
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**CARACTERIZAÇÃO DA MOBILIZAÇÃO DAS RESERVAS DAS
SEMENTES DO MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* Sims f.
flavicarpa O. Deg) DURANTE A GERMINAÇÃO**

HENRIQUE HESPANHOL TOZZI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Fevereiro - 2010

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**CARACTERIZAÇÃO DA MOBILIZAÇÃO DAS RESERVAS DAS
SEMENTES DO MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* Sims f.
flavicarpa O. Deg) DURANTE A GERMINAÇÃO**

MESTRANDO: HENRIQUE HESPANHOL TOZZI

ORIENTADOR: MASSANORI TAKAKI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Fevereiro - 2010

582.0467 Tozzi, Henrique Hespagnol
T757c Caracterização da mobilização das reservas das sementes
do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O.
Deg) durante a germinação / Henrique Hespagnol Tozzi. - Rio
Claro : [s.n.], 2010
55 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Massanori Takaki

1. Sementes. 2. Carboidratos. 3. Lipídios. 4. Proteínas. 5.
Histoquímica. 6. Bioquímica. I. Título.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
DEDICATÓRIA	vii
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
Informações da Espécie.....	3
Germinação de Sementes.....	5
Compostos de Reserva e sua mobilização.....	7
<i>Mobilização de carboidratos</i>	8
<i>Mobilização de Lipídios</i>	10
<i>Mobilização de Proteínas</i>	12
OBJETIVO	13
MATERIAIS E MÉTODOS	14
Obtenção das sementes.....	14
<i>Beneficiamento</i>	14
Condições de germinação.....	14
Quantificação das reservas.....	15
<i>Lipídios</i>	15
<i>Carboidratos</i>	15
<i>Proteínas</i>	15
Histologia/Histoquímica.....	16
<i>Azul de Toluidina</i>	16
<i>Ácido Periódico de Schiff</i>	16
<i>Azul de Bromofenol</i>	17
<i>Azul do Nilo</i>	17
Eletroforese de Proteínas.....	17
Cromatografia em camada delgada de Lipídios.....	18
RESULTADOS	19
Germinação das sementes.....	19
Extração das Reservas.....	19
<i>Carboidratos</i>	19
<i>Lipídios</i>	21
<i>Proteínas</i>	21
Análise eletroforética de proteínas e cromatográfica de lipídios.....	22
<i>Proteínas</i>	22
<i>Lipídios</i>	23
Histoquímica.....	25
<i>Endosperma</i>	25
<i>Cotilédone</i>	25
DISCUSSÃO	43
BIBLIOGRAFIA	49

AGRADECIMENTOS

Normalmente, uma dissertação é algo difícil de se concluir. Porém, mais difícil ainda é esta sessão, onde devemos fazer justiça a todas as pessoas que de alguma maneira nos ajudaram nessa empreitada tão desgastante e ao mesmo tempo incomensuravelmente recompensadora. Vamos então tentar... Meus sinceros agradecimentos...

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer meu orientador Massanori Takaki, por ter me aceitado tão prontamente como orientado (e, espero eu, ciente dos riscos disso... e que não tenha tido nenhuma surpresa, exceto as agradáveis...), por todo o companheirismo, por todo o auxílio, sugestões e pelo conhecimento compartilhado. Que venham mais horas felizes!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UNESP/RIO CLARO, por ter permitido a realização desse trabalho.

À CAPES e CNPq, por todo o apoio financeiro que sustentou esse projeto (e o seu realizador também...).

Às professoras Vera Lúcia Scatena (departamento de Botânica, UNESP-RC) e Maria Izabel Camargo Mathias (departamento de Biologia, UNESP-RC), por terem gentilmente cedido seus laboratórios para a realização da análise histológica.

À professora Márcia Regina Brochetto Braga (departamento de Biologia, UNESP-RC), por ter gentilmente cedido o laboratório de biologia molecular para a realização da eletroforese de proteínas.

Aos professores José Carlos Marconato e Jonas Contiero (departamento de Bioquímica e Microbiologia, UNESP-RC), pela possibilidade de utilizar os seus respectivos laboratórios para a execução de etapas cruciais para o projeto.

Aos amigos do Jardim Experimental da UNESP-RC, pela experiência trocada e pelo excelente convívio no dia a dia.

A todos os amigos dos departamentos de Botânica, Biologia, Zoologia e Ecologia.

Aos grandes amigos e à minha mana da PCS, Nelore, Rodrigo, Remedio (Juliano – mudou de faculdade) e Dé, por tudo o que vocês representam e representarão na minha vida e por todas as outras coisas que continuarei lembrando durante muito tempo, mas que agora não dá pra colocar no papel.

Às grandes amigas que estão ao lado dos grandes amigos, Bia e Júlia, por finalmente terem colocado um pouco de juízo na cabeça do Nelore e do Remedio.

À recém formada República Nemelés e a todos os seus integrantes, por terem tido a audácia de pensar que podíamos morar juntos, e de fato conseguimos: Chaves (pelas partidas de Smash, pelas risadas e maneirismos do vocábulo), Pássaro (também pelas partidas de Smash, novos vocabulários além do Nemelesiano Arcaico e espécies que existem só na imaginação deste, por ter aceitado ir morar na Nemelés... a propósito, já zerou Sonic hoje?), Shao (por sempre me dar moedinhas como contribuição para o meu cofre e por fazer doces excelentes – tá na hora de outro, não? – além de excelente churrasqueiro), Gandhi (grandes papos enquanto estamos comendo, e ele sentado na escada, além da jogatina esporádica de jogos das antigas), Paulo (pelas longas conversas, por sempre me ajudar a me tornar um melhor profissional, jogatinas de Smash, vocabulários novos, e por não ter me matado ainda por não conseguir dormir), 69 (por ser uma grande amiga, e por sempre ensinar como dominar animais de estimação indefesos), Raíssa (pela grande amizade e por tudo o que já discutimos e debatemos, pelas jogatinas esporádicas também, especialmente as de Mario Kart), Laura (parágrafo próprio adiante, mas ela também faz parte da república), Tochinha (por ter trazido tanta alegria à Rep... acho que estávamos precisando disso) e Tenébrio (*In Memoriam*, por tudo o que ele representou para mim no começo dessa Rep... que esteja em paz no paraíso dos gatos). A todos vocês que formam a Rep. Nemelés, meus sinceros agradecimentos pelos (até agora) 10 meses que estamos juntos, e por tornarem a minha estada em Rio Claro extremamente agradável, prazerosa, e pra deixar bem claro, muito engraçada.

À Laura, minha valiosa companheira, sempre ao meu lado para me ajudar, me dar bronca (especialmente) me ajudar a corrigir as falhas, tanto as minhas quanto as da dissertação, e principalmente por sempre estar ao meu lado, independentemente se estou feliz, triste, com raiva, calmo... por me aceitar do jeito que eu sou, por ser essa pessoa incrível e principalmente por ter me dado todo o apoio que precisei na transição para o mestrado e por estar ao meu lado no momento do descanso merecido. Sem ela, esse trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos meus amigos de Americana, que apesar da distância, sempre que podemos, nos juntamos para noites regadas a comida e jogatina!

À todos os meus familiares (tios, tias, primos, avós, avôs, alguns *In memoriam*) pela presença e por sempre estarem presentes para um conselho ou apoio.

À minha mãe (*In Memoriam*), por tudo o que me ensinou e por ter cuidado de mim até esse período tão importante e decisivo na minha vida.

À minha (nova) família, por todo o apoio e companheirismo. Meu Pai, por sempre cuidar de mim e facilitar minha vivência providenciando muitas coisas sem as quais tudo seria mais difícil e também à Ivani, Cris, Gi, Denis e Del, por terem trazido todo o barulho e movimento que uma casa precisa, por todo o companheirismo, conversas, terapias, alongamentos, jogatinas (parece que só jogo video game...) tanto de games quanto de cartas e jantares excelentes.

E finalmente, à você, que está lendo o resultado de um trabalho de dois anos...

Meus mais sinceros agradecimentos.

“Se há confiança, todas as provas são desnecessárias.

Se não há confiança, todas as provas são inúteis.”

- Provérbio Popular Chinês

Este trabalho é dedicado à todos os que me apoiaram
e me ajudaram ao longo dessa caminhada.

RESUMO

O maracujá-amarelo é uma fruta de grande valor econômico e cultural no Brasil, país com a maior produção e consumo do fruto atualmente. Apesar da grande importância do fruto, a mobilização da reserva de suas sementes durante a germinação não é conhecida. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar as alterações histológicas e bioquímicas ocorridas na semente durante os primeiros dez dias de germinação. Extrações de carboidratos, lipídios e proteínas foram realizadas juntamente com a análise histoquímica das sementes nos períodos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias de germinação tanto sob luz branca quanto no escuro. Os resultados mostraram que a principal reserva das sementes é lipídica, pois o seu consumo é alto durante a germinação, porém também há variações nos níveis de proteínas e carboidratos que podem estar envolvidas no processo de germinação.

Palavras-Chave: *Passiflora edulis*, germinação, mobilização de reservas, carboidratos, lipídios, proteínas

ABSTRACT

The Yellow Passion fruit is of great economic and cultural value in Brazil, the country with the largest production and consumption nowadays. Despite its great importance, the mobilization of the seed reserves is unknown. Therefore, our objective was to evaluate the histological and biochemical changes that occur in the seed during the first ten days of germination. Carbohydrates, lipid and protein extractions were done along with seed histochemical analysis at 0, 2, 4, 6, 8 and 10 days of germination under continuous white light and darkness. The results showed that lipids are the main reserve, for its consumption is high during germination, but there are also variations in protein and carbohydrates levels that may be involved in the germination process.

Key Words: *Passiflora edulis*, germination, reserve mobilization, carbohydrates, lipids, proteins.

INTRODUÇÃO

Informações sobre a espécie

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) é uma planta pertencente à ordem Malpighiales, família Passifloraceae e encontrada praticamente em todo o Brasil (presente nos estados Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) como também em muitos outros países da América Latina, como Argentina, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela e Paraguai. É a mais cultivada das espécies de maracujá pelo seu alto valor econômico. Seu fruto é globoso ou ovóide, medindo de 5-7 x 4-6 cm, possuindo coloração amarelada, amarelo-esverdeada ou púrpura escuro, e suas sementes são ovais, com dimensões de 5-6 x 3-4 mm, muito duras, cor creme (CERVI, 1997) e mostram um embrião espatulado com dois cotilédones e uma pequena região hipocotiledonária envolvidos por um endosperma ruminado, sendo toda a estrutura protegida por um tegumento rígido (DATHAN & SING, 1973). O Brasil provavelmente é o centro de origem, juntamente com Paraguai e Argentina, da espécie *Passiflora edulis* (maracujá-roxo), sendo o maracujá-amarelo um possível híbrido entre *P. edulis* e *P. ligularis* (MORTON, 1987).

Seu grande valor econômico, e por conseqüência, importância, reside nas qualidades gustativas de seu fruto e pelas qualidades farmacodinâmicas de seu suco, casca e sementes. A grande importância econômica do fruto de maracujá reside no produto industrializado, de onde se extrai o suco concentrado e também os subprodutos da industrialização do suco, tais como cascas, polpas e sementes, utilizados na alimentação animal (MANICA, 1981). Na medicina tradicional, a planta é utilizada como estimulante digestivo e tratamento para câncer gástrico (MORTON, 1987), e suas

folhas utilizadas como desobstruentes e possuindo propriedades diuréticas após cozimentos e fermentações. A raiz, folha e sementes são anti-helmínticas, sendo a folha também útil contra irritações do aparelho bronco-pulmonar, insônia e como calmante (CERVI, 1997). O suco possui sabor típico, muito apreciado, rico em vitamina A, cálcio e fósforo (FERREIRA, 2000).

A cultura do maracujá ocupa um grande espaço no Brasil, com a produção anual de 2006 chegando a 615 mil toneladas (AGRIANUAL, 2009), destacando-se como o maior produtor mundial.

As sementes de *Passiflora edulis* geralmente passam por um período de dormência (situação em que sementes viáveis não germinam quando em condições favoráveis de temperatura, luz e de disponibilidade de água). Alexandre et al. (2004) demonstraram que sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. apresentam dormência e Melleti & Maia (1999) indicaram que, por ser uma espécie já domesticada, o período de dormência pode ser superado com 30 dias de armazenamento das sementes. Outros estudos mostraram que o maracujá possui melhor germinação quando submetidos à temperatura alternada de 20-30 °C (SANTOS et al., 1999, SILVA, 2004).

Para uma planta estabelecer-se a partir de sementes em um determinado ambiente, a germinação deve ser eficiente. Para tanto, cada espécie apresenta adaptações, como a mobilização de determinadas reservas para a formação de estruturas físicas na plântula ou para ativação do metabolismo, sintetizando intermediários metabólicos com finalidades diversas. Essas adaptações podem ser o fator decisivo na determinação do sucesso germinativo para uma situação de competição entre diferentes espécies.

Germinação de Sementes

O conceito de germinação de sementes muitas vezes gera confusão quanto ao seu uso correto, principalmente no que diz respeito ao exato momento da germinação. É considerado, em termos biológicos, que a germinação começa no momento em que se inicia a embebição de água pela semente, e termina freqüentemente quando há a protrusão da radícula (BEWLEY & BLACK, 1994), porque, em alguns casos, como no gênero *Salsola*, há inicialmente a protrusão da parte aérea ao invés da raiz (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

A embebição de água é um dos principais processos na germinação. É a partir dele que uma semente seca, com teor de água mínimo e metabolismo praticamente indetectável, irá se reidratar, iniciar a respiração, ativar organelas e iniciar a síntese protéica e consumo de reservas. Esse processo na maioria dos casos ocorre em um padrão trifásico:

Fase I – Início do processo de embebição por parte da semente e rápido aumento da respiração. Como a semente possui um potencial hídrico muito baixo, em razão da sua baixa hidratação e alta concentração de solutos, essa embebição se dá principalmente em razão da diferença de potenciais entre a semente e o meio onde ela está localizada, configurando-se em um processo osmótico;

Fase II - (Fase lag). Nessa fase, os potenciais hídricos estão bem próximos, e pouca embebição ocorre. É nessa fase que ocorrem a maioria dos processos metabólicos que precedem a protrusão da radícula, e a atividade respiratória se estabiliza;

Fase III – Ocorre concomitantemente com a protrusão da radícula. É observada a retomada do processo de embebição, em parte pelas mudanças nas

células da radícula enquanto ocorre o seu alongamento, em parte pela hidrólise dos materiais de reserva, que resulta em pequenas moléculas osmoticamente ativas. Há também um segundo aumento na atividade respiratória, associada à maior disponibilidade de oxigênio, em decorrência da ruptura do tegumento (BEWLEY, 1997; BEWLEY & BLACK, 1994, GUIMARÃES, 1999).

De importância equivalente são os fatores temperatura e luz para algumas espécies. A maneira como esses fatores afetam a germinação das sementes varia de espécie para espécie.

As diferentes espécies podem germinar preferencialmente na presença de luz, sendo denominadas fotoblásticas positivas, no escuro, denominadas fotoblásticas negativas, ou germinar tanto na presença de luz quanto na ausência desta, denominadas fotoblásticas neutras. O fitocromo é a molécula responsável pela percepção da luz, com o fitocromo A modulando as respostas de baixíssima fluência (cerca de $0,1\mu\text{mol.m}^{-2}$), e o fitocromo B responsável pela percepção da razão vermelho:vermelho extremo encontrada nos diferentes ambientes, controlando a germinação através da resposta de fluência baixa (em torno de $1\mu\text{mol.m}^{-2}$) (TAKAKI, 2001; CARDOSO, 2008).

A temperatura atua sobre a semente de diferentes maneiras. Age mantendo uma situação favorável para as reações metabólicas durante a germinação, sendo a velocidade dessas reações diretamente proporcional à temperatura, existindo uma temperatura ótima para cada espécie. No entanto, se a temperatura atingir níveis altos, por volta dos 40°C (sendo a temperatura máxima para a germinação da maioria das espécies encontrada entre 30 e 40°C) (COPELAND & MCDONALD, 2001) a germinação raramente ocorre, devido ao efeito prejudicial que a alta temperatura possui sobre as vias metabólicas, principalmente alterando a estrutura tridimensional de proteínas. Por outro lado, a baixa temperatura também prejudica a germinação das

sementes, por conta da inativação de enzimas, mudança de fase da membrana, e redução da taxa metabólica, até o ponto onde as vias essenciais para a germinação da semente não possam mais operar (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989). No entanto, nem sempre temperaturas altas e baixas prejudicam a germinação. Em alguns casos, para a superação da dormência de algumas sementes, existem tratamentos com temperaturas baixas, simulando o período de inverno, para que haja a posterior germinação. Já em outros, a alternância entre baixas e altas temperaturas também atua positivamente na quebra da dormência, alterando as características físicas dos tegumentos rígidos e facilitando a entrada de água (BEWLEY & BLACK, 1994).

Compostos de reserva e sua mobilização

Os principais compostos de reserva em uma semente são carboidratos, lipídios e proteínas, variando em proporção nas diferentes espécies. O estudo da composição química de uma semente também é de interesse prático da tecnologia de sementes, porque tanto o vigor quanto o potencial de armazenamento de sementes são influenciados pelo teor dos compostos de reserva presentes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Além disso, o interesse nas reservas das sementes não se dá somente pelo seu teor nutritivo, mas também por serem úteis na confecção de produtos industrializados (BUCKERIDGE et al., 2004a).

Morton (1987) mostrou que na semente de *P. edulis* há 11,1% de proteína e 23% de óleo similar ao de girassol e soja, sendo este óleo constituído predominantemente por ácidos linoléico (68,70%), oléico (17,5%), palmítico (11%) e esteárico (2,80%) (PONTES, 1989). Além disso, Raju (1955) mostrou que a reserva da semente de *Passiflora calcarata* contém amido, óleo e proteínas como reserva.

