

**MECANISMO E CONTROLE DA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Genipa
americana* L.**

SUE ÉLLEN ESTER QUEIROZ

2009

SUE ÉLLEN ESTER QUEIROZ

**MECANISMO E CONTROLE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
Genipa americana L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Ciências Florestais, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Queiroz, Sue Éllen Ester.

Mecanismo e controle da germinação de sementes de *Genipa
americana* L. / Sue Éllen Ester Queiroz. – Lavras : UFLA, 2009.
51 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva.
Bibliografia.

1. Endosperma. 2. Endo- β -mananase. 3. Força de ruptura. 4.
Ácido abscísico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9562
– 583.93

SUE ÉLLEN ESTER QUEIROZ

**MECANISMO E CONTROLE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
Genipa americana L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Ciências Florestais, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 19 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Antonio Claudio Davide UFLA

Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria UFLA

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende von Pinho UFLA

Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

UFLA

(ORIENTADOR)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2009

A Deus e aos meus pais, Massilon Queiroz do Carmo e Mariana Miranda
Perígolo do Carmo

OFEREÇO.

Ao meu orientador Prof. Amaral.

As minhas queridas irmãs Késsia e Pollyana.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus.

Aos meus pais, Massilon e Mariana, pelo apóio e incentivo durante todos os anos de estudos, e por acreditarem em mim.

Ao meu orientador Prof. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pela oportunidade, aprendizagem, dedicação, carinho, amizade e orientação desde a graduação.

Ao Prof. Anderson Cleiton José, pela grande contribuição nos trabalhos moleculares.

À Bióloga e amiga Ana Carla, pela ajuda nos trabalhos de microscopia eletrônica e demais atividades.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Florestais, pela oportunidade da realização do curso de graduação e mestrado.

Aos Laboratórios de Sementes Florestais, Análise de Sementes, Biologia Molecular, Melhoramento Florestal, Microestrutura e Arquitetura Alimentar, Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural.

À laboratorista Olívia Alvina Tonetti, pela colaboração nos trabalhos de laboratório. À laboratorista Elenir, pela disponibilidade do Laboratório de Análise de Sementes. Ao José Pedro, pela coleta dos frutos.

Aos Professores Antônio Cláudio Davide, José Márcio Rocha Faria, Édila von Pinho e Dulcinéia de Carvalho.

Ao Pedro, pela força, compreensão e apoio nas decisões, durante o mestrado.

Às minhas amigas de república, Kamila, Nathália e Deise, pelo apoio e o laço de amizade que construímos durante estes anos.

À minha família, Késsia, Pollyana, Isabela, Laís, João Manuel, Neto, Cláudio e Reinaldo. Aos meus tios Marlene e Toninho pelo apoio em Lavras.

À grande amiga Cinara, pela contribuição durante os experimentos no laboratório de Sementes Florestais.

Ao Biólogo Anderson Tadeu, pela contribuição nos trabalhos moleculares.

À Bióloga Simoni, pela grande amizade que construímos durante o mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Sementes Florestais, Giuliana, Cristiane, Júlio, Juliano, Antônio, Tathiana, Letícia, Géssica e Kelly.

À Professora Marcela Carlota Nery, pela contribuição durante a análise dos resultados.

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento Florestal, Alisson, Murilo, Fábio, Flávio e Rogério.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1 Coleta dos frutos e beneficiamento das sementes.....	6
2.2 Determinação do grau de umidade.....	6
2.3 Curva de embebição.....	7
2.4 Germinação.....	7
2.5 Caracterização morfológica dos frutos e das sementes.....	7
2.6 Caracterização morfo-anatômica do endosperma micropilar e lateral.....	8
2.7 Crescimento do embrião.....	9
2.8 Determinação da força de ruptura.....	10
2.9 Quantificação da atividade da enzima endo- β -mananase.....	10
2.10 Localização da atividade da enzima endo- β -mananase.....	12
2.11 Extração do DNA genômico.....	12
2.12 Desenho dos primers degenerados.....	14
2.13 Reação da polimerase em cadeia.....	15
2.14 Purificação do produto da PCR.....	16
2.15 Sequenciamento gênico.....	17
2.16 Análise estatística.....	18
3 RESULTADOS.....	19
3.1 Curva de embebição.....	19
3.2 Germinação.....	20
3.3 Caracterização morfológica dos frutos e das sementes.....	21
3.4 Caracterização morfo-anatômica do endosperma micropilar e lateral.....	23

3.5 Crescimento do embrião.....	24
3.6 Determinação da força de ruptura.....	26
3.7 Quantificação da atividade da enzima endo- β -mananase.....	28
3.8 Força de ruptura x atividade da enzima endo- β -mananase.....	29
3.9 Localização da atividade da enzima endo- β -mananase.....	30
3.10 Reação da polimerase em cadeia.....	31
3.11 Sequenciamento gênico.....	32
4 DISCUSSÃO.....	34
5 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	49

RESUMO

QUEIROZ, Sue Éllen Ester. **Mecanismo e controle da germinação de sementes de *Genipa americana* L.** 2009. 51 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG .*

Genipa americana pertence à família Rubiaceae, possui importância econômica para produção de alimentos, e florestal, para a recomposição de ambientes de mata ciliar, por suportar períodos de alagamento. Assim, objetivou-se estudar o mecanismo e controle da germinação de *Genipa americana*. Para a caracterização dos frutos e das sementes foram capturadas imagens digitais, e microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para os estudos morfo-anatômicos. As sementes foram embebidas em água ou em 100 μ M de ABA e o crescimento do embrião foi mensurado ao longo dos dias de embebição, por meio de um paquímetro digital. Para a determinação da força requerida para a ruptura do endosperma micropilar utilizou-se um texturômetro. A atividade da enzima endo- β -mananase foi determinada através de um gel de atividade e a técnica de impressão de tecidos foi utilizada para localizar esta atividade. Para amplificar o gene de endo- β -mananase foi utilizada a técnica da PCR. Os principais resultados foram que, os frutos são do tipo baga, indeiscente e com aproximadamente 105 sementes; as sementes possuem formato variado de coloração castanho-amarelada e tegumento levemente enrugado. Para as sementes embebidas em água, a protrusão da radícula teve início a partir do oitavo dia de embebição. O endosperma micropilar possui seis a oito camadas de células, com dimensões e espessura da parede celular inferiores aos do endosperma lateral. Foi observado nos embriões das sementes embebidas em água um crescimento antes da protrusão da radícula. Para as sementes completarem a germinação foi necessário o enfraquecimento do endosperma micropilar, que ocorreu em dois estágios. Foi observado um aumento da atividade da enzima endo- β -mananase ao longo dos dias de embebição, que coincidiu com os dois estágios de enfraquecimento do endosperma micropilar, sendo que o primeiro estágio relacionou-se apenas com a atividade da enzima e o segundo estágio também coincidiu com o crescimento do embrião. Tanto para sementes embebidas em água ou ABA, por meio da técnica de impressão de tecidos, foi observada a presença da enzima no endosperma micropilar e lateral, antes da protrusão da radícula, mas a atividade de endo- β -mananase iniciou-se no endosperma micropilar. ABA inibiu completamente a germinação das

* Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA.

sementes por inibir o crescimento dos embriões e o segundo estágio de enfraquecimento do endosperma micropilar, mas a atividade de endo- β -mananase não foi inibida, ABA apenas causou uma redução da atividade dessa enzima. A seqüência parcial de aminoácidos de *G. americana* apresentou 98% de similaridade com endo- β -mananase de sementes de *Coffea arabica*.

Palavras Chave: Endosperma. Endo- β -mananase. Força de ruptura. Ácido abscísico.

ABSTRACT

QUEIROZ, Sue Éllen Ester. **Mechanism and control of *Genipa americana* L. seed germination.** 2009. 51 p. Dissertation (Master in Forest Engineering) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Genipa americana belongs to the family Rubiaceae, it possesses economic importance for food production, and forest importance for implantation of environments of riparian forest for tolerate flooding periods. So, the objective of the present work was to study the mechanism and control of germination of *Genipa americana*. For the characterization of fruit and seeds, digital images were captured and scanning electron microscopy was used for morphoanatomic studies. The seeds were imbibed either in water or 100 μ M of ABA, the embryo length was measured along the imbibition through a digital caliper. For determination force required for the embryo to puncture the micropylar endosperm a texturemeter machine was used. The activity of enzyme endo- β -mannanase was determined through an activity gel and the tissue printing technique was utilized to locate this activity. To amplify endo- β -mannanase gene the PCR technique was used. The main results were that, the fruits are of the berrylike type, indehiscent and with about 105 seeds, the seeds possess diverse shape, yellowish-brown in color and slightly wrinkled coat. For the seeds imbibed in water, the radicle protrusion started at 8 days of imbibition. The micropylar endosperm possesses six to eight layers of cells, with both dimensions and thickness of the cell wall inferior to those of the lateral endosperm. It was found that, the embryos of the water-imbibed seeds presented growth before radicle protrusion. For the seeds to complete germination, the weakening of the micropylar endosperm was necessary, which took place in two stages. An increase of the activity of enzyme endo- β -mannanase was observed along the imbibition, which coincided with two stages of weakening of the endosperm micropylar, where the first stage related with the activity of enzyme and the second stage coincided too with the growth of embryo. Both for seeds either water or ABA imbibed, the tissue printing technique revealed the presence of the enzyme in the micropylar endosperm and in the lateral endosperm before the radicle protrusion, but the activity of endo- β -mannanase started in the endosperm micropylar. ABA inhibited totally seed germination by inhibiting the embryo growth and the second stage of weakening of the micropylar endosperm, but the activity of endo- β -mannanase was not inhibited, ABA only caused a reduction of the activity of this enzyme. The partial sequence of aminoacids of

* Guidance: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA.

G. americana presented 98% of similarity with endo- β -mannanase of *Coffea arabica* seeds.

Key words: Endosperm. Endo- β -mannanase. Puncture force. Abscisic acid.

1 INTRODUÇÃO

Genipa americana, conhecida popularmente como jenipapo, pertence à família Rubiaceae. Sua distribuição se estende por todo o país em várias formações florestais, situadas em várzeas úmidas ou encharcadas (Lorenzi, 1992). Segundo Andrade et al. (2000), a espécie possui uma ampla distribuição pelas regiões tropicais úmidas e subtropicais da América Latina, desde o México até a Argentina.

G. americana é uma espécie de importância econômica (Andrade et al., 2003), pois seus frutos são consumidos *in natura* ou utilizados para a produção de doces, compotas, licores e geléias (Nascimento, 1997). Os frutos, quando verde, fornecem um suco de coloração azulado, muito usado como corante (Sebbenn, 1997; Lorenzi, 1992). Na área florestal a espécie é utilizada para a implantação de ambientes de mata ciliar, devido às suas características adaptativas, por suportar longos períodos de alagamento combinadas ao rápido crescimento e abundante produção de sementes (Durigan & Nogueira, 1990).

A dispersão dos frutos ocorre de novembro a dezembro, com produção de grandes quantidades de sementes (Lorenzi, 1992). Os frutos são do tipo baga, com mesocarpo adocicado e carnudo, contendo de 150 a 500 sementes. As sementes são achatadas com perfil irregular (Souza, 1999), e apresentam protrusão da radícula com aproximadamente 8 a 13 dias após o início da embebição (Andrade et al. 2000; Souza et al. 1999) e a porcentagem máxima de plântulas é obtida após 70 dias de embebição (Andrade et al., 2000). Segundo Nascimento & Damião-Filho (1998) a germinação das sementes é desuniforme; todavia, Prado Neto et al. (2007), propuseram a pré-embebição das sementes em GA₃ (ácido giberélico) durante 12 horas para acelerar e uniformizar a germinação. Embora tenham sido realizados alguns estudos durante a

germinação de sementes de *G. americana*, existe uma carência de trabalhos relacionados ao mecanismo e ao controle da germinação. Segundo Silva et al. (2007), estudos nesse nível podem contribuir para o desenvolvimento de tecnologias que podem ser adotadas no processo de produção de mudas.

