UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

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

A SEMENTE DE *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg. (MARACUJÁ-AMARELO) DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DA PLÂNTULA: A DINÂMICA DE LIPÍDIOS, CARBOIDRATOS E CLOROPLASTOS, E SUA RELEVÂNCIA NESSE PERÍODO

HENRIQUE HESPANHOL TOZZI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Rio Claro, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas – Biologia Vegetal.

RIO CLARO
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Doutorando: Henrique Hespanhol Tozzi

Orientador: Massanori Takaki

A SEMENTE DE *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg. (MARACUJÁ-AMARELO) DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DA PLÂNTULA: A DINÂMICA DE LIPÍDIOS, CARBOIDRATOS E CLOROPLASTOS, E SUA RELEVÂNCIA NESSE PERÍODO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Rio Claro, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas – Biologia Vegetal.

RIO CLARO

2014

581.1 Tozzi, Henrique Hespanhol
T757s A semente de Passiflora edulis Sims f. flavicarpa O. Deg. (maracujá-amarelo) durante a germinação e crescimento inicial da plântula : a dinâmica de lipídios, carboidratos e cloroplastos, e sua relevância nesse período. / Henrique Hespanhol Tozzi. - Rio Claro, 2014
79 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Fisiologia vegetal. 2. Germinação de sementes. 3. Mobilização de reservas. 4. Cloroplastos. 5. Ultra-estrutura. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: A SEMENTE DE Passiflora edulis Sims f. flavicarpa O. Deg. (MARACUJÁ-AMARELO) DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DA PLANTULA: A DINÂMICA DE LIPÍDIOS, CARBOIDRATOS E CLOROPLASTOS, E SUA RELEVANCIA NESSE PERÍODO

AUTOR: HENRIQUE HESPANHOL TOZZI

ORIENTADOR: Prof. Dr. MASSANORI TAKAKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL) , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MASSANORI TAKAKI
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro/UNESP

Prof. Dr. VICTOR JOSÉ MENDES CARDOSO
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro/UNESP

Profa. Dra. ADELITA APARECIDA SARTORI PAOLI
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro/UNESP

Prof. Dr. FÁBIO SOCOLOWSKI
Universidade Federal do Vale do São Francisco - Campus Ciências Agrárias

Prof. Dr. MARCÍLIO DE ALMEIDA
Departamento de Ciências Biológicas - ESALQ/USP/Piracicaba

Data da realização: 29 de setembro de 2014.

“Duas possibilidades existem: ou estamos sozinhos no universo, ou não estamos. Ambas são igualmente assustadoras.”

- Arthur C. Clarke

“*We choose to go to the moon in this decade and do the other things, not because they are easy, but because they are hard.*”

- John F. Kennedy

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador Dr. Massanori Takaki, por aceitar novamente a tarefa de me orientar durante 4 anos, por todo o companheirismo e amizade, por todo o auxílio, sugestões e pelo conhecimento compartilhado.

À CAPES e CNPq, por todo o apoio financeiro que sustentou esse projeto.

À professora Dra. Marília Gaspar, por gentilmente ceder um espaço no laboratório de carboidratos “Sônia Machado de Campos Dietrich” para a realização da análise de carboidratos deste trabalho, bem como à M.Sc. Juliana Zerlin, por todo o auxílio e amizade durante esse período.

Aos professores Dr. Maurício Bacci Jr. e Dr. Odair Corrêa Bueno, por gentilmente ceder espaço em seus respectivos laboratórios. E à Sebastião Zanão, pelo auxílio na cromatografia gasosa e grande amizade.

Ao professor Dr. Flávio Henrique Caetano e à professora Dra. Maira Izabel Camargo Mathias, pela disponibilidade do laboratório de microscopia eletrônica. Aos técnicos Antônio Yabuki e Mônika Iamonte, por todo o auxílio, e à Pablo Henrique Nunes, por todo o auxílio, apoio e amizade.

Aos amigos do Jardim Experimental da UNESP-RC, pela experiência trocada e pelo excelente convívio no dia a dia: Eduardo, Anna, Lorena, Otávia e Luís Felipe.

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

Um agradecimento especial aos professores do Depto. de Botânica, por toda a amizade e influência compartilhada todos estes anos, e em especial ao Dr. Victor José Mendes Cardos e Dr. Reinaldo Monteiro. Um agradecimento também especial ao Dr. Gustavo Habermann, principalmente por valorizar a boa ciência, assim como por manter viva não só a memória dos grandes cientistas, mas também as suas contribuições que ajudaram a moldar a sociedade na qual vivemos hoje. “Se eu vi além, é porque estava sobre o ombro de Gigantes”.

À minha namorada Isabela Amorim, pelo apoio, cumplicidade e companheirismo, e pelo suporte emocional durante esse tempo de trabalho. Por sempre me fazer querer ser uma pessoa melhor e mais completa, seja no âmbito profissional ou pessoal.

Aos grandes amigos Nelore, Rodrigo, Remedio (Juliano– mudou de faculdade), Vinícius e as amigas Dé, Bia, Júlia e Gabi, por tudo o que vocês representam e representarão na minha vida e por todas as outras coisas que continuarei lembrando durante muito tempo, e que não dá para colocar no papel.

À República Nemelés e a todos os seus integrantes e agregados durante todos esses anos: Fellipe Chaves, Carlos “Pássaro”, Alexandre “Shao”, Rafael “Gandhi”, Paulo, Laura, Rebeca, Raíssa, Cláudia, Danilo “Jesus”, Thales, Igor, Danilo “Cearense”, Paola e Pedro. A todos vocês que sempre formarão a Rep. Nemelés, meus sinceros agradecimentos por todo esse tempo juntos, e por tornarem a minha estada em Rio Claro extremamente agradável e prazerosa.

Aos meus amigos de Americana, por toda a amizade ao longo destes anos. Aos de São Paulo também, e que agora estão mais próximos.

Aos amigos Emerson, Renan, Jorge, Djanira e Jéssica da Além Mar Comercial e Industrial S.A.

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

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

À minha 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, Felipe e Del, por terem trazido todo o barulho e movimento que uma casa precisa, por todo o companheirismo, conversas e diversão.

Aos irmãos da Família Hu, em especial ao meu Mestre Ronaldo Schols, pelas técnicas compartilhadas e por participar ativamente na minha melhora pessoal.

E finalmente, a você, que está lendo o fruto de um trabalho de quatro anos...

Meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO 7

ABSTRACT 8

INTRODUÇÃO 9

MATERIAIS E MÉTODOS 16

Obtenção e beneficiamento das sementes 16

Condições de germinação para as análises 16

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 17

Microscopia Confocal 17

Análise de ácidos Graxos 17

- Extração 18

- Derivatização 18

- Análise em cromatografia líquida gasosa e detecção por espectrometria de massa 18

Análise qualitativa dos carboidratos solúveis 19

Massa seca de endospermas e cotilédones ao longo da germinação e crescimento inicial 19

Análise de crescimento em casa de vegetação, fluorescência e trocas gasosas 20

Análise estatística 21

RESULTADOS 22

Germinação das sementes 22

Microscopia Eletrônica – Consumo de reservas 22

Microscopia Eletrônica –Observação de Cloroplastos 31

- Endosperma 31

- Cotilédones 31

Microscopia Confocal 34

- Endosperma 34

- Cotilédones 34

Análise de Ácidos Graxos 40

- Ácidos Graxos no Endosperma 40

- Consumo de ácidos Graxos no Endosperma 40

- Ácidos graxos nos cotilédones 40

- Consumo de ácidos graxos nos cotilédones 40

Análise de Açúcares 42

- Endosperma 42

- Cotilédones 44

Massa seca de endospermas e cotilédones ao longo da germinação e crescimento inicial 47

Análise do crescimento em casa de vegetação 49

- Massa Seca Folhas, raízes e caule 49

- Área Foliar e área foliar específica 50

- Assimilação de CO_2 e Área foliar específica x Assimilação de CO_2 50

- Eficiência Quântica Potencial e Eficiência Quântica Efetiva 52

- Fração da luz utilizada no PSII, calor dissipado no complexo antena e calor dissipado no centro de reação 53

DISCUSSÃO 55

Microscopia eletrônica – consumo de reservas 55

Mobilização de ácidos graxos 57

Microscopia Eletrônica e Microscopia Confocal – Observação de Cloroplastos 59

Massa seca de endospermas e cotilédones ao longo da germinação e crescimento inicial 63

Análise do Crescimento em Casa de Vegetação 63

Análise de Açúcares Livres 66

CONCLUSÕES 70

BIBLIOGRAFIA 71

RESUMO

O estudo da mobilização de reservas em *Passiflora edulis* é de grande importância para o conhecimento da fisiologia da germinação da espécie, e esse conhecimento pode abrir caminhos para novas aplicações científicas e econômicas. Nossos experimentos mostraram a mobilização de reservas da semente através da microscopia eletrônica de transmissão, onde observamos a disposição dos corpos lipídicos, o consumo dos corpos proteicos e posterior formação do vacúolo no endosperma, e indícios da retomada do metabolismo com a mudança de formato do núcleo. Também realizamos a análise dos ácidos graxos durante a germinação, verificando que há diferenças na mobilização de ácidos graxos entre os tratamentos de luz branca contínua e escuro, no endosperma, enquanto nos cotilédones, não há diferenças significativas entre os dois tratamentos, sugerindo que as diferenças no padrão da mobilização de reservas no endosperma pode ter papel importante para a manutenção dos cotilédones em estágios similares de desenvolvimento tanto na luz quanto no escuro. A análise de açúcares mostrou um consumo errático para alguns açúcares no endosperma, mostrando ciclos de incremento/utilização tanto sob luz branca quanto no escuro, ao passo que nos cotilédones o consumo foi mais linear, com pouca variação nos primeiros dias após a semeadura (DAS) seguido de um aumento nas médias por volta de 8 a 10 DAS. Também observamos a presença de cloroplastos no endosperma de sementes germinadas sob luz branca contínua e nos cotilédones tanto de sementes germinadas sob luz branca contínua quanto no escuro. O fato de haver cloroplastos no endosperma de sementes ortodoxas ainda não foi relatado na literatura, e análises para averiguar sua morfologia e similaridade com cloroplastos capazes de realizar fotossíntese, bem como a importância da sua presença no endosperma, são de grande relevância. Também procuramos mostrar o papel do endosperma no crescimento inicial da plântula, e possíveis diferenças no seu crescimento e desenvolvimento durante os primeiros dias de estabelecimento. Estas diferenças podem ser explicadas não somente pela condição luminosa à qual a semente é exposta ou a qualidade das suas reservas, mas também pela presença de cloroplastos no endosperma durante os tempos iniciais de germinação.

Palavras-Chave: Germinação de sementes, mobilização de reservas, cloroplastos, ultra-estrutura.

ABSTRACT

Seed reserve mobilization in *Passiflora edulis* fruit is of great importance to the knowledge of this species seed germination, and this knowledge can open new ways for scientific and economic applications. Our experiments showed seed reserve mobilization through transmission electron microscopy, where we observed the disposition of the lipid bodies, protein bodies consumption and subsequent vacuole formation, and evidence of metabolism resumption with changes in nuclei format. We also analyzed free fatty acids during germination, verifying that there are differences in fatty acid mobilization between the continuous light and darkness treatments, in the endosperm. In the cotyledons, there are no significant differences between the two treatments, suggesting that the differences in the patterns of reserve mobilization may have an important role in maintaining the cotyledons in the same developmental stage in continuous light as well as in darkness. Free sugar analysis showed an erratic consumption pattern for some sugars in the endosperm, presenting increment/mobilization cycles in continuous light as well as continuous darkness, whereas in the cotyledons, with little to no variation in the first days after sowing (DAS) followed by an increase in averages at 8 and 10 DAS. We also observed the presence of chloroplasts in the endosperm of seeds germinated under continuous white light, and in the cotyledons of seeds germinated under continuous white light and continuous darkness. The endosperm of an orthodox seed having chloroplasts is still not reported in the literature, and analysis to verify their morphology and similarity to photosynthesizing chloroplasts, as well as its importance in the endosperm, are of great relevance. We also tried to show the endosperm role in the plant initial development, and possible differences in plant growth and development during the initial days of establishment. These differences can be explained not only by the light conditions the seed is exposed to or the quality of its reserves, but also by the presence of chloroplasts in the endosperm during the initial days of germination.

Key Words: Seed Germination, reserve mobilization, chloroplasts, ultrastructure

INTRODUÇÃO

A germinação de sementes é um processo crucial durante o ciclo de vida de uma espermatófita. Sobreviver a esta fase significa um passo adiante no estabelecimento de um indivíduo, e em última instância a sobrevivência de uma dada espécie. Durante a germinação muitos processos acontecem, como a absorção de água; aumento na respiração e na taxa de atividade metabólica; membranas, organelas e DNA passam por manutenção de danos. Todos esses processos são influenciados por muitos fatores abióticos, como temperatura e luz, assim como pelos recursos inerentes à própria semente, como as reservas acumuladas no diásporo durante o seu amadurecimento. A dependência da semente por suas reservas está relacionada principalmente ao tamanho da semente, qualidade das suas reservas, eficiência na translocação dessas reservas e eficiência fotossintética dos cotilédones (se os cotilédones funcionam como um órgão de armazenamento de reservas ou como um recurso fotossintético após a germinação) (KITAJIMA, 2002; SORIANO et al., 2013).

Assim, 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 compostos metabólicos intermediários com finalidades diversas. Essas adaptações podem ser o fator decisivo na determinação do sucesso germinativo, e também para uma situação de competição entre diferentes espécies, como por exemplo a herbivoria das folhas da plântula ou um posicionamento em locais sombreados, podendo, pelo consumo das reservas, suportar uma condição luminosa inferior à necessária para que o desenvolvimento inicial da plântula seja levado a cabo. Muitos estudos estabeleceram padrões de mobilização de reservas e enzimas específicas a esses processos em sementes de diferentes espécies de plantas, seja para a mobilização de lipídios (EASTMOND & GRAHAM, 2001; GRAHAM, 2008; MUTO & BEEVERS, 1974; TO et al., 2002), carboidratos (BUCKERIDGE et al., 2000; DIRK et al., 1999; HORNER & ARNOTT, 1966; SANTOS & BUCKERIDGE 2004; TAKAKI & DIETRICH, 1980) e proteínas (ASHTON, 1976; MÜNTZ et al., 2001;), sendo as sementes mais utilizadas em trabalhos desse

tipo as pertencentes às espécies *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e *Ricinus comunis* L., para citar alguns exemplos.

A mobilização de reservas durante o período de germinação de sementes é um dos passos mais importantes desse processo, pois provê a energia necessária para que as células do embrião retomem a sua atividade, realizem os reparos em toda a estrutura funcional celular (como no DNA, membranas e organelas) e iniciem o desenvolvimento.

As três principais fontes energéticas em uma semente são os carboidratos (principalmente na forma de mono, di e oligossacarídeos, amido, além de muitos outros polissacarídeos de reserva), as proteínas e os lipídios. Em sementes oleaginosas, os lipídios são armazenados na forma de triacilgliceróis que constituem os corpos esféricos discretos chamados oleossomos ou corpos lipídicos.

Enquanto muitos trabalhos são desenvolvidos com algumas poucas espécies, e dessa maneira tornando-as representativas para muitos outros estudos, pouca literatura foi encontrada sobre a mobilização e a identificação dos compostos de reservas que atuam no processo de germinação de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg, espécie de grande importância econômica para o Brasil, embora alguns trabalhos (MORTON, 1987; SANT'ANNA et al., 2001) mostrem somente a composição química da semente.

Trabalhos anteriores (TOZZI, 2010; TOZZI & TAKAKI, 2011), mostraram que a semente desta espécie utiliza primariamente lipídios como principal material de reserva, com a redução em seus níveis sendo identificável a partir do sexto dia de germinação (concomitantemente com o período de protrusão da raiz primária, entre o quarto e o sexto dia, e início do crescimento da plântula) com alguma mobilização de carboidratos, especialmente carboidratos livres durante todo o processo de germinação, e alterações nos níveis de proteínas solúveis totais, tanto pelo aumento da solubilidade de corpos protéicos mobilizados como pela síntese de novas proteínas e de enzimas *de novo*.

No que concerne a mobilização de reservas e sua observação ultra-estrutural, cada uma das classes apresenta características bem definidas. São constituídas por 3 tipos principais: lipídios, proteínas e carboidratos. Lipídios

geralmente são mobilizados primeiro, e os ácidos graxos resultantes dessa mobilização são convertidos em glucose, fornecendo energia para a respiração celular (BOREK et al., 2006). Proteínas, por sua vez, são degradadas à medida que a protrusão radicular ocorre, e correlaciona-se com um aumento de amino-ácidos na plântula, assim como a síntese de proteínas (ASHTON, 1976). Já a mobilização dos carboidratos de reserva é relacionada ao consumo de oxigênio e morfogênese da plântula (ICHIE et al., 2001).

