6890) com espectrometria de massa da Agilent (MS-5973), utilizando uma coluna de polaridade média HP1701 (30 m, D.I. 0,25 mm), no modo de monitoramento de íons (SIM). O volume de injeção foi de 1 µL, empregando o modo de injeção *splitless*, empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1 mL.min⁻¹, com temperatura do injetor em 200 °C. A estimativa da quantidade de ABA produzido pelas sementes foi feita em relação à detecção da área dos íons do ABA endógeno e do padrão interno da amostra e da concentração inicial do padrão interno.

4.3. Níveis endógenos de glucose e sacarose nas sementes

Após o beneficiamento dos frutos, as sementes quiescentes foram escarificadas mecanicamente e incubadas sobre papel de filtro em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 0,5 mL de água/semente, em condições de 12h de luz e temperatura de aproximadamente 25 °C. A cada 24 horas de incubação, do primeiro ao quinto dia após a embebição, as sementes foram coletadas (10

sementes por tratamento a cada dia, com três repetições) e dissecadas, separando-se o tegumento e o endosperma.

Os tecidos isolados foram macerados usando nitrogênio líquido, liofilizados e submetidos a quatro extrações repetitivas com álcool, com adição de 1,5 mL de etanol 80% por amostra, por 20 min a 80 °C. A cada extração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante recolhido. Após todas as extrações, os sobrenadantes recolhidos foram reunidos, secos, resuspendidos em 1 mL de água destilada e analisados por cromatógrafo de troca aniônica de alta performance com detector de pulso amperométrico da Dionex (HPAEC/ PAD - DX500), utilizando a coluna Carbo-Pac PA1. A estimativa da quantidade de glucose e sacarose nas sementes foi feita em relação à detecção da área dos íons dos respectivos açúcares e do padrão, sendo considerada para o cálculo a concentração conhecida dos açúcares do padrão.

5. Resultados/Discussão

5.1. Efeitos dos açúcares nos níveis endógenos de ABA

Primeiramente foi comparada a taxa de germinação, a massa fresca das sementes intactas e a massa fresca do tegumento, do endosperma e do embrião isolado das sementes embebidas em água (controle), glucose e sacarose.

Analisando a porcentagem de germinação ao longo do período, observou-se que a germinação completa das sementes ocorreu somente no segundo dia após a embebição, tanto no controle como nos tratamentos, não havendo aparentemente influência dos açúcares sobre o processo germinativo (Fig. 1). Sabe-se que as sementes de *Sesbania virgata* atingem 100% de germinação entre o segundo e terceiro dias após a embebição (Buckeridge & Dietrich 1996, Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2007).

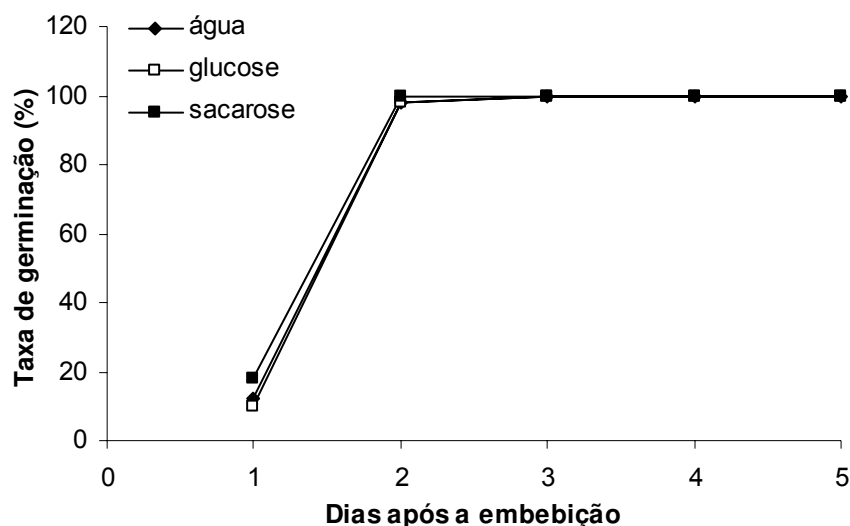


Figura 1. Taxa de germinação em sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quinto dia após a embebição em água (controle), glucose (0,05 M) e sacarose (0,025 M). Os valores representam a média de três repetições.

Aparentemente, como mencionado, tanto a glucose como a sacarose não tiveram nenhuma influência sobre a taxa de germinação em sementes de *S. virgata* (Fig. 1). Realmente, concentrações similares de glucose e sacarose não inibiram a germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana*, não tendo nenhum efeito sobre o processo. (Cernac *et al.* 2006). Apesar disso, estes açúcares, principalmente em concentrações mais altas, inibem a germinação de algumas espécies (Zhou *et al.* 1998, Price *et al.* 2003, Dekkers *et al.* 2004, Cernac *et al.* 2006).

Quanto à variação de massa fresca das sementes ao longo do mesmo período, observou-se um aumento gradativo nos valores de massa fresca das sementes, tanto no controle como nos tratamentos, apesar das sementes embebidas em glucose e sacarose terem apresentado massa fresca menor, quando comparadas com as sementes embebidas em água, principalmente a partir do terceiro dia após a embebição (Fig. 2).

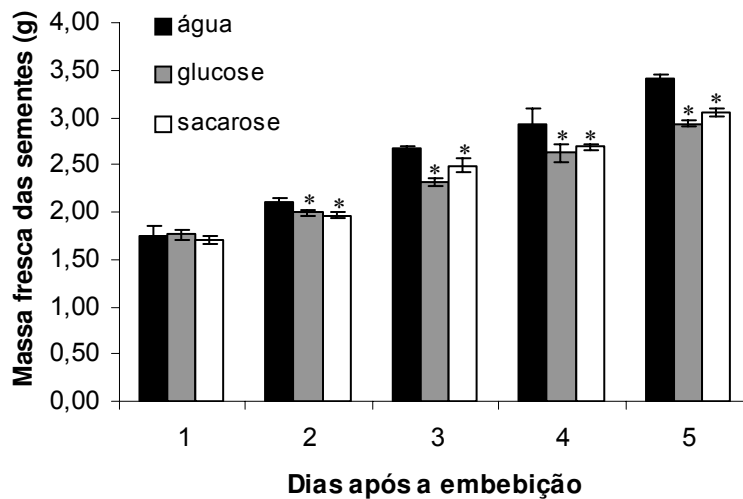


Figura 2. Massa fresca das sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quinto dia após a embebição em água (controle), glucose (0,05 M) e sacarose (0,025 M). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

Este aumento de massa fresca das sementes intactas durante o período germinativo e pós-germinativo deve estar relacionado à absorção de água durante a germinação e ao alongamento e crescimento do embrião principalmente após a germinação. Desta forma, sugere-se que a presença de glucose e sacarose tenham diminuído a absorção de água durante a germinação e reprimido o alongamento e crescimento do embrião durante e após o processo germinativo (Fig. 2), apesar de não ter influenciado o processo germinativo, que foi similar ao controle (Fig. 1). Sabe-se que a glucose e a sacarose podem inibir o desenvolvimento inicial da nova plântula após a germinação de sementes de *Arabidopsis* (Gibson *et al.* 2001, Price *et al.* 2003, Dekkers *et al.* 2004).

Comparando com o tegumento, observou-se que os valores de massa fresca desse tecido permaneceram praticamente constantes por todo o período, tanto no controle como nos tratamentos, não ocorrendo diferenças significativas entre estes (Fig. 3A).

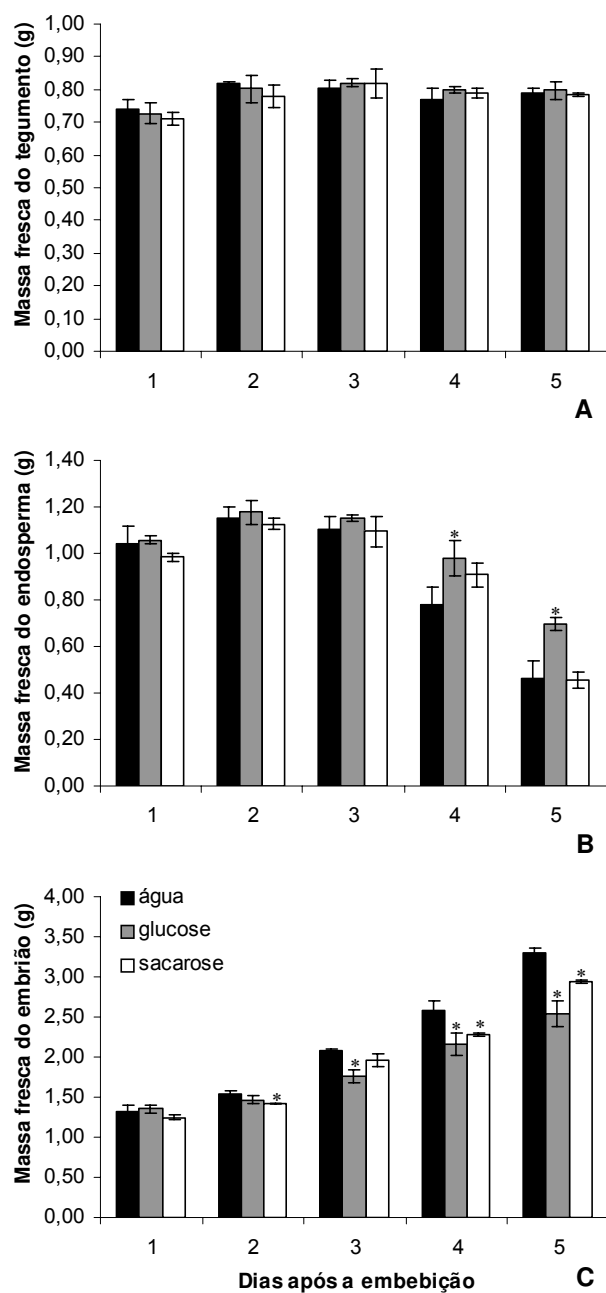


Figura 3. Massa fresca dos tegumentos (**A**), dos endospermas (**B**) e dos embriões isolados (**C**) de sementes de *S. virgata*, do segundo ao quinto dia após a embebição em água (controle), glucose (0,05 M) e sacarose (0,025 M). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

Analisando o endosperma, observou-se uma diminuição gradativa nos valores de massa fresca deste tecido, tanto no controle como nos tratamentos, a partir do terceiro dia após a embebição (Fig. 3B). Embora na presença de glucose, o endosperma tenha apresentado massa fresca maior no quarto e quinto dias após a embebição, quando comparada com a do endosperma das sementes embebidas em água (Fig. 3B), indicando inibição na degradação do endosperma nas sementes embebidas em glucose.

