

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Adriana Potomati

**EFEITO DO ÁCIDO ABSCÍSICO SOBRE A
MOBILIZAÇÃO DE GALACTOMANANO E O
DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO EM
SEMENTES DE *Sesbania marginata* Benth.**

este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Adriana Potomati
e aprovada pela Comissão Julgadora.
14/01/00

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
Título de Mestre em Biologia Celular
e Estrutural na área de Biologia
Celular.*

Orientador: Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Campinas

2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO DE CIÊNCIAS

UNIDADE BC
N.º CHAMADA: UNICAMP
P849e
V. Ex
TOMBO 87/41138
PR. 278/00
PREGO 88.11.00
DATA 16-06-00
N.º CPD

CM-0014237B-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P849e Potomati, Adriana
Efeito do ácido abscísico sobre a mobilização de galactomanano e o desenvolvimento do embrião em sementes de *Sesbania marginata* Benth/Adriana Potomati.-- Campinas, SP: [60p], 2000
f: illus.

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

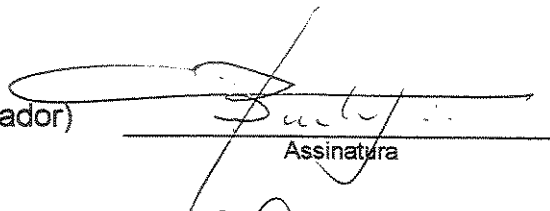
1. Sementes. 2. Ácido abscísico. 3. Galactomanano. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: 14/01/2000

BANCA EXAMINADORA

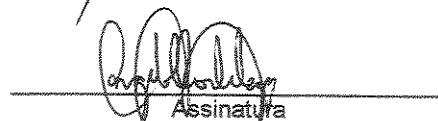
TITULARES:

Prof.Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)



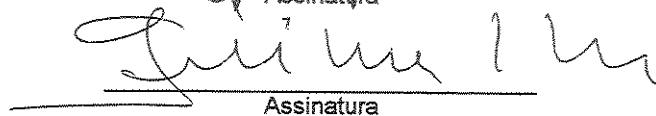
Assinatura

Prof.Dr. Angelo Luiz Cortelazzo



Assinatura

Prof.Dr. Giulio Cesare Stancato



Assinatura

SUPLENTE:

Profa.Dra. Thelma Regina Gabriel da Silva



Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Bendita a primavera da vida, breve,
 cujo sopro tudo atravessa!
 A forma desaparece
 Enquanto o ser para a vida desperta.
 Gerações se sucedem
 No esforço de evoluir;
 Espécie produz espécie,
 Em tempos que não tem fim;
 Mundos inteiros se erguem e declinam!
 Mergulha nos encantos da vida, ó flor,
 Na orelha da primavera;
 Louvando a bondade do Eterno,
 Aproveita tua curta existência.
 Acrescenta a ela, criativa,
 Também o teu óbulo;
 Breve e hesitante,
 Sopra, o quanto aquentares,
 A tua parcela de vida ao dia eterno!*

Bjornstjerne Bjornson (Psalm 99)

Ao meu filho, *Luiz Gustavo*,
O primeiro na minha vida,
ele é minha luz... meu milagre.

Ofereço

Ao meu Pai, *Adilson Potomati*,
Por ter cravado em meu coração
para sempre o *Amor...*
O único capaz de enfrentar todos
os momentos de nossa vida.

Dedico

In Memoriam

AGRADECIMENTOS

Desejo aproveitar esta oportunidade para agradecer não apenas a meus amigos dos dias felizes, mas a todos que sempre ficaram ao meu lado nos bons e maus tempos, tendo sempre uma palavra de estímulo e encorajamento.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge, meu orientador, por seu estímulo, percepção e sabedoria.

À banca examinadora pela aprovação com distinção e louvor.

À *Márcia de Oliveira* pela seriedade e eficiência durante sua ajuda na realização dos experimentos.

À seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo, pela utilização do laboratório, e a todos os pesquisadores, funcionários e estagiários, pelo apoio constante. Em especial, à *Maria Rita Marques, Paulo Alcântara Machado, Marco Aurélio, Márcia Braga e Valéria Panegassi*, não só pela amizade e incentivo mas também pela paciência dispensada nos momentos mais difíceis pelo qual passei.

Ao Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, em especial, *Angelo, Izabel, Heidy e Liliam* que muito me ajudaram nos tempos que passei em Campinas.

À Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal), pela bolsa concedida.

À *Patrícia Geraldes Teixeira e Ana Lúcia R. Portugal Silveira* por muitos e muitos anos de amizade.

Ao *Paulo César Santos Moreira*, que aturou todos os momentos em que estive de mau humor com muita coragem e confiança.

Ao meu irmão, *Marcelo Potomati*, por sempre estar ao meu lado.

À minha Mãe, *Helenice Potomati*, por seu amor incondicional, que fez com que acreditasse em mim em todos os momentos. Não há palavras que expressem tamanha gratidão mamãe.

Obrigada !

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
RESUMO.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
SEMENTES.....	9
GERMINAÇÃO.....	10
<i>Embebição.....</i>	<i>10</i>
<i>Extensão da radícula.....</i>	<i>11</i>
COMPONENTES DE RESERVA.....	12
<i>Carboidratos.....</i>	<i>13</i>
POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE PAREDE CELULAR.....	14
GALACTOMANANOS.....	14
CONTROLE DA MOBILIZAÇÃO DE GALACTOMANANO DURANTE A GERMINAÇÃO.....	16
OBJETIVOS.....	23
TRABALHO CIENTÍFICO.....	24
Abstract.....	26
Introduction.....	27
Material and methods.....	28
Results and discussion.....	31
References.....	37
Figures.....	41
Legend to the figures.....	48
CONCLUSÕES.....	50
SUMMARY.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

RESUMO

Galactomananos são polissacarídeos de reserva da parede celular, compostos por uma cadeia principal de manoses β -(1 $\rightarrow$ 4), com ramificações simples de galactose, ligadas α -(1 $\rightarrow$ 6) à cadeia principal. São compostos típicos de sementes em espécies da família Leguminosae e os estudos feitos até o momento indicam que este seja uma molécula bifuncional, exercendo um papel no controle da embebição no início da germinação e posteriormente servindo como reserva de carbono para o crescimento inicial da plântula. As sementes de *Sesbania marginata* (Leguminosae-Faboideae) acumulam galactomanano no endosperma (21% da massa de matéria seca da semente), o qual é completamente degradado após a germinação, por ação de três enzimas: α -galactosidase, endo- β -mananase, e exo- β -mananase (ou β -manosidase). Os produtos da degradação são transferidos para os cotilédones e eixo embrionário em crescimento, acumulando amido, que é posteriormente degradado ao longo do crescimento da plântula. No presente trabalho foi verificado que o ácido abscísico (ABA 10^{-4} M) é capaz de retardar a germinação das sementes de *S. marginata* e inibir significativamente o crescimento do embrião. O acompanhamento das variações das massas fresca e seca mostrou que o ABA tem um efeito transitório na massa seca, apresentando um efeito drástico no ganho de massa fresca, sugerindo que sua ação seja na absorção de água pelo embrião em crescimento. Um efeito parcial do ABA foi verificado sobre a degradação do galactomanano, sendo este efeito também caracterizado pela inibição do aumento na atividade de uma das enzimas de degradação, a α -galactosidase. Em experimentos em que o ABA foi aplicado antes e/ou depois da protrusão da radícula (que sinaliza o início da degradação do galactomanano) foi verificado que o hormônio tem efeito sobre a degradação do galactomanano principalmente quando aplicado antes da protrusão da radícula ou durante as 144h do experimento e menor quando aplicado depois da protrusão da radícula. Os efeitos sobre a massa fresca do embrião foram idênticos em intensidade aos observados para o endosperma. No entanto, não houve efeito sobre a massa seca do embrião. Quando endosperma e embrião foram isolados e tratados de forma similar, observou-se efeito do ABA sobre a degradação do galactomanano nas condições experimentais, mas sobre massa fresca do embrião o efeito só foi verificado quando o ABA foi mantido durante 144h e não houve qualquer efeito sobre a massa seca. Como ocorreu uma grande diferença em massa do embrião, quando o endosperma foi retirado, conclui-se que o galactomanano funciona mais como uma reserva de água que de carbono para o embrião e que o efeito do ABA parece ser principalmente na degradação do galactomanano, com consequências para o embrião. Assim, o ABA atua mais como um modulador que como inibidor do processo de degradação de reservas e seu aproveitamento pelo embrião em crescimento.

INTRODUÇÃO

SEMENTES

As sementes surgiram ao longo da evolução como uma estratégia de perpetuação de novos indivíduos. Sua forma e composição química variam em diferentes espécies, de acordo com a estratégia de perpetuação e com o estabelecimento da plântula. Estas variações podem estar, por exemplo, na resistência e permeabilidade da testa, na quantidade, no tipo e na localização do material de reserva, assim como no grau de desenvolvimento do embrião (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975).

A semente, contendo o embrião como uma nova planta em miniatura, está estrutural e fisiologicamente equipada para desempenhar o seu papel como uma unidade de dispersão e provida com reserva alimentar para sustentar o crescimento da plântula até que esta se estabeleça como um organismo autotrófico (Bewley, 1997). Sob condições satisfatórias de temperatura, umidade, luz e gases, a semente reiniciará seu metabolismo e o embrião irá se desenvolver a uma velocidade diretamente dependente destas interações com suas estruturas acessórias (endosperma, cotilédones, casca, etc). Uma semente durante a germinação está mais suscetível e exigente em seu microambiente que uma planta adulta. Para um ciclo de vida se completar, a semente deve apresentar adaptações que a capacitem evitar quaisquer condições adversas e dar suporte para que o embrião possa se desenvolver em uma planta adulta bem estabelecida em relação ao meio ambiente e suas variáveis.

GERMINAÇÃO

Por definição a germinação incorpora aqueles eventos que começam com a tomada de água pela semente quiescente e termina com alongamento do eixo embrionário (Bewley & Black, 1994). O sinal visível de que a germinação está completa é a protrusão da radícula nas estruturas que circundam o embrião. Eventos subsequentes, incluindo a mobilização das reservas estocadas, estão associados com o crescimento da plântula.

Embebição

A absorção de água pela maioria das sementes quiescentes maduras é trifásica. A fase I começa com uma rápida tomada inicial e compreende um processo físico onde estão atuando as forças matriciais, conferidas pelas paredes celulares e pelos conteúdos celulares das sementes, entre os quais figuram principalmente os componentes de reserva. Sendo assim, esta fase independe da semente estar viva. Em seguida ocorre um período de latência, que corresponde à fase II, durante a qual ocorrem diversos processos metabólicos. A fase III corresponde ao alongamento do eixo embrionário que se inicia logo após a protrusão da radícula com um novo processo de embebição.

A entrada de água durante a embebição é suficiente para a retomada das atividades metabólicas. A renovação ou substituição de componentes ocorre após muitas horas, quando o estado metabólico está totalmente ativado. É comumente assumido que as enzimas responsáveis pela retomada inicial da atividade metabólica estejam presentes dentro da semente, tendo sobrevivido, pelo menos parcialmente, à fase de dessecação que termina na maturação da semente (Bewley, 1997).