Mobilização de Carboidratos

Carboidratos são a principal fonte de reservas de sementes de plantas cultivadas para consumo humano (BEWLEY & BLACK, 1994), em razão de seu alto valor energético. Seu principal representante é a molécula de glucose, além de outras, como por exemplo galactose, manose, xilose e frutose, que formam diversos polímeros com função de reserva. Açúcares livres raramente são materiais de reserva, porém podem servir como tal em algumas sementes, como em *Acer saccharum*, onde sua concentração é de 11% (BEWLEY & BLACK, 1994). Os principais carboidratos de reserva em uma semente são o amido e os polissacarídeos de reserva de parede celular.

Por ser uma molécula relativamente instável, já que o seu grupamento aldeído pode ser espontaneamente oxidado à carboxila, a glucose pode ser polimerizada para a formação de amido, que é osmoticamente inerte e, portanto, não interfere no equilíbrio osmótico da semente (HELDT, 2005). O amido é composto por dois polímeros, organizados de maneira concêntrica: amilose, formada por cadeias não ramificadas de aproximadamente 1000 moléculas de glucose por meio da ligação glicosídica α -(1,4), e amilopectina, cadeias de amilose ramificadas pela ligação glicosídica α -(1,6) (com ramificações a cada 20-25 moléculas) e aproximadamente 10^4 a 10^5 moléculas. A proporção entre os dois polímeros varia de acordo com os autores, sendo aproximadamente 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina (BEWLEY & BLACK, 1994; BUCKERIDGE et al., 2004a; HELDT, 2005). É exatamente nessas ligações glicosídicas que as enzimas degradadoras de amido vão atuar, desmembrando os grânulos de amido em estruturas menores, como a maltose e a glucose. As principais enzimas são a α -amilase, β -amilase e a amido fosforilase. A α -amilase é uma endoenzima que hidrolisa de maneira aleatória as ligações α -(1,4) nas amiloses e amilopectinas, sendo a primeira enzima a atuar no processo de degradação do amido,

pela sua capacidade de atuar diretamente no grânulo, liberando moléculas de maltose e moléculas maiores contendo ligações α -(1,6), as dextrinas. Já a β -amilase é uma exoglucanase que ataca somente os terminais não-redutores dos polímeros do grânulo de amido. Pode hidrolisar completamente a amilose, porém a amilopectina é hidrolisada parcialmente, pois a enzima não consegue hidrolisar as ligações α -(1,6), também resultando na liberação de dextrinas. Por último, a amido fosforilase ataca as ligações α -(1,4) incorporando um fosfato entre a penúltima e a última molécula de glucose da extremidade não redutora, liberando glucose-1-fosfato, que pode ser utilizada diretamente na produção de sacarose, e também de dextrinas. Por último, essas dextrinas liberadas são então hidrolisadas por enzimas desramificadoras, que atuam sobre a ligação α -(1,6), liberando porções finais redutoras que possibilitam a completa degradação do amido pelas exoenzimas (BEWLEY & BLACK, 1994; BUCKERIDGE et al., 2004b).

Os polissacarídeos de reserva de parede celular são divididos em três grupos: mananos (podendo ser subdivididos em mananos puros, glucomananos e galactomananos), xiloglucanos e galactanos (BUCKERIDGE et al., 2000).

Mananos puros são definidos como contendo mais de 90% de manose formando uma cadeia linear do tipo β -(1,4), sem ramificações, podendo o restante estar ramificado com galactose, sendo relacionado aos galactomananos, porém com menos resíduos de galactose. O número de ramificações de galactose está diretamente ligado à solubilidade, sendo os mananos pouco solúveis e formadores de uma estrutura cristalina, e os galactomananos, com um maior número de ramificações de galactose, solúveis. Os mananos estão ligados à dureza do endosperma, e por conseqüência, à proteção mecânica do embrião, também apresentando função de reserva, e os galactomananos apresentam, além da sua função de reserva, a função de absorção de

água e manutenção da umidade ao redor do embrião, protegendo-o contra a perda de água durante períodos de seca pós-embebição. Tanto os mananos puros quanto os galactomananos são degradados em seus carboidratos constituintes pelas enzimas endo- β -mananase, β -manosidase e α -galactosidase, sendo que esta última atua somente sobre os galactomananos. Os xiloglucanos possuem uma cadeia principal de β -D-(1,4)-glucano ramificada com ligações α -(1,6) de resíduos D-xilopiranosídeos ou β -D-galactopiranosídeo-(1,2)-D-xilopiranosídeos, possuindo a função de reserva e sua degradação ocorrendo pela ação de quatro hidrolases: β -galactosidase, endo- β -(1,4)-glucanase (também conhecida como xiloglucano endo transglicosilase – XET), α -xilosidase e β -glucosidase, com sua mobilização ocorrendo após a protrusão da raiz. Por último, os galactanos são polímeros formados por ligações β -(1,3), (1,6) com algumas ligações β -(1,4) (chamado de arabinogalactano tipo I) e outro tipo, mais freqüente, com ligações β -(1,4) com ramificações de L-arabinofuranose a cada 16-21 resíduos da cadeia principal (chamado de arabinogalactano tipo II), sendo as enzimas responsáveis pela sua degradação a α -arabinosidase e três β -galactosidases, aumentando sua atividade após a germinação, porém, acredita-se também que os galactanos estejam associados ao controle da expansão celular (BUCKERIDGE et al., 2000; BUCKERIDGE et al., 2004b).

Mobilização de Lipídios

O armazenamento de lipídios ocorre em corpúsculos discretos no citoplasma delimitados por uma única membrana, chamados geralmente de corpos lipídicos (SOMERVILLE, 2000). Outros termos que também podem ser encontrados são esferossomos e glóbulos lipídicos (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989; YOO, 1970). Os lipídios são armazenados na forma de triglicerídios, e sua mobilização ocorre da seguinte maneira: (1) os triglicerídios são hidrolisados, resultando em glicerol e

ácidos graxos livres; (2) o glicerol é utilizado na síntese de glucose; (3) os ácidos graxos livres são degradados gerando acetil, que também será usado na síntese de glucose ou na respiração.

A hidrólise dos triglicerídios é feita por enzimas sintetizadas após a germinação (lipases). Lipases que possuem atividade ótima ao redor de pH 4,0 e diminuem após a germinação são consideradas como não associadas à mobilização dos triglicerídios; já as lipases com atividade ótima em pH neutro aumentam a atividade durante a mobilização dos triglicerídios, após a germinação. A atividade dessas lipases encontra-se no citosol ou nos glioxissomos, e não nos corpos lipídicos (BEWLEY & BLACK, 1994).

O processo pelo qual essas enzimas têm acesso ao seu substrato ainda não foi completamente esclarecido. Sabe-se que a mobilização dos lipídios está associada às oleosinas (BUCKERIDGE et al., 2004b) que são proteínas de 15 a 26 KDa presentes nas membranas dos corpos lipídicos. Outras funções sugeridas são a estabilização dos corpos lipídicos durante o processo de desidratação da semente e definir o tamanho do corpo lipídico impondo uma curvatura definida à sua superfície que, por sua vez, pode ser importante na regulação da razão superfície:volume e dessa maneira facilitar a mobilização rápida dos corpos lipídicos durante a germinação (SOMMERVILLE, 2000).

O destino dos subprodutos da hidrólise de triglicerídios é variado. O glicerol pode ser reutilizado para a síntese de triglicerídios, utilizado na respiração, ou convertido à sacarose e transportado ao eixo em crescimento. Já os ácidos graxos livres sofrerão β -oxidação e o seu produto, acetil-CoA, poderá ser utilizado na respiração celular ou na síntese de glucose (BEWLEY & BLACK, 1994).

Mobilização de Proteínas

As proteínas de reserva de muitas sementes são encontradas em organelas delimitadas por uma membrana simples chamadas de corpos protéicos. Esses corpos são vesículas derivadas do retículo endoplasmático rugoso, como no milho, ou vacúolos de acúmulo de proteínas, como na maioria das espécies, nos quais as proteínas são depositadas durante a maturação da semente em um estado osmoticamente inativo. Nas sementes de dicotiledôneas, os cotilédones são os principais locais onde ocorre o acúmulo de proteínas (BUCKERIDGE et al., 2004b; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989; MÜNTZ, 1998; MÜNTZ et al., 2001).

A hidrólise das proteínas em seus aminoácidos constituintes é feita por meio de uma classe de enzimas chamadas proteases, que podem ser categorizadas de acordo com a maneira de ação sobre os substratos em que elas atuam, sendo: (1) endopeptidases, que clivam as ligações peptídicas internas para originarem cadeias polipeptídicas menores; (2) aminopeptidases, que realizam a hidrólise sequencialmente a partir do último aminoácido na extremidade do terminal amino da cadeia, um a um; e (3) carboxipeptidases, que realizam função semelhante à das aminopeptidases, porém a partir da extremidade do terminal carboxila da proteína. Estas duas últimas são consideradas exopeptidases (BEWLEY & BLACK, 1994).

Os aminoácidos resultantes da hidrólise das proteínas são convertidos a amidas (glutamina e asparagina), que são formas transportadas para o eixo embrionário em crescimento. A transformação dos aminoácidos resultantes das hidrólises das proteínas de reserva em amidas é realizada principalmente pela enzima asparagina sintetase (BUCKERIDGE et al., 2004b).

Apesar da importância econômica de *P. edulis*, não foi encontrado na literatura um estudo sobre o processo de mobilização de suas reservas durante a germinação de

sua semente. O estudo da germinação de sementes é importante tanto sob o ponto de vista econômico, visando à utilização dos compostos industrialmente, quanto do ponto de vista biológico, para o puro conhecimento da espécie, conhecimento este que pode ser aplicado para diversos fins, como na sua própria preservação em banco de sementes, onde os tipos de reserva podem influenciar na sua preservação (TOUCHELL & DIXON, 1994).

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a germinação da semente do maracujá-amarelo, analisando bioquimicamente a mobilização das reservas acompanhado da análise histológica das sementes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das Sementes

As sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* cv. IAC 273/277 foram adquiridas no Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Possuem teor de água médio de 9,21% (Estufa 105±3°C até que a massa das sementes se mantivesse constante (BRASIL, 1992) e a massa seca de cada semente é em média 22,85 ± 0,16 mg.

Beneficiamento

Segundo informações do IAC, após a retirada das sementes dos frutos, estas foram colocadas em um liquidificador ligado, com uma peça adaptada para criar turbilhonamento no lugar das lâminas normais, durante trinta segundos, e em seguida peneiradas para remoção da polpa. Após esse procedimento, foram lavadas e secas na sombra em papel neutro. Na sequência da secagem, as sementes foram limpas com flanela para retirar a sarcotesta restante. Os resíduos restantes foram removidos manualmente.

Condições de Germinação

As 40 sementes foram colocadas em cada uma das três placas de Petri forradas duplamente com papel filtro embebido com 10mL de água destilada. As placas foram mantidas na alternância de temperatura de 20-30°C (12h-12h) em incubadoras, conforme Silva (2004) e sob luz branca contínua, provida por duas lâmpadas fluorescentes de 15W tipo luz do dia (GE, Hungria) , instaladas sobre a prateleira onde foram colocadas as placas de Petri, de maneira que a fluência fosse o mais homogênea possível. O mesmo procedimento experimental também foi realizado com as sementes no escuro contínuo, exceto que as placas de Petri foram mantidas dentro de caixas gerbox pretas. Sementes do tempo zero (t0), segundo (t2), quarto (t4), sexto (t6), oitavo

(t8) e décimo (t10) dia de germinação foram coletadas e submetidas às análises que se seguem.

Quantificação das reservas

Lipídios

As 40 sementes de cada repetição nos diferentes períodos de germinação foram trituradas com o auxílio de pistilo e almofariz, com solução de clorofórmio-metanol-água destilada (1:1:1 v:v:v), de acordo com o método de Bligh & Dyer (1959). Em seguida, a mistura foi centrifugada para a separação das fases entre os solventes, e a fração do clorofórmio (fundo do tubo) foi coletada. O conteúdo de lipídios totais foi determinado a partir da diferença de peso entre o recipiente (previamente pesado) contendo os lipídios totais após a evaporação do clorofórmio e o mesmo recipiente completamente vazio.

Carboidratos

O método foi executado de acordo com o utilizado em Takaki & Dietrich (1980). As 40 sementes de cada repetição nos diferentes períodos de germinação foram homogeneizadas e os carboidratos livres foram extraídos com 15 mL de etanol 70% (v:v) em refluxo durante 60 minutos. Após centrifugação o sobrenadante continha carboidratos livres. Os precipitados após a centrifugação foram extraídos de acordo com o método de Matheson & Saini (1977), resultando nas seguintes frações: polissacarídeos solúveis a frio em Cloreto de Mercúrio 10mM (1:7, p:v); polissacarídeos solúveis a quente em Oxalato de Amônio 0,5% (1:7, p:v); polissacarídeos álcali solúveis em Hidróxido de Sódio 5% (1:7, p:v).

Os carboidratos totais foram estimados em cada fração de acordo com o método de Dubois et al. (1956), utilizando-se glucose como padrão.

Proteínas

A extração de proteínas solúveis foi realizada de acordo com o método descrito por Alfenas et al. (2006), a qual consistiu na homogeneização das sementes em tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0 e posterior centrifugação a 5000xg. O teor de proteínas dos extratos foi quantificado pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como proteína padrão.

Histologia/ Histoquímica

Sementes submetidas aos mesmos tratamentos descritos no item “Condições de Germinação” foram fixadas a vácuo em FAA 70% (JOHANSEN, 1940) durante dois dias, e posteriormente mantidas em álcool 70% até a realização da desidratação e emblocamento em historesina Leica. Para a desidratação, o material foi submetido a banhos de álcool de duas horas nas concentrações de 90% e 100%, seguido de um banho em álcool 100%:resina líquida (1:1) durante duas horas, e mantido posteriormente em resina ativada durante no mínimo uma semana. Após esse procedimento, o material foi emblocado em historesina.

Os blocos foram cortados em micrótomo Reichert-Jung Leica modelo 2040 Autocut, na espessura de oito micrômetros, de maneira que os cortes fossem obtidos em sentido longitudinal, e foram submetidos às seguintes técnicas:

- **Azul de Toluidina (rotina, para detecção de compostos ácidos):** Os cortes foram corados na solução de azul de toluidina em pH 4,7 durante 3 minutos. Em seguida, foram lavados em água destilada. Após a secagem, as lâminas foram montadas em Entellan (adaptado de Pearse, 1985).

- **Ácido Periódico de Schiff - PAS (para detecção de carboidratos):** As lâminas foram colocadas durante 10 minutos em ácido periódico 1%. Em seguida, foram colocadas durante 5 minutos em água de torneira, e na seqüência por 5 minutos

em água destilada. Após isso, foram mergulhadas durante 20 minutos no reativo de Schiff (no escuro), passando em seguida por 3 banhos de 1 minuto cada em água sulfurosa. Seguiram-se mais um banho em água de torneira e um em água destilada, por 5 minutos cada, coloração pelo Azul de Toluidina durante 30 segundos, finalizando com mais um banho em água de torneira e outro em água destilada, durante 5 minutos cada. Após a secagem, as lâminas foram montadas em Entellan (adaptado de Pearse, 1985).

- **Azul de Bromofenol (para detecção de proteínas):** As lâminas foram coradas durante 1 hora no corante azul de bromofenol à temperatura ambiente, lavadas em ácido acético 0,5% durante 1 minuto e por fim lavadas em água corrente durante 15 minutos. Após a secagem, as lâminas foram montadas em Entellan (adaptado de Pearse, 1985).

- **Azul do Nilo (para detecção de lipídios):** As lâminas foram coradas durante 10 minutos na solução de Azul do Nilo a 60°C. Na seqüência, foram lavadas em água destilada e em 2 banhos de ácido acético 1%, sendo o primeiro com duração de 5 minutos e o segundo com duração de 3 minutos (adaptado de HAWES & SATIAT-JEUNEMAITRE, 2001). Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em água destilada, secas e montadas em Entellan.

Após a realização das colorações e montagem das lâminas permanentes, os materiais foram fotografados em fotomicroscópio Leica DMLB com câmera Leica DFC280 e analisados.

Eletroforese de proteínas

Alíquotas com 100 µg de proteínas solúveis foram retiradas dos extratos de proteínas de cada tempo e liofilizadas. Em seguida, o resíduo foi ressuspensão em uma mistura de 20 µL de água destilada e deionizada e 20 µL de tampão desnaturante (1,5% de Tris-base (p:v), 20% de SDS 20% (v:v), 10% de β-mercaptoetanol (v:v), 20% de glicerol 87% (v:v), 0,2% de azul de bromofenol (p:v) e 50% de água destilada e

deionizada (v:v)), e em seguida colocado em água fervente por 5 minutos. A eletroforese foi executada em gel de SDS-PAGE com um gradiente de 8-18% de acordo com Hames & Rickwood (1990), com posterior revelação por Comassie Brilliant Blue R-250 0,1% em metanol:ácido acético:água (40:10:50) durante duas horas, seguido de descoloração em metanol:ácido acético:água (40:10:50). Como proteínas padrão, foi utilizado o Prestained Prot/Marker/P7708S/175ln da New England Biolabs.

Cromatografia de camada delgada de Lipídios

Alíquotas contendo 2mg de cada amostra de lipídios totais foram aplicadas em placas cromatográficas Silica Gel 60 20X20cm (Merck), com fase móvel hexano:éter etílico:ácido acético (85:15:1). De acordo com os Rfs, do maior para o menor, obtém-se monoglicerídeos, ácidos graxos, diglicerídeos, esteróis, triglicerídeos e fosfolipídeos (DEVEM & MANOCHA, 1975). Para a revelação das placas, foi utilizado iodo sublimado em câmara fechada, com leve aquecimento para aceleração do processo, até que as manchas nas placas estivessem completamente visíveis.

