

ELISA MONTEZE BICALHO

GERMINAÇÃO E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DE SEMENTES DE  
MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius)

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitotecnia, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

ELISA MONTEZE BICALHO

GERMINAÇÃO E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DE SEMENTES DE  
MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius)

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitotecnia, para a obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2011

---

Prof<sup>a</sup>. Marília Contin Ventrella  
(Co-orientadora)

---

Prof. Eduardo E. de Lima e Borges  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Valéria Monteze Guimarães

---

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva

---

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike  
(Orientador)

*Aos meus pais, Maurício e Nilce,  
pelo amor incondicional,  
dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa e à FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em especial ao professor Claudio Bruckner e Antonio Grossi.

Ao Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike pelos ensinamentos e conselhos.

Ao Grupo de Pesquisas em Macaúba por toda a troca de experiências, em especial à Vanessa.

Aos meus co-orientadores, Profa. Marília e Prof. Eduardo, por toda a acessibilidade e prontidão.

Aos professores Marco Aurélio Pedron e Silva e Valéria Monteze Guimarães pela oportunidade da convivência acadêmica.

À Kuki, pela amizade e grande ajuda nas correções e discussões desse trabalho.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Análise de Sementes Florestais e Laboratório de Anatomia Vegetal.

Aos amigos e colegas do mestrado com quem tive a sorte de dividir momentos ímpares: Elma, Anderson, Djair, Victor, Christiane, Haynna.

À amiga e companheira de laboratório, Glauciana, por toda a ajuda e companhia.

Às minhas grandes amigas, Mychelle, Clau, Jussara e Andressa, por terem sido minha segunda família em Viçosa.

À Nayara, minha prima e companheira de “república”, por tudo que aprendemos e fizemos juntas.

Aos meus pais, Maurício e Nilce, meus irmãos, Mauriley e Marley, meus cunhados, Fernanda e Daniel, e aos meus sobrinhos, Carol, Duda e Pedro, pela compreensão nos momentos de ausência e pela eterna torcida.

Ao Eduardo, meu companheiro, pelo amor, amizade e por estar sempre ao meu lado nos momentos mais importantes.

À Deus, pelo dom da vida.

## BIOGRAFIA

Elisa Monteze Bicalho, filha de Maurício Bicalho e Maria Nilce Monteze Bicalho, nasceu em Ubá – MG, no dia 8 de fevereiro de 1985. Graduiu-se em Ciências Biológicas em julho de 2009 pela Universidade Federal de Viçosa. Em agosto de 2009, iniciou o curso de mestrado em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa, concluído em julho de 2011.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>1 - Contextualização e justificativa</b> .....	<b>1</b>
<b>2 - Dormência e germinação de sementes de Arecaceae</b> .....	<b>2</b>
<b>3 - Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação</b> .....	<b>4</b>
<b>4 - Eventos pós-germinativos: mobilização de reservas e estudos histoquímicos</b> .....	<b>7</b>
<b>5 – Objetivos gerais</b> .....	<b>8</b>
<b>6 – Referências</b> .....	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>14</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>14</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>15</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>16</b>
<i>Material, amostragem e germinação das sementes</i> .....	<i>16</i>
<i>Teor de água e curva de embebição</i> .....	<i>17</i>
<i>Preparo do extrato enzimático</i> .....	<i>17</i>
<i>Atividade degradativa de mananos</i> .....	<i>17</i>
<i>Ensaio da <math>\alpha</math>-galactosidase</i> .....	<i>18</i>
<i>Determinação de mananos</i> .....	<i>18</i>
<i>Análise anatômica e histoquímica</i> .....	<i>19</i>
<b>Resultados</b> .....	<b>19</b>
<i>Curva de embebição</i> .....	<i>21</i>
<i>Ensaio das enzimas degradativas de mananos</i> .....	<i>21</i>
<i>Determinação de mananos</i> .....	<i>21</i>
<i>Análise histológica</i> .....	<i>22</i>
<b>Discussão</b> .....	<b>28</b>
<b>Referências</b> .....	<b>32</b>

<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>37</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>37</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>38</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>39</b>
<i>Material, amostragem e germinação das sementes .....</i>	<i>39</i>
<i>Extração e determinação de lipídios .....</i>	<i>40</i>
<i>Extração e determinação de amido .....</i>	<i>40</i>
<i>Extração e determinação de proteínas solúveis.....</i>	<i>40</i>
<i>Análise anatômica e histoquímica .....</i>	<i>41</i>
<b>Resultados .....</b>	<b>41</b>
<i>Mudanças no teor de lipídios e alterações histoquímicas .....</i>	<i>43</i>
<i>Mudanças no teor de amido e alterações histoquímicas .....</i>	<i>43</i>
<i>Mudanças no teor de proteínas solúveis e alterações histoquímicas .....</i>	<i>44</i>
<b>Discussão .....</b>	<b>53</b>
<b>Referências.....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>60</b>

## RESUMO

BICALHO, Elisa Monteze, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Germinação e mobilização de reservas de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius)** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-orientadores: Marília Contin Ventrella e Eduardo Euclides de Lima e Borges.

Os objetivos desse trabalho foram estudar o processo germinativo de macaúba por meio das atividades das enzimas degradativas de mananos, e quantificar o teor de mananos presentes nas células do endosperma. Além disso, estudou-se a dinâmica de mobilização das reservas lipídicas, protéicas e amiláceas por meio de análises bioquímicas e histoquímicas. As sementes foram submetidas ao protocolo de superação de dormência para espécies do gênero *Acrocomia* (registro de patente: PI0703180-7) e o processo germinativo de macaúba foi acompanhado durante 29 dias. As análises foram realizadas em embrião ou haustório e endosperma adjacente separadamente. As atividades das enzimas de degradação de mananos foram realizadas por métodos colorimétricos em espectrofotômetro utilizando-se como substratos goma-guar, para o ensaio de  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase, e *para*-nitrofenil  $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (pNPGal), para o ensaio de  $\alpha$ -galactosidase. O teor de mananos foi realizado por cromatografia gasosa, o de lipídios por método gravimétrico em aparelho de Soxhlet, o de amido por método fenol-sulfúrico e o de proteínas solúveis por reagente de Bradford. Foram realizados os testes histoquímicos de corifosfina para pectinas, Sudan Black B para lipídios totais, lugol para detecção de amido, XP para proteínas e safrablau para coloração e caracterização. As atividades de  $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase foram maiores no endosperma que no embrião ou haustório durante todo o período germinativo estudado. As atividades das enzimas aumentaram no endosperma após a protrusão do pecíolo cotiledonar enquanto que no embrião/haustório somente a atividade da  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase foi aumentada. Ao mesmo tempo, o teor de mananos no endosperma foi reduzido. O teor de lipídios foi reduzido no embrião a partir da protrusão do pecíolo cotiledonar, mas aumentou no endosperma durante o período estudado. O teste de Sudan Black B demonstrou a redução de quantidade e tamanho dos corpos lipídicos no embrião. A partir da protrusão do pecíolo cotiledonar foram identificados grãos de amido, marcados com o teste de lugol, sendo formados no haustório e aumentando em quantidade até o fim das avaliações. O teor de amido no embrião/haustório aumentou exponencialmente a partir da protrusão do pecíolo cotiledonar. Não foi detectado amido pelo teste de lugol no endosperma. O teor de proteínas decaiu continuamente no embrião/haustório desde o início da embebição, entretanto, não foi alterado no endosperma. O teste de XP demonstrou perda de coloração dos corpos protéicos



no embrião/haustório ao longo do tempo. Os resultados sugerem que as enzimas estudadas estão principalmente envolvidas na mobilização de mananos e/ou galactomananos do endosperma após a germinação. O embrião possuiu reservas que provêm energia para os primeiros eventos metabólicos da germinação. No endosperma, as reservas lipídicas e protéicas não foram acessadas durante o período estudado, mas houve intensa degradação de polissacarídeos de parede celular do endosperma lateral a partir da germinação no sentido estrito. As modificações bioquímicas e anatômicas citadas resultaram na formação de amido transiente no haustório.

## ABSTRACT

BICALHO, Elisa Monteze, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2011. **Germination and storage mobilization in macaw palm seeds (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius)** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-advisers: Marília Contin Ventrella and Eduardo Euclides de Lima e Borges.

The aims of this work were to study the germination process of macaw palm seeds through the activities of the enzymes  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase, and quantify the amount of mannan present in the endosperm cells. In addition, we studied the dynamics of mobilization of lipid, protein and starch reserves by biochemical and histochemical analysis. The seeds were submitted to a protocol to overcome the species dormancy (patent application: PI0703180-7) and macaw palm germination process was followed up to 29 days. Analyses were performed in embryo / haustorium and lateral and micropylar endosperm separately. The activities of the enzymes  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase were performed by colorimetric methods in a spectrophotometer using guar gum and p-nitrophenyl-D-galactopyranoside (pNPGal), as substrates, respectively. The content of mannan was analysed by gas chromatography, the lipid by the gravimetric method in the extraction apparatus, the starch by the phenol-sulfuric and soluble protein by Bradford method. Histochemical tests were performed to corifosfina of pectin, cellulose material to calcofluor, Sudan Black B for total lipids, lugol for detection of starch, XP for protein and safrablau for staining and characterization. The activities of  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase were higher in the endosperm to the embryo / haustorium throughout the germination period studied. The activities of both enzymes increased in the endosperm after the protrusion of the cotyledon petiole but in the embryo / haustorium only the  $\beta$ -mannanase activity increased. At the same time, the content of mannan reduced in the endosperm. The lipid content reduced in the embryo from the protrusion of the cotyledon petiole, but increased in the endosperm during the period studied. The Sudan Black B test showed a reduction in number and size of lipid bodies in the embryo. Right after the protrusion of the cotyledonary petiole were identified starch grains, marked with Lugol test, being formed in the haustorium and increasing in quantity until the end of evaluations. In this phase the starch content in the embryo / haustorium increased exponentially. The starch in the endosperm was not identified by lugol histochemical test. The protein content decreased continuously in the embryo / haustorium from the start of imbibition, however, has not changed in the endosperm. The XP test showed qualitative loss of staining of protein bodies in the embryo / haustorium over time. The results suggest that the two enzymes studied are mainly involved in the mobilization of mannans and / or galactomannans of the endosperm

after germination. The embryo possesses reserves that provide energy to the early metabolic events of germination. In the endosperm, lipid and protein reserves have not been accessed during the period studied, but there was intense degradation of cell wall polysaccharides from the endosperm side of germination in the strict sense.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1 - Contextualização e justificativa

Estimativas do Governo Federal apostam no Brasil como potencial produtor de biomassa destinada à produção de biocombustíveis. Por suas condições de solo e clima, o país retém vantagem comparativa de agregação de valor à produção primária. Diante do cenário atual de crescente demanda por combustíveis de fontes renováveis, o Brasil ganha, dessa forma, importância sócio-econômica na medida em que investe em programas de incentivo à produção e tecnologia de biocombustíveis.

Existe uma expectativa de produção e utilização de plantas oleaginosas perenes como fonte de matéria-prima, principalmente em países de clima tropical como o Brasil. Uma das espécies cogitadas é a macaúba (*Acrocomia aculeata*), que se destaca por ser uma palmeira altamente produtiva e nativa.

A macaúba é uma espécie de ampla utilização, porém é a propriedade oleaginosa dos seus frutos e sementes que se destaca. Concentrados no mesocarpo e na amêndoa do fruto, e por possuírem propriedades diferentes, os óleos têm vasta aplicação no setor industrial e energético, atendendo a mercados consumidores distintos (Fortes e Baugh, 1999; Bora e Rocha, 2004).

Apesar de todo o potencial da macaúba, poucos estudos foram finalizados com a espécie, e o que se sabe é que existe grande variabilidade genética entre as populações naturais (Abreu et al., 2011). É necessário, portanto, que *A. aculeata* seja domesticada para produção em grande escala, pois sua exploração é feita somente de forma extrativista e até o momento plantações comerciais são incipientes. Entretanto, a propagação da espécie ocorre somente na forma de sementes, cuja germinação natural lenta e heterogênea (até 3%), torna esse tipo de propagação economicamente inviável.

Em 2007, a Universidade Federal de Viçosa desenvolveu um protocolo laboratorial que eficientemente elevou este baixo índice de germinação de macaúba aos patamares de 60% (Motoike et al., 2007, registro de patente número PI0703180-7). Apesar deste aumento na porcentagem, a sincronização da germinação ainda é um desafio. Portanto, para que esta questão seja sanada, é essencial desenvolver estudos de cunho bioquímico, anatômico e fisiológico do processo germinativo de sementes de *A. aculeata*. Informações acerca das enzimas-chave do processo germinativo, da dinâmica de mobilização de reservas, da atuação de fitormônios, alinhados com estudos

histológicos, podem responder a esta demanda ao esclarecerem as restrições inerentes à germinação/dormência de sementes de *A. aculeata*.

## **2 - Dormência e germinação de sementes de Arecaceae**

A dormência em sementes é uma característica inata às espécies que necessitam sobreviver em situações adversas. Em suporte a esta premissa, consta a evidência de que a origem evolutiva da dormência coincide com as mudanças climáticas que o planeta Terra sofreu durante as eras geológicas (Hilhorst, 2007). Em sementes intactas e viáveis, a dormência é considerada um fenômeno de bloqueio à germinação sob condições favoráveis (Bewley, 1997), ou a capacidade de um dado genótipo germinar somente em uma faixa estreita de fatores ambientais (Baskin e Baskin, 2004). Esses conceitos foram criados para populações de sementes, em relação às quais se definem níveis de dormência. Entretanto, para sementes individuais, pode-se denominar a dormência como um fenômeno de “sim ou não” (Allen et al., 2007).

Baskin e Baskin (2004), baseados no esquema de dormência criado por Nikolaeva (1977), dividiram o fenômeno em cinco classes, de acordo com o impedimento predominante nas sementes: dormência fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e físico-fisiológica. Entretanto, as diferenças entre as cinco classes podem não ser bem delimitadas, podendo haver sobreposições de características entre elas. Dessa forma, Hilhorst (2007) sugere uma classificação com somente dois níveis: dormência imposta pelo embrião, em que o mesmo não é capaz de germinar mesmo que seja isolado do restante da estrutura da semente; e dormência imposta pelos tecidos adjacentes ao embrião, em que a semente inteira não é capaz de germinar, mas o embrião germina em cultivo.

Vários fatores podem estar relacionados à imposição da dormência em sementes recém colhidas e permeáveis à água. Dentre eles, o mais provável, segundo Hilhorst (1995), é o envolvimento do conteúdo de ácido abscísico (ABA) durante a maturação das sementes na planta-mãe. Todavia, tanto a manutenção do estado de dormência como a promoção da germinação são co-dependentes da interação entre os hormônios e a ativação gênica (Kucera et al., 2005). O ABA tem papel crucial na manutenção da dormência à medida que exerce regulação negativa. Giberelina é requerida para alongamento celular, superação de restrições do tegumento e indução do enfraquecimento do endosperma. Brassinosteróides e etileno promovem a germinação,

mas em muitas espécies é provável que ambos atuem após a dormência (Kucera et al., 2005).

Dessa forma, diversos são os fatores internos às sementes que, juntamente com as alterações ambientais, contribuem para a predominância de um ou outro processo. De acordo com o exposto, é provável que a imposição da dormência a dada população esteja relacionada a fatores fisiológicos, exceto em casos de imaturidade embrionária ou existência de barreiras físicas que impeçam a germinação.

A superação da dormência tem sido amplamente estudada e verificada para espécies de interesse comercial como arroz (Cohn e Hughes, 1981; 1986), aveia (Adkins et al., 1984), tabaco (Bove et al., 2005) e dendê (Fondom et al., 2010), dentre outras. Entretanto, para alguns grupos de plantas ainda não existe um modelo de estudo de dormência ou germinação, como é o caso das Arecaceae.

A propagação de palmáceas para fins agronômicos e ornamentais ocorre basicamente na forma de sementes, com poucas exceções como *Phoenix dactylifera* e *Rhapis* spp, que se propagam vegetativamente e por cultura de tecidos, respectivamente (Robinson, 2009). O tecido de reserva das sementes desse grupo é o endosperma, que provê a nutrição e o crescimento inicial da plântula (Banks e Marcus, 1999). Muitas espécies de palmeiras podem levar até cem dias para germinar com uma taxa de não mais que 20% de sucesso (Tomlinson, 1990).

Sementes de Arecaceae exibem dureza típica que se deve à presença de mananos na parede celular do endosperma (Buckeridge et al., 2000), fato que pode estar relacionado à lenta germinação e até mesmo à dormência que acomete algumas espécies do grupo. Dessa forma, o uso de métodos de superação de dormência e aceleração do processo germinativo tem sido foco de estudo em Arecaceae.

Em *Areca triandra*, existe dormência exógena imposta pelo pericarpo, que é a maior barreira à germinação e pode ser removida por escarificação mecânica. Estádios químicos como imersão das sementes em solução de GA<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e estratificação foram eficientes na superação da dormência interna de sementes da espécie, porém sem grande sucesso no aumento da porcentagem de germinação (Yang et al., 2007). Em *Howea forsteriana*, Chin et al. (1988) estudaram a superação da dormência por meio de imersão das sementes em soluções contendo solventes orgânicos e GA<sub>3</sub>. Os autores sugerem que os solventes são efetivos em transportar o ácido giberélico até o embrião, promovendo a germinação sem efeitos deletérios.

Sementes de progênies de *Elaeis guineensis* submetidas a estádios de calor por sessenta dias são aptas a germinar por curto tempo, resultando em plântulas vigorosas (Rees, 1962; Fondom et al., 2010). A germinação de *Hyphaene thebaica* é induzida por estádio prévio de escarificação mecânica, imersão em água em tempos distintos ou estádios químicos combinados antes da sementeira (Moussa et al., 1998). Em trabalho realizado com sementes de *Pritchardia remota*, Pérez et al. (2008) relatam que a germinação da espécie em questão está condicionada a uma dormência morfofisiológica, que é superada após remoção do endocarpo ou opérculo, seguido por incubação em altas temperaturas (25 a 35°C).

Como se pode perceber, os mecanismos e processos de germinação e dormência de sementes de palmeiras são pouco compreendidos (Orozco-Segovia et al., 2003). O que se sabe, na verdade, é que algumas espécies necessitam de poucos dias para completar o processo germinativo enquanto outras podem levar até dois anos para iniciar o processo, como *A. aculeata* (Ellis et al., 1985), ou até mesmo cinco anos, como *Chamaedorea seifrizii* (Wagner, 1982).

Após a germinação, o endosperma de Arecaceae provê o crescimento inicial da plântula. O tipo de desenvolvimento da plântula envolve três categorias: remota ligular, remota tubular e adjacente ligular (Tomlinson, 1990; Meerow, 2004; Henderson, 2006). A germinação da macaúba é do tipo remota ligular, em que a primeira estrutura que emerge da semente é o pecíolo cotiledonar, estrutura que mantém a conexão com a plântula que se desenvolve a certa distância da semente.

### **3 - Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação**

No que concerne à germinação, de modo geral, a embebição é o fator primário e iniciador do processo, pois a ativação metabólica das sementes só é possível por meio da hidratação dos tecidos (Bewley e Black, 1994). A embebição é um processo físico guiado pelo potencial mátrico das sementes e pode ocorrer tanto em sementes vivas quanto em mortas (Nonogaki et al., 2007).