Sementes de café (*Coffea arabica*), também pertencentes à família Rubiaceae, apresentam germinação lenta e desuniforme devido à rigidez do endosperma micropilar, que oferece resistência mecânica à expansão da radícula. O endosperma desta espécie é composto principalmente por mananas, que são fontes de reservas para as sementes (Wolfson et al., 1961). Em sementes de café (*Coffea arabica*) a germinação só ocorre quando o endosperma micropilar é enfraquecido (Silva et al., 2004). De acordo com Hilhorst et al. (1998), a protrusão da radícula acontece quando a força exercida pelo embrião supera a força de resistência imposta pelo endosperma micropilar. A presença de endosperma rígido, que precisa ser enfraquecido para que ocorra a protrusão da radícula, já foi mostrado em outras espécies, tais como tomate (*Solanum esculentum*) (Groot & Karssen, 1987; Toorop et al., 1996, 2000), pimenta (*Capsicum annum*) (Watkins & Cantliffe, 1983), tabaco (*Nicotina tabacum*) (Leubner-Metzger et al., 1995), melão (*Cucumis melo*) (Welbaum et al., 1995), *Datura ferox* (Sanchez et al., 1986), e lobeira (*Solanum lycocarpum*) (Pinto et al., 2007).

Três enzimas estão envolvidas no enfraquecimento do endosperma micropilar através da hidrólise de mananas e galactomananas em sementes: α -galactose (EC 3.2.1.22), β -manosidase (EC 3.2.1.25) e endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) (Toorop et al., 1996). O enfraquecimento do endosperma micropilar ocorre em sementes de *C. arabica* pela enzima endo- β -mananase, onde a atividade da enzima está presente antes da protrusão da radícula, primeiramente no endosperma micropilar e mais tarde no endosperma lateral (Silva et al., 2004). Por outro lado, em sementes de tomate e lobeira, espécies pertencentes à

família Solanaceae, a atividade da enzima endo- β -mananase inicia-se no endosperma micropilar antes da protrusão da radícula, porém a atividade no endosperma lateral é observada apenas após a germinação (Toorop et al., 1996; Pinto et al., 2007).

O aumento da atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar correlacionou-se com o decréscimo da força requerida para o embrião romper o endosperma durante a germinação de sementes de tomate, café e lobeira (Toorop et al., 2000; Silva et al., 2004; Pinto et al., 2007) respectivamente. O enfraquecimento do endosperma micropilar, antes da protrusão da radícula, acontece em dois estágios, sendo que o aumento da atividade da enzima coincide com as duas quedas na força. A atividade da enzima endo- β -mananase também se correlacionou com o aumento de porosidade na parede celular do endosperma micropilar em sementes de tomate e café (Toorop et al., 2000; Silva et al., 2004).

Por outro lado, em sementes de alface (*Lactuca sativa*), a enzima não está relacionada com a germinação, pois a atividade da enzima endo- β -mananase só foi detectada após a protrusão da radícula (Nonogaki & Morohashi, 1999; Wang et al., 2004). Em sementes de outras espécies, como as sementes de fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), caraway (*Carum carvi* L.), chinesa senna (*Cassia tora* L.), carabo (*Ceratonia siliquan* L.) e tamareira (*Phoenix dactylifera* L.), que possuem paredes celulares menos espessas, onde o embrião penetra facilmente o endosperma micropilar, também apresentam atividade desta enzima somente após a germinação, sendo, portanto, importante na degradação de reservas para o estabelecimento da plântula (Gong et al., 2005).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio regulador positivo da dormência e regulador negativo da germinação (Kucera et al., 2005). Durante a germinação, ABA inibe a protrusão da radícula atuando tanto no endosperma quanto no embrião das sementes (Silva et al., 2004; Silva et al., 2008). No

endosperma micropilar de *C. arabica*, ABA inibe parcialmente a atividade da enzima endo- β -mananase através da inibição de duas isoformas desta enzima (Silva et al., 2004). ABA também reduziu a atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma das sementes de tomate e lobeira (Toorop et al., 1996; Pinto et al., 2007). As sementes de café, tomate e lobeira quando embebidas em ABA tiveram o segundo estágio de queda da força de ruptura inibido (Silva et al., 2004; Toorop, et al., 1996; Pinto et al., 2007). Para estas espécies a atividade de endo- β -mananase não é suficiente para promover a protrusão da radícula, já que ABA não inibe completamente a atividade da enzima. Esses resultados sugerem que outras enzimas, que são inibidas por ABA, podem estar envolvidas no segundo estágio de enfraquecimento das paredes celulares do endosperma micropilar (Toorop et al., 1996).

Todavia, Pinto et al. (2007) mostraram que o segundo estágio de enfraquecimento do endosperma é controlado pelo embrião; neste caso, ABA age nas células do embrião durante a germinação (Silva et al. 2008). Hilhorst (1995) sugere que ABA possa suprimir a hidrólise de enzimas que atuam no afrouxamento da parede celular das células do embrião, inibindo assim a elongação e extensão. Em sementes de café, ABA inibe o aumento do turgor do embrião, controlando o potencial de crescimento durante a germinação, impedindo a protrusão da radícula (Silva et al., 2004). Em *Brassica napus*, Schopfer & Plachy (1985) demonstraram que ABA inibe o afrouxamento das paredes celulares do embrião, inibindo assim a germinação. Além disso, em sementes de *C. arabica*, ABA inibiu a acumulação de β -tubulina, crescimento e divisão celular do embrião, a organização transversal dos microtúbulos e a replicação do DNA nuclear durante a embebição (Silva et al., 2008).

Assim, neste trabalho objetivou-se:

- Caracterizar morfológicamente os frutos e as sementes de *G. americana*;

- Caracterizar morfo-anatomicamente o endosperma micropilar e lateral das sementes *G. americana*;
- Estudar o mecanismo de germinação das sementes de *G. americana*;
- Estudar o controle, por ácido abscísico, da germinação das sementes de *G. americana*;
- Sequenciar e estudar o gene da enzima endo- β -mananase em *G. americana*;
- Comparar o mecanismo e o controle da germinação de *G. americana* com os de semente de *C. arabica*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta dos frutos e beneficiamento das sementes

Os frutos foram coletados nos municípios de Lavras (Latitude 21° 14' 43", Longitude 44° 59' 59"), Lagoa da Prata (Latitude 20° 01' 21", Longitude 45° 32' 37") e Itumirim (Latitude 21° 19' 01", Longitude 44° 52' 16"), sendo que, em cada município foram coletados frutos de aproximadamente seis a dez matrizes. A coleta dos frutos foi realizada manualmente, coletando apenas os frutos maduros, já dispersos da planta-mãe. O beneficiamento dos frutos foi realizado através da despolpa manual, onde os frutos foram primeiramente cortados transversalmente com o auxílio de uma faca, a polpa dos frutos e as sementes foram passadas por uma peneira na presença de água corrente, para facilitar a despolpa.

Em seguida, as sementes foram catadas manualmente, sendo descartadas as sementes mal formadas, com sinais visíveis de predação e danos mecânicos. Após o beneficiamento, o excesso de água na superfície externa das sementes foi removido com o uso de papel de filtro. As sementes foram mantidas em sala de secagem, 20°C e 60% de umidade relativa, até alcançarem 12% de umidade, com base no peso fresco (Salomão, 2004), o que foi alcançado próximo aos três dias de secagem. Em seguida as sementes foram, então, armazenadas em sacos plásticos selados dentro da câmara fria (5°C e 60%) até o início dos experimentos.

2.2 Determinação do grau de umidade

Para a determinação do grau de umidade utilizaram-se 4 repetições de cinco sementes, que foram previamente pesadas e submetidas à estufa regulada a 103°C por 17 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem com base

no peso fresco, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

2.3 Curva de embebição

Para a determinação da curva de embebição, as sementes foram previamente esterilizadas em uma solução de hipoclorito de sódio 1%, durante 10 minutos e em seguida lavadas em água corrente, para retirar o excesso de hipoclorito. Utilizaram-se 4 repetições de 10 sementes que foram embebidas em água destilada, nas mesmas condições do experimento de germinação, descrito anteriormente. O peso fresco de cada semente foi determinado diariamente até a protrusão da radícula.

2.4 Germinação

A germinação das sementes foi realizada utilizando-se quatro repetições de 25 sementes cada. As sementes foram previamente esterilizadas em uma solução de hipoclorito de sódio 1%, durante 10 minutos e em seguida lavadas em água corrente, para retirar o excesso de hipoclorito. As sementes foram embebidas em 7mL de água destilada ou em solução de 100 μ M de ABA (Sigma) entre folhas de papel de germinação, em placas de Petri de 90mm de diâmetro. As placas de Petri foram colocadas em BOD reguladas sob luz e temperatura constante de 25°C (Souza et al., 1999). A solução de ABA foi preparada dissolvendo o composto em KOH, seguida de neutralização em 1 N HCl (Silva et al., 2004). A germinação foi avaliada diariamente, as sementes foram consideradas germinadas quando apresentaram protrusão radicular maior que 1mm.

2.5 Caracterização morfológica dos frutos e das sementes

Os frutos dispersos, recém coletados, foram analisados externamente e internamente. Os frutos e as sementes tiveram suas cores e formas avaliadas visualmente e as dimensões quantificadas com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo) através da avaliação de dez amostras. Para a caracterização morfológica das sementes, foram utilizadas sementes secas e embebidas em água destilada, antes e após a germinação. Para a observação das estruturas internas das sementes, foi realizado um corte no sentido longitudinal com o auxílio de um bisturi. Imagens dos frutos e das sementes foram obtidas com o uso de uma câmera digital (Cânon Power Shot S40, 4.0M pixels) acoplada a um microscópio estereoscópico (modelo Leica MZ 75).

2.6 Caracterização morfo-anatômica do endosperma micropilar e lateral

O endosperma micropilar e lateral das sementes de *G. americana* foram analisados morfo-anatomicamente através de microscopia eletrônica de varredura. As sementes foram embebidas, em água destilada, nas mesmas condições do experimento de germinação, por três dias e em seguida foram cortadas transversalmente, com o auxílio de um bisturi. As amostras foram fixadas em um fixador (Karnovsky modificado – Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2 e CaCl₂ 0,001M) por um período de 10 dias a 5°C.

Após a fixação, as sementes foram transferidas para uma solução de glicerol 30%, durante 30 minutos e, em seguida, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e cortadas longitudinalmente, com o auxílio de um bisturi, sobre uma superfície metálica resfriada com nitrogênio líquido. As amostras foram imersas em água destilada, durante 10 minutos, e fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas; em seguida foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de acetona (25, 50 e 75%), onde permaneceram por um

período de 10 minutos em cada concentração. Finalmente, as amostras foram transferidas para uma solução de acetona, com concentração de 100% durante 10 minutos, esta etapa foi repetida três vezes.

Em seguida, as amostras foram levadas a uma câmara hermeticamente fechada e resfriada a 5°C para a secagem ao ponto crítico. Os stubs foram envoltos em papel alumínio e foi fixada uma fita adesiva de carbono. As amostras foram prensadas sobre a fita adesiva e depois receberam um banho de ouro para aumentar sua resistência e condutividade elétrica, permitindo a melhor visualização das estruturas internas das sementes. A análise em microscopia de varredura (Leo Evo 40) foi realizada no laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise-estrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Os parâmetros morfo-anatômicos avaliados no endosperma micropilar foram espessura, diâmetro celular e espessura da parede celular, e os do endosperma lateral foram diâmetro celular e espessura da parede celular. A espessura do endosperma micropilar foi quantificada a partir da média do comprimento das camadas de células que constituem o endosperma micropilar de seis sementes.