A reserva lipídica da semente é constituída principalmente de triacilgliceróis (TAG), armazenados intracelularmente em organelas discretas, os corpos lipídicos. Estruturalmente, essas organelas apresentam diâmetro variando de 0,5 a 2 µm (LEPRINCE et al., 1998). Sua matriz de triacilgliceróis é circundada por uma única membrana fosfolipídica com proteínas inseridas, as oleosinas (TZEN et al., 1993), proteínas alcalinas de baixo peso molecular (15-24 kDa) que se acumulam sobre a superfície dos corpos lipídicos de sementes tolerantes à dessecação (MURPHY, 2001). Acredita-se que uma das funções das oleosinas é manter os corpos lipídicos como organelas discretas em uma solução aquosa, evitando sua coalescência quando a semente passa por dessecação e posterior hidratação (TZEN & HUANG, 1992). Essa organização estrutural também auxilia na eficiência da mobilização dos triacilgliceróis, uma vez que a superfície de contato para a ação das enzimas mobilizadoras tende a ser maior quanto maior o número de corpos lipídicos.

Os triacilgliceróis possuem uma estrutura composta por uma molécula de glicerol ligada a três ácidos graxos através de ligações éster. Estes ácidos graxos podem variar entre si ou serem de um mesmo tipo. Durante o processo de mobilização, os ácidos graxos são inicialmente clivados do glicerol pela ação de lipases, resultando em uma molécula de glicerol e três de ácidos graxos. Estes são complexados com a coenzima A, formando o complexo Ácido Graxo-Acil-CoA que passa pelo processo de β-oxidação, na qual um ácido graxo Cn (onde n é o número de carbonos) são sequencialmente quebrados em n/2 moléculas de Acetil-CoA, metabolizada no glioxissomo para posterior formação de succinato e NADH, ao passo que a mitocôndria converte o succinato a oxaloacetato e gera ATP pela oxidação do NADH, tendo como objetivo final a produção de glicose através da gliconeogênese no citoplasma (VICK & BEEVERS, 1978; LARSON & GRAHAM, 2001; GRAHAM, 2008).

Geralmente, a mobilização dos lipídios ocorre majoritariamente no período pós-germinativo (GRAHAM, 2008), iniciando durante a germinação e com sua principal fase de consumo se dando no início do desenvolvimento da plântula (YANG et al., 2009, QUETTIER & EASTMOND, 2008, ALENCAR et al., 2012). Além de fonte de energia para o metabolismo, os ácidos graxos podem também ter papel estrutural de grande importância, sendo um dos principais constituintes dos fosfolipídios, moléculas tidas como o alicerce das membranas biológicas. Os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico são alguns exemplos de ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios (VICK & BEEVERS, 1978).

Corpos protéicos possuem uma estrutura variada, elétron densa, com diâmetro de 0,1 a 25 μm, e geralmente apresentam-se em 3 tipos: uma estrutura granular e homogênea (matriz protéica), um padrão concêntrico de grânulos elétron densos, e por último uma matriz protéica com inclusões, que podem ser globóides ou cristalóides (PERNOLLET, 1978). Os corpos protéicos possuem, em sua composição, proteínas de reserva (70-80% de peso seco), sais de ácido fítico (10% peso seco), enzimas hidrolíticas, cátions e ácidos ribonucléicos (PERNOLLET, 1978). Sua biogênese se dá a partir da formação de vacúolos durante a maturação da semente, com transporte ativo de proteínas de reserva para esses vacúolos, ocorrendo a formação da matriz protéica (HARA-NISHIMURA et al, 1987).

Açúcares solúveis são de extrema importância não somente durante o início da germinação, desenvolvimento inicial da plântula e manutenção do novo indivíduo, mas também possuem um papel essencial na tolerância à dessecação durante a maturação da semente e fases iniciais da germinação (LEPRINCE et al., 1990).As sementes perdem a tolerância à dessecação enquanto a germinação ocorre, e o consumo de oligossacarídeos está ligado diretamente à perda de tolerância à dessecação, uma vez que oligossacarídeos da série rafinósica, ciclitóis e sacarose são reconhecidamente importantes no desenvolvimento desta tolerância durante a maturação de sementes (KOSTER & LEOPOLD, 1998; GÓRECKI et al., 1997). Juntamente com a queda nos níveis de oligossacarídeos, os níveis de monossacarídeos tendem a variar durante a germinação, podendo variar positivamente pela quebra de polissacarídeos de reserva como o amido, polissacarídeos de

reserva de parede como galactomanano, seja pelo consumo de lipídios de reserva, para prover glucose, frutose e sacarose não somente ao embrião no início do seu desenvolvimento, mas também para serem transportados por todos os tecidos durante o estabelecimento da plântula, onde são requeridos para o crescimento e manutenção do equilíbrio osmótico (ROSA et al., 2009). Os níveis de monossacarídeos também podem variar negativamente, através do consumo destes pelos tecidos, relações de fonte-dreno, ou mesmo em situações de estresse. Como o período germinativo é bastante delicado para a plântula, variações nos níveis de açúcares solúveis podem comprometer o desenvolvimento. Fatores abióticos como por exemplo a salinidade, situações de seca e diferentes qualidades de luminosidade são reconhecidos por alterar a concentração de açúcares solúveis (ROSA et al., 2009).

Concomitantemente com a mobilização de reservas, durante o desenvolvimento inicial da plântula, os cotilédones podem passar por um estado fotossintetizante, variando entre as espécies. Geralmente, sementes grandes com muitas reservas apresentam germinação hipógea. Seus cotilédones funcionam como armazenadores de reserva e não se tornam fotossintetizantes. Essas espécies apresentam a característica de serem tolerantes à sombra. Por outro lado, sementes com germinação epígea tendem a ser menores, possuem uma menor quantidade de reservas, e seus cotilédones se tornam fotossintetizantes conforme as reservas vão se esgotando. Essas espécies apresentam a característica de serem dependentes de luz no seu desenvolvimento inicial (KITAJIMA, 2002; SORIANO et al., 2013). A capacidade fotossintética então adquirida pelos cotilédones fornecerá energia para o crescimento contínuo da plântula.

Após a germinação, o desenvolvimento dos cloroplastos pode acontecer de maneiras distintas, dependendo da condição ambiental à qual a semente está sujeita. No escuro, os proplastídios indiferenciados podem se diferenciar até o estágio de etioplasto, organela com a presença de corpos membranosos indiferenciados, os corpos prolamelares, que contém moléculas de protoclorofilídeo, precursores da clorofila. Já na presença de luz, ocorre a redução do protoclorofilídeo em clorofilídeo *a*, que na sequência convertido à clorofila *a* e *b*. Concomitantemente com a síntese de clorofila, os corpos prolamelares se desenvolvem, formando os tilacóides e grana (POGSON &

ALBRECHT, 2011). Esse processo é muito comum em cotilédones de sementes epígeas, como descrito em *Tabebuia rosea*DC (KITAJIMA, 2002).

As sementes de *P. edulis,* quando germinadas sob luz branca contínua, possuem cotilédones que se apresentam verdes após saírem do interior do endosperma e do tegumento. No entanto, o endosperma também apresenta uma coloração esverdeada logo após a abertura dos tegumentos. Essa coloração verde pode indicar a presença de cloroplastos e por consequência uma capacidade fotossintetizante, algo ainda não relatado na literatura para esse tecido. Além disso, a germinação da semente de maracujá amarelo é epígea, e um endosperma fotossintetizante pode representar uma vantagem para o estabelecimento da plântula na transição do estado heterotrófico para o autotrófico.

Assim, a compreensão das mudanças ocorridas a nível ultra-estrutural nesta espécie levará a conhecimentos relevantes sobre a sua germinação, bem como servirá de subsídio para pesquisas futuras que envolvam a manipulação e manutenção da mesma, como por exemplo, em técnicas de armazenamento e preservação de germoplasma, servindo de referência para possíveis alterações que o emprego destas técnicas possam causar para o desempenho germinativo da espécie.

Além disso, tendo a semente de *P. edulis* como objeto de estudo, procuramos analisar a mobilização dos ácidos graxos e carboidratos livres nos cotilédones e endosperma durante dez dias sob luz branca contínua e escuro contínuo, para contemplar tanto a germinação como a fase de crescimento inicial da plântula, tendo como hipótese a premissa de que haverá diferenças na mobilização dessas duas reservas de acordo com a condição luminosa.

Por fim, procuramos entender a relação do endosperma e a possível presença de cloroplastos neste tecido e a sua influência no crescimento inicial da plântula. A retirada do endosperma após um período determinado da germinação, em diferentes condições luminosas, nos permitiu tentar compreender não somente a influência das reservas do endosperma no crescimento inicial, mas também se há a participação ou alguma influência no crescimento derivada do fato de os cloroplastos serem, ou não, fotossinteticamente ativos. É sabido que diferentes condições de desenvolvimento afetam inúmeros fatores das plantas, sendo o índice de área

foliar específico uma das características mais utilizadas para se estimar a estratégia de crescimento de uma planta, como também a massa seca de alguns órgãos, como folhas e raízes, já que o crescimento destes tecidos é bastante plástico e responde diferentemente de acordo com a condição de desenvolvimento (PETERSON et al, 1989; WILSON et al., 1999; JAMES et al., 2002). Não somente o ganho de massa seca e o crescimento são afetados, mas também a eficiência quântica potencial e a eficiência quântica efetiva do fotossistema II também podem sofrer alterações quando as plântulas são submetidas à diferentes condições ambientais e de estresse (BAKER, 2008). Dessa maneira, a assimilação de CO_2 também pode sofrer alterações em resposta aos diferentes tratamentos aplicados em nossos experimentos.

Nossa meta então foi responder as seguintes perguntas durante o nosso trabalho: (I) a germinação da semente de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg é semelhante à de sementes como por exemplo as já mencionadas *Arabidopsis thaliana* e *Ricinus comunis*? (II) Durante a germinação serão consumidos inicialmente os lipídios, uma vez que é uma semente oleaginosa? (III) Qual seria o papel dos carboidratos livres? Também procuramos averiguar a presença de cloroplastos no endosperma de P. edulis através de técnicas de microscopia eletrônica e microscopia confocal, para responder se (I) existem cloroplastos no endosperma; (II) esses cloroplastos apresentam morfologia semelhante a de cloroplastos competentes a realizar fotossíntese; (III) em que momento eles aparecem, durante a germinação ou crescimento inicial da plântula. Juntamente com as respostas a essas perguntas, procuramos averiguar a importância dos cloroplastos no endosperma, bem como sua influência sobre a dinâmica do consumo de reservas e as condições fisiológicas de suas membranas internas durante a germinação e crescimento inicial da plântula.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e beneficiamento das sementes

As sementes de *P. edulis* f. flavicarpa cv. IAC 273/277 foram adquiridas no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), sendo beneficiadas por metodologia própria do Instituto, consistindo basicamente de remoção da polpa por turbilhonamento em liquidificador (com uma peça adaptada para não danificar as sementes), secas, e os resíduos de arilo restantes removidos manualmente, segundo informações do próprio Instituto Agronômico.

Condições de germinação para as análises

As sementes foram colocadas em placas de Petri de 90mm de diâmetro forradas com duas camadas de papel filtro embebido com 10mL de água destilada, variando na quantidade de sementes colocadas nas placas de acordo com cada experimento. Para a análise de microscopia tanto eletrônica de transmissão quanto confocal, foram utilizadas 15 sementes para cada uma das três placas de Petri usadas para as repetições, tanto na luz quanto no escuro. Para as análises de ácidos graxos e carboidratos, crescimento em casa de vegetação e análise de trocas gasosas por IRGA, vinte sementes em cada uma das repetições.

As placas de cada experimento foram incubadas na alternância de temperatura de 20-30ºC (12h-12h) dentro de germinadores (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 seja a mais homogênea possível, e de cerca de 70µmol.m^{-2}.s^{-1}. O mesmo procedimento experimental 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), décimo (t10) e décimo-quarto (14) dia de germinação foram coletadas e processadas das maneiras descritas na sequência.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O tegumento das sementes foi retirado, e somente o endosperma e cotilédone foram submetidos à MET, sendo processados separadamente. A pré-fixação foi realizada com Karnovsky modificado (glutaraldeído 1,5%, formaldeído 1,5%, tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2) durante duas semanas, seguida de duas lavagens de 15 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH7,2por duas horas, seguida de duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. Após esse processo, foi realizada uma lavagem de 15 minutos em álcool 10% seguida de contrastação em bloco com acetato de uranila 2% em álcool 10%. O material foi desidratado em série crescente de concentração de acetona até 100%, embebido em resina Spurr e emblocado (DYKSTRA, 1993). Os blocos foram então cortados em ultra-micrótomo LEICA Reichert Super Nova na espessura entre 60-90 nm, contrastados novamente em acetato de uranila e citrato de chumbo, e analisados ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100. A documentação fotográfica foi realizada com uma câmera digital Olympus Veleta acoplada ao microscópio eletrônico, com aquisição das imagens pelo programa Olympus iTEM.

Microscopia Confocal

As sementes dos tempos acima mencionados foram separadas em cotilédones e endosperma, sendo utilizadas para análise o cotilédone inteiro e porções de endosperma seccionadas à mão livre. O material foi montado a fresco em lâminas de vidro com lamínula de espessura 0,16mm e glicerina:Tampão Fosfato Salino (PBS) 9:1. A excitação foi realizada a 488nm, com bandpass de 650-700nm.

Análise de ácidos Graxos

Os procedimentos para extração, derivatização e análise foram feitos com base em Sant'anna et al. (2001), com algumas adaptações. A metodologia segue descrita abaixo.

- Extração

O tegumento foi retirado e os cotilédones e endospermas foram separados para análise. Dez cotilédones e dez metades de endosperma foram utilizados em cada uma das três repetições de extração e cromatografia. Após a separação, os dez cotilédones e as dez metades de endosperma foram colocados dentro de “vials” de vidro e a extração se procedeu com 1mL de hexano. Após homogeneização e passagem de 15 minutos pelo ultrassom, a solução foi filtrada em algodão com auxílio de uma seringa de vidro, e a fase sólida restante descartada. O hexano foi evaporado em um dessecador ligado à uma bomba de vácuo, e a fração restante após a evaporação foi submetida à derivatização.

- Derivatização

O processo consistiu em ressuspensão da fração lipídica em 500 µL de hidróxido de potássio 0,5N em metanol e aquecimento à 60ºC durante 10 minutos. Em seguida, 400 µL de ácido sulfúrico 0,9N foram adicionados, e novamente a solução foi aquecida à 60ºC durante 10 minutos. Na sequência, 1 mL de hexano foi adicionado e os “vials” foram agitados vigorosamente. Após a separação de fases, a fase hexânica foi recolhida e purificada com bicarbonato de amônio a 1%. Ao final desse processo, a fase hexânica foi recolhida e submetida à análise cromatográfica.

- Análise em cromatografia líquida gasosa e detecção por espectrometria de massa

O procedimento consistiu em injeção de 1 µL da amostra à temperatura de 160 ºC, seguindo com o seguinte programa: 160ºC durante 5 minutos, e na sequência uma rampa com incremento de 5ºC por minuto até a temperatura final de 200ºC, permanecendo nessa temperatura por 3 minutos. Em seguida, houve um incremento de 8ºC por minuto até a temperatura final de 280ºC, permanecendo nesse patamar por 6 minutos. Após passagem pela coluna, a amostra foi analisada em um espectrômetro de massa no alcance de 40 a 500 m/z.

Análise qualitativa dos carboidratos solúveis

A análise de carboidratos foi realizada no Núcleo de Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo. Amostras de dez cotilédones e de dez metades de endosperma foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica (10 X 1) contendo resinas nas formas catiônicas (Dowex 50 X 40 X 200) e aniônica (Dowex 1 X 8 – 200) (Carvalho & Dietrich 1993). Em seguida foram filtradas em membranas de 0,45 µm e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo ICS 3000 utilizando coluna CarboPac PA1 (2 X 250 mm). Os oligossacarídeos e monossacarídeos foram analisados na concentração de 400 µg mL-1. O gradiente para separação dos oligossacarídeos foi realizado misturando-se o eluente A (água deionizada) e o eluente B (250 mM de hidróxido de sódio) na seguinte programação: 0-25 min, 100 mM B; 25-30 min, 200 mM B; 30-35 min, 100 mM B. O gradiente para separação dos monossacarídeos foi realizado misturando-se o eluente A (água deionizada) e o eluente B (250 mM de hidróxido de sódio) na seguinte programação: 0-25 min, 16 mM B; 25-30 min, 200 mM B; 30-35 min, 16 mM B. O fluxo aplicado foi de 0,250 ml min-1.Os monossacarídeos e os oligossacarídeos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais de fucose, arabinose, galactose, glucose, manose, mio-inositol e rafinose (Sigma).

Massa seca de endospermas e cotilédones ao longo da germinação e crescimento inicial

Para esse experimento, dez sementes tiveram seus dez endospermas e vinte cotilédones separados, colocados em uma folha de papel alumínio previamente identificada e tarada, e tiveram suas massas anotadas. Os envelopes de papel alumínio contendo os tecidos foram colocados dentro de uma placa de petri de 120mm. Em seguida, a placa de Petri foi colocada em estufa a 95ºC, durante dois dias. Ao final desses dois dias, os envelopes eram retirados e suas massas eram novamente medidas. A diferença entre a massa final e a massa inicial dos envelopes representou o peso seco dos tecidos. O experimento foi realizado em triplicata.