As sementes apresentam geralmente o padrão trifásico de embebição, em que primeiramente se detecta a entrada passiva de água nas sementes, aumento de respiração mitocondrial, reparação de DNA e transcrição de novos mRNAs. Essa é a chamada fase I, em que o conteúdo de água aumenta exponencialmente. Na fase II, com os tecidos hidratados, há expansão e geração de potencial de crescimento do embrião. A fase III é inaugurada pela emergência da radícula, que marca a germinação no sentido estrito. Os

eventos que ocorrem após a emergência da radícula são denominados pós-germinativos (Bewley e Black, 1994; Gui Ferreira e Borghetti, 2004; Nonogaki et al., 2007).

Porém, existem alguns eventos que antecedem e proporcionam a protrusão radicular. Um deles, e talvez o mais importante, é o enfraquecimento do endosperma micropilar, tecido localizado entre o tegumento e a radícula do embrião. Em algumas espécies, esse tecido é responsável por causar o impedimento físico à germinação (Gong et al., 2005; Davide et al., 2008; Veiga et al., 2007). Existem algumas hidrolases de parede celular que são responsáveis pelo enfraquecimento desse tecido e pela mobilização de polissacarídeos de reserva de parede, como mananos. A presença desses polímeros em sementes de palmeiras e café, por exemplo, tem sido relacionada à extrema dureza e resistência a danos mecânicos (Buckeridge et al. 2000). Polímeros de manose constituem a maior reserva de hemicelulose presente na parede celular dos tecidos adjacentes ao embrião de sementes que exibem dormência tegumentar (Bewley 1997).

Segundo Sugimura e Murakami (1990), as hidrolases de parede podem ser sintetizadas pelo haustório e secretadas dentro do endosperma, ou sintetizadas *de novo* no endosperma por meio de um sinal de origem do haustório, ou ainda serem pré-existentes e ativas no endosperma ou somente serem ativadas por algum sinal de origem do haustório.

Segundo Reid e Méier (1973), a degradação de galactomananos de parede celular requer a presença de três enzimas que atuam cooperativamente: endo- $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase. A enzima endo- $\beta$ -mananase realiza a hidrólise de mananos, glucomanos e galactomananos (Bewley e Black, 1994). À endo- $\beta$ -mananase tem sido atribuído o papel de liberar sementes da dormência por meio do enfraquecimento do endosperma micropilar (Bewley, 1997) e de ser fundamental na mobilização de mananos, especialmente em relação ao mecanismo de ação dos hormônios ABA e giberelina (Buckeridge et al., 2000). Entretanto, Gong et al. (2005) detectaram atividade da endo- $\beta$ -mananase após a protrusão da radícula e sugerem que a emergência de embriões está relacionada à estrutura da parede celular do endosperma micropilar e não à atividade dessa enzima. Existe, ainda, a hipótese de que a enzima tenha uma dupla função na germinação. Em trabalho com *Sesbania virgata*, Lisboa et al. (2006) detectaram dois picos de atividade da endo- $\beta$ -mananase, um durante a protrusão da radícula, e o segundo pico associado com o período de mobilização de reservas. Nonogaki et al. (2000) detectaram diferentes isoformas da enzima em



tomateiro sendo expressas seqüencialmente em diferentes partes do endosperma, inicialmente no endosperma micropilar e subseqüentemente no endosperma lateral. Provavelmente a expressão diferencial se deva à presença de dois genes, *LeMAN1*, cuja expressão é restrita ao endosperma lateral, e *LeMAN2*, restrito ao endosperma micropilar (Nonogaki et al., 2007). Veiga et al. (2007) detectaram aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase durante o armazenamento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*). Segundo os autores, a enzima é sintetizada à medida que as sementes avançam dos estádios de desenvolvimento para o estágio germinativo. Giorgini e Comoli (1996) em trabalho com sementes de *Coffea arabica*, só detectaram atividade da endo- $\beta$ -mananase no embrião em período após a protrusão da radícula. A enzima não teve atividade detectada em endospermas isolados, o que sugere que a produção de mananases requer a presença do embrião.

A enzima  $\alpha$ -galactosidase atua liberando cadeias laterais de galactose em mananos de parede celular (Bewley e Black, 1994). Entretanto, essa enzima tem função ampla não somente em tecidos vegetais, hidrolisando cadeias laterais de galactose em uma gama de tecidos (Feurtado et al., 2001). Em sementes, a enzima possui função constitutiva, estando presente desde a embebição até a emergência (Nonogaki et al., 2007). Em sementes de tomateiro, está presente no embrião, endosperma lateral e micropilar. No embrião provavelmente está envolvida na mobilização de oligossacarídeos da série da rafinose. No endosperma provavelmente possui função constitutiva, com aumento de atividade posterior ao aumento de atividade da endo- $\beta$ -mananase ou  $\beta$ -manosidase (Feurtado et al., 2001). Segundo Tonini et al. (2010), a  $\alpha$ -galactosidase é produzida principalmente durante a maturação da semente e pode ser ativada somente após a germinação por processo hidrolítico. Além disso, os autores sugerem uma relação entre degradação de proteínas e galactomananos por meio de enzimas hidrolíticas como forma de balancear a relação carbono/nitrogênio no desenvolvimento da plântula. A atividade da  $\alpha$ -galactosidase não está sob a regulação de hormônios como ABA e giberelina tampouco é inibida em situações de baixo potencial osmótico ou por luz vermelho distante (Nonogaki et al., 2007).

Além de ABA e giberelina, outros hormônios podem estar relacionados à germinação de forma geral. Etileno pode regular a síntese de uma classe de  $\beta$ -1,3-glucanase em sementes de tabaco (Leubner-Metzger et al., 1998), óxido nítrico estimula a germinação em sementes responsivas à luz (Beligni e Lamattina, 2000) e

brassinosteróides podem estar envolvidos no alongamento e divisão celular de *Arabidopsis* (Steber e McCourt, 2001).

Modelos e mecanismos de atuação dos principais hormônios e enzimas envolvidos na germinação são bem estabelecidos para plantas-modelo (*Arabidopsis*, *Solanum lycopersicum*, *Coffea* sp, *Nicotiana* sp, *Lactuca sativa* e *Daucus carota*, por exemplo), e pouco se pode dizer em relação às espécies de difícil germinação.

#### **4 - Eventos pós-germinativos: mobilização de reservas e estudos histoquímicos**

Carboidratos, lipídeos e proteínas perfazem a maior parte das reservas de sementes em geral, armazenadas em cotilédones, nas exoalbuminosas, ou em endospermas, nas albuminosas. Em *Euterpe edulis*, além das típicas reservas, encontram-se também mananos como reservas insolúveis na parede celular (Panza et al., 2004). Sementes de *Phoenix dactylifera* contém a maior parte das reservas na forma de proteínas, perfazendo 54% do colilédone e 11% do endosperma. Porém, 65% do endosperma são constituídos de parede celular, sendo, portanto, a reserva majoritária dessa semente (Sekhar e DeMason, 1988). Entretanto, corpos lipídicos, fibras protéicas cristalinas e corpos eletrondensos no vacúolo de *P. dactylifera* são proeminentes (DeMason e Thomson, 1981).

Na família das Arecaceae é comum o embrião conter grande porcentagem de reserva que provê energia para a germinação e para os eventos primários desse processo. O parênquima cotiledonar do embrião de *Washingtonia filifera* é composto por 43% de corpos protéicos e 25% por corpos lipídicos (DeMason, 1988). Estudos histoquímicos realizados em endosperma e embrião de sementes de macaúba (*A. aculeata*) revelaram presença abundante de corpos protéicos e corpos lipídicos e ausência de grão de amido, além de proeminente parede celular provavelmente composta de mananos ou galactomananos (Moura et al. 2010). Também no trabalho de Corte et al. (2009), testes histoquímicos foram essenciais para a detecção das principais reservas em cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides* e sua organização celular.

Em *Elaeis guineensis*, a proporção de carboidratos insolúveis e lipídeos são de 36% e 47% respectivamente segundo Alang et al. (1988). Nesse trabalho, os autores relatam que a degradação de galactomananos, componente da segunda maior reserva da semente, é utilizada mais rapidamente que os lipídeos durante o processo germinativo. Esses dados corroboram com o trabalho de Oo e Stumpf (1983), também realizado com dendezeiro.

Carboidratos e polissacarídeos de reserva de parede celular são açúcares não redutores de baixa atividade osmótica e alta atividade mátrica, uma vez que possuem níveis diferentes de solubilidade em água. Tornam-se reservas convenientes para a célula após ação de hidrolases de parede celular (Buckeridge et al., 2000). Os lipídios são reservas energéticas inertes e que necessitam de maior número de etapas metabólicas para se tornarem energia pronta para a utilização da célula (Bewley e Black, 1994). Durante a germinação de sementes de coco (*Cocos nucifera*) o embrião metaboliza e estoca carboidratos do endosperma na forma de amido no haustório, provavelmente para ser utilizado durante o processo germinativo e crescimento de plântula (Balasubramaniam et al., 1973). Proteínas solúveis são consumidas à medida que esqueletos carbônicos, compostos nitrogenados como enzimas e aminoácidos são requeridos pelo embrião ou plântula em crescimento (Bewley e Black, 1994).

Testes histoquímicos foram eficientes na detecção de mobilização das reservas de sementes de *Yucca* (Horner e Arnott, 1966). Por meio de análise anatômica e histoquímica, os autores observaram que houve redução do número de corpos protéicos e lipídicos durante o processo de germinação, bem como a formação de grãos de amido a partir do segundo dia de embebição. Quanto à mobilização de reservas de cotilédones de *C. peltophoroides*, a análise anatômica e histoquímica demonstraram que a reserva lipídica foi gradualmente reduzida a partir de 20 dias após a sementeira, período em que o primeiro par de folhas estava completamente aberto. Quanto aos corpos protéicos, foi observado aos 10 dias após a sementeira, que estes tiveram desarranjo no padrão globular inicial e, ao final do processo, o material protéico foi digerido e desapareceu. Grãos de amido foram diagnosticados até os 20 dias após a sementeira, sendo a primeira reserva a ser consumida no processo (Corte et al., 2006; Corte et al.; 2008). Dessa forma, estudos histoquímicos são de extrema importância para estudos de mobilização de reservas de sementes.

## **5 – Objetivos gerais**

A proposta desse trabalho foi investigar e compreender a dinâmica bioquímica, anatômica e fisiológica da germinação de sementes de macaúba submetidas ao protocolo de superação de dormência de Motoike et al. (2007). Pretendeu-se traçar um perfil da atividade de enzimas-chave no processo germinativo e da mobilização de reservas do embrião e endosperma, desde a embebição até o crescimento inicial da plântula.

## 6 – Referências

- Abreu, I. S., Carvalho, C. R., Carvalho, G. M. A., Motoike, S. Y.** (2011) First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) – a promising plant for biodiesel production. *Australian Journal of Botany* 59(2), 149-155.
- Adkins S.W., Simpson G.M., Naylor J.M.** (1984) The physiological basis of seed dormancy in *Avena fatua* IV. Alternative respiration and nitrogenous compounds. *Physiologia Plantarum* 60(2),234-238.
- Alang, Z. C., Moir, G. F. J., Jones, L. H.** (1988) Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Annals of Botany* 61,261-268.
- Allen P. S., Bence-Arnold, R. L., Batlla, D., Bradford, K. J.** (2007) Modeling of seed dormancy, pp. 72-104 in: Bradford, K., Nonogaki, H. (Eds.) Annual Plant Reviews, 27, *Seed Development, Dormancy and Germination*. Wiley-Blackwell.
- Arkoll, D.** (1990) New crops from Brazil, pp. 367-371 in: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland.
- Balasubramaniam, K., Atukorala, T. M., S., Wijesundera, S., Hoover, A. A., De Silva, M. A. T.** (1973) Biochemical changes during germination of the coconut (*Cocos nucifera*). *Annals of Botany* 37, 439-445.
- Banks, K., Marcus, J.** (1999) A practical guide to germinating palm seeds. *Palms, Journal of the International Palm Society* 56-59.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C.** (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14,1-16.
- Beligni, M. V., Lamattina, L.** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210, 215-221.
- Bewley, J. D.** (1997) Breaking down the walls – a role for endo- $\beta$ -mannanase in release from seed dormancy? *Trends in Plant Science* 2(12), 464-469.
- Bewley, J. D., Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum. 2 ed.
- Bora, P. S., Rocha, V. M.** (2004) Macaíba Palm: Fatty and amino acids composition of fruits. *Ciencia y tecnologia alimentaria*, 4(3), 158-162.
- Bove J., Lucas P., Godin B., Oge' L., Jullien M., Grappin P.** (2005) Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology* 57,593–612.

- Buckeridge, M. S., Dietrich, S. M. C.** (1990) Galactomanans from brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13,109-112.
- Buckeridge, M. S., Santos, H. P., Tiné, M. A. S.** (2000) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38,141-156.
- Charlo, H. C. O.** (2006) Aspectos morfológicos, germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Archontophoenix alexandrae* (F. Mueller) H. Wendl. e Drude (Arecaceae) em diferentes substratos. *Árvore* 30(6),933-940.
- Chin, H. F., Krishnapillay, B., Alang, Z. C.** (1988) Breaking dormancy in kentia palm seeds by infusion technique. *Pertanika* 11(1),137-141.
- Cohn, M.A., Hughes, J.A.** (1981) Seed dormancy in red rice (*Oryza sativa*). I. Effect of temperature on dry-afterripening. *Weed Science* 29,402-404.
- Cohn, M. A., Hughes, J. A.** (1986) Seed dormancy in red rice. V. Response do azide, hidroxilamine and cyanide. *Plant Physiology* 80,531-533.
- Corte, V. B., Borges, E. E. L., Pontes, C. A., Leite, I. T. A., Ventrella, M. C., Mathias, A. A.** (2006) Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Árvore* 30(6), 941-949.
- Corte, V. B., Borges, E. E. L, Ventrella, M. C., Leite, I. T. A., Braga, A. J. T.** (2008) Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. *Árvore* 32(4), 641-650.
- Corte, V. B., Ventrella, M. C., Borges, E. E. L., Pontes, C. A., Pinho, D.** (2009) Histochemical and ultrastructural study of *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae) seeds. *Árvore* 33(5), 873-883.
- Davide, A. C., Silva, C. S. J., da Silva, E. A. A., Pinto, L. V. A., Faria, J. M. R.** (2008) Estudos morfo-anatômicos, bioquímicos e fisiológicos durante a germinação de sementes de candeia (*Eremanthus erythropappus*) (DC.) MacLeish. *Revista Brasileira de Sementes* 30(2),171-176.
- DeMason, D. A.** (1988) Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany* 75(3),330-337.
- DeMason, D. A., Thomson, W. W.** (1981) Structure and ultrastructure of the cotyledon of date palm (*Phoenix datylifera* L.). *Botanical Gazzete* 142(3),320-328.
- Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H.** (1985) Handbook of seed technology for genebanks: compendium of specific germination information and test recommendations, v. 2. *International Board For Plant Genetic Resources*, Roma. <http://.ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublications/52/begin.htm>.

- Feurtado, J.A., Banik, M., Bewley, D.** (2001) The cloning and characterization of  $\alpha$ -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *Journal of Experimental Botany* 52,1239-1249.
- Fondom, N. Y., Etta, C. E., Mih, A. M.** (2010) Breaking seed dormancy: revisiting heat-treatment duration on germination and subsequent seedling growth of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) progenies. *Journal of Agricultural Science* 2(2), 101-110.
- Fortes, I. C. P., Baugh, P. J.** (1999) Study of analytical on-line pyrolyses of oils from macauba fruit (*Acrocomia sclerocarpa* M) via GC/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 10(6), 469-477.
- Giorgini, J., Comoli, E.** (1996) Effect of embryo and exogenous GA<sub>3</sub> on endospermic endo- $\beta$ -mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8(1),43-49.
- Gong, X., Bassel, G. W., Wang, A., Greenwood, J. S., Bewley, D.** (2005) The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- $\beta$ -mannanase activity. *Annals of Botany* 96,1165-1173.
- Gui Ferreira, A., Borghetti, F.** (2004) *Germinação do básico ao aplicado*. Artmed. 324p. 2004.
- Henderson, F.M.** (2006) Morphology and anatomy of palm seedlings. *The Botanical Review* 72(4),273-329.
- Hilhorst, H. W. M.** (1995) A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research* 5,61-73.
- Hilhorst, H.W.M.** (2007) Definitions and hypotheses of seed dormancy. In: Bradford D, Nonogaki H. Seed development, dormancy and germination. *Annual of Plant Reviews*, v. 27. Blackwell Publishing.
- Horner, H. T., Arnott, H. J.** (1966) A histochemistry and ultrastructural study of pre- and post-germinated *Yucca* seeds. *Botanical Gazette* 127(1),48-64.
- Kucera, B., Cohn, M. A., Leubner-Metzger, G.** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307.
- Leubner-Metzger, G., Petruzzelli, L., Waldvogel, R., Vögeli-Lange, R., Meins Jr., F.** (1998) Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I  $\beta$ -1,3-glucanase during tobacco seed germination. *Plant Molecular Biology* 38,785-795.
- Lisboa, C. G. S., Tonini, P. P., Tiné, M. A. S., Buckeridge, M. S.** (2006) Endo- $\beta$ -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterization and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(2),269-280.

- Meerow, A.W.** (2004) *Palm seed germination*. University of Florida IFAS Extension.
- Motoike, S. Y., Lopes, F. A., Oliveira, M. A. R., Carvalho, M., Sá Júnior, A. Q.** (2007) Processo de germinação e produção de sementes pré-germinadas de palmeiras do gênero *Acrocomia*.
- Moura, E. F., Ventrella, M. C., Motoike, S. Y.** (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67(4), 399-407.
- Moussa, H., Margolis, H. A., Dubé, P-A, Odongo, J.** (1998) Factors affecting the germination of doum palm (*Hyphaene thebaica* Mart.) seeds from the semi-arid zone of Niger, West Africa. *Forest Ecology and Management* 104(1-3), 27-41.
- Nikolaeva, M.G.** (1977) Factors controlling the seed dormancy pattern. pp. 51–74 in Khan, A.A. (Ed.) *Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Amsterdam, Elsevier.
- Nonogaki, H., Chen F., Bradford, K. J.** (2007) Mechanisms and genes involved in germination *sensu strictu*. In: Bradford, K., Nonogaki, H. Annual Plant Reviews, 27, *Seed Development, Dormancy and Germination*. Wiley-Blackwell, 392p.
- Nonogaki, H., Gee, O. H., Bradford, K. J.** (2000) A germination-specific endo- $\beta$ -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology* 123,1235-1245.
- Oo, K. C., Stumpf, P. K.** (1983) Some enzymic activities in the germinating oil palm (*Elaeis guineensis*) seedlings. *Plant Physiology* 73,1028-1032.
- Orozco-Segovia, A., Batis, A. I., Rojas-Aréchiga, M., Mendoza, A.** (2003) Seed Biology of Palms: a review. *Palms* 47(2),79-94.
- Panza, V., Láinez, V., Maldonado, S.** (2004) Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145,445-453.
- Pérez, H. E., Shiels, A. B., Zleski, H. M., Drake, D. R.** (2008) Germination after simulated rat damage in seeds of two endemic Hawaiian palm species. *Journal of Tropical Ecology* 24,555-558.
- Rees, A. R.** (1962) High-temperature pre-treatment and the germination of seed of the oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.). *Annals of Botany* 26(4),569-581.
- Reid, J.S.G., Meier, H.** (1973) Enzymic activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112, 301–308.
- Robinson, M. L.** (2009) *Cultivated palm seed germination*. Cooperative Extension. University of Nevada.