Assim, uma das primeiras mudanças após a embebição é a retomada da atividade respiratória, a qual pode ser detectada dentro de minutos. Após a etapa inicial de aumento no consumo de oxigênio, a taxa declina até a radícula atravessar as estruturas da testa (Botha *et al*, 1992; Bewley & Black, 1994). Neste

sentido, a ativação das enzimas do ciclo de Krebs e das proteínas da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, resultam em um aumento da produção de ATP.

Extensão da radícula

A extensão da radícula, atravessando a testa, marca o fim da germinação e o início do crescimento da plântula. Este é um processo que envolve a turgescência celular e requer a produção de paredes celulares nas células do eixo da radícula (Cosgrove, 1997). Acredita-se que há três possibilidades para o início do crescimento da radícula. A primeira é que, durante a germinação, o potencial osmótico das células da radícula fica mais negativo por causa do acúmulo de substâncias osmoticamente ativas, como um resultado da hidrólise de reservas presentes dentro de suas células. A diminuição do potencial osmótico pode aumentar a absorção e o aumento de turgor resultante pode dirigir a expansão celular (Welbaum & Bradford, 1990; Bradford, 1995).

A segunda possibilidade é que a extensibilidade das paredes das células da radícula permite seu alongamento. Entretanto, os mecanismos pelos quais a radícula começa a ficar mais extensível diferem daqueles de outros tecidos e são ainda desconhecidos. O afrouxamento da parede celular possivelmente resultaria da quebra e união de moléculas de xiloglucano, adjacentes às microfibrilas de celulose, as quais poderiam permitir a expansão pela separação das microfibrilas (Wu *et al.*, 1994).

A terceira possibilidade é que os tecidos da semente que circundam a radícula facilitem o alongamento da mesma. Como o crescimento da radícula é axial, o potencial de turgor é suficiente para dirigir seu alongamento em sementes cujas células não estão fisicamente constritas pelas estruturas circundantes. É o que acontece, por exemplo, em sementes de uva, onde o rompimento da testa durante a embebição se dá apenas pela rigidez das paredes celulares da radícula (Schopfer & Placy, 1985). A produção de novas paredes celulares durante os

estágios iniciais do alongamento da radícula diminui o potencial de turgor da célula. No entanto, em outras sementes, o potencial de turgor isoladamente é insuficiente para dirigir a extensão da parede e há uma forte constrição do crescimento das células da radícula pelas estruturas circundantes.

Em alface, tabaco e tomate, o endosperma é uma estrutura constritora; já em melão é o perisperma. A redução da resistência destas estruturas é necessária para a germinação ser completada. Resultados obtidos por diferentes autores têm mostrado um declínio na resistência mecânica de estruturas que cobrem a ponta da raiz do embrião durante a emergência da radícula no endosperma de sementes de pepino (Watkins & Cantliffe, 1983) e no perisperma de sementes de melão (Welbaum *et al.*, 1995). Esta queda de resistência deve-se à ação das hidrolases de parede celular, como as hemicelulases, produzidas no próprio endosperma.

Na germinação de cultivares selvagens de tomate, a diminuição da força de perfuração requerida pela radícula para penetrar na parede celular rica em mananos tem sido atribuída à endo- β -mananase, uma enzima produzida dentro do endosperma durante a emergência da radícula (Groot *et al.*, 1988). A enzima é sintetizada primeiramente na região micropilar e mais tarde, após a germinação, no resto do endosperma. Cada região produz diferentes isoformas (Nonogaki & Morohashi, 1996; Toorop *et al.* 1996; Voigt & Bewley, 1996). Assim, num mesmo tecido, devem haver isoformas da enzima relacionadas com a germinação e outras isoformas associadas com a mobilização das reservas da parede celular após a germinação.

COMPONENTES DE RESERVA

Além dos constituintes químicos normalmente encontrados em tecidos de plantas, as sementes contêm outras substâncias como carboidratos, proteínas e lipídeos que são estocadas para suportar os primeiros estágios do desenvolvimento da plântula. Antes do estabelecimento da atividade fotossintética, o embrião em desenvolvimento é completamente dependente das reservas contidas no endosperma ou nos cotilédones.

Embora muitos tecidos de sementes tais como o perisperma e o eixo embrionário possam ser adaptados como tecido de reserva, o endosperma (tecido extra-embrionário) e o cotilédone (parte do embrião) são os principais órgãos que exercem esta função em sementes de Angiospermas. (Bryant, 1985; Bewley & Black, 1994; Mayer, 1989 citado por Buckeridge & Reid, 1996). Em fenogrego (*Trigonella foenum-graecum*), por exemplo, o endosperma é uma fonte de reserva de carboidratos (galactomananos) mas os cotilédones contêm proteínas e lipídeos. Alguns endospermas contêm principalmente lipídeos e proteínas como reserva mas a maioria tem se especializado em armazenar carboidratos.

Carboidratos

Em alguns grupos vegetais os carboidratos compreendem a maior reserva estocada em sementes. Eles estão divididos em três classes: sacarose e seus derivados, amido e os polissacarídeos de reserva de parede celular (Halmer, 1985).

A sacarose é o dissacarídeo mais abundante no reino vegetal (Dey, 1980; Avigad, 1982). É o principal produto da fotossíntese e a forma pela qual o carbono é translocado em plantas, sendo também o açúcar predominantemente utilizado como reserva. Além disso, este dissacarídeo é precursor da síntese de oligo e polissacarídeos mais complexos, como os oligossacarídeos da série rafínosica que ocorrem tanto no endosperma como no embrião de leguminosas e são degradados durante a germinação (Reid, 1971; Buckeridge *et al.*, 1995^a, Buckeridge & Dietrich, 1996).

O amido está presente em sementes maduras e localizado em órgãos de reserva especializados, como o endosperma de cereais e cotilédones de leguminosas. Sua utilização promove uma fonte de açúcares utilizados pelo embrião nos primeiros estágios do desenvolvimento (Bewley & Black, 1992).

POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE PAREDE CELULAR

Em sementes de Leguminosae, entre as principais reservas estão os polissacarídeos de parede celular, que são utilizados no período de estabelecimento da plântula (Reid, 1985).

Há três grupos principais de polissacarídeos de reserva de parede celular: os arabinogalactanos, os xiloglucanos e os mananos, estes últimos sendo compostos de mananos puros e galactomananos.

Os arabinogalactanos são compostos de resíduos de galactose e arabinose com quantidades menores de ácido galacturônico. Uma espécie bem estudada e que armazena arabinogalactano em seus cotilédones é *Lupinus angustifolius* (Buckeridge & Reid, 1996).

Os xiloglucanos possuem uma cadeia principal do tipo celulósica com glucoses β -(1 $\rightarrow$ 4), a qual é ramificada por unidades de α -xilose que ainda podem ser ramificados por resíduos de β -galactose. Dentre as espécies que acumulam xiloglucano podemos citar *Tropaeolum majus*, *Tamarindus indica* e *Copaifera langsdorffii* (Buckeridge *et al.*, 1992).

Os mananos são polissacarídeos baseados numa cadeia principal de resíduos de manose β -(1 $\rightarrow$ 4) ligados, onde algumas moléculas podem ser substituídas por resíduos de glucose e galactose. Existem mananos puros, cristalinos, encontrados em Palmae (Bewley & Reid, 1985) e os galactomananos com numerosas substituições de galactose, encontrados em sementes de fenogrego, carob e guar.

GALACTOMANANOS

Os galactomananos são polissacarídeos de reserva característicos de sementes endospermicas pertencentes à família Leguminosae e são classificados como gomas originárias de sementes. São solúveis em água e formam dispersões viscosas e estáveis (Neukom, 1989).

Sua estrutura básica é constituída de uma cadeia principal formada por resíduos de D-manose unidos entre si por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4). Ao esqueleto principal, unem-se resíduos de D-galactose, através de ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) formando ramificações simples (Moe *et al.*, 1947; Unrau, 1961; Somme, 1968; Manzi & Cerezo, 1984). São macromoléculas com múltiplas funções. No início da germinação, o polímero auxilia na embebição de água e subsequentemente protege o embrião em crescimento contra períodos de estresse hídrico, funcionando assim como um “tampão” de água. Isto ocorre através das ramificações altamente hidrofílicas que levam à absorção de altas quantidades de água na estrutura que envolve o embrião. Após a germinação o galactomanano é mobilizado, servindo como substrato de reserva durante o desenvolvimento da plântula (Reid, 1985).

Sementes de leguminosas contendo galactomananos variam em muitos detalhes importantes, como a presença ou ausência da camada de aleurona, de células endospermicas vivas ou não e dos mecanismos de degradação do galactomanano. Tais características podem ser usadas como ferramentas para a compreensão da taxonomia e evolução das leguminosas bem como dos mecanismos adaptativos de algumas espécies de leguminosas ao ambiente (Buckeridge *et al.* 1995^a).

Em leguminosas a razão manose:galactose, ou seja, a distribuição de resíduos de galactose ao longo da cadeia principal de mananos, varia de espécie para espécie. Neste sentido, as três subfamílias de leguminosas (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae) podem ser razoavelmente distinguidas pela razão manose:galactose de seu galactomanano. Em espécies consideradas mais primitivas (Leguminosae-Caesalpinioideae) a razão varia de 3 a 5,1:1 enquanto que em espécies consideradas mais recentes (Leguminosae-Faboideae) a razão média é de 1,1:1 (Davis *et al.*, 1994). Buckeridge *et al.* 1995^b examinaram diversas espécies de Mimosoideae e verificaram que as razões manose:galactose estavam em torno de 2:1, ou seja, intermediárias entre as outras duas subfamílias, que representam os extremos evolutivos da família Leguminosae.

Em sementes de *Trigonella foenum-graecum* (fenogrego) verificou-se que os galactomananos se formam nos vacúolos citoplasmáticos e durante a maturação são depositados até o preenchimento total das paredes celulares do endosperma. Após a germinação das sementes, estes desaparecem completamente e paralelamente ocorre aumento de amido nos cotilédones (Nadelman, 1890 citado por Reid, 1985). A mobilização do endosperma se dá inicialmente na região próxima à casca, junto à camada de aleurona, dirigindo-se posteriormente à região do embrião (Reid, 1971).

A degradação desse polímero vem sendo abordada dos pontos de vista morfológico, fisiológico e bioquímico. Reid (1985) apontou a camada de aleurona como a provável responsável pela produção das enzimas hidrolíticas capazes de digerir o galactomanano presente no endosperma.

CONTROLE DA MOBILIZAÇÃO DE GALACTOMANANO DURANTE A GERMINAÇÃO

A mobilização do galactomanano em sementes de leguminosas endospérmicas é bem conhecida para algumas espécies (Reid 1985, Buckeridge & Reid, 1996). Ela é mediada por três enzimas hidrolíticas: α -galactosidase, endo- β -mananase e β -manosidase. Em fenogrego, as duas primeiras são produzidas pela camada de aleurona do endosperma e secretadas no tecido de reserva, contendo galactomanano. A presença destas três enzimas parece ser uma característica geral em sementes de leguminosas endospérmicas, as quais contêm galactomanano. Estas enzimas agem em conjunto, promovendo a degradação completa do galactomanano (Reid & Meier 1972, McCleary 1983, Buckeridge *et al.* 1995^a, Buckeridge & Dietrich 1996).