Em sementes de *S. virgata*, a mobilização das proteínas de reserva e dos galactomananos 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, Tonini *et al.* 2006).

Sabendo que a glucose e a galactose são epímeros e, ainda, que a galactose pode inibir a ação da α -galactosidade sobre os galactomananos (Buckeridge, comunicação pessoal), sugere-se que a inibição da degradação do endosperma em presença da glucose ocorra como consequência da inibição da atividade da α -galactosidade.

Quanto ao embrião, ocorreu um aumento gradativo nos valores de massa fresca das sementes, tanto no controle como nos tratamentos, apesar das sementes embebidas em glucose e sacarose terem apresentado massa fresca menor, quando comparadas com as sementes embebidas em água, principalmente no quarto e quinto dias após a embebição (Fig. 3C).

Desta forma, como já mencionado acima, a presença de glucose e sacarose parece ter reprimido o alongamento e crescimento do embrião após o processo germinativo.

Analisando a produção de ABA endógeno no tegumento das sementes embebidas em água, observou-se que este hormônio esteve presente em altas quantidades no primeiro e no quarto dia após a embebição, ou seja, no início do período germinativo e durante a degradação de reservas (Fig. 4). Sabe-se que a degradação intensa das proteínas de reserva e dos galactomananos presentes no

endosperma ocorre entre o terceiro e quinto dias após a embebição (Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge *et al.* 2000b, Tonini *et al.* 2006).

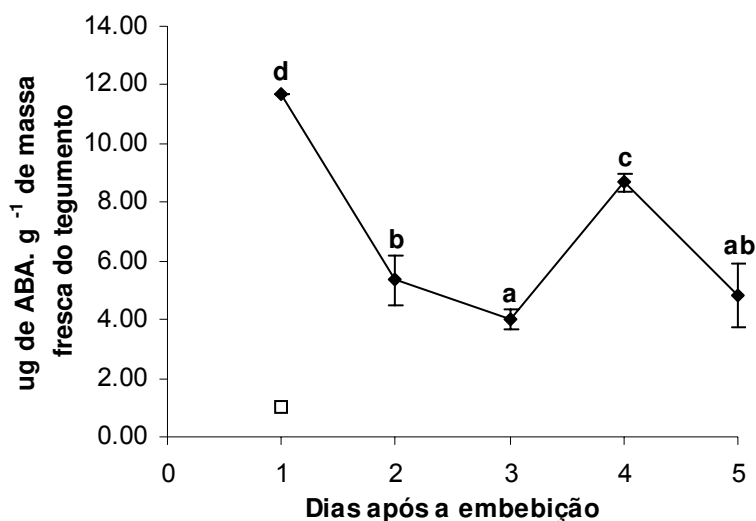


Figura 4. Produção de ABA nos tegumentos isolados de sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quinto dia após a embebição em água. Os valores representam a média de três repetições. (médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

Apesar da produção de ABA ter sido muito alta no primeiro dia após a embebição (Fig. 4), acredita-se que este hormônio não influencie o processo germinativo em sementes de *S. virgata*, já que a taxa de germinação não é alterada significativamente com a presença de ABA exógeno quando comparado ao controle (Capítulo 2). Desta forma, embora o ABA esteja envolvido no mecanismo de dormência de sementes em diversas espécies, 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), este hormônio, aparentemente, não tem nenhuma influência sobre a taxa de germinação em sementes de *S. virgata*.

Desta forma, a alta concentração de ABA no tegumento no início da germinação, assim como sua presença no tecido durante o período pós-germinativo, deve 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 das reservas 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 de açúcares redutores em excesso. Tonini *et al.* (2007) já haviam sugerido a participação do tegumento na modificação e/ou armazenamento das enzimas hidrolíticas em sementes de *S. virgata*, controlando a ação dessas hidrolases durante e após a germinação, possivelmente junto com o ABA presente no tecido.

Em sementes embebidas em glucose e sacarose, pode-se observar que, como no controle, a quantidade de ABA endógeno no tegumento foi muito alta no primeiro e quarto dias após a embebição (Fig. 5). Apesar das semelhanças entre as curvas de produção de ABA no tegumento das sementes embebidas em água, glucose e sacarose, a presença de glucose parece ter induzido a produção de ABA durante o período germinativo e, inclusive, no início do período pós-germinativo no tegumento isolado, já que a quantidade de ABA foi significativamente maior, quando comparado ao controle, no primeiro, segundo e terceiro dias após a embebição (Fig. 5).

Esse aumento pode ser relacionado à indução, causada pelos açúcares, da biossíntese do ABA (Arenas-Huertero *et al.* 2000, Cheng *et al.* 2002, León & Sheen 2003, Chen *et al.* 2006, Dekkers & Smeekens 2007) e não a um atraso no declínio da concentração de ABA endógeno decorrente da adição de açúcares, como sugerido por Price *et al.* (2003).

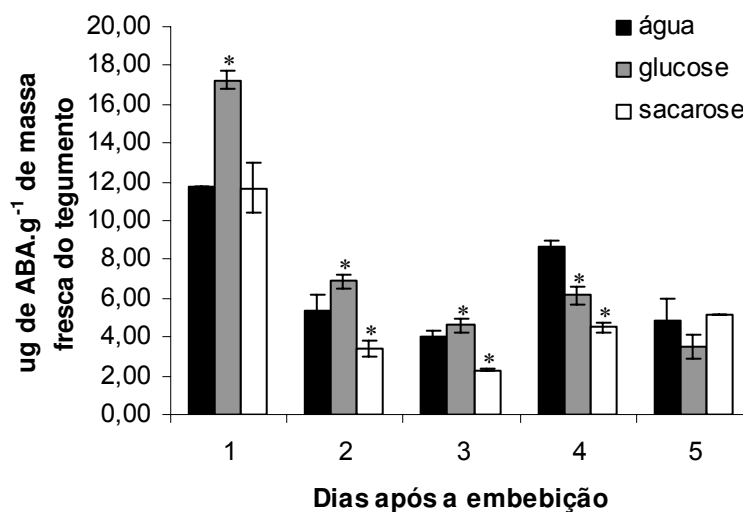


Figura 5. Produção de ABA nos tegmentos isolados de sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quinto dia após a embebição em água (controle), glucose (0,05 M) e sacarose (0,025 M). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

Em contrapartida, a presença de sacarose parece ter controlado a produção do hormônio no fim da germinação e durante o período pós-germinativo, já que a quantidade de ABA foi menor, quando comparado ao controle, no segundo, terceiro e quarto dias após a embebição (Fig. 5). Em concentrações baixas, a adição de açúcares ao meio de incubação das sementes suprime a ação inibitória do ABA (Garciaarrubio *et al.* 1997, Finkelstein & Lynch 2000). Os açúcares parecem interagir com os hormônios de várias maneiras, dependendo da concentração dos açúcares e da resposta analisada (Finkelstein & Gibson 2001).

Além disso, apesar da sacarose ser a principal forma de carbono translocada, as hexoses parecem exercer um papel maior na regulação dos açúcares (Sturm & Tang 1999).

Como a glucose induziu a produção de ABA durante e após a germinação (Fig. 5), sugere-se uma relação íntima entre a via de sinalização do ABA e a dos açúcares, mais especificamente da glucose, em sementes de *S. virgata*.

Durante este processo, a glucose estaria controlando a produção de ABA e, conseqüentemente, a degradação das proteínas de reserva, a ativação e atividade da α -galactosidase e a degradação dos galactomananos. Realmente, sabe-se que a glucose atrasa a degradação de reservas (Lu & Hills 2002, To *et al.* 2002) e inibe o desenvolvimento inicial da nova plântula após a germinação (Price *et al.* 2003, Dekkers *et al.* 2004).

Desta forma, sugere-se a influência do ABA durante o período de degradação das reservas em sementes de *S. virgata*, possivelmente controlando a atividade das enzimas hidrolíticas relacionadas ao processo, e uma relação entre a via de sinalização do ABA e a dos açúcares, a fim de controlar o processo de degradação dos galactomananos, evitando a produção dos açúcares redutores e sacarose em excesso durante o período pós-germinativo e promover o desenvolvimento inicial da plântula. O excesso de açúcares leva à produção de amido transitório (Reid 1971, Buckeridge & Dietrich 1996) e com isto gastos energéticos adicionais para a plântula.

5.2. Efeitos dos açúcares nos níveis endógenos de etileno

Analisando a produção de etileno endógeno nas sementes embebidas em água, observou-se que este hormônio esteve presente em pequenas quantidades no primeiro e segundo dias após a embebição, ou seja, durante o período germinativo (Fig. 6). Entretanto, durante o período pós-germinativo, a produção de etileno aumenta bruscamente, praticamente quatro vezes mais, ocorrendo a maior concentração de hormônio no quarto dia após a embebição (Fig. 6).