- Sekhar, K. N. C., DeMason, D. A.** (1988) Quantitative ultrastructure and protein composition of date palm (*Phoenix dactylifera*) seeds: a comparative study of endosperm vs. embryo. *American Journal of Botany* 75(3), 323-329.
- Steber, C. M., McCourt, P.** (2001) A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125, 763-769.
- Sugimura, Y., Murakami, T.** (1990) Structure and function of the haustorium in germinating Coconut palm seed. *JARQ* 24, 1-14.
- Tomlinson, P.B.** (1990) *The structural biology of palms*. Clarendon Press, Oxford. 477 p.
- Tonini, P.P., Carrara, T.B., Buckeridge, M.S.** (2010) Storage proteins and cell wall mobilization in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees* 24, 675-684.
- Veiga, A. D., Guimarães, R. M., Rosa, S. D. V. F., Von Pinho, E. V. R., Silva, L H. C., Veiga, A. D.** (2007) Armazenabilidade de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem. *Revista Brasileira de Sementes* 29(1), 83-91.
- Wagner, R.I.** (1982) Raising ornamental palms. *Principes* 26, 86–101.
- Yang, Q-H., Ye, W-H., Yin, X-J.** (2007) Dormancy and germination of *Areca triandra* seeds. *Scientia Horticulturae* 113, 107-111.



## CAPÍTULO I

---

### **Atividades de enzimas degradativas de mananos e mobilização de polissacarídeos de parede celular de sementes de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) durante a germinação**

#### **Resumo**

Este trabalho traz pela primeira vez informações a respeito da dinâmica bioquímica, morfoanatômica e fisiológica da germinação de sementes de *Acrocomia aculeata* (macaúba). Sementes de macaúba submetidas ao protocolo de superação de dormência (registro de patente: PI0703180-7) foram coletadas em nove estádios durante o período germinativo e crescimento inicial da plântula, desde a embebição até a eminência da parte aérea. Amostras frescas de embrião ou haustório e endosperma adjacente ao embrião foram processadas separadamente para os ensaios enzimáticos de degradação de mananos ( $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase), além de estudos anatômicos e histoquímicos. Amostras de endosperma lateral foram coletadas a partir da protrusão do pecíolo cotiledonar para quantificação do teor de mananos. As atividades de  $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase aumentaram no endosperma a partir da protrusão do pecíolo cotiledonar à medida que o teor de mananos foi reduzido. No embrião, apesar da menor atividade, a  $\beta$ -mananase apresentou a mesma tendência observada no endosperma. A  $\alpha$ -galactosidase não apresentou aumento significativo no embrião durante o processo germinativo, o que sugere função constitutiva. O teste histoquímico para pectina evidenciou o espessamento inicial e degradação celular do endosperma adjacente durante o processo germinativo. Além disso, demonstrou a perda de material péctico à medida que polissacarídeos de parede celular foram mobilizados. Os dados sugerem que as enzimas  $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase não estão diretamente relacionadas ao enfraquecimento do endosperma micropilar de sementes de *A. aculeata*, mas atuam mobilizando polissacarídeos de reserva de parede celular do endosperma.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase,  $\alpha$ -galactosidase, mananos, galactomananos, corifosfina, safrablau.

## Introdução

A macaúba, *Acrocomia aculeata*, é uma planta da família Arecaceae cujo interesse comercial está no alto teor lipídico da polpa do fruto e da semente. O teor de óleo pode alcançar 60% no mesocarpo e 38 a 45% na semente. Entretanto, as propriedades e constituição de ambos diferem entre si, podendo o óleo do mesocarpo ser destinado ao setor energético e o da semente às indústrias de cosméticos (Bora e Rocha, 2004; Hiane, 2006).

As sementes de macaúba são de difícil germinação, que por vias naturais chega somente a 3% em um ano (Ellis et al., 1985) e a espécie não apresenta propagação vegetativa evidente. Para a exploração em escala comercial dessa espécie, são necessários programas de melhoramento genético para desenvolver cultivares superiores de alta produção. Dessa forma, ampliou-se a propagação da espécie aumentando a porcentagem de germinação. Foi desenvolvido um protocolo de superação de dormência de Arecaceae do gênero *Acrocomia*, que elevou a taxa de germinação para uma faixa entre 40 e 60% (Motoike et al., 2007. Registro de patente: PI0703180-7). Porém, o processo germinativo de macaúba ainda conta com muitos desafios, principalmente de variabilidade da taxa de germinação.

Sementes de Arecaceae, de forma geral, contêm mananos e/ou galactomananos nas paredes de células do endosperma lateral e micropilar que conferem dureza e, ao mesmo tempo, atuam como proteção mecânica antes e durante o processo germinativo (Buckeridge et al., 2000; Buckeridge, 2010). Galactomananos estão presentes em células do endosperma de *Elaeis guineensis* como segunda maior reserva (Alang et al., 1988). Células do endosperma de *A. aculeata*, possuem paredes espessadas, não celulósicas e não lignificadas, constituídas por carboidratos insolúveis de reserva, como demonstrado por meio de testes histoquímicos no trabalho de Moura et al. (2010). A estrutura da parede celular do endosperma de *Phoenix dactylifera* (DeMason et al., 1983) e *Washingtonia filifera* (DeMason, 1986), composta majoritariamente de mananos, também foi demonstrada por meio da histoquímica.

Durante a germinação no sentido estrito, três enzimas podem atuar concomitantemente degradando galactomananos e enfraquecendo o endosperma para a protrusão da radícula:  $\beta$ -mananase,  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -manosidase (Reid e Méier, 1973). A  $\beta$ -mananase hidrolisa ao acaso ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  nos polímeros de mananos (Bewley e Black, 1994). A atuação da  $\beta$ -mananase pode ser relacionada ao enfraquecimento do endosperma micropilar durante a protrusão da radícula (Bewley,

1997), à mobilização de reservas de parede celular (Gong et al., 2005) ou a ambos os momentos, demonstrando papel duplo (Lisboa et al., 2006). A enzima  $\alpha$ -galactosidase remove cadeias laterais de galactose ligadas por meio de ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$  à cadeia principal de mananos (Nonogaki et al., 2007). A enzima apresenta função constitutiva, estando presente desde a embebição até a completa germinação (Nonogaki et al. 2007). A enzima  $\beta$ -manosidase atua hidrolisando extremidades não redutoras de resíduos de  $\beta$ -D-manose em oligomananos liberados após a atividade de  $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -galactosidase (Nonogaki et al., 2007; Mo e Bewley, 2003).

Esse trabalho objetivou relacionar as atividades das enzimas  $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase com modificações anatômicas, histoquímicas e bioquímicas do teor de mananos do endosperma de sementes de macaúba durante o processo germinativo.

## **Material e Métodos**

### *Material, amostragem e germinação das sementes*

Sementes obtidas de frutos provenientes de maciços naturais de macaúba de Montes Claros (MG), safra 2008/2009, foram utilizadas nesse trabalho. Os frutos foram despulpados, secos à temperatura ambiente e tiveram o endocarpo quebrado com auxílio de um torno mecânico. As sementes foram processadas no Laboratório de Pesquisas da Acrotech Sementes e Reflorestamento.

O processamento e a análise do embrião ou haustório e endosperma foram realizados separadamente nos estádios propostos. Para análises de endosperma, utilizou-se o tecido adjacente ao embrião ou haustório por ser a região mais prontamente acessada durante a germinação. As amostras foram coletadas ao longo do tempo durante o processo germinativo de macaúba submetido ao protocolo de superação de dormência de Motoike et al. (2007). O protocolo consta de uma etapa de desinfestação em solução de hipoclorito de sódio seguida de seis dias de embebição em solução de peróxido de hidrogênio. Ao final da embebição, as sementes são escarificadas mecanicamente na região da micrópila e imersas em solução de ácido giberélico. Acompanhou-se a germinação de sementes de macaúba desde a desinfestação e embebição até o 29º dia e foram coletados nove estádios diferentes. Os estádios equivalem a etapas do protocolo e do desenvolvimento inicial da plântula (Tabela 1).

Até o estágio sete foram coletados todos os embriões intactos, inclusive aqueles com pecíolo cotiledonar em processo de alongamento. Nos estádios 8 e 9, o haustório foi utilizado nas análises.

**Tabela 1.** Descrição dos estádios germinativos de sementes de macaúba utilizados nas análises.

<b>Estádio</b>	<b>Dias do processo germinativo</b>	<b>Etapa do Protocolo</b>
I	0	Anterior a desinfestação
II	0,5	12 horas em solução de hipoclorito
III	2,5	2 dias em solução de peróxido de hidrogênio
IV	4,5	4 dias em solução de peróxido de hidrogênio
V	6,5	6 dias em solução de peróxido de hidrogênio
VI	9,5	3 dias após a escarificação
VII	12,5	6 dias após escarificação
VIII	21,5	15 dias após a escarificação
IX	29	21 dias após a escarificação

#### *Teor de água e curva de embebição*

O teor de água inicial das sementes foi determinado por método de estufa a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$  (Brasil, 2009) utilizando-se quatro repetições de oito sementes intactas. Para a determinação do ganho diário de água, as sementes foram submetidas ao protocolo de superação de dormência de Motoike et al. (2007) e pesadas a cada 24 horas durante os primeiros 14 dias do processo germinativo. Foram utilizadas oito repetições de oito sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem de água.

#### *Preparo do extrato enzimático*

O extrato enzimático foi preparado a partir de endosperma e embrião ou haustório congelados, separadamente. Foram homogeneizados 0,1 grama por repetição do material vegetal em gral sobre gelo, utilizando 1,5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5. As amostras foram centrifugadas a 9000 g por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em microcentrífuga refrigerada. O sobrenadante constituiu o extrato enzimático e serviu como fonte de  $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -galactosidase.

#### *Atividade degradativa de mananos*

Para determinar qual o tempo ideal do ensaio de  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase, estudou-se a atividade em relação ao tempo. O ensaio consistiu de 700  $\mu$ L de substrato goma-guar (Sigma<sup>®</sup>) 0,5% e 300  $\mu$ L de extrato enzimático. As amostras foram incubadas em banho termostático a 37 °C e retiradas a cada três minutos durante 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de ácido dinitrossalicílico, DNS, (Miller, 1959) 1% e fervida durante cinco minutos. Foi realizada leitura em espectrofotômetro a 550 nm, conforme o protocolo de Gusakov et al. (2011) com adaptações. A quantificação de açúcares redutores (AR) liberados foi realizada utilizando-se curva padrão de 0,01 a 0,09  $\mu$ g de glicose.

Após determinado o tempo ideal de ensaio enzimático, prosseguiu-se ao ensaio padrão para cada estágio, com 30 minutos de ensaio. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade equivalente de açúcares redutores liberados por 30 minutos por grama de matéria fresca, nas condições do ensaio.

#### *Ensaio da $\alpha$ -galactosidase*

O ensaio para determinação da atividade dessa enzima seguiu protocolo proposto por Guimarães et al. (2001). O ensaio foi composto por 250  $\mu$ L de substrato  $\rho$ NPGal (*para*-nitrofenil  $\alpha$ -D-galactopiranosídeo) 2 mM, 730  $\mu$ L de tampão de extração (acetato de sódio 0,1 M, pH 5) e 20  $\mu$ L de extrato enzimático. As amostras foram incubadas em banho termostático a 37 °C por 15 minutos. A reação foi paralisada com 1 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,5 M para posterior leitura a 410 nm. A quantidade de  $\rho$ NP produzido foi avaliado usando curva padrão de 0 a 0,16  $\mu$ mol de  $\rho$ NP. Uma unidade da enzima foi definida como o equivalente necessário para produzir um  $\mu$ mol de  $\rho$ -nitrofenol por minuto por grama de matéria fresca.

#### *Determinação de mananos*

A partir da protrusão do pecíolo cotiledonar, o endosperma lateral de sementes dos estádios seis a nove foi coletado para determinação de mananos. As amostras foram secas em estufa a 45 °C por 24 horas e trituradas. Foram utilizadas três repetições de três gramas por estágio. A extração foi feita com água deionizada em banho termostático a 90°C por 2 horas. Em seguida foram filtradas e diluídas em álcool etílico concentrado, na proporção de 3:1, e armazenadas sob refrigeração a 4 °C por 24 horas para aglutinação dos mananos. O material foi novamente filtrado e liofilizado por 6 horas. A digestão dos mananos foi feita com ácido trifluoroacético 2 M em autoclave a

120 °C e 1,5 atm por uma hora. A neutralização foi realizada com hidróxido de amônio 2,5 M em centrífuga a 9000 g por 10 minutos. As amostras foram novamente liofilizadas e ressuspendidas com água destilada. A derivatização das amostras seguiu método alditol-acetato (Englyst e Cummings, 1984). Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo Shimadzu, modelo CG 14AS, com o uso de coluna capilar Shimadzu, comprimento 50m. A temperatura da coluna foi de 220°C, a do injetor de 250°C e a do detector de 275°C. Foram utilizadas manose e galactose (Sigma<sup>®</sup>) a 0,5 e 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> como padrões. O teor de monossacarídeos encontrados individualmente em cada estágio amostrado nessa etapa foi somado para compor o teor total de mananos. Os dados foram submetidos ao fator de correção 0,93 para ligações glicosídicas (FAO, 2000). Os resultados foram expressos em miligramas de mananos por grama de matéria seca.

#### *Análise anatômica e histoquímica*

O embrião ou haustório e o endosperma adjacente foram coletados nos estádios propostos na Tabela 1 e fixados em formalina neutra tamponada (FNT) por 48 horas para posterior processamento. Secções coradas com azul de Astra e safranina (safrablau 19:1) (Gerlach, 1969) foram utilizadas para análise estrutural. Foi realizado o teste histoquímico com o fluorocromo corifosfina (Ueda e Yoshioka, 1976) para pectina, como forma de detectar modificações na parede celular durante o processo germinativo de sementes de macaúba.

As amostras foram desidratadas em série butílica e emblocadas em parafina (Histosec<sup>®</sup>). Foram seccionadas longitudinal e transversalmente em micrótomo rotativo (Spencer 820) com 10µm de espessura. As secções foram desparafinizadas em série xilólica, coradas com safrablau e montadas em resina sintética (Permount<sup>®</sup>), ou submetidas ao teste histoquímico e montadas em água. As imagens foram obtidas utilizando microscópio de luz Olympus (AX-70) equipado com sistema U-Photo e o programa Spot-Basic. Os fluorocromos foram observados por meio de sistema de epifluorescência equipado com filtro UV (WU:330-385 nm), um espelho dicróico (400 nm) e um filtro de barreira (420 nm).

## **Resultados**

#### *Descrição morfológica dos estádios*

O estágio I (Figura 1A) corresponde ao tempo inicial do processo germinativo estudado. A semente intacta é recoberta pelo tegumento, de coloração marrom escura. Em secção longitudinal, o endosperma apresentou coloração esbranquiçada, semelhante à parafina, e proeminente cavidade interna que é conectada fisicamente à cavidade que abriga o embrião. Nessa fase o embrião pôde ser facilmente destacado do endosperma que o circunda, estando conectado fisicamente apenas pelo endosperma micropilar. O endosperma micropilar é um tecido constituído por células de paredes espessas, situado entre a região proximal do embrião e o tegumento da região micropilar.

Com o aumento gradativo do teor de água observado nos estádios II, III, IV e V, foi observado que embrião e endosperma aumentaram de volume consideravelmente sem alterar a aparência externa da semente. Os estádios II a IV foram omitidos por não apresentarem modificações morfológicas consideráveis. A absorção maciça de água culminou, conforme mostrado em secção longitudinal da semente no estágio V (Figura 1B), em mudança de coloração do endosperma para branco gelo. Observou-se também que a cavidade interna da semente foi reduzida. No final do estágio V, houve a retirada manual do endosperma micropilar, seguindo o protocolo de Motoike et al. (2007).

No estágio VI (Figura 1C) foi constatado o alongamento do pecíolo cotiledonar em torno de 2 mm para fora da semente. Esse evento foi considerado como germinação no sentido estrito, conforme adotado por Ribeiro et al. (2011). Além da protrusão do pecíolo cotiledonar no embrião, não foram constatadas alterações morfológicas no endosperma nesse estágio.

O estágio VII (Figura 1D) apresentou pecíolo cotiledonar mais alongado, com cerca de 5 a 7 mm de comprimento. O endosperma não apresentou modificações morfológicas nesse estágio.

O estágio VIII (Figura 1E) foi marcado pelo surgimento da radícula. Nessa fase, o pecíolo cotiledonar apresentava de 1,0 a 1,2 centímetros de comprimento. Na extremidade oposta à radícula, o haustório se apresentou desenvolvido e maior que nos estádios anteriores, além de superfície com invaginações proeminentes. No entorno do haustório o endosperma apresentou sinais de degradação e coloração menos intensa que o endosperma residual.

O estágio IX (Figura 1F) foi caracterizado pela presença de plúmula proeminente, com pecíolo cotiledonar com cerca de 1,0 a 1,2 cm e a radícula 0,3 a 0,5 cm de comprimento. Nesse estágio o haustório apresentou aparência esponjosa e ocupava

grande parte do interior da semente. O endosperma ao redor do haustório apresentou intensos sinais de degradação.

#### *Curva de embebição*

As sementes de macaúba apresentaram teor médio de água de 6,22% na base úmida. O aumento crescente no teor de água ocorreu até o 8º dia de avaliação (fase I). Do oitavo ao 14º dia o teor de água não aumentou significativamente, caracterizando a fase II (Figura 2).

Três dias após a escarificação mecânica na região da micrópila, houve a protrusão do pecíolo cotiledonar, caracterizado como critério para a germinação no sentido estrito. Esse evento ocorreu, em pelo menos 50% das sementes, no 9º dia da curva de embebição.

#### *Ensaio das enzimas degradativas de mananos*

Ao longo do processo germinativo, a atividade da  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase iniciou em torno de 11 e 22  $\mu\text{mols AR.30min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  (estádio 1) em embrião e endosperma, respectivamente. Do estágio I ao V houve redução para 1,4  $\mu\text{mols AR.30min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  no endosperma, com ponto de mínimo no gráfico em 6,5 dias de embebição. A atividade das enzimas no endosperma foi superior à atividade no embrião e haustório em todos os pontos avaliados. Somente após a protrusão do pecíolo cotiledonar (estádio VI, 3 a 6 dias após a escarificação) detectou-se aumento exponencial na atividade das enzimas em ambos os tecidos chegando a 36 e 66  $\mu\text{mols AR.30min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  em haustório e endosperma, respectivamente (Figura 3).

A atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase apresentou resposta semelhante às demais em todos os pontos, sendo maior no endosperma micropilar e lateral que no embrião/haustório. Até o estágio VII, a atividade dessa enzima foi em torno de 0,2 e 0,3  $\mu\text{mols pNP.mL}^{-1}.\text{g. min}^{-1}$ . Somente a partir da protrusão e início de alongamento do pecíolo cotiledonar houve aumento na atividade da  $\alpha$ -galactosidase chegando a 0,8  $\mu\text{mols pNP.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$  no estágio IX (Figura 4).