A quantificação do diâmetro das células foi realizada a partir de duas medições em dez células de três sementes, no sentido de maior comprimento e menor comprimento, onde se obteve um valor médio por célula. Para a quantificação da espessura média da parede celular foram utilizadas 10 células de três sementes. A quantificação dos parâmetros foi feita no próprio microscópio de varredura, Leo Evo 40.

2.7 Crescimento do embrião

Para a avaliação do crescimento dos embriões, as sementes foram previamente esterilizadas em uma solução de hipoclorito de sódio 1%, durante

10 minutos, e em seguida lavadas em água corrente, para retirar o excesso de hipoclorito. As sementes de *G. americana* foram embebidas em água destilada ou em solução de 100 μ M de ABA, nas mesmas condições do experimento de germinação. A cada três dias de embebição, dez embriões foram isolados das sementes com o auxílio de um bisturi e o comprimento dos embriões foi obtido a partir de um paquímetro digital (Mitutoyo), onde se mensurou o comprimento dos embriões intactos e dos cotilédones e hipocótilo.

2.8 Determinação da força de ruptura

Para a determinação da força de ruptura do endosperma micropilar, as sementes foram tratadas em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos e colocadas para embeber em água destilada ou em solução de 100 μ M de ABA à temperatura de 25°C. A cada 2 dias, 30 sementes tiveram o endosperma micropilar isolado, sem que houvesse danos, com o auxílio de um bisturi. A determinação da força requerida para a ruptura do endosperma micropilar foi realizada de acordo com Silva et al. (2004); Pinto et al. (2007). Para a obtenção dos dados, foi utilizado o aparelho texturômetro (Stable Microsystems Texture analyser) do Laboratório de Microestrutura e Arquitetura Alimentar do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA. Assim, na parte superior do aparelho foi acoplada uma sonda de ponta hemisférica de 2mm de diâmetro, e, na base, um bloco de polivinil com orifício de 2,2mm de diâmetro.

O endosperma micropilar, isolado da semente, foi encaixado na sonda, graças ao orifício deixado pela ponta da radícula do embrião, onde foi perfurado pela sonda, devido à movimentação da sonda para baixo, em direção ao bloco de polivinil. A força requerida para a ruptura do endosperma micropilar foi expressa em Newton (N), e utilizada como um parâmetro de resistência mecânica do endosperma micropilar durante a germinação das sementes.

2.9 Quantificação da atividade da enzima endo- β -mananase

As sementes de *G. americana* foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 1%, durante 10 minutos, e colocadas para embeber em água destilada ou em solução de 100 μ M de ABA à temperatura constante de 25°C, onde, a cada dois dias, 30 sementes tiveram o endosperma micropilar isolado. Os endospermas micropilares foram macerados em nitrogênio líquido até virarem pó e as amostras foram armazenadas em deep freezer (-80°C), até o momento da extração da enzima.

A extração da enzima foi realizada em 200 μ l de tampão de extração de endo- β -mananase (Hepes 0,1M, pH 8,0 com 0,5M de NaCl) para 30 endospermas micropilares (Pinto et al., 2007). Para quantificar a enzima foi utilizado um gel de espessura de 0,75mm contendo 24mL de LBG (Locust Bean Gun) 0,1%, 0,24g de Agarose tipo III-A (Sigma) e 6mL de tampão McIlvaine pH=5 (11mL de 1M de ácido cítrico, 50mL de 0,4M Na₂HPO₄2H₂O (fosfato de sódio bihidratado) e 149mL de água destilada) sobre um suporte de gel (GE Healthcare GelBond film for agarose gel). Com o auxílio de um compressor aspirador (Dia Pump) foram realizados orifícios no gel, sendo aplicados 2 μ l do extrato contendo endo- β -mananase. Após todas as aplicações o gel, permaneceu em uma BOD a 25°C durante 24 horas. Em seguida, o gel foi lavado em água destilada, a revelação foi realizada através da imersão do gel em 200mL de tampão McIlvaine pH=5,0, durante 30 minutos.

Depois o gel foi lavado novamente em água destilada, para remover o excesso do tampão. Para a coloração do gel foi utilizada uma solução de Congo Red 0,5% durante 15 minutos. Após essa etapa, o Congo Red foi descartado e foi adicionado etanol durante 10 minutos, seguido de uma solução de 1M de NaCl durante 5 minutos. Todas as etapas de revelação foram realizadas sobre plataforma agitadora com movimentos rotatórios na horizontal. A atividade da enzima foi identificada através da ocorrência de círculos brancos no gel. Para a

quantificação da atividade da enzima, foram medidos os diâmetros dos círculos com o auxílio de um paquímetro digital. O cálculo da atividade da enzima endo- β -mananase das amostras foi feito através da comparação com a curva padrão gerada pela enzima endo- β -mananase de *Aspergillus niger*. O cálculo da atividade foi realizado de acordo com Downie et al. (1994).

2.10 Localização da atividade da enzima endo- β -mananase

As sementes de *G. americana*, esterilizadas em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, foram embebidas em água destilada ou em solução de 100 μ M de ABA à temperatura constante de 25°C. A cada dois dias de embebição, dez sementes foram cortadas longitudinalmente, com o auxílio de um bisturi e colocadas em contato com um gel de atividade de endo- β -mananase de 0,75mm de espessura. O gel foi preparado a partir de 24mL de LBG (Locust Bean Gun) 0,1%, 0,24g de Agarose tipo III-A (Sigma) e 6mL de tampão McIlvaine pH 5,0 contendo 11mL de 1M de ácido cítrico, 50mL de 0,4M Na₂HPO₄·2H₂O (fosfato de sódio bihidratado) e 149mL de água destilada, sobre um suporte de gel (Gelbond film). Em seguida, o gel foi colocado dentro de uma câmara úmida durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período as sementes foram removidas com o uso de uma pinça e o gel foi rapidamente lavado em água destilada. A revelação do gel foi realizada de acordo com as etapas descritas anteriormente. Em seguida, o gel foi fotografado utilizando-se uma máquina digital (Cyber-shot DSC-S500 Sony). A atividade da enzima foi detectada a partir da presença de pontos claros no gel.

2.11 Extração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada a partir do protocolo de microextração de DNA genômico (Ferreira & Grattapaglia, 1995) adaptado. As folhas de plantas adultas de *Genipa americana* foram maceradas em nitrogênio líquido até

virarem pó, aproximadamente 1g de material foi transferido para um microtubo de 1,5mL. Para cada amostra foram adicionados 800µL de tampão de extração CTAB com 1,5µL de β-mercaptoetanol, onde permaneceram aquecidos em banho-maria à 65°C durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado ao tampão de extração o tecido macerado, que foi incubado em banho-maria à 65°C durante 1 hora, sendo agitado a cada 15 minutos.

Os tubos foram retirados do banho-maria e permaneceram resfriando durante cinco minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a primeira extração, adicionando 600µL de solvente orgânico (clorofórmio-álcool isoamílico) e agitando levemente durante 10 minutos. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 12000 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde foram adicionados 600µL de clorofórmio e novamente as amostras foram agitadas por 10 minutos e centrifugadas por 5 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, onde foram adicionados 90µL de acetato de sódio (NaAc pH 4,6) e 900µL de isopropanol gelado. As amostras foram incubadas durante 30 minutos à -20°C e centrifugadas durante 3 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 300µL de etanol 70% gelado, agitando levemente, os microtubos foram centrifugados durante 3 minutos e o sobrenadante descartado. O pelete foi seco em câmara de fluxo laminar por 2 horas; em seguida, o pelete foi ressuscitado em 49µL de tampão TE (pH 8,0) e armazenado a 5°C. A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 1% (0,7g de agarose, 70mL de tampão TAE 1% e 2µL de brometo de etídio). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese durante 40 minutos a 100W e as imagens foram registradas através de um aparelho de fotodocumentação Spectroline (Ultraviolet Transilluminator). O DNA genômico foi quantificado em Nanodrop (Spectrophotometer ND 1000).

2.12 Desenho dos primers degenerados

Regiões altamente conservadas do cDNA de endo- β -mananase presentes em sementes de várias espécies como o café (*Coffea arabica*) (AJ278996) e da Silva (2002), tomate (*Solanum esculentum*) (AY046588, AF184238, AF290893, AF017144), alface (*Lactuca sativa* L.) (AJ315978) e cenoura (*Daucus carota* L.) (AF545503), disponíveis em banco de dados como GenBank/NCBI – National Center for Biotechnology Information, foram utilizados para confecção dos primers degenerados.

Essas seqüências foram alinhadas através do Programa de Formação de Clusters de Seqüências (ClustalW), no qual, a partir da estimativa de semelhança entre as seqüências, alinhadas par a par, foram possíveis identificar as regiões conservadas. Pequenas regiões idênticas, em genes homólogos, são identificadas, caracterizadas e utilizadas para a localização de domínios similares em outras espécies onde este gene ainda não foi explorado.

As regiões altamente conservadas foram utilizadas para desenhar os primers, através do programa Primerquest, que gerou quatro pares de primers *forward* e *reverse* (Tabela 1). A identificação de regiões homólogas no cDNA dessas espécies, indica que a mesma região pode ocorrer em sementes de *G. americana*.

TABELA 1 Sequência dos quatro pares de primers, *Forward* e *Reverse*, onde a letra N representa as bases nitrogenadas AG/GT, a letra R representa A/G e a letra Y C/T. UFLA, Lavras, MG, 2009.

Primer		Sequência
1	<i>Forward</i>	GGNACNGARTTYGTNATG
	<i>Reverse</i>	CCRTCRCRAANGCCCA
2	<i>Forward</i>	CCCCCGGAGTCTATGATGAAC
	<i>Reverse</i>	GTGCACCGTCGCTCTGTCC
3	<i>Forward</i>	ATCCCGATATTTGGCTGTCTGG
	<i>Reverse</i>	CGTCCGGTTGATGGGTTCTG
4	<i>Forward</i>	GAAATGGCAACTTACGTCAAATCA
	<i>Reverse</i>	CACCTGCAATGCCTCCTCTTC

2.13 Reação da polimerase em cadeia

Para a amplificação do DNA genômico de *G. americana*, foi utilizada a reação da polimerase em cadeia (PCR). Foram utilizados 1µL DNA (20ng), 2µL de tampão de PCR (10X), 1µL do primer forward (10µmol.L⁻¹), 1µL do primer reverse (10µmol.L⁻¹), 1µL de MgCl₂ (50µmol), 1µL de DNTP (10mmol.L⁻¹), 1µL de enzima Taq polimerase (5U/µL) e 12µL de água ultra pura. Os reagentes foram colocados em microtubos de 200µL; em seguida foram levados para um termociclador (Mastercycler Eppendorf). Imediatamente, foi realizada a amplificação utilizando-se o programa: 94°C por 3', com o ciclo de 94°C por 20'', para que ocorresse a desnaturação do DNA, 55°C por 30'' para o anelamento dos primers, 72°C por 40'' para extensão dos iniciadores pela Taq polimerase, sendo este ciclo repetido 30 vezes e à temperatura de 72°C por 10'. Essa reação foi necessária para obter uma quantidade de material amplificado suficiente para trabalhos futuros. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% (0,7g de agarose, 70mL de tampão TAE 1% e 2µL de brometo de

etídio) e submetidas a eletroforese durante 40 minutos a 100W. Para identificar se a região amplificada foi à região de interesse, utilizou-se um marcador de peso molecular de DNA (Amresco – DNA Molecular Weight Ladders) de 100 pares de base. O gel foi visualizado sob luz UV e a identificação da região amplificada de interesse foi feita através da comparação do produto da PCR com o marcador de peso molecular, em seguida imagens foram registradas através de um aparelho de fotodocumentação Spectroline (Ultraviolet Transilluminator).