No entanto, a regulação da mobilização do galactomanano não é tão conhecida. Um dos modelos bem estudados é o de *Trigonella foenum-graecum* (fenogrego). O controle da hidrólise do galactomanano no endosperma pelo

embrião foi primeiramente demonstrado em fenogrego por Spyropoulos e Reid em 1985. Nestas sementes a hidrólise do galactomanano é evidenciada pela diminuição do peso seco do endosperma (mais casca) e aumento na atividade da α -galactosidase em homogenatos do endosperma. Estes autores constataram início de atividade da α -galactosidase ao redor de 20 horas após embebição, sendo que esta atividade atingiu seu máximo em 48 horas. Neste tempo, a massa seca do endosperma mais casca já havia diminuído, tornando-se constante. Esses autores relataram que endospermas isolados após 5 horas de embebição mostravam uma acentuada inibição da degradação do galactomanano, sendo que, quanto menor o volume do líquido de embebição, maior seria a inibição. Quando os endospermas foram lavados em água por 2 horas, o efeito foi eliminado e pôde ser revertido, incubando-se os endospermas lavados, no líquido de lavagem. Quando os endospermas foram isolados após o início da degradação do galactomanano (25 horas após o início da embebição), não houve mais inibição. Todos estes resultados levaram os autores a concluir que: 1) deve haver um inibidor da degradação do galactomanano do endosperma logo após a embebição; 2) que este inibidor provavelmente age na síntese de enzimas na camada de aleurona; 3) que este é lixiviado do endosperma recém-embebido e que 25 horas após a embebição o inibidor não mais está presente ou é inefetivo.

Em sementes de *S. marginata*, foi detectada a presença, além do galactomanano, de carboidratos da série rafínósica, tanto no endosperma como no embrião. A degradação completa desses açúcares ocorreu por volta do 3º dia de embebição e foi sugerido que estejam relacionados ao processo de germinação. O galactomanano, presente no endosperma, é completamente degradado a partir do 3º dia de embebição (quando 100% das sementes estão germinadas), fornecendo manose e galactose livres que são utilizadas pelo embrião como fonte energética para o crescimento (Buckeridge & Dietrich, 1996). Em fenogrego, o embrião é responsável pela remoção dos produtos finais da quebra do galactomanano no endosperma, ou seja, galactose e manose (Zambou & Spyropoulos, 1990).

O aumento da atividade hidrolítica total corresponde ao período em que houve diminuição no conteúdo de galactomanano das sementes de *S. marginata*, uma vez que as variações da massa seca do endosperma correspondem principalmente às variações no conteúdo de galactomananos.

Os mecanismos que controlam a atividade dessas enzimas hidrolíticas são desconhecidos e constituem, provavelmente, o principal modo de controle do processo de degradação dos galactomananos de parede celular (Spyropoulos & Reid, 1985).

Zambou *et. al.* (1993) apontaram as saponinas como possíveis candidatas a ocuparem o papel de inibidor da degradação do galactomanano em sementes de *Trigonella foenum-graecum* L.

Há também indicações de que o ácido abscísico (ABA) pode estar envolvido na degradação de materiais de reserva durante a germinação de sementes, atuando através da inibição da síntese de enzimas relacionadas a este processo, tais como α -amilase em cereais (Higgins *et al.* 1982; Oishi & Bewley 1990; Black, 1991) e mananase em sementes de *Trigonella foenum-graecum* L. (Malek & Bewley, 1991). Quando aplicado externamente inibe a quebra do galactomanano em endospermas de *Trigonella foenum-graecum* (Reid & Meier 1973). Le Page-Degivry & Garelo (1973) detectou o ABA endógeno sendo lixiviado para fora (710 μ g/semente) no meio de incubação antes da germinação ocorrer em *Taxus baccata* e demonstraram que a aplicação exógena inibia o crescimento do embrião.

Assim, desde cedo tem-se notado o efeito ABA em vários processos. Hoje está claro que sementes em desenvolvimento raramente germinam e quando a germinação precoce ocorre, esta é associada às deficiências na síntese ou na sensibilidade ao ácido abscísico (Black, 1991; Hilhost, 1995; Karssen, 1995). O acúmulo de ABA em sementes em desenvolvimento é baixo durante os primeiros estágios, maior no meio do desenvolvimento, quando as reservas estocadas estão sendo sintetizadas, e declina quando a semente termina a maturação.

Halmer & Bewley (1979), trabalhando com sementes de alface, demonstrou a existência de um inibidor que deveria ser lixiviado para fora do endosperma

antes que a produção de mananase pudesse ocorrer. Quando endospermas isolados eram incubados num pequeno volume de água, a produção da enzima não foi detectada, e, após várias lavagens seguidas, a produção foi liberada. Esse líquido de lavagem aplicado em outros endospermas, ainda que incubados num grande volume, inibiam a produção da enzima. No mesmo trabalho, ele aplicou o ABA exógeno (10^{-4}M) e demonstrou resultados semelhantes ao observado com o inibidor presente no líquido de lavagem.

Dulson *et al.* (1988), também trabalhando com alface, obtiveram os mesmos resultados, mostrando a presença do inibidor e sua semelhança no modo de ação com o ABA. Esses autores acrescentaram dados relevantes, detectando a presença deste hormônio no meio de incubação dos endospermas, possivelmente o ABA endógeno que foi lixiviado. Os autores também observaram que o efeito inibitório ocorreu antes da germinação, uma vez que eles não detectaram o ABA no meio de incubação, no caso de sementes intactas que germinaram.

Outro modelo bem estudado é o tomate. O ácido abscísico inibiu a germinação de sementes de tomate e o ácido giberelico (GA_3) promoveu (Groot & Karssen 1992, Ni & Bradford 1993). Em sementes de tomate, o embrião está embebido num endosperma rígido. Neste tipo de semente, a porção micropilar do endosperma, a qual circunda a ponta da radícula, apresenta uma barreira mecânica para a protrusão desta, exercendo um efeito inibitório sobre a germinação. Groot & Karssen (1987) demonstraram que o enfraquecimento do endosperma facilitou a germinação em sementes de tomate. Como a parede celular do endosperma de tomate é rica em galactomanano, seu enfraquecimento se dá pela ação de enzimas que o hidrolisam. Groot *et al.* (1988) detectaram a atividade destas enzimas um dia antes da germinação, e esta atividade esteve concentrada exclusivamente na porção do endosperma próxima ao local de emergência da radícula. O ABA 10^{-4}M não só inibiu a germinação mas também o desenvolvimento da atividade da enzima.

A resistência mecânica não é o único fator que afeta a germinação da semente. O potencial de crescimento do embrião (radícula) é outro fator. Em

sementes de alface o aumento do potencial de crescimento do embrião, resultante do acúmulo de solutos ou de um aumento da extensibilidade da parede (Carpita *et al.* 1979), é o principal fator na germinação. Há um balanço na resistência mecânica do endosperma e o potencial de crescimento do embrião. No trabalho de Groot *et al.* (1988) comentado acima, o ABA também diminui o potencial de crescimento do embrião e apesar da diminuição não ser considerada suficiente para evitar a protrusão da radícula, a remoção da resistência mecânica do endosperma nas sementes tratadas com o ABA evitou o alongamento do eixo embrionário.

Hilhorst & Downie (1996), trabalhando com mutantes de tomate deficientes em ABA, demonstraram a capacidade deste hormônio de prevenir a germinação. Estes autores notaram uma característica secundária interessante: mutantes deficientes em ABA apresentavam uma testa mais fina, sendo que isto contribuía para a germinação mais rápida nas sementes deficientes.

A degradação e o enfraquecimento do endosperma adjacente à ponta da radícula precedem a protrusão da radícula em sementes de pimenta (*Capsicum annum* L.) (Watkins *et al.* 1985), em espécies de *Datura* (Sánchez *et al.* 1990), melão (Welbaum *et al.* 1995), mutantes deficientes em ABA de tomate (Groot *et al.* 1988) e tabaco (Leubner-Metzger *et al.* 1995, 1996).

O desenvolvimento da atividade da endo-mananase, em tomate, foi localizado no endosperma antes da emergência da radícula e a atividade desta enzima foi inibida por ABA, prevenindo a germinação (Nomaguchi *et al.* 1995, Leviatov *et al.*, 1995, Nonogaki & Morohashi, 1996.)

Dahal *et al.* (1997) obtiveram os mesmos resultados e ainda puderam complementar, demonstrando que a atividade de endo- β -D-mananase, localizada no endosperma (próximo a ponta da radícula) aumenta paralelamente com a porcentagem de germinação. Entretanto, quando sementes de tomate incubadas em ABA são transferidas para água, a atividade da mananase permanece muito baixa, mas a germinação ocorre rapidamente. Segundo Dahal *et al.* (1997), o ABA pode prevenir o enfraquecimento do endosperma, na ausência do embrião, mas não inibe diretamente o acúmulo inicial de mananase. A emergência da radícula

pode ocorrer sem que ocorra um novo aumento na atividade de mananase. É possível que a ação dessa enzima seja requerida somente por um período inicial e outros fatores então começam a limitar a germinação, como o potencial de crescimento do embrião (Toorop *et al.* 1996, Still & Bradford, 1997).

A ausência de ABA durante o desenvolvimento de sementes de tomate altera as relações hídricas da semente, contribuindo assim para a prevenção da germinação precoce (Liu *et al.* 1997).

Alguns trabalhos divergem quanto ao efeito do ABA na mobilização das reservas. Sementes de grão de bico (*Cicer arietinum*) contêm alto nível de ABA e o pico coincide com o aumento do peso fresco e alongamento do eixo embrionário (Iglesias & Balbiano, 1997). Este trabalho confirma a hipótese de Berry & Bewley (1991) de que o potencial osmótico, entre o endosperma e o embrião, é muito mais importante na regulação da germinação do que o ABA. Resultados semelhantes com cevada e arroz foram obtidos respectivamente por Yamada (1984) e Qin (1990). Em grão de bico a diminuição de ABA ocorre após a etapa de germinação e um aumento tardio coincide justamente com o alongamento do eixo embrionário.

Giorgini & Comoli (1996) demonstraram que a mobilização de galactomanano na semente de *Coffea arabica* é um fenômeno essencialmente pós-germinativo que pode estar sob o estrito controle do embrião. A endo- β -mananase só é detectada após a emergência da radícula, aumentando da extremidade micropilar para a extremidade oposta da semente correlacionada com o crescimento dos cotilédones. Endospermas isolados não apresentam atividade da enzima mostrando que o seu controle é feito pelo eixo embrionário. O ABA inibe completamente a atividade da enzima e o crescimento do embrião.