#### *Determinação de mananos*

Manose e galactose foram os monossacarídeos detectados pelo método empregado. O teor inicial de mananos e/ou galactomananos foi em média de 30  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca logo após a protrusão do pecíolo cotiledonar, que marca a germinação

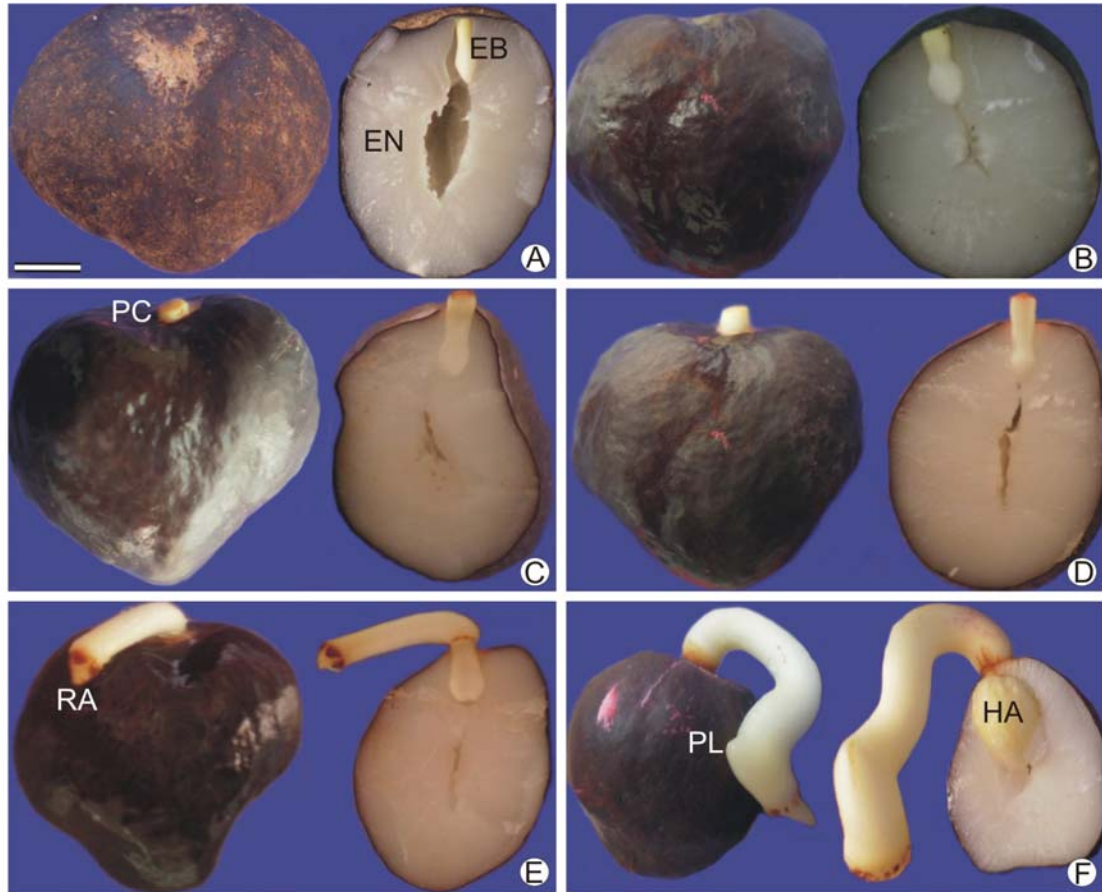


no sentido estrito. Aos 12 dias do processo germinativo, houve uma queda do teor de mananos para média de  $3,0 \text{ mg.g}^{-1}$  MS, estabilizando em torno de  $5 \text{ mg.g}^{-1}$  de MS de endosperma (Figura 5).

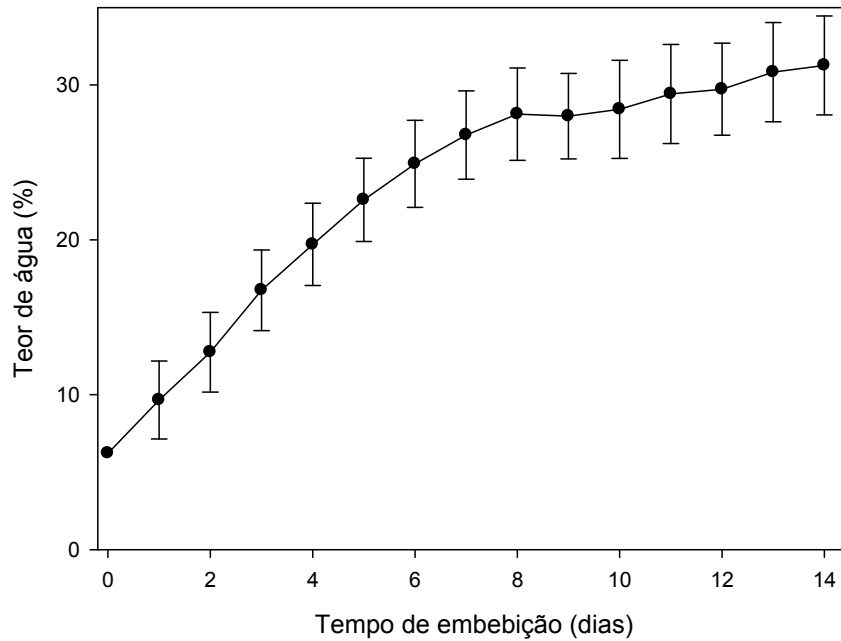
### *Análise histológica*

A coloração com safrablau em secções longitudinais de embrião ou haustório e endosperma adjacente (Figura 6) representou as transformações morfoanatômicas que esses tecidos sofreram durante o período germinativo. Do estágio I para o V (Figura 6A e B), devido ao aumento no conteúdo de água, houve aumento no volume celular. No estágio VI (Figura 6C), o pecíolo cotiledonar iniciou o processo de alongamento, que se estendeu pelos estádios VII (Figura 6D) e VIII (Figura 6E), culminando com o aparecimento da radícula. A coloração de embrião e endosperma dos estádios I ao VIII (Figura 6A, B, C, D e E) foi homogênea. No estágio IX (Figura 6F), o endosperma adjacente apresentou pouca intensidade de coloração, demonstrando perda de estrutura de parede celular.

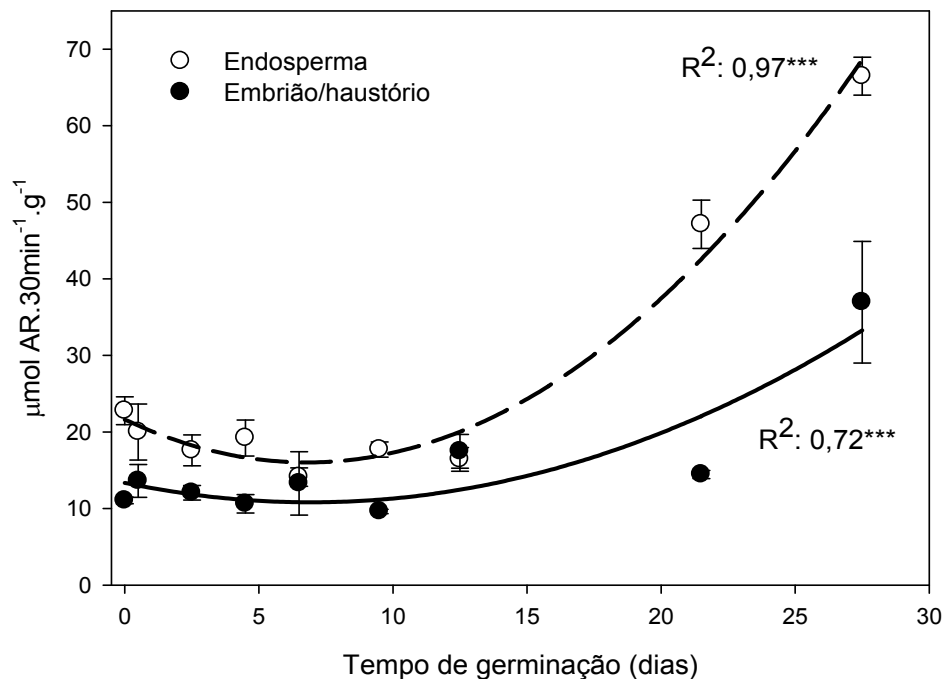
O teste histoquímico de corifosfina, que detecta de cor laranja substâncias pécnicas, evidenciou modificações no endosperma lateral e no embrião e haustório decorrentes do processo germinativo de macaúba (Figura 7). No estágio I, o embrião apresentou células isodiamétricas com parede celular delgada e conteúdo evidente. As células do endosperma apresentaram parede pronunciada, rica em substâncias pécnicas e conteúdo celular pouco evidente (Figura 7A, B). No endosperma micropilar, foi observado que as células possuem parede espessa, pobres em pectinas e formam de quatro a seis camadas com pouco conteúdo celular (Figura 7A). Durante a embebição (estádios II a V), as células tanto do embrião quanto do endosperma lateral e micropilar tornaram-se túrgidas. Entretanto, esse fato não acarretou em modificações histoquímicas na parede celular do endosperma, mas no embrião o conteúdo celular sofreu alterações (Figura 7C). Nos estádios VI e VII (Figuras 7D e E, respectivamente), as células do endosperma adjacente ainda estavam dotadas de substâncias pécnicas, mesmo que a germinação no sentido estrito já houvesse ocorrido. Somente nos estádios VIII e IX (Figuras 7F e G, respectivamente) as células do endosperma apresentaram modificações. As células adjacentes ao haustório estavam degradadas e ausentes em conteúdo. A parede celular apresentou coloração verde e não laranja, o que indica que houve degradação ou mobilização de substâncias pécnicas.



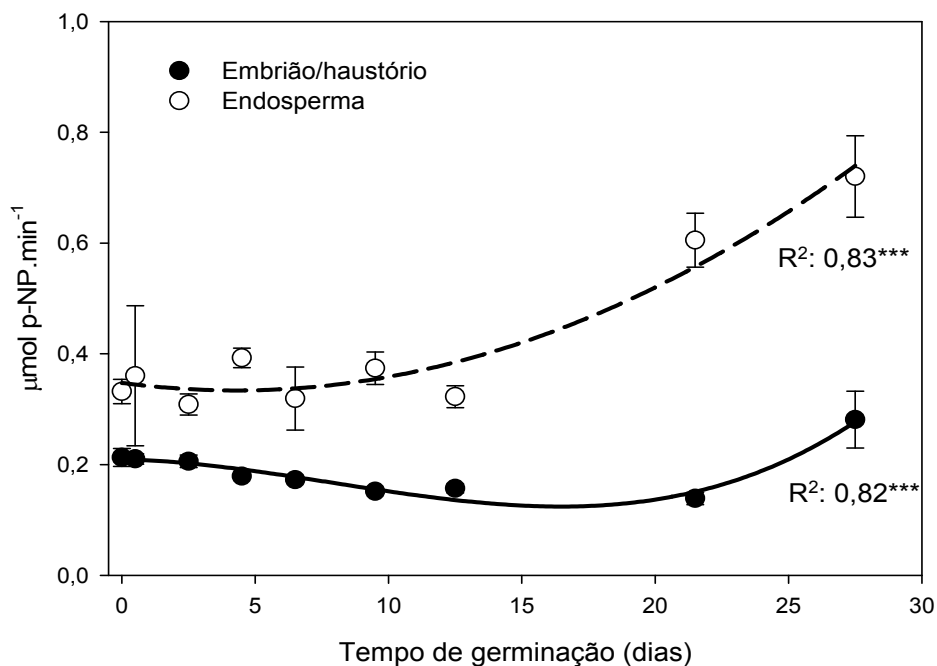
**Figura 1.** Estádios do processo germinativo de macaúba. A – estágio I. B – Estádio V. C – Estádio VI. D – Estádio VII. E – Estádio VIII. F – Estádio IX. Barra: 0,5 cm. EB: embrião; EN: endosperma; PC: pecíolo cotiledonar; RA: radícula; PL: plúmula proeminente; HA: haustório.



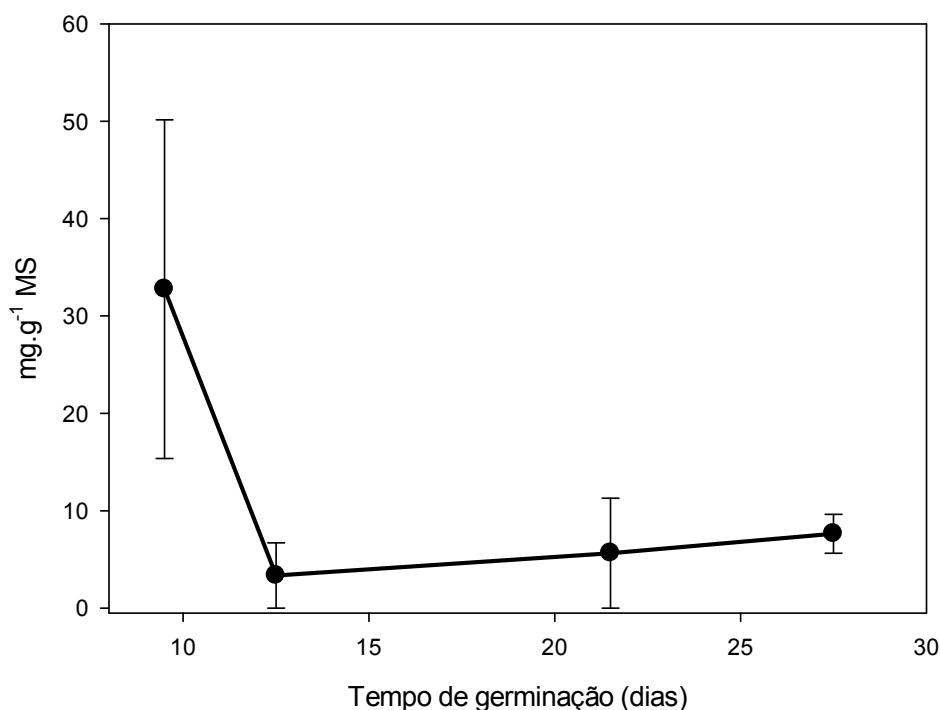
**Figura 2.** Curva de embebição de sementes de *Acrocomia aculeata* submetidas ao protocolo de superação de dormência de Motoike et al. (2007). As barras verticais são erros padrão entre as repetições.



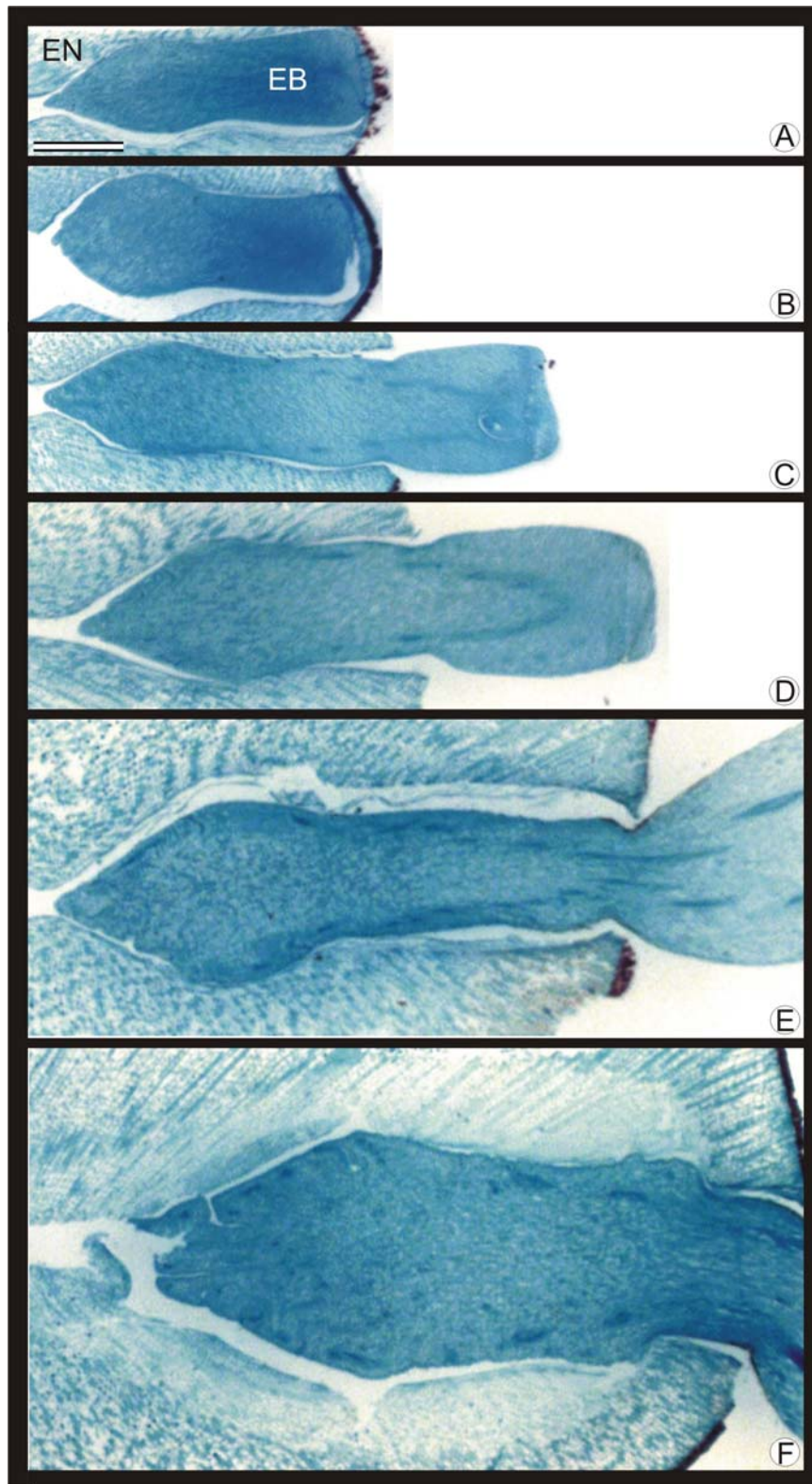
**Figura 3.** Atividades combinadas das enzimas  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase no embrião/haustório e endosperma durante o processo germinativo de sementes de macaúba. Os dados possuem distribuição normal pela estatística K-S e foram ajustados ao modelo de regressão linear quadrático pelo programa Sigma Plot<sup>®</sup> 10. As barras verticais são erro padrão entre as repetições.  
\*\*\* significativo a 0,1% de probabilidade.



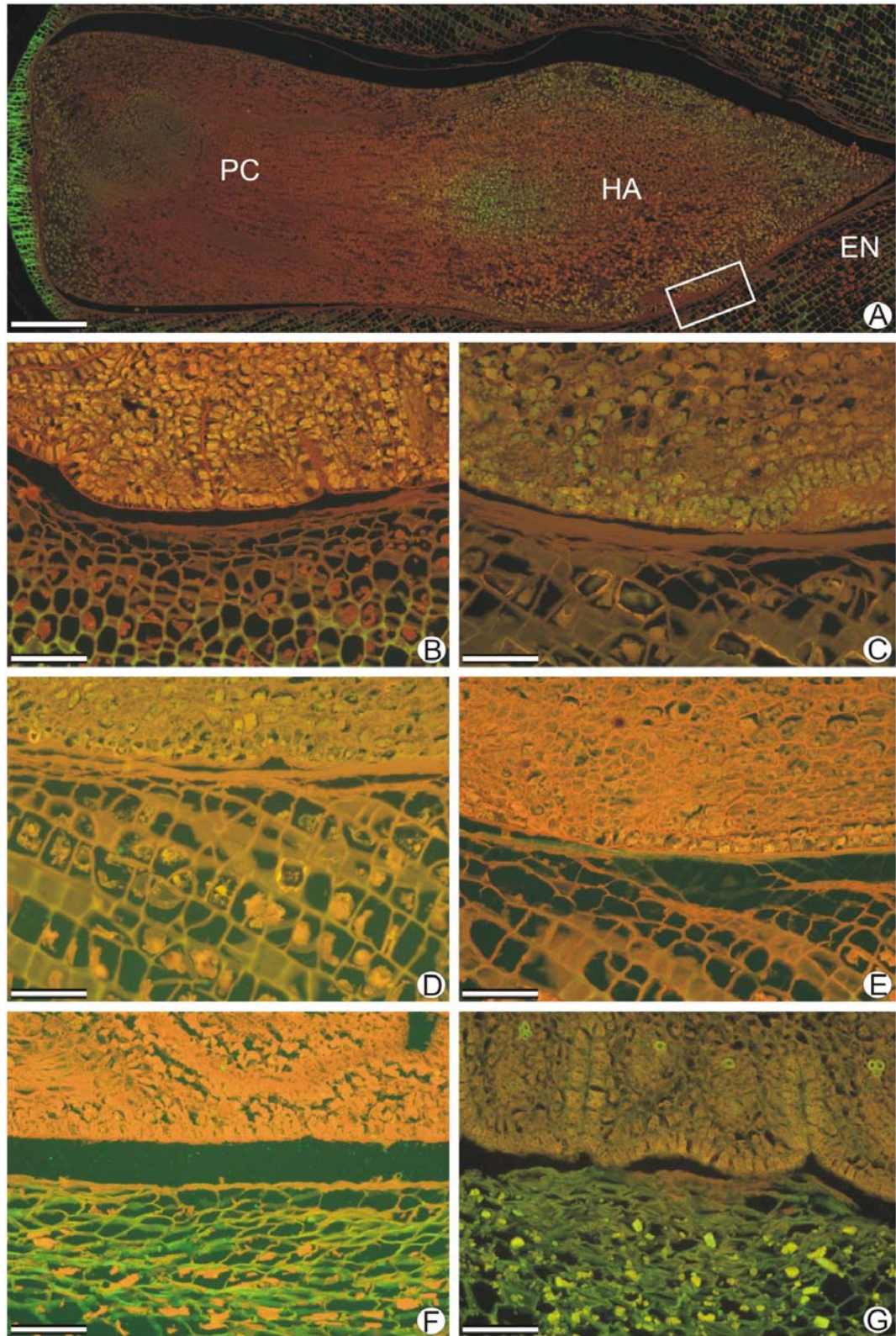
**Figura 4.** Atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase no embrião/haustório e endosperma durante o processo germinativo de sementes de macaúba. Os dados possuem distribuição normal pela estatística K-S e foram ajustados ao modelo de regressão linear quadrático para os dados de endosperma e cúbico para os dados de embrião/haustório pelo programa Sigma Plot<sup>®</sup> 10. As barras verticais são erro padrão entre as repetições. \*\*\* significativo a 0,1% de probabilidade.