Análise de crescimento em casa de vegetação, fluorescência e trocas gasosas

Aos 10 DAS, dez sementes germinadas sob luz branca contínua e dez sementes germinadas sob escuro contínuo tiveram o que sobrou do endosperma retirado (tratamentos luz sem endosperma – LSE e escuro sem endosperma – ESE, respectivamente) e colocadas para continuar o seu desenvolvimento em substrato florestal (Genebom, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) em casa de vegetação com temperatura média diurna de 32 ± 2 °C, juntamente com 10 sementes intactas germinadas sob luz branca contínua e escuro contínuo (respectivamente, tratamentos luz com endosperma, LCE e escuro com endosperma, ECE). Aos 50 DAS (40 dias após o plantio) foram realizadas medidas de trocas gasosas (assimilação de CO_2) e de fluorescência da clorofila *a* por meio de analisador de gases por infra-vermelho (IRGA) de sistema aberto (LI-6400xt, LI-COR, Lincoln, NE, USA), acoplado à fluorômetro (LCF 6400-40, LI-COR) de pulso de amplitude modulada. As medidas foram realizadas das 9h até 11h, em dia sem nuvens. O déficit de pressão de vapor (DPV, kPa) na câmara amostra variou de acordo com a oscilação do ambiente externo à câmara. A concentração de CO_2 na câmara amostra foi fixada em 400 µmol mol^{-1}. A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) foi mantida em 1200 µmol m^{-2} s^{-1}, que foi similar ao DFFFA medido (quantômetro) na casa de vegetação. A fluorescência da clorofila *a* foi medida com um pulso saturante de luz de aproximadamente 7000 µmol fótons m^{-2} s^{-1} durante 0,7s. Para medir a eficiência quântica potencial, as folhas foram cobertas com papel alumínio durante 30 minutos, sendo a fluorescência máxima da clorofila *a* (*Fm*) e fluorescência mínima (Fo) medidas na sequência. A fluorescência variável (*Fv*) foi calculada pela equação *Fv* = *Fm*-*Fo*, sendo a eficiência quântica potencial calculada por *Fv*/*Fm*(BOLHÀR-NORDEMKAMPF & ÖQUIST, 1993). A fluorescência máxima (*Fm'*) foi medida após um pulso multifásico de luz saturante, sendo a fluorescência-base sob luz actínica medida anteriormente a este pulso (*Fs*). A eficiência quântica efetiva (ϕ_{PSII}) foi calculada como ϕ_{PSII} = (*Fm'*-*Ft*)/*Fm'* (GENTY et al., 1989). A fração da luz usada na fotoquímica pelo fotossistema II (PSII) [P = ((Fm' - Fs)/Fm')], dissipação do calor no complexo antena [D = 1 - (Fv'/Fm')], e a dissipação do calor nos centros de reação [E=(1-qP) (Fv'/Fm') foram calculados de acordo

com Demming-Adams (1996). Nestes cálculos, Fv' é a fluorescência variável entre a fluorescência máxima (Fv') e mínima (Fo') de uma folha adaptada à luz e Fs é a fluorescência estável em uma folha adaptada à luz. O quenching fotoquímico (qP) foi calculado por qP=(Fm'-Fs)/(Fm'-Fo'), de acordo com Baker (2008).

Na sequência dessas análises, procedeu-se à medição de massa seca (g) das folhas, raiz e caule e área foliar (cm^2) de cada uma das plantas de cada tratamento, sendo realizados os cálculos de Área Foliar específica (AFE, cm^2/g) e de Área Foliar Específica X Assimilação de CO_2.

Análise estatística

Os dados de ácidos graxos, carboidratos, trocas gasosas e análise vegetativa foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias dos valores de cada tratamento. Havendo diferença significativa entre as médias, foi aplicado o teste de Holm-Sidak com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Germinação das sementes

As sementes apresentaram alta germinabilidade e alcançaram valores próximos de 100% tanto na luz branca quanto no escuro, sendo que estas últimas iniciaram a protrusão da raiz cerca de dois dias antes das sementes mantidas sob luz branca contínua (Figura 1).

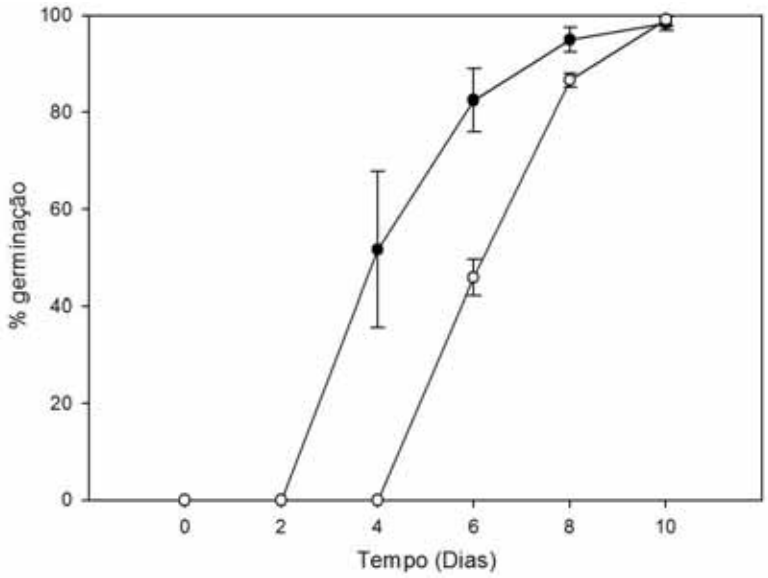

Figura 1: Germinação acumulada de *P. edulis*. -o- luz branca contínua, -●- escuro contínuo. As barras de erro representam o desvio padrão.

Microscopia Eletrônica – Consumo de reservas

Numerosos corpos lipídicos foram observados tanto nos cotilédones quanto no endosperma (figuras 2 A-C e 3 A e C). Esses corpos lipídicos são delimitados por uma única unidade de membrana, ocupando, nos tempos iniciais, praticamente todo o espaço intra-celular. Conforme o avanço nos dias após a semeadura, o número de corpos lipídicos diminuiu, permitindo a observação de outras organelas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e plastídios.

Glóbulos protéicos foram encontrados tanto nos cotilédones quanto no endosperma. Tanto glóbulos protéicos com matriz protéica homogênea quanto com inclusões de cristalóides estão presentes nas células dos cotilédones e do

endosperma (figura 4). Não foram observados corpos protéicos com inclusões globóides.

Os núcleos se mostraram compactados nos tempos iniciais de germinação, tanto no endosperma quanto no cotilédone, e retornaram ao seu formato arredondado tradicional até o décimo dia (figura 5 A e B). Pouca heterocromatina foi observada nos núcleos e a presença de um nucléolo bem organizado. Não foram encontrados sinais da região organizadora do nucléolo.

Organelas arredondadas elétron-densas foram observadas próximas a corpos lipídicos nos tempos mais avançados de germinação (figura 6), os glioxissomos em associação com mitocôndrias.

A observação de mitocôndrias se tornou possível no o sexto dia, podendo ser considerado como o início do crescimento e desenvolvimento da plântula. No endosperma, as mitocôndrias foram encontradas, na maior parte do tempo, próximas umas das outras, estando também próximas dos corpos lipídicos e dos plastídios (figura 6 B).

No endosperma, a parede celular apresentou características fibrilares, com uma lamela média mais elétron-densa (figura 3D). Não foram observadas alterações na estrutura da parede celular, bem como na sua espessura, no decorrer da germinação.

Ocorreu a formação de um grande vacúolo nas células do endosperma entre o oitavo e décimo dia após a semeadura, com todo o material celular restante sendo alocado na periferia desse vacúolo (figuras 3B e 7C). A formação deste vacúolo coincidiu com a degradação dos corpos protéicos que antes ocupavam a porção central da célula. Sinais de degradação das células do endosperma, além da perda de turgescência das mesmas foram observados.

Para as sementes germinadas no escuro, a observação da mobilização de reservas se mostrou bastante semelhante com o ocorrido sob luz branca. Os corpos lipídicos foram sistematicamente degradados até o décimo dia no endosperma, possibilitando a observação das organelas durante o crescimento inicial da plântula. Também houve a formação de um grande vacúolo na região central da célula, com todas as organelas e estruturas alocadas nas laterais. Este vacúolo também foi formado concomitantemente com a degradação dos

corpos protéicos, que ocorreu da borda do grânulo em direção ao seu interior, com a formação de vários micro-vacúolos nas bordas (figura 7B).

Diferentemente do observado no endosperma de sementes germinadas sob luz branca, plastídios/cloroplastos não foram observados durante a germinação ou crescimento inicial no endosperma de sementes submetidas ao escuro contínuo. No entanto, nos cotilédones de sementes germinadas no escuro, apesar de a dinâmica de reservas acompanhar o observado na luz branca, houve a observação de plastídios indiferenciados, caracterizados pela presença de corpos prolamelares em seu interior (figura 7F).

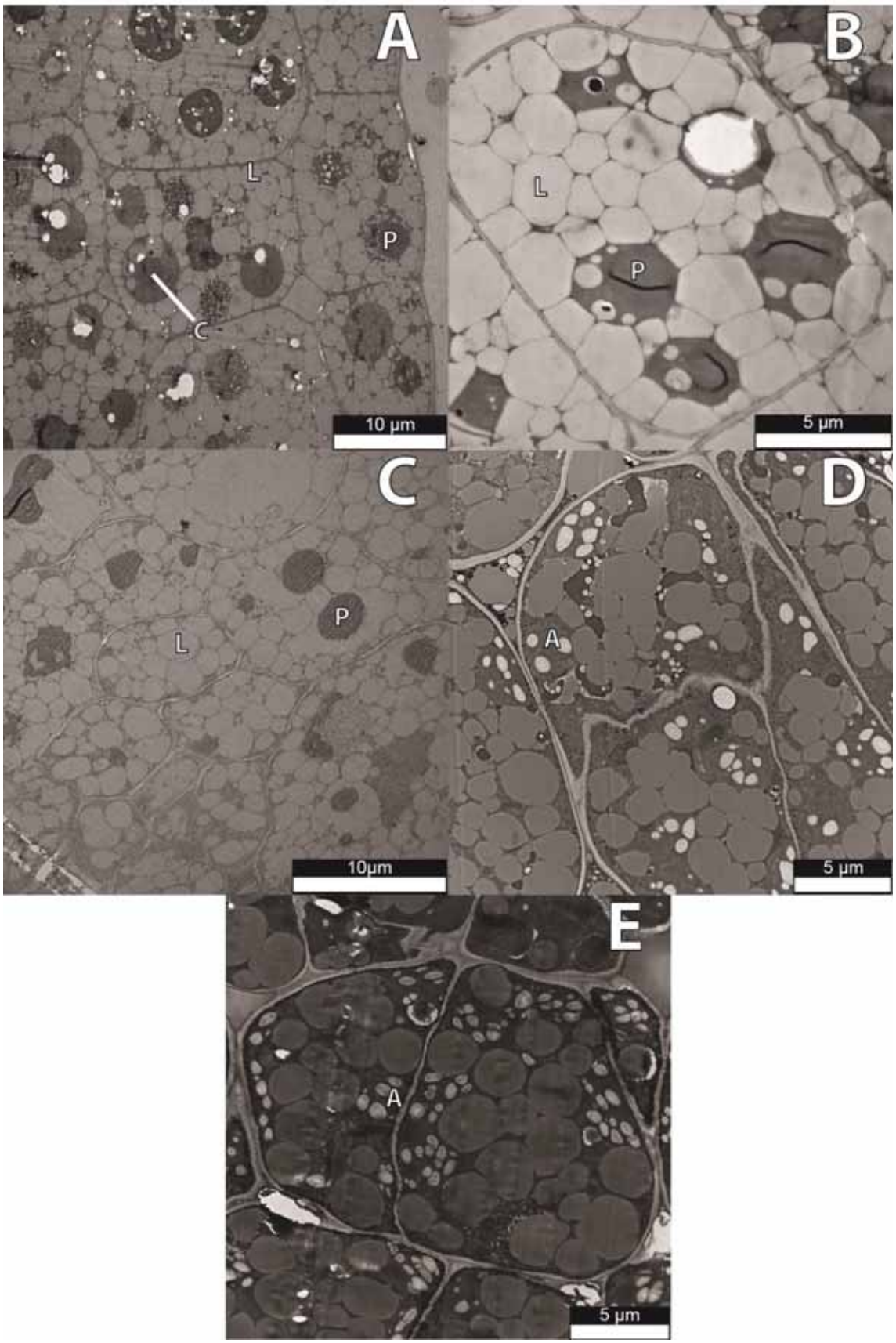

Figura 2: Cotilédones de *P. edulis* durante a germinação e desenvolvimento inicial da plântula. Notar a diminuição na quantidade de corpos lipídicos (L) e protéicos (P) ao passo que a germinação ocorre. Notar também a presença de cristalóide (C, figura A) na matriz protéica de um corpo protéico, assim como amiloplastos (A, figura E) nos tempos tardios após semeadura. A – t0, B – t2, C – t6, D – t8 e E – t10.

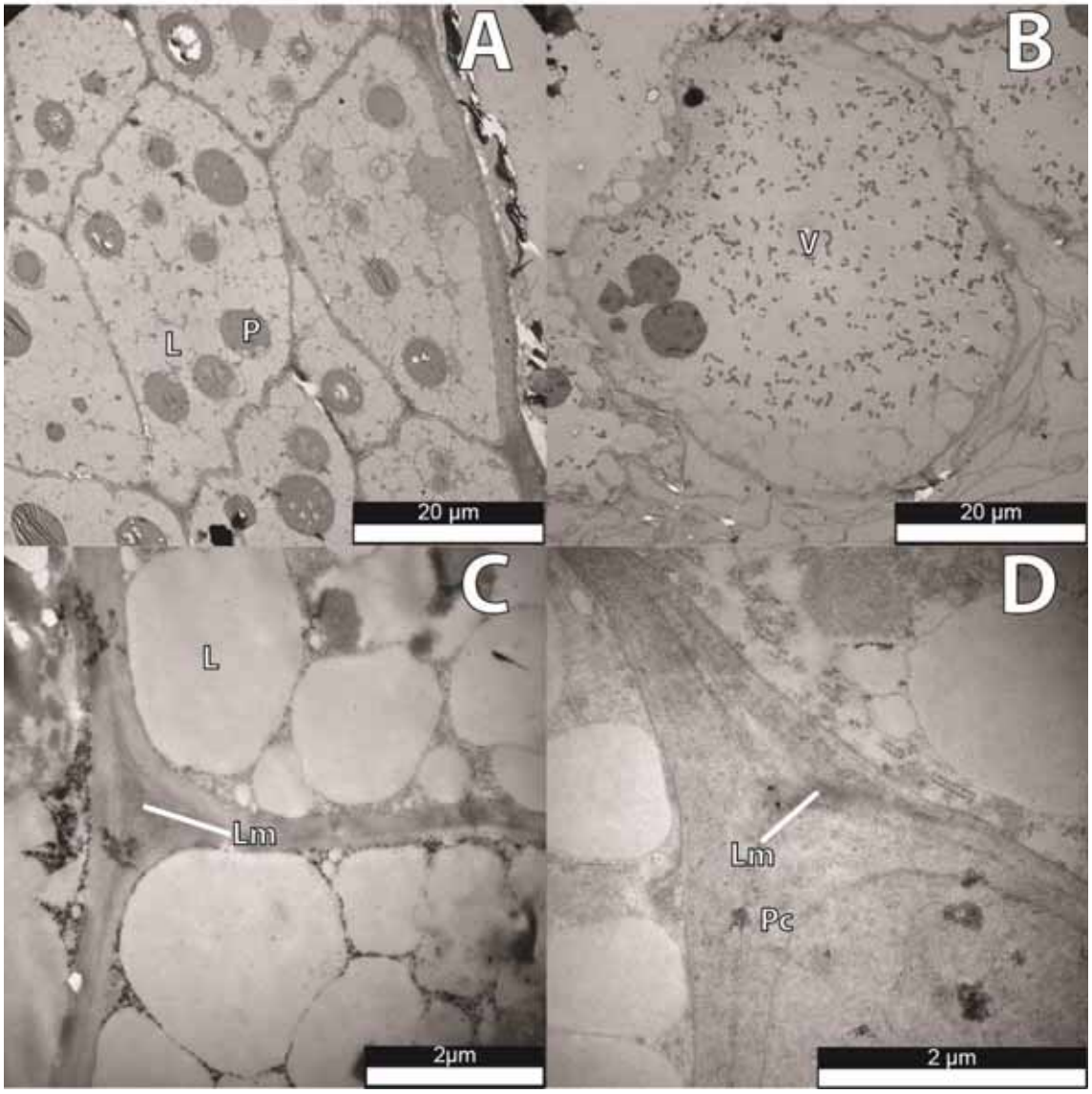

Figura 3: Endosperma de *P. edulis* durante a germinação e desenvolvimento da plântula. A-B (t0 e t10, respectivamente), observar a mudança na configuração da célula, antes preenchida por corpos lipídicos (L), com alguns corpos protéicos (P) (figura A), para uma célula com um grande vacúolo centralizado, com o citoplasma limitado à periferia da célula (figura B). Na parte inferior da figura B, notar o empilhamento de paredes celulares de algumas células já vazias. C-D (t0 e t10), detalhe da parede celular (Pc) e da lamela média (Lm), não apresentando aqui evidências de consumo de polissacarídeos de reserva de parede.