Visser *et al.* (1996) mostraram que a germinação de grãos de cevada requer um aumento na capacidade do ABA de se difundir para fora do embrião, uma redução na sensibilidade do embrião e/ou inibição da síntese de ABA *de novo* e ainda um aumento na habilidade de degradar o ABA extracelular. Neste trabalho, a redução do nível do hormônio, no embrião, foi acompanhada pelo aumento deste no meio de incubação. Esse alto nível no meio de incubação cai

rapidamente (enquanto que o nível no embrião permanece baixo) num período que corresponde aos primeiros estágios de germinação. Isto sugere que a ação inibitória ocorre fora do embrião, sendo que, um sítio de percepção do ABA pode estar localizado na superfície da célula.

A inibição por ácido abscísico é gradual, dependente da dose e não desaparece após a germinação, prevenindo a degradação das proteínas de reserva em *Arabidopsis thaliana*. Ele causa apreciáveis alterações no metabolismo energético do nitrogênio e também parece que inibe a germinação, restringindo a disponibilidade de energia e metabólitos. A adição de açúcares ou aminoácidos no meio de incubação libera a germinação, independente das concentrações inibitórias deste hormônio (Garcarrubio *et al.* 1997).

Assim, a influência do ABA sobre o ciclo de vida típico de uma planta superior pode ser crítica, começando a atuar durante o desenvolvimento da semente, quando os níveis aumentam acentuadamente. Este aumento seria parte do sinal que desencadearia uma cascata de eventos regulatórios, aos quais estariam ligados os diversos tipos de respostas, de acordo com os sinais do meio ambiente, para promover a sobrevivência da planta, desde a maturação da semente, aquisição de tolerância a dessecação, prevenção da germinação precoce até a mobilização das reservas. Parece que as características não só ambientais mas também as morfológicas da semente, adaptada ao seu ambiente, estariam contribuindo para diferentes estratégias de adaptação das plantas aos seus respectivos ambientes.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do ácido abscísico no metabolismo degradativo do galactomanano de sementes de *Sesbania marginata* e avaliar as consequências deste sobre o desenvolvimento inicial das plântulas.

TRABALHO CIENTÍFICO

**EFFECT OF ABSCISIC ACID ON THE
MOBILISATION OF GALACTOMANNAN AND
EMBRYO DEVELOPMENT OF *SESBANIA*
*MARGINATA***

Adriana Potomati^{1,2} & Marcos S. Buckeridge^{1*}

¹Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, Cx Postal
4005, CEP 01061-970, São Paulo, SP, Brazil

²MSc student at State University of Campinas, Dept of Cell Biology

* e-mail msbuck@usp.br phone 55 11 55846300 ext 287, to whom correspondence
should be addressed

Abstract

Galactomannans are storage cell wall polysaccharides found in endospermic seeds of legumes. They are thought to be storage polymers, since it has been observed for a few species (among them *Sesbania marginata*) that it is completely broken down after germination and its products are transferred to the growing embryo. We examined the effect of 10^{-4} M abscisic acid (ABA) on the degradation of galactomannan in isolated endosperms and intact seeds of *S. marginata*. We found that after seed germination the initial embryo growth was retarded. Ultrastructural analysis showed that the embryo is completely surrounded by an endosperm which displays very thick galactomannan containing cell walls. Although an inhibitory effect has been observed on the increase of fresh mass of the embryo, the effect of ABA on the dry mass was weaker and transitory (from 48 to 96h). Endosperm dry mass and galactomannan degradation were significantly inhibited and the activity of α -galactosidase was strongly affected. The addition of ABA before and/or after the start of mobilisation in intact seeds or isolated endosperms, showed that whereas addition before mobilisation did not affect dry mass decrease in intact seeds, it was strongly affected in isolated endosperms. On the other hand, whereas it affected embryo fresh mass increase in intact seeds, but not in isolated embryos, no significant effect was observed on dry mass. This results suggest that ABA affects galactomannan degradation and by doing so, prevents water absorption by the embryo, rather than affect its dry mass. As ABA has been detected in the endosperm of seeds of *S. marginata*, it is proposed that it probably acts as a modulator of galactomannan mobilisation and consequently synchronises it with early growth of the embryo.

Introduction

The seeds of lettuce, tomato and many legumes are known to accumulate galactomannan or galactoglucomannan in their endospermic cell walls (Halmer & Bewley, 1979; Buckeridge *et al.*, 2000). These polymers are broken down after germination, producing free galactose and mannose which serve as a source of carbon and energy for the growing seedling (Reid, 1971; McCleary & Matheson, 1974; Buckeridge & Dietrich, 1996). Galactomannan has therefore been considered as a storage polysaccharide (Reid, 1985). However, galactomannan has also been demonstrated to perform other functions, such as weakening of the endosperm of tomato seeds to facilitate radicle protrusion (Groot & Karsen, 1987) and to control water imbibition in seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*)(Reid & Bewley, 1979).

Groot & Karssen (1987) demonstrated that gibberellin regulates seed germination through the induction of endosperm weakening in tomato and Spyropoulos & Reid (1985) suggested that the endosperm of legumes might be under control of auxin and gibberellin.

When isolated and incubated in relatively small volumes of water, the endosperms of lettuce (Dulson *et al.*, 1988) and fenugreek (Spyropoulus & Reid, 1988) were not capable of completing galactomannan degradation. However they did so when incubated in larger volumes. On this basis, these authors proposed the existence of a water soluble inhibitor(s) which is somehow inactivated (or

degraded) during germination and consequently releases storage cell wall mobilisation.

Galactomannan mobilisation is inhibited by abscisic acid (ABA) in seeds of lettuce (Halmer & Bewley, 1979), tomato (Groot & Karssen, 1992) and fenugreek (Kontos & Spyropoulos, 1995). In these studies, exogenously applied ABA has been demonstrated to interfere with the activity of galactomannan-hydrolysing enzymes. Dulson *et al.* (1988) detected the presence of endogenous ABA in seeds of lettuce and proposed that it plays a role in the regulation of endo- β -mannanase production in isolated lettuce endosperms.

Recently, galactomannan mobilisation in endosperms of *Sesbania marginata*, a tropical legume, was followed during and after germination, the enzymes α -galactosidase, endo- β -mannanase and exo-mannanase being the principal enzymes involved (Buckeridge & Dietrich, 1996). In the present work we studied the effect of exogenously applied ABA on isolated endosperm and intact seeds of *Sesbania marginata*.

Material & methods

Material - Seeds of *Sesbania marginata* Benth. were obtained from plants cultivated under natural conditions in the gardens of the Instituto de Botânica in São Paulo, Brazil.

Scanning electron microscopy (SEM) - For the examination of ultrastructural characteristics of seeds of *Sesbania marginata*, pieces of quiescent seeds were mounted on stubs and subsequently coated with gold (Baltec SCD 050 coater), examined and photographed in a Philips Scanning Electron Microscope XL20 at an accelerating voltage of 10 kV.

Light microscopy – For light microscopy observations, seeds of *Sesbania marginata* were soaked in distilled water for 24h at room temperature and transversally cut into 10 µm-thick slices using a cryostat microtome. Sections were placed on glass slides and covered with 0.1% methylene blue and incubated for 1 min at 60° C. The excess of methylene blue was taken out by blotting the slide on Whatman no. 3 paper. The sections were observed and photographed directly using a camera attached-microscope (Carl Zeiss-Jena).

Seed germination and sampling - Seeds of *Sesbania marginata* were scarified, one by one, by abrading the seed coat in the region below the lens with sandpaper. They were sterilised with sodium hypochlorite (0.75% active chlorine) for 15min and washed with sterile distilled water. They were then placed in 9 cm diameter Petri dishes (30 seeds/plate) under continuous light .

Seeds were incubated at 30°C in 16ml of water or abscisic acid (10^{-4} M ABA) for 17h, when complete imbibition was observed. Five samples of 16 seeds were harvested daily and immediately dissected in order to separate the endosperm plus seed coat from the embryo (cotyledons plus embryonic axis). Another five samples were maintained intact during the entire experimental period (144h) and then

dissected. After recording the fresh mass of separate seed parts of each sample, they were dried at 80°C. When constant weight was attained (after approximately 48h) the dry mass was recorded. As it has been calculated that 50% of dry mass of the endosperm plus seed coat corresponds to galactomannan (Buckeridge & Dietrich 1996), the loss of half of the dry mass of endosperm was considered as 100% of degradation.

Using the general procedure described above, several parameters were evaluated every 24h in the following way: (W) seeds maintained in water from 0 to 144h; (W/A) seeds maintained in water from 0 to 17h and transferred to 10^{-4} M ABA until 144h; (A/W) seeds maintained 10^{-4} M ABA from 0 to 17h and transferred to water until 144h; (A) seeds maintained in 10^{-4} M ABA from 0 to 144h.

Galactomannan extraction - Galactomannan was extracted from powdered endosperm plus seed coat with hot water (80°C) for 8h. After filtration through cheesecloth, centrifugation was performed (10,000g, 30min. 5°C) followed by precipitation with 3 volumes of ethanol. The precipitate was left overnight at 5°C, collected by centrifugation, dried and weighed. This crude polysaccharide was considered as the galactomannan which was quantified gravimetrically (modified from Anderson, 1949).

Extraction and detection of α -galactosidase - The time course of α -galactosidase activity in endosperm of *S. marginata* was determined by placing seeds to germinate under the same conditions as above, separating daily the endosperm plus seed coat from the embryo up to the 6th day followed by extraction and assay

of crude preparations for α -galactosidase as described below.

The samples were crushed with 20mM sodium acetate buffer pH 5.0 at 5°C and centrifuged (10,000g, 30min., 5°C). Aliquots of the supernatant were assayed for α -galactosidase activity using a 50mM solution of p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (Sigma Chem.Co., St Louis, USA) as substrate. The reaction was stopped by addition of 0.1N Na₂CO₃ and the absorbance determined at 405nm (Reid & Meier, 1973).

Results & discussion

Effect of ABA on seed germination. Absciscic acid at 10⁻⁴M strongly retarded germination of seeds of *Sesbania marginata*. After 24h, ABA apparently inhibited germination completely, but these seeds reached 100% germination after 96h (**Figure 1A**). This behaviour characterised a retardation rather than complete inhibition process, suggesting that seeds of *S. marginata* are somehow able to metabolise exogenously applied ABA. On the other hand, when seedling growth was evaluated by measurement of radicle length, a significant inhibition was observed (**Figure 1B**) even after 96h. As this is a more accurate form of evaluation of the effect of ABA on early growth than radicle protrusion alone, it can be concluded that ABA has a permanent (rather than retardation only) effect on seedling growth.

Morphology of seeds of S. marginata. As a typical legume seed from the subfamily Faboideae, *S. marginata* possesses an endosperm which completely

surrounds the embryo (**Figure 2A**, see also Buckeridge and Dietrich, 1996). Under larger magnification (**Figure 2B**), it can be seen that the seed coat presents a palisade layer as well as a parenchyma layer. Furthermore, between seed coat and endosperm, an aleurone layer is present (**Figure 2D** black arrow), which is assumed, by comparison with Reid (1971), to produce the enzymes responsible for galactomannan degradation. Large amounts of galactomannan were shown to be present in endosperm cell walls by Buckeridge and Dietrich (1996) and this can also be noted in **Figure 2C and 2D**.