2.14 Purificação do produto da PCR

O produto da PCR, analisado em gel de agarose, foi purificado para a obtenção da região amplificada de interesse. Para a purificação, foi utilizado um Kit de purificação de DNA em bandas de gel de agarose (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit Amersham Biosciences). Com o auxílio de uma lâmina de barbear, foi realizado um corte no gel contendo a banda de DNA a ser purificada. O corte foi realizado o mais próximo possível da banda de DNA. As fatias do gel, contendo o DNA, foram cortadas em pequenos pedaços e transferidas para um tubo de 1,5mL previamente pesado.

Foram adicionados 2950µL de tampão capture para 295mg de gel de agarose. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex e incubados a 60°C por aproximadamente 15 minutos, até que a agarose fosse totalmente dissolvida. Os tubos foram centrifugados rapidamente para a coleta da amostra. A coluna de GFX foi acoplada dentro de um tubo coletor, as amostras foram transferidas para a coluna GFX e em seguida incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto. O tubo GFX foi centrifugado à velocidade máxima durante 1 minuto. Todo o líquido foi descartado, esvaziando completamente o tubo coletor. A coluna GFX, contendo o DNA, foi colocada novamente dentro do tubo coletor vazio. Em seguida, foram adicionados 500µL de Wash buffer, e centrifugados a velocidade máxima durante 30 segundos.

O tubo coletor foi descartado e a coluna GFX foi transferida para um novo eppendorf de 1,5mL, onde aplicaram-se 50µL de uma solução tampão (TE pH 8,0) diretamente na fibra de vidro da coluna GFX. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas a velocidade máxima durante 1 minuto, para recuperar o DNA purificado. O DNA purificado foi armazenado a 5°C.

2.15 Sequenciamento gênico

O produto da PCR purificado foi submetido a uma nova PCR, para obtenção de uma quantidade de DNA suficiente para o sequenciamento. Para a reação, foram utilizados 1µL do produto de PCR purificado, 2µL de tampão de PCR (10X), 1µL do primer forward ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$), 1µL do primer reverse ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$), 1µL de MgCl_2 (50µmol), 1µL de DNTP mix (10mmol.L^{-1}) 1µL da enzima Taq polimerase (5U/µL) e 12µL de água ultra pura. Os reagentes foram colocados em microtubos de 200µL; em seguida, foram levados para um termociclador (Mastercycler Eppendorf). Foi realizada a amplificação utilizando-se o programa: 94°C por 3', o ciclo foi ajustado para 94°C por 20'', 55°C por 30'', 72°C por 40''. Este ciclo foi repetido 30 vezes e em seguida a temperatura foi reduzida para 72°C por 10'.

Para a purificação do produto da PCR, foi utilizado o Kit de Purificação do DNA em Solução (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit Amersham Biosciences). Inicialmente uma coluna GFX foi acoplada a um tubo coletor e adicionaram-se 500µL de capture buffer, 17µL do produto da PCR foi transferido para a coluna GFX e centrifugou-se por 30 minutos em rotação máxima. A solução do tubo coletor foi descartada e adicionaram-se 500µL de wash buffer na coluna GFX. O tubo coletor juntamente com a coluna GFX foram centrifugados durante 30 segundos, o tubo coletor foi descartado e a coluna foi transferida para um eppendorf de 1,5mL. Foram aplicados, diretamente

sobre a coluna GFX, 50 μ L de TE (pH 8,0). A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida centrifugada por 1 minuto para recuperar o DNA purificado. O DNA foi analisado em gel de agarose e quantificado em Nanodrop (Spectrophotometer ND 1000). O DNA purificado foi liofilizado durante 18 horas e enviado para o sequenciamento.

2.16 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANAVA), pelo programa Sisvar 5.0 (Furtado, 2007), onde as médias do crescimento do embrião foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As médias dos resultados da força requerida para a ruptura do endosperma micropilar, da atividade da enzima e as médias dos parâmetros de microscopia foram comparadas pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. Para analisar a redução da força de ruptura do endosperma micropilar em função da atividade da enzima endo- β -mananase, foi realizado um ajuste da equação de regressão linear através do programa SigmaPlot2000.

3 RESULTADOS

3.1 Curva de embebição

Observou-se que a embebição das sementes *G. americana* em água segue um padrão trifásico, durante o período estudado, 26 dias (Figura 1). A fase I foi marcada por uma rápida absorção de água e um aumento significativo do peso fresco das sementes, com duração de aproximadamente cinco dias. Após o sexto dia de embebição as sementes entraram na fase II, onde o peso fresco manteve-se estável. Esta fase de embebição demonstrou-se a mais longa, com duração de aproximadamente 12 dias. A fase III iniciou-se após o décimo oitavo dia de embebição, onde as sementes novamente apresentaram aumento do peso, como consequência da germinação (protrusão da radícula).

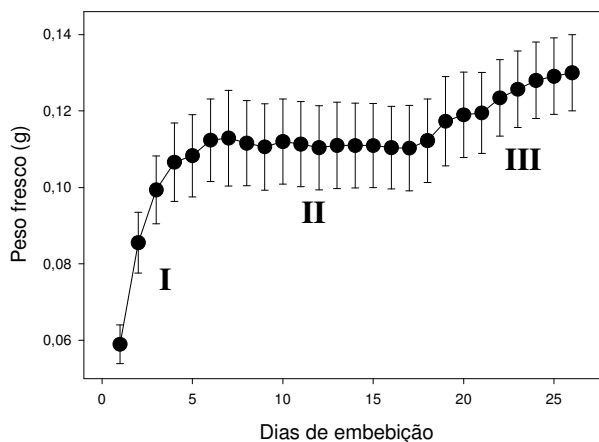


FIGURA 1 Curva de embebição das sementes de *G. americana* com as fases I, II e III. Pontos indicam a média das 4 repetições de 10 sementes e as barras indicam o desvio padrão médio.

3.2 Germinação

A germinação das sementes de *G. americana* embebidas em água, sob luz constante e temperatura de 25°C, teve início após o oitavo dia de embebição, 50% de germinação foram obtidas aos onze dias de embebição e a porcentagem máxima de germinação, em torno de 90%, foi alcançada aos dezessete dias (Figura 1). As sementes embebidas em 100µM de ABA não apresentaram germinação (Figura 2).

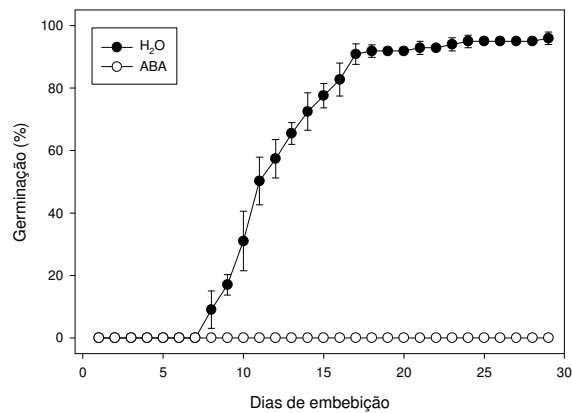


FIGURA 2 Curva de germinação das sementes de *G. americana* embebidas em água e em 100µM de ABA. Pontos representam médias das quatro repetições com 25 sementes cada, e as barras indicam o desvio padrão médio.

3.3 Caracterização morfológica dos frutos e das sementes

Os frutos de *G. americana* são carnosos, do tipo baga indeiscentes, com formato arredondado e diâmetro médio de 68,18mm; os frutos imaturos apresentam coloração esverdeada (Figura 3A). Quando maduros os frutos apresentam uma coloração marrom-esverdeada (Figura 3B) e com aroma característico, composto por uma casca mole, fina e enrugada (Figura 3B). O mesocarpo é carnudo, amarelado e adocicado, cada fruto possui em média 105 sementes.

As sementes possuem formato variado, arredondadas a ovaladas, sua coloração é castanho-amarelada, com tegumento pouco enrugado, as faces são levemente convexas a planas e as bordas arredondadas (Figura 3D). Em geral as sementes são dispersas com 37,6% de umidade. Quando úmidas, apresentam uma mucilagem, remanescente do endocarpo, que fica aderida ao tegumento e depois de secas a mucilagem permanece como uma película pardo-esbranquiçada (Figura 3D). As sementes possuem um comprimento médio de aproximadamente 9,56mm, largura de 6,61mm e espessura de 1,84mm. São albuminosas (Figura 3E), com endosperma bastante rígido e que ocupa a maior parte da semente. O embrião é composto por dois cotilédones, hipocótilo e radícula, possui o formato de uma espátula, com coloração esbranquiçada, de comprimento médio de 6,1mm, possui cotilédones e hipocótilo bem diferenciados, os cotilédones são foliáceos, simétricos e com nervuras bastante visíveis (Figura 3F).

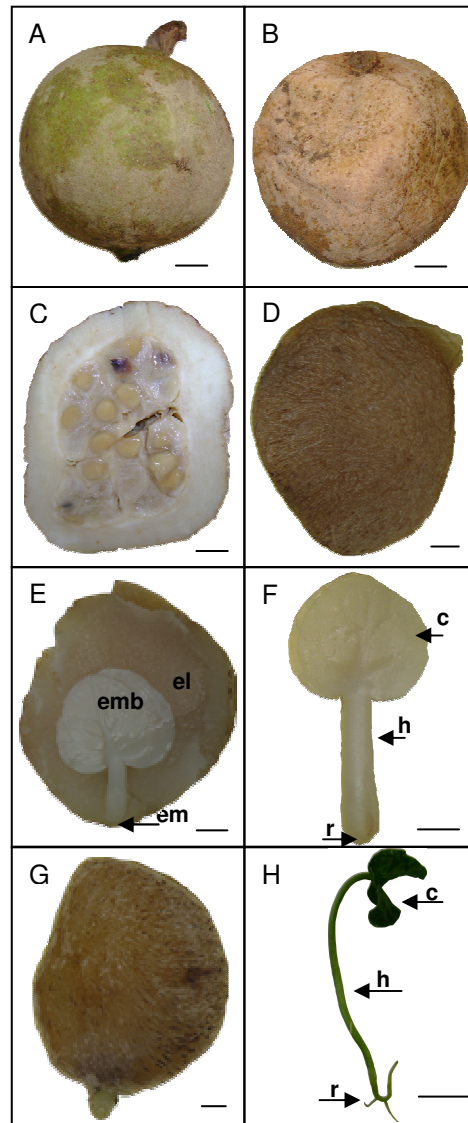


FIGURA 3 Foto do fruto verde (A); fruto maduro (B); corte transversal do fruto maduro (C); semente seca (D); corte longitudinal da semente com 3 dias de embebição, com endosperma lateral (el), endosperma micropilar (em) e embrião (emb) (E); embrião com cotilédones (c), hipocótilo (h) e radícula (r) (F); semente germinada (G); e plântula com cotilédones, hipocótilo e radícula (H). As barras de A a C e H indicam 1cm e de D a G indicam 1mm.

3.4 Caracterização morfo-anatômica do endosperma micropilar e lateral

Através de microscopia eletrônica de varredura observou-se que, aderido ao endosperma, encontra-se o tegumento. Ao tegumento encontra-se aderido resto da polpa do fruto que é remanescente do endocarpo. (Figura 4A). Foi possível observar que o endosperma micropilar das sementes de *G. americana* é formado por 6 a 8 camadas de células (Figura 4B), as quais juntas correspondem a uma espessura de aproximadamente 147,33 μ m (Tabela 2). As células do endosperma micropilar são achatadas, com formato poligonal alongado (Figura 4C), possuem diâmetro médio de 20,02 μ m e espessura da parede celular de 3,15 μ m (Tabela 2). As células do endosperma lateral são arredondadas com formato poligonal (Figura 4D), com diâmetro médio de 36,65 μ m e espessura média da parede celular de 6,34 μ m (Tabela 2), valores estatisticamente superiores aos encontrados para o endosperma micropilar.

TABELA 2 Parâmetros morfo-anatômicos do endosperma lateral e micropilar das sementes de *G. americana*. UFLA, Lavras, MG, 2009.