RESULTADOS

Germinação das Sementes

As sementes de *P. edulis* apresentaram alta porcentagem de germinação, com as sementes submetidas ao tratamento no escuro apresentando 2mm de protrusão radicular em torno do quarto dia de incubação e as mantidas na luz branca apresentando protrusão da radícula a partir do quinto dia. Apesar do atraso no início da germinação de um tratamento para o outro, ao final dos 10 dias foi atingido o máximo de germinação (figura 1).

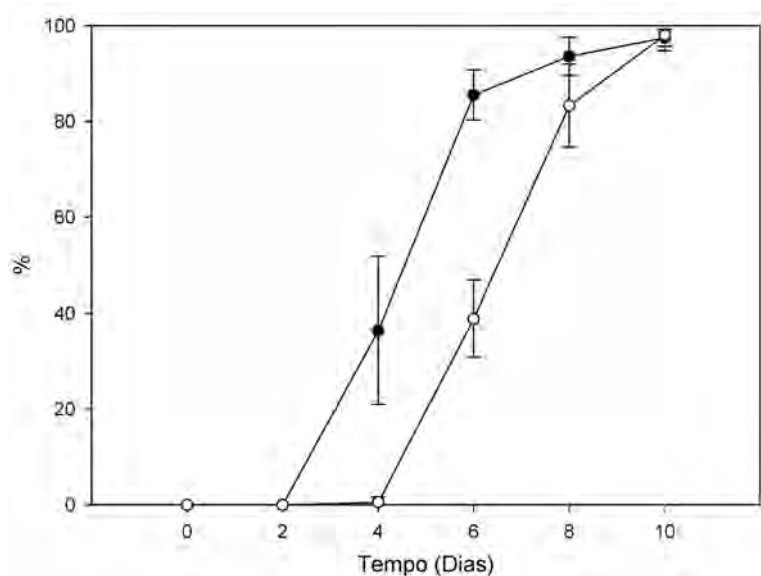


Figura 1: Curvas de germinação das sementes de *Passiflora edulis*. Legenda: ○- luz branca, ●- escuro. As barras de erro representam o desvio padrão.

Extração de Reservas

Carboidratos

Ocorreu uma redução nos níveis de açúcares livres até o oitavo dia para as sementes germinadas na luz branca, e até o sexto dia para as sementes germinadas no escuro (figura 2A), com os valores aumentando ao décimo dia de germinação para a luz branca e oitavo para o escuro. Já os polissacarídeos solúveis a frio (figura 2B)

mostraram uma diminuição acentuada durante os dois primeiros dias de germinação, com pequenas variações nos valores nos dias subsequentes, tanto para as sementes germinadas na luz branca quanto no escuro. A fração de polissacarídeos solúveis a quente (figura 2C) mostrou níveis relativamente semelhantes durante oito dias de germinação, aumentando ao décimo dia, tanto para as sementes germinadas sob luz branca quanto no escuro. As sementes germinadas no escuro mostraram quantidades maiores de polissacarídeos solúveis a quente do que as germinadas na luz branca contínua. Em relação à fração de polissacarídeos álcali-solúveis (figura 2D), os níveis também oscilaram para as sementes germinadas na luz branca durante os primeiros oito dias, com os níveis aumentando ao décimo, enquanto as sementes germinadas no escuro mostram um incremento inicial um pouco maior, aumentando gradativamente até o décimo dia.

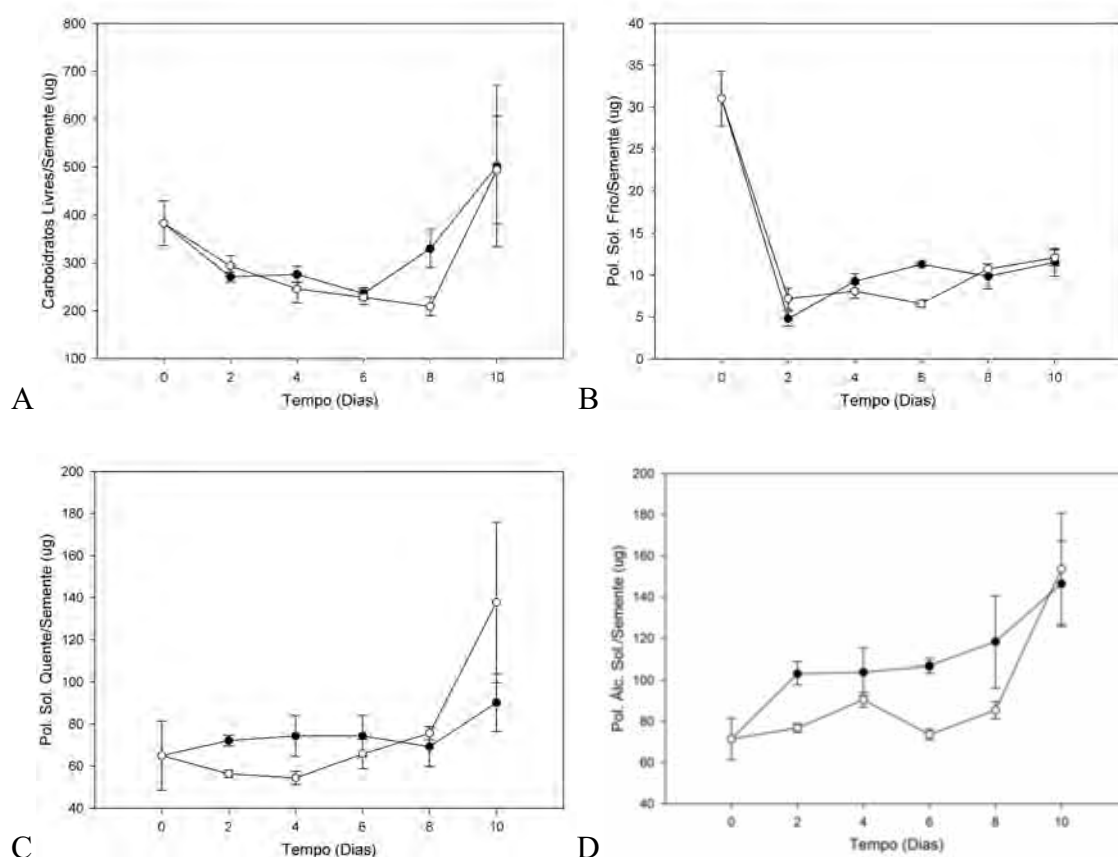


Figura 2: Frações de carboidratos em sementes de *Passiflora edulis*, expressos em valores totais por semente (μg), durante a germinação. A – Carbohidratos livres, B – Polissacarídeos solúveis a frio, C – Polissacarídeos solúveis a quente, D – Polissacarídeos álcali solúveis. Legenda: -○- luz branca, -●- escuro. As barras de erro representam o desvio padrão.

Lipídios

Os lipídios mostraram uma clara diminuição durante os dez dias de germinação, caindo para aproximadamente metade de seu valor inicial na semente ao final do processo (figura 3). As sementes germinadas no escuro apresentaram uma diminuição mais acentuada do que as germinadas na luz branca, porém, após os dez dias, tanto as sementes germinadas na luz branca quanto no escuro atingiram níveis semelhantes de lipídios remanescentes.

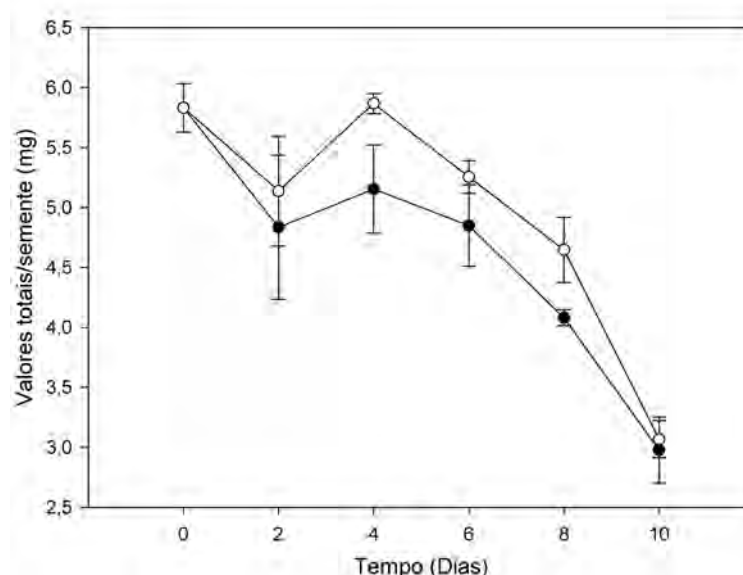


Figura 3: Níveis de lipídios totais em sementes de *Passiflora edulis*, expressos em valores totais por semente (mg), durante a germinação. Legenda: -○- luz branca, -●- escuro. As barras de erro representam o desvio padrão.

Proteínas

As proteínas solúveis totais (figura 4) apresentaram um incremento nos dez primeiros dias de germinação, tanto nas sementes germinadas no escuro quanto na luz branca. A oscilação nos valores nos dias iniciais se manteve próxima, contudo, as sementes germinadas na luz branca apresentaram um incremento crescente e contínuo, enquanto houve oscilações nos valores para as sementes germinadas no escuro.

Todavia, em ambos os tratamentos chegaram a níveis próximos ao final do período experimental.

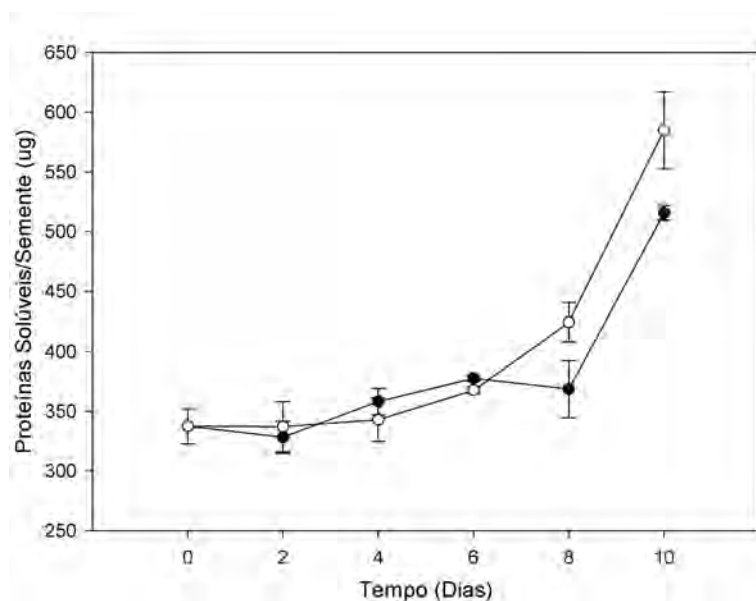


Figura 4: Níveis de proteínas solúveis totais em sementes de *Passiflora edulis*, expressos em μg , durante a germinação. Legenda: -○- luz branca, -●- escuro. As barras de erro representam o desvio padrão.

Análise eletroforética de proteínas e cromatográfica de lipídios

Proteínas

A eletroforese dos extratos protéicos mostrou uma tendência à diminuição na quantidade de proteínas de alta massa molecular (aqui consideradas as proteínas das bandas L1 a L5 para a extração das sementes germinadas sob luz branca contínua e E1 a E5 para as sementes germinadas no escuro) e uma tendência ao aumento na quantidade de proteínas de baixa massa molecular (bandas L6 a L8 e E6 a E8) durante o processo de germinação (figura 5). As massas moleculares para cada banda são representados na tabela 1:

Tabela 1: Massa molecular das bandas de eletroforese

Bandas	Peso Molecular (KDa)
L1/E1	63
L2/E2	58
L3/E3	50
L4/E4	44
L5/E5	31
L6/E6	23,5
L7/E7	20
L8/E8	18

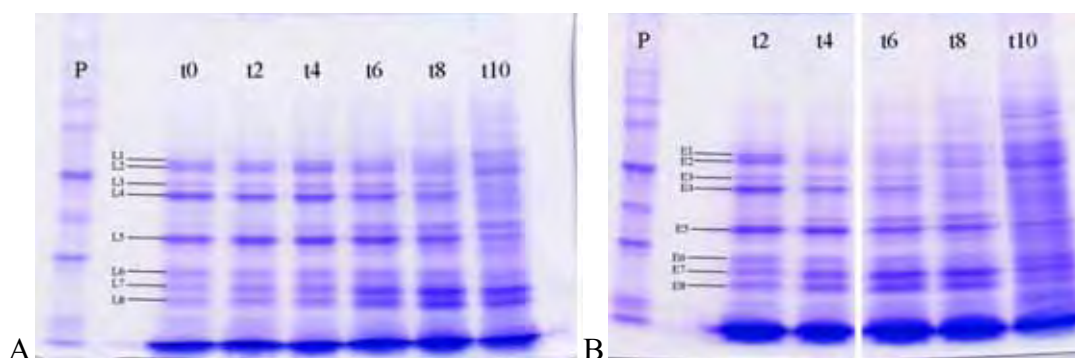


Figura 5: Eletroforese de Proteínas solúveis totais de sementes de *Passiflora edulis*. A – Luz Branca, B – Escuro, P – Padrão.

Lipídios

Foi observado nas sementes germinadas sob luz branca que o nível de monoglicerídeos parece se manter constante durante todo o período, e os ácidos graxos apresentaram uma redução em seus níveis. Aparentemente há um aumento nos diglicerídeos, indicada pela forte coloração no tempo t10. O nível de esteróis parece sofrer um leve incremento ao décimo dia, enquanto triglicerídeos praticamente se mantiveram constantes durante todo o processo de germinação (figura 6). Já no escuro, apesar de parecer seguir as mesmas tendências, as manchas de ácidos graxos mostraram-se muito fracas, praticamente imperceptíveis (figura 7). Tanto na luz branca quanto no escuro o nível de fosfolipídios apresentou um leve aumento durante os 10 dias de germinação.

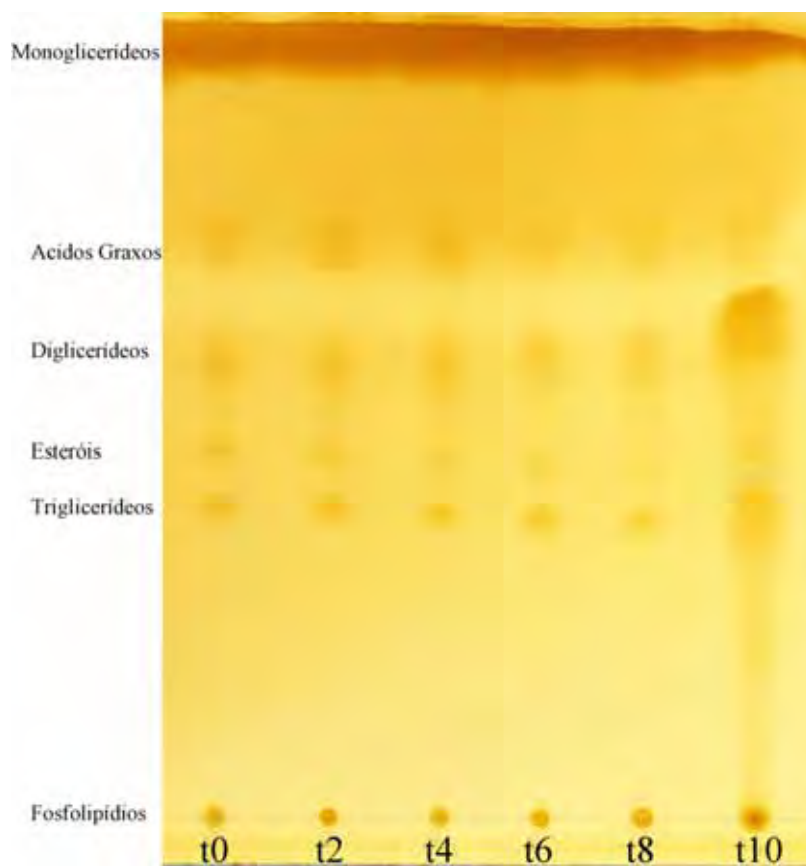


Figura 6: Cromatografia de camada delgada de lipídios de sementes de *Passiflora edulis*, germinadas sob luz branca contínua.

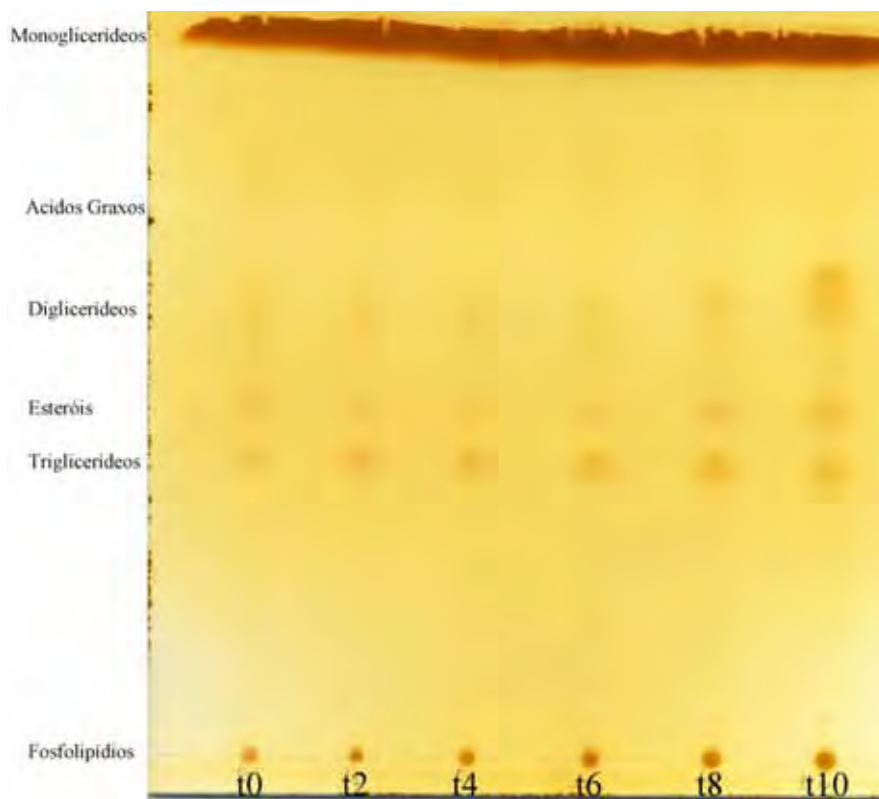


Figura 7: Cromatografia de camada delgada de lipídios de sementes de *Passiflora edulis*, germinadas em escuro contínuo.