Reid and Bewley (1979) observed that the endosperm of seeds *Trigonella foenum-graecum* imbibes most of the water (ca 60%) taken by the seed. On the basis of some hydrodynamic properties of galactomannan such as high viscosity and also the fact that it binds water strongly, those authors proposed that the endosperm would play a role as a “water buffer” following germination. Thus, as water enters the endosperm and it becomes completely imbibed, any change in environmental conditions which is capable of decreasing water availability, would induce water loss firstly from the endosperm and only later on from the embryo.

Besides protection against water loss, it is possible that the presence of galactomannan in the endosperm might play a role in synchronising metabolic events in course in the endosperm and embryo following germination. Taking this into consideration, along with the facts that *i*) ABA is present in the endosperm of seeds of *S. marginata* (H.Mercier and M.S.Buckeridge, unpublished results) and *ii*) that it has an effect on germination and growth of the seed and seedling of this species respectively; we examined the effect of the hormone on different seed parts with the aim of understanding the physiological importance of ABA for

synchronisation of storage cell wall mobilisation and seedling growth in *S. marginata*.

Effect of ABA on the embryo. **Figure 3** shows changes in dry and fresh mass of seedling of *S. marginata* up to 6 days in 10^{-4} M ABA or water. The fresh mass was strongly affected throughout the experimental period (**Figure 3A**) whereas the dry mass was relatively less affected, showing some effect only between 50 and 100h (**Figure 3B**). As the effect of ABA on the fresh mass is stronger than on the dry mass, it is likely that the water uptake by the embryo was affected by ABA with little effect on dry mass. As this experiment was performed with intact seeds and under this condition the embryo is completely surrounded by the endosperm, the effect of ABA could be either direct or indirect. In other words, the effect of the hormone on embryo growth might be a consequence of a stronger effect on the endosperm.

Effect of ABA on the endosperm. **Figure 4A** shows that the decrease in endosperm dry mass, which is in great part affected by galactomannan degradation (Buckeridge & Reid, 1996), was significantly inhibited by 10^{-4} M ABA after 6 days (144h) of germination. Indeed, galactomannan degradation was partially inhibited following germination (**Figure 4B**) and this inhibition was corroborated by inhibition of the increase in α -galactosidase activity in the endosperm (**Figure 4C**).

Buckeridge and Dietrich (1996) showed that galactomannan degradation in seeds of *S. marginata* starts only after radicle protrusion. Also, Spyropoulos and Reid (1985) showed that isolated endosperms of seeds of *Trigonella foenum-graecum* are not capable to perform galactomannan degradation, unless a water

soluble inhibitor is leaked out from the endosperm. It is reasonably well accepted that in seeds of *T. foenum-graecum*, the galactomannan hydrolases are produced in the aleurone layer and translocated to the endosperm, where galactomannan degradation takes place. Furthermore, the morphology of the seeds of *S. marginata* (**Figure 2**), is closer to the one of *T.foenum-graecum* and *Cyamopsis tetragonolobus* than, for example, to the seeds of *Ceratonia siliqua* which does not possess an aleurone layer, the enzymes being produced into the cytoplasm of endosperm cells (see Reid, 1985 for a review).

Taking these information into account, we performed two combined experiments designed to check two different points: 1) when does ABA exerts its effect? Before or after radicle protrusion? 2) where is ABA primary effect located? Endosperm or embryo? Figures 5 and 6 show the results of these experiments, in which dissected (into endosperm and embryo) or intact seeds of *S. marginata* were incubated in water or 10^{-4} M ABA up to 6 days.

Figure 5A shows changes in dry weight of endosperms of intact seeds incubated under different conditions. When incubated in water for 6 days (W), galactomannan degradation is completed (dry mass decreases to 20 mg per seed). If 10^{-4} M ABA is added up to 17h (before radicle protrusion) and kept in water up to 6 days (A/W), galactomannan degradation occurs as under incubation in water. When in ABA for the whole period (A), strong inhibition of degradation was observed. However, a partial effect was observed when ABA was added after radicle protrusion (W/A). These results suggest that ABA has its effect after radicle protrusion, i.e. possibly after hydrolytic enzymes are already synthesised.

These results can be compared to the ones presented in **Figure 6A**, where isolated endosperms/embryos were subjected to the same treatments. Differently from what happened with intact seeds, in isolated endosperms ABA had a significant effect when added before 17h (A/W) and equally when incubated during the whole experimental period (A) or after 17h only (W/A). It is clear from this comparison that endosperms of seeds of *S.marginata* present the same behaviour as *T.foenum-graecum* in the sense that isolated endosperms showed inhibition of galactomannan degradation. It is equally clear that the effect of ABA is not exclusively on either endosperm or embryo, but on both.

The effects of ABA on the embryo under the same conditions described above confirmed the observation that it has little or no effect on the dry mass (compare **Figures 5C** and **6C**), but had a stronger effect on the fresh mass (compare **Figures 5B** and **6B**). With isolated embryos, ABA had a significant effect only when present during all the experimental period, whereas a much stronger effect was observed, especially when ABA was present during 6 days (A in figure 5B).

The crossed analysis of the two experiments lead to the following suggestions: 1) there might be a cause-effect relationship between the effect of ABA on the endosperm and on the embryo, since as greater the effect of ABA on the former, the greater its effect on the second; 2) the effect on the embryo seems to be mainly on water uptake, whereas in the endosperm both galactomannan and α -galactosidase activity were affected.

The role of ABA on galactomannan mobilisation. As galactomannan has been suggested as an important substance in the control of water relations of

legume endosperm (Reid & Bewley, 1979, Buckeridge & Dietrich, 1996), it is reasonable to assume that the uptake of water by the embryo might have been affected via inhibition of galactomannan degradation in the endosperm. This hypothesis was tested by determining galactomannan yield and α -galactosidase activity following germination with and without ABA.

The presence of ABA in isolated endosperms of *Sesbania marginata* (646.3 ± 39.9 pmoles per g of fresh mass), detected by radioimmunoassay (H. Mercier and M.S. Buckeridge, unpublished), strongly suggests that this hormone is involved in the control of reserve mobilisation and indirectly controls seedling growth. It is likely that in seeds of *S. marginata*, ABA is the analogous to the inhibitor that has been detected in seeds of *Trigonella foenum-graecum* by Zambou et al. (1993). Thus, it is possible that under natural conditions the concentration of ABA decreases throughout germination, either by sink of the developing cotyledons or through biochemical degradation, in order to permit galactomannan mobilisation and consequently the release of the water retained during imbibition, to the growing embryo.

It is noticeable that whereas a large difference is observed between fresh mass of embryos originated from intact and endosperm-less seeds, a very small difference was observed between their respective dry masses [compare (W) in **Figures 5B** and **6B**]. In this respect, McCleary and Matheson (1976), fed growing embryos of guar seeds with radioactive mannose and galactose and demonstrated that the products of galactomannan mobilisation are used for several biochemical processes in the growing seedling. If the same situation occurs in seeds of *S.*

marginata, a reasonable explanation for the differential accumulation of water in comparison with the carbon transferred from the endosperm to the growing embryo is that whereas most of the carbohydrate (mannose and galactose) is transformed into sucrose (Buckeridge and Dietrich, 1996) and used for respiration (i.e. leading to CO₂), water seems to be retained somehow in the elongating tissues. This agrees with the observation that ABA, by inhibiting galactomannan mobilisation, appears to control indirectly the rate of changes in fresh mass of the growing embryo.

References

- Anderson, E. 1949. Endosperm mucilages of legumes: occurrence and composition. *Ind. Eng. Chem.*, 41:2887-2890.
- 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. Reviews: Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. *Ciencia e Cultura Journal of the Brazilian Assoc. Advanced Sci.* 48(3):153-162.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S. 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 30 (1) in press.

- Dulson, J., Bewley, J.D. & Johnson, R.H. 1988. Absciscic acid is an endogenous inhibitor in the regulation of mannanase production by isolated lettuce endosperms. *Plant Physiol.* 87:660-665.
- Groot, S.P.C. & Karssen, C.M. 1987. Giberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening. A study with giberellin-deficient mutants. *Planta* 171:525-531.
- Groot, S.P.C. & Karssen, C.M. 1992. Dormancy and germination of absciscic acid-deficient tomato seeds. Studies with the *sitiens* mutant. *Plant Physiol.* 99:952-958.
- Halmer, P. & Bewley, J.D. 1979. Mannanase production by the lettuce endosperm. Control by the embryo. *Planta* 144:330-340.
- 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 protoplasts. *J. Exp. Botany* 46:577-583.
- McCleary, B.V. & Matheson, N.K. 1974. α -D-galactosidases activity and galactomannan and galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. *Phytochem.* 13:1747-1757.
- McCleary, B.V. & Matheson, N.K. 1976. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochem.* 15:43-47.
- Reid, J.S.G. 1971. Reserve carbohydrate metabolisms in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. *Planta* 100:131-142.
- Reid, J.S.G. 1985. Cell wall storage carbohydrates in seeds. Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses. *Adv. Bot. Res.* 11:125-155.

- Reid, J.S.G. & Bewley, J.D. 1979. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic legume seed. *Planta*, 147: 145-150.
- Reid, J.S.G. & H. Meier. 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.
- 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.
- Spyropoulos, C. G. & Reid J.S.G., 1988. Water stress and galactomannan breakdown in germinated fenugreek seeds. Stress affects the production and the activities in vivo of galactomannan hydrolysing enzymes. *Planta* 179:403-408.
- Zambou, K.; Spyropoulos, C.G.; Chinou, I. & Kontos, F., . 1993. Saponin-like substances inhibit α -galactosidase production in the endosperm galactomannan degradation. *Planta* 189: 207-212.