Endosperma	Parâmetros	Média (μ m)	Desvio (μ m)
Micropilar	espessura total	147,33	41,02
	diâmetro celular	20,02 A	4,2
	espessura da parede celular	3,15 a	0,74
Lateral	diâmetro celular	36,65 B	5,6
	espessura da parede celular	6,34 b	1,6

As letras maiúsculas comparam a variável diâmetro e as letras minúsculas comparam a variável espessura, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

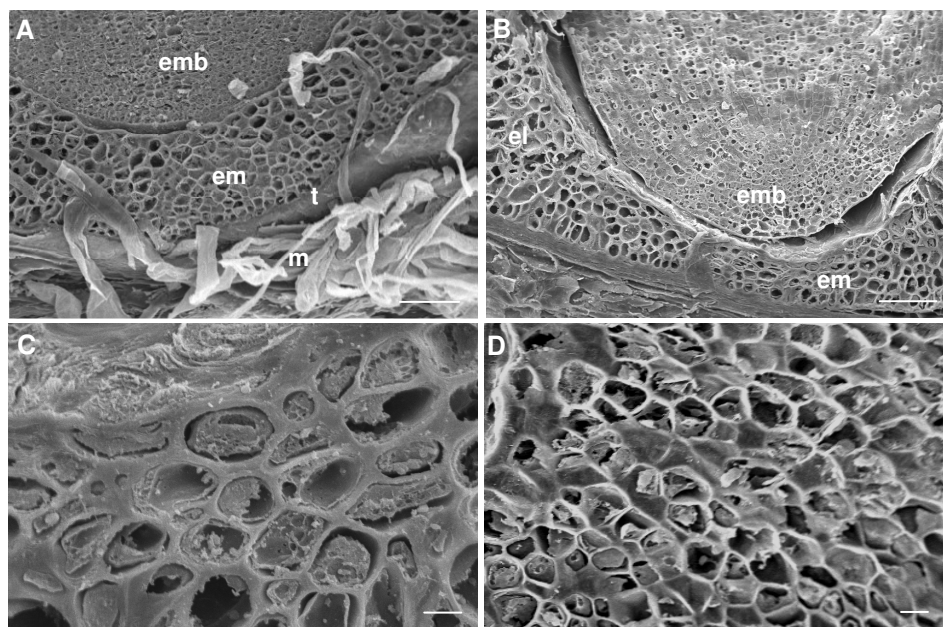


FIGURA 4 Microscopia eletrônica de varredura das sementes de *G. americana* embebidas em água por três dias. Visão geral da semente: embrião (emb), endosperma micopilar (em), tegumento (t) e mucilagem remanescente do endocarpo (m) (A); células do endosperma lateral (el), endosperma micopilar (em) e embrião (emb) (B); detalhe das células do endosperma micopilar (C) e endosperma lateral (D). Barras indicam 100 μ m para as Figuras A e B, 10 μ m para a Figura C e 20 μ m para a Figura D.

3.5 Crescimento do embrião

Os embriões das sementes de *G. americana* embebidas em água apresentaram crescimento significativo antes da protrusão da radícula (Figura 5A). Os embriões das sementes com um dia de embebição, em água, apresentaram 6,1mm de comprimento e após 15 dias de embebição os embriões atingiram aproximadamente 8,4mm de comprimento; um crescimento mais acentuado foi observado após 9 dias de embebição (Figura 5A). O crescimento

do embrião, dentro da semente, antes da protrusão da radícula foi de aproximadamente 2,3mm de comprimento, o que representa 38% de crescimento em relação ao seu tamanho inicial.

Das partes isoladas, o hipocótilo apresentou em média 2,8mm de comprimento, no primeiro dia de embebição em água; após 15 dias de embebição o hipocótilo atingiu 4,1mm de comprimento (Figura 5A). Já os cotilédones, no início da embebição em água apresentaram em média 3,2mm de comprimento e após 15 dias de embebição atingiram 4,3mm (Figura 5A). Os cotilédones cresceram 1,1mm antes da protrusão radícula, sendo responsáveis por 34% do crescimento total do embrião. Portanto, o hipocótilo foi a parte que apresentou maior crescimento antes da protrusão da radícula, sendo responsável por 46% do crescimento total do embrião.

Para as sementes embebidas em 100 μ M de ABA, foi observado um pequeno crescimento dos embriões até os 15 dias de embebição, que foi estatisticamente inferior aos valores obtidos em água, a partir do terceiro dia de embebição (Figura 5B). Os embriões das sementes embebidas em ABA tiveram um aumento de 0,6mm de comprimento, que representam 10% de crescimento (Figura 5B). Das partes isoladas, o hipocótilo foi responsável pelo crescimento, já o crescimento dos cotilédones não apresentou diferença estatística ao longo dos 15 dias de embebição.

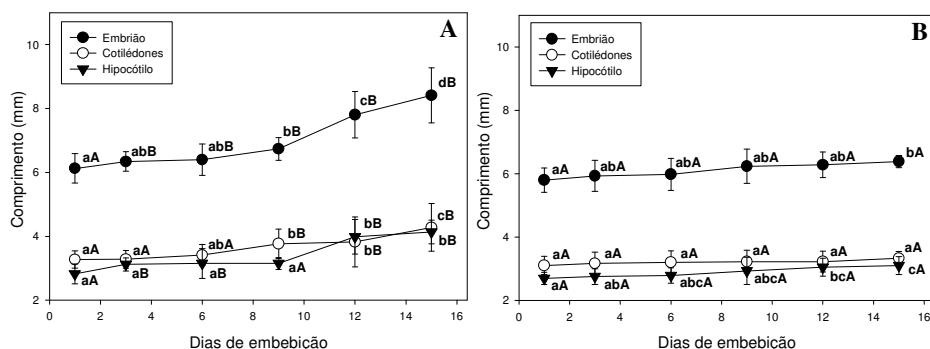


FIGURA 5 Comprimento dos embriões de sementes de *G. americana* embebidas em água (A) e em ABA (B), mostrando o crescimento total do embrião e das partes isoladas, hipocótilo e cotilédones. Os pontos representam a média de 10 repetições e as barras representam o desvio padrão. As letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos (água ou ABA) e as letras maiúsculas comparam entre os tratamentos (água e ABA) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.6 Determinação da força de ruptura

A força requerida para a ruptura do endosperma micropilar das sementes de *G. americana*, embebidas em água e em 100 μ M de ABA, apresentou uma queda significativa ao longo dos 16 dias de embebição (Figura 6). Para as sementes embebidas em água a força de ruptura aos dois dias de embebição foi 3,0N (Newton) apresentando uma queda significativa até o oitavo dia de embebição atingindo 1,7N (Figura 6). Entre o oitavo dia até o décimo segundo dia de embebição não houve diferença significativa da força, apenas a partir do décimo segundo dia observou-se uma nova queda da força, que aos 16 dias de embebição atingiu 0,8N (Figura 6). A força de ruptura do endosperma micropilar durante 16 dias de embebição em água apresentou uma queda de 2,2N. Foram observados dois estágios significativos de queda na força de ruptura, o primeiro estágio de queda ocorreu no início da embebição até o oitavo

dia, a partir daí foi observada uma estabilização até o décimo segundo dia. O segundo estágio de queda ocorreu a partir do décimo segundo dia até o décimo sexto dia de embebição.

Para as sementes embebidas em 100 μ M de ABA, a força de ruptura iniciou-se aos dois dias de embebição com 3,3N, a partir daí houve queda na força até o oitavo dia de embebição, atingindo 2,5N. A partir do oitavo dia de embebição, não foi observada queda significativa na força de ruptura até os décimo sexto dia (Figura 6). Para as sementes embebidas em ABA houve um decréscimo de 0,9N e foi observado apenas um estágio de redução na força de ruptura do endosperma micropilar.

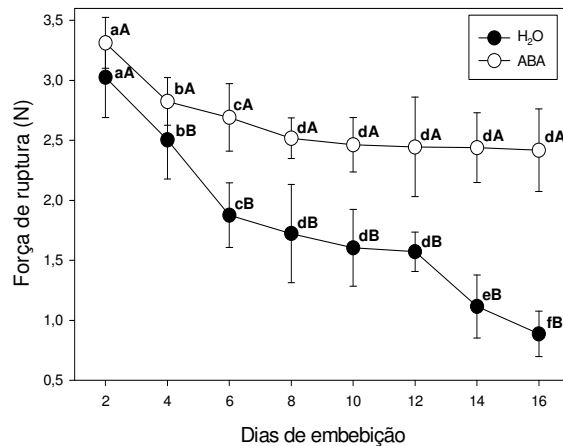


FIGURA 6 Força requerida para ruptura do endosperma micropilar das sementes de *G. americana* durante 16 dias de embebição em água e em 100 μ M de ABA. Os pontos indicam as médias de 30 sementes, as barras indicam o desvio padrão. As letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos (água ou ABA) e as letras maiúsculas comparam entre os tratamentos (água e ABA) pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

3.7 Quantificação da atividade da enzima endo- β -mananase

A atividade da enzima endo- β -mananase aumentou significativamente no endosperma micropilar das sementes de *G. americana* embebidas em água (Figura 7). Todavia, até o quarto dia de embebição não foi observada diferença significativa, a partir deste ponto até o oitavo dia de embebição a atividade aumentou significativamente. Em seguida, a atividade se manteve estável desde o oitavo dia de embebição até o décimo segundo dia; após esse ponto observou-se aumento significativo da atividade (Figura 7).

Para as sementes embebidas em 100 μ M de ABA, observou-se aumento significativo na atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar (Figura 7). Até os seis primeiros dias de embebição a atividade não apresentou aumento significativo. Porém, observou-se um aumento no oitavo dia de embebição que se manteve estável até o décimo segundo dia. A partir do décimo segundo dia de embebição até o décimo sexto dia, a atividade aumentou significativamente (Figura 7).

Quando se compara a atividade da enzima endo- β -mananase entre as sementes embebidas em água e ABA, de maneira geral, e principalmente, a partir do sexto dia de embebição, os valores de atividade apresentaram superiores estatisticamente para as sementes embebidas em água até o décimo sexto dia de embebição. Portanto, ABA inibiu parcialmente a atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar das sementes de *G. americana*.

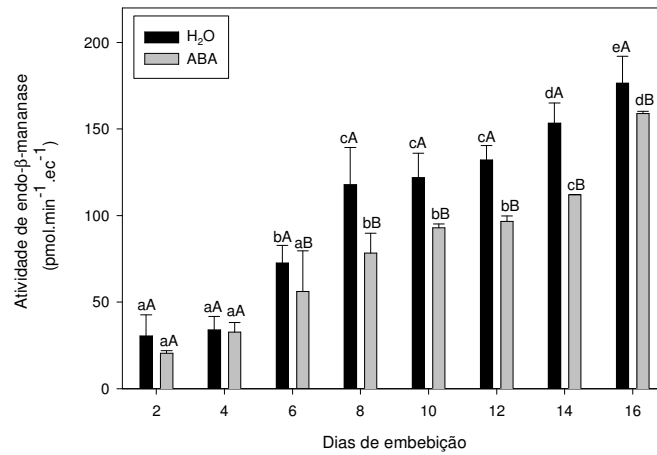


FIGURA 7 Atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar de sementes de *G. americana*, embebidas em água e em 100 μ M de ABA. Os dados representam as médias de três repetições e as barras representam o desvio padrão. As letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos (água ou ABA) e as letras maiúsculas comparam entre os tratamentos (água e ABA) pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

3.8 Força de ruptura X atividade da enzima endo- β -mananase

A força necessária para a ruptura do endosperma micropilar para as sementes embebidas em água e em ABA foi comparada à atividade da enzima endo- β -mananase (Figura 8). Os resultados confirmaram que a força de ruptura, tanto para as sementes embebidas em água como em ABA, apresentou um efeito linear negativo com o aumento da atividade de endo- β -mananase. As sementes embebidas em água apresentaram valor de r^2 superior (0,9132) aos das sementes embebidas em ABA (r^2 0,6742), indicando que, para as sementes embebidas em água, a atividade da enzima endo- β -mananase explicou melhor a força de ruptura do endosperma micropilar.