**Figura 5.** Teor de mananos de endosperma lateral após a germinação de sementes de *Acrocomia aculeata* submetidas ao protocolo de superação de dormência de Motoike et al. (2007). As barras verticais são erro padrão entre as repetições.



**Figura 6.** Secções longitudinais dos estádios de germinação de sementes de macaúba coradas com safrablau. A – Estádio I. B – Estádio V. C – Estádio VI. D – Estádio VII. E – Estádio VIII. F – Estádio IX. Barra: 3 mm. EN: endosperma; EB: embrião.



**Figura 7.** Secções longitudinais de sementes de macaúba submetidas ao teste histoquímico de corifosfina. A – Embrião e endosperma adjacente no estágio I. O retângulo branco indica a região demonstrada nos demais estádios. B – Detalhe do estágio I. C – Detalhe do estágio V. D – Detalhe do estágio VI. E – Detalhe do estágio VII. F – Detalhe do estágio VIII. G – Detalhe do estágio IX. Barras: A = 500  $\mu$ m; B a G = 100  $\mu$ m. PC: pecíolo cotiledonar; HA: haustório; EN: endosperma.

## Discussão

As sementes de macaúba utilizadas nesse estudo apresentaram teor de água na base úmida semelhante às ortodoxas, que podem sofrer desidratação até que o conteúdo de água alcance cerca de 5% sem prejudicar sua viabilidade (Roberts e Ellis, 1988). O baixo teor de água inicial (6,22%) está relacionado ao fato de que os lipídios serem a reserva majoritária de sementes de macaúba (dados apresentados no capítulo II).

A embebição das sementes ocorre em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) segundo o protocolo de Motoike et al. (2007). O tegumento de sementes de *A. aculeata* é mecanicamente frágil devido à presença de células isodiamétricas com paredes finas e não lignificadas (Moura et al., 2010). É provável que as sementes de macaúba não apresentem restrição tegumentar à entrada de água, pois a embebição, apesar de lenta, é evidente, facilitada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A embebição das sementes de *A. aculeata*, conforme tratadas segundo o protocolo de superação de dormência em estudo, apresentaram padrão bifásico de absorção de água. O padrão bifásico é peculiar, sendo o mais comum o trifásico, conforme proposto por Bewley e Black (1994). É provável que a retirada manual do endosperma micropilar após o período de embebição alivie a pressão interna do embrião exercida pela entrada de água, culminando com a protrusão do pecíolo no início da fase II e não no início da fase III. Apesar de a germinação ocorrer, não quer dizer que embrião e endosperma estejam metabolicamente maduros e prontos para a germinação. Durante a embebição, há reparo de cristas mitocondriais e síntese de enzimas respiratórias como citocromo c oxidase, glicose-6-fosfato desidrogenase, citocromo c NADH redutase e inclusive álcool desidrogenase (Mayer e Shain, 1974), dentre outros reparos, como em RNAm e DNA, além de síntese de enzimas hidrolases de parede celular (Nonogaki et al., 2007).

Com os resultados apresentados, pode-se inferir que o tipo de hemicelulose existente na parede celular do endosperma de sementes de macaúba é galactomanano combinado ou não com mananos puros. A detecção de manose e galactose e a atividade de enzimas que degradam mananos, além do espessamento da parede celular do endosperma, conforme Moura et al. (2010), são indícios para essa afirmação. A dureza típica de sementes de Arecaceae é dada pela presença de mananos e galactomananos nas paredes celulares de endosperma (Buckeridge et al., 2000). Mananos foram detectados também no endosperma de *Euterpe edulis* (Panza et al., 2004), *Phoenix dactylifera* (DeMason et al., 1983) e *Washingtonia filifera* (DeMason, 1986), e galactomananos no endosperma de *Elaeis guineensis* (Alang et al., 1987).

No presente estudo, a atividade degradativa de mananos tanto no embrião quanto no endosperma, foi pronunciada a partir do período pós-germinativo, inaugurado pela protrusão do pecíolo cotiledonar (germinação no sentido estrito). Esses dados corroboram com trabalhos de sementes de *Lycopersicon esculentum* (Nonogaki et al., 2000) e de *Trigonella foenum-graecum*, *Carum carvi*, *Cassia tora*, *Ceratonia siliqua*, *Phoenix dactylifera* e *Coffea arabica* (Gong et al., 2005), em que a atividade da  $\beta$ -mananase teve papel secundário na emergência dos embriões, evento diretamente relacionado à estrutura da parede celular próxima à micrópila. Além disso, a atividade de  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase estão correlacionadas, sugerindo uma atuação conjunta (Mo e Bewley, 2003). Nas sementes de *A. aculeata* não há evidências da existência de região com células de paredes menos espessadas em torno da micrópila que permita a germinação, ao contrário do trabalho de Gong et al. (2005). No presente trabalho, as enzimas degradativas atuaram no período de mobilização de reservas e não no enfraquecimento do endosperma micropilar, que até o fim da embebição não havia sido rompido. Na germinação *in situ* de sementes de macaúba, as atividades conjuntas das enzimas  $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase podem realizar o enfraquecimento do endosperma micropilar. Outros trabalhos também relatam resposta semelhante às sementes de macaúba para a atividade de enzimas degradativas de mananos, como de *Coffea arabica* (Giorgini e Comoli, 1996), *Lycopersicon esculentum* e *Daucus carota* (Bewley, 1997), e *Lactuca sativa* (Nonogaki e Morohashi, 1999; Wang et al., 2004).

O teste histoquímico para pectinas (corifosfina) e a coloração com safrablau correlacionaram qualitativamente a atividade das enzimas de degradação de mananos e a redução no teor de mananos nos estádios pós-germinativos. Até o estágio VII, as células do endosperma eram dotadas de substâncias pécticas, com aspecto não deteriorado. Os estádios VIII e IX foram os que apresentaram maiores modificações na parede celular do endosperma, maiores atividades degradativas de mananos e menores teores de mananos. As modificações representam perda de substâncias pécticas e da lamela média, indicando desorganização e deterioração celular (Weis et al., 1988). O aspecto deteriorado do endosperma adjacente nos estádios finais avaliados deve-se tanto às modificações bioquímicas quanto físicas, devido à crescente expansão do haustório (Alang et al., 1988).

A redução no teor de mananos foi concomitante ao aumento das atividades da  $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase, evidenciando a mobilização de polissacarídeos de reserva de parede celular. É provável que haja envolvimento de



celulases e pectinases na degradação de parede celular no endosperma devido às modificações observadas no teste histoquímico. A redução na espessura da parede celular também foi detectada em endosperma de sementes de *Elaeis guineensis* concomitante à redução da porcentagem de carboidratos insolúveis e do aumento nas atividades de  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -mananase (Alang et al., 1988). A degradação da parede celular é necessária também para que as reservas do interior da célula, como lipídios e proteínas, sejam acessadas por outras enzimas de mobilização. A hidrólise de mananos pelas enzimas  $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -galactosidase libera manose e galactose que servirão de fonte de energia para o embrião em emergência (Bewley e Black, 1994). Conforme galactomananos são degradados, amido transitório é formado no cotilédone (dados apresentados no segundo capítulo), o que sugere uma relação entre os dois fenômenos (Buckeridge e Dietrich, 1996). Em endosperma de sementes de *Arecaceae*, à medida que mananos são lentamente degradados (DeMason et al., 1983), eles provêm resistência mecânica ao embrião em desenvolvimento durante e após a germinação (Buckeridge, 2010).

O aumento da atividade da  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase pode estar relacionado à aplicação de ácido giberélico após a retirada do endosperma micropilar, pois as giberelinas são promotoras da germinação por ativarem hidrolases de parede (Ni e Bradford, 1993; Bewley, 1997). Esse fato corrobora com o trabalho de Ribeiro et al. (2011), em que o tratamento mais eficiente para a superação de dormência de sementes de macaúba foi a remoção do tegumento opercular combinada com a aplicação de alta dose de GA<sub>3</sub>.

A atividade das enzimas degradativas de mananos foi mais pronunciada no endosperma que no embrião/haustório durante todo o processo germinativo devido à presença de mananos (substrato) no endosperma. Além da presença do substrato, pode haver genes diferentes codificando para isoformas de  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase tanto no embrião quanto no endosperma. De acordo com Nonogaki et al. (2000), a  $\beta$ -mananase em sementes de tomateiro é codificada por dois genes diferentes, um que só se expressa no endosperma micropilar e outro que só é expresso no endosperma lateral após a emergência da radícula. Em *Arabidopsis thaliana* há expressão de genes de  $\beta$ -mananase tanto no endosperma lateral e micropilar quanto na radícula após a germinação (Iglesias-Fernández et al., 2011). Dessa forma, é possível que existam genes que codifiquem mananases específicas de embrião/haustório que são sintetizadas *de*

*novo* durante a germinação (Nonogaki et al., 2000) ou que as enzimas já estejam presentes de forma inativa na semente antes da embebição (Ren et al., 2008).

Durante a embebição das sementes de macaúba nesse trabalho, a atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi baixa em relação ao período pós-germinativo (após a protrusão do pecíolo cotiledonar). Entretanto, pode-se dizer que houve atividade devido à especificidade da enzima ao substrato pNP-gal. A atividade da  $\alpha$ -galactosidase é basicamente constitutiva, estando presente desde a embebição até à emergência da radícula (Nonogaki et al., 2007). Enzimas do metabolismo da galactose estão entre as primeiras a serem ativadas ou produzidas durante a germinação, principalmente devido à utilização desse monossacarídeo nos primeiros eventos respiratórios durante a embebição (Mayer e Shain, 1974). Em *Phoenix dactyfera* a  $\alpha$ -galactosidase é sintetizada durante o desenvolvimento do endosperma e está associada com a maturação e mobilização da parede celular (DeMason et al., 1992), e pode ser ativada por proteólise durante e após a germinação em *Sesbania virgata* (Tonini et al., 2010). Segundo Magalhães et al., (2009) em cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* a  $\alpha$ -galactosidase é pré-formada, apresentando atividade desde o início da embebição.

De forma semelhante à  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase, a enzima  $\alpha$ -galactosidase apresentou aumento na atividade após a protrusão do pecíolo cotiledonar no endosperma. Esses dados sugerem atuação concomitante das duas enzimas na mobilização de polissacarídeos de parede celular, assim como em sementes de *Trigonella foenum-graecum* (Reid, 1985). Em *Sesbania virgata* a mobilização de galactomananos é um fenômeno pós-germinativo por ser iniciado somente após a protrusão da radícula (Tonini et al., 2010). No embrião/haustório, a atividade da  $\alpha$ -galactosidase não aumentou exponencialmente durante o processo germinativo estudado e esteve sempre abaixo da atividade da enzima no endosperma. Segundo Feurtado et al. (2001), existem evidências de que a enzima está presente no endosperma lateral e micropilar durante e após a germinação e, em menor grau, no embrião, em sementes de *Lycopersicon esculentum*. É presumível que no embrião a atividade da  $\alpha$ -galactosidase esteja envolvida na mobilização de oligossacarídeos da série da rafinose já presentes no tecido (Hilhorst e Downie, 1996).

Após a protrusão do pecíolo cotiledonar, o haustório começa a se desenvolver aumentando em volume e ampliando as invaginações periféricas que provavelmente ampliam a superfície de exposição às células do endosperma lateral no período pós-

germinativo. Entretanto, não há conexão física entre haustório e endosperma, e a região formada entre eles é a zona de dissolução do haustório, por onde produtos de hidrólise de reservas e enzimas hidrolíticas permeiam (DeMason et al., 1985; Buckeridge et al., 2000; Gong et al., 2007; Sekhar e DeMason, 1990). Durante o processo germinativo de macaúba, a primeira estrutura que emerge é o pecíolo cotiledonar, que com o decorrer dos estádios de desenvolvimento diferenciará parte aérea e radícula pelo desenvolvimento do eixo embrionário. Dessa forma, a plântula se desenvolve a certa distância da semente, caracterizando germinação do tipo remota ligular (Tomlinson, 1990).

Em suma, este trabalho traz informações inéditas a respeito da germinação de sementes de *A. aculeata*. O protocolo de superação de dormência de Motoike et al., (2007) promoveu a embebição das sementes de macaúba. Entretanto, a retirada manual da micrópila contribuiu para acelerar a protrusão do pecíolo cotiledonar sem, contudo, ter inaugurado a fase III da embebição. A  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase atuam claramente na mobilização de galactomananos e/ou mananos não tendo aparente participação no enfraquecimento do endosperma micropilar nem na superação da dormência. A  $\alpha$ -galactosidase não é específica de mobilização de galactomananos ou durante a germinação e crescimento inicial. É provável que, além das enzimas estudadas, outras participem no processo germinativo de macaúba, como celulasas e expansinas. A histoquímica demonstrou com eficiência as modificações decorrentes dos processos bioquímicos.

## Referências

- Alang, Z. C., Moir, G. F. J., Jones, L. H.** (1988) Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Annals of Botany* 61,261-268.
- Bewley, J. D.** (1997) Breaking down the walls – a role for endo- $\beta$ -mannanase in release from seed dormancy? *Trends in Plant Science* 2(12), 464-469.
- Bewley, J. D., Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum. 2 ed.
- Bora, P. S., Rocha, Rosalynd, V. M.** (2004) Macaíba Palm: Fatty and amino acids composition of fruits. *Ciencia y tecnologia alimentaria*. Galicia, Espanha 4(3), 158-162.
- Brasil.** (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília: SDA/ACS, 399p.

**Buckeridge, M. S.** (2010) Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* 154, 1017-1023.

**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., Santos, H. P., Tiné, M. A. S.** (2000) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 141-156.

**DeMason, D. A.** (1985) Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera* L.). *Protoplasma* 126, 168-177.

**DeMason, D. A.** (1986) Endosperm structure and storage reserve histochemistry in the palm, *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany* 73(9), 1332-1340.

**DeMason, D. A., Madore, M. A., Sekhar, K. N. C., Harris, M. J.** (1992) Role of  $\alpha$ -galactosidase in cell wall metabolism of date palm (*Phoenix dactylifera*) endosperm. *Protoplasma* 166, 3-4, 177-186.

**DeMason, D. A., Sexton, R., Gorman, M., Reid, J. S. G.** (1985) Structure and biochemistry of endosperm breakdown in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Protoplasma* 126(3), 159-167.

**DeMason, D. A., Sexton, R., Reid, J. S. G.** (1983) Structure, composition and physiological state of the endosperm of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany* 52, 71-80.

**DeMason, D. A., Widney, D., Stillman, J. I.** (1992) *In vitro* and transplantation experiments with germination of date embryos. *Canadian Journal of Botany* 70(5), 965-974.

**Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H.** (1985) Handbook of seed technology for genebanks: compendium of specific germination information and test recommendations, v. 2. *International Board For Plant Genetic Resources, Roma*. <http://ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublications/52/begin.htm>.

**Englyst, H. N.; Cummings, J. H.** (1984) Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst* 109, 973-942.

**Feurtado, J.A., Banik, M., Bewley, D.** (2001) The cloning and characterization of  $\alpha$ -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *Journal of Experimental Botany* 52, 1239-1249.

**Giorgini, J. F., Comoli, E.** (1996) Effect of embryo endogenous GA3 on endospermic endo- $\beta$ -mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8(1), 43-49.

- Gong, X., Bassel, G. W., Wang, A., Greenwood, J. S., Bewley, D.** (2005) The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- $\beta$ -mannanase activity. *Annals of Botany* 96,1165-1173.
- Gong, X., Bewley, J. D.** (2007) Sorting out the *LeMANs*: endo- $\beta$ -mannanase genes and their encoded proteins in tomato. *Seed Science Research* 17, 143-154.
- Guimarães, V. M., Rezende, S. T., Moreira, M. A., Barros, E. G., Felix, C. R.** (2001) Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry* 58, 67-73.
- Herth, W., Schnepf, E.** (1980) The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma* 105, 129-133.
- Hiane, P. A., Macedo, M. L. R., Silva, G. M., Neto, J. A. B.** (2006) Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., em ratos wistar em crescimento. *B. Ceppa* 24(1), 191-206.
- Hilhorst, H. W. M., Downie, B.** (1995) Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker): studies with the *sitiens* mutant. *Journal of Experimental Botany* 47(294), 89-97.
- Iglesias-Fernández, R., Rodríguez-Gacio, M. C., Barrero-Sicilia, C., Carbonero, P., Matilla, A.** (2011) Three endo- $\beta$ -mannanase genes expressed in the micropilar endosperma and in the radicle influence germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Planta* 233, 25-36.
- Lisboa, C. G. S., Tonini, P. P., Tiné, M. A. S., Buckeridge, M. S.** (2006) Endo- $\beta$ -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterization and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(2),269-280.
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., Zhang, J.** (2010) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* 61(11), 2979-2990.
- Magalhães, S. R., Borges, E. E. L., Berger, A. P. A.** (2009) Alterações nas atividades das enzimas alfa-galactosidase e poligalacturonase e nas reservas de carboidratos de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvú) durante a germinação. *Revista Brasileira de Sementes* 31(2), 253-261.
- Mayer, A. M., Shain, Y.** (1974) Control of seed germination. *Annual Reviews of Plant Physiology* 25, 167-193.
- Miller, G. L.** (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3), 426-428.
- Mo, B., Bewley, J. D.** (2003) The relationship between  $\beta$ -mannosidase and endo- $\beta$ -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison

of seed populations and individual seeds. *Journal of Experimental Botany* 54(392), 2503-2510.

**Motoike, S. Y., Lopes, F. A., Oliveira, M. A. R., Carvalho, M., Sá Júnior, A. Q.** (2007) Processo de germinação e produção de sementes pré-germinadas de palmeiras do gênero *Acrocomia*. Registro de patente: PI0703180-7.