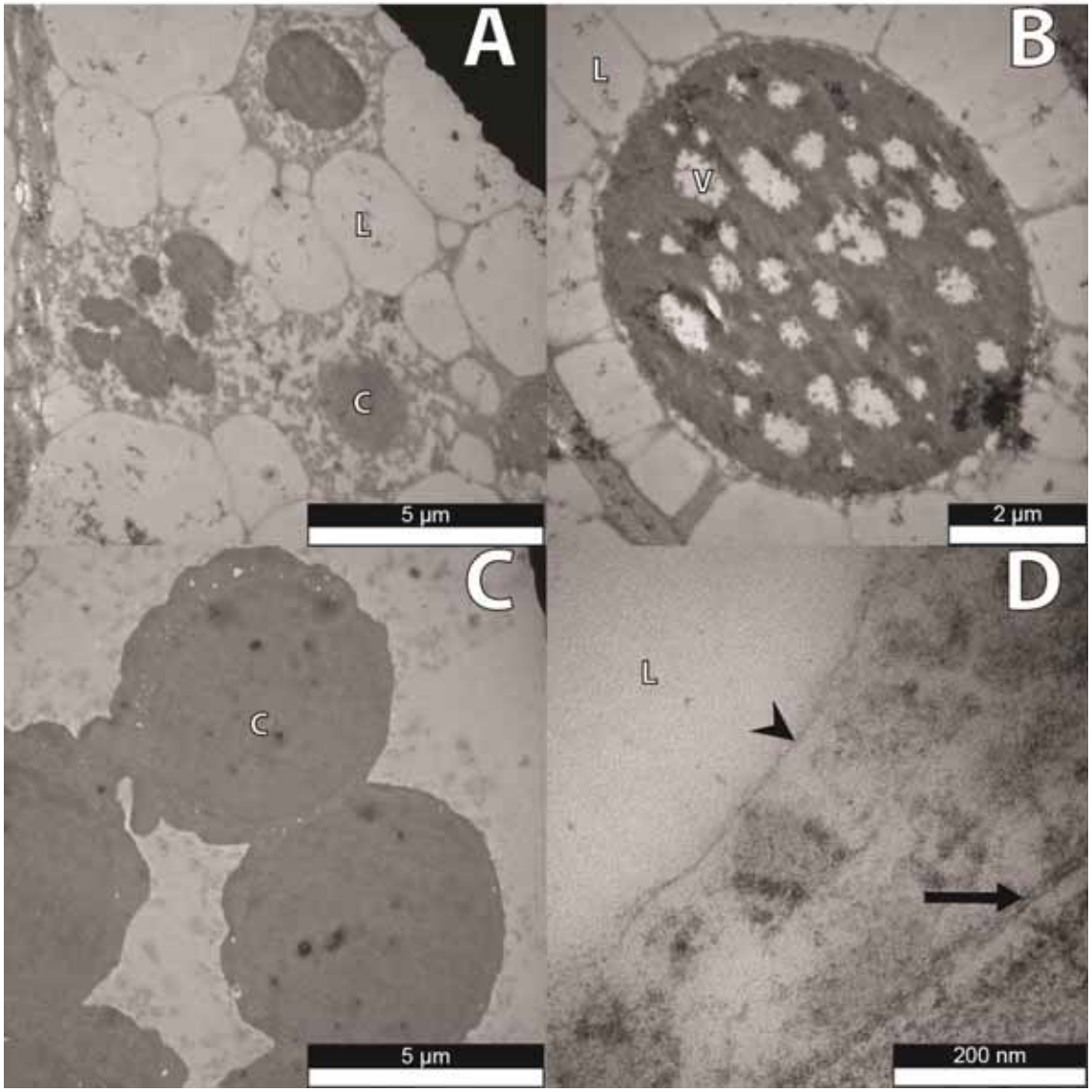

Figura 4: Principais reservas do endosperma da semente de *P. edulis*. A-C, glóbulos protéicos. Notar em B os vacúolos (V) formados pela degradação protéica, e em A e C a fusão de alguns corpos protéicos, com cristalóides (C). Em D, detalhe característico das gotas lipídicas, com uma unidade de membrana (cabeça de seta) em contraste com as duas unidades de membrana da membrana plasmática (seta).

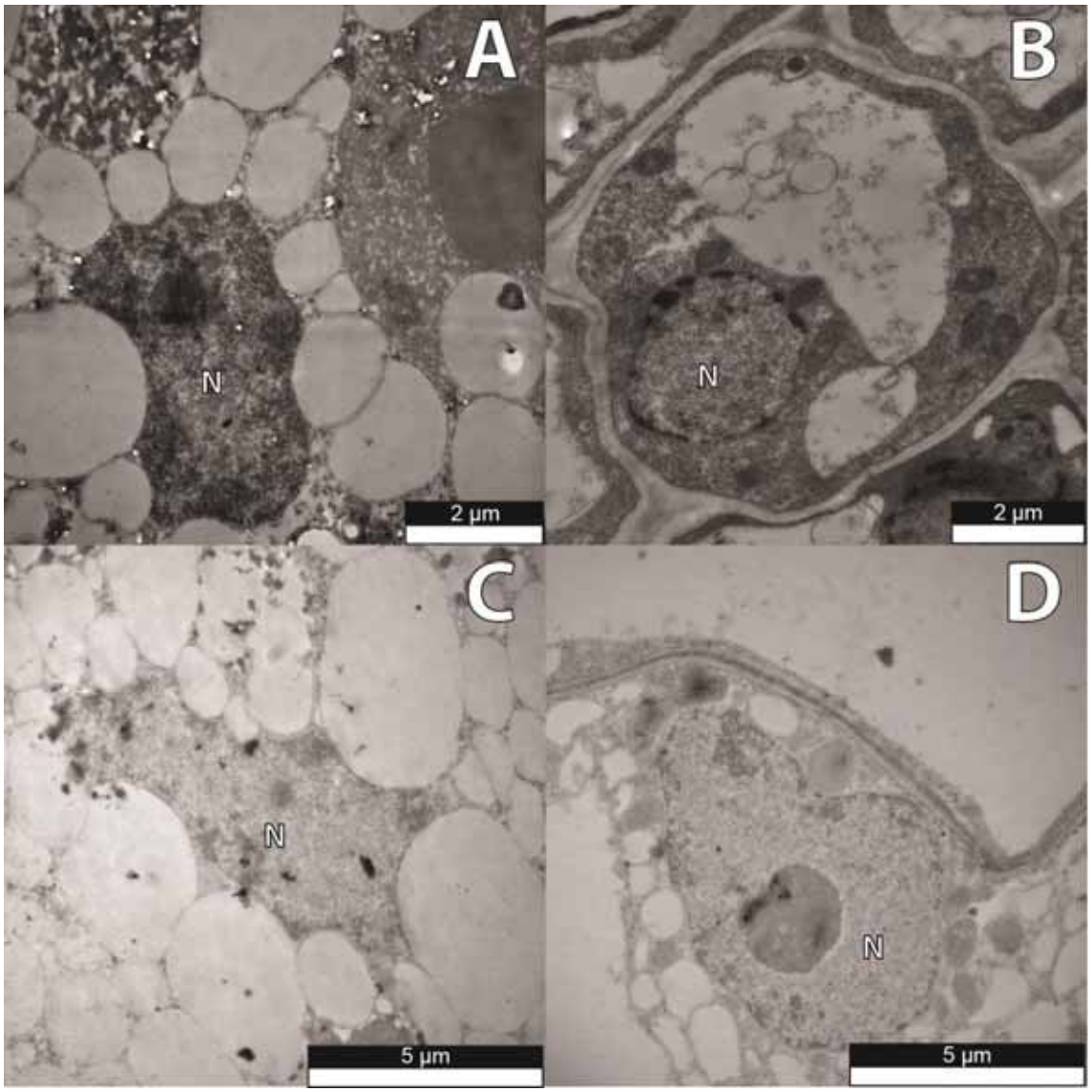

Figura 5: Mudança nos formatos dos núcleos durante a germinação e o desenvolvimento da plântula de *P. edulis*. Notar a transição de um núcleo compacto (A, C) para o formato arredondado tradicional (B,D). A-B, cotilédones (t0 e t10 respectivamente) e C-D, endosperma (t0 e t10, respectivamente).

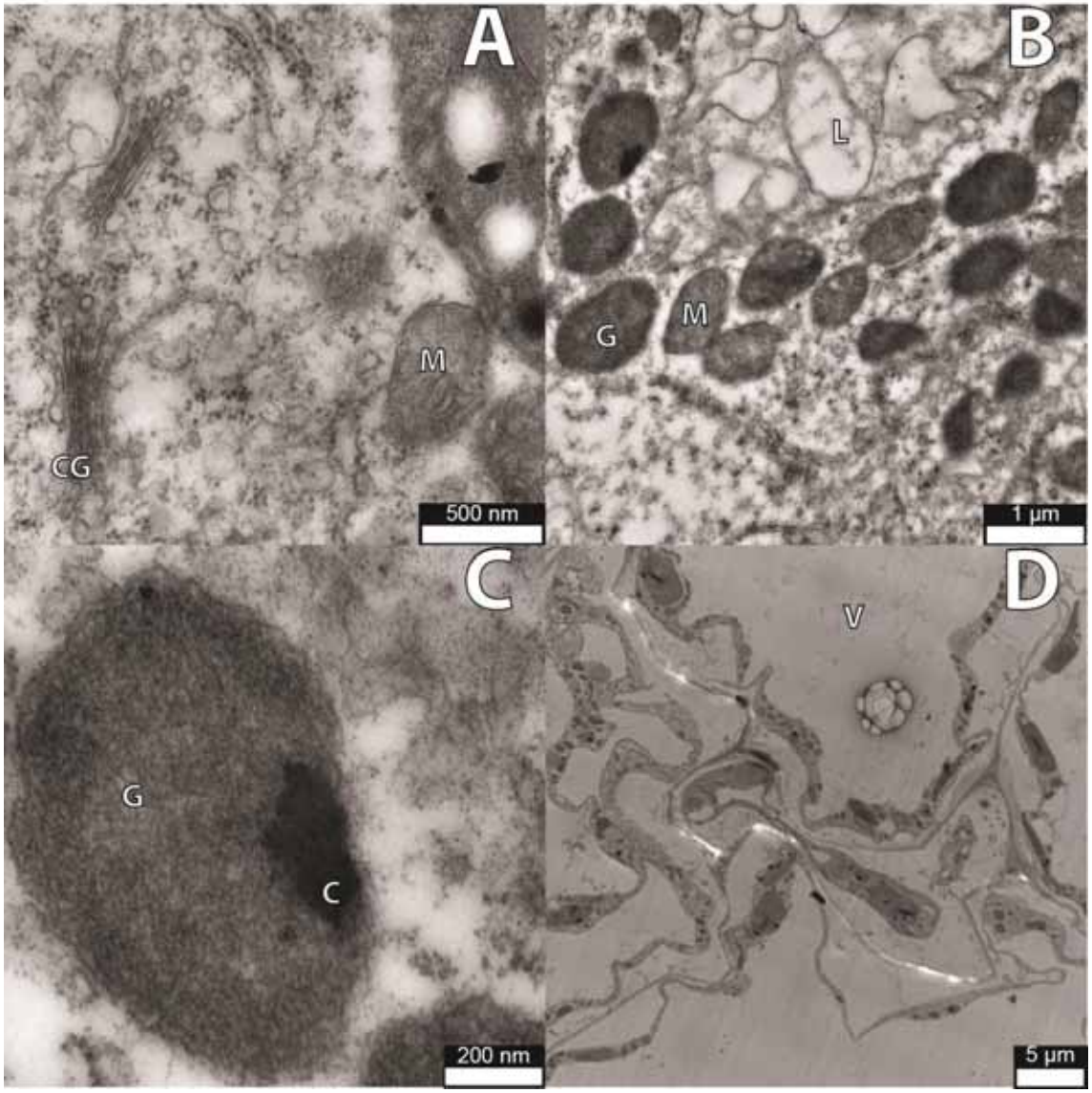

Figura 6: Organelas e estruturas celulares no Endosperma de *P. edulis*. A, complexo de Golgi com vesículas em suas laterais; B, mitocôndrias e glioxissomos; C, detalhe de um glioxissomo com cristaloide; D, células do endosperma vazias, com o citoplasma limitado às margens das células. CG – Complexo de Golgi, M – Mitocôndria, G – Glioxissomo, C – Cristalóide, V – Vacúolo.

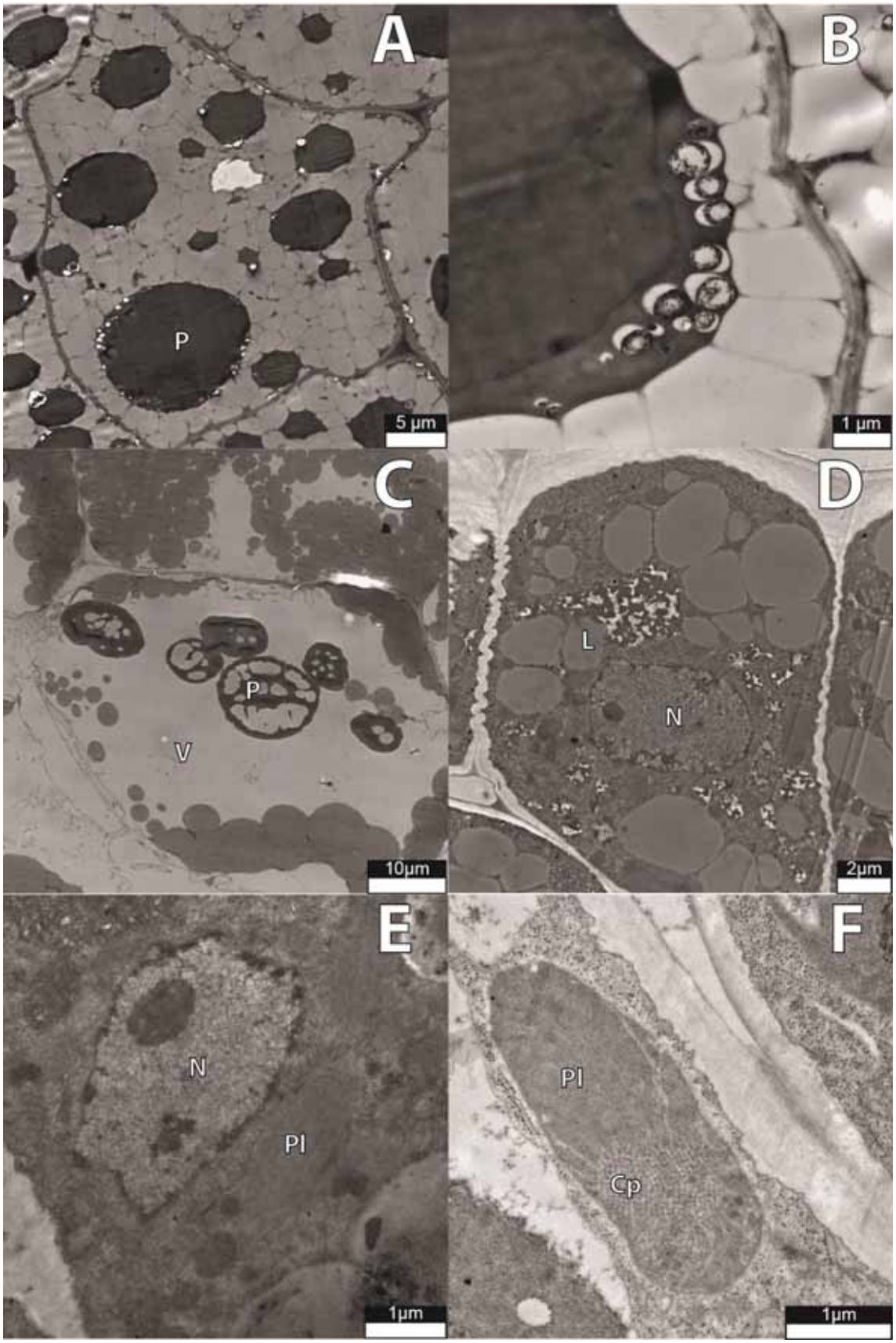

Figura 7: Consumo de reservas no escuro em endosperma e cotilédones de *P. edulis*. A, endosperma 4 DAS, com muitos lipídios preenchendo toda a extensão da célula e grandes corpos protéicos; B, detalhe do consumo dos corpos protéicos; C, célula do endosperma em 10 DAS, restando poucas reservas e formação do vacúolo central a partir do consumo de proteínas; D, célula do cotilédone em 8 DAS, com consumo avançado de corpos protéicos e

corpos lipídicos presentes; E, detalhe do núcleo, e plastídio indiferenciado em cotilédones; F, plastídio indiferenciado na célula de um cotilédone. Notar a presença de corpos prolamelares, característicos de plastídios que ainda não se diferenciaram em cloroplastos. P – Corpo Protéico, V – Vacúolo, L – Lipídio, N – Núcleo, Pl – Plastídio, Cp – Corpo prolamelar.

Microscopia Eletrônica –Observação de Cloroplastos

- Endosperma

Plastídios foram observados em 8 dias após a semeadura (DAS) (figura 8 A-B) no endosperma de sementes germinadas sob luz branca, apresentando um sistema simples de tilacóides, não havendo a formação de grana. Os plastídios foram localizados na margem das células, assim posicionados devido à formação do vacúolo central das células do endosperma, resultante da fusão e consumo dos corpos proteicos de reserva. Em 10 DAS, os plastídios foram encontrados em um estágio mais avançado de desenvolvimento, com um aumento no número de membranas internas, como também um aumento na sua complexidade, formando grana com 3 a 6 membranas empilhadas (figura 8 C).