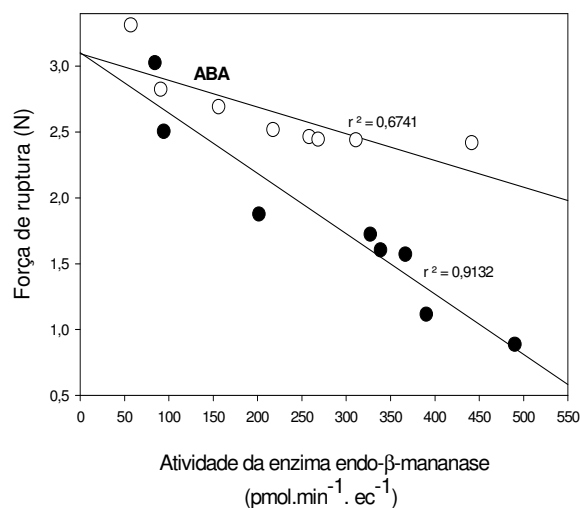


FIGURA 8 Força de ruptura X atividade da enzima endo- β -mananase em sementes de *G. americana* embebidas em água e em 100 μ M de ABA.

3.9 Localização da atividade da enzima endo- β -mananase

A técnica de impressão de tecidos permitiu localizar a atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma das sementes. Tanto para as sementes embebidas em água, como para as embebidas em ABA, foram detectados pontos claros no gel, evidenciando a presença da atividade da enzima. Para as sementes embebidas em água, a atividade da enzima foi detectada no endosperma micropilar e lateral antes da protrusão da radícula. Contudo, observou-se que a atividade da enzima ocorre inicialmente no endosperma micropilar, logo no início da embebição das sementes (Figura 9B), e posteriormente no endosperma lateral (Figura 9C). Próximo a protrusão da radícula observou-se atividade de endo- β -mananase em todo o endosperma da semente (Figura 9D).

Paras as sementes embebidas em 100 μ M de ABA, a atividade da enzima demonstrou o mesmo padrão de atividade das sementes embebidas em água,

iniciando no endosperma micropilar (Figura 9E) e posteriormente ocupando o endosperma lateral, antes da protrusão da radícula (Figura 9F e 9G).

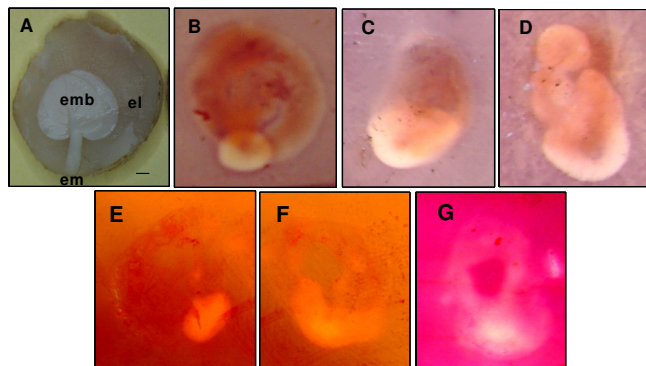


FIGURA 9 Impressão de tecidos de sementes de *G. americana* mostrando a atividade de endo- β -mananase. Corte longitudinal da semente (A) indicando a posição das estruturas, endosperma micropilar (em), endosperma lateral (el) e embrião (emb); sementes embebidas em água durante 6 (B), 12 (C), e 18 dias (D); sementes embebidas em 100 μ M de ABA durante 6 (E), 12 (F), e 18 dias (G). Os pontos claros no gel evidenciam a atividade de endo- β -mananase.

3.10 Reação da polimerase em cadeia

A partir da técnica de reação da polimerase em cadeia foi possível identificar dois pares de primers que foram eficientes na amplificação de bandas. Ao final da PCR, o primer 1 (Tabela 1) não apresentou amplificação de bandas, quando visualizado em gel de agarose sob luz ultravioleta, sendo então esse par de primers descartado para o gene da enzima endo- β -mananase. Já o primer 2 (Tabela 1), apresentou amplificação de várias regiões, onde em gel de agarose foi possível observar a formação de várias bandas, além da região esperada, sendo inespecífico para o gene da enzima de endo- β -mananase de *G. americana*. No entanto, os primers que apresentaram uma amplificação no comprimento de

banda esperado, quando comparados com o marcador de peso molecular, foram os primers 3 e 4 (Tabela 1), indicando serem específicos para o gene endo- β -mananase.

3.11 Sequenciamento do gene endo- β -mananase

Das amostras enviadas para o seqüenciamento, apenas uma delas foi seqüenciada satisfatoriamente. A seqüência apresentou 510 nucleotídeos, correspondendo a 170 aminoácidos (Figura 10). Essa seqüência de aminoácidos quando comparada em banco de dados (GenBank/NCBI) e alinhada com outras espécies apresentou 98% de similaridade com endo- β -mananase de *Coffea arabica* (Marraccini et al., 2001), que estudaram sementes de café germinadas (Figura 10), 85% de similaridade com endo- β -mananase de sementes não germinadas de *Daucus carota* (Homrichhausena et al., 2003). Para as sementes de *Solanum esculentum* germinadas (Bewley et al., 1997) observaram-se 77% de similaridade, enquanto 80% de similaridade ocorreram quando comparando sementes não germinadas de *Solanum esculentum* (Nonogaki et al., 2000) e apenas 72% de similaridade com sementes germinadas de *Lactuca sativa* (Wang et al., 2004).

```

Tomate G  YLKNHIEKVVTRLNSITKVAYKDDPTIMAWELMNEPRDQADYSGKTVNGWVQEMASSFVKS 224
Tomate NG YYKNHIKKVVTRFNTITGMYKDDSTIMAWELMNEPRNQADYSGNTLNAWVQEMASSFVKS 236
Cenoura  HYRNHVQRVITRINTITRVAYKDEPTIMAWELMNEPRCEADYSGRTVNGWVQEMASSFVKS 234
Café     YYKNHIKKVLTRINTISRVAYKDDPTVMAWELINEPRCQVDFSGKTLNAWVQEMATYVKS 235
Alface   YYKNHLKTILTRNSITGVDYKDDSTIFSWELMNEPRCQSDLSGKFLQEWIVEMAAEIKS 224
Jenipapo ----------ATYVKS 6

Tomate G  LDNKHLLLEIGMEGFYGDSIPERKSVNPGYQVGTDFISNHLINEIDFATIHAYTDQWVSGQ 284
Tomate NG LDNKHLLLEIGMEGFYGDSVPERKSINPGYQVGTDFISNHLIKEIDFATIHAYTDQWLSGQ 296
Cenoura  IDNKHLLLEIGMEGFYGDIMPEEKKQENPGYQVGTDFISNHLIKEIDFATIHAYPDIWLAQ 294
Café     LDNKHLLLEIGMEGFYGDSMPGKKQYNPGYQVGTDFITNNLIKEIDFATIHAYPDIWLSGQ 295
Alface   IDNKHLLLEIGLEGFYGESMPEEKKQNNPGYEVGTDFITNNGVNNVDFATIHMYPDQWVPGA 284
Jenipapo LDKKHLLLEIGMEGFYGDSMPGKKQYNPGYQVGTDFITNNLIKEIDFATIHAYPDIW--- 62

Tomate G  SDDAQLVWMEKWITSHWEDARNILKKPLVLAEFGKSSRGQGS----RDIFMSSVYRNVYN 340
Tomate NG SDDAQMIFMQKWMTSHWQDAKNILKKPLVLAEFGKSSRDPGYNQNIRDTFMSTIYRNIYS 356
Cenoura  NEDAQMAFMGRWMESHSTDAQTILKKPLVIAEFGKSSKDPGFTSSARDLYMGAVYSSIYK 354
Café     SDGAQMMFMRWMTSHSTDSKTILKKPLVIAEFGKSSKDPGYSLYARESFMAAIYGDIYR 355
Alface   SDEARAKFVEKWINAHIEDCDSILRKPLLIAEFGKSSWSSGYTVEARDEYFGGIFNTAYE 344
Jenipapo -AQNPFFWRLP-DFHGRVRVS-SIPLLCVLY----HVYTLPKQAVWTE-RCTDDVH 112

Tomate G  LAKEGGTMAGSLVWQLMAHGMENYDDGYCIVLGQTPSTQIISDQAHVMTALARSLN--- 397
Tomate NG LAKGGGTMGSLIWQLVAQMENYEDGYCIELGKNPSTAGIITSQSHAMTALAHLVKI-- 414
Cenoura  SARNGGTLGGGLVWQVLAQGMQPYDGYEIVLADNPTTAAVISRQSHAMAALSHQV--- 410
Café     FARRGG-IAGGLVWQILABCMPYADGYEIVLSCNPSTCRIISQSRQMTSLDHMSSNRT 414
Alface   SARNRGSCSGTTFWQVMAEGMDNWGDGYVVLDCNPSTAAIIAKQSORISSLNSSTNLEF 404
Jenipapo EKVDD-SLHRL-DRT-KTIGFH-IREIKORSRIQFTCQGHIHGRNLQ-YLQVA---- 160

```

FIGURA 10 Alinhamento da sequência de aminoácidos de endo-β-mananase de *G. americana* comparada com a sequência de outras espécies, como o café (CAC08208.1), tomate NG (AF184238), tomate G (O48540.2), alface (CAC51690.3) e cenoura (AAN34823.1).

4 DISCUSSÃO

A curva de embebição das sementes de *G. americana* apresentou um padrão trifásico, padrão proposto por Bewley & Black (1994). Em sementes de *C. arabica* o mesmo padrão foi identificado (Silva et al., 2004). A fase I teve início assim que as sementes foram colocadas em contato com a água, indicando que não existe impedimento físico do tegumento e do endosperma à entrada de água. Para as sementes de *C. arabica* a fase II demonstrou-se a fase mais longa, o mesmo ocorreu em *G. americana*, onde as sementes permaneceram sem aumento do peso fresco por aproximadamente 12 dias.

A germinação das sementes de *G. americana* embebidas em água, sob luz constante e temperatura de 25°C, teve início após o oitavo dia de embebição, resultados que coincidem com Andrade et al. (2000); Souza et al. (1999), aos quais relataram que sementes de *G. americana* quando colocadas para germinar, em temperatura na faixa de 20 a 30°C, apresentam início da protrusão da radícula entre 8 a 13 dias de embebição. Com onze dias de embebição, obtiveram-se 50% de germinação, e a porcentagem máxima de germinação (90%) foi alcançada aos 17 dias. A germinação de *G. americana* apresentou-se semelhante à germinação de *C. arabica*, onde a protrusão da radícula ocorre após cinco dias de embebição e 50% de germinação são obtidas aos dez dias de embebição (Silva et al., 2004).

Através da análise morfológica dos frutos de *G. americana*, observou-se que os frutos são do tipo carnosos, indeiscentes, semelhantes aos frutos de café (Borém et al., 2008), porém os frutos de *G. americana* possuem aproximadamente 105 sementes e os frutos de café possuem, normalmente, apenas duas sementes (Silva, 2002), podendo apresentar três ou mais sementes (Borém et al., 2008). Comparando as sementes de *G. americana* com as de *C.*

arabica, *G. americana* possuem um formato variado, levemente arredondada com comprimento médio de 9,56mm e espessura de 1,84mm, enquanto as sementes de café são elípticas com comprimento de 10-8mm e espessura de 6,5-9,5mm (Dedecca, 1957). Já o embrião da semente de *G. americana* possui o formato de uma espátula, com coloração esbranquiçada, bastante semelhante ao de *C. arabica*, composto por um eixo e dois cotilédones, mas os embriões de café são muito pequenos, com 3-4mm de comprimento (Dedecca, 1957) enquanto os de *G. americana* têm 6,1mm de comprimento.