Figures

Figure 1

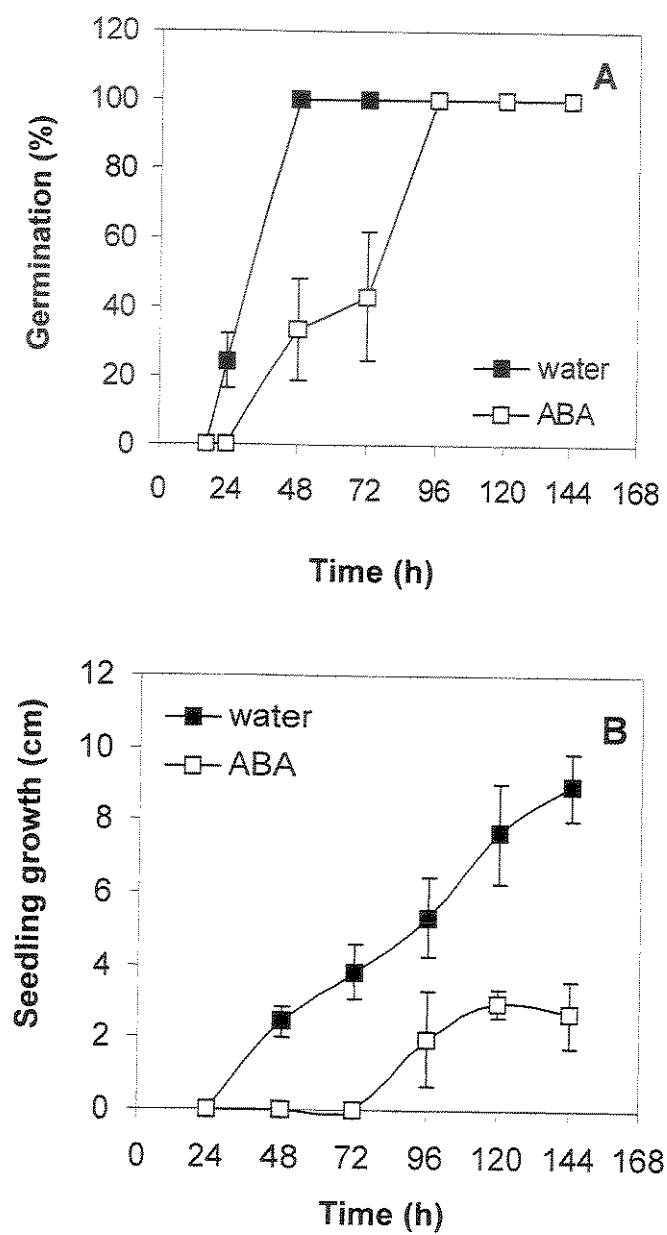


Figure 2

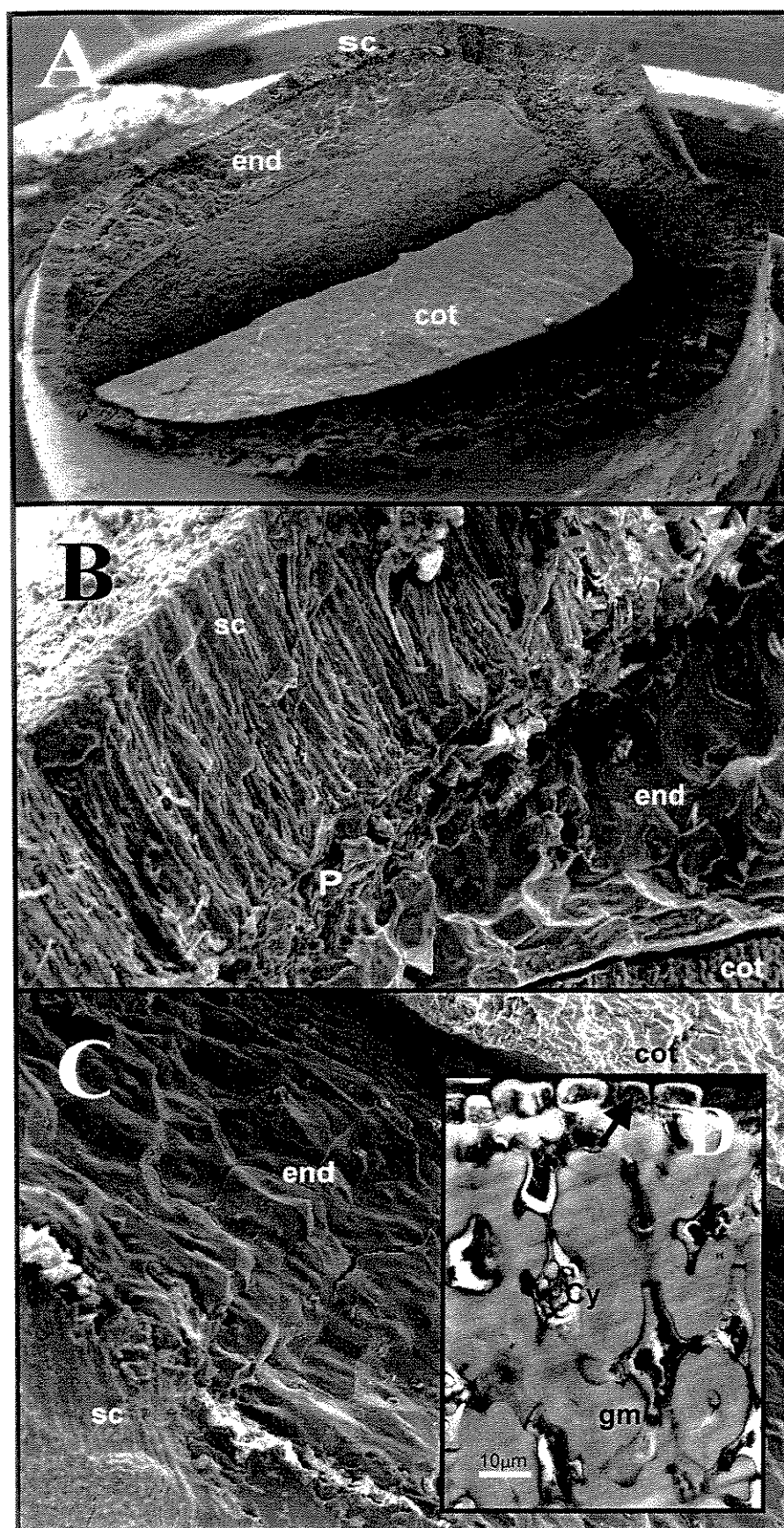


Figure 3

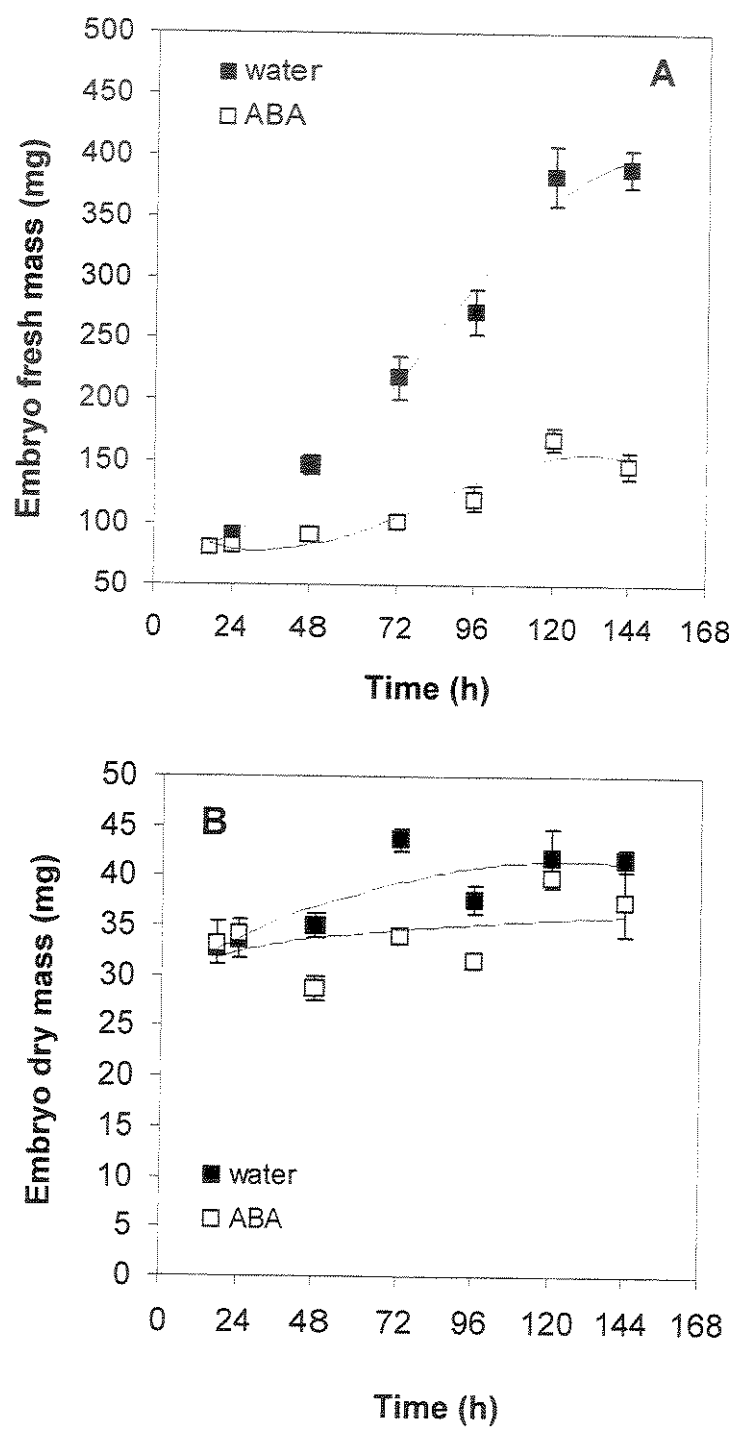


Figure 4

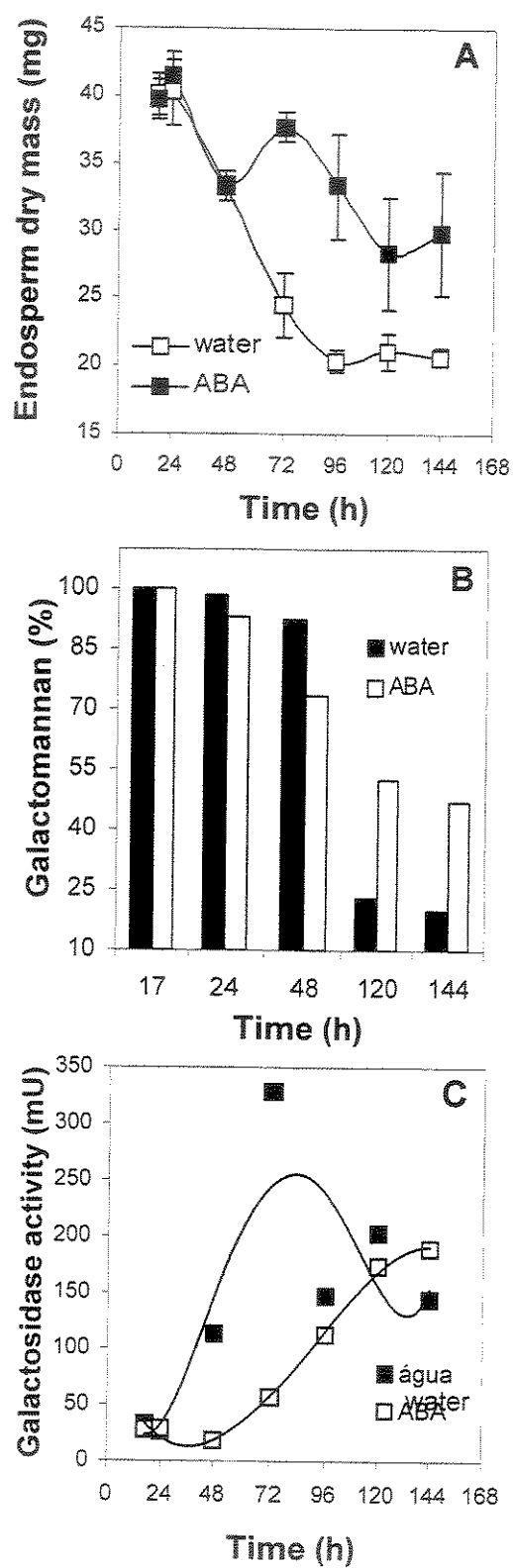


Figure 5

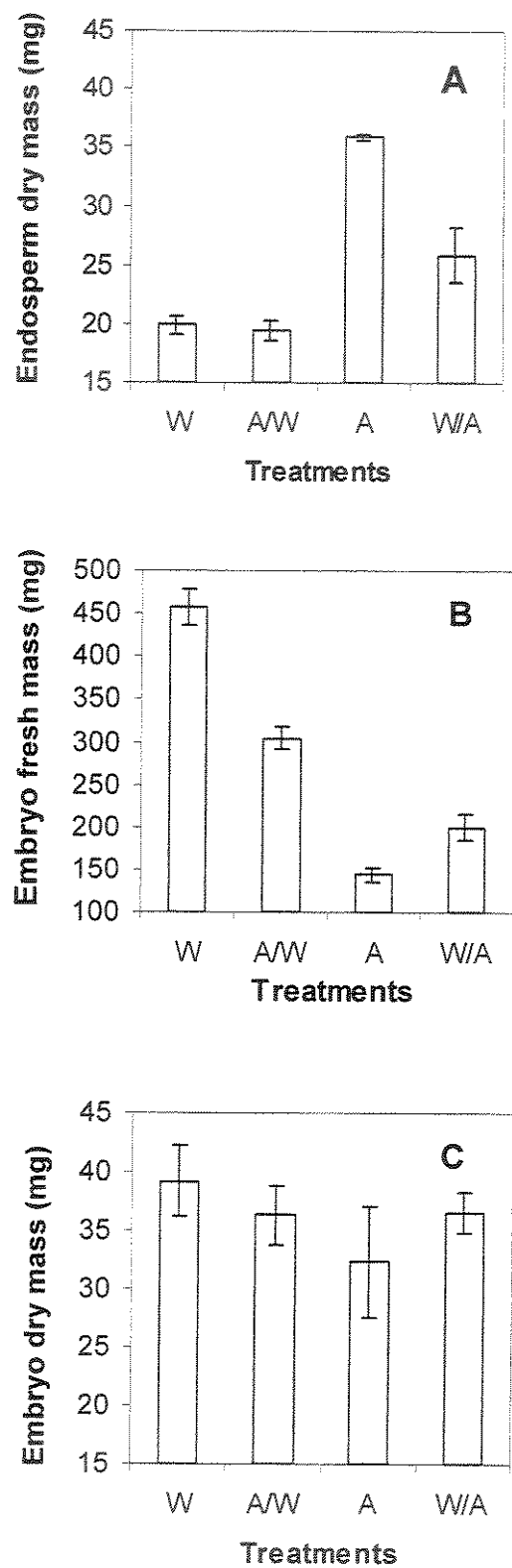
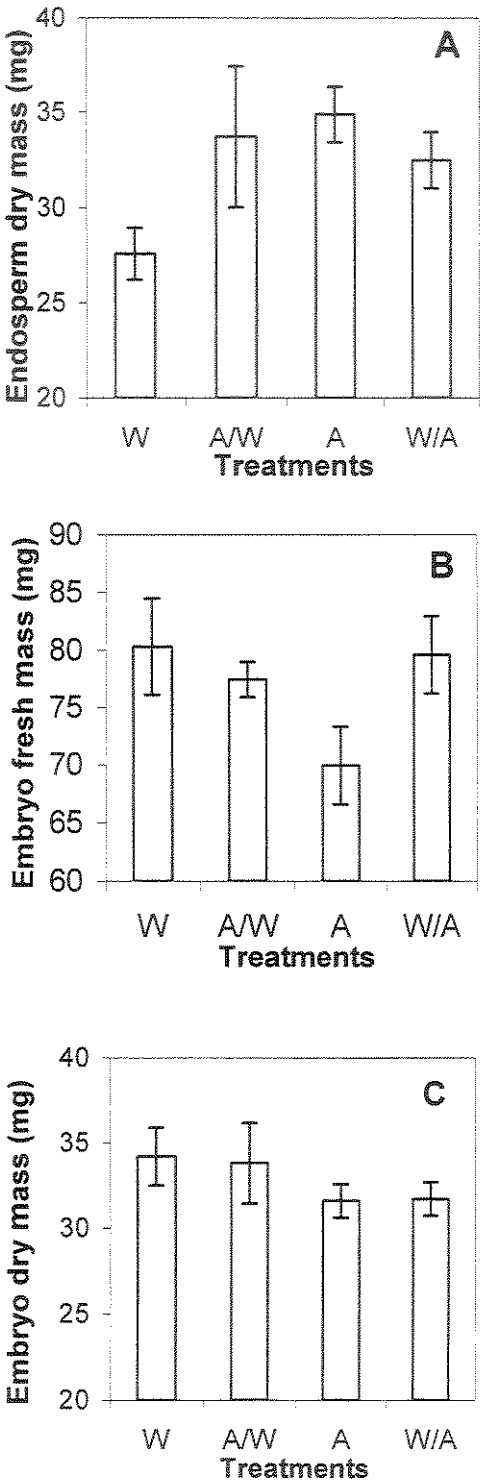


Figure 6



Legends to Figures

Figure 1 – Effect of exogenously applied ABA (10^{-4}M), on germination of seeds of *Sesbania marginata* (**A**) and on plantlet growth (**B**) during 6 days after imbibition.

Figure 2 – Ultrastructural analysis of the seed of *Sesbania marginata*. (**A**) general view of transversally broken seed showing the seed coat (sc), endosperm (end) and cotyledons (cot), 48X; (**B**, 671X) and (**C**, 335X) magnifications showing details of the connections between seed coat (sc), endosperm (end) containing thick cell walls (white arrow in C) and cotyledons (cot) and (**D**) light microscopy showing the aleurone layer (black arrow), cytoplasm (**Cy**) and endospermic cell walls thickened with galactomannan (gm). Bar represents $10\mu\text{m}$.

Figure 3 – Effect of exogenously applied ABA (10^{-4}M) on the fresh mass (**A**) and dry mass (**B**) of the embryo during germination of seeds of *Sesbania marginata*. Intact seeds were put to germinate in water or ABA and measurements were made every 24h for 6 days.

Figure 4 – Effect of exogenously applied ABA (10^{-4}M) on galactomannan degradation following germination (up to 6 days) of seeds of *Sesbania marginata*. Dry mass of the endosperm following

degradation (**A**); yield of galactomannan (**B**); activity of α -galactosidase (**C**).

Figure 5 – Effect of ABA (10^{-4} M) on the dry mass of the endosperm (**A**) and the fresh (**B**) and dry (**C**) masses of the embryo after 144h of imbibition. Seeds of *Sesbania marginata* were maintained in the different treatments: **W** = in water for 144h, **A** = seeds maintained in ABA for 144h, **A/W** = in ABA and after 17h they were maintained in water and **W/A** = seeds placed in water and after 17h maintained in ABA. Standard deviation were obtained with 5 replicates.

Figure 6 - Effect of ABA (10^{-4} M) on the dry masses of the isolated endosperm (**A**) , fresh (**B**) and dry (**C**) weight of the isolated embryo after 144h of imbibition. Seeds of *Sesbania marginata* were placed to germinate under different treatments. After 17h, they were dissected and isolated embryos and endosperms were maintained in water imbibition for 6 days. Treatments were: **W** = seeds placed in water, dissected after 17h and isolated embryos and endosperms maintained in water up to 144h, **A** = maintained in ABA for 144h, **W/A** = seeds placed in water and after dissection they were maintained in ABA and **A/W** = seeds placed in ABA and after dissection they were maintained in water. Standard deviation were obtained with 5 replicates.

Conclusões

Com os resultados do presente trabalho, é possível concluir que o ácido abscísico exerce uma importante função na germinação e principalmente no desenvolvimento inicial da plântula de *Sesbania marginata*, agindo ao nível do endosperma e também do embrião.

O ABA aplicado exógenamente é capaz de:

- retardar a germinação
- inibir o crescimento da radícula
- inibir a absorção de água pelo embrião
- retardar a ativação da enzima α -galactosidase
- inibir a degradação do galactomanano

Summary