**Moura, E. F., Ventrella, M. C., Motoike, S. Y.** (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67(4), 399-407.

**Murray, D. R., Peoples, M. R., Waters, S. P.** (1979) Proteolysis in the axis of the germinating pea seed. *Planta* 147(2) 111-116.

**Nonogaki, H., Chen F., Bradford, K. J.** (2007) Mechanisms and genes involved in germination *sensu strictu*. In: Bradford, K., Nonogaki, H. Annual Plant Reviews, 27, *Seed Development, Dormancy and Germination*. Wiley-Blackwell, 392p.

**Nonogaki, H., Gee, O. H., Bradford, K. J.** (2000) A germination-specific endo- $\beta$ -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology* 123,1235-1245.

**Nonogaki, H., Nomaguchi, M., Morohashi, Y., Matsushima, H.** (1998) Development and localization of endo- $\beta$ -mananase in the embryo of germinating and germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany* 49(326), 1501-1507.

**Panza, V., Láinez, V., Maldonado, S.** (2004) Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145,445-453.

**Reid, J.S.G.** (1985) Structure and function in legumeseed polysaccharides. In: Brett, C. (Ed.) *Biochemistry of the plant cell walls*. Cambridge, Cambridge Univ. Press., 1985, p.259-268.

**Reid, J.S.G., Meier, H.** (1973) Enzymic activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L. *Leguminosae*). Secretion of a- galactosidase and b-mannosidase by the aleurone layer. *Planta*, 112,301-308.

**Ren, Y., Bewley, J. D., Wang, X.** (2008) Protein and gene expression patterns of endo- $\beta$ -mannanase following germination of rice. *Seed Science and Research* 18, 139-149.

**Ribeiro, L. M., Souza, P. P., Rodrigues Jr., A. G., Oliveira, T. G. S., Garcia, Q. S.** (2011) Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. *Seed Science and Technology* 39(2), 303-317.

**Roberts, E. H., Ellis, R. H.** (1988) Water and seed survival. Communication presented at a symposium *Advances in Seed Biology*.

**Sekhar, K. N. C., DeMason, D. A.** (1990) Identification and immunocytochemical localization of alfa-galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181(1), 53-61.

**Tomlinson, P.B.** (1990) *The structural biology of palms*. Clarendon Press, Oxford. 477 p.

**Tonini, P. P., Carrara, T. B., Buckeridge, M. S.** (2010) Storage proteins and cell wall mobilization in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees* 24, 675-684.

**Ueda, K., Yoshioka, S.** (1976) Cell wall development of *Micrasterias americana*, especially in isotonic and hypertonic solutions. *Journal of cell Science* 21, 617-631.

**Wang, A., Li, J., Bewley, D.** (2004) Molecular cloning and characterization of an endo- $\beta$ -mannanase gene expressed in the lettuce endosperm following radicle emergence. *Seed Science Research* 14, 267-276.

**Weis, K., Polito, V. S., Labavitch, J. M.** (1988) Microfluorometry of pectic materials in the dehiscence zone of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) da Webb) fruits. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 36(8):1037-1041.

## CAPÍTULO II

---

### **Alterações bioquímicas e histoquímicas durante a germinação e a mobilização de reservas de sementes de *Acrocomia aculeata***

#### **Resumo**

A mobilização de reservas é um evento bioquímico e fisiológico que provê as necessidades energéticas para a plântula após a germinação. Sementes de *Acrocomia aculeata* (macaúba), cuja germinação é difícil, são dotadas de lipídios, proteínas e galactomananos (ver capítulo I) como principais reservas. Esse trabalho teve como objetivo investigar as alterações bioquímicas e histoquímicas das reservas de sementes de *A. aculeata* submetidas ao protocolo de superação de dormência para espécies do gênero *Acrocomia*. O teor de lipídios, proteínas e amido foram quantificados no endosperma e embrião/ haustório, durante 29 dias da germinação. A caracterização qualitativa das alterações bioquímicas, durante este período, foi realizada por meio de testes histoquímicos. A reserva protéica foi a primeira a sofrer alteração no decorrer do processo germinativo, decaindo continuamente no embrião já a partir do início da embebição, mas permanecendo inalterada no endosperma. O teor de lipídios decresceu no haustório após a protrusão do pecíolo cotiledonar, mas aumentou em proporção no endosperma. Não foi detectado amido no endosperma pelo teste de lugol. Entretanto, o teor de amido aumentou exponencialmente no período pós-germinativo no haustório, na região próxima à epiderme e em células adjacentes aos tecidos vasculares. Sugere-se que a formação de grãos de amido no haustório seja em decorrência do catabolismo de reservas do endosperma ou do próprio embrião. Os resultados indicam que apesar de a reserva majoritária ser de lipídios, esses são acessados tardiamente, após o período germinativo estudado. Provavelmente os lipídios estão relacionados ao crescimento e estabelecimento da plântula e não à germinação de sementes de macaúba.

**Palavras-chave:** mobilização de reservas, histoquímica, lipídios, proteínas, amido, haustório, *Acrocomia aculeata*.



## Introdução

Após a dessecação, as sementes passam por um período de dormência, que pode ser seguido de um período de embebição, que culmina com a germinação. Esta só ocorre quando as condições ambientais são favoráveis (Pitchard et al., 2002). A mobilização de reservas é um evento que acontece a partir da germinação *sensu strictu*. É essencial para prover energia para o crescimento inicial da plântula até que esta esteja hábil para iniciar os primeiros eventos fotossintéticos (Mayer e Shain, 1974; Bewley e Black, 1994).

Nas espécies de *Arecaceae* que possuem germinação do tipo remota, a primeira estrutura que emerge é o pecíolo cotiledonar, que marca a germinação no sentido estrito (Tomlinson, 1990). Durante o processo germinativo de sementes de *Arecaceae*, o haustório expande no interior da semente enquanto secreta enzimas que degradam as reservas do endosperma e as repassa à plântula em desenvolvimento (Oo e Stumpf, 1983).

Dentre as reservas mais comumente encontradas em sementes de espécies da família *Arecaceae*, estão lipídios, mananos e galactomananos, proteínas e, menos comumente o amido (DeMason et al., 1983; Alang et al., 1988; Buckeridge et al., 2000; Panza et al., 2004). Lipídios, quando perfazem significativa porcentagem nas reservas do endosperma, são utilizados tardiamente (Alang et al., 1988), por serem energeticamente custosas, necessitando de maior número de etapas metabólicas para se tornarem prontamente consumíveis (Bewley e Black, 1994; Harwood, 1997; Graham, 2008). Além disso, a mobilização de lipídios de reserva não é essencial para a germinação da semente, mas sim para o estabelecimento da plântula (Graham, 2008).

Mananos e galactomananos são carboidratos presentes nas paredes celulares do endosperma e são consumidos anteriormente aos lipídios (Alang et al., 1988; Oo e Stumpf, 1983) durante a germinação no sentido estrito (Bewley, 1997; Buckeridge et al., 2000; Buckeridge, 2010) ou durante a expansão do haustório (Balasubramaniam et al., 1973). Proteínas são menos utilizadas para a produção de energia, sendo primariamente fonte de esqueletos carbônicos e aminoácidos para a síntese de novas proteínas e enzimas (Lott, 1981).

A família *Arecaceae* contém espécies de interesse comercial, amplamente utilizadas e estudadas, como o dendezeiro (*Elaeis guineensis*), a pupunha (*Bactris gasipaes*), a tamareira (*Phoenix dactylifera*), o açazeiro (*Euterpe oleraceae*), dentre outras. A macaúba, *Acrocomia aculeata*, apesar da potencial produtividade em óleo,

ainda é uma espécie rústica que necessita ser domesticada para a utilização em programas de melhoramento genético. Até o momento, a macaúba só se propaga por sementes, cuja germinação em condições naturais chega somente a 3% (Ellis et al., 1985). Foi patenteado um protocolo de superação de dormência de espécies do gênero *Acrocomia* (Motoike et al., 2007) que elevou a porcentagem de germinação em laboratório. Mas ainda não há registros na literatura sobre a germinação e mobilização de reservas de sementes de macaúba.

Esse trabalho discute a dinâmica bioquímica, anatômica e histoquímica da germinação e da mobilização de reservas de sementes de *Acrocomia aculeata* submetidas ao protocolo de superação de dormência de Motoike et al. (2007).

## **Material e Métodos**

### *Material, amostragem e germinação das sementes*

Sementes obtidas de frutos provenientes de maciços naturais de macaúba de Montes Claros (MG), safra 2008/2009, foram utilizadas nesse trabalho. Os frutos foram despulpados, secos à temperatura ambiente e tiveram o endocarpo quebrado com auxílio de um torno mecânico. As sementes foram processadas no Laboratório de Pesquisas da Acrotech Sementes e Reflorestamento.

O processamento e a análise do embrião ou haustório e endosperma foram realizados separadamente nos estádios propostos. Para análises de endosperma, utilizou-se o tecido adjacente ao embrião ou haustório por ser a região mais prontamente acessada durante a germinação. As amostras foram coletadas ao longo do tempo durante o processo germinativo de macaúba submetido ao protocolo de superação de dormência de Motoike et al. (2007). O protocolo consta de uma etapa de desinfestação em solução de hipoclorito de sódio seguida de seis dias de embebição em solução de peróxido de hidrogênio. Ao final da embebição, as sementes são escarificadas mecanicamente na região da micrópila e imersas em solução de ácido giberélico. Acompanhou-se a germinação de sementes de macaúba desde a desinfestação e embebição até o 29º dia e foram coletados nove estádios diferentes. Os estádios equivalem a etapas do protocolo e do desenvolvimento inicial da plântula (Tabela 1).

Até o estádio sete foram coletados todos os embriões intactos, inclusive aqueles com pecíolo cotiledonar em processo de alongamento. Nos estádios 8 e 9, o haustório foi utilizado nas análises.

**Tabela 1.** Descrição dos estádios germinativos de sementes de macaúba utilizados nas análises.

<b>Estádio</b>	<b>Dias do processo germinativo</b>	<b>Etapa do Protocolo</b>
I	0	Anterior a desinfestação
II	0,5	12 horas em solução de hipoclorito
III	2,5	2 dias em solução de peróxido de hidrogênio
IV	4,5	4 dias em solução de peróxido de hidrogênio
V	6,5	6 dias em solução de peróxido de hidrogênio
VI	9,5	3 dias após a escarificação
VII	12,5	6 dias após escarificação
VIII	21,5	15 dias após a escarificação
IX	29	21 dias após a escarificação

#### *Extração e determinação de lipídios*

Partes do endosperma adjacente e embriões ou haustórios foram coletados dos nove estádios propostos. O material foi seco em estufa a 45° C por 24 horas e posteriormente triturado em processador tipo *blender*. A partir de 1,0 grama do material moído, os lipídios foram extraídos a frio, utilizando hexano como solvente por método gravimétrico em aparelho de Soxhlet. Foram utilizadas três repetições por estádio. Os resultados foram expressos em porcentagem de óleo.

#### *Extração e determinação de amido*

Após a extração de lipídios, as mesmas amostras foram secas e utilizadas para determinação do teor de amido. Foram tomados 50 mg de material moído, sendo três repetições por estádio. Durante 20 minutos prosseguiu-se à digestão do amido com ácido perclórico 35%, em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 9000 g e temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado na quantificação do amido, segundo o método fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956). A leitura foi realizada em triplicatas em espectrofotômetro a 490 nm, utilizando glicose (Sigma®) como padrão. Os valores de absorbância encontrados foram ajustados ao fator de correção 0,93 (FAO, 2000) para ligações glicosídicas, e transformadas em miligramas de amido por grama de matéria seca.

#### *Extração e determinação de proteínas solúveis*

A extração de proteínas solúveis foi realizada com material congelado de partes de embrião ou haustório e endosperma adjacente separadamente. Foram macerados 0,1 grama de material por repetição utilizando 1,5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4° C e 10000 rpm. O sobrenadante foi coletado para os ensaios. Foram utilizadas três repetições e triplicatas para as leituras em espectrofotômetro.

A quantificação foi realizada segundo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores de absorbância foram expressos em miligramas de proteínas solúveis por grama de matéria fresca.

#### *Análise anatômica e histoquímica*

Partes de embrião ou haustório e endosperma adjacente foram coletadas nos estádios propostos e fixados em formalina neutra tamponada (FNT) por 48 horas para posterior processamento. Foram realizados os seguintes testes histoquímicos: para lipídios totais, Sudan Black B (Johansen, 1940); para proteínas solúveis, xilidine Ponceau (Vidal, 1977); para metacromasia, azul de toluidina (O'Brien et al., 1964); e para amido, lugol (Johansen, 1940).

Para o teste de Sudan Black B, o material foi seccionado em 20µm de espessura em criomicrotomo e as lâminas foram montadas em água glicerinada. Para os demais corante e reagentes, as amostras foram desidratadas em série butílica, emblocadas em parafina (Histosec<sup>®</sup>), seccionadas longitudinal e transversalmente em microtomo rotativo em 10µm de espessura, e desparafinizadas em série xilólica (XP) ou desidratadas em série etílica e emblocadas em historresina (Historesin, Leica<sup>®</sup>) (toluidina e lugol) e seccionado em microtomo rotativo com 6µm de espessura. As lâminas. As lâminas foram montadas em resina sintética (Permount<sup>®</sup>). As imagens foram obtidas usando microscópio de luz Olympus (AX-70), equipado com sistema fotográfico U-photo, e o *software* Spot-Basic.

## **Resultados**

### *Descrição morfológica dos estádios*

O estádio I (Figura 1A) corresponde ao tempo inicial do processo germinativo estudado. A semente intacta é recoberta pelo tegumento, de coloração marrom escura.

Em secção longitudinal, o endosperma apresentou coloração esbranquiçada, semelhante à parafina, e proeminente cavidade interna que é conectada fisicamente à cavidade que abriga o embrião. Nessa fase o embrião pôde ser facilmente destacado do endosperma que o circunda, estando conectado fisicamente apenas pelo endosperma micropilar. O endosperma micropilar é um tecido constituído por células de paredes espessas, situado entre a região proximal do embrião e o tegumento da região micropilar.

Com o aumento gradativo do teor de água observado nos estádios II, III, IV e V, foi observado que embrião e endosperma aumentaram de volume consideravelmente sem alterar a aparência externa da semente. Os estádios II a IV foram omitidos por não apresentarem modificações morfológicas consideráveis. A absorção maciça de água culminou, conforme mostrado em secção longitudinal da semente no estágio V (Figura 1B), em mudança de coloração do endosperma para branco gelo. Observou-se também que a cavidade interna da semente foi reduzida. No final do estágio V, houve a retirada manual do endosperma micropilar, seguindo o protocolo de Motoike et al. (2007).

No estágio VI (Figura 1C) foi constatado o alongamento do pecíolo cotiledonar em torno de 2 mm para fora da semente. Esse evento foi considerado como germinação no sentido estrito, conforme adotado por Ribeiro et al. (2011). Além da protrusão do pecíolo cotiledonar no embrião, não foram constatadas alterações morfológicas no endosperma nesse estágio.

O estágio VII (Figura 1D) apresentou pecíolo cotiledonar mais alongado, com cerca de 5 a 7 mm de comprimento. O endosperma não apresentou modificações morfológicas nesse estágio.

O estágio VIII (Figura 1E) foi marcado pelo surgimento da radícula. Nessa fase, o pecíolo cotiledonar apresentava de 1,0 a 1,2 centímetros de comprimento. Na extremidade oposta à radícula, o haustório se apresentou desenvolvido e maior que nos estádios anteriores, além de superfície com invaginações proeminentes. No entorno do haustório o endosperma apresentou sinais de degradação e coloração menos intensa que o endosperma residual.

O estágio IX (Figura 1F) foi caracterizado pela presença de plúmula proeminente, com pecíolo cotiledonar com cerca de 1,0 a 1,2 cm e a radícula 0,3 a 0,5 cm de comprimento. Nesse estágio o haustório apresentou aparência esponjosa e ocupava grande parte do interior da semente. O endosperma ao redor do haustório apresentou intensos sinais de degradação.

### *Mudanças no teor de lipídios e alterações histoquímicas*

Os lipídios perfizeram cerca de 47% das reservas do embrião no estágio I. Essa porcentagem foi mantida até o estágio V (seis dias em solução de peróxido de hidrogênio), que corresponde ao fim da embebição. A partir do estágio VI (três dias após a escarificação e fim da embebição), a porcentagem de lipídios começa a reduzir no embrião, chegando à média de 36,9% no haustório no estágio IX (21 dias após a escarificação e 29 dias do processo germinativo) (Figura 2).

No endosperma foi observada resposta contrária à encontrada no embrião e haustório. Lipídios perfizeram 51% das reservas do endosperma antes da submissão das sementes ao protocolo de superação de dormência de Motoike et al (2007). Até o estágio V a porcentagem inicial de lipídios no endosperma lateral e micropilar foi mantida em torno de 50%. A partir do estágio VI ao IX, a porcentagem de lipídios aumentou de 52% para 61% (Figura 2).

Nas secções referentes ao estágio I (Figuras 3A B) e primeiros estádios da embebição, o teste de Sudan Black B no endosperma e embrião não demonstrou diferenças visíveis quanto à coloração. Secções longitudinais de endosperma evidenciaram as reservas lipídicas coradas em azul intenso a negro em todos os estádios. No embrião, houve redução da reserva lipídica principalmente após a protrusão do pecíolo (Figura 3C, D, E e F). A redução gradativa de lipídios no haustório foi evidenciada dos estádios VI ao IX (Figuras 3C a F). No estágio VI (Figura 3C) os lipídios formaram gotas no interior das células. No estágio VII (Figura 3D), essas gotas tornaram-se mais espaçadas e menos evidentes. No estágio VIII (Figura 3E), os lipídios formavam gotas menores e no estágio XI (Figura 3F) as gotas eram escassas e pequenas.

### *Mudanças no teor de amido e alterações histoquímicas*

No embrião, o teor de amido no estágio I foi, em média, 34,3 mg.g<sup>-1</sup> MS. Essa média foi mantida dentro de um intervalo de dados até o estágio V. A partir do estágio VI, cujo teor médio foi de 38 mg.g<sup>-1</sup> MS, verificou-se o aumento exponencial no teor de amido que chegou a média de 116 mg.g<sup>-1</sup> MS no estágio IX (18 dias após a protrusão do pecíolo cotiledonar) (Figura 4).

Não houve detecção histoquímica de grãos de amido dos estádios I (Figura 5A) ao VI. O aumento no teor de amido concomitante ao aparecimento de grãos pôde ser claramente observado após a protrusão do pecíolo cotiledonar (Figura 5B a G) no

haustório. Em secções coradas com azul de toluidina e contra-coradas com lugol, pôde-se observar o aparecimento de grãos de amido próximos aos cordões procambiais (Figura 5B e C) da região do haustório no estágio VII. A quantidade de grãos de amido aumentou à medida que a germinação das sementes de macaúba se prolongava. Nos estádios VIII (Figura 5D e E) e IX (Figura 5F e G), grãos de amido foram observados em maior concentração próximos à epiderme do haustório e aos vasos condutores (Figura 5F). Entretanto, a partir do 20º dia após a protrusão do pecíolo cotiledonar, os grãos de amido estavam presentes também no interior do haustório, que apresentou pronunciadas invaginações da epiderme, grandes espaços intercelulares e células vacuolizadas.

O amido no endosperma adjacente ao embrião ou haustório não foi detectado com o teste histoquímico com lugol, dessa forma não foi apresentado por meio de fotografia.

Foi observado que as respostas obtidas para o teor de amido foram contrárias àquelas de lipídeo no embrião. No embrião ou haustório, o teor lipídico foi reduzido enquanto o de amido aumentou exponencialmente.