Como a produção de etileno endógeno foi muito baixa no primeiro e segundo dias após a embebição (Fig. 6), sugere-se que este hormônio não influencie o processo germinativo em sementes de *S. Virgata*, uma vez que a taxa de germinação não é alterada significativamente com a presença de etileno exógeno quando comparado ao controle (Capítulo 2).

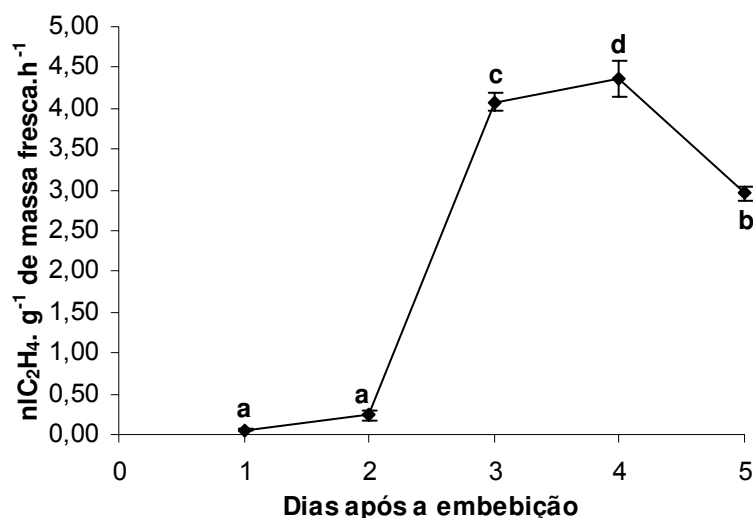


Figura 6. Produção de etileno em sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quinto dia após a embebição em água. Os valores representam a média de três repetições. (médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

Embora muitos trabalhos relacionem a produção deste hormônio durante o período germinativo à quebra da dormência e germinação, como em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Beaudoin *et al.* 2000), *Amaranthus caudatus* (Kepczynski & Karssen 1985, Kepczynski & Kepczynska 1997, Bialecka & Kepczynska 2003), *Lactuca sativa* (alface) (Steward & Freebairn 1969, Negm & Smith 1978, Abeles 1986, Saini *et al.* 1989, Nascimento *et al.* 2004), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Khalil 1992), *Pisum sativum* (ervilha) (Gorecki *et al.* 1991, Petruzzelli *et al.* 1995), dentre outras. O papel deste hormônio na germinação continua controverso.

Alguns autores afirmam que a produção do etileno é uma consequência da germinação, enquanto outros sugerem que a produção de etileno seja necessária à germinação (Abeles *et al.* 1992, Matilla 2000). Dentre as sementes que requerem etileno para germinar, algumas são extremamente sensíveis enquanto outras requerem altas quantidades do gás (Esashi 1991, Kepczynski & Kepczynska 1997, Matilla 2000). Além disso, em alguns casos a presença deste

gás inibe ou não afeta a germinação (Kepczynski & Kepczynska 1997, Matilla 2000).

Após o período germinativo, a quantidade de etileno aumenta expressivamente, quatro vezes mais (Fig. 6), sugerindo a participação deste hormônio durante a degradação de reservas, que ocorre no período pós-germinativo. Realmente, através da aplicação de etileno exógeno, pode-se observar a influência deste hormônio na atividade da α -galactosidase e, conseqüentemente, na degradação dos galactomananos (Capítulo 2), comprovando a participação deste hormônio durante o período pós-germinativo.

Em sementes embebidas em glucose e sacarose, pode-se observar que, como no controle, a quantidade de etileno endógeno foi muito baixa no primeiro e segundo dias após a embebição, aumentando bruscamente após a germinação (Fig. 7). Ainda como no controle, a produção de etileno endógeno nas sementes embebidas em sacarose foi maior no quarto dia após a embebição, enquanto nas sementes embebidas em glucose a maior quantidade de hormônio foi observada ao redor do terceiro e quarto dias após a embebição (Fig. 7).

Apesar das semelhanças entre as curvas de produção de etileno em sementes embebidas em água, glucose e sacarose, a presença de glucose e sacarose parece ter controlado a produção de etileno, que foi significativamente menor, quando comparado ao controle, ao longo do processo germinativo e pós-germinativo (Fig. 7).

Como os açúcares reprimiram a produção de etileno durante e após a germinação (Fig. 7), sugere-se uma relação íntima entre a via de sinalização do etileno e a dos açúcares em sementes de *S. virgata*.

Durante este processo a glucose e a sacarose estariam controlando a produção de etileno e, conseqüentemente, a degradação das proteínas de reserva, a ativação e atividade da α -galactosidase e a degradação dos galactomananos, a fim de evitar a formação de açúcares em excesso e promover o desenvolvimento inicial da plântula. Sabe-se que a glucose atrasa a degradação de reservas (Lu & Hills 2002, To *et al.* 2002) e inibe o desenvolvimento inicial da

nova plântula após a germinação (Price *et al.* 2003, Dekkers *et al.* 2004), assim como a sacarose (Gibson *et al.* 2001).

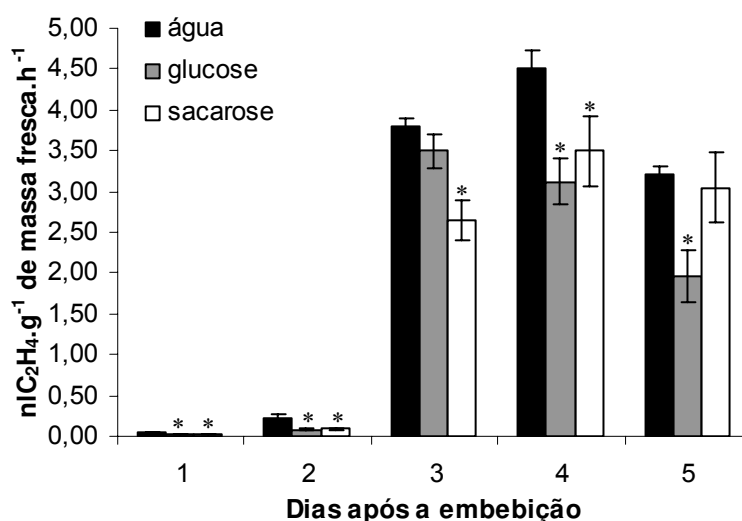


Figura 7. Produção de etileno em sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quinto dia após a embebição em água (controle), glucose (0,05 M) e sacarose (0,025 M). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

Em *Arabidopsis*, já foi demonstrada uma interação antagônica entre as vias de sinalização do etileno e a dos açúcares (Zhou *et al.* 1998, Gazzarrini & McCourt 2001, León & Sheen 2003, Yanagisawa *et al.* 2003, Gagne *et al.* 2004, Rognoni *et al.* 2007). Dentro deste contexto, a glucose antagonizaria a via de sinalização do etileno por ativar os genes relacionados a biossíntese e sinalização do ABA (Cheng *et al.* 2002), modulando as respostas ao etileno, de uma maneira dependente do ABA (León & Sheen 2003). A diminuição das respostas ao ABA e aos açúcares é geralmente acompanhada por um aumento na síntese e respostas ao etileno (Finkelstein & Gibson 2001). Embora seja possível, também, que a glucose possa inibir a via de sinalização do etileno diretamente (Rolland *et al.* 2002).

O efeito observado da glucose e sacarose em sementes de *S. virgata* é possível desde o primeiro dia após a embebição, pois a formação de açúcares não ocorre somente no período pós-germinativo com a degradação dos galactomananos, mas também durante a germinação, através da degradação dos oligossacarídeos da série rafínosica (Buckeridge & Dietrich 1996). Sabe-se que em sementes dessa mesma espécie, além dos galactomananos, outros compostos de reserva como os oligossacarídeos da série rafínosica estão presentes no endosperma, embora no citoplasma das células (Buckeridge & Dietrich 1996).

Desta forma, sugere-se a influência do etileno durante o período de degradação das reservas em sementes de *S. virgata*, modulando a atividade das enzimas hidrolíticas relacionadas ao processo, e uma relação entre a via de sinalização do etileno e a dos açúcares, controlando assim o processo de degradação dos galactomananos, evitando a produção dos açúcares redutores e sacarose em excesso durante o período pós-germinativo.

5.3. Níveis endógenos de glucose e sacarose nas sementes

Analizando os níveis endógenos de glucose e sacarose nas sementes embebidas em água, observou-se que estes açúcares estiveram presentes nas sementes inteiras em quantidades inferiores no primeiro e segundo dias após a embebição, ou seja, durante o período germinativo (Fig. 8). Entretanto, durante o período pós-germinativo, a presença de glucose e sacarose aumentaram bruscamente, aproximadamente duas e três vezes mais, respectivamente, ocorrendo a maior concentração dos açúcares no quarto dia após a embebição (Fig. 8). Estas elevadas taxas de glucose e sacarose coincidiram com o segundo pico encontrado para a produção de ABA nas sementes embebidas em água, glucose e sacarose (Fig 5).