Histoquímica

Endosperma

É observado que a quantidade de lipídios diminui expressivamente durante os primeiros 10 dias de germinação (figura 8), ocorrendo uma diminuição mais pronunciada entre o sexto e oitavo dia, no sentido porção externa para a porção interna do endosperma. Nota-se também que as bordas das gotículas de lipídio reagem positivamente ao Azul de Bromofenol, indicando a presença de proteínas nessa parte da estrutura da gotícula (figura 9). As paredes celulares reagiram positivamente ao PAS e Azul de Toluidina, permitindo observar a degradação da parede celular, passando da estrutura rígida e definida observada nos tempos iniciais (figuras 10A-D e 11A-D) para uma estrutura flácida, ocasionando a perda da integridade da estrutura, observada nos tempos tardios de pós-embebição (figuras 10E-F e 11E-F). Nota-se que não há mais nenhum outro material de reserva no endosperma, seja ele formado por carboidratos ou proteínas. Nenhuma diferença foi observada entre as sementes germinadas sob luz branca contínua ou escuro contínuo (figuras 16-19).

Cotilédones

Na técnica de azul de toluidina, é vista a retomada do formato funcional do núcleo entre os tempos t4 e t6 (Figura 12C-D), juntamente com uma mudança de coloração no citoplasma, passando de um azul claro para uma coloração mais pronunciada e homogênea, evidenciada pelos glóbulos presentes nos tempos iniciais e que desaparecem nos tempos finais. Ao PAS os grânulos do citoplasma pouco reagiram, no entanto, também é observada uma coloração mais forte no citoplasma nos tempos finais, além do aparecimento de pequenos grânulos de amido corados nos tempos t8 e t10 (Figuras 13E-F). Os grânulos citoplasmáticos presentes nos tempos iniciais (t0 a t6, Figuras 14A-D) reagiram positivamente ao Azul de Bromofenol, desaparecendo nos

dias mais avançados de germinação e também apresentando uma coloração mais homogênea do citoplasma. Nenhum resultado foi observado na coloração de azul do nilo (figura 15).

Evidências de divisão celular aparecem nos tempos t_6 e t_8 , em decorrência do fato das células terem um tamanho relativamente grande no t_6 , e na seqüência estarem com a formação de paredes celulares dividindo o citoplasma, além da formação de novos núcleos. Nenhuma diferença expressiva entre os tratamentos luz branca contínua e escuro contínuo foi observada (figuras 20-23).

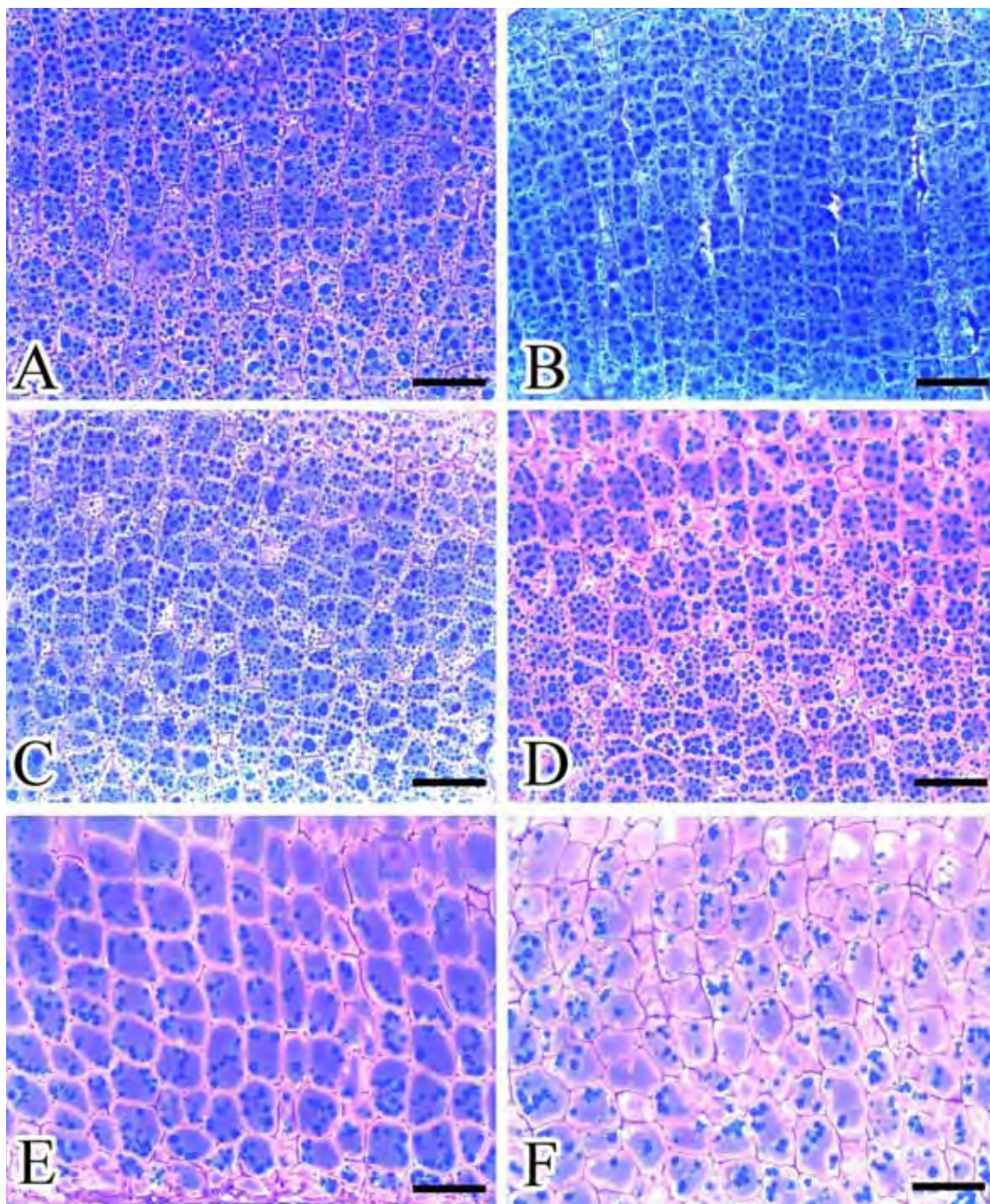


Figura 8: Endosperma da semente de *P. edulis* germinada sob luz branca contínua, submetido a técnica de Azul do Nilo para coloração de lipídios. Notar a diminuição no nível de lipídios a partir de t6 (D). A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 100 μm.

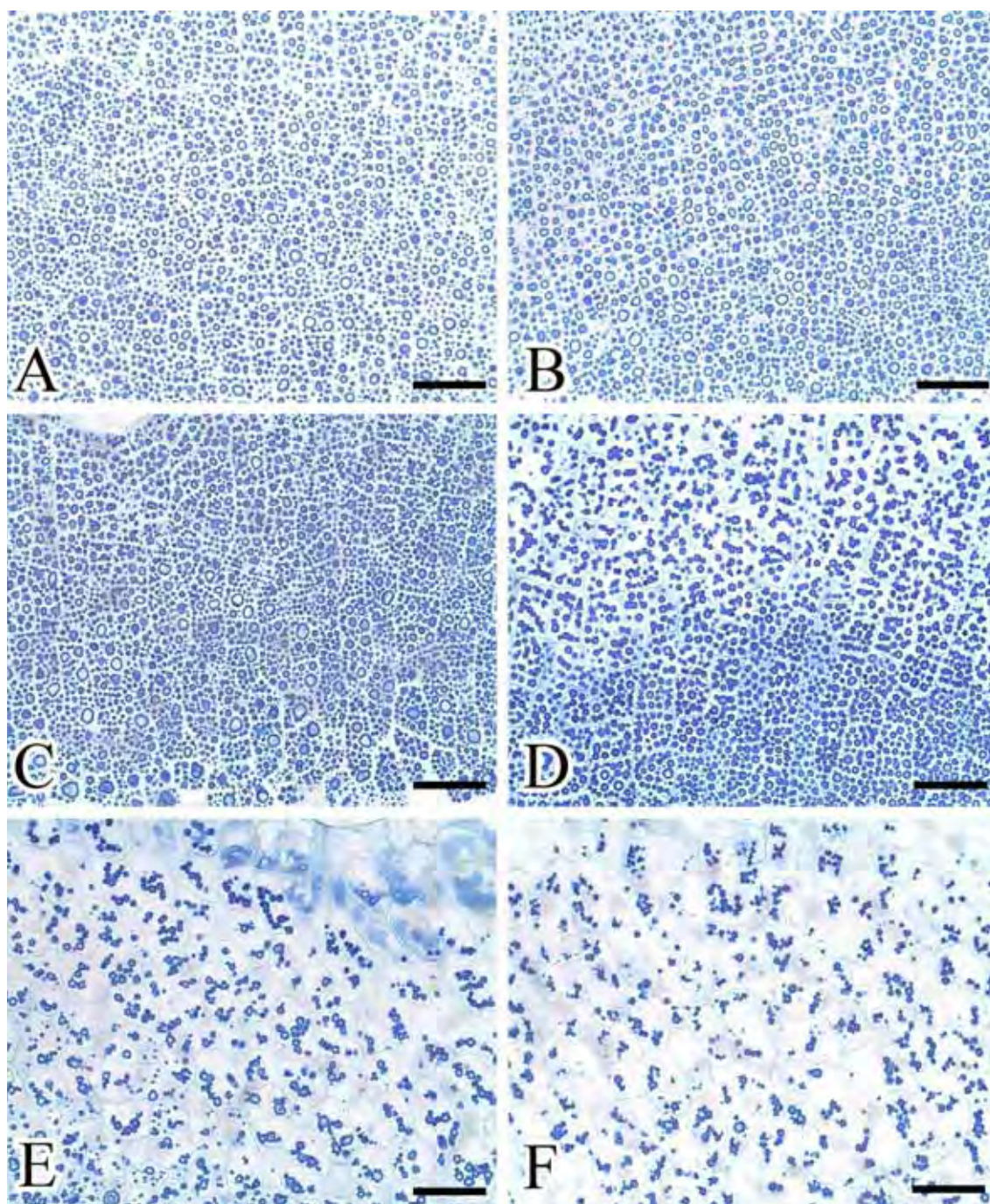


Figura 9: Endosperma da semente de *P. edulis* germinada sob luz branca contínua, submetido a técnica de Azul de Bromofenol para coloração de proteínas. Observar a presença de proteínas (oleosinas) ao redor dos corpos lipídicos. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 100 μ m.

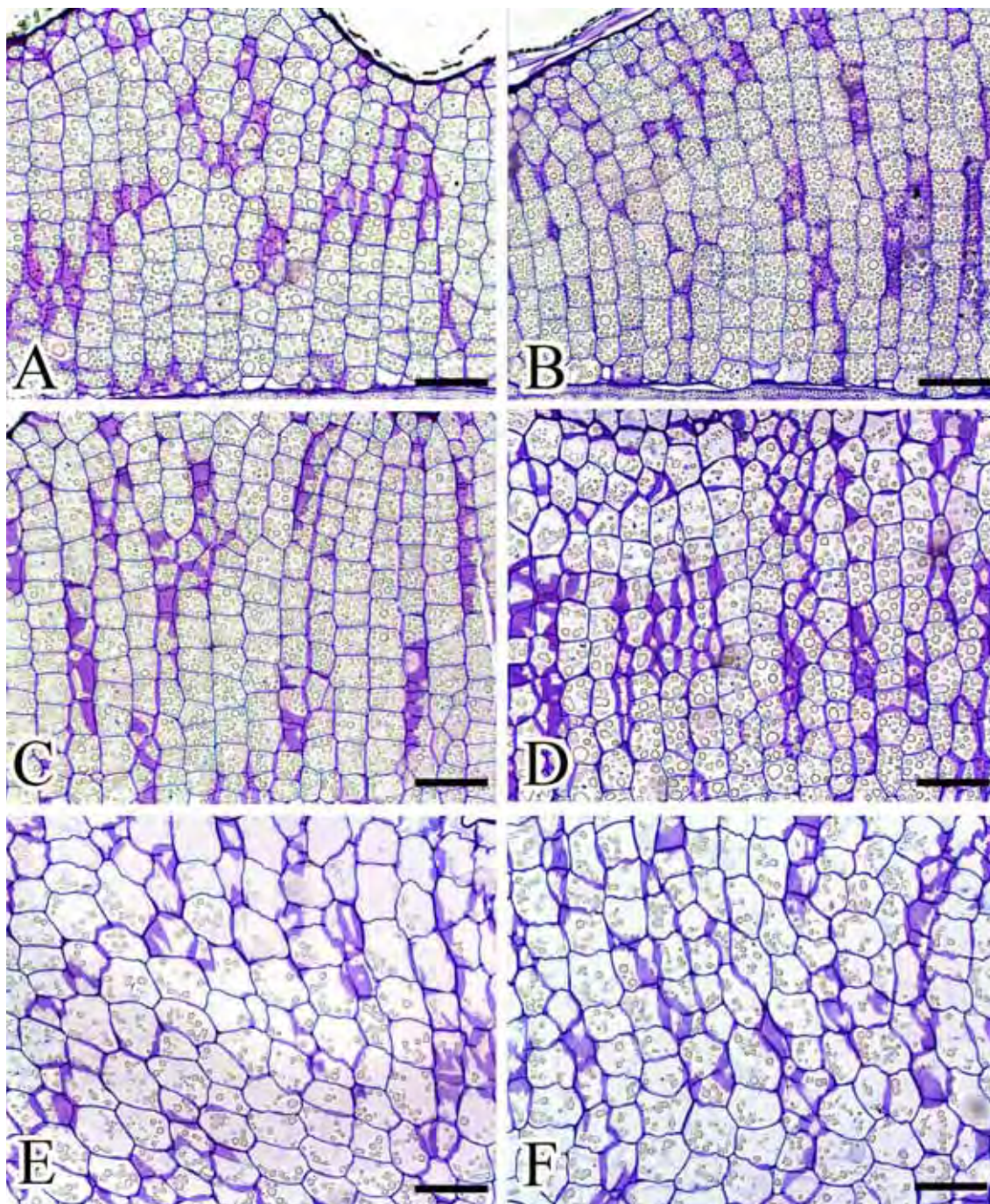


Figura 10: Endosperma da semente de *P. edulis* germinada sob luz branca contínua, submetido a técnica de PAS para coloração de carboidratos. O afrouxamento das paredes celulares é evidente nos tempos t8 e t10 (E-F) após o início da incubação. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 100 μm .

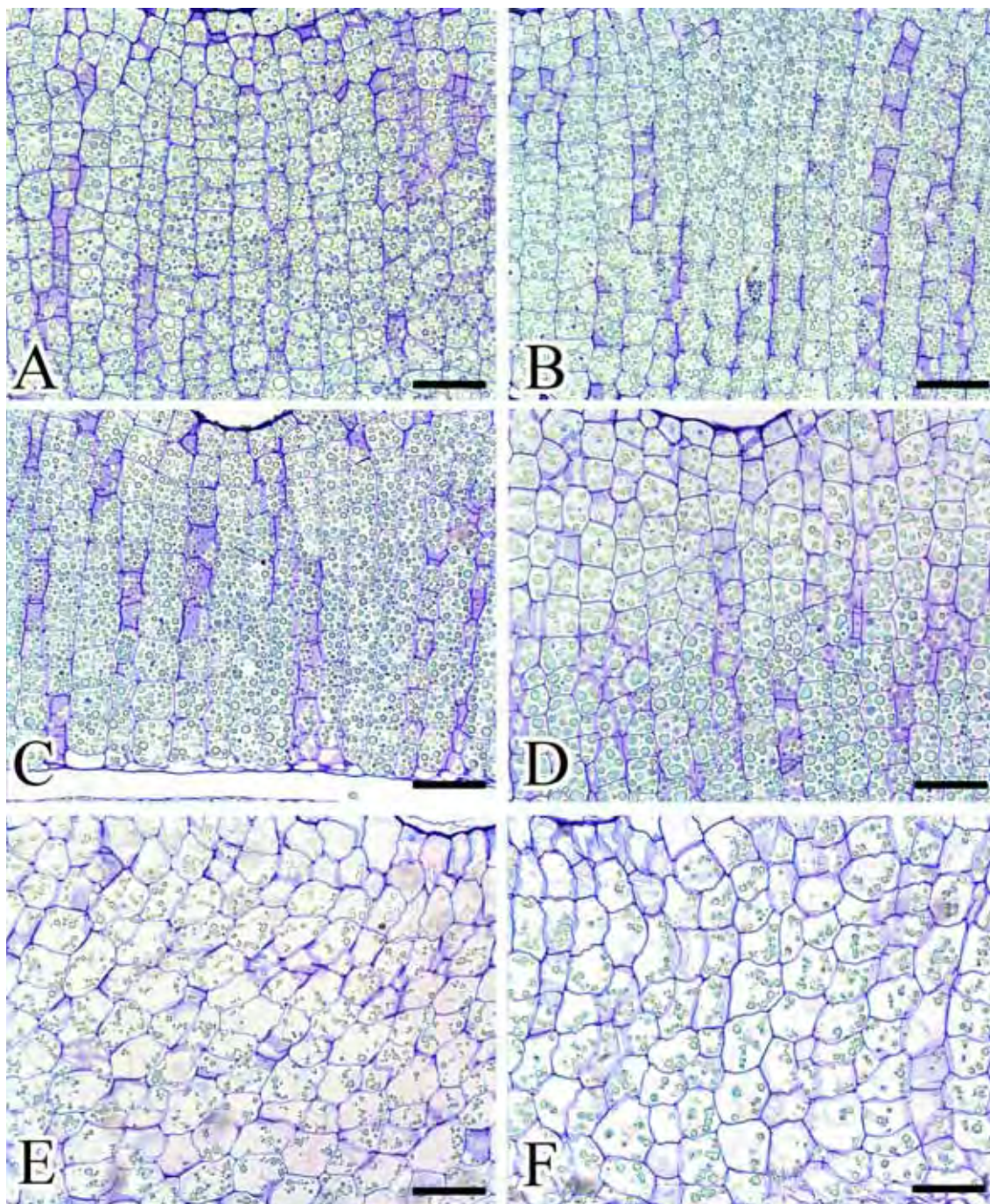


Figura 11: Endosperma da semente de *P. edulis* germinada sob luz branca contínua, submetido a técnica de Azul de toluidina para coloração de estruturas ácidas. O afrouxamento das paredes celulares também é evidente nos tempos tardios após a germinação (E-F). A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 100 μm.