Galactomannans are storage cell wall polysaccharides found in endospermic seeds of legumes. They are thought to be storage polymers, since it has been observed for a few species (among them *Sesbania marginata*) that it is completely broken down after germination and its products are transferred to the growing embryo. We examined the effect of ABA (10^{-4} M abscisic acid) on the degradation of galactomannan in isolated endosperms and intact seeds of *S. marginata*. We found that after seed germination the initial embryo growth was retarded by ABA. Ultrastructural analysis showed that the embryo is completely surrounded by an endosperm which displays very thick galactomannan containing cell walls. Although an inhibitory effect has been observed on the increase of fresh weight of the embryo, the effect of ABA on the dry weight was weaker and transitory (from 48 to 96h). Endosperm dry weight and galactomannan degradation were significantly inhibited and the activity of α -galactosidase was strongly inhibited by ABA. The addition of ABA before and/or after mobilisation in intact seeds or isolated endosperm, showed that whereas addition of ABA before mobilisation did not affect dry weight decrease in intact seeds, it was strongly affected in isolated endosperms. On the other hand, whereas ABA affected embryo fresh weight increase in intact seeds, but not in isolated embryos, no significant effect was observed on dry weight. These results suggest that ABA affects galactomannan degradation and by doing so, prevents water absorption by the embryo, rather than affect its dry weight. As ABA has been detected in the endosperm of seeds of *S. marginata*, it is proposed that it probably acts as a modulator of galactomannan mobilisation and consequently synchronises it with early growth of the embryo.

Referências Bibliográficas

- Avigad, G. 1982. **Sucrose and others disaccharides**. In Enciclopedia of Plant Physiology: New Series (F. A. Loewus and W. Tanner, eds) Vol. 13^A, pp.217-347. Springer-Verlag. Berlin and New York.
- 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 requirement for dessiccation**. *Planta* 186:27-34
- Bewley, J.D. 1997. **Seed germination and Dormancy**. *Plant Cell* 9:1055-1066.
- Bewley, J.D. & Black, M. 1992. **Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to germination. 2. Viability, Dormancy and Environmental Control**. (Berlin: Springer-Verlag).
- Bewley, J.D. & Black, M. 1994. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York.
- Black, M., 1991. **Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds** In: Davies WJ. Jones HG (eds). *Abscisic acid physiology and biochemistry*. BIOS Scientific Publisher, Lancaster. UK. Pp 99-124.
- Botha, F.C.; Potgieter, G.P. and Botha, A. M. 1992. **Respiratory Metabolism and gene expression during seed germination**. *J. Plant Growth Regul.* 11: 211-224

- Bradford, K.J. 1995. **Water relations in seeds germination.** In **Seeds Development and Germination**, J. Kigel and G. galili. (New York: Marcel Dekker), pp. 351-396.
- Bryant, J.A. 1985. **Seed Physiology.** Edward Arnold Pty Ltd, Southampton, Australia.
- Buckeridge, M.S., Rocha, D.C., Reid, J.S.G., Dietrich, S.M.C. 1992. **Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations.** *Physiol Plant* **86**:145-151.
- Buckeridge, M.S., Panegassi, V.R., Dietrich, S.M.C. 1995^a. **Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth.(Leguminosae) following germination.** *Revta brasil. Bot.*, **18**: 171-175.
- Buckeridge, M.S., Panegassi, Rocha, D.C., V.R., Dietrich, S.M.C. 1995^b. **Seeds galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae.** *Phytochem.* **38**(4): 871-875.
- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C. 1996. **Mobilization of the raffinose family oligossacarides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae).** *Plant Science* **117**: 33-43.
- Buckeridge, M.S. & Reid, J.S.G. 1996. Reviews: **Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions.** *Ciencia e Cultura Journal of the Brazilian Assoc. Advanced Sci.* **48**(3):153-162.