Em alguns plastídios foram observadas estruturas que se assemelham a corpos prolamelares (figura 8 A, C)

O endosperma de sementes germinadas no escuro contínuo não apresentou plastídios em nenhum dos dias observados (figura 8 F).

- Cotilédones

Nos cotilédones de sementes germinadas sob luz branca contínua, os plastídios começaram a ser visíveis a partir do 8º DAS (figura 9 A). Tilacóides não foram observados, e também não ocorreu a formação de grana e apresentaram grânulos de amido em seu interior. Esse padrão continua aos 10 DAS (Figura 9 B), com as células dos cotilédones apresentando numerosos amiloplastos. Aos 14 DAS, os amiloplastos apresentaram tilacóides em seu interior, formando grana, juntamente com grânulos de amido (figura 9C).

Já para os cotilédones de sementes germinadas no escuro contínuo, plastídios (etioplastos) também apareceram em 8 DAS (Figura 9 D). No entanto, a maioria deles não apresentaram grãos de amido em seu interior. O mesmo padrão se manteve aos 10 DAS (Figura 9 E), e alguns tilacóides foram observados em seu interior, sem apresentar a formação de grana. Aos 14DAS, corpos prolamelares foram observados no interior dos plastídios (figura 9 F).

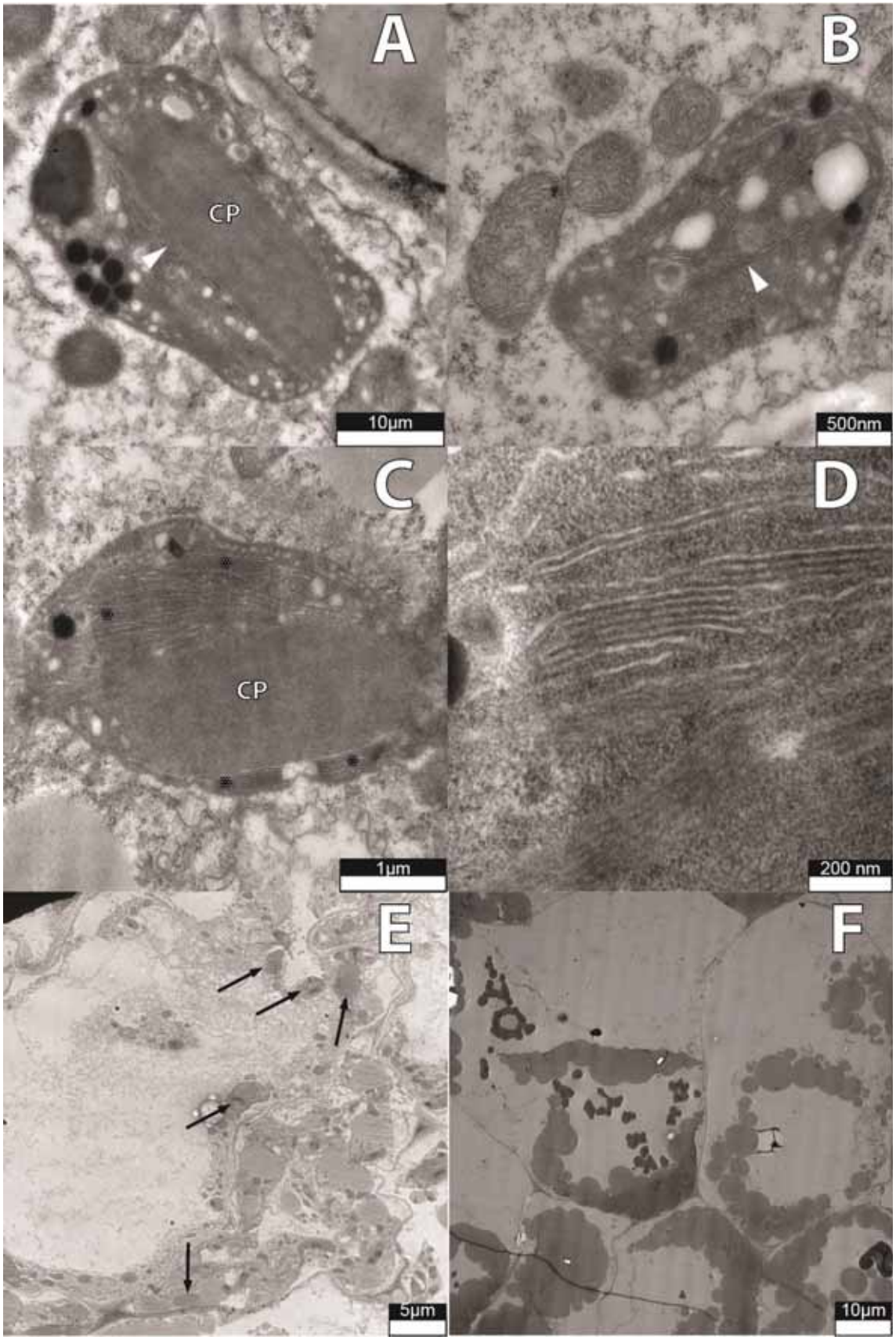

Figura 8: Cloroplastos no endosperma de sementes de *P. edulis*. A-B, 8DAS; C-D, 10 DAS. Em D, detalhe de grana. E, Localização dos cloroplastos na célula. F, 10 DAS germinadas em escuro contínuo, não apresentando plastídios. Legenda: cabeças de seta, tilacóides; setas, cloroplastos; CP, Corpo prolamelar; *, grana.

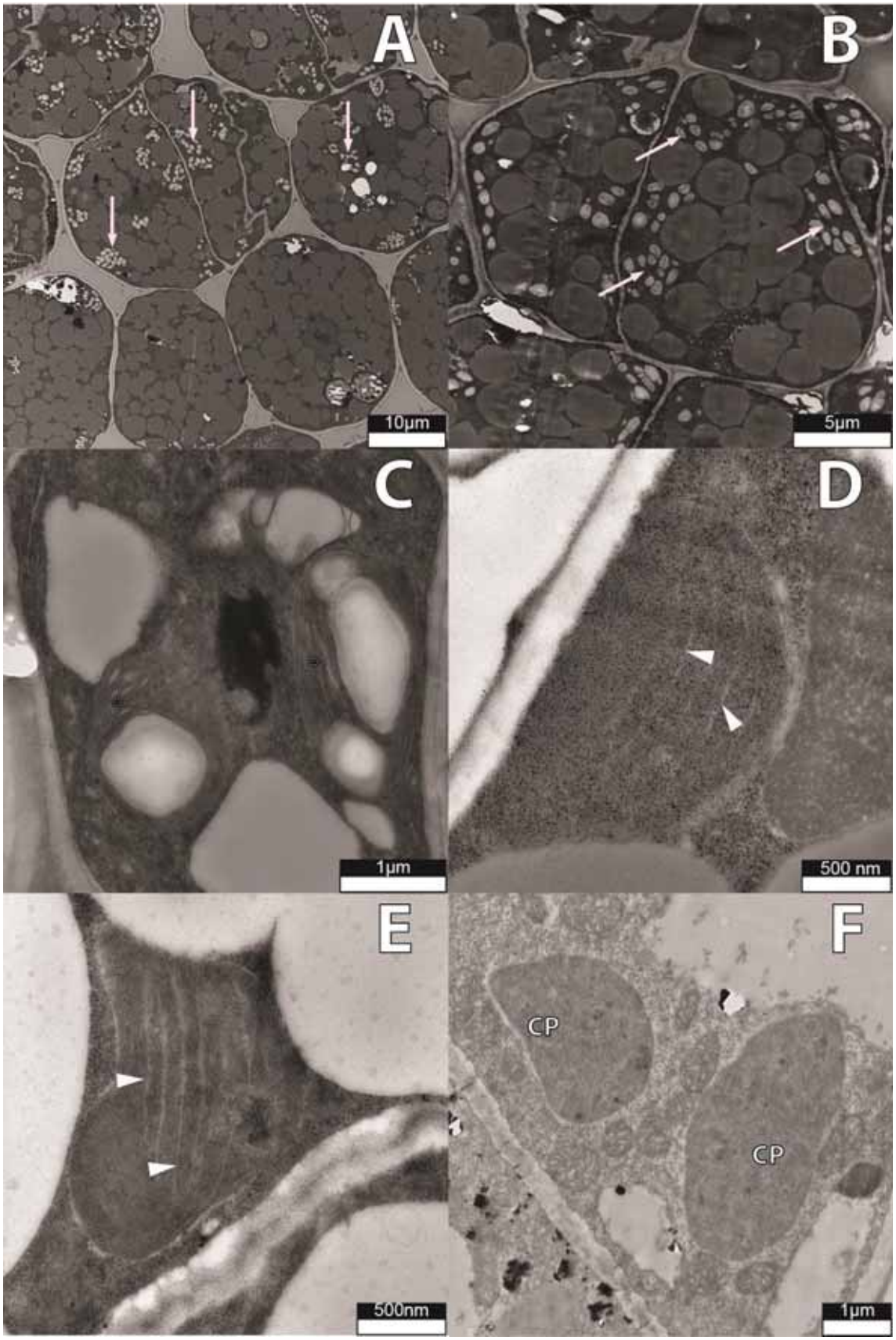

Figura 9: A, B e C – Plastídios de cotilédones da semente de *P. edulis* em 8, 10 e 14 DAS germinados sob luz contínua, respectivamente, com formação de amido em seu interior. D, E e F, plastídios de cotilédones de 8, 10 e 14 DAS germinados sob escuro contínuo, não apresentando amido em seu interior. Legenda: Cabeças de seta, tilacóides; setas, amiloplasto; CP, corpo prolamelar; *, grana.

Microscopia Confocal

- Endosperma

A resposta fluorescente começou a aparecer em 8 DAS na luz branca (figura 10 C-D), mantendo a resposta de fluorescência em 10 DAS (figura 10 E-F). A localização dos pontos de fluorescência coincidiu com a localização celular dos plastídios na microscopia eletrônica de transmissão, à margem da célula (Figura 11 A-B). Para facilitar a compreensão do texto a seguir, os pontos de fluorescência serão tratados como plastídios (figuras10 e 11).

Os plastídios foram observados por todo o tecido. O início da resposta fluorescente no tecido coincidiu com a transição para a coloração verde apresentada pelo tecido, coloração esta que aparece nas partes expostas à luz durante a germinação. Nos locais onde o tegumento da semente recobre o endosperma, uma coloração branco-amarelada estava presente.

Nenhuma resposta de fluorescência foi observada no endosperma de sementes germinadas no escuro contínuo (figura 11 A-B).

- Cotilédones

Os cotilédones de sementes germinadas sob luz branca apresentaram plastídios, com o seu aparecimento iniciando-se aos 6 DAS, predominantemente concentrados nos estômatos dos cotilédones inicialmente (figura 12 A-B), e na sequência, aos 8 e 10 DAS foram encontrados pela lâmina, nas regiões entre as nervuras (figura 13 C-F). A sua localização no interior da célula foi difusa, não estando relegado à qualquer região em particular. O aparecimento dos plastídios foi acompanhado por uma mudança de coloração dos cotilédones, passando de brancos a verdes.

Os cotilédones de sementes germinadas sob escuro contínuo também apresentaram resposta de fluorescência e, consequentemente, plastídios. Sua observação também se deu aos 6 DAS, inicialmente concentrados nos estômatos (figura 12 C-D), e na sequência aparecendo no restante dos cotilédones, aos 8 e 10 DAS nas regiões entre as nervuras (figura 14 A-B). O aparecimento dos plastídios no escuro também foi acompanhado por uma mudança na coloração dos cotilédones, porém, diferentemente do observado

sob luz branca, no escuro contínuo os cotilédones passaram de branco a branco-amarelado, coloração de folhas em estado de clorose.

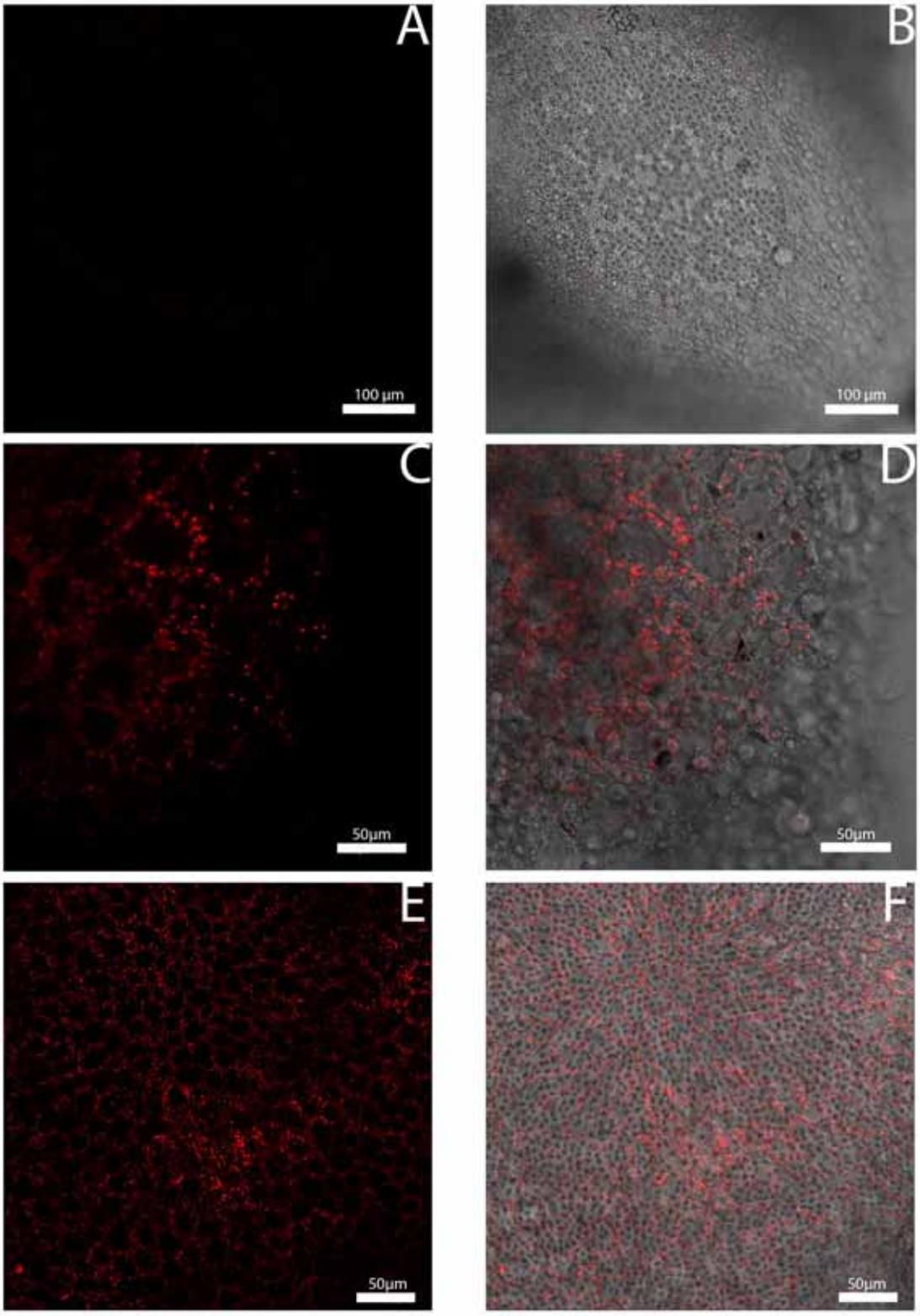

Figura 10: Microscopia confocal do endosperma de *P. edulis* sob luz branca contínua. A-B 0 DAS, C-D 8 DAS e E-F 10 DAS. A, C, E – Somente resposta de fluorescência; B, D, F – resposta de fluorescência sobreposta à imagem feita por diferença de contraste de interferência.