#### *Mudanças no teor de proteínas solúveis e alterações histoquímicas*

O teor de proteínas solúveis no embrião inicialmente foi 18 mg.g<sup>-1</sup> MF no tempo zero da germinação (estádio I). Esse teor decaiu exponencialmente e de forma constante, atingindo aos 18 dias o valor mínimo de 3 mg.g<sup>-1</sup> MF, o qual perdurou até o final do período de estudo do processo germinativo (Figura 6).

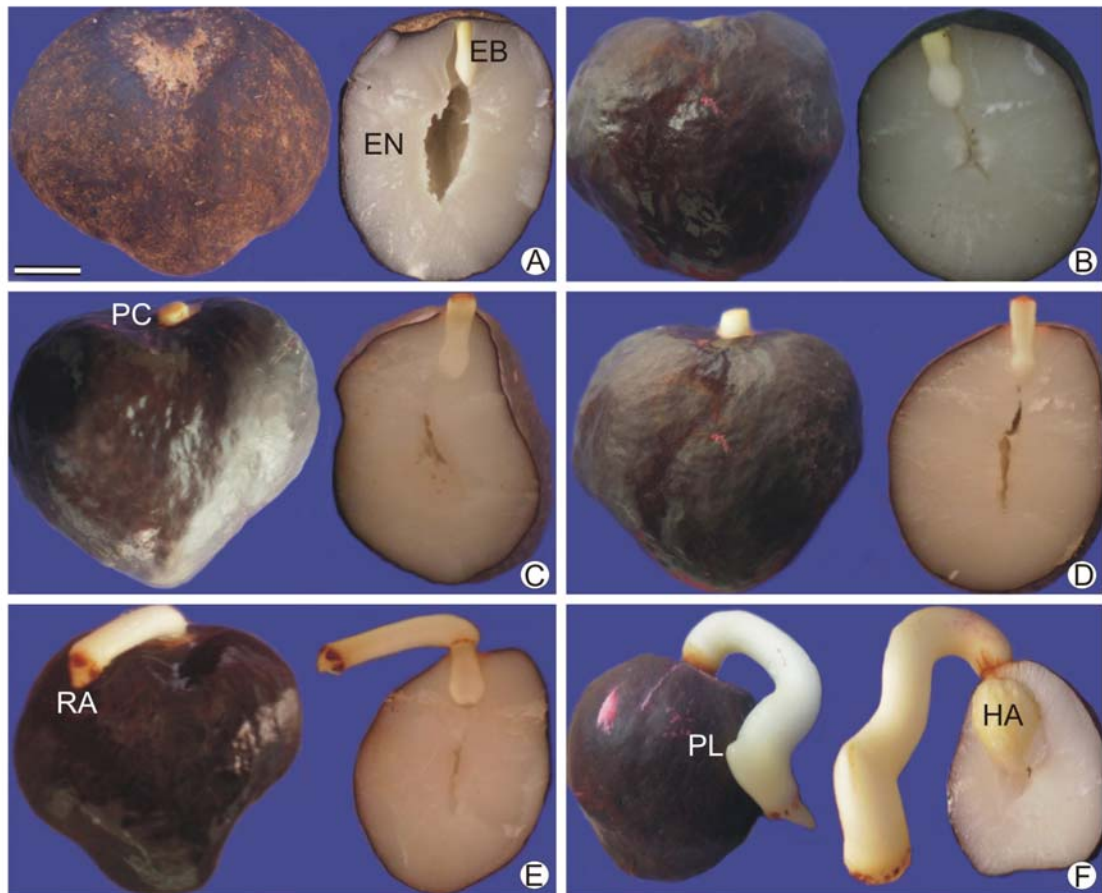
Com o teste de XP (Figura 7), foi possível detectar corpos protéicos globulares bem delimitados em todas as regiões do embrião e endosperma nos estádios I e II (Figura 7A, B e C). Nos estádios III, IV e V, houve redução da intensidade de coloração da reserva protéica além de os corpos protéicos terem adquirido aparência esponjosa (Figura 7D, E e F). No estágio VI, na região do pecíolo cotiledonar em início de alongamento e do eixo embrionário, os corpos protéicos já não eram detectados, mas na região do haustório o invólucro expandiu, formando cavidades internas e o material XP-positivo dentro desses corpúsculos estavam restritos a cerca de um terço do seu volume interno (Figura 7G e H).

Nos estádios VII, VIII e IX (Figura 7I, J, K e L), houve um desarranjo no padrão globular observado previamente dos corpos protéicos. Nesses estádios, o material protéico estava fragmentado pela degradação dos corpúsculos e parietalmente

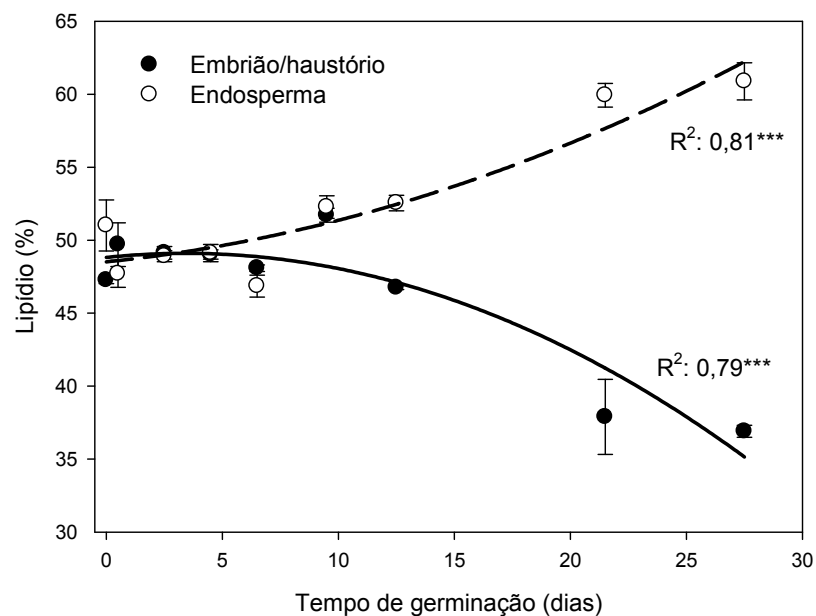
deslocado. Nessa etapa, havia somente vestígios parietais de material protéico que foi digerido.

No endosperma praticamente não houve alteração quanto ao teor de proteínas solúveis, que permaneceu em torno de 4 a 6 mg.g<sup>-1</sup> MF durante todo o processo germinativo estudado. O teste de XP detectou corpos protéicos bem delimitados no endosperma lateral durante todo o processo germinativo estudado.



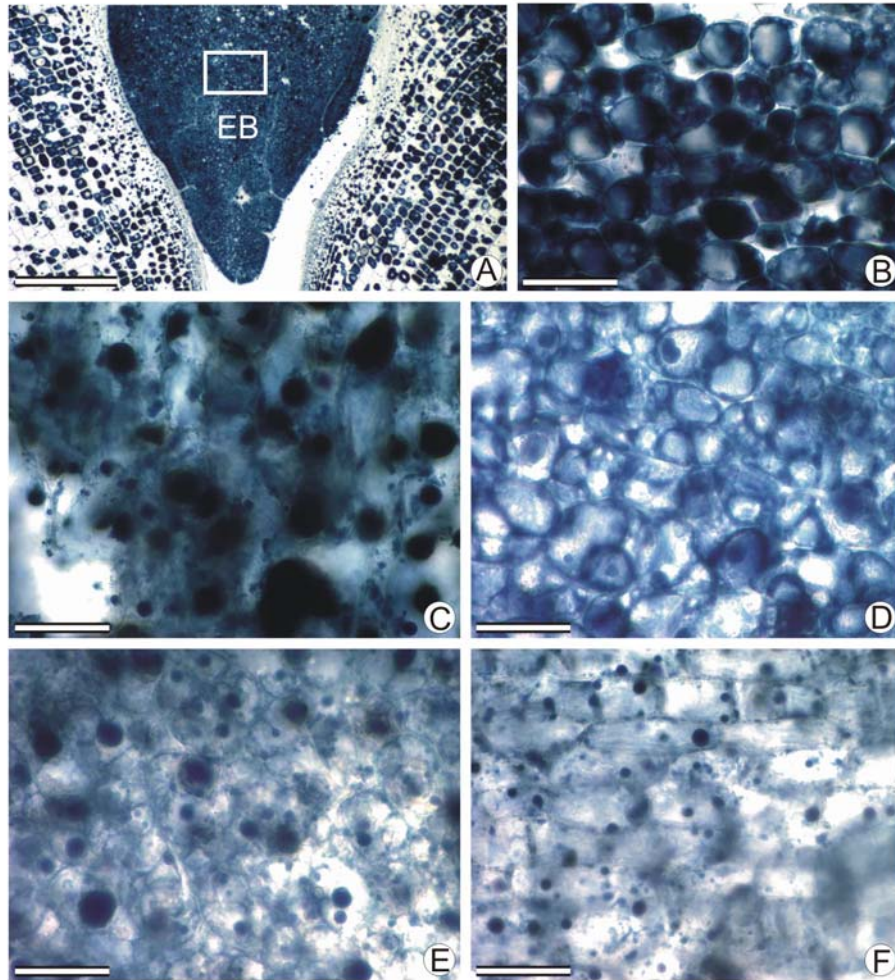


**Figura 1.** Estádios do processo germinativo de macaúba. A – estágio I. B – Estádio V. C – Estádio VI. D – Estádio VII. E – Estádio VIII. F – Estádio IX. Barra: 0,5 cm. EB: embrião; EN: endosperma; PC: pecíolo cotiledonar; RA: radícula; PL: plúmula proeminente; HA: haustório.

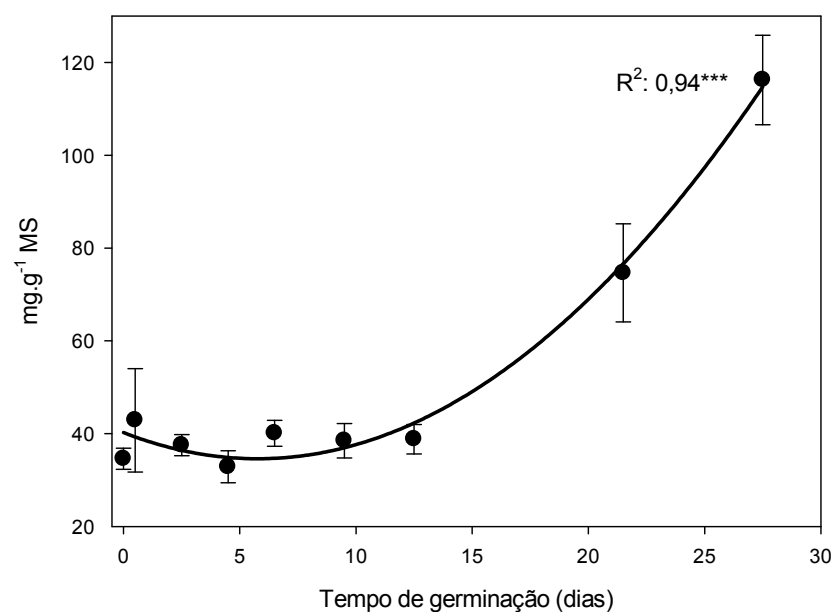


**Figura 2.** Teor de lipídios de embrião ou haustório e endosperma de sementes de *Acrocomia aculeata*. Os dados possuem distribuição normal pela estatística K-S e foram ajustados ao modelo de regressão linear quadrático pelo programa Sigma Plot<sup>®</sup> 10. As barras verticais são o desvio padrão entre as repetições.

\*\*\* significativo a 0,1% de probabilidade.



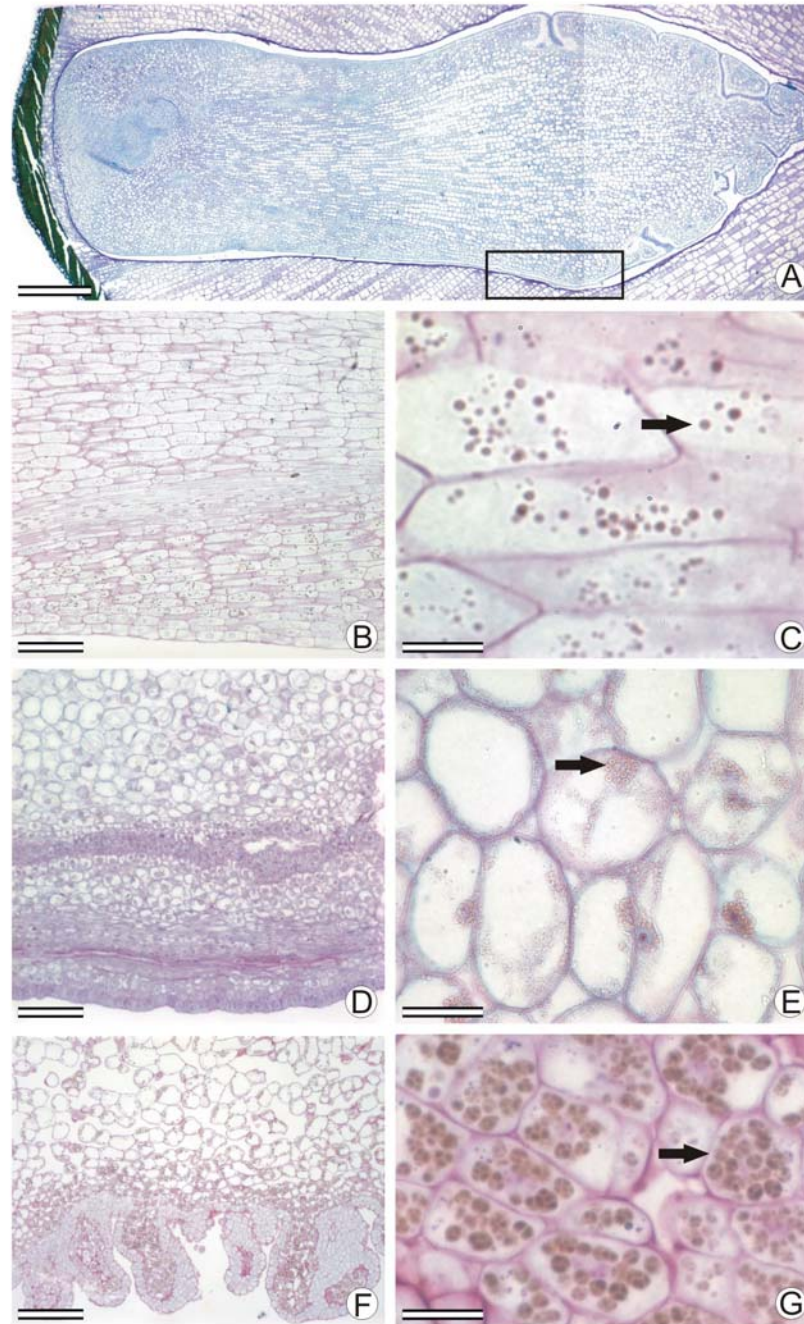
**Figura 3.** Mobilização de lipídios de sementes de *Acrocomia aculeata* durante o processo germinativo. A – Secção longitudinal de embrião e endosperma no estágio I corados com Sudan Black B. O retângulo indica a região amostrada nos demais tratamentos. B – Detalhe de embrião em estágio I. C – Detalhe de haustório em estágio I. D – Detalhe de haustório em estágio VII. E – Detalhe de haustório em estágio VIII. F – Detalhe de haustório em estágio IX. Barras: A = 400  $\mu\text{m}$ ; B a F = 40  $\mu\text{m}$ . EB: embrião.



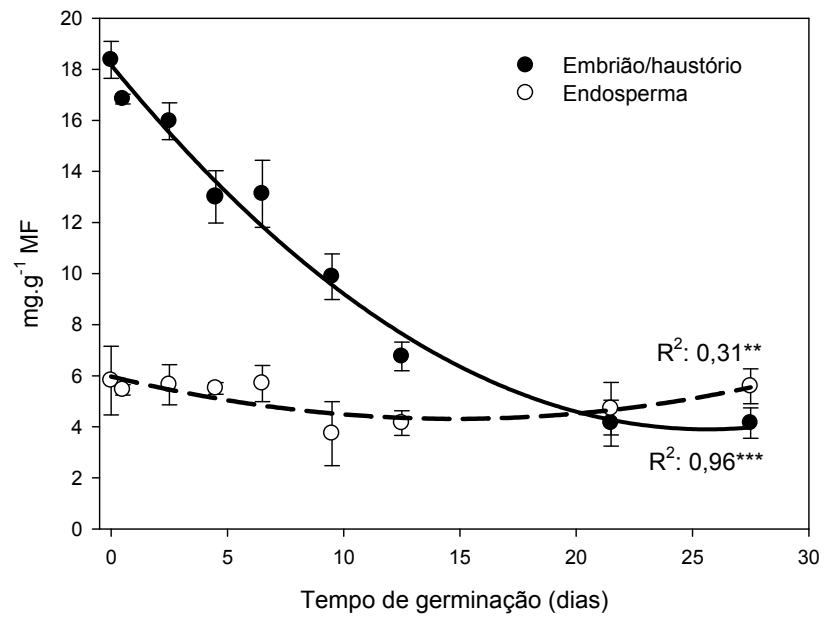
**Figura 4.** Teor de amido de embrião e haustório de sementes de *Acrocomia aculeata* durante o período germinativo. Os dados possuem distribuição normal pela estatística K-S e foram ajustados ao modelo de regressão linear quadrático para os dados de embrião/haustório e cúbico para os dados de endosperma pelo programa Sigma Plot<sup>®</sup> 10. As barras verticais são o desvio padrão das repetições.

\*\*\* significativo a 0,1% de probabilidade.

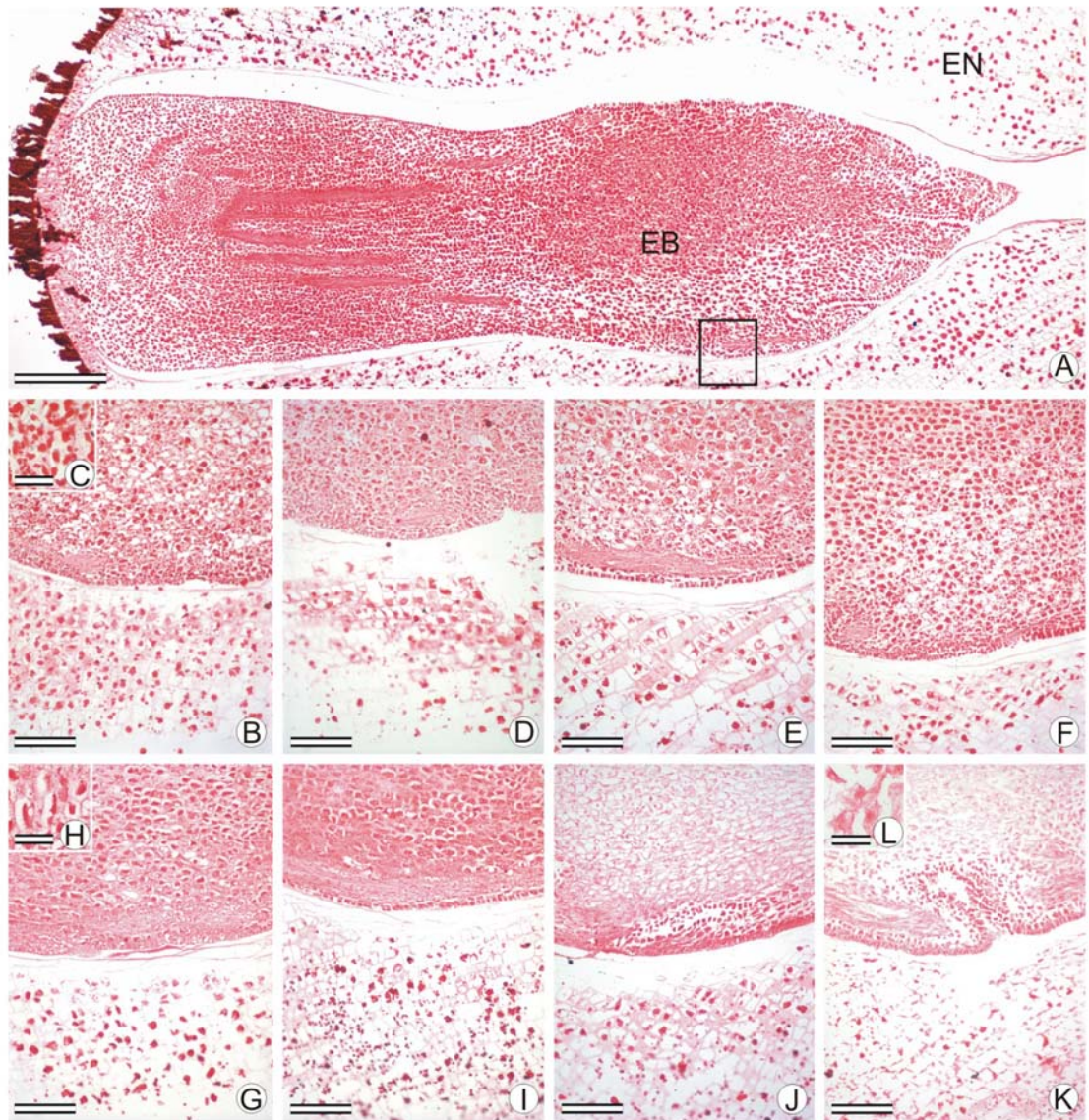
\*\*significativo a 1% de probabilidade.