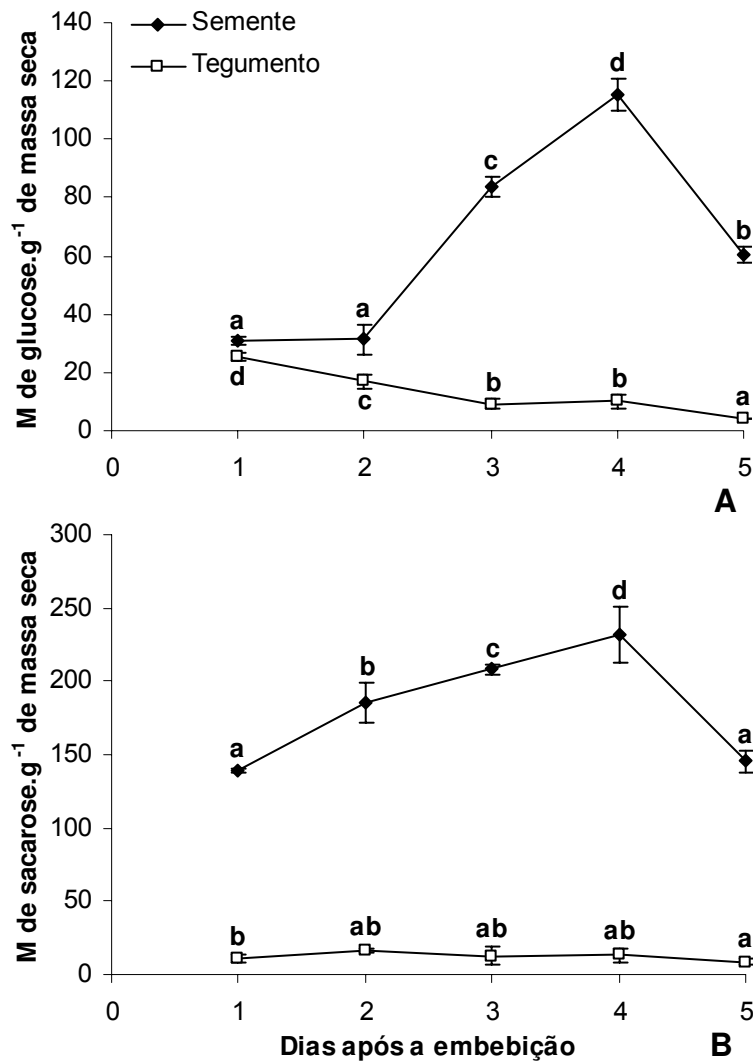


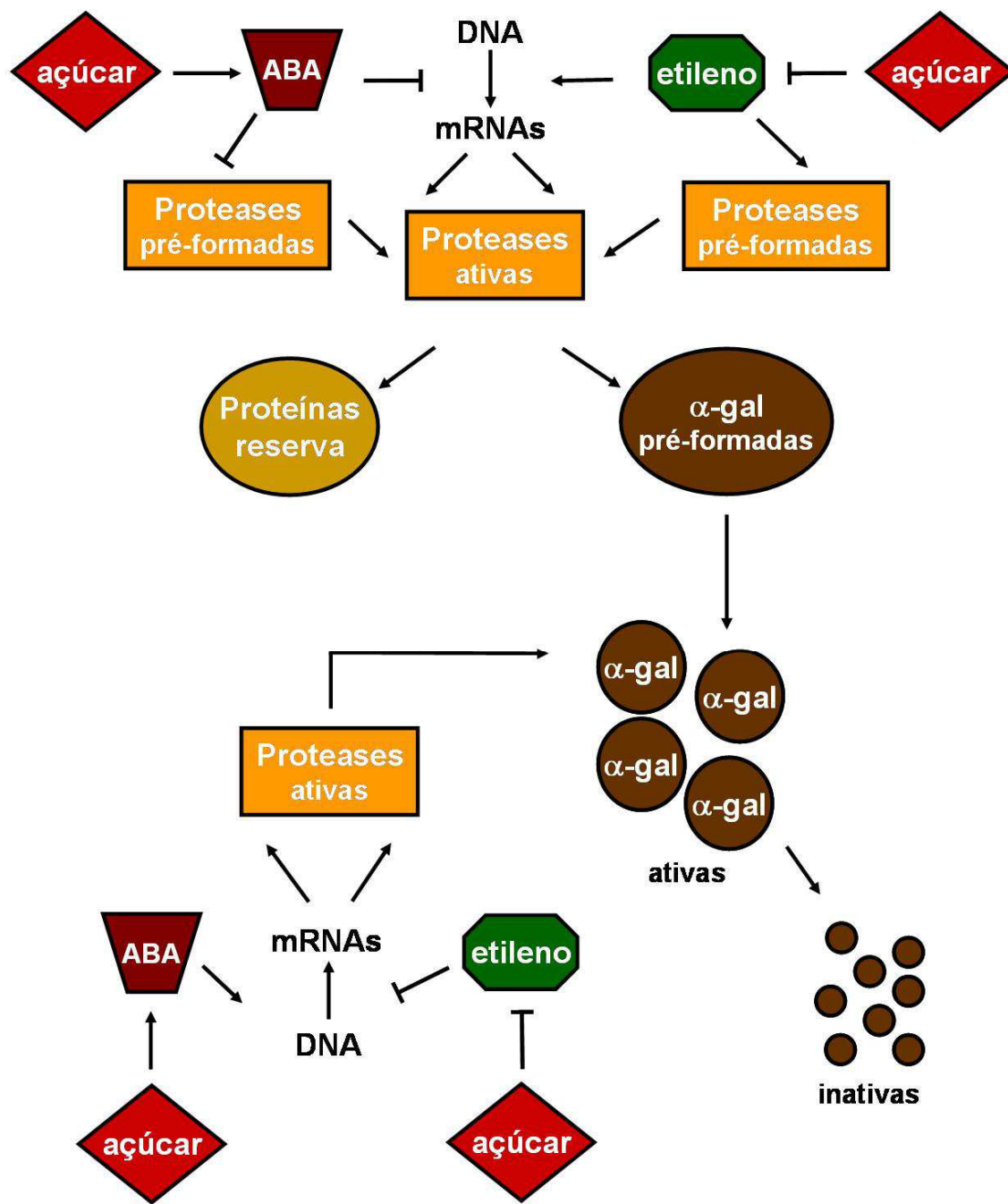
Figura 8. Níveis endógenos de glicose (A) e sacarose (B) nos tegumentos isolados e nas sementes íntegras de *S. virgata*, do primeiro ao quinto dia após a embebição em água. Os valores representam a média de três repetições. (médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de LSD a 5%, $p=0,05$).

Quanto aos níveis de glicose e sacarose endógenos no tegumento isolado, observou-se que não houve grandes variações na quantidade destes açúcares ao longo do período germinativo e pós-germinativo, embora as taxas maiores de glicose e sacarose tenham ocorrido no primeiro dia após a embebição (Fig. 8).

Estas elevadas taxas de glucose e sacarose encontradas no tegumento coincidiram com o primeiro pico encontrado para a produção de ABA nas sementes embebidas em água e em glucose e sacarose exógenas (Fig 5). Desta forma, torna-se possível, *in vivo*, a influência da glucose e sacarose no controle da produção de ABA endógeno, já que estes açúcares estariam disponíveis nas sementes durante a produção deste hormônio, sugerindo uma relação íntima entre a via de sinalização do ABA e a dos açúcares em sementes de *S. virgata*.

6. Conclusões

Com base em resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2, sugere-se dois mecanismos de controle enzimático no período pós-germinativo, quando ocorre a degradação dos galactomananos. No primeiro mecanismo de controle, a ativação da α -galactosidase pré-formada durante a maturação ocorreria através de um processamento proteolítico, induzido pela via de sinalização do etileno e/ou reprimido pela do ABA (Fig. 9). Além do controle proteolítico que ocorre no início do período pós-germinativo, ocorreria um processo de regulação da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos, após atividade intensa da α -galactosidase, através também da via de sinalização do ABA e do etileno. Neste processo, o ABA e o etileno estariam antagonicamente induzindo e reprimindo, respectivamente, a síntese *de novo* de proteases, que seriam responsáveis pela desativação da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos (Fig. 9).



germinação e pós-germinação

Figura 9. Modelo esquemático do mecanismo de controle da α-galactosidase no endosperma de sementes de *S. virgata* durante e após a germinação.

Desta forma, para que a degradação de reservas ocorra eficientemente em sementes de *S. virgata*, seria necessário um balanço ideal entre o etileno e o ABA durante e após a degradação dos galactomananos. Dentro deste contexto, sugere-se a existência de correlação entre a via de sinalização do etileno e a dos açúcares durante e após a germinação, assim como entre a via de sinalização do ABA e a dos açúcares, possivelmente garantindo o afluxo sincrônico de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento do embrião e estabelecimento da plântula. Assim, uma complexa rede de regulação integraria a sinalização de hormônios e nutrientes, controlando a ativação e a atividade da α -galactosidase, a fim de controlar o processo de degradação dos galactomananos, evitando a produção dos açúcares redutores e da sacarose em excesso durante o período pós-germinativo (Fig. 9).

7. Referências bibliográficas

- ABELES, F.B. 1986. Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv 'grand rapids' seed germination. *Plant Physiology* 81: 780-787.
- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W. & SALTVEIT, M.E.JR. 1992. Ethylene in plant biology. 2º ed. Academic Press, San Diego.
- ARENAS-HUERTERO, F.; ARROYO, A.; ZHOU, L.; SHEEN, J. & LEON, P. 2000. Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development* 14:2085-2096.
- BEAUDOIN, N.; SERIZET, C.; GOSTI, F. & GIRAUDAT, J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell* 12:1103-1115.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. 2º ed. Plenum Press, New York. 445p.

- BIALECKA, E.J. & KEPCZYNSKI, J. 2003. Regulation of α -amylase activity in *Amaranthus caudatus* seeds by methyl jasmonate, gibberellin A₃, benzyladenine and ethylene. *Plant Growth Regulation* 39:51-56.
- BIALECKA, E.J. & KEPCZYNSKI, J. 2007. Changes in concentrations of soluble carbohydrates during germination of *Amaranthus caudatus* L. Seeds in relation to ethylene, gibberellin A₃ and methyl jasmonate. *Plant Growth Regulation* 51:21-31.
- 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. 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, Paris. p. 283-317.
- 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.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2004a. Acúmulo de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 31-50.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. & AIDAR, M.P.M. 2004b. Mobilização de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 163-185.
- 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.