- Carpita, N.C., Nabors, N.W., C.W. & Petretic, N.L. 1979. **The growth physics and water relations of red-light-induced germination in lettuce seeds.** *Planta* **144**:217-224.
- Cosgrove, D.J. 1997. **Relaxation in a high-stress environment: The molecular basis of extensible cell walls and cell enlargement.** *Plant Cell* **9**: 1031-1041.
- Dahal, P., Nevins, D.J., and Bradford, K. 1997. **Relationship of endo- β -mannanase activity and cell wall hydrolizis in tomato endosperm to germination rates.** *Plant physiol.* **113**:1243-1252.
- Davis, A.L.; Hoffmann, R.A.; Russell, A. & Debet, M., 1994. **^1H and ^{13}C -NMR characterization of the digalactosylmannopentaose liberated from legume seed galactomannan by beta-mannanase action.** *Carbohydrate Reserch* **271**:43-54.
- Dea, I.C.M. & Morrison, A. 1975. **Chemistry and interactions of seed galactomannans.** *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **31**: 241-312.
- Dulson, J., Bewley, J.D. & Johnson, R.H. 1988. **Absciscic acid is an endogenous inhibitor in the regulation of mannanase production by isolated lettuce endosperms.** *Plant Physiol.* **87**: 660-665.
- Garcarrubio, A., Legaria, P.J. & Covarrubias, A.A. 1997. **Absciscic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients.** *Planta* **203**:182-187.
- Giorgini, J.F. & Comoli, E. 1996. **Effect of Embryo and exogenous GA_3 on endospermic endo- β -mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth.** *R. Bras. Fisiol. Veg.* **8**:43-49.

- Groot, S.P.C. & Karssen, C.M. 1987. **Giberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening. A study with giberellin-deficient mutants.** *Planta* **171**:525-531.
- Groot, S.P.C., Kieliszewska-Rokicka, B., Vermeer, E. and Karssen, C.M. 1988. **Giberellins-induced hidrolisis of endosperm cell walls in giberellin-deficient tomato seeds prior to radicle emergence.** *Planta* **174**:500-504.
- Groot, S.P.C. & Karssen, C.M. 1992. **Dormency and Germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. Studies with the *sitiens* mutant.** *Plant physiol.* **99**:952-958.
- Halmer, P. & Bewley, J.D. 1979. **Mannanase production by the lettuce endosperm. Control by the embryo.** *Planta* **144**, 330-340.
- Halmer, P. 1985. **The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds.** *Physiol. Veg.* **23**(1):107-125.
- Higgins, T.J.V., Jacobsen, J.V. & Zwar, J.A. 1982. **Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and m-RNA levels in barley aleurone layers.** *Plant Mol. Biol.* **1**: 191-195.
- Hilhorst, H.W.M. & Downie, B. 1996. **Primary dormency in tomato (*Lycopersicon esculentum*) studies with the *sitiens* mutant.** *J. Exp. Botany*, **47**:89-97.
- Hilhorst, H.W.M. 1995. **A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy.** *Seed Sci.Res.* **5**, 61-75.

- Iglesias, R.G. & Babiano, M.J. 1997. **Endogenous abscisic acid during the germination of chick-pea seeds**. *Physiologia Plantarum* **100**:500-504.
- Karssen, C. M. 1995. **Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control**. In *Seed Development and Germination*, J.Kigel and G. Galili, eds (New York: Marcel Dekker), pp.333-350.
- Le Page-Devivry, M.T. & Garello, G. 1973. **La dormance embryonnaire chez *Taxus baccata*: influence de la composition du milieu liquide sur l'induction de la germination**. *Physiologia Plantarum* **29**:204-207.
- Leubner-Metzger G., Frundt C., Meins F Jr. 1996. **Effects of gibberelins, darkness and osmotica on endosperm rupture and class β -(1 $\rightarrow$ 3) glucanase induction in tobacco seed germination**. *Planta* **199**: 282-288.
- Leubner-Metzger G., Frundt C., Vogeli-Lange R., Meins F Jr. 1995. **Class β -(1 $\rightarrow$ 3) glucanases in the endosperm of tobacco during germination**. *Plant Physiol* **109**: 751-759.
- Leviatov S., Shoseyov O, Wolf S. 1995. **Involvement of endomannanase in the control of tomato seed germination under low temperature conditions**. *Ann bot* **76**: 1-6.
- Liu, Y., Hilhorst, H.W.M., Groot, S.P. and Bino, R.J. 1997. **Amounts of Nuclear DNA and Internal Morphology of Gibberellin- and Abscisic acid-deficient Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Seeds during Maturation, Imbibition and Germination**. *Annals of Botany* **79**:161-168.

- 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 the seed of *Gleditsia triacanthos*.** *Carbohydrate Res.* **134**: 115-131.
- Mayer, A.M. e Poljakoff-Mayber, A. 1975. **The germination of seeds.** Ed. Wareing, P.F. e Galston, A.Y. Pergamoon Pres, Great Britain, 2 ed. 192p
- McCleary, B.V. 1983. **Enzymic interactions in the hydrolusis of galactomannan in germinating guar.** *Phytochemistry* **22**:649-658.
- Moe, O. A., Miller, S. E. & Iwen M.H. 1947. **Investigation of the reserve carbohydrates of leguminous seeds. I. Periodate oxidation.** *J. Am. Chem. Soc.* **69**:2621-2825.
- Naldeman, H. 1890. **Über die Schleimendosperme der Leguminosen.** *Pringsheims Jahrb Wiss Bot* **21**: 1-83.
- Neukom, H. 1989. **Galactomannans: Properties and Applications.** *Lebensmmittel Wissenschaft and Technologie*, London, v. 22, n. 2, p. 41-45.
- Ni, B.R. & Bradford, K.J. 1993. **Germination and dormancy of abscisic acid and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicum sculentum*) seeds. Sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin, and water potential.** *Plant Physiol.* **101**:607-617.

- Nomaguchi, M., Nonogaki, H., Yukio, M. 1995. **Development of galactomannan-hydrolyzing activity in the micropilar endosperm tip of tomato seed prior to germination.** *Physiol. Plantarum* **94**:105-109.
- Nonogaki, H. & Morohashi, Y. 1996. **An endo- β -mannanase develops exclusively in the micropilar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence.** *Plant Physiol.* **110**:555-559.
- Oishi, M.Y. & Bewley, J.D., 1990. **Distinction between the responses of developing maize kernels to fluoridone and desiccation in relation to germinability, α -amilase activity, and abscisic acid content.** *Plant Physiol.*, **94**:592-598.
- Qin, Z.Z., 1990. **Changes and endogenous abscisic acid levels in rice embryo and endosperm and association with development and germination.** *Acta Bot. Sin.* **32**:448-455.
- Reid, J.S.G. 1971. **Reserve carbohydrate metabolisms in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L.** *Planta.* **100**: 131-142.
- Reid, J.S.G., Meier, H. 1972. **The function of the aleurone layer during galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), and lucerne (*Medicago sativa* L.) , a correlative biochemical and ultra structural study.** *Planta* **106**. 44-60.
- Reid, J.S.G. & H. Meier. 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.

- Reid, J.S.G. & Bewley, J.D. 1979. **A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic legume seed.** *Planta*, 147: 145-150.
- Reid, J.S.G. 1985. **Cell wall storage carbohydrates in seeds.** *Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses*. *Adv. Bot. Res.* 11: 125-155.
- Sanchez, R.A.; Sunell, L.; Labavitch, J.M. & Bonner, B.A. 1990. **Changes in endosperm cell walls of *Datura* species before radicle protusion.** *Plant Physiology*, 93: 89-97, 1990.
- Schopfer, P. & Placy, C. 1985. **Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect of embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L.** *Plant physiol.* 77:676-686.
- Somme, R. 1968. **The structure of a galactomannan from *Medicago lupulina* L.** *Acta Chem.Scand.* 22:537-545.
- 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.
- Still, W.D. & Bradford, K.J. 1997. **Endo- β -Mannanase activity from individual Tomato Endosperm Caps and Radicle Tips in relation to germination rates.** *Plant Physiol.* 113: 21-29.
- Toorop, P.E., Bewley, J.D., and Hilhorst, H.W.M. 1996. **Endo- β -mannanase isoforms are present in the endosperm of tomato seeds, but not are essentially linked to the completion of germination.** *Planta* 200:153-158.

- Unrau, A.M. 1961. **The constitution of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala***. J. Org. Chem. **26**: 3097-3101.
- Visser, K., Vissers, A.P.A., Cagiran, M.I., Kijne, J.W. and Wang, M., 1996. **Rapid germination of a Barley Mutant is correlated with a rapid turnover of abscisic acid outside the embryo**. Plant Physiol. **111**: 1127-1133.
- Voigt, B. & Bewley, J.D. 1996. **Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and pos-germinative endo- β -mannanase. Responses to dissication, abscisic acid and osmoticum**. Planta **200**:71-77.
- Watkins, J.T. & Cantliffe, D.J. 1983. **Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annum* at low temperature**. Plant Physiol. **72**: 146-150.
- Watkins, J.T.; Cantliffe, D.J.; Huber, D.J. & Nell, T.A. 1985. **Gibberelic acid stimulated degradation of endosperm in pepper**. Journal of American Society for Horticultural Science, **110**:61-65.
- Welbaum, G.E. & Bradford, K.J. 1990. **Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.) V. Water relations of imbibition and germination**. Plant Physiol. **92**: 1046-1062.
- Welbaum G. E., Muthui W.J., Wilson J.H., Grayson R.I., Fell R.D. 1995. **Weakening of muskmelon perisperm envelope tissue during germination**. J. Exp. Bot. **46**: 391-400 .

Wu, Y., Spollen, W.G., Sharp, R.E., Hetherington, P.R. & Fry, S.C. 1994. **Root growth maintenance at low water potentials. Increased activity of xiloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid.** Plant Physiol. **106**:607-615.

Yamada, K. 1984. **Changes in the level of endogenous abscisic acid in barley during germination and use of abscisic acid in malting.** J. Am. Soc. Brew. Chem. **42**:79-84.

Zambou, K. & Spyropoulos, C. G., 1990. **D-Galactose uptake by fenugreek cotyledons. Effect of water stress.** Plant Physiol. **93**: 1417-1421.

Zambou, K.; Spyropoulos, C.G.; Chinou, I. & Kontos, F., . 1993. **Saponin-like substances inhibit α -galactosidase production in the endosperm galactomannan degradation.** Planta. **189**: 207-212.