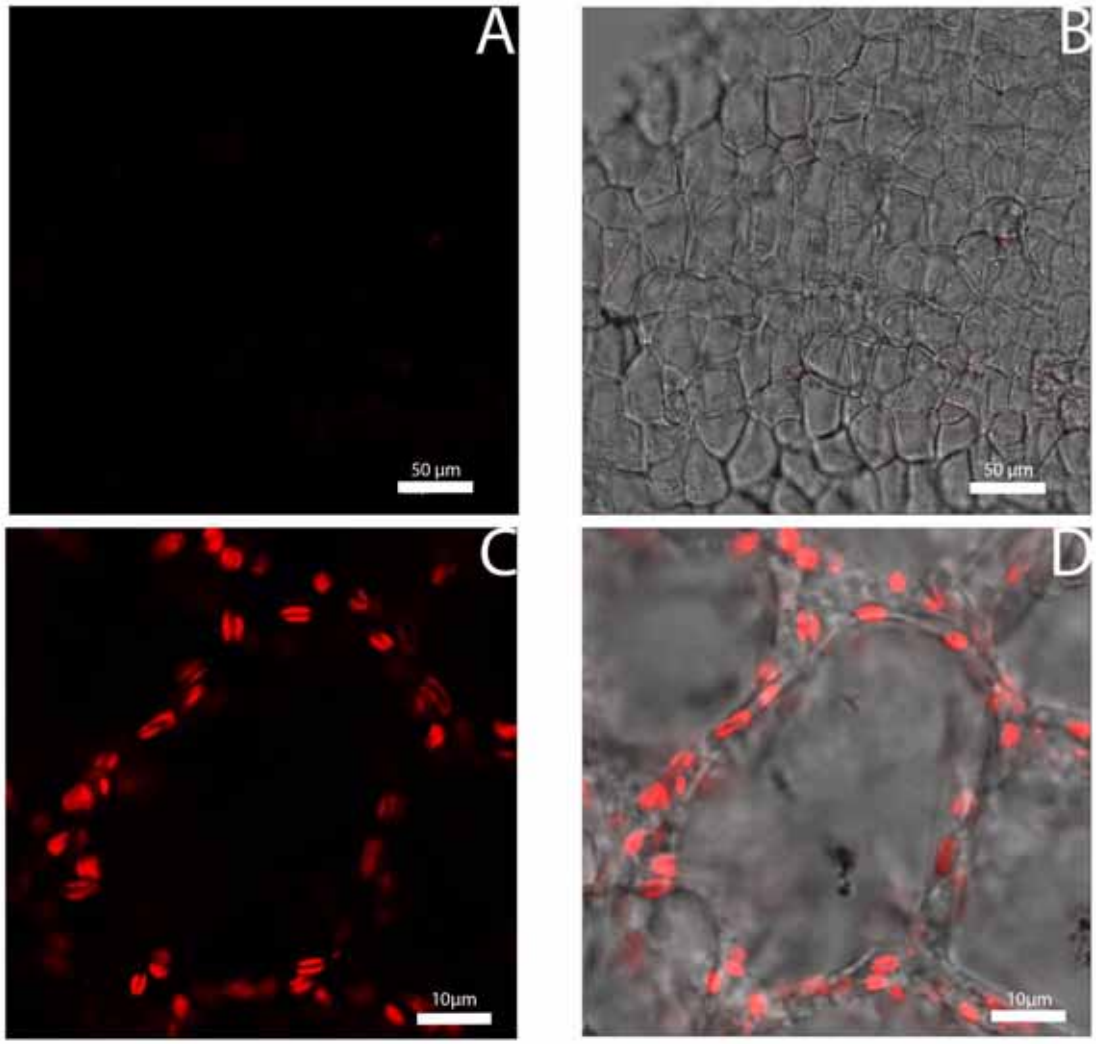

Figura 11: Microscopia confocal de *P. edulis*. A-B 10 DAS sob escuro contínuo, C-D detalhe da localização dos cloroplastos no endosperma sob luz contínua a 10 DAS, à margem das células. A, C – Somente resposta de fluorescência; B,D – resposta de fluorescência sobreposta à imagem feita por diferença de contraste de interferência.

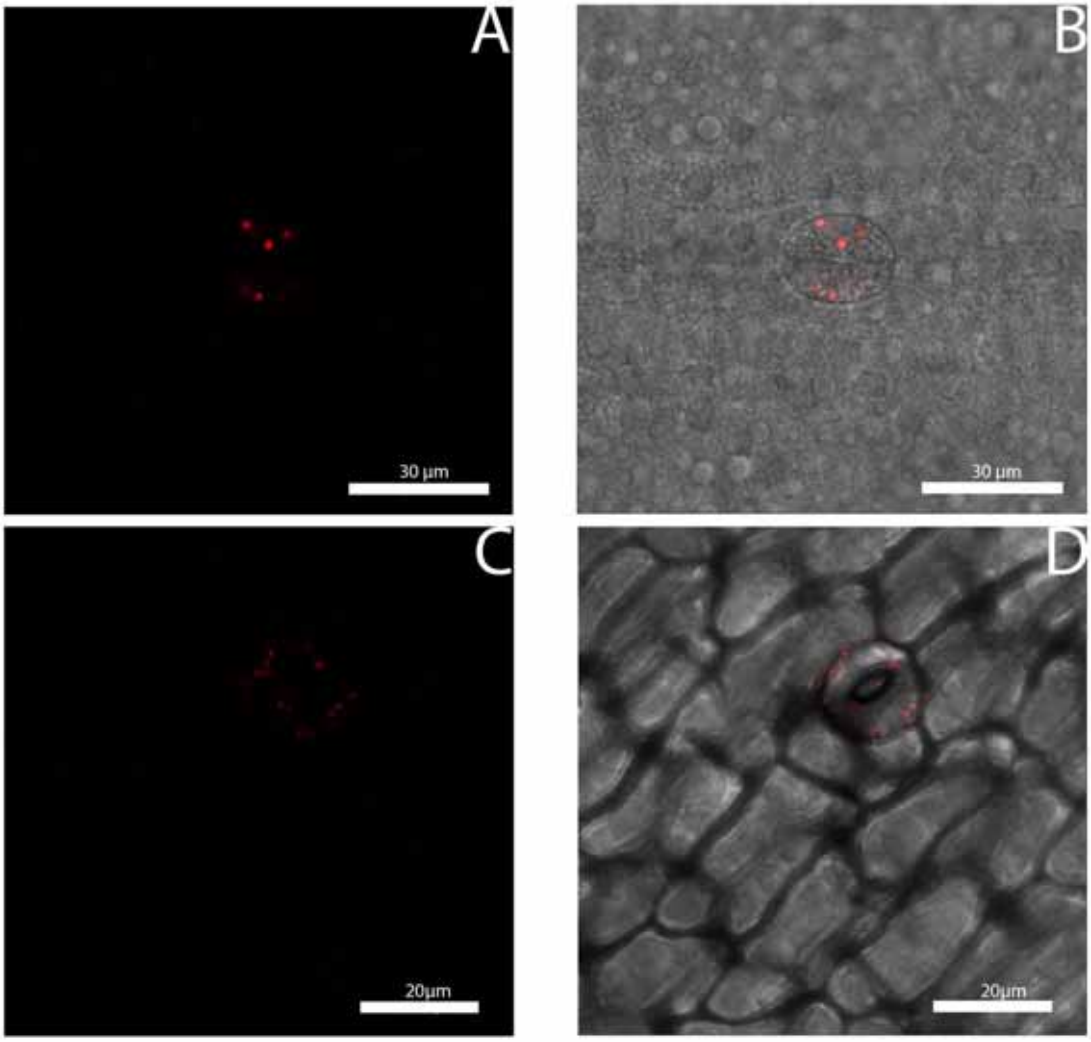

Figura 12: Observação dos cloroplastos nos estômatos dos cotilédones de *P. edulis*, em 6 DAS. A-B sob luz branca, C-D escuro contínuo. A, C – Somente resposta de fluorescência; B,D – resposta de fluorescência sobreposta à imagem feita por diferença de contraste de interferência.

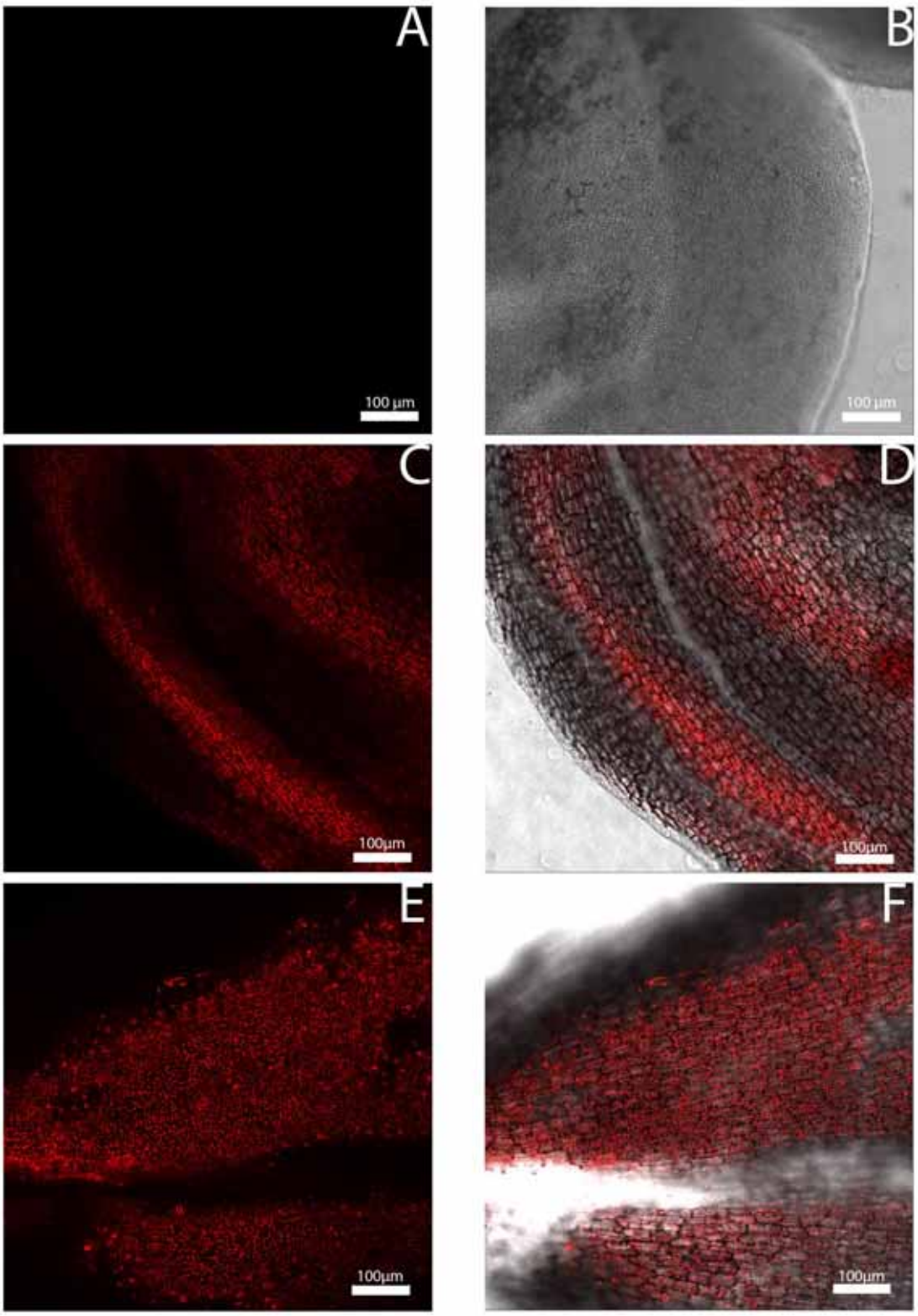

Figura 13: Microscopia confocal dos cotilédones de *P. edulis* sob luz branca contínua. A-B 0 DAS, C-D 8 DAS, E-F 10 DAS. A, C, E – Somente resposta de fluorescência; B,D,F – resposta de fluorescência sobreposta à imagem feita por diferença de contraste de interferência.

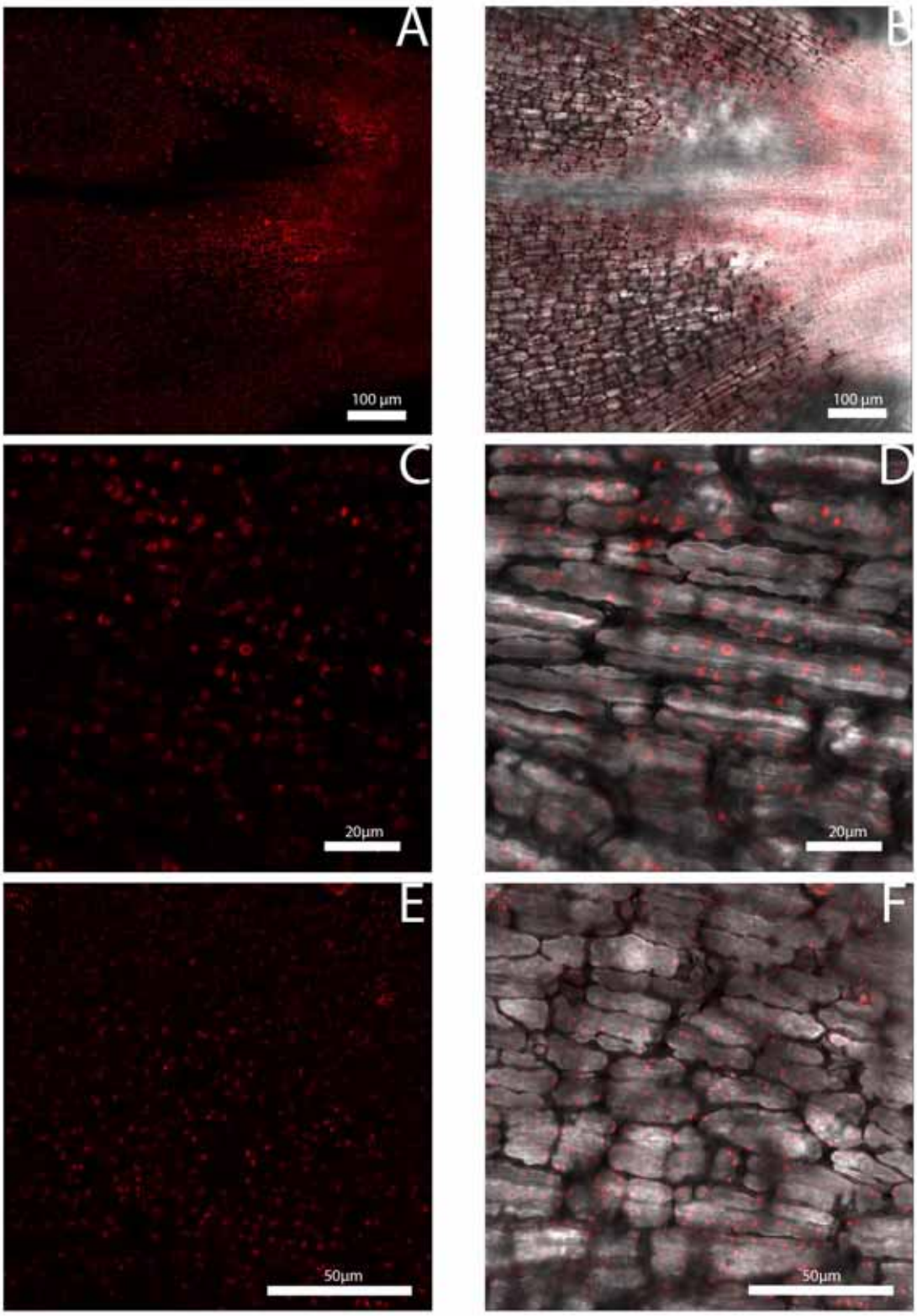

Figura 14: Microscopia confocal dos cotilédones de *P. edulis.* A-B 10 DAS sob escuro contínuo. C-D detalhe da localização dos plastídios nas células em 10 DAS sob luz branca contínua, encontrados de forma difusa nas células deste tecido. E-F detalhe da localização dos plastídios nas células em 10 DAS sob escuro contínuo, também de forma difusa neste tecido. A, C, E – Somente resposta de fluorescência; B, D, F – resposta de fluorescência sobreposta à imagem feita por diferença de contraste de interferência.

Análise de Ácidos Graxos

- Ácidos Graxos no Endosperma

Quatro tipos de ácidos graxos foram encontrados no endosperma de *P. edulis*: ácido palmítico (C16:0), ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2) e ácido esteárico (C18:0). O ácido oléico representa a maior porção de ácidos graxos no endosperma, consistindo em 65,05% do total de ácidos graxos, seguido pelo ácido linoleico (17,60%), palmítico (11,95%) e por último o esteárico (5,40%).

- Consumo de ácidos Graxos no Endosperma

O consumo de ácidos graxos no endosperma apresentou um padrão dependente da situação luminosa durante a germinação. Na luz branca contínua, o consumo dos ácidos graxos foi evidente entre o sexto e oitavo dia após a semeadura (figura 15-A), período em que a germinação chega próxima dos 80%. Já no escuro, o início do consumo é evidenciado entre o segundo e o quarto dia após a semeadura (figura 15-B). No entanto, neste período a germinação atingiu cerca de 40%.

A análise estatística do consumo de ácidos graxos entre os tratamentos luz branca contínua e escuro, nos tempos de 0 a 10 dias após a semeadura, deixou clara a diferença no padrão de sua mobilização. Há diferença significativa na mobilização de todos os ácidos graxos entre os dois tratamentos a partir do sexto dia após a semeadura ($P<0,05$).

- Ácidos graxos nos cotilédones

Assim como no endosperma, foram encontrados os ácidos palmítico, oléico, linoléico e esteárico, em proporções similares às observadas no endosperma. O ácido oléico foi encontrado em maior quantidade também nos cotilédones (56,49%), seguido pelo ácido linoleico (25,05%), palmítico (12,94%) e esteárico (5,52%).

- Consumo de ácidos graxos nos cotilédones

O consumo de ácidos graxos nos cotilédones foi evidenciado a partir do sexto dia após a semeadura nas sementes submetidas à luz branca (figura 15-C), e em torno do quarto dia nas sementes submetidas ao escuro (figura 15-D).