**Figura 5.** Formação de amido no haustório de sementes de *Acrocomia aculeata* durante o processo germinativo. A – Secção longitudinal de embrião e endosperma no estágio I corados com azul de toluidina e lugol. O retângulo indica a região amostrada em B, D e F. B – Haustório em estágio VII. C – Detalhe de haustório em estágio VII. D – Haustório em estágio VIII. E – Detalhe de haustório em estágio VIII. F – Haustório em estágio IX. G – Detalhe de haustório em estágio IX. Barras: A = 500  $\mu\text{m}$ ; B = D = F = 150  $\mu\text{m}$ ; C = E = G = 20  $\mu\text{m}$ . Setas: grãos de amido.



**Figura 6.** Teor de proteínas solúveis de embrião ou haustório e endosperma de sementes de *Acrocomia aculeata* durante o processo germinativo. Os dados possuem distribuição normal pela estatística K-S e foram ajustados ao modelo de regressão linear quadrático para os dados de embrião/haustório e cúbico para os dados de endosperma pelo programa Sigma Plot<sup>®</sup> 10. As barras verticais são o desvio padrão das repetições.  
 \*\*\* significativo a 0,1% de probabilidade.  
 \*\*significativo a 1% de probabilidade.



**Figura 7.** Reservas de proteínas marcadas com XP (vermelho) em sementes de *Acrocomia aculeata* durante o processo germinativo. A – Secção longitudinal de embrião e endosperma no estágio I. O retângulo indica a região amostrada nos estádios indicados em B, D, E, F, G, I, J e K. B – Estádio II. C – Detalhe de embrião em estágio II. D – Estádio III. E – Estádio IV. F – Estádio V. G – Estádio VI. H – Detalhe de haustório em estágio VI. I - Estádio VII. J – Estádio VIII. K – Estádio IX. L – Detalhe de haustório em estágio IX. Barras: A = 500  $\mu\text{m}$ ; B = D = E = F = G = I = J = K = 200  $\mu\text{m}$ ; C = H = L = 30  $\mu\text{m}$ . EN: endosperma; EB: embrião.

## Discussão

A germinação de sementes de macaúba foi semelhante à de *Elaeis guineensis* e outras espécies da família Arecaceae. Durante o crescimento inicial da plântula de macaúba, o haustório expandiu enquanto a região de endosperma adjacente foi degradada e as reservas absorvidas (Oo e Stumpf, 1983a; Alang et al., 1988).

Lipídios perfazem a maior parte das reservas do endosperma de *Acrocomia aculeata*, seguido por carboidratos de parede celular (galactomananos, conforme capítulo anterior), proteínas e, em última instância, amido. O embrião é, principalmente, dotado de reservas lipídicas e protéicas que provêm as necessidades iniciais da plântula durante parte do processo germinativo. Em *Euterpe edulis*, lipídios e proteínas também representam grande parte das reservas de embrião e endosperma (Panza et al., 2009).

Nesse trabalho, as proteínas solúveis do embrião foram as reservas que apresentaram redução no teor já a partir do início da embebição. Em *Prosopis juliflora* a reserva protéica foi exaurida pelas células do embrião durante a protrusão radicular (Gallão et al., 2007). O papel das proteínas solúveis é o de prover aminoácidos e esqueletos carbônicos para a síntese de novas proteínas ou enzimas que atuarão na mobilização de outros tipos de reservas (Bewley e Black, 1994). As proteínas são hidrolisadas por proteinases e peptidases formadas durante a maturação das sementes ou que foram sintetizadas *de novo* durante a germinação (Sreenivasulu et al., 2008). Tonini et al. (2010a) sugerem que a mobilização de proteínas e carboidratos de reserva podem estar conectadas por meio da ativação proteolítica da enzima  $\alpha$ -galactosidase presente em corpos protéicos.

Nesse trabalho, os corpos protéicos do embrião, principalmente na região do eixo embrionário e do pecíolo cotiledonar, perderam a intensidade da coloração à medida que se avançava a embebição e a mobilização de reservas após a germinação. Da mesma forma, no embrião de *Mucuna pruriens*, os corpos protéicos tornaram-se degradados com o decorrer do período pós-germinativo e foram degradados anteriormente aos corpos protéicos dos cotilédones (Muccifora et al., 2010). Esses dados corroboram com a hipótese de Murray et al. (1979) de que a degradação de proteínas no eixo embrionário precede a mobilização de proteínas no cotilédone. Os corpos protéicos marcados com XP nos cotilédones de *Prosopis juliflora* tornaram-se mais solúveis e menos globulares durante a germinação (Gallão et al., 2007). Nos cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides*, o teor protéico decaiu desde o início da embebição, concomitante à redução da coloração indicativa do teste de XP (Corte et al.,



2008). Entretanto, no final do processo germinativo de *A. aculeata*, foi observado que as proteínas ainda eram claramente visíveis na epiderme do haustório (13 e 18 dias após a protrusão do pecíolo cotiledonar). Já no endosperma de sementes de macaúba não houve alteração significativa nem no teor protéico nem dos corpos protéicos marcados com teste de XP durante o processo germinativo estudado. Esses dados indicam que os corpos protéicos do endosperma provavelmente são acessados tardiamente durante o desenvolvimento da plântula, como ocorreu em *Sesbania virgata* no período pós-germinativo (Tonini et al., 2006).

Quanto ao teor de lipídios, a redução no embrião, equivalente ao aumento no endosperma (em torno de 10%) durante o período germinativo estudado, levam à sugestão de duas hipóteses. A primeira delas relaciona redução e aumento como resultado de causa e consequência, ou seja, a causa do aumento da proporção de lipídios no endosperma pode ser em decorrência da redução desses no haustório. Em *E. guineensis*, atividade de lipases foi detectada somente no embrião e que devido a sua localização, a enzima provavelmente não contribuiu para a hidrólise de lipídios do endosperma (Oo e Stumpf (1983a). Entretanto, os autores sugerem que haja um tipo de transporte de triacilgliceróis entre embrião/haustório e endosperma já evidenciado em sementes de dendezeiro (Oo e Stumpf, 1983b). Acúmulos de ácidos graxos livres no embrião de *Avena sativa* sugerem que haja transporte desses do escutelo para o embrião durante a germinação (Leonova et al., 2010). Portanto, é provável que a mobilização de lipídios em algumas espécies de Arecaceae (oleaginosas) seja um evento que envolva dois estádios e estruturas diferentes, haustório e endosperma (Alang et al., 1988).

A segunda hipótese sugere independência entre a redução de lipídios no embrião/haustório e aumento dessa reserva no endosperma. Lipídios no embrião/haustório podem ter sido convertidos em carboidratos por meio da gliconeogênese, o que pode ter contribuído para a formação de grãos de amido no haustório. Durante a germinação de *E. guineensis*, a atividade da enzima isocitrato liase (ciclo do glioxilato) está confinada ao haustório e só foi detectada no embrião no final da embebição (Alang et al., 1988). Os autores sugerem por esses dados que a gliconeogênese de dendezeiro ocorre em todo o cotilédone do embrião. Segundo Graham (2008), os eventos que envolvem a degradação de lipídios em sementes, ciclo do glioxilato e gliconeogênese, são induzidos um dia após a embebição em embrião de *Arabidopsis*. É provável também que parte dos lipídios do embrião seja convertida diretamente em acetil-CoA pela  $\beta$ -oxidação. A regulação da mobilização de lipídios de

reserva é realizada pela razão carbono: nitrogênio e também pelo status de carboidratos na semente (Graham, 2008). O aumento da porcentagem de lipídios no endosperma também foi detectado por Alang et al. (1988) em trabalho com *E. guineensis* e por Bernardes (2010) em trabalho com *Euterpe precatoria* e *Euterpe oleraceae*, evidenciando um padrão de mobilização lipídica para palmáceas. No presente trabalho, é provável que tenha havido aumento da proporção relativa de lipídios no endosperma em degradação em relação às reservas mobilizadas primariamente. Essas reservas são, provavelmente, mananos e/ou galactomananos (conforme capítulo 1), uma vez que é necessário hidrolisar a parede celular para acessar reservas internas. Existe ainda a possibilidade de a região amostrada ao redor do embrião ser diferenciada durante os estádios. À medida que o processo germinativo se processou, o haustório cresceu no interior da semente, ocupando cada vez um espaço maior. O endosperma adjacente ao embrião dos primeiros estádios provavelmente não era equivalente ao dos estádios finais.

No endosperma de sementes de macaúba, não foi detectado amido, o que faz dessas sementes não amiláceas (Moura et al., 2010). No embrião, foi detectado amido a partir da protrusão do pecíolo cotiledonar. O amido no haustório aumentou exponencialmente como consequência da mobilização de reservas vindas provavelmente do endosperma ou das próprias reservas do embrião. O aumento do teor de amido pode estar relacionado à redução no conteúdo de galactomananos (Gallão et al., 2007), visto no capítulo I. Nesse trabalho, o aumento exponencial de amido coincidiu com a maior degradação de galactomananos (capítulo I). O amido no haustório é uma reserva transitória que pode ser acessada mais facilmente durante o crescimento da plântula e sob condições desfavoráveis (Balasubramaniam et al., 1973).

O início da formação de amido em células adjacentes aos cordões procambiais do haustório foi observado a partir da protrusão do pecíolo cotiledonar. Nos estádios subsequentes, o amido pôde ser observado em grande quantidade próximo à epiderme e à zona de dissolução do haustório, mas sempre próximo aos tecidos de condução. Os açúcares são convertidos a amido transitente que é depositado nas células adjacentes ao tecido vascular (Matsukura et al., 2000). Esses resultados contrastam com os observados no haustório de *Cocos nucifera*, em que maior quantidade de grãos de amido foi observada na epiderme e nas células adjacentes (Sugimura e Murakami, 1990). O acúmulo de grãos de amido próximos aos tecidos vasculares do haustório pode

ser devido à presença de transportadores de sacarose (açúcar não redutor, principal produto de transporte pelo floema) nas células companheiras (Matsukura et al., 2000).

Em suma, as proteínas no embrião são constantemente degradadas durante a embebição, germinação e mobilização de reservas. Os lipídios no haustório também são reduzidos durante o período estudado. O embrião, dessa forma, tem reservas suficientes para prover os primeiros eventos germinativos da semente. Entretanto, a degradação de reservas de carboidratos, i.e. mananos, (capítulo I) somente foi evidenciada no endosperma, que manteve o teor de proteínas e aumentou o de lipídios. Em conseqüência, a formação de grão de amido no haustório evidencia a mobilização de reservas durante o período estudado. As reservas mais energeticamente custosas como lipídios e proteínas (do endosperma) seriam responsáveis pela manutenção da plântula de macaúba por longo tempo, inclusive após o início dos primeiros eventos fotossintéticos. Há registro que o endosperma de *A. aculeata* possa manter a o crescimento da plântula por cerca de três meses.

## Referências

**Alang, Z. C., Moir, G. F. J., Jones, L. H.** (1988) Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Annals of Botany* 61,261-268.

**Balasubramaniam, K., Atukorala, T. M. S., Wijesundera, S., Hoover, A. A.** (1973) Biochemical changes during germination of the coconut (*Cocos nucifera*). *Annals of Botany* 37, 439-445.

**Bernardes, R. S.** (2010) Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart. e *Euterpe precatoria* Mart.) submetidas ao aumento da temperatura. *Tese de Mestrado*, INPA.

**Bewley, J. D.** (1997) Breaking down the walls – a role for endo- $\beta$ -mannanase in release from seed dormancy? *Trends in Plant Science* 2(12), 464-469.

**Bewley, J. D., Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum. 2 ed.

**Buckeridge, M. S.** (2010) Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* 154, 1017-1023.

**Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254. 1976.

**Buckeridge, M. S., Santos, H. P., Tiné, M. A. S.** (2000) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38,141-156.

**Corte, V. B., Borges, E. E. L., Ventrella, M. C., Leite, I. T. A., Braga, A. J. T.** (2008) Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. *Árvore* 32(4):641-650.

**DeMason, D. A., Sexton, R., Reid, J. S. G.** (1983) Structure, composition and physiological state of the endosperm of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany* 52, 71-80.

**Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F.** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annalitical Chemistry* 28, 350-356.

**Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H.** (1985) Handbook of seed technology for genebanks: compendium of specific germination information and test recommendations, v. 2. *International Board For Plant Genetic Resources, Roma*. <http://ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublications/52/begin.htm>.

**FAO** production year book (2000) FAOSTAT database. Disponível em: <http://apps.fao.org>.

**Gallão, M. I., Vieira, I. G. P., Mendes, F. N. P., Souza, A. S. N., Brito, E. S.** (2007) Reserve mobilization in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 2012-2018.

**Graham, I. A.** (2008) Seed storage oil mobilization. *Annual Reviews of Plant Biology* 59, 115-142.

**Harwood, J. L.** (1997) *Plant Lipid Metabolism*. In: Dey, P. M., Harborne, J. B., eds. *Plant Biochemistry*. Academic Press. 554p.

**Johansen, D. A.** (1940) *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 423p.

**Leonova, S., Grimberg, A., Marttila, S., Stymne, S., Carlsson, A. S.** (2010) Mobilization of lipid reserves during germination of oat (*Avena sativa* L.), a cereal rich in endosperm oil. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 3089-3099.

**Lott, J. N. A.** (1981) Protein bodies in seeds. *Nord. Journal of Botany* 1, 421-432.

**Matsukura, C., Saitoh, T., Hirose, T., Ohsugi, R.** (2000) Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (*OsSUT1*) induced by sugar and light. *Plant Physiology* 124, 85-93.

**Mayer, A. M., Shain, Y.** (1974) Control of seed germination. *Annual Reviews of Plant Physiology* 25, 167-193.

- Motoike, S. Y., Lopes, F. A., Oliveira, M. A. R., Carvalho, M., Sá Júnior, A. Q.** (2007) Processo de germinação e produção de sementes pré-germinadas de palmeiras do gênero *Acrocomia*. Registro de patente: PI0703180-7.
- Muccifora, S., Guerranti, R., Muzzi, C., Hope-Onyekwere, N. S., Pagani, R., Leoncini, R., Bellani, L. M.** (2010) Ultrastructura and biochemical investigations of proteins mobilization of *Mucuna pruriens* (L.) DC. Cotyledons and embryo axis. *Protoplasma* 239, 15-21.
- Murray, D. R., Peoples, M. R., Waters, S. P.** (1979) Proteolysis in the axis of the germinating pea seed. *Planta* 147(2) 111-116.
- O'Brien, T. P., Feder, N., McCully, M. E.** (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Oo, K. C., Stumpf, P. K.** (1983a) Some enzymatic activities in the germinating oil palm (*Elaeis guineensis*) seedlings. *Plant Physiology* 73, 1028-1032.
- Oo, K. C., Stumpf, P. K.** (1983b) The Metabolism of the Germinating Oil Palm (*Elaeis guineensis*) Seedling'. *Plant Physiology* 73, 1033-1037.
- Panza, V., Láinez, V., Maldonado, S.** (2004) Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145,445-453.
- Panza, V., Pighin, D., Láinez, V., Pollero, R. J., Maldonado, S.** (2009) Storage lipids and proteins of *Euterpe edulis* seeds. *Biocell* 33(2), 99-106.
- Penfield, S., Rylott, E. L., Gilday, A. D., Graham, S., Larson, T. R., Graham, I. A.** (2004) Reserve mobilization in the *Arabidopsis* endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires Phosphoenolpyruvate Carboxykinase1. *The Plant Cell* 16, 2705-2718.
- Pritchard, S. L., Charlton, W. L., Baker, A., Graham, I. A.** (2002) Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 31(5), 639-647.
- Sreenivasulu, N., Usadel, B., Winter, A., Radchuk, V., Scholz, U., Stein, N., Weschke, W., Strickert, M., Close, T. J., Stitt, M., Graner, A., Wobus, U.** (2008) Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology* 146, 1738-1758.
- Sugimuma, Y., Murakami, T.** (1990) Structure and function of the haustorium in germinating coconut palm seed. *JARQ* 24, 1-14.
- Tomlinson, P.B.** (1990) *The structural biology of palms*. Clarendon Press, Oxford. 477 p.
- Tonini, P. P., Lisboa, C. G. S., Freschi, L., Mercier, H., Mazzoni-Viveiros, S. C., Buckeridge, M. S.** (2006) Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and

endo- $\beta$ -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees* 20, 669-678.

**Tonini, P. P., Carrara, T. B., Buckeridge, M. S.** (2010a) Storage proteins and cell wall mobilization in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees* 24, 675-684.

**Tonini, P. P., Purgatto, E., Buckeridge, M. S.** (2010b) Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). *Annals of Botany* 106, 607-616.

**Vidal, B. C.** (1977) Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* 22, 45-64.

## CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo revelou que as enzimas  $\beta$ -mananse,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase atuaram na degradação de mananos e/ou galactomananos do endosperma lateral à medida que o haustório se desenvolveu no interior da semente, desempenhando um papel relevante na mobilização destes compostos durante o período germinativo. As enzimas estudadas, portanto, não desempenharam papel na superação da dormência de sementes de *Acrocomia aculeata* nesse trabalho.

Quanto às reservas, lipídios foram majoritários tanto de embrião quanto de endosperma de sementes de macaúba. Essa reserva é requisitada no embrião durante o desenvolvimento inicial da plântula, mas não no endosperma. As proteínas do embrião foram mobilizadas durante a germinação e crescimento da plântula. O amido é formado no haustório como produto final do catabolismo das reservas requisitadas a partir do embrião e endosperma.

Os próximos passos necessários para complementar os conhecimentos gerados por esse trabalho, sugerem o uso de marcadores metabólicos para melhor elucidar o processo germinativo de macaúba. Atividade de lipases e outras enzimas do catabolismo de lipídios, como a isocitrato liase, podem levar ao melhor entendimento da mobilização desse tipo de reserva.