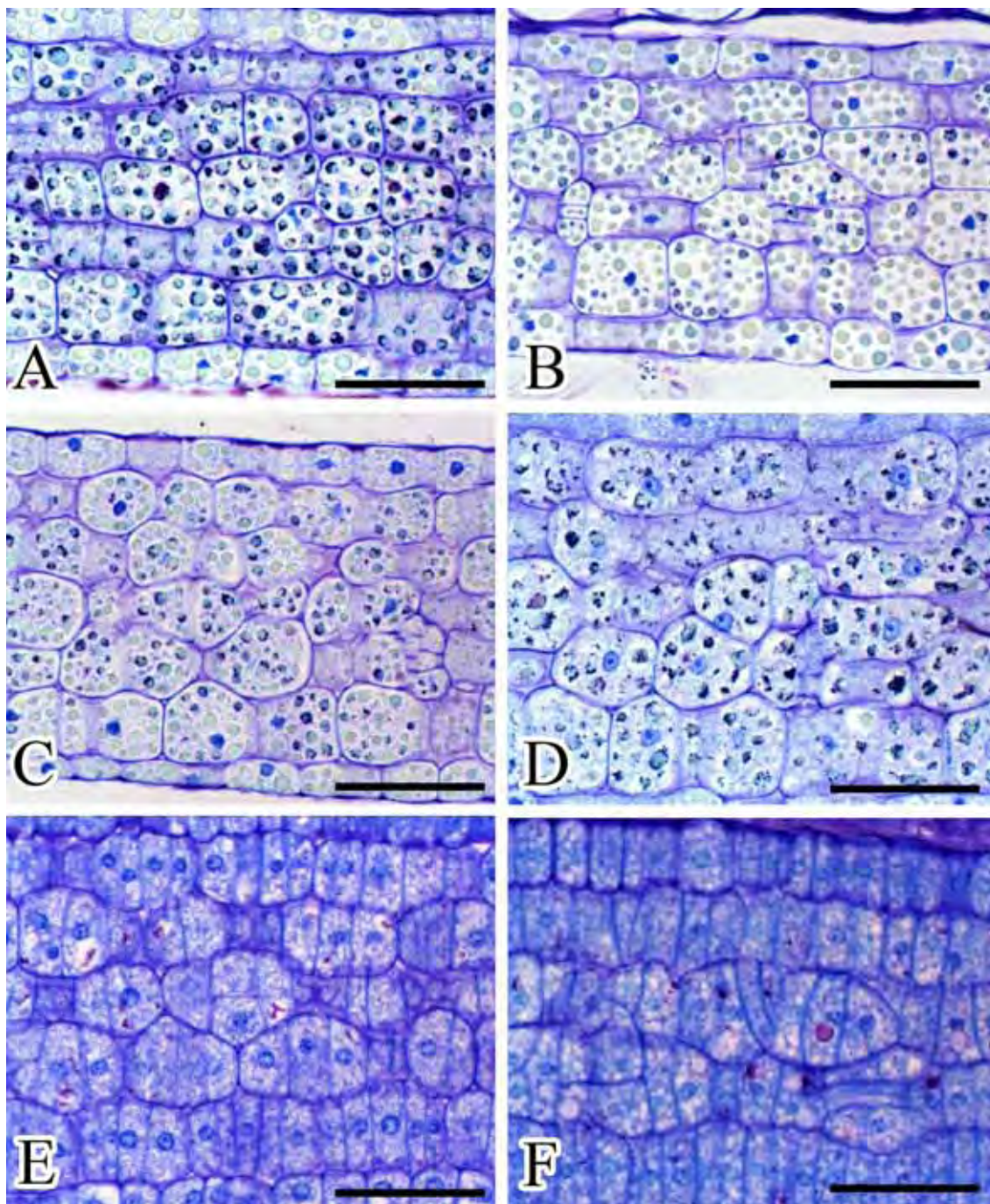


Figura 12: Cotilédones da semente de *P. edulis* germinada sob luz branca contínua, corados pela técnica de azul de toluidina para a coloração de estruturas ácidas, permitindo observar a reestruturação do núcleo (A-D) e a mudança na intensidade de coloração do citoplasma (D-F). A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 50 μ m.

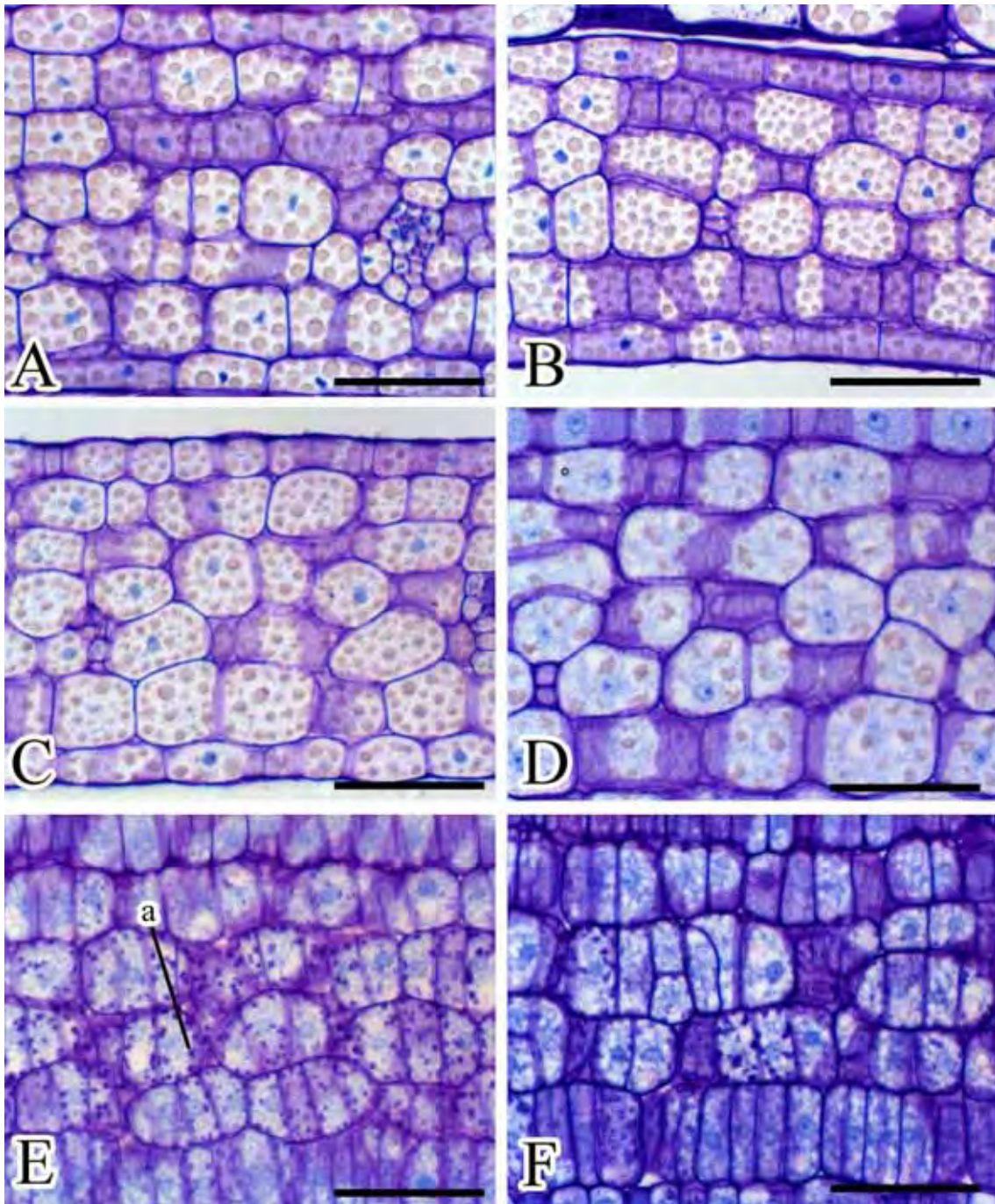


Figura 13: Cotilédones da semente de *P. edulis* germinada sob luz branca contínua, corados pela técnica de PAS para a coloração de carboidratos, mostrando a mudança na intensidade de coloração do citoplasma, juntamente com o aparecimento de grãos de amido (E-F). A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10, a-amido. Escala = 50 µm.

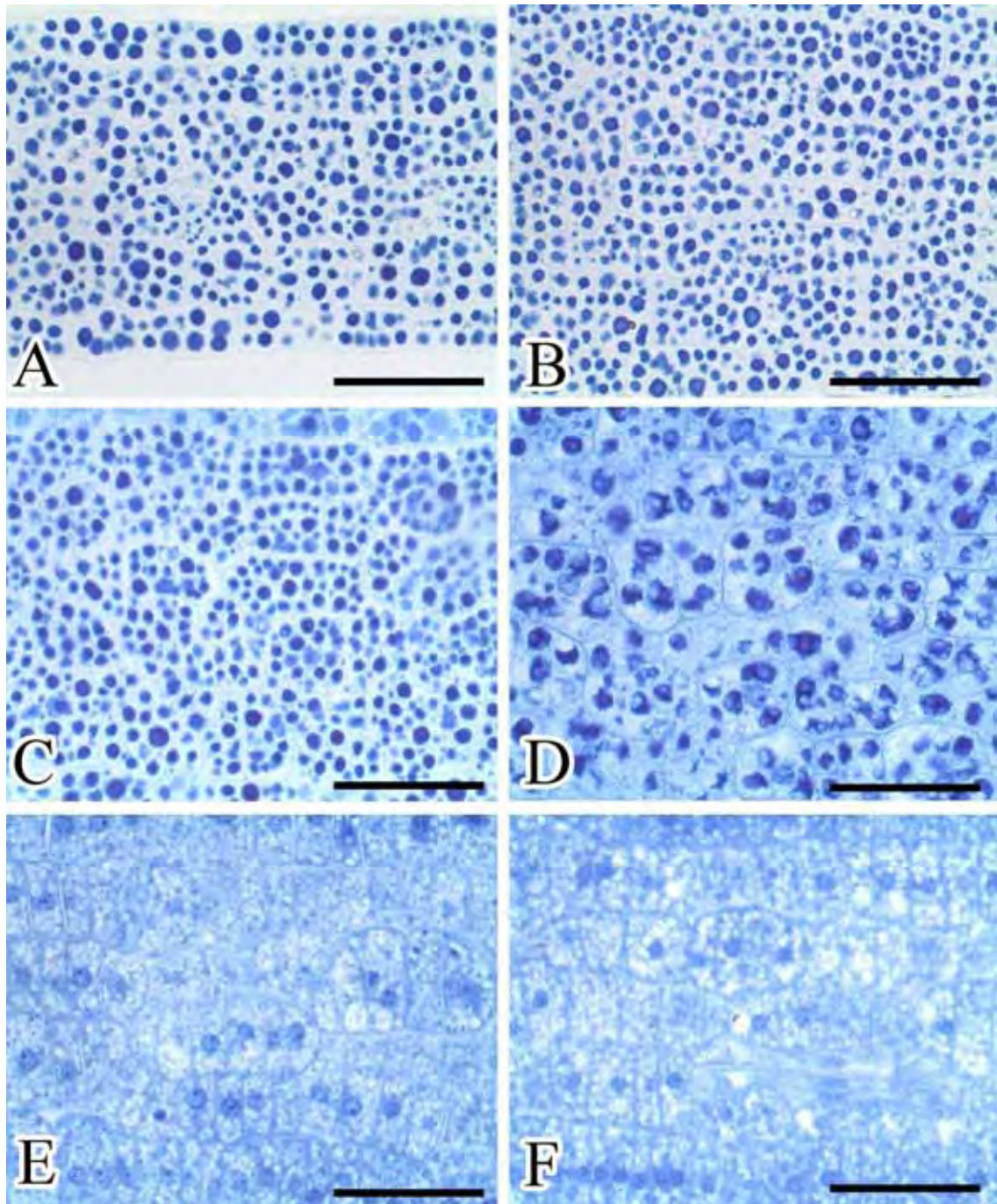


Figura 14: Cotilédones da semente de *P. edulis* germinada sob luz branca contínua, corados pela técnica de azul de bromofenol para a coloração de proteínas. Os grânulos protéicos presentes no citosol (A-D) são completamente hidrolisados durante a germinação. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 50 µm.

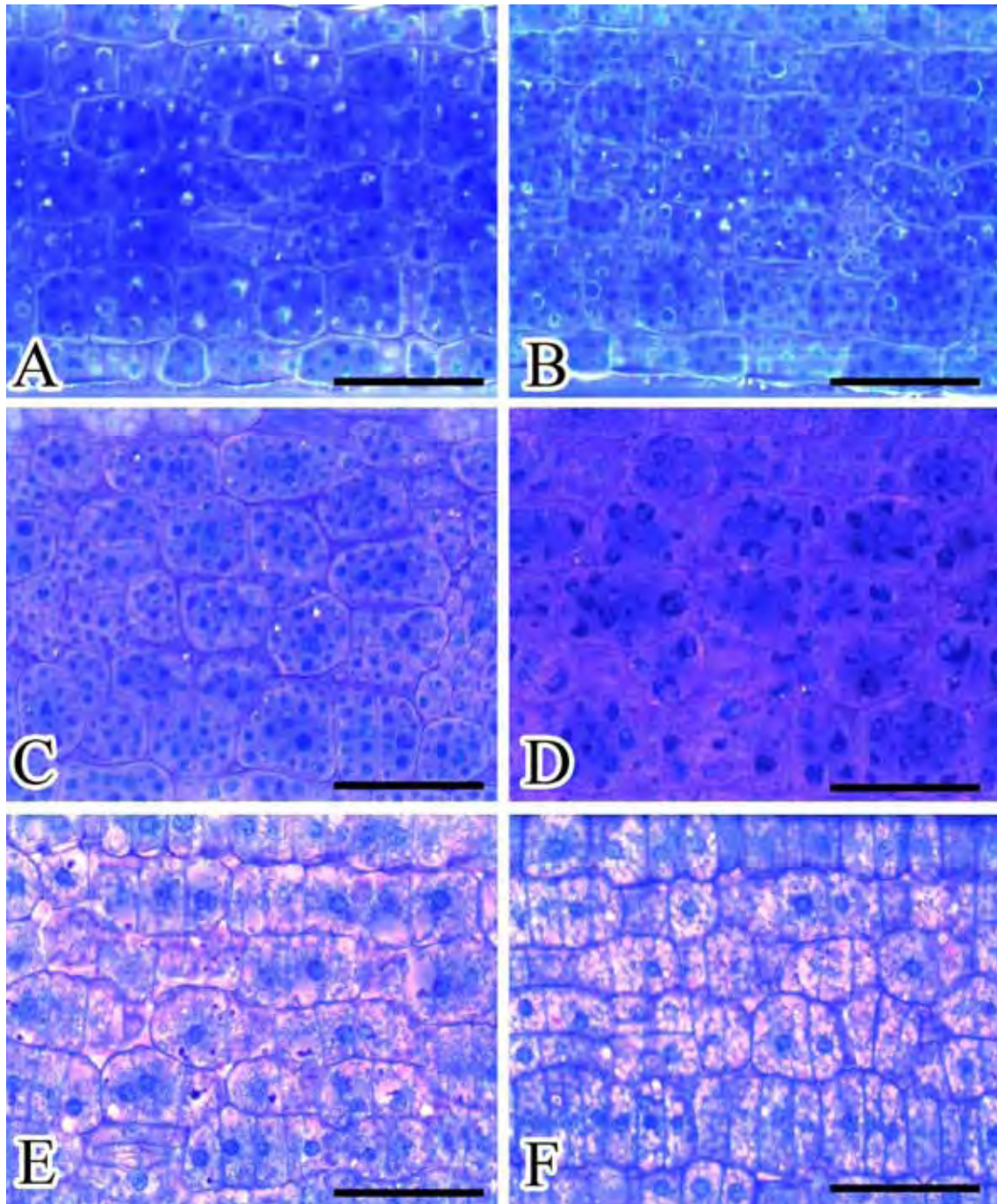


Figura 15: Cotilédones da semente de *P. edulis* germinada sob luz branca contínua, corados pela técnica de azul do Nilo para a coloração de lipídios. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 50 μm .