Os embriões das sementes de *G. americana* crescem dentro da semente, antes da protrusão da radícula, o mesmo foi observado em embriões de *C. arabica*, nos quais este crescimento é devido à expansão e alongação celular, que se dá através da síntese de DNA, abundância e reorientação dos microtúbulos e acumulação de β -tubulina (Silva et al., 2004; 2008). Foi observado um aumento total no tamanho dos embriões de 2,3mm de comprimento, o que representa 38% de crescimento em relação ao seu tamanho inicial, resultado semelhante ao encontrado em sementes de *C. arabica*, onde os embriões crescem 35% em relação ao seu tamanho inicial. Ambas as partes, hipocótilo e cotilédones, contribuíram para o crescimento total do embrião, mas o hipocótilo foi quem apresentou maior crescimento, tanto em *G. americana* como em *C. arabica* (Silva et al., 2004).

Foi observado por Silva et al. (2004) que em sementes de *C. arabica* ocorre a formação de uma protuberância no endosperma micropilar, antes da germinação. A presença de protuberância é devido a força exercida sobre o endosperma micropilar pelo embrião, confirmando que existe um crescimento do embrião dentro da semente antes da protrusão da radícula. Já em sementes de *G. americana* esta protuberância não foi observada.

Em relação às características morfo-anatômicas, observadas através da microscopia de varredura, observou-se que o endosperma das sementes de *G.*

americana apresenta uma preferência ou predestinação da região onde a protrusão da radícula irá acontecer, pois as células do endosperma micropilar, localizadas próximo a ponta da radícula do embrião, possuem dimensões menores e paredes celulares menos espessas que as células do endosperma lateral. Esta predestinação do local da protrusão da radícula também foi proposta para as sementes de lobeira (Pinto et al., 2007), café (Silva et al., 2004) e tomate (Toorop et al., 2000).

O número de camadas de células, seis a oito, no endosperma micropilar de *G. americana*, foi superior ao número de camadas de células encontradas por Silva et al. (2004), em sementes de café, três a quatro camadas de células. As estruturas das células do endosperma de *G. americana* são semelhantes às de *C. arabica*, onde as células do endosperma lateral possuem formato poligonal com maiores dimensões e espessura de parede. As paredes celulares mais espessas indicam acúmulo de reservas necessárias durante a germinação de sementes, sugerindo que as paredes celulares do endosperma lateral armazenam substâncias em maiores quantidades do que as células do endosperma micropilar.

Em relação à força requerida para a ruptura do endosperma micropilar, das sementes de *G. americana* embebidas em água, foi observado um decréscimo significativo ao longo dos dias de embebição. Observaram-se dois estágios de queda, do segundo dia até o oitavo dia de embebição foi observada a primeira queda, a partir do oitavo dia de embebição até o décimo segundo dia, a força manteve-se estável, e somente a partir de doze dias de embebição observou-se a segunda queda na força de ruptura. A ocorrência de dois estágios de redução na força de ruptura também foi encontrada em sementes de tomate (Toorop et al. 2000), café (Silva et al., 2004) e lobeira (Pinto et al., 2007). A força de ruptura apresentou uma redução de aproximadamente 73%, onde a força inicial foi de 3N e o menor valor obtido, aos dezesseis dias de embebição,

foi de 0,88N, valores superiores aos encontrados em sementes de café (Silva et al., 2004), que foram de 1,36N e 0,57N, respectivamente. Os valores superiores para a força de ruptura encontrados em sementes de *G. americana* podem estar relacionados com o número de camadas de células do endosperma micropilar, seis a oito, que é superior ao número de camadas de células das sementes de café, três a quatro camadas (Silva et al., 2004).

O decréscimo da força de ruptura coincidiu com o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar. Estes resultados foram semelhantes aos resultados encontrados em sementes de tomate (Groot et al., 1987; Toorop et al., 2000) café (Silva et al., 2004) e lobeira (Pinto et al., 2007). Embora se esperasse que ocorresse uma atividade de endo- β -mananase superior em *G. americana* em relação a *C. arabica*, devido ao maior número de camadas de células do endosperma micropilar, isto não ocorreu. Na verdade foi observado o contrário, ou seja, todos os valores de atividade encontrados por Silva et al. (2004) no endosperma micropilar de *C. arabica* foram superiores aos de *G. americana*. Isto talvez explique os resultados para a força de ruptura do endosperma micropilar bem superiores para *G. americana*, quando comparado com *C. arabica*.

O primeiro estágio de redução da força de ruptura do endosperma micropilar coincidiu com o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase; esses resultados foram semelhantes aos resultados encontrados em sementes de tomate (Groot et al., 1987; Toorop et al., 2000) café (Silva et al., 2004) e lobeira (Pinto et al., 2007). Assim, a primeira queda na força não apresentou correlação com o crescimento do embrião, pois durante os oito primeiros dias de embebição o embrião não apresentou crescimento significativo.

A segunda queda na força de ruptura também se correlacionou com o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase, mas segundo Silva et al. (2004); Pinto et al. (2004) não se pode excluir a possibilidade de o crescimento

do embrião, durante a germinação, também contribuir para a segunda fase de enfraquecimento do endosperma micropilar. A partir do oitavo dia de embebição houve crescimento significativo do embrião. Portanto, sugere-se que, a partir desse momento o embrião começa a adquirir força suficiente, potencial de pressão, para iniciar o rompimento do endosperma micropilar, contribuindo para o decréscimo na força de ruptura.

No entanto, as duas fases de queda da força de ruptura coincidiram com o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar das sementes. Resultados semelhantes foram encontrados por Groot et al. (1987); Toorop et al. (2000); Silva et al. (2004); Pinto et al. (2007), indicando que a atividade da enzima endo- β -mananase está relacionada com o enfraquecimento do endosperma micropilar. Sementes de *G. americana* que tiveram o endosperma micropilar removido antes do experimento de germinação, apresentaram protrusão da radícula no terceiro dia (dados não mostrados), indicando que o endosperma apresenta resistência mecânica ao crescimento do embrião; e, para que a germinação ocorra, o endosperma micropilar precisa ser enfraquecido.

A localização da atividade da enzima endo- β -mananase foi confirmada pela técnica de impressão de tecidos, onde a atividade foi detectada tanto no endosperma lateral como no endosperma micropilar antes da protrusão da radícula; o mesmo foi encontrado por Silva et al. (2004) estudando sementes de café. Tanto para as sementes de *G. americana* como para as sementes de *C. arabica* a atividade de endo- β -mananase ocorreu inicialmente no endosperma micropilar e posteriormente no endosperma lateral, antes da protrusão da radícula. Sugere-se que exista um padrão de atividade da enzima endo- β -mananase de acordo com a família. Para a família Solanaceae, observando as sementes de *S. esculentum* (Toorop et al., 1996) e *S. lycocarpum* (Pinto et al., 2007), a atividade da enzima é detectada no endosperma micropilar antes da

protrusão da radícula e somente após a germinação a atividade é observada no endosperma lateral. Já para a família Rubiaceae, comparando os dados de *G. americana* com os resultados encontrados por Silva et al. (2004) em sementes de *C. arabica*, a atividade da enzima é detectada no endosperma lateral e micropilar antes da protrusão da radícula, embora em ambas as famílias a atividade sempre inicie no endosperma micropilar.

A atividade da enzima no endosperma micropilar, antes da germinação, pode estar relacionada com a degradação do endosperma para facilitar a protrusão da radícula, e a atividade no endosperma lateral, após a germinação, está relacionada com a mobilização de reservas da parede celular, resultando em produtos que serão usados para o crescimento das plântulas (Voigt & Bewley, 1996). Assim, sugere-se que as espécies que apresentem crescimento expressivo do embrião antes da germinação, 30 a 40% do tamanho original, como *G. americana*, *C. arabica* e *A. crassiflora*, onde o crescimento do embrião é de 300% antes da protrusão da radícula, Silva et al. (2007), possuam atividade da enzima no endosperma lateral antes da protrusão da radícula. Já as espécies onde o crescimento do embrião só é expressivo após a germinação, como nas sementes de tomate e lobeira, a atividade no endosperma lateral ocorre somente após a protrusão da radícula. Além disso, especula-se que a atividade de endo- β -mananase no endosperma lateral antes da protrusão da radícula, contribua para o crescimento do embrião, necessário para gerar força suficiente para superar a resistência imposta pelo endosperma.

As sementes de *G. americana* embebidas em ABA tiveram a germinação completamente inibida. No geral, não houve crescimento do embrião, para as sementes embebidas em ABA, porém o hipocótilo apresentou um pequeno aumento de comprimento, que pode ser devido à entrada de água na semente, causando uma pequena expansão celular, já que ABA não impede a entrada de água na semente. Estudos realizados por Silva et al. (2008)

mostraram que ABA, além de inibir a germinação, inibe o crescimento e a divisão celular dos embriões das sementes de café, ABA também inibe a acumulação de β -tubulina, a organização transversal dos microtúbulos e replicação do DNA nuclear dos embriões durante a embebição, fatores envolvidos com a divisão celular.

ABA também inibiu a segunda queda na força de ruptura do endosperma micropilar das sementes. Estes resultados coincidem com os observados por Toorop et al. (2000); Chen & Bradford (2000); Wu et al. (2001); Silva et al. (2004); Pinto et al. (2007). A primeira queda na força de ruptura ocorreu mesmo para as sementes embebidas em ABA, apesar de estatisticamente inferior aos valores observados nas sementes embebidas em água. O decréscimo na força de ruptura ocorreu do segundo ao oitavo dia de embebição, sendo que a partir do oitavo dia a força se manteve estável até os 16 dias de embebição. De acordo com Pinto et al. (2007), o primeiro estágio de enfraquecimento do endosperma micropilar de sementes de lobeira não é inibido por ABA, e este enfraquecimento está relacionado com a atividade de endo- β -mananase, já o segundo estágio, que é essencial para completar a germinação, é controlado por ABA, através da inibição do crescimento do embrião.

No entanto, ABA não inibiu completamente a atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar das sementes de *G. americana*, apenas causou redução da atividade, resultados que se assemelham com Toorop et al. (2000); Silva et al. (2004); Pinto et al. (2007). Em sementes de café, embebidas em ABA, a atividade da enzima foi reduzida para aproximadamente 10% em relação às sementes embebidas em água (Silva et al., 2004). O fato de ABA não inibir a atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar das sementes de *G. americana*, mas inibir o crescimento do embrião confirma o que já foi discutido acima, onde a segunda queda na força de ruptura, que é inibida por ABA, está relacionada com a inibição do crescimento do embrião.

A localização da atividade de endo- β -mananase através da técnica de impressão do tecido, para as sementes embebidas em ABA, mostrou-se semelhante aos resultados encontrados em água. Para as sementes de tomate ABA não inibiu a atividade da enzima no endosperma micropilar antes da protrusão da radícula (Toorop et al., 1996), os mesmos resultados foram encontrados por Pinto et al. (2007) em sementes de lobeira. Nonogaki et al. (2000), estudando o cDNA de endo- β -mananase no endosperma micropilar das sementes de tomate, observaram que o gene é expresso no endosperma micropilar antes da protrusão da radícula e esta expressão não é inibida por ABA. Esses resultados diferem dos resultados encontrados em sementes de café (Silva et al., 2004), onde ABA não inibiu a atividade da enzima no endosperma lateral, mas a atividade no endosperma micropilar foi inibida. Isto se deve ao fato de ABA inibir duas isoformas da enzima endo- β -mananase (pI 4,5 e pI 6,5) no endosperma micropilar das sementes de café.

Assim, a atividade de endo- β -mananase é necessária no início do processo de germinação, promovendo o enfraquecimento dos tecidos do endosperma micropilar, que conferem uma resistência mecânica a protrusão da radícula. Depois, com o endosperma micropilar enfraquecido, o embrião torna-se responsável para promover o segundo estágio de queda na força de ruptura, já que ABA inibe o crescimento do embrião e a segunda queda na força de ruptura. Portanto, aparentemente neste ponto (2º estágio), o embrião tem força suficiente (potencial de pressão), para romper o endosperma.