- CERNAC, A.; ANDRE, C.; HOFFMANN-BENNING, S. & BENNING, C. 2006. WRI1 is required for seed germination and seedling establishment. *Plant Physiology* 141:745-757.
- CHEN, K. & AN, Y-Q. C. 2006. Transcriptional Responses to Gibberellin and Absciscic Acid in Barley Aleurone. *Journal of Integrative Plant Biology* 48:591-612.
- CHEN, K.; MILLER, A.N.; PATTERSON, G.W. & COHEN, J.D. 1988. A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-SIM-MS analysis. *Plant Physiology* 86:822-825.
- CHENG, W-H; ENDO, A.; ZHOU, L.; PENNEY, J.; CHEN, H-C; ARROYO, A.; LEON, 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.
- DEKKERS, B.J.W. & SMEEKENS, S.C.M. 2007. Sugar and abscisic acid regulation of germination and transition to seedling growth. *In*: Bradford, K. & Nonogaki, H. Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing, Oxford. p. 305-327.
- DEKKERS, B.J.W.; SCHUURMANS, J.A.M.J. & SMEEKENS, S.C.M. 2004. Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 579-588.
- ESASHI, Y. 1991. Ethylene and seed germination. *In*: MATTOO, A.K. & SUTTLE, J.C. The plant hormone ethylene. CRC Press, Boca Raton. p. 133-157.
- FINKELSTEIN, R.R. & GIBSON, S.I. 2001. ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* 5:26-32.
- FINKELSTEIN, R.R. & LYNCH, T.J. 2000. Absciscic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiology* 122:1179-1186.
- GAGNE, J.M.; SMALLE, J.; GINGERICH, D.J.; WALKER, J.M.; YOO, S-D.; YANAGISAWA, S.I. & VIERSTRA, R.D. 2004. Arabidopsis EIN3-binding F-box

- 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. PNAS 101: 6803-6808.
- GARCIARRUBIO, A.; LEGARIA, J.P. & COVARRUBIAS, A.A. 1997. Absciscic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203:182-187.
- GAZZARRINI, S. & MCCOURT, P. 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion Plant Biology* 4:387-391.
- GIBSON, S.I.; LABY, R.J. & KIM, D. 2001. The *sugar-insensitive1 (sis1)* mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*. *biochemical and biophysical research communications* 280:196-203.
- GORECKI, R.J.; ASHINO, H.; SATOH, S. & ESAHI, Y. 1991. Ethylene production in pea and cocklebur seeds of differing vigour. *Journal Experimental Botany* 42:407-414.
- GROOT, S.P.C. & KARSSSEN, C.M. 1992. Dormancy and germination of absciscic acid-deficient tomato seeds - studies with the *sitiens* mutant. *Plant Physiology* 99:952-958.
- HALMER, P. & BEWLEY, J.D. 1979. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. *Planta* 144:333-340.
- KEPCZYNSKI, J. & KARSSSEN, C.M. 1985. Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of *Amaranthus caudatus*. *Physiologia Plantarum* 63:49-52.
- KEPCZYNSKI, J. & KEPCZYNSKA, E. 1997. Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum* 101:720-726.
- KHALIL, M.K. 1992. Nature of growth regulators effects on *Nicotiana tabacum* seed germination. *Angewandte Botanik* 66: 106-108.
- 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 α -galactosidase and endo- β -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 α -galactosidase and endo- β -mannanase in the endosperm of developing carob seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 34:787-793.
- LEÓN, P. & SHEEN, J. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science* 8:110-116.
- LU, C. & HILLS, M.J. 2002. Arabidopsis mutants deficient in diacylglycerol acyltransferase display increased sensitivity to abscisic acid, sugars, and osmotic stress during germination and seedling development. *Plant Physiology* 129:1352-1358.
- MALEK, L. & BEWLEY, J.D. 1991. Endo- β -mannanase activity and reserve mobilization in excised endosperms of fenugreek is affected by volume of incubation and abscisic acid. *Seed Science Research* 1:45-49.
- MATILLA, A.J. 2000. Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research* 10:111-126.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1976. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 15:43-47.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J. & HUBER, D.J. 2004. Ethylene evolution and endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature *Scientia Agricola* 61:156-163.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J. & HUBER, D.J. 2005. SEED aging affects ethylene production and endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature, *Seed Science Technology*. 33:11-17.
- NEGM, F.B. & SMITH, O.E. 1978. Effects of ethylene and carbon dioxide on the germination of osmotically inhibited lettuce seed. *Plant Physiology* 62:473-476.

- 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.; MATSUSHIMA, H. & MOROHASHI, Y. 1992. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. *Physiologia Plantarum* 85:167-172.
- PETRUZZELLI, L., HARREN, F., PERRONE, C. AND REUSS, J. 1995. On the role of ethylene in seed germination and early root growth of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* 145:83-86.
- PIRRELLO, J.; JAIMES-MIRANDA, F.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; TOURNIER, B.; KHALIL-AHMAD, Q.; REGAD, F.; LATCHE, A.; PECH, J.C. & BOUZAYEN, M. 2006. SI-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiology* 47:1195-1205.
- 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.
- PRICE, J.; LI, T-C.; KANG, S.G.; NA, J.K. & JANG, J-C. 2003. Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132:1424-1438.
- 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. 1985. Cell wall storage carbohydrates in seeds. *Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses*. *Advances in Botanical Research* 11:125-155.
- 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. Enzyme activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.

- Leguminosae). Secretion of α -galactosidases and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112:301-308.
- ROGNONI, S.; TENG, S.; ARRU, L.; SMEEKENS, S.C.M & PERATA, P. 2007. Sugar effects on early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation* 52:217-228.
- ROLLAND, F.; MOORE, B. & SHEEN, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14:S185-S205.
- ROOK, F. & BEVAN, M.W. 2003. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *Journal of Experimental Botany* 54:495-501.
- SAINI, H.S.; CONSOLACION, E.D.; BASSI, P.K. & SPENCER, M.S. 1989. Control processes in the induction and relief of thermoinhibition of lettuce seed germination. *Plant Physiology* 90:311-315.
- 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.
- SEILER, A. 1977. Galaktomannanabbau in keimenden Johannisbrotsamen (*Ceratonia siliqua* L.). *Planta* 134:209-221.
- SMEEKENS, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 51:49-81.
- STURM, A. & TANG, G.Q. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4:401-407.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3^o ed. Artmed, Porto Alegre. 719p.
- TO, J.P., REITER, W.D. & GIBSON, S.I. 2002. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biology* 2:4.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of

- Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). Trees: structure and function 20:669-678.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; SILVAI, C.O.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. Trees: structure and function 21:13-21.
- YANAGISAWA, S.; YOO, S-D. & SHEEN, J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. Nature 425:521-525.
- ZHOU, L.; JANG, J.C.; JONES, T.L. & SHEEN, J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95:10294-99.

DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento das plantas é dependente de sinais internos gerados pelos hormônios. Interações hormonais, integrados com sinais do ambiente, resultam em alterações fenotípicas, sendo o crescimento e a diferenciação resultados de diversas vias de uma rede integrada de sinalização, não apenas envolvendo fatores de crescimento, mas também fatores externos (Vandenbussche & Van Der Straeten 2007).

Dentro desta interação entre os hormônios, há a participação de componentes presentes entre as vias de sinalização. Esta conexão pode ser na base (a produção de um hormônio é influenciado por outro), no meio (uso comum de um intermediário durante a sinalização), no fim das vias de sinalização (um gene alvo em comum ou uma ação cooperativa na ativação de um processo subcelular), ou a combinação destes (Vandenbussche & Van Der Straeten 2007).

De fato, sabe-se que o etileno e o ABA partilham elementos de transdução de sinal, e que o etileno regula negativamente o grau de dormência por suprimir a expressão de genes envolvidos na sinalização do ABA (Beaudoin *et al.* 2000, Borghetti 2004). Além disso, verificou-se que a quebra de dormência por etileno envolve proteólise seletiva mediada por um complexo multicatalítico proteasoma, inibida por ABA (Cervantes *et al.* 1994, Borghetti *et al.* 2002).

Dessa forma, tanto o silenciamento de genes envolvidos na dormência como a remoção de polipeptídeos inibidores da germinação fazem parte do processo de remoção da dormência em sementes (Borghetti 2004). Por outro lado, tem sido sugerido que o etileno estimule a germinação também através da inativação do ABA (Chiwocha *et al.* 2005, Vandenbussche & Van Der Straeten 2007).

Realmente, os efeitos do etileno podem ser explicados pelo fato deste hormônio agir negativamente como um regulador da ação do ABA, promovendo a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula (Beaudoin *et al.* 2000, Ghassemian *et al.* 2000). Nesse contexto, a via de sinalização do etileno pode

reprimir parcialmente a biossíntese do ABA ou regular negativamente a sinalização deste hormônio, diminuindo a sensibilidade ao ABA endógeno (Ghassemian 2000, Cheng *et al.* 2002).

Apesar de não ter sido diretamente observada, no presente trabalho, a influência do ABA e do etileno sobre a germinação de sementes de *Sesbania virgata*, sugere-se a influência destes hormônios durante a degradação de reservas no período pós-germinativo (Capítulo 2). Em sementes de *S. virgata*, a mobilização das reservas começa somente quando a germinação termina, durante o processo chamado de pós-germinação (Tonini *et al.* 2006).

Desta forma, verificou-se que o etileno apresentou um efeito indutor na atividade total da α -galactosidase e, possivelmente, como consequência, na degradação dos carboidratos de reserva, presentes na forma de galactomananos na parede celular do endosperma. Em contrapartida, o ABA apresentou um efeito modulador na atividade da α -galactosidase, além de retardar a degradação das proteínas de reservas, presentes no citoplasma das células endospermicas (Capítulo 2).