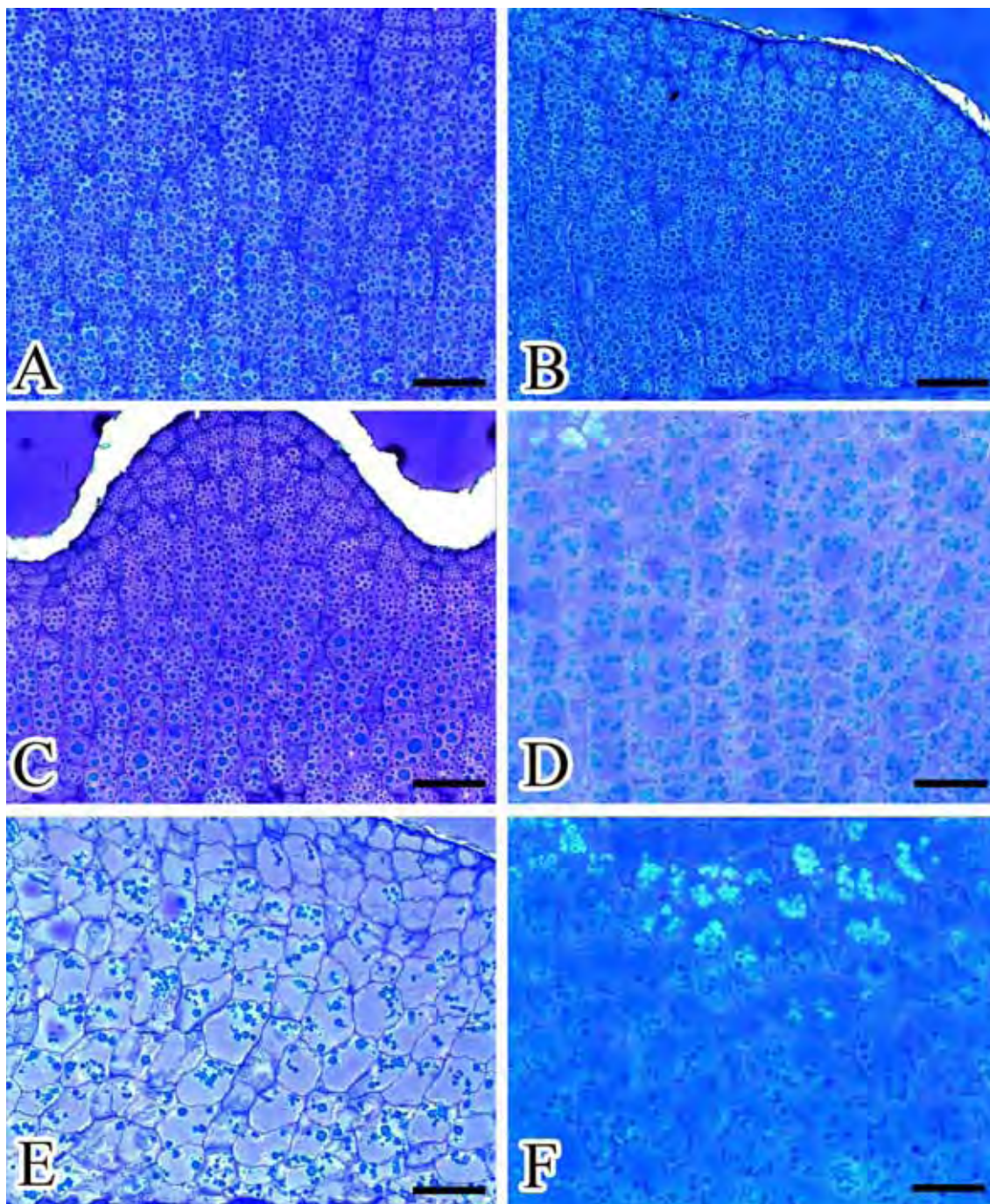


Figura 16: Endosperma da semente de *P. edulis* germinada no escuro, submetido a técnica de Azul do Nilo para a coloração de lipídios. Notar a diminuição no nível de lipídios também a partir de t6 (D). A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 100 μm.

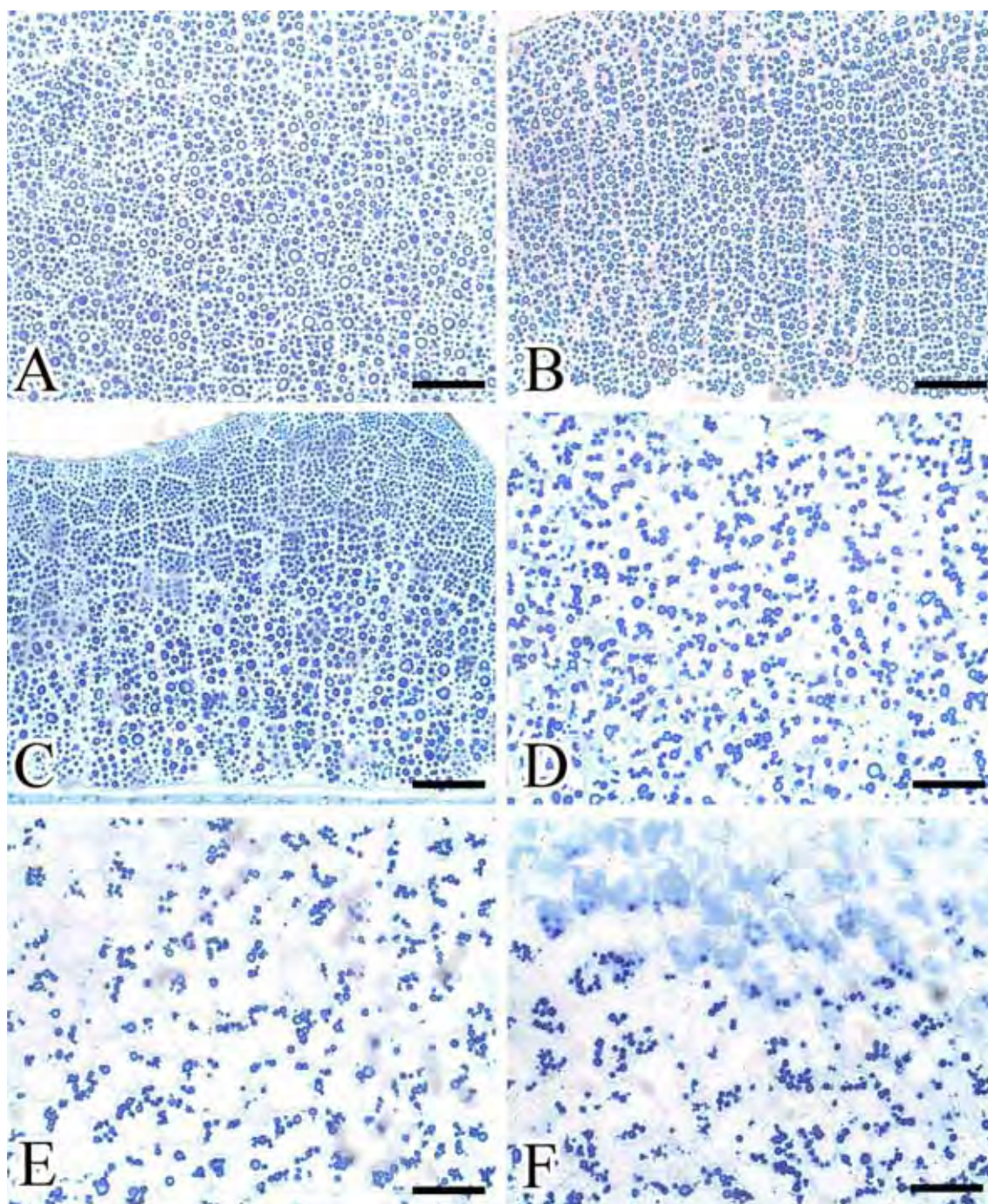


Figura 17: Endosperma da semente de *P. edulis* germinada no escuro, submetido a técnica de Azul de Bromofenol para a coloração de proteínas, evidenciando a presença de proteínas (oleosinas) ao redor dos corpos lipídicos. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 100 μ m.

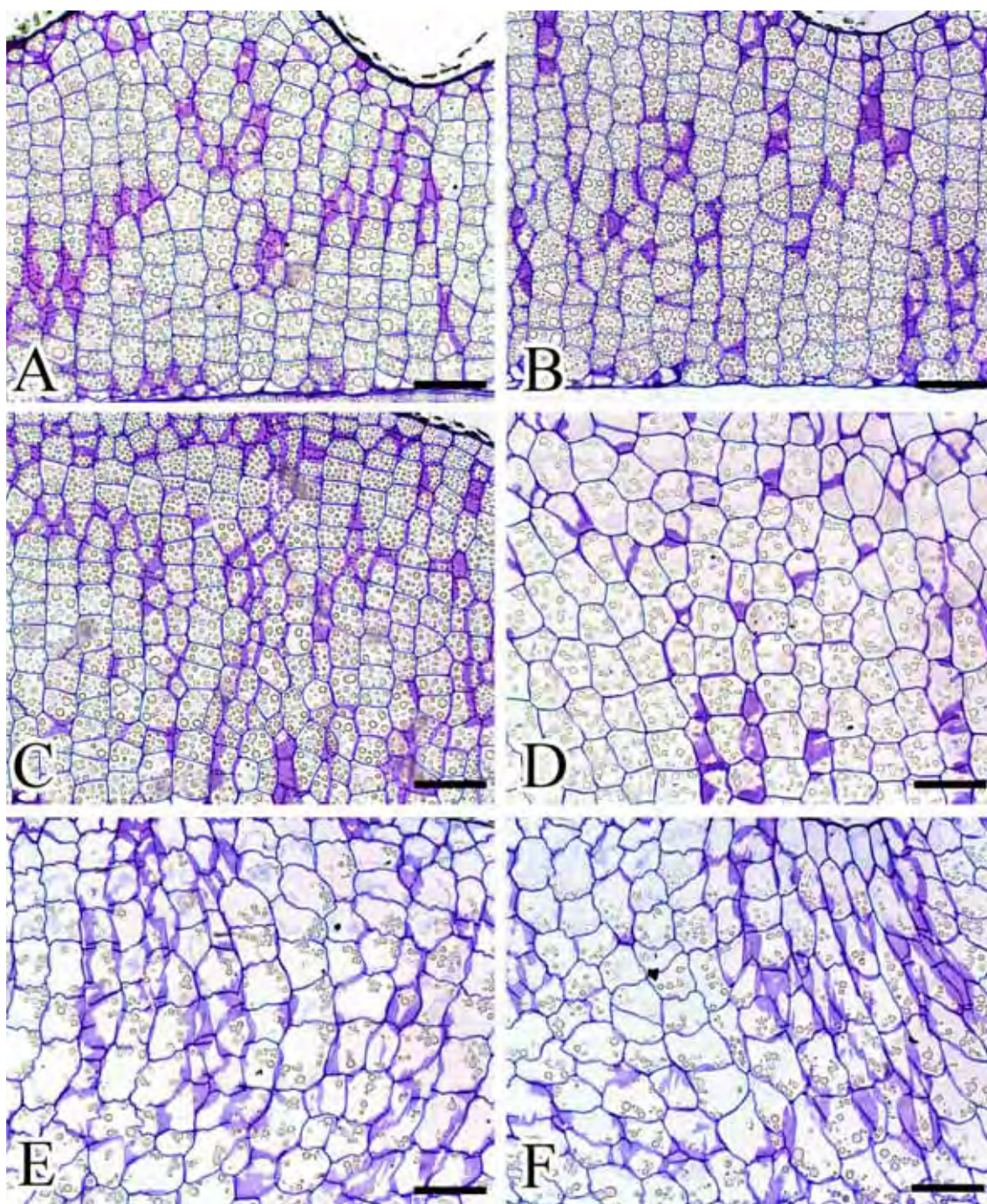


Figura 18: Endosperma da semente de *P. edulis* germinada no escuro, submetido a técnica de PAS para a coloração de carboidratos. O afrouxamento das paredes celulares é evidente nos tempos t8 e t10 (E-F) após o início da incubação. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 100 μm.

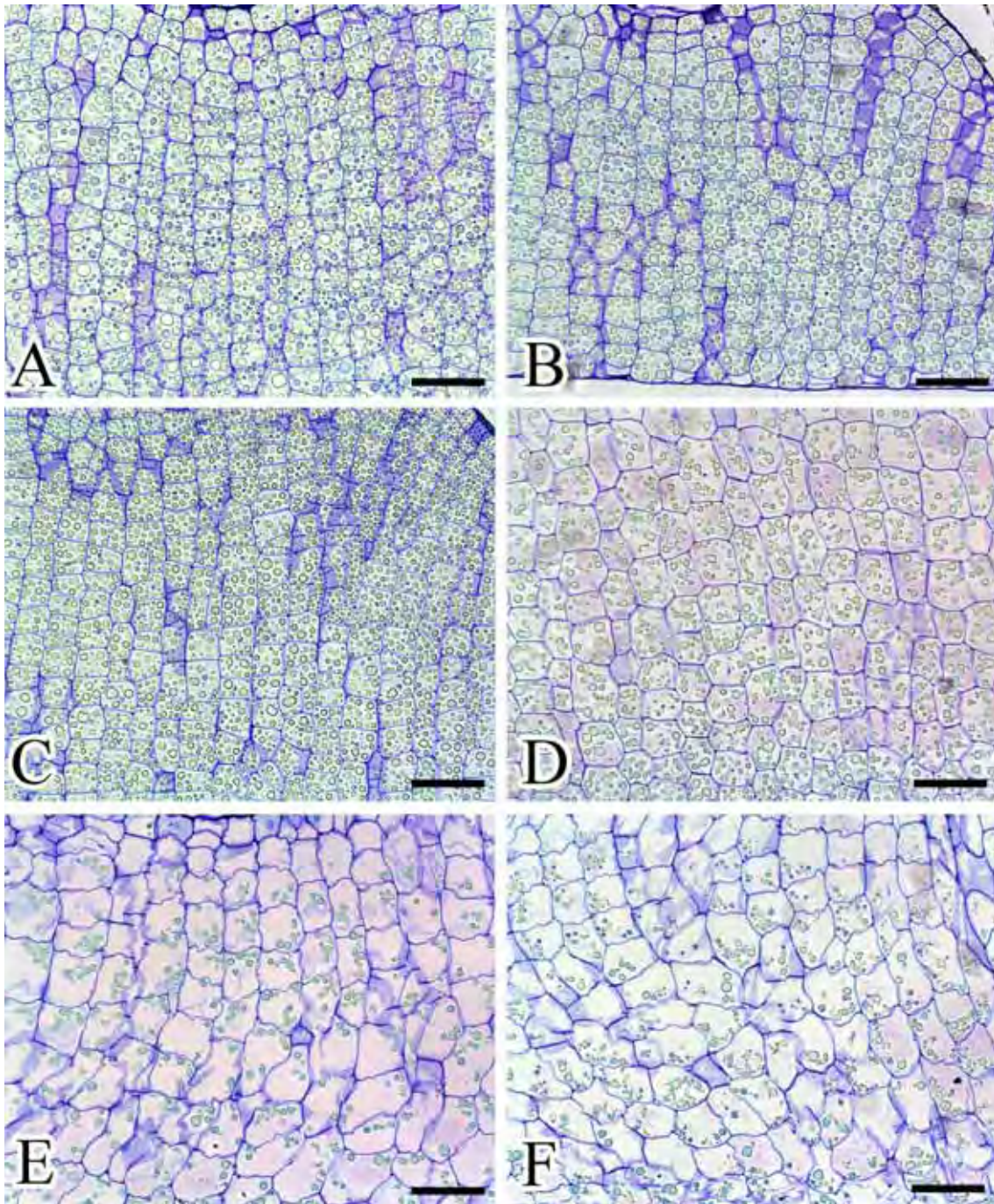


Figura 19: Endosperma da semente de *P. edulis* germinada no escuro, submetido a técnica de Azul de toluidina para a coloração de estruturas ácidas. O afrouxamento das paredes celulares também é evidente nos tempos tardios após a germinação (E-F). A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 100 μm .

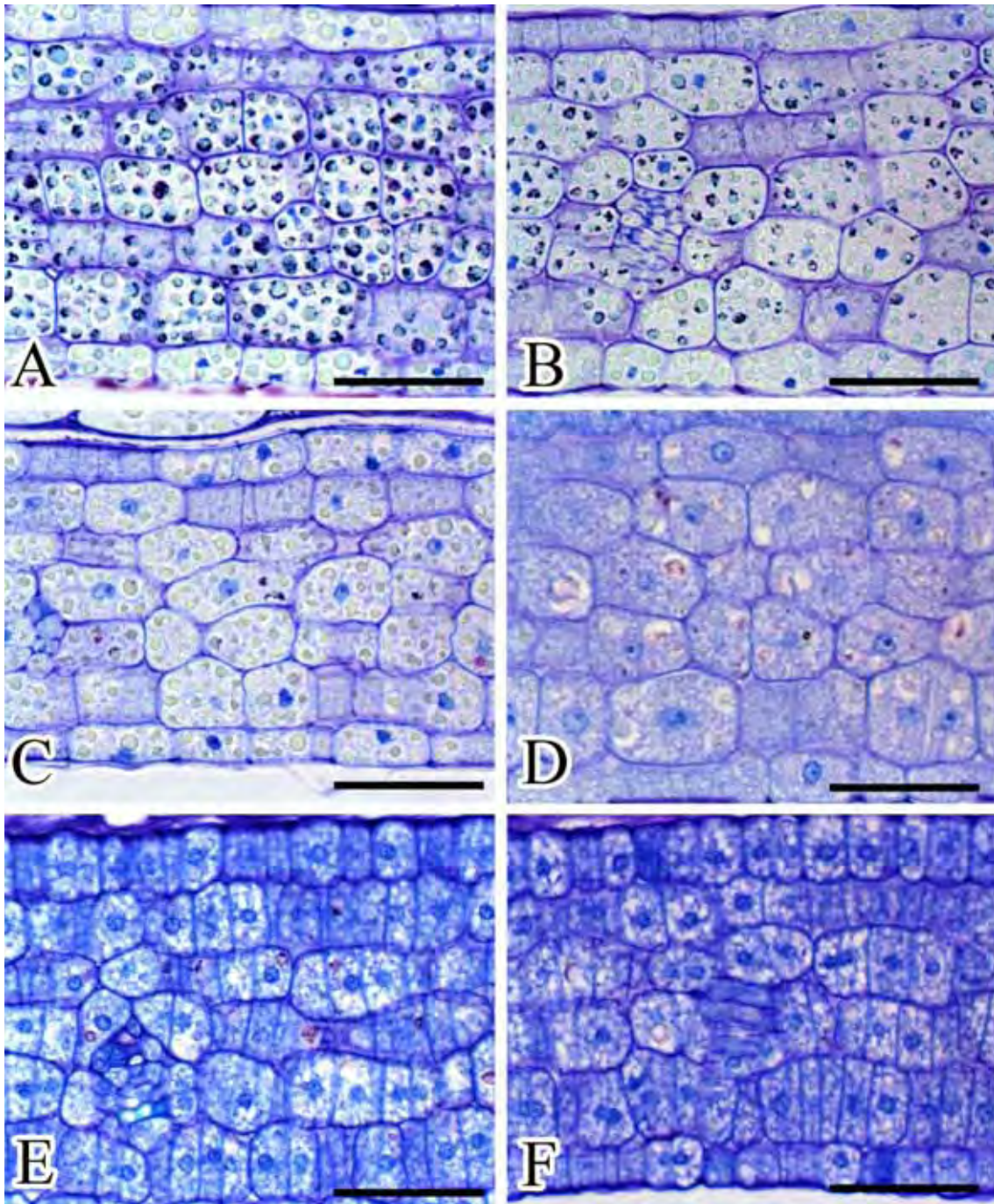


Figura 20: Cotilédones da semente de *P. edulis* germinada no escuro, corados pela técnica de azul de toluidina para a coloração de estruturas ácidas, permitindo observar a reestruturação do núcleo (A-D) e a mudança na intensidade de coloração do citoplasma (D-F). A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 50 μ m.