Na comparação entre os tratamentos luz branca e escuro a cada dia de coleta, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

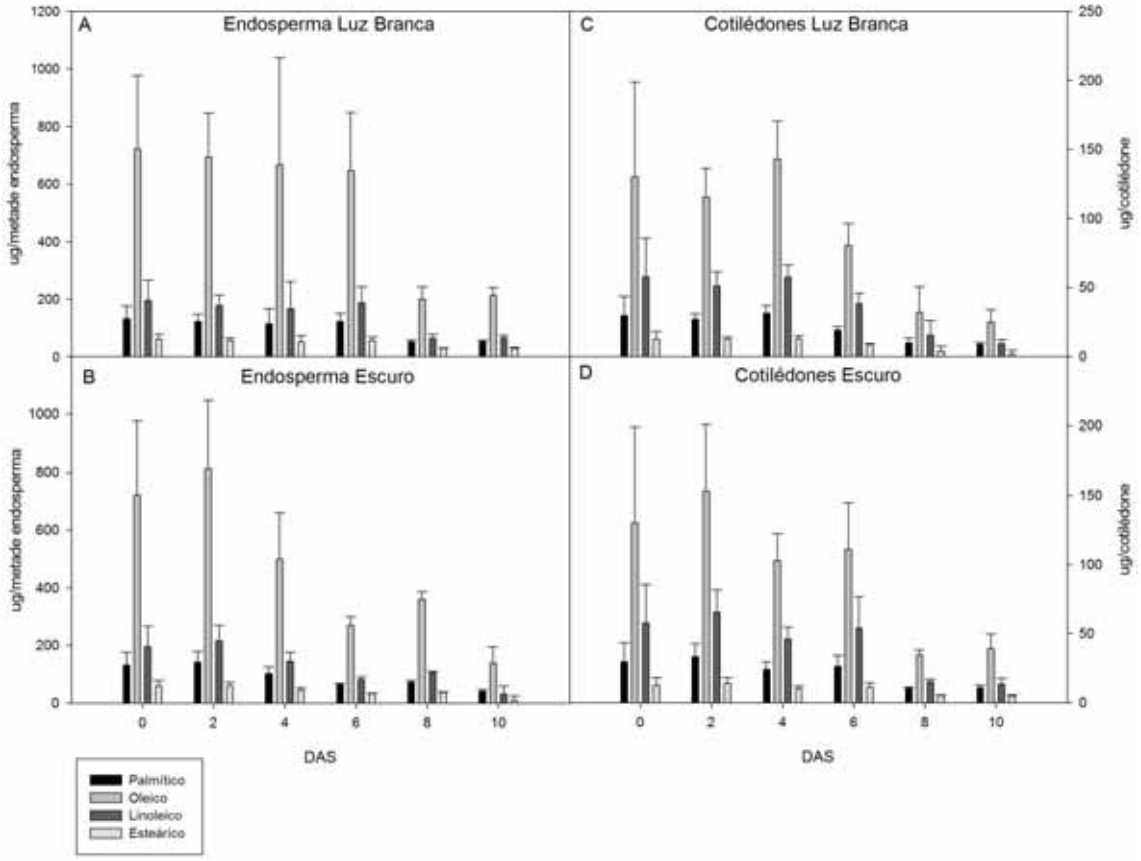

Figura 15: Consumo de ácidos Graxos no endosperma (A-B) e nos cotilédones (C-D) da semente de *P. edulis*. As barras de erro representam o desvio padrão.

Análise de Açúcares

- Endosperma

De uma maneira geral, os açúcares observados no endosperma, tanto de sementes germinadas sob luz branca quanto no escuro, apresentaram um comportamento variável em seus níveis. Sob luz branca, houve uma queda nos níveis de galactose durante os 8 primeiros DAS, e um aumento ao décimo DAS; a fucose apresenta um leve incremento aos 2 DAS, seguido de queda até o oitavo, e um incremento ao décimo DAS; já arabinose apresentou níveis-traço até o oitavo DAS, seguido por um incremento de quase 1,5x em sua média ao décimo dia; a glucose mostrou níveis estáveis durante os oito primeiros DAS, em torno de 5 µg/endosperma, saltando para um nível próximo de 50µg/endosperma aos 10 DAS; manose apresentou um leve incremento em relação ao seu valor inicial aos 2 DAS, e seguiu em queda até o oitavo DAS, subindo para valores superiores aos iniciais aos 10 DAS; por fim, o mio-inositol mostrou um padrão errático, tendo um incremento notável em relação ao valor inicial aos 4 DAS, caindo a valores muito baixos em 8 DAS, e novamente voltando a valores altos aos 10 DAS (figura 16).

No escuro contínuo, alguns açúcares apresentaram padrões semelhantes aos observados sob luz branca contínua, enquanto outros mostraram-se completamente diferentes. A galactose mostrou uma queda em relação ao nível inicial aos 2 e 4 DAS, mostrando um leve incremento após o sexto DAS, embora não tenha variado muito após esse período, e não chegando aos mesmos níveis observados sob luz branca; já a fucose mostrou um padrão de incremento em relação ao nível inicial aos 2 DAS, seguido de queda até o oitavo DAS, mas uma queda menos expressiva do que o observado na luz; por sua vez, a arabinose mostrou um incremento em relação aos valores iniciais aos 4 DAS, apresentando diminuição aos 6 DAS e chegando a zero em 8 e 10 DAS; glucose apresentou níveis estáveis, entre 5 e 10 µg/endosperma até o sexto DAS, aumentando expressivamente aos 8 e 10 DAS, chegando a 50 µg/endosperma; a manose foi a que apresentou o padrão mais errático, mostrando incrementos aos 4 e 8 DAS, enquanto em 6 e 10 DAS mostrou níveis próximos de zero. Por fim, o mio-inositol mostrou padrões opostos aos observados em luz branca: aos 2 DAS há um incremento na média de mio-inositol, diminuindo aos 4 DAS, e subindo novamente aos 6 e 8 DAS.

Aos 10 DAS, os níveis de mio-inositol no endosperma de sementes germinadas sob luz branca e escuro contínuo foramsemelhantes (figura 16).

A rafinose foi encontrada no endosperma somente no tempo 0, ou seja, na semente quiescente. Nos outros tempos de germinação, este oligossacarídeo não foi identificado tanto no endosperma de sementes germinadas sob luz branca contínua quanto no endosperma de sementes germinadas sob escuro contínuo (17).

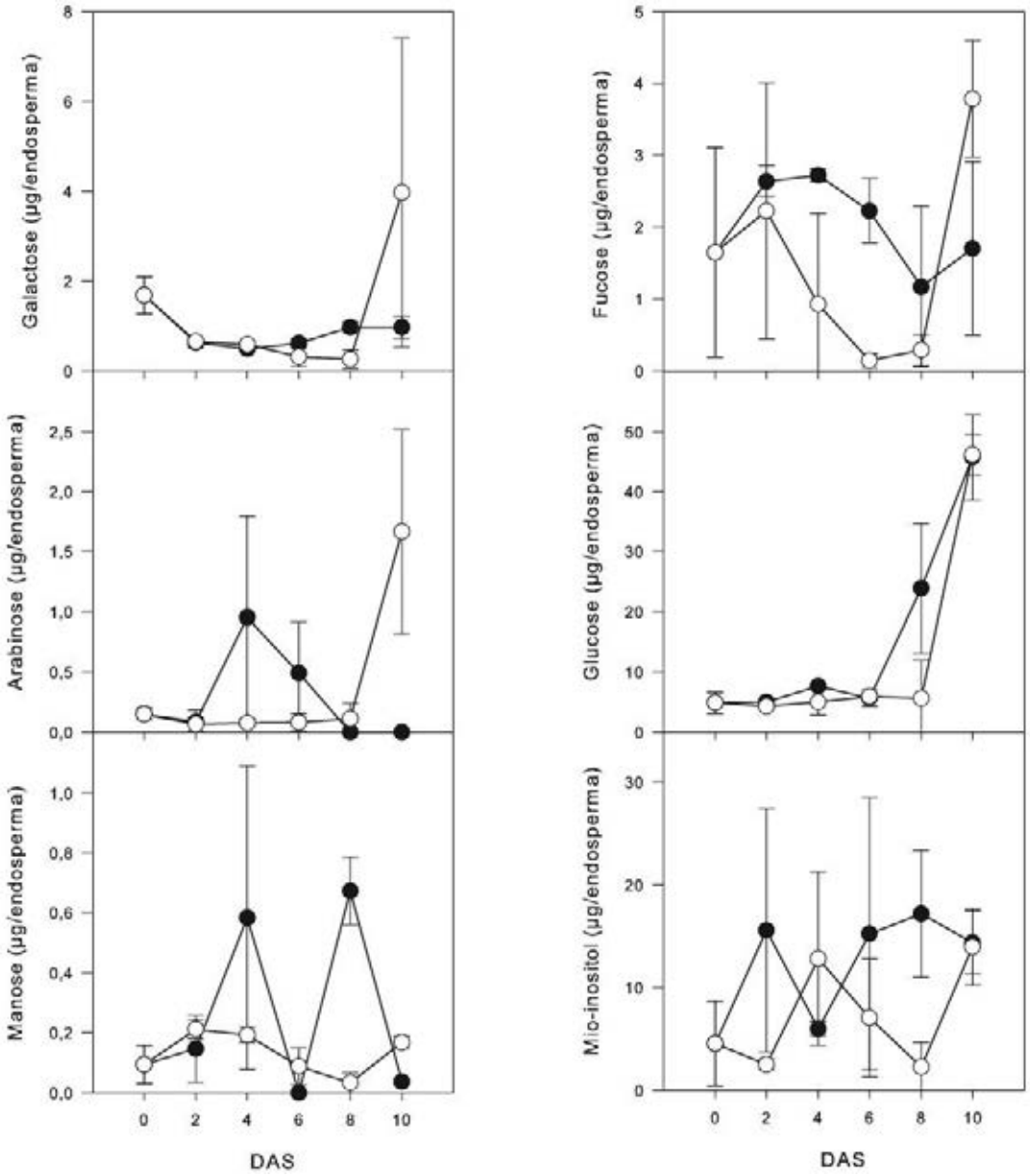

Figura 16: Conteúdo de Carboidratos Livres no endosperma da semente de *P. edulis*. -○- luz branca contínua, -●- escuro contínuo. As barras de erro representam o desvio padrão.

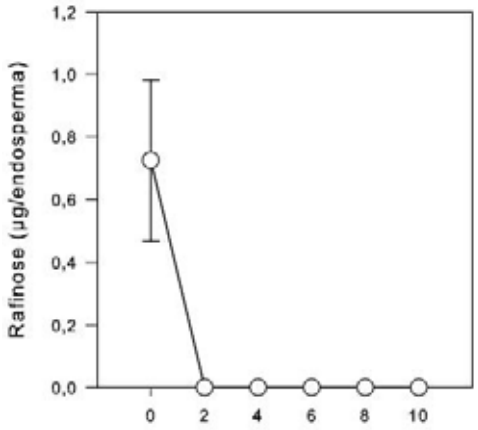

Figura 17: Conteúdo de rafinose no endosperma da semente de *P. edulis*. Há rafinose somente no tempo 0, portanto na semente quiescente. Nos outros tempos rafinose não foi identificada, tanto para sementes germinadas sob luz branca contínua quanto escuro contínuo. -o- luz branca contínua, -●- escuro contínuo. As barras de erro representam o desvio padrão.

- Cotilédones

Diferentemente do observado no endosperma, os açúcares livres nos cotilédones seguiram um padrão menos errático e, de certa forma, mais como o esperado, com níveis baixos nos tempos iniciais após a semeadura, aumentando (ou variando) nos tempos após a protrusão da raiz primária, e mostrando um aumento pronunciado por volta de 10 DAS, tanto nos cotilédones de sementes germinadas sob luz branca contínua quanto em cotilédones de sementes germinadas em escuro contínuo.

Nos cotilédones de sementes germinadas sob luz branca contínua, os açúcares livres mostraram os seguintes resultados: houve pouca variação nas médias de galactose, muito próximas de zero durante todo o tempo; fucose apresentou uma pequena variação durante os primeiros 8 DAS, tendo um aumento substancial aos 10 DAS; já arabinose apresentou valores zero durante os 8 primeiros dias, aumentando expressivamente em 10 DAS; glucose apresentou valores entre zero e 1 até 8 DAS, aumentando para cerca de 30 µg/cotilédone aos 10 DAS; a média de manose ficou em zero até o sexto DAS, apresentando leve incremento aos 8 DAS, e tendo novo incremento aos 10 DAS; por fim, o mio-inositol apresentou valores próximos de zero durante os 8 primeiros DAS, com sua média aumentando para cerca de 7 µg/cotilédone aos 10 DAS (figura 18).

Apresentando alguns padrões diferentes, os resultados observados em cotilédones de sementes germinadas no escuro foram os seguintes: galactose

apresentou níveis muito próximos de zero durante os 6 primeiros DAS, aumentando seus valores expressivamente aos 8 e 10 DAS; fucose, por sua vez, teve pouca variação durante os 6 DAS iniciais, mostrou um leve incremento em 8 DAS, e voltou a zero em 10 DAS; arabinose não mostrou variação nas médias, todas apresentando-se em zero durante os 10 DAS; já a glucose apresentou valores próximos de zero durante os 6 primeiros DAS, saltando para uma média de cerca de 43 µg/cotilédone aos 8 DAS, e de cerca de 161 µg/cotilédone aos 10 DAS; manose mostrou uma variação errática, mostrando valores diferentes de zero em 4, 8 e 10 DAS, sendo o valor de 10 DAS o maior em média, apesar de seu grande desvio padrão; por fim, o mio-inositol apresentou valores muito próximos de zero durante os 6 primeiros DAS, aumentando ao oitavo e décimo DAS, alcançando médias maiores do que o observado em cotilédones de sementes germinadas sob luz branca contína em tempos similares (figura 18).

Em relação à rafinose, esta foi observada aos 2 DAS. Nos outros tempos de germinação, a rafinose não foi identificada tanto nos cotilédones de sementes germinadas sob luz branca contínua quanto em cotilédones de sementes germinadas sob escuro contínuo (figura 19).

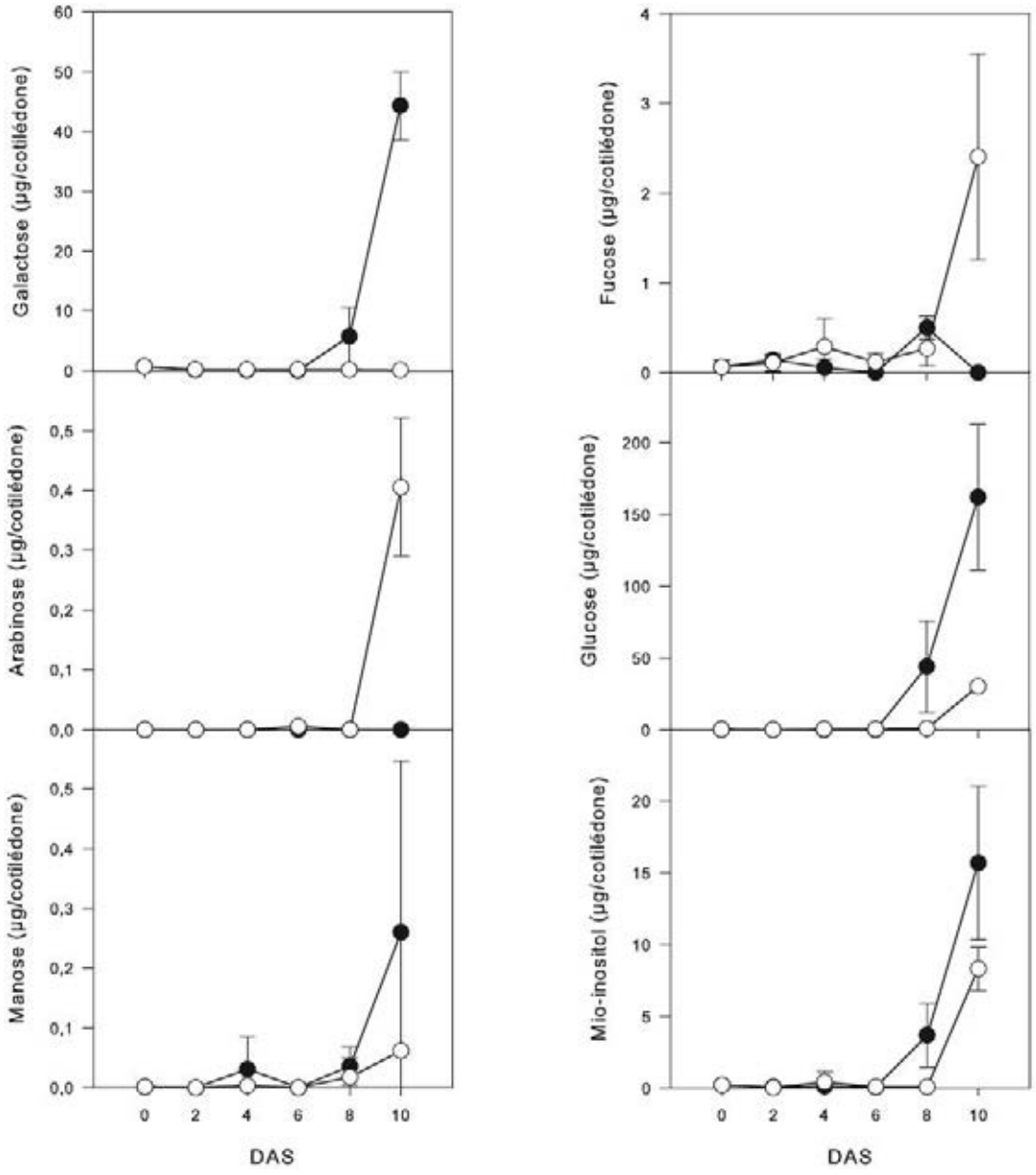

Figura 18: Conteúdo de Carboidratos livres nos cotilédones da semente de *P. edulis*. -○- luz branca contínua, -●- escuro contínuo. As barras de erro representam o desvio padrão.