Este efeito modulador do ABA sobre a degradação das reservas em sementes de *S. virgata* já havia sido observado por Tonini *et al.* (2006), que sugeriu uma relação de causa e efeito entre o ABA e a ação das enzimas hidrolíticas. Além disto, sabe-se que o etileno pode regular a atividade de diversas enzimas (Cardoso 2004, Nascimento *et al.* 2004, Nascimento *et al.* 2005, Pirrello *et al.* 2006), como a α -galactosidase (Bialecka & Kepczynska 2007).

Sabendo que a produção da α -galactosidase ocorre durante a maturação das sementes, e que a enzima pré-formada deve ser processada e ativada, através de um processo proteolítico, possivelmente modulado através da via de sinalização de hormônios (Fig. 6 - Capítulo 1), sugere-se que o etileno esteja envolvido, no início do período pós-germinativo, na ativação da α -galactosidase pré-formada. Desta forma, o etileno estaria estimulando a síntese ou ativação de proteases pré-formadas relacionadas a ativação da α -galactosidase (Fig. 5 - Capítulo 2). De fato, pode-se observar um aumento nos níveis de teores protéicos

em presença do etileno exógeno, sugerindo-se a influência do etileno na síntese *de novo* de proteínas no endosperma, que podem ser relacionadas à degradação dos galactomananos (Capítulo 2).

No final do processo de degradação dos galactomananos foi sugerida, ainda, a síntese *de novo* de enzimas relacionadas ao controle da α -galactosidase, através de sua degradação ou desativação, a fim de evitar o excesso de açúcares redutores e sacarose (Fig. 6 - Capítulo 1). Neste contexto, no final do processo de degradação dos galactomananos, no qual ocorre uma grande produção de etileno endógeno, sugere-se que este hormônio estaria reprimindo a síntese *de novo* de proteases, relacionadas à desativação da α -galactosidase (Fig. 5 - Capítulo 2, Capítulo 3).

Como em presença do ABA ocorre um retardamento na degradação dos galactomananos, pode-se sugerir um efeito inibidor do ABA, no início do período pós-germinativo, sobre a ativação da α -galactosidase pré-formada, possivelmente através do processo proteolítico mencionado acima, já que o ABA teve efeito modulador nos teores de proteínas totais, supostamente inibindo a síntese ou a ativação de proteases pré-formadas, relacionadas à degradação das proteínas de reservas e dos galactomananos (Capítulo 2). Além disto, pode-se sugerir um efeito indutor do ABA sobre a degradação ou desativação da α -galactosidase no final do processo de degradação dos galactomananos, no qual ocorre grande produção do hormônio endógeno, possivelmente através da indução da síntese *de novo* de proteases no final do processo, modulando assim a atividade da enzima (Fig. 5 - Capítulo 2, Capítulo 3).

Como estes hormônios agem de forma antagônica sobre a atividade da α -galactosidase, um balanço ideal entre o etileno e o ABA permite que a degradação de reservas ocorra eficientemente em sementes de *S. virgata*. Neste processo, o ABA e o etileno estariam regulando a atividade de proteases, que seriam responsáveis pela ativação da α -galactosidase no início do processo pós-germinativo e pela desativação da enzima no final do processo de degradação dos

galactomananos, a fim de evitar o excesso de açúcares redutores no tecido e a produção de sacarose (Fig. 5 - Capítulo 2).

Além dos hormônios, açúcares como glucose e sacarose têm uma função essencial no metabolismo das plantas (Smeekens 2000). Desta forma, diferentes organismos desenvolveram a habilidade de “sentir” níveis internos de açúcares (sensibilidade ao açúcar), conseqüentemente ajustando suas atividades metabólicas e celulares, através da via de sinalização dos açúcares (Price *et al.* 2003, Rognoni *et al.* 2007). Dentro deste contexto, além do papel metabólico, os açúcares teriam uma função parecida com a dos hormônios (Smeekens 2000, León & Sheen 2003, Rolland *et al.* 2006, Dekkers *et al.* 2008).

Embora já tenha sido demonstrado que os açúcares agem como moléculas sinalizadoras, pouco se sabe sobre os mecanismos pelo quais as plantas respondem a estes (Rognoni *et al.* 2007). Aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares têm sido utilizados para estudar as respostas das plantas aos açúcares (Smeekens 2000, Rolland *et al.* 2002) e algumas das estratégias genéticas aplicadas são baseadas no efeito inibitório dos açúcares sobre o desenvolvimento pós-germinativo de *Arabidopsis thaliana*.

O atraso no desenvolvimento da plântula causado pelos altos níveis de açúcares pode ser visto como uma regressão do metabolismo, o qual cessa a mobilização de reservas das sementes (Gazzarrini & McCurt 2001, Rook *et al.* 2001). De fato, sabe-se que a glucose pode retardar a degradação das reservas nas sementes (Lu & Hills 2002, To *et al.* 2002).

Porém, a via de sinalização dos açúcares não opera isoladamente, mas é parte de uma rede de regulação celular. Recentes estudos claramente demonstram uma interação entre sistemas de sinalização, especialmente entre açúcares e fitohormônios (Smeekens 2000).

Tem sido sugerido que entre os fitohormônios, o ABA é o de maior importância para a resposta das plantas aos açúcares (Rognoni *et al.* 2007). Dentro deste contexto, as respostas aos açúcares seriam diretamente mediadas

pelo ABA, pela via de indução da sua biossíntese e pela ativação de alguns genes de sinalização do ABA (Arenas-Huertero *et al.* 2000, Chen *et al.* 2006).

No presente trabalho, a presença de glucose parece ter induzido a produção de ABA durante o período germinativo e, inclusive, no início do período pós-germinativo em sementes de *S. virgata* (Capítulo 3). Esse aumento pode ser relacionado à indução, causada pelos açúcares, da biossíntese do ABA mencionada acima (Arenas-Huertero *et al.* 2000, Cheng *et al.* 2002, León & Sheen 2003, Chen *et al.* 2006, Dekkers & Smeekens 2007) e não a um atraso no declínio da concentração de ABA endógeno decorrente da adição de açúcares, como sugerido por Price *et al.* (2003).

Desta forma, como a glucose induziu a produção de ABA durante e após a germinação, sugere-se a existência de uma correlação entre a via de sinalização do ABA e a dos açúcares, mais especificamente da glucose, em sementes de *S. virgata*. Durante este processo, a glucose estaria controlando a produção de ABA e, conseqüentemente, a degradação das proteínas de reserva e dos galactomananos, através da regulação da ativação e atividade da α -galactosidase (Fig. 9 - Capítulo 3).

No caso do etileno, acredita-se que este hormônio interage com a via de sinalização dos açúcares, porém antagonicamente, controlando o desenvolvimento da plântula (Zhou *et al.* 1998, Gazzarrini & McCourt 2001, Rognoni *et al.* 2007). Dentre deste contexto, a glucose antagoniza a via de sinalização do etileno por ativar os genes relacionados à biossíntese e sinalização do ABA (Cheng *et al.* 2002), modulando as respostas ao etileno, de uma maneira dependente do ABA (León & Sheen 2003). De fato, a diminuição das respostas ao ABA e aos açúcares é geralmente acompanhada por um aumento na síntese e respostas ao etileno (Finkelstein & Gibson 2001). Porém, é possível também que a glucose possa inibir a via de sinalização do etileno diretamente (Rolland *et al.* 2002).

De fato, os açúcares reprimiram a produção de etileno durante e após a germinação em sementes de *S. virgata*, sugerindo também uma relação entre a

via de sinalização do etileno e a dos açúcares nesta espécie. Durante este processo a glucose e a sacarose estariam controlando a produção de etileno e, conseqüentemente, a ativação e atividade da α -galactosidase e a degradação dos galactomananos (Fig. 9 - Capítulo 3).

Além disso, como elevadas taxas de glucose e sacarose foram encontradas durante a produção de ABA e etileno, torna-se possível, *in vivo*, a influência dos açúcares no controle da produção destes hormônios, já que a glucose e a sacarose estariam disponíveis nas sementes durante todo o processo (Capítulo 3).

Concluindo, sugere-se a influência do ABA e do etileno durante o período de degradação das reservas em sementes de *S. virgata*, possivelmente controlando a atividade das enzimas hidrolíticas relacionadas ao processo, e uma relação possivelmente direta entre a via de sinalização destes hormônios e a dos açúcares, a fim de controlar o processo de degradação dos galactomananos, evitando a produção dos açúcares redutores e sacarose em excesso durante o período pós-germinativo, promovendo o desenvolvimento inicial da plântula (Fig. 9 - Capítulo 3). Ainda, como estes hormônios estariam envolvidos também no controle do processo de degradação das proteínas de reservas, sugere-se que a mobilização de reservas de carbono (galactomananos) no endosperma de sementes de *S. virgata* deve estar relacionada à mobilização das reservas de nitrogênio (proteínas) no mesmo tecido, possivelmente garantindo o afluxo sincrônico de compostos carreadores dos dois macronutrientes (C e N) para o desenvolvimento do embrião e estabelecimento da plântula (Fig. 5 - Capítulo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B. 1986. Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv 'grand rapids' seed germination. *Plant Physiology* 81:780-787.
- ADEMARK, P.; VARGA, A.; MEDVE, J.; HARJUNPÄ, V. & TORBJÖRN, D. 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a β -mannanase. *Journal of Biotechnology* 63:199-210.
- ADKINS, S.W. & ROSS, J.D. 1981. Studies in wild oat seed dormancy. I. The role of ethylene in dormancy breakage and germination of wild oat seeds (*Avena fatua* L.). *Plant Physiology* 67: 358-362.
- 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^oed. Artes Médicas, Porto Alegre. 1294p.
- AMARAL DA SILVA, E.A.; TOOROP, P.E.; VAN AEIST, A. & HILHORST, H.W.M. 2004. Absciscic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta* 220:251-261.
- ARENAS-HUERTERO, F.; ARROYO, A.; ZHOU, L.; SHEEN, J. & LEON, P. 2000. Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development* 14:2085-2096.
- 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.
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M.; CHESTER, E.W. & SMITH, M. 2003. Ethylene as a possible cue for seed germination of *Schoenoplectus hallii* (Cyperaceae), a rare

- summer annual of occasionally flooded sites. *American Journal of Botany* 90:620-627.
- BEAUDOIN, N.; SERIZET, C.; GOSTI, F. & GIRAUDAT, J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12:1103-1116.
- 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. 2001. Seed germination and reserve mobilization. *In*: Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group www.els.net.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. 2^oed. 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)- β -mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta* 203:454-459.
- BIALECKA, E.J. & KEPCZYNSKI, J. 2003. Regulation of α -amylase activity in *Amaranthus caudatus* seeds by methyl jasmonate, gibberellin A₃, benzyladenine and ethylene. *Plant Growth Regulation* 39:51-56.
- BIALECKA, E.J. & KEPCZYNSKI, J. 2007. Changes in concentrations of soluble carbohydrates during germination of *Amaranthus caudatus* L. Seeds in relation to ethylene, gibberellin A₃ and methyl jasmonate. *Plant Growth Regulation* 51:21-31.