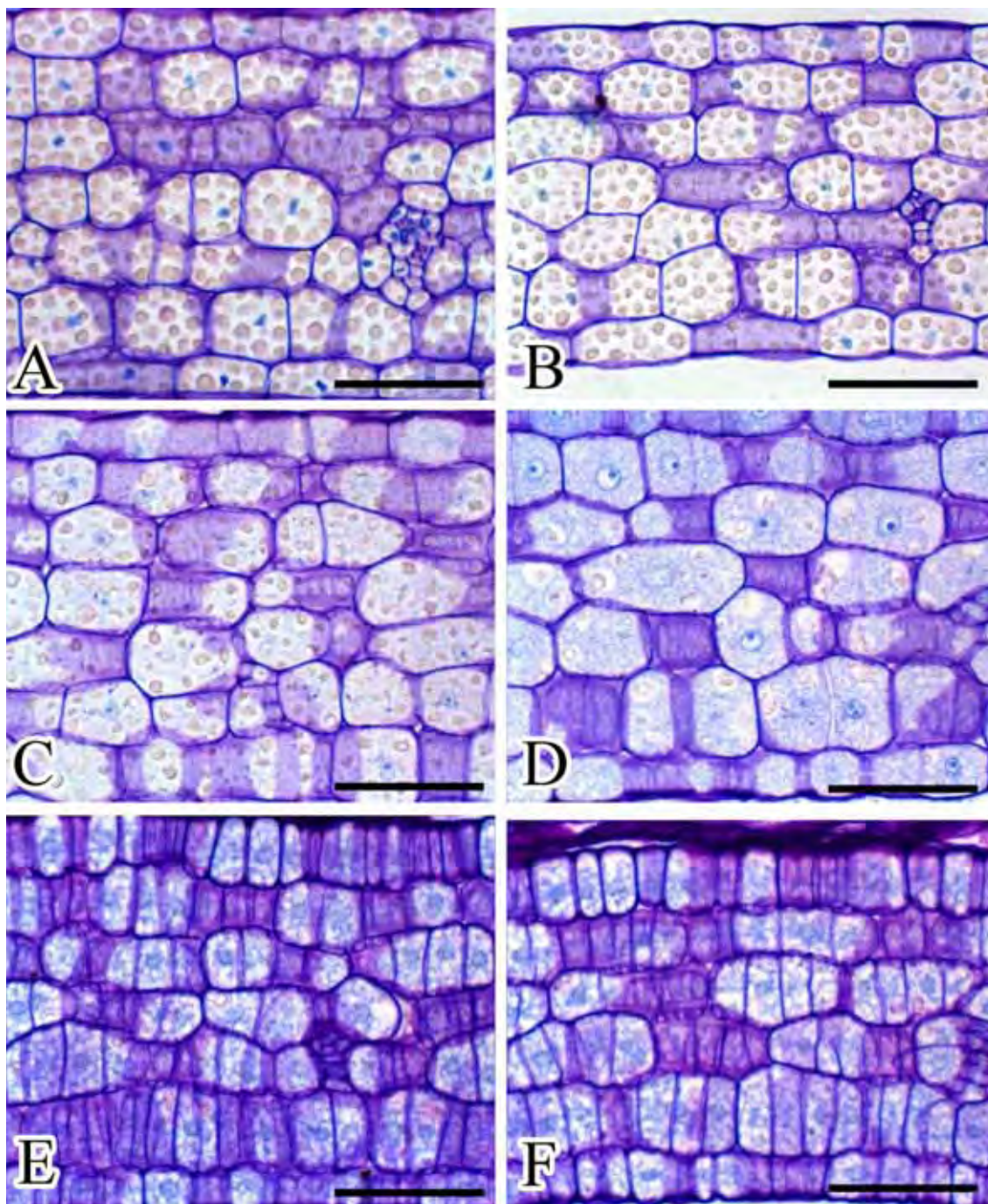


Figura 21: Cotilédones da semente de *P. edulis* germinada no escuro, corados pela técnica de PAS para a coloração de carboidratos, mostrando a mudança na intensidade de coloração do citoplasma(E-F). Nessas micrografias os grãos de amido não são observados. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10, a-amido. Escala = 50 μ m.

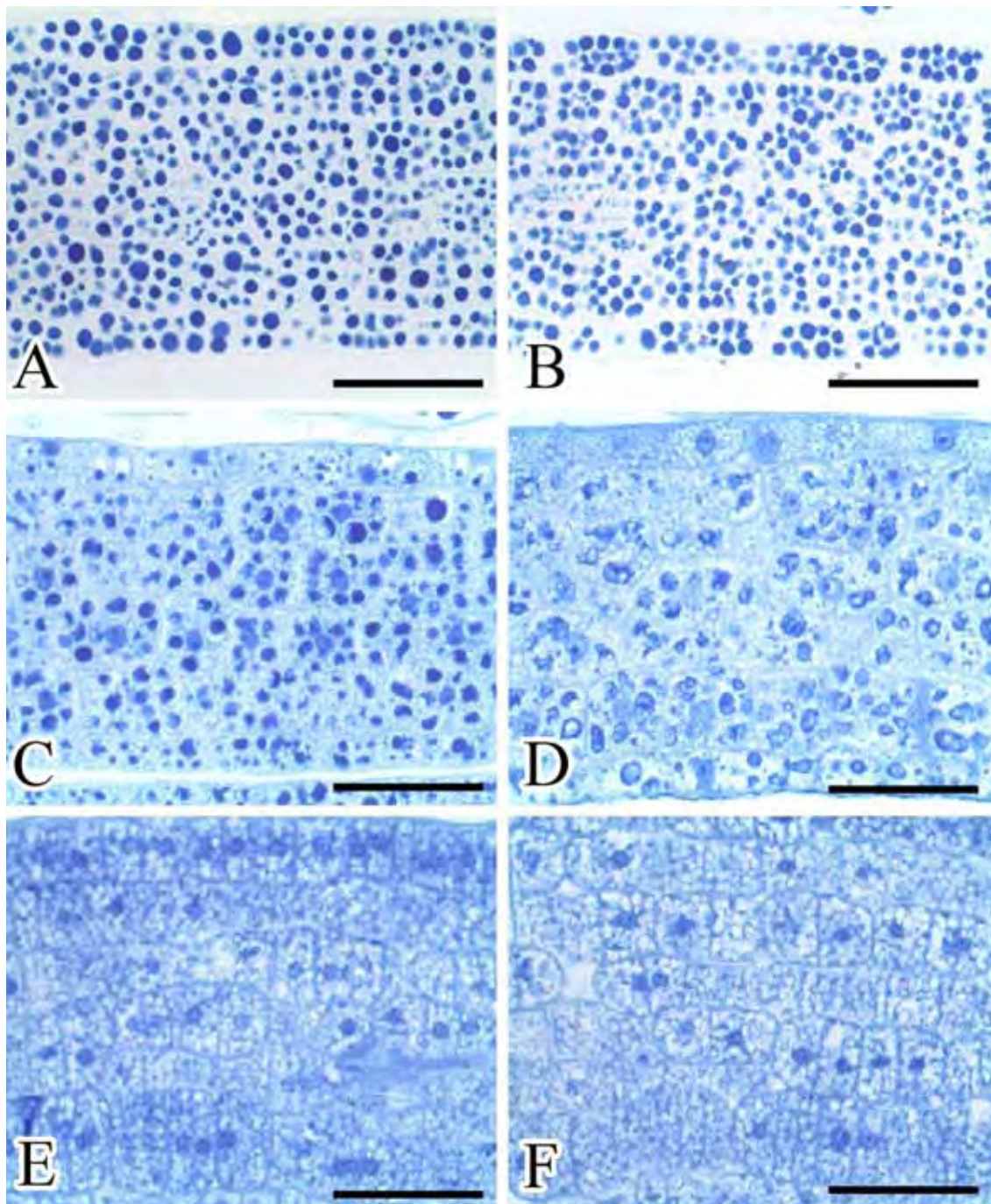


Figura 22: Cotilédones da semente de *P. edulis* germinada no escuro, corados pela técnica de azul de bromofenol para a coloração de proteínas. Os grânulos protéicos presentes no citosol (A-D) são completamente hidrolisados durante a germinação. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 50 μm .

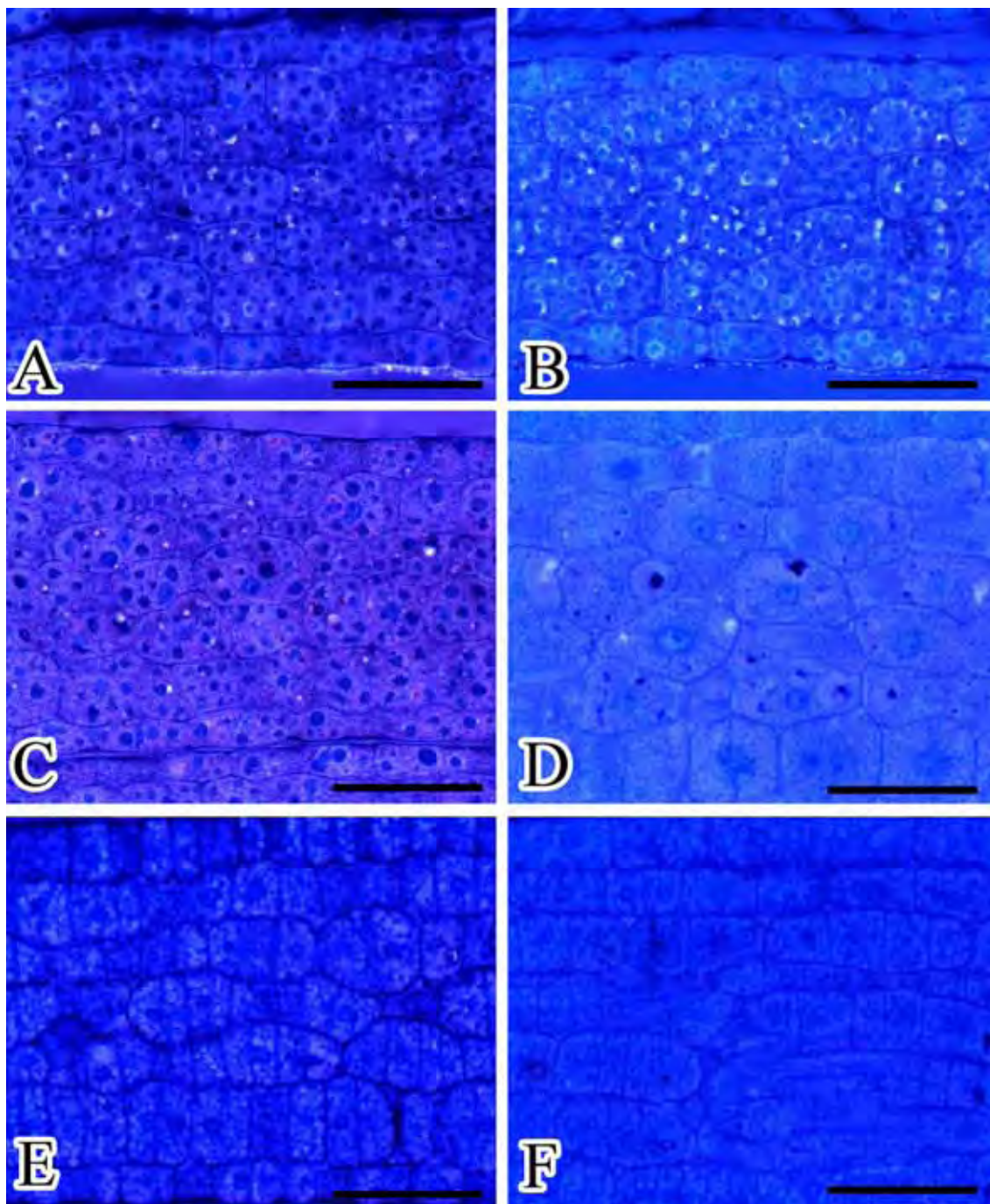


Figura 23: Cotilédones da semente de *P. edulis* germinada no escuro, corados pela técnica de azul do Nilo para coloração de lipídios. A-t0; B-t2; C-t4; D-t6; E-t8; F-t10. Escala = 50 μm.

DISCUSSÃO

Ficou evidente que a principal fonte de energia para a germinação da semente de *P. edulis* são os lipídios, tanto pelos resultados apresentados pela histoquímica quanto pela observação da sua diminuição apresentada pelas análises bioquímicas. A semente é caracterizada como oleaginosa em razão do seu endosperma rico em lipídios (CORNER, 1977), e a diminuição nos níveis desta reserva é semelhante ao de outras sementes oleaginosas, apesar de nem sempre seguir os mesmos padrões. Enquanto as sementes de *Euphorbia heterophylla* apresentaram uma diminuição nos níveis de lipídios ao redor de 70% entre 3 e 4 dias pós embebição (SUDA & GIORGINI, 2000), e sementes de *Arabidopsis thaliana* apresentaram diminuição de 65% no nível de lipídios após três dias e doze horas de germinação (MANSFIELD & BRIARTY, 1996), as sementes de *P. edulis* começaram a apresentar diminuição nos níveis de lipídios por volta do sexto dia de germinação.

Outras sementes também mantiveram os níveis de lipídios estáveis no início da germinação, só os consumindo em tempos mais avançados, como na semente de mamona (MUTO & BEEVERS, 1974), onde o conteúdo de lipídio se mantém até o terceiro dia de germinação, desaparecendo quase por completo até o sétimo dia, e em sementes de sibipiruna, *Caesalpinia peltophoroides* (CORTE et al., 2006; CORTE et al., 2008), com diminuição acentuada no nível de lipídios durante os primeiros dez dias de germinação, sendo consumidos até o vigésimo dia. Provavelmente, os lipídios presentes no endosperma podem servir como material de reserva para a síntese de carboidratos através do ciclo do glioxilato, já que nos cotilédones começa a aparecer uma resposta moderadamente positiva ao PAS próximo ao tempo onde o nível de lipídios começa a diminuir expressivamente (t6). Adicionalmente, pequenos grânulos de amido começam a aparecer nos tempos t8 e t10, coincidindo também com a diminuição

acentuada nos níveis de lipídios. Sabe-se que a degradação bioquímica de lipídios leva à formação de Acetil Co-A, levando em última instância à síntese de sacarose através da gluconeogênese, podendo ser armazenada na forma de amido quando os níveis deste açúcar no citosol são muito elevados (BUCKERIDGE et al., 2004; MANSFIELD & BRIARTY, 1996; SILVA, T.R.G. et al., 1998). O mesmo é sugerido no trabalho de Horner & Arnott (1966), onde sementes de *Yucca schidigera* mostraram um incremento em amido enquanto as reservas lipídicas eram consumidas, atribuindo o aumento nos níveis de amido à degradação dos triglicerídios em glicerol e ácidos graxos, e então convertidos em carboidrato, justificando a presença do amido. A hipótese para sustentar tal fato é que a degradação das reservas primárias seria maior do que a necessária para o desenvolvimento da plântula, e, portanto, para manter o equilíbrio osmótico, o excesso seria convertido em uma reserva “secundária”, no caso, o amido. Ademais, se observarmos o incremento nos níveis de polissacarídeos solúveis a quente do oitavo (t8) para o décimo dia (t10) (figura 2C), podemos inferir que este aumento é relacionado ao aparecimento de amido nos cotilédones, já que o amido é extraído por este procedimento. Muito provavelmente, o grande desvio padrão encontrado no t10 pode ser explicado pela variação biológica dentro de cada amostra, refletindo possíveis diferenças no consumo de lipídios, de carboidratos livres e na síntese de amido a partir dos carboidratos livres por cada semente. O menor incremento no tratamento de escuro contínuo pode ser devido a um consumo mais acelerado dos carboidratos livres, não deixando, portanto, grande excesso para ser utilizado para a síntese de amido.