A sequência parcial de 510 nucleotídeos, obtida a partir do DNA de *G. americana* apresentou alta similaridade com o cDNA de outras espécies, como café (*Coffea arabica*), cenoura (*Daucus carota*), tomate (*Solanum esculentum*) e alface (*Lactuca sativa*) indicando que a sequência pertence ao gene da enzima endo- β -mananase. Quando comparada com *Coffea arabica* (Marraccini et al., 2001), a sequência de aminoácidos apresentou 98% de similaridade; esta alta

similaridade pode ser devido ao fato das duas espécies pertencerem à mesma família. O sequenciamento parcial do gene endo- β -mananase permitirá a elaboração de trabalhos futuros de expressão gênica, onde a sequência parcial deste gene pode ser utilizada para o desenho de primers específicos para *G. americana*, e os resultados servirão de comparação com os dados de atividade da enzima, e também auxiliará no sequenciamento completo do gene endo- β -mananase de *G. americana*, que contribuirá para a realização de pesquisas futuras relacionadas a este gene.

5 CONCLUSÕES

Os frutos de *G. americana* apresentam em média 105 sementes. As sementes são castanho-amareladas, com tegumento levemente enrugado. O endosperma das sementes é rígido e não impede a entrada de água.

O endosperma micropilar, das sementes de *G. americana*, possui seis a oito camadas de células, com formato poligonal alongadas; as células possuem dimensões e espessura de paredes inferiores ao endosperma lateral.

Os embriões de *G. americana* crescem dentro da semente antes da protrusão da radícula e este crescimento é inibido por ABA.

Para que a germinação ocorra é necessário o enfraquecimento do endosperma micropilar.

O enfraquecimento do endosperma ocorre em dois estágios, sendo que o segundo estágio é regulado por ABA.

A atividade da enzima endo- β -mananase inicia-se no endosperma micropilar e depois se estende para o endosperma lateral, antes da protrusão da radícula. ABA causou uma redução da atividade da enzima.

A sequência parcial de aminoácidos de *G. americana* apresenta 100% de similaridade com endo- β -mananase de *C. arabica*.

O mecanismo e o controle da germinação de sementes de *G. americana* são similares aos de sementes de *C. arabica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. C. S.; METRI, J. C.; BARROS NETO, B.; GUERRA, N. B. Desidratação osmótica do jenipapo (*Genipa americana* L.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 276-281, 2003.
- ANDRADE, A. C. S.; SOUZA, A. F.; RAMOS, F. N.; PEREIRA, T. S.; CRUZ, A. P. M. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 609-615, 2000.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BEWLEY, J. D.; BURTON, R. A.; MOROHASHI, Y.; FINCHER, G. B. Molecular cloning of a cDNA encoding a (1-->4)-beta-mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Planta**, Berlin, v. 203, n. 4, p. 454-459, 1997.
- BOREM, F. M.; SALVA, T. J. G.; SILVA, E.A.A. da. Anatomia e composição química do fruto e da semente do cafeeiro. In: BOREM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 21- 40.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 3, p. 1265-1274, 2000.
- DEDECCA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. Typica Cramer. **Bragantia**, Campinas, v. 16, p. 315-355, 1957.
- DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- β -mananase activity using Congo red dye. **Phytochemistry**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 829-835, 1994.
- DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. Recomposição de matas ciliares. **Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, p. 1-14, 1990. Série Registros.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220 p.

FURTADO, D. **Sistema de análise de variância: sisvar 5.0**. Lavras: UFLA/DEX, 2007. Software.

GONG, X.; BASSEL, G. W.; WANG, A.; GREENWOOD, J. S.; BEWLEY, J. D. The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- β -mannanase activity. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 7, p. 1165-1173, 2005.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm cap weakening: a study with gibberellin-deficient mutant. **Planta**, Berlin, v. 171, p. 525-531, 1987.

GROOT, S. P. C.; BRUINSMA, J.; KARSSSEN, C. M. The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: studies with a gibberellin-deficient mutant. **Physiologic Plantarum**, Copenhagen, v. 71, p. 184-190, 1987.

HOMRICHHAUSENA, T. M.; JESSICA R. HEWITTA, J. R.; NONOGAKI, H. Endo- β -mannanase activity is associated with the completion of embryogenesis in imbibed carrot (*Daucus carota* L.) seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, p. 219-227, 2003.

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 51-53, 1995.

HILHORST, H. W. M.; GROOT, S. C. P.; BINO, R. J. The tomato seed as a model to study seed development and germination. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 169-183, 1998.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 15, p. 281-307, 2005.

LEUBNER-METZGER, G.; FRÜNDT, C.; VÖGELI-LANGE, R. MEINS-JR, F. Class I β -1,3-glucanase in endosperm of tobacco during germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 751-759, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1992. 36 p.

MARRACCINI, P.; ROGERS, W. J.; ALLARD, C.; ANDRÉ, M. L.; CAILLET, V.; LACOSTE, N.; LAUSANNE, F.; MICHAUX, S. Molecular and biochemical characterization of endo-beta-mannanase from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains, **Planta**, Berlin, v. 213, n. 2, p. 296-308, 2001.

NASCIMENTO, W. M. O. **Caracterização morfo-anatômica, comportamento germinativo e avaliação de técnicas para o teste de tetrazólio em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.)**. 1997. 95 p. Tese (Mestrado em Produção e Tecnologia de Sementes) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NASCIMENTO, W. M. O.; DAMIÃO-FILHO, C. F. Caracterização morfológica das sementes e plântulas de jenipapeiro (*Genipa americana* L. – Rubiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 143-147, 1998.

NONOGAKI, H.; MOROHASHI, Y. Temporal and spatial pattern of the development of endo- β -mannanase activity in germinating and germinated lettuce seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 377, p. 1307-1313, 1999.

NONOGAKI, H.; GEE, O. H.; BRADFORD, K. J. A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropilar endosperm cap of tomato seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 4, p. 1235-1245, 2000.

PRADO NETO, M.; DANTAS, A. C. V. L.; VIEIRA, E. L.; ALMEIDA, V. O. Germinação de sementes de jenipapeiro submetidas à pré-embebição em regulador e estimulante vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 693-698, 2007.

PINTO, L. V. A.; SILVA, E. A. A. da; DAVIDE, A. C.; MENDES DE JESUS, V. A.; TOOROP, P. E.; HILHORST, H. W. M. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 100, p. 1175-1187, 2007.

SALOMÃO, A. N. Desiccation, storage and germination of *Genipa americana* seeds. In: SCANDÉ, M.; JOKER, M.; DULLO, M. E.; THOMSEN, K. A. **Comparative storage: biology of tropical tree seeds**. Rome: IPGRI, 2004. p. 263-269.

SANCHEZ, R. A.; MIGUEL, L.; MERCURI, O. Phytochrome control of cellulase activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 37, p.1574-1580, 1986.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C. Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, p. 676–686, 1985.

SEBBENN, A. M. **Estrutura Genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas.** 1997. 107 p. Tese (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SILVA, E. A. A. da. **Coffee (*Coffea arabica* cv. Rub) seed germination: mechanism and regulation.** 2002. 105 p. Thesis (PHD) – Wageningen University, Holanda.

SILVA, E. A. A. da ; TOOROP, E. P.; VANAELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rub) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, 2004.

SILVA, E. A. A. da; MELO, D. L. B.; DAVIDE, A. C.; BODE, N.; ABREU, G. B.; FARIA, J. M. R.; HILHORST, H. W. M. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, London, p. 1-8, 2007.

SILVA, E. A. A. da; TOOROP, E. P, VAN LAMMEREN, A. A. M; HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* ‘Rubi’) seed germination. **Annals of Botany**, London, p. 1-9, 2008.

SOUZA, A. F.; ANDRADE, A. C. S.; RAMOS, F. N.; LOUREIRO, M. B. Ecophysiology and morphology of seed germination of the neotropically lowland tree *Genipa americana* (Rubiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 15, p. 667-680, 1999.

TOOROP, P. E.; VAN AELST, A. C.; HILLHORST, H. W. M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1371-1379, 2000.

TOOROP, P. E.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. Endo- β -mananase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. **Planta**, Berlin, v. 200, n. 2, p. 153-158, 1996.

VOIGT, B.; BEWLEY, J. D.; Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and post-germinative endo- β -mananase: responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. **Planta**, Berlin, v. 2000, n. 1, p. 71-77, 1996.

WANG, A.; LI, J.; BEWLEY, J. D. Molecular cloning and characterization of an endo- β -mananase gene expressed in the lettuce endosperm following radicle emergence. **Seed Science Research**, Ontario, v. 14, p. 267-276, 2004.

WATKINS, J. T.; CANTLIFFE, D. J. Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annuum* at low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, p. 146-150, 1983.

WELBAUM, G. E.; MUTHUI, W. J.; WILSON, J. H.; GRAYSON, R. L.; FELL R. D. Weakening of muskmelon (*Cucumis melo* L.) V. Water relations of imbibition and germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 46, p. 391-400, 1995.

WOLFROM, M. L.; LAVER, M. L.; PATIN, D. L. Carbohydrates of coffee bean. **Journal of Organic Chemistry**, v. 26, p. 4533-4536, 1961.

ANEXOS

	Pág.
TABELA 1A. Resumo da análise de variância para os resultados do tamanho dos embriões, cotilédones e hipocótilo das sementes de <i>G. americana</i> , embebidas em água ou em solução de 100µL de ABA.....	50
TABELA 2A. Resumo da análise de variância para os resultados da força requerida para a ruptura do endosperma micropilar das sementes de <i>G. americana</i> , embebidas em água ou em solução de 100µL de ABA.....	50
TABELA 3A. Resumo da análise de variância para os resultados da atividade da enzima endo-β-mananase do endosperma micropilar das sementes de <i>G. americana</i> , embebidas em água ou em solução de 100µL de ABA.....	51
TABELA 4A. Resumo da análise de variância para os resultados dos parâmetros de microscopia eletrônica de varredura.....	51

TABELA 1A. Resumo da análise de variância para os resultados do tamanho dos embriões, cotilédones e hipocótilo das sementes de *G. americana*, embebidas em água ou em solução de 100µL de ABA.

FV	GL	QM		
		EMBRIÕES	COTILÉDONES	HIPOCÓTILO
Dias	5	6,4680**	1,1376**	2,3690**
Embebição (Água e ABA)	1	22,960**	5,4017**	7,7775**
Dias x Embebição	5	2,630**	0,5797**	0,7088**
Resíduo	108			
Total	119			
CV(%)		6,34	9,66	8,17

**significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 2A. Resumo da análise de variância para os resultados da força requerida para a ruptura do endosperma micropilar das sementes de *G. americana*, embebidas em água ou em solução de 100µL de ABA.

FV	GL	QM
Dias	7	96.737535**
Embebição (Água e ABA)	1	82.544376**
Dias x Embebição	7	2.965569**
Resíduo	464	
Total	479	
CV(%)	14,97	

**significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 3A. Resumo da análise de variância para os resultados da atividade da enzima endo- β -mananase do endosperma micropilar das sementes de *G. americana*, embebidas em água ou em solução de 100 μ L de ABA.

FV	GL	QM
Dias	7	14392,51**
Embebição (Água e ABA)	1	6256,08**
Dias x Embebição	7	529,46**
Resíduo	32	
Total	47	
CV(%)	11,10	

**significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 4A. Resumo da análise de variância para os resultados dos parâmetros de microscopia eletrônica.

FV	GL	QM	
		DIÂMETRO	ESPESSURA
Endosperma	1	4526,44**	179,02**
Resíduo	58		
Total	59		
CV(%)		17,3	23,09

**significativo a 5% de probabilidade.