- BLACK, M. 1991. Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. *In*: DAVIES, W.J. & JONES, H.G. Abscissic acid physiology and biochemistry. BIOS Scientific Publisher, Lancaster-UK. p. 99-124.
- BORGHETTI, F. 2004. Dormência embrionária. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 109-126.
- BORGHETTI, F; NODA, F.N. & SÁ, C.M. 2002. Possible involvement of proteasoma activity in ethylene - induced germination of dormant sunflower embryos. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14:125-131.
- 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 β -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -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.; CAVALARI, A.A. & SILVA, G.B. 2008. Parede Celular. *In*: KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- 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.; HUTCHEON, I.S. & REID, J.S.G. 2005. The role of exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -galactanase in the mobilization of polysaccharides from cotyledon cell walls of *Lupinus angustifolius* following germination. *Annals of Botany* 96:435-444.

- 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.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2004a. Acúmulo de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 31-50.
- 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.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. & AIDAR, M.P.M. 2004b. Mobilização de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 163-185.
- 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.
- CARDOSO, V.J.M. 2004. Etileno *In*: KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 386-408.
- 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^oed. American Society of Plant Physiologists, Rockville. p. 52-108.
- CASTRO, R.D. & HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. p. 149-162.

- 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.
- CERNAC, A.; ANDRE, C.; HOFFMANN-BENNING, S. & BENNING, C. 2006. WRI1 is required for seed germination and seedling establishment. *Plant Physiology* 141:745-757.
- CERVANTES, E.; RODRIGUEZ, A. & NICOLÁS, G. 1994. Ethylene regulates the expression of a cysteine proteinase gene during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Molecular Biology* 25:207-215.
- CHEN, Y.; JI, F.; XIE, H.; LIANG, J. & ZHANG, J. 2006. The Regulator of G-Protein Signaling Proteins Involved in Sugar and Absciscic Acid Signaling in *Arabidopsis* Seed Germination. *Plant Physiology* 140:302-310.
- 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* absciscic acid biosynthesis and glucose signaling. *Plant Cell* 14:2723-2743.
- CHIWOCHA, S.D.S.; CUTLER, A.J.; ABRAMS, S.R.; AMBROSE, S.J.; YANG, J.; ROSS, A.R.S. & KERMODE, A.R. 2005. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the absciscic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant Journal* 42:35-48.
- CHUDZIKOWSKI, 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.
- COLII, S. 2004. Etileno *In*: KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 308-332.
- 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.
- CORUZZI, G.M. & ZHOU, L. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: Emerging 'matrix effects'. *Current Opinion Plant Biology* 4:247-253.
- 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.
- DAVIES, H.V. & CHAPMAN, J.M. 1980. Protein mobilization, feedback inhibition in cucumber. *Planta* 149:288-291.
- 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.
- DEKKERS, B.J.W. & SMEEKENS, S.C.M. 2007. Sugar and abscisic acid regulation of germination and transition to seedling growth. *In*: Bradford, K. & Nonogaki, H. Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing, Oxford. p. 305-327.
- DEKKERS, B.J.W.; SCHUURMANS, J.A.M.J. & SMEEKENS, S.C.M. 2004. Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218:579-588.
- DEKKERS, B.J.W.; SCHUURMANS, J.A.M.J. & SMEEKENS, S.C.M. 2008. Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 67:151-167.

- DEMASON, D.A.; MADORE, M.A.; SEKHAR, K.N.C. & HARRIS, M.J. 1992. Role of α -galactosidase in cell wall metabolism of date palm (*Phoenix dactylifera*) endosperm. *Protoplasma* 166:177-186.
- DEWALD, D.B.; SADKA, A. & MULLET, J.E. 1994. Sucrose modulation of soybean Vsp gene expression is inhibited by auxin. *Plant Physiology* 104:439-444.
- DIRK, L.M.A.; GRIFFEN, A.M.; DOWNIE, B. & BEWLEY, J.D. 1995. Multiple isoenzymes of endo- β -D-mannanase in dry and imbibed seeds. *Phytochemistry* 40:1045-1056.
- 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.
- ECKARDT, N.A. 2002. Absciscic acid biosynthesis gene underscores the complexity of sugar, stress, and hormone interactions. *Plant Cell* 14:2645-2649.
- 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.
- ESASHI, Y. & LEOPOLD, A.C. 1969. Dormancy regulation in subterranean clover seeds by ethylene. *Plant Physiology* 44:1470-1472.
- ESAU, K. 1974. Anatomia das plantas com sementes. Tradução: MORRETES, B.L. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 293p.
- FEURTADO, J.A. 1999. α -Galactosidase and β -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 α -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. & GIBSON, S.I. 2001. ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* 5:26-32.
- FINKELSTEIN, R.R. & LYNCH, T.J. 2000. Absciscic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiology* 122:1179-1186.
- 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.
- 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.
- GAGNE, J.M.; SMALLE, J.; GINGERICH, D.J.; WALKER, J.M.; YOO, S-D.; YANAGISAWA, S.I. & VIERSTRA, R.D. 2004. Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *PNAS* 101:6803-6808.
- GALLARDO, M.; DE RUEDA, P.M.; MATILLA, A. & SÁNCHEZ-CALLE, I.M. 1994. The relationships between ethylene production and germination of *Cicer arietinum* seeds. *Biologia Plantarum* 36:201-207.
- GARCIARRUBIO, A.; LEGARIA, J.P. & COVARRUBIAS, A.A. 1997. Absciscic acid inhibits germination of mature Arabidopsis seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203:182-187.

- GAZZARRINI, S. & MCCOURT, P. 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion Plant Biology* 4:387-391.
- GHASSEMIAN, M.; NAMBARA, E.; CUTLER, S.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y. & MCCOURT, P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:1117-1126.
- GIANINETTI, A.; LAARHOVEN, L.J.J.; PERSIJN, S.T.; HARREN, F.J.M & PETRUZZELLI, L. 2007. Ethylene production is associated with germination but not seed dormancy in red rice. *Annals of Botany* 99:735-745.
- GIORGINI, J.F. & COMOLI, E. 1996. Effect of embryo and exogenous GA₃ 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.
- GORECKI, R.J.; ASHINO, H.; SATOH, S. & ESAHI, Y. 1991. Ethylene production in pea and cocklebur seeds of differing vigour. *Journal Experimental Botany* 42:407-414.
- 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. Giberellins-induced hydrolysis of endosperm cell walls in giberellin-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.
- HAVELANGE, A.; LEJEUNE, P.E. & BERNIER, G. 2000. Sucrose/Cytokinin interaction in *Sinapsis alba* at floral induction: a shoot-to-root physiological loop. *Physiologia Plantarum* 109:343-350.
- HERMANN, K.; MEINHARD, J.; DOBREV, LINKIES, P.; PESEK, B.; HEß, B., MACHÁCKOVA', I., FISCHER, U. & LEUBNER-METZGER, G. 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): a comparative study of fruits and seeds. *Journal of Experimental Botany*. 58:3047-3060.
- 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. 1995. Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum*) studies with the *sitiens* mutant. *Journal of Experimental Botany* 47:89-97.
- HUIJSER, JC; PEGO, J.; KORTSTEE A. & SMEEKENS, S. 1999. The sugar sensing mutant *sun6* is insensitive to abscisic acid: involvement of abscisic acid and the *ABI* genes in sugar sensing. Presented at the 10th International Conference on Arabidopsis Research, July 4-8, Melbourne, Australia.
- 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.

- JANG, J-C.; LEON, P.; ZHOU, L. & SHEEN, J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9:5-19.
- 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.
- KARSSSEN, 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.
- KEPCZYNSKI, J. & KARSSSEN, C.M. 1985. Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of *Amaranthus caudatus*. *Physiologia Plantarum* 63: 49-52.
- KETRING, D.L. & MORGAN, P.W. 1971. Physiology of oil seeds. II. Dormancy release in Virginia-type peanut seeds by plant growth regulators. *Plant Physiology* 47: 488-492.
- KHALIL, MK. 1992. Nature of growth regulators effects on *Nicotiana tabacum* seed germination. *Angewandte Botanik* 66:106-108.
- KONTOS, F. & SPYROPOULOS, C.G. 1995. Production and secretion of α -galactosidase and endo- β -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 α -galactosidase and endo- β -mannanase in the endosperm of developing carob seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 34:787-793.
- LABOURIAU, L.G. 1983. A germinação das sementes. Secretaria-geral da Organização dos Estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Washington. 173p.
- LALONDE, S. & SAINI, H.S. 1992 Comparative requirement for endogenous ethylene during seed germination. *Annals of Botany* 69:423-428.