Enquanto, no geral, a tendência dos lipídios totais foi em direção à diminuição, o nível de fosfolipídios aumentar consideravelmente pode ser correlacionável com o desenvolvimento da célula e o aumento no número de organelas, como mitocôndrias e glioxissomos (MARRIOTT & NORTHCOTE, 1975), assim como um aumento na área

total de membranas plasmáticas e de membranas intracelulares, servindo como material para a formação de sistemas de membranas especialmente do retículo endoplasmático (YOO, 1970). A manutenção no nível de esteróis, com o leve incremento no último dia também pode estar relacionado com o aumento nos fosfolipídios, e portanto com o aumento na área de membranas. É sugerido que esteróis estejam ligados à estabilização das membranas celulares (BUSH & GRUNWALD, 1972). No entanto, era de se esperar que o nível de triglicerídeos diminuísse acompanhando a diminuição no nível de lipídios totais, assim como observado em *Picea glauca* (CYR, D.R. et al., 1991) e em *Ricinus comunis* (MARRIOTT & NORTHCOTE, 1975), apesar de a proporção entre os triglicerídeos ter se mantido durante o período de germinação. Já os ácidos graxos mostraram uma diminuição durante a germinação na luz branca, porém quase não apareceram no escuro. É conhecido que durante a germinação não há acúmulo de ácidos graxos na semente, exceto em algumas espécies, como em *Elaeis guineensis*, onde há um acúmulo de ácidos graxos no endosperma durante a degradação dos corpos oleosos (BEWLEY & BLACK, 1994). A semente de maracujá, então, pode armazenar uma pequena quantidade de ácidos graxos germinando sob luz branca contínua, enquanto no escuro a degradação de ácidos graxos advindos da metabolização dos triglicerídeos deve ocorrer concomitantemente. Isso explicaria o fato de praticamente não haver manchas de ácidos graxos na cromatografia. Decerto, é difícil atestar que há uma diminuição ou aumento nos valores, uma vez que a cromatografia em camada delgada baseia-se somente em análises visuais, e portanto qualitativa, e uma análise quantitativa se mostra necessária.

A observação de que há uma diminuição um pouco mais acentuada no nível de lipídios das sementes germinadas no escuro do que nas germinadas sob luz branca contínua pode ter relação com a natureza energética da reserva. O fato de a semente

estar no escuro pode desencadear algum sinal para o consumo de suas reservas para um rápido estiolamento até conseguir alcançar alguma fonte de luz. Sementes de *Arabidopsis thaliana* que tiveram seus endospermas removidos e colocadas para germinar no escuro apresentaram um menor alongamento do hipocótilo e, portanto, demonstraram um papel essencial dos triglicerídeos do endosperma em fornecer energia para o seu estiolamento, enquanto sementes sem endosperma, porém com uma fonte de sacarose, conseguiram manter o desenvolvimento do hipocótilo normalmente (PENFIELD et al., 2004).

A marcação positiva ao redor das gotículas de lipídios pelo azul de bromofenol pode indicar a presença de oleosinas, proteínas entre 15 e 26 KDa aderidas à membrana de corpúsculos que armazenam triglicerídios, e que estão associadas à mobilização dos lipídios e à manutenção da estrutura do corpo lipídico durante a perda de água no amadurecimento das sementes (BUCKERIDGE et al., 2004, SOMERVILLE et al., 2000).

A diminuição nos açúcares livres observada durante o período pré-protrusão radicular pode ter relação com a ativação do metabolismo inicial da semente, fornecendo energia para a germinação antes que os processos iniciais de mobilização de reservas possam ocorrer (PRITCHARD et al., 2002). Já o seu aumento ao décimo dia de germinação pode ter relação com o início dos processos fotossintéticos, uma vez que os cotilédones já começaram a apresentar coloração esverdeada, em sementes germinadas sob luz branca contínua. O aumento nas sementes germinadas no escuro pode ser devido ao consumo da reserva lipídica em uma maior velocidade do que o necessário para a plântula, como discutido anteriormente.

É difícil afirmar que há mobilização de polissacarídeos de reserva de parede em *P. edulis*. Enquanto características histoquímicas demonstram que pode haver, como a

flacidez observada nas paredes celulares do endosperma nos tempos t8 e t10, não há indício da mobilização de carboidratos, já que não há alteração expressiva na intensidade de coloração pelo PAS ou pelo azul de toluidina, como também há um aumento nos níveis de polissacarídeos álcali-solúveis. Contudo, este aumento deve ser relacionado também ao crescimento do cotilédone e, por conseqüência, ao aumento nos níveis de polissacarídeos de parede celular, já que é observada divisão celular entre os dias t6 e t8. O trabalho de Horner & Arnott (1966) mostrou a diminuição na coloração pelo PAS conforme os dias de germinação, mencionando também a dissolução organizada da parede celular do perisperma próximo ao embrião. A perda da integridade da parede celular pode indicar também o início da senescência do endosperma, se separando dos cotilédones 15-20 dias após a sementeira (PEREIRA & ANDRADE, 1994).

A observação do formato irregular, empacotado dos núcleos nos tempos iniciais de germinação, assim como também observado por Yoo (1970), é um indicativo do baixo metabolismo da semente, e à medida que ocorre a embebição, ocorre a retomada do metabolismo celular (de CASTRO, BRADFORD & HILHORST, 2004), e boa parte dos estágios iniciais da germinação são voltados à reorganização e desenvolvimento de organelas já existentes e à síntese de novas (MANSFIELD & BRIARTY, 1996). A retomada do metabolismo pode ser comprovada, além da observação da germinação *in situ*, pela tonalidade do citoplasma na técnica do Azul de Toluidina, que reage com compostos de caráter ácido (PEARSE, 1985) que, por sua vez, podem indicar a presença de mRNAs, além da constatação da recuperação do formato tradicional do núcleo. A síntese de novos mRNAs ocorre enquanto a germinação prossegue, codificando proteínas essenciais para o metabolismo normal da célula e manutenção do crescimento da plântula (BEWLEY, 1997).

A reação positiva dos grânulos citoplasmáticos com o azul de bromofenol sugere uma natureza protéica a esses grânulos, muito provavelmente ácida, já que também há regiões dos grânulos coradas pelo azul de toluidina. O desaparecimento dos grânulos e a posterior coloração intensa do citoplasma sugere que há a degradação desses corpos protéicos em porções menores, o que pode ser corroborado pelos testes eletroforéticos apresentados. Semelhança foi observada em sementes de *Prosopis juliflora*, onde os corpos protéicos em formato globular são hidrolisados e apresentaram-se mais solúveis (GALLÃO et al., 2007). Evento similar foi observado por Corte et al. (2008), com a mobilização de proteínas pelas sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Entretanto, a autora relata que há um aumento no invólucro do corpo protéico precedendo a degradação do seu conteúdo, que fica confinado a um pequeno espaço, enquanto o mesmo não é observado da mesma maneira em nosso material. No entanto, observa-se nos tempos t8 e t10 sinais de vacuolização no citoplasma, em decorrência da utilização desse material de reserva, assim como observado por Mansfield & Briarty (1996). A baixa vacuolização observada em nossos resultados indica que provavelmente a mobilização de proteínas é mais lenta nos dez primeiros dias, ocorrendo somente após o período abordado. Outra hipótese seria que, de acordo com Buckeridge et al. (2004), essa vacuolização leva ao acúmulo, em seu interior, de hidrolases que levam em um último evento à digestão celular e à degeneração dos cotilédones, o que não ocorre em *P. edulis*.

Essa degradação dos corpos protéicos presentes nos cotilédones pode estar diretamente ligada ao aumento na quantidade de proteínas solúveis observado durante a germinação. Os corpos protéicos (presumidamente insolúveis) são hidrolisados em porções menores, e assim, se tornam solúveis e passíveis de extração pela metodologia utilizada. O mesmo foi observado nos trabalhos de Gallão (2007) e Silva (1998).

Contudo, a síntese protéica iniciada após a retomada do metabolismo da semente não deve ser descartada como motivo para o incremento de proteínas solúveis, pois segundo Kornberg & Beevers (1957) a degradação de lipídios e carboidratos durante a germinação é um processo cujo propósito essencial é fornecer energia para a síntese protéica durante o crescimento da planta. E da mesma maneira como acontece no presente trabalho, Chandrasiri et al. (1987) *apud* Bau (1997) observaram um decréscimo rápido no conteúdo lipídico de sementes de soja, enquanto o nível de proteínas aumentava gradativamente. Adicionalmente, a síntese de enzimas *de novo* também não pode ser descartada como razão para o aumento substancial no nível de proteínas solúveis totais, uma vez que processos como a mobilização de lipídios é dependente da síntese *de novo* das enzimas isocitrato-liase e malato-sintase após o início do processo germinativo (MARTINS et al., 2000), também podendo citar exemplos como os das enzimas endo- β -mananase e α -galactosidase, responsáveis pela degradação de polissacarídeos de reserva de parede celular (BUCKERIDGE et al., 2000), peroxidase, responsável, entre outras funções, pela oxidação de fenóis, defesa de patógenos e na regulação na alongação das células (CAMPOS et al., 2004) e α -amilase, responsável pela degradação do amido (ARAGÃO, 2003).

CONCLUSÕES

Concluimos que a principal reserva utilizada na germinação da semente de *P. edulis* é lipídica, com seus níveis apresentando queda a partir do 6º dia após o início da embebição. Variações nos níveis de proteínas solúveis totais, com tendência ao aumento, também foram observadas, podendo ser em razão da hidrólise dos corpos protéicos presentes nos cotilédones, aumentando a solubilidade dos mesmos, como também não pode ser descartada a síntese de novas proteínas e de enzimas *de novo*. Os níveis de carboidratos livres mostraram queda até o oitavo dia, apresentando um incremento ao décimo, possivelmente em razão da rápida degradação dos lipídios. Há o aparecimento de amido a partir do oitavo dia após o início da embebição, provavelmente com função de reserva secundária.

BIBLIOGRAFIA

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. Instituto FNP, São Paulo, pp. 371-376, 2009.

ALEXANDRE, R.S.; JÚNIOR, A.W.; NEGREIROS, J.R.S.; PARIZZOTTO, A.; BRUCKNER, C.H. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesq. Agropec. bras.**, Brasília, v. 39, n.12, p.1239-1245, 2004.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese e Marcadores Bioquímicos em plantas e microorganismos**. Viçosa, UFV, 2006, 627 p.

ARAGÃO, C.A.; DANTAS, B.F.; ALVES, E.; CAETANO, A.C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, pp. 43-48, 2003.

BAU, H.M.; VILLAUME, C.; NICOLAS, J.P.; MÉJEAN, L. Effect of Germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. **J. Sci. Food Agric.** 73, p. 1-9, 1997.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canada Journal of Biochemical Physiology**, 37, 911-917, 1959.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BEWLEY, J.D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, v.9, pp. 1055-1066, 1997.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds – Physiology of Development and Germination**. New York, Plenum Press, 1994, 445 p.

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P. dos; TINÉ, M.A.S. Acúmulo de Reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: Do Básico ao Aplicado**, ARTMED, Porto Alegre, pp. 31-50, 2004a.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P. dos; TINÉ, M.A.S. Mobilization of Storage Cell Wall Polysaccharides in seeds. **Plant Physiol. Biochem.** 38 (1/2) pp. 141-156, 2000.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P. dos; TINÉ, M.A.S.; AIDAR, M.P.M. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: Do Básico ao Aplicado**, ARTMED, Porto Alegre, pp. 163-188, 2004b.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P.; LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.12, pp. 137-162, 2000.

BUSH, P.B.; GRUNWALD, C. Sterol changes during germination of *Nicotiniana tabacum* seeds. **Plant Physiol.**, v. 50, pp. 69-72, 1972.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência de feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, pp-637-643, 2004.

CARDOSO, V.J.M. Germinação. In: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 384-408, 2008.

CARVALHO, J.E.U.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. FUNEP, Jaboticabal, 2000.

CASTRO, R.D. de; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do Básico ao Aplicado**. Artmed, Porto Alegre, pp. 149-162, 2004.

CERVI, A.C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do Gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **FontQueria**, Madrid, v. 45, p. 42-45, 1997

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Principles of Seed Science and Technology**, Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2001, 467p.

CORNER, E.J.H. **The Seeds of Dicotyledons**, Volume I, Cambridge University Press, Cambridge, 1976, 284 pp.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, pp. 941-949, 2006.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; VENTRELLA, M. C.; LEITE, I. T. A. L.; BRAGA, A. J. T. Histochemical Aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. **Revista Árvore**, v. 32, n.4, pp. 641-650, 2008.

CYR, D.R.; WEBSTER, F.B.; ROBERTS, D.R. Biochemical events during germination and early growth of somatic embryos and seed of interior spruce (*Picea glauca engelmanni* complex). **Seed Science Research**, v. 1, pp. 91-97, 1991.

DATHAN, A.S.R.; SINGH, D. Development and structure of seed in *Tacsonia* Juss. and *Passiflora* L. **Proceedings: Plant Sciences**, V. 77, n.1, p. 5-18, 1973.

DEVEN, J.M.; MANOCHA, M.S. The Effect of Glutamic Acid on the Fatty Acid and Lipid Composition in *Choanephora cucurbitarum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, pp. 1827-1833, 1975.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, 350-356, 1956.

FERREIRA, G. Propagação do Maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 206, pp. 18-24, 2000.

GALLÃO, M.I; VIEIRA, I.G.P, MENDES, F.N.P.; SOUZA, A.S.N de; BRITO, E.S. de. Reserve mobilization in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). **J. Sci. Food Agric.**, v.87, 2012-2018, 2007.

GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de Sementes** - produção e tecnologia de sementes. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999, 129p.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. (Ed.) **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2^{ed}. IRL Press, p. 73-85. 1990.

HAWES, C.R.; SATIAT-JEUNEMAITRE, B. **Plant Cell Biology: A practical approach**. Oxford university press, Oxford. 2001, 338 p.

HELDT, H.W. **Plant Biochemistry**, Elsevier, San Diego, 2005, 630 p.

HORNER, H.T., Jr.; ARNOTT, H.J. A Histochemical and Ultrastructural Study of Pre- and Post-Germinated *Yucca* Seeds. **Botanical Gazette**, v. 127, n.1, pp.48-64, 1966.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**, McGraw-Hill Book Company, New York, 1940, 523 p.

KORNBERG, H.L.; BEEVERS, H. The Glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrates in castor bean. **Biochim. Biophys Acta.**, v.26, n.3, p. 531-537, 1957.

MANICA, I. Importância econômica. In: _____. **Fruticultura Tropical - Maracujá**. Ceres, São Paulo. pp.1-17, 1981.

MANSFIELD, G.; BRIARTY, L.G. The Dynamics of Seedling and Cotyledon Cell Development in *Arabidopsis thaliana* During Reserve Mobilization. **Intl. J. Plant Sci.**, v. 157, n.3, pp. 280-295, 1996.

MATHESON, N.K.; SAINI, H.S. Polysaccharide and Oligosaccharide Changes in Germinating Lupin Cotyledons. **Phytochemistry**, v. 16, pp. 59-66, 1977.

MARRIOTT, K.M.; NORTHCOTE, D.H. The breakdown of lipid reserves in the endosperm of germinating castor beans. **Biochem. J.** v. 148, pp. 139-144, 1975.

MARTINS, C.A.O.; SEDIYAMA, C.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A.; REIS, M.S.; ROCHA, V.S. Atividade da Isocitrato-Liase durante a germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, PP.42-46, 2000.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The Germination of Seeds**, Pergamon Press, New York, 1989, 270 p.

MELETTI, L. M. M.; MAIA, M. L. **Maracujá: Produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999, 62p.

MORTON, J. F. Passionfruit. In: _____. **Fruits of Warm Climates**, Creative Resource Systems, Miami, pp. 320-328, 1987.

MÜNTZ, K. Deposition of Storage Proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 38, pp. 77-99, 1998.

MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored Proteinases and the Initiation of Storage Protein Mobilization During Germination and Seedling Growth. **Journal of Experimental Botany**, V. 52, n. 362, pp. 1741, 1752, 2001.

MUTO, S.; BEEVERS, H. Lipase activities in Castor Bean endosperm during germination. **Plant Physiol.** 54, pp. 23-28, 1974.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry Theoretical and Applied, Volume two: Analytical technology**. Churchill Livingstone, New York, 1985, 1055 p.

PENFIELD, S.; RYLLOTT, E.L.; GILDAY, A.D.; GRAHAM, S.; LARSON, T.R.; GRAHAM, I.A. Reserve Mobilization in the Arabidopsis Endosperm Fuels Hypocotyl Elongation in the Dark, is Independent of Abscisic Acid, and Requires Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1. **The Plant Cell**, v. 16, pp. 2705-2718, 2004.

PEREIRA, T.S.; ANDRADE, A.C.S. de. Germinação de *Psidium guajava* L. e *Passiflora edulis* SIMS – Efeito da Temperatura, Substrato e Morfologia do Desenvolvimento Pós-Seminal. **Revista Brasileira de Sementes**, v.16, n.1, pp. 58-62, 1994.

PONTES, M.A.N. Estudos dos subprodutos do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.): III. Obtenção do óleo e da torta. **Boletim do CEPPA**, v.7, n.1, p.23-321, 1989.

PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, I.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. **The Plant Journal** v.31, n.5, p. 639-647, 2002.

RAJU, M. V. S. Embriology of the Passifloraceae. I. Gametogenesis and Seed Development of *Passiflora calcarata* Mast. **Journal of the Indian Botanical Society**, 35, 126-138, 1955.

SANTOS, C.M.; SOUZA, G.R.L.; SILVA, J.R.; SANTOS, V.L.M. Efeitos da temperatura e do substrato na germinação da semente do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 21, nº 1, p. 1-6, 1999.

SILVA, A. M., 2004. Germinação de Sementes de Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) em diferentes temperaturas e substratos. Dissertação (mestrado em ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 24p.

SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L.; DIETRICH, S.M.C. Variation in Storage Compounds during Germination and Early Plantlet Growth of *Dalbergia miscolobium*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.10, n.2, pp. 119-124, 1998.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J.; JAWORSKI, J.G.; OHLROGGE, J.B. Lipids. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.), **Biochemistry and molecular biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 456-527, 2000.

SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F. Seed Reserve Composition and Mobilization During Germination and Initial Seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal*, v. 12, n. 3, p.226-245, 2000.

TAKAKI, M. New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.13, n.1, pp. 104-108, 2001.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C. Effect of GA₃ and Light on Polysaccharide Levels and Metabolism in Germinating Coffee Seeds. **Journal of Experimental Botany** vol. 31, n. 125, pp.1643-1649, 1980.

TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. **Annals of Botany** v. 74, pp. 541-546, 1994.

YOO, B.Y. Ultrastructural Changes in Cells of Pea Embryo Radicles during Germination. **J. Cell Biol.**, v.45, pp.158-171, 1970.