- 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.
- LEUBNER-METZGER, G. 2002. Seed after-ripening and over-expression of class I β -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 β -(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 α -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.
- LI, Y.; LEE, K.K.; WALSH, S.; SMITH, C.; HADINGHAM, S.; SOREFAN, K.; CAWLEY, G. & BEVAN, M.W. 2006. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a relevance vector machine. *Genome Research* 16:414-427.
- 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- β -mananase 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.

- LISBOA, C.G.S. 2008. Aplicações biotecnológicas de polissacarídeos de plantas: uma estratégia sustentável para a produção em demanda. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- LISBOA, C.G.S.; TONINI, P.P.; TINÉ, M.A.S. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Endo-mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazil Journal of Plant Physiology* 18:269-280.
- LU, C. & HILLS, M.J. 2002. Arabidopsis mutants deficient in diacylglycerol acyltransferase display increased sensitivity to abscisic acid, sugars, and osmotic stress during germination and seedling development. *Plant Physiology* 129:1352-1358.
- MALEK, L. & BEWLEY, J.D. 1991. Endo- β -mannanase activity and reserve mobilization in excised endosperms of fenugreek is affected by volume of incubation and abscisic acid. *Seed Science Research* 1:45-49.
- MANZI, A.E. & CEREZO, 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- β -mannanases from germination coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213:296-308.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975. The germination of seeds. 2^o 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.

- McCLEARY, B.V. 1983. Enzymic interaction in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannanase. *Phytochemistry* 22:649-658.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1974. α -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 β -mannanase and β -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)- α -D-galactosyl-(1-4)- β -D-mannobiose and 6(2)- α -D-galactosyl-(1-4)- β -D-mannobiose. *Carbohydrate Research* 104:285-297.
- 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.
- MICKEY, D. 1994. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. *In*: SPRENT, J.I. & MICKEY, D. *Advances in legume systematics 5: the nitrogen factor*. Royal Botanic Gardens Kew., Londres. p. 221-228.
- MO, B. & BEWLEY, J.D. 2002. β -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 β -mannosidase and endo- β -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.
- MOUSSA, H.; MARGOLIS, H.A.; DUBE, P.A. & ODONGO, J. 1998. Factors affecting the germination of doum palm (*Hyphaene thebaica* Mart.) seeds from the semi-arid zone of Niger, West Africa. *Forest Ecology and Management* 104:27-41.
- MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A. & TIEDEMANN, J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52:1741-1752.
- NADELMANN, H. 1890. Über die Schleimendosperme der Leguminosen. *Pringsheims Jahrb Wissenschaft Botany* 21:1-83.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J. & HUBER, D.J. 2004. Ethylene evolution and endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature *Scientia Agricola* 61:156-163.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J. & HUBER, D.J. 2005. SEED aging affects ethylene production and endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature, *Seed Science Technology*. 33:11-17.
- NEGM, F.B. & SMITH, O.E. 1978. Effects of ethylene and carbon dioxide on the germination of osmotically inhibited lettuce seed. *Plant Physiology* 62: 473-476.
- 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 β -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- β -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- β -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- β -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- β -mananase 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.
- OSBORNE, T.B. 1924. The vegetable protein. 2^o ed. Longmans Green and Co., Londres. p. 154.
- OVERBEEKE, N.; FELLINGER, A.J.; TOONEN, M.Y.; VAN WASSENAAR, D. & VERRIPS, C.T. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the α -galactosidase cDNA from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar). *Plant Molecular Biology* 13:541-550.
- PANEGASSI, V.R.; SERRA, G.E. & BUCKERIDGE, M.S. 2000. Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*)

- para uso na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20:406-415.
- PETRUZZELLI, L., HARREN, F. AND REUSS, J. 1994. Patterns of C₂H₄ production during germination and seedling growth of pea and wheat as indicated by a laser-driven photoacoustic system. *Environmental and Experimental Botany* 34:55-61.
- PETRUZZELLI, L., HARREN, F., PERRONE, C. AND REUSS, J. 1995. On the role of ethylene in seed germination and early root growth of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* 145:83-86.
- PIRRELLO, J.; JAIMES-MIRANDA, F.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; TOURNIER, B.; KHALIL-AHMAD, Q.; REGAD, F.; LATCHE, A.; PECH, J.C. & BOUZAYEN, M. 2006. SI-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiology* 47:1195-1205 .
- 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.
- PRICE, J.; LI, T-C.; KANG, S.G.; NA, J.K. & JANG, J-C. 2003. Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132:1424-1438.
- PUGA-HERMIDA, M.I.; GALLARDO, M.; RODRIGUEZ-GACIO, M.C. & MATILLA, A.J. 2006. Polyamine contents, ethylene synthesis, and *BrACO2* expression during turnip germination. *BIOLOGIA PLANTARUM* 50:574-580.

- 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*. 6th 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 α -galactosidases and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112:301-308.
- ROGNONI, S.; TENG, S.; ARRU, L.; SMEEKENS, S.C.M & PERATA, P. 2007. Sugar effects on early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation* 52:217-228.
- ROLLAND, F.; MOORE, B. & SHEEN, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14:S185-S205.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E. & SHEEN, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review Plant Biology* 57:675-709.
- ROOK, F. & BEVAN, M.W. 2003. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *Journal of Experimental Botany* 54:495-501.
- ROOK, F.; CORKE, F.; CARD, R.; MUNZ, G.; SMITH, C. & BEVAN, M.W. 2001. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant Journal* 26:421-433.
- SAINI, H.S.; BASSI, P.K. & SPENCER, M.S. 1985a. Seed germination in *Chenopodium album* L.: Relationships between nitrate and the effects of plant hormones. *Plant Physiology* 77:940-943.
- SAINI, H.S.; BASSI, P.K. & SPENCER, M.S. 1985b. Seed germination in *Chenopodium album* L.: further evidence for the dependence of the effects of growth regulators on nitrate availability. *Plant Cell and Environment* 8:707-711.
- SAINI, H.S.; CONSOLACION, E.D.; BASSI, P.K. & SPENCER, M.S. 1989. Control processes in the induction and relief of thermoinhibition of lettuce seed germination. *Plant Physiology* 90:311-315.
- 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.
- SATOH, S.; TAKEDA, Y. & ESASHI, Y. 1984. Dormancy and impotency of cocklebur seeds. IX. Changes in ACC ethylene conversion activity and ACC

- content of dormant and non dormant seeds during soaking. *Journal of Experimental Botany* 35:1515-1524.
- 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 (*Ceratonia siliqua* L.). *Planta* 134:209-221.
- SEKHAR, K.N.C. & DeMASON, D.A. 1990. Identification and immunocytochemical localization of α -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181:53-61.
- SHEWRY, P.R. & CASEY, R. 1999. Seed Protein. *In*: SHEWRY, P.R. & CASEY, R. Seed Protein. Kluwer, Dordrecht. p. 883.
- SLACK, P.T.; BLACK, M. & CHAPMAN, J.M. 1977. Testa and lipid mobilization in cucumber. *Journal of Experimental Botany* 28:569-577.
- SMEEKENS, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 51:49-81.
- SOMME, R. 1968. The structure of a galactomannan from *Medicago Lupulina* L.. *Acta Chemica Scandinavica* 22:537-545.
- SPOLEN, W.G.; LENOBLE, M.E.; SAMUELS, T.D.; BERNSTEIN, N. & SHARP, R.E. 2000. Absciscic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology* 122:967-976.
- SPYROPOULOS, C.G. & REID, J.S.G. 1985. Regulation of α -galactosidase activity and the hydrolases of galactomannan in the endosperm of the fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed. *Planta* 166:271-275.
- STEWART, E.R. & FREEBAIRN, H.T. 1969. Ethylene, Seed Germination, and Epinasty. *Plant Physiology* 44:955-958.
- 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^oed. Artmed, Porto Alegre. 719p.

- THOMAS, W.; OKITA, T.W.; ROGERS, J.C. 1996. Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:327-350.
- TINÉ, M.A.S. 1997. Mobilização do xiloglucano de reserva em sementes de *Hymenaea courbaril* L. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- TO, J.P.; REITER, W.D. & GIBSON, S.I. 2002. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biology* 2:4.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees: structure and function* 20:669-678.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; SILVA, C.O.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees: structure and function* 21:13-21.
- 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- β -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- β -

- mannanase activity in tomato and lettuce seeds. *Journal of Plant Physiology* 154:679-685.
- UNRAU, A.M. 1961. The constitution of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Organic Chemistry* 26:3097-3101.
- VANDENBUSSCHE, F. & VAN DER STRAETEN, D. 2007. One for all and all for one: cross-talk of multiple signals controlling the plant phenotype. *Journal of Plant Growth Regulation* 26:178-187.
- VAN STADEN, J.; OLATOYE, S.T. & HALL, M.A. 1973. Effect of light and ethylene upon cytokinin levels in seed of *Spergula arvensis*. *Journal of Experimental Botany* 24:662-671.
- 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- β -mannanase: responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. *Planta* 200:71-77.
- XIAO, W.; SHEEN, J. & JANG, J.C. 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology* 44:451-461.
- 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.
- WILSON, K.A. 1986. Review of protein mobilization in dicot seeds. *In*: Dalling, M.J. Plant Proteolytic Enzymes. Volume 2. CRC Press, Boca Raton. p. 19-47.
- 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.
- YANAGISAWA, S.; YOO, S-D. & SHEEN, J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 425:521-525.
- ZAMBOU, K. & SPYROPOULOS, C.G. 1990. D-Galactose uptake by fenugreek cotyledons. Effect of water stress. *Plant Physiology* 93:1417-1421.
- ZHOU, L.; JANG, J.C.; JONES, T.L. & SHEEN, J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:10294-99.
- ZHU, A. & GOLDSTEIN, J. 1994. Cloning and functional expression of DNA encoding coffee bean α -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.