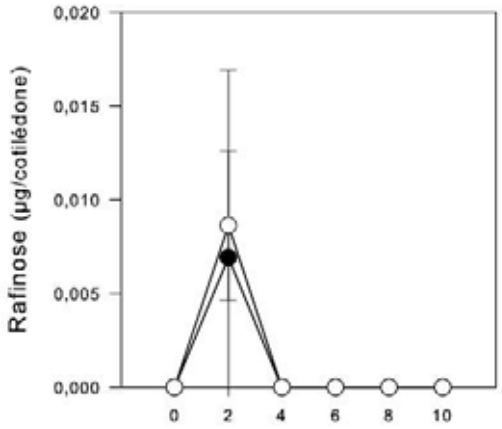

Figura 19: Conteúdo de rafinose nos cotilédones da semente de *P. edulis*. Há um pico de rafinose aos 2 DAS tanto na luz branca quanto no escuro. -o- luz branca contínua, -●- escuro contínuo. As barras de erro representam o desvio padrão.

Massa seca de endospermas e cotilédones ao longo da germinação e crescimento inicial

A massa seca dos endospermas mostrou decréscimo ao longo dos 6 primeiros dias de germinação, sendo que este decréscimo foi estatisticamente significante ao décimo DAS nas sementes germinadas sob luz branca, e ao oitavo e décimo dia nas sementes germinadas no escuro. É notável que, sob luz branca, a massa seca do endosperma pouco varia até o oitavo dia, sofrendo um decréscimo pronunciado entre o oitavo e décimo dia, enquanto que no escuro o decréscimo na massa seca foi praticamente linear após o quarto DAS, sendo mais pronunciado do que o observado em endospermas de sementes germinadas sob luz branca contínua (figura 20).

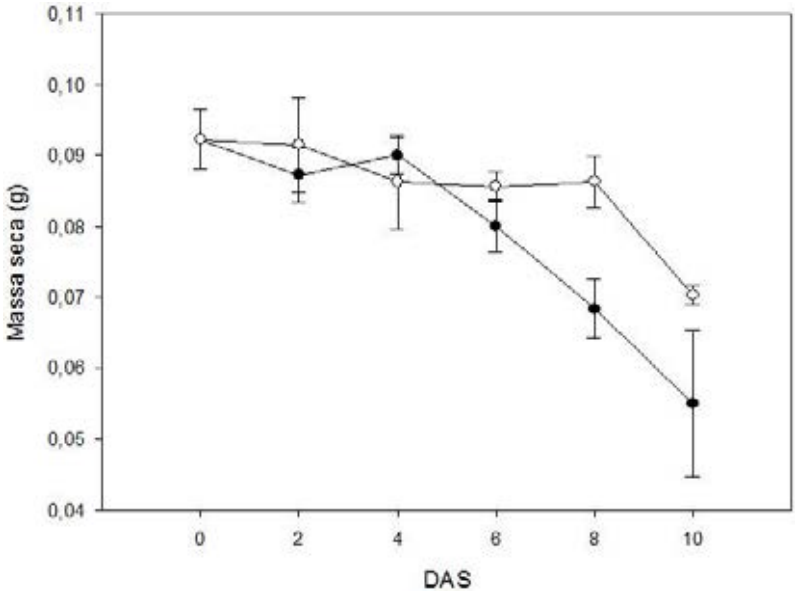

Figura 20: Decréscimo da massa seca no endosperma da semente de *P. edulis* durante a germinação. As barras de erro mostram o desvio padrão. -o- luz branca contínua, -●- escuro contínuo.

Em relação aos cotilédones, o inverso do que ocorreu no endosperma foi observado (figura 21). Houve um incremento de massa seca tanto na luz branca quanto no escuro, sendo que sob luz branca contínua esse incremento foi significante estatisticamente ao décimo dia, e sob escuro contínuo esse incremento foi significativo ao oitavo e décimo dia DAS. Nota-se também que o incremento na massa seca é bastante pronunciado após o sexto dia nos cotilédones de sementes germinadas no escuro, sendo a média ao décimo dia cerca de 1,6x maior do que a média de massa seca dos cotilédones de sementes germinadas sob luz branca contínua.

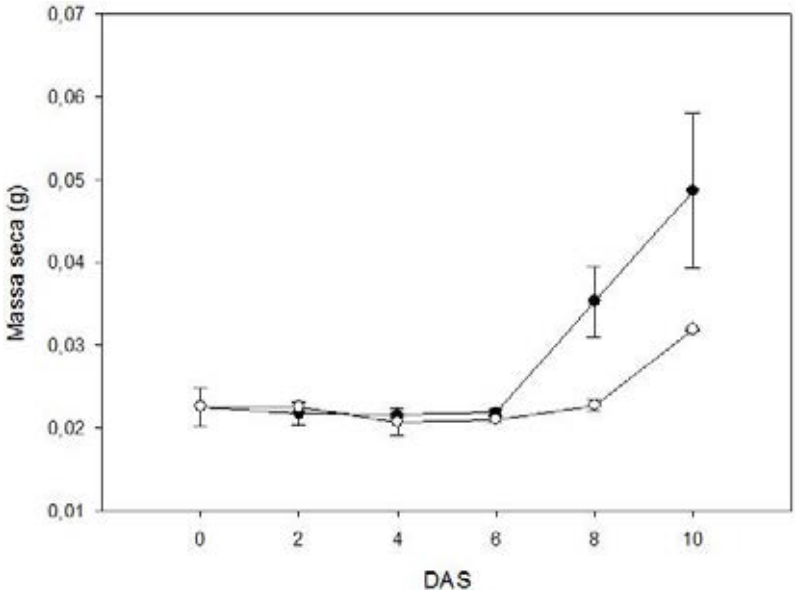

Figura 21: Incremento da massa seca nos cotilédones, hipocótilo e raiz da semente de *P. edulis* durante a germinação. As barras de erro mostram o desvio padrão. -o- luz branca contínua, -●- escuro contínuo.

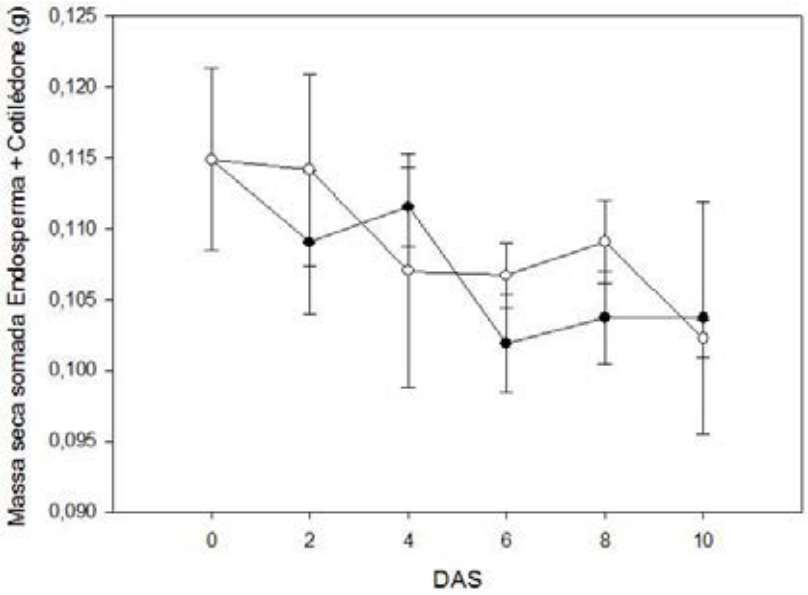

Figura 22: Massas somadas dos endospermas e cotilédones de sementes de *P. edulis* em cada tratamento luminoso, evidenciando que não há diferenças na assimilação de massa seca entre os tratamentos. As barras de erro mostram o desvio padrão. -o- luz branca contínua, -●- escuro contínuo.

Análise do crescimento em casa de vegetação

- Massa Seca Folhas, raízes e caule

Nas folhas e raízes, observamos que as médias de massa seca foram maiores nas plântulas oriundas de sementes que tiveram seu endosperma mantido, sendo a maior média observada em plântulas de sementes germinadas sob luz branca (LCE), e na sequência plântulas oriundas de sementes germinadas no escuro (ECE). As plântulas provenientes de sementes germinadas sob luz branca e que tiveram seu endosperma removido (LSE) apresentaram massa seca inferior aos tratamentos anteriormente citados, porém maior que a massa seca observada em plântulas provenientes de sementes germinadas no escuro e endosperma retirado (ESE), apresentando a menor média observada (tabela1)

Estatisticamente, para as médias acima mencionadas, só houve diferença significativa nos tratamentos LCE x ESE e ECE x ESE. Todos os outros tratamentos não diferiram entre si.

Já para a massa seca dos caules, a ordem foi, respectivamente do maior para o menor, LCE>LSE>ECE>ESE; apesar do padrão seguido na massa seca de folhas e raiz, aqui as maiores massas secas observadas foram as de

plântulas oriundas de sementes germinadas sob luz branca contínua, independentemente da retenção do endosperma.

Houve diferença significativa entre os tratamentos LCE x ESSE (P<0,001), LSE x ESE (P=0,002) e ECE x ESE(P=0,002) em relação à massa seca dos caules.

Tabela 1 - Massa Seca dos tecidos

Tratamento	Folhas (mg)	Raiz (mg)	Caule (mg)
LSE	89,8±14,9	50,3±5,6	24,2±5,6
LCE	116,4±37,8	69,1±22,7	28,0±6,5
ESE	58,8±21,3	37,0±15,0	12,5±4,5
ECE	105,3±21,6	61,2±9,4	23,8±5,3

- Área Foliar e área foliar específica

As médias das áreas foliares diferiram significativamente entre os tratamentos LCE x ESE e ECE x ESE (P<0,001), sendo a ordem observada, do tratamento com maior área foliar para o tratamento com menor, LCE>ECE>LSE>ESE. Os valores das médias estão resumidos na tabela 2.

Já a área foliar específica média de cada tratamento apresentou diferenças significativas somente entre os tratamentos LCE x ESE (P=0,041), seguindo a ordem da maior área foliar específica para a menor: ESE>ECE>LSE>LCE. As médias estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2 - Área foliar e área foliar específica

Tratamento	Área Foliar (cm^2)	Área Foliar Específica (cm^2g^{-1})
LSE	26,44±4,02	29,6±3,6
LCE	31,0112±7,27	27,3±3,0
ESE	19,7500±4,29	34,8±5,4
ECE	30,7850±2,69	30,4±7,2

- Assimilação de CO_2 e Área foliar específica x Assimilação de CO_2

As médias de assimilação de CO_2, assim como as médias de área foliar específica x assimilação de CO_2 não diferiram significativamente entre os tratamentos (P= 0,300 e P=0,243, respectivamente), ao contrário do esperado. As médias estão representadas nas figuras 23 e 24. A maior média de assimilação de CO_2 foi apresentado pelo tratamento LCE, enquanto o

tratamento que apresentou maior média de assimilação de CO2 x Área foliar específica foi o de plântulas oriundas de sementes germinadas no escuro que tiveram seu endosperma retirado.

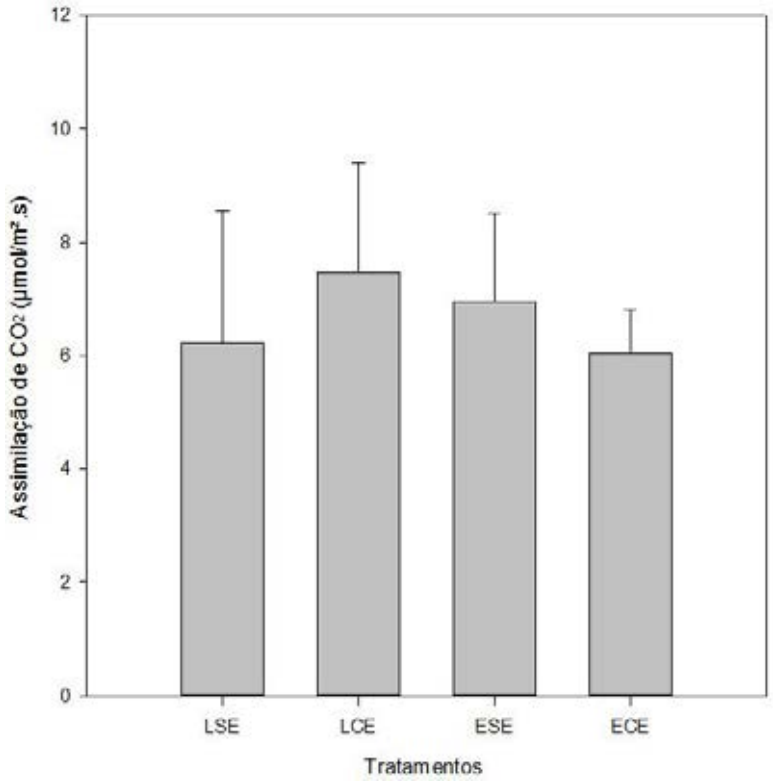

Figura 23: Assimilação de CO_2 em cada um dos tratamentos. As barras representam o desvio padrão das médias.

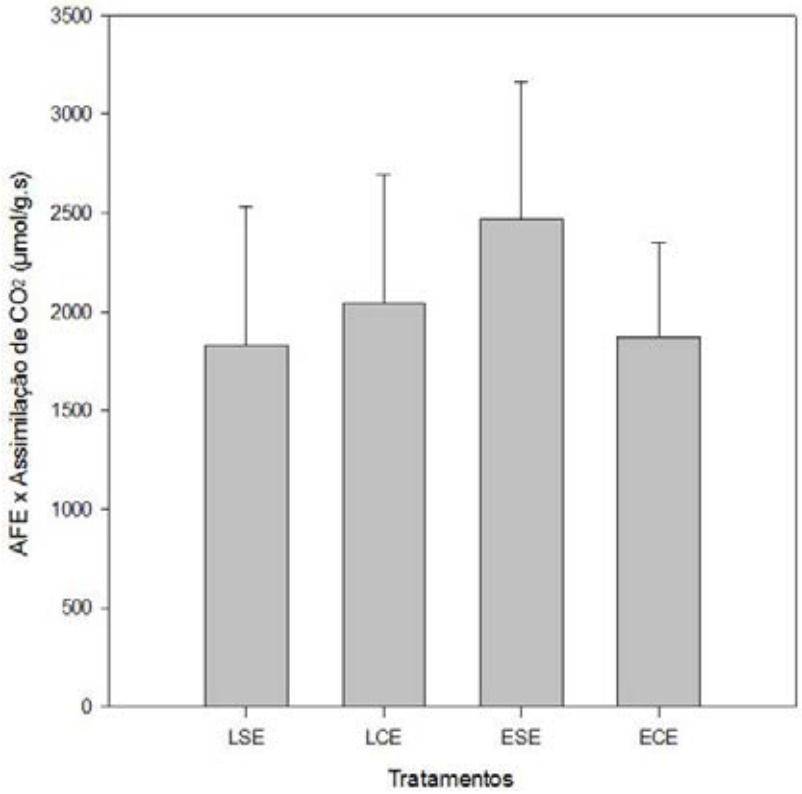

Figura 24: Área foliar específica (AFE) x assimilação de CO_2. As barras representam o desvio padrão das médias.

- Eficiência Quântica Potencial e Eficiência Quântica Efetiva

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as medições de eficiência quântica potencial (P=0,184). No entanto, os tratamentos cujas sementes foram germinadas sob luz branca contínua apresentaram médias maiores do que os tratamentos nos quais as sementes eram germinadas sob escuro contínuo (Figura 25). Já para as medidas de eficiência quântica efetiva, houve diferença significativa entre os tratamentos LSE x ECE (P<0,05). As maiores médias entre os tratamentos, neste caso, foram observadas em plântulas oriundas de sementes germinadas sob escuro contínuo (figura 26).

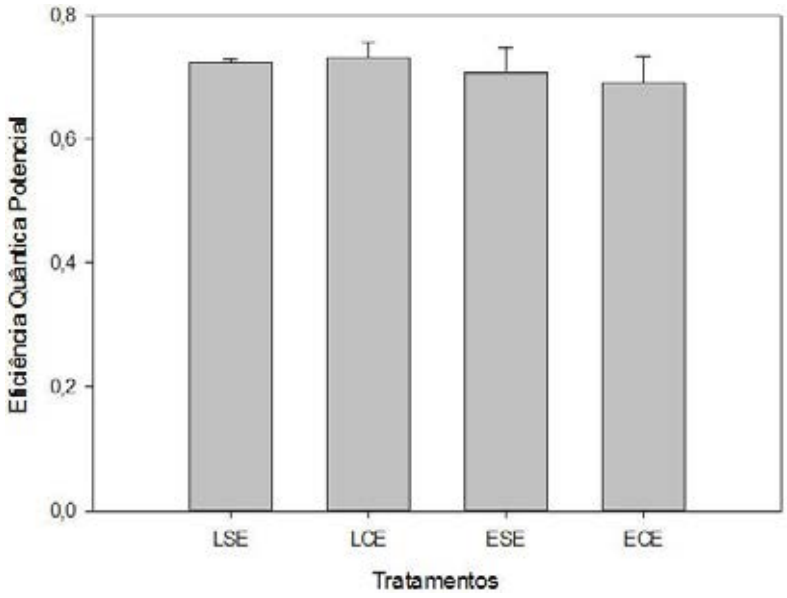

Figura 25: Eficiência Quântica Potencial do fotossistema II da plântula de *P. edulis*. As barras de erro mostram o desvio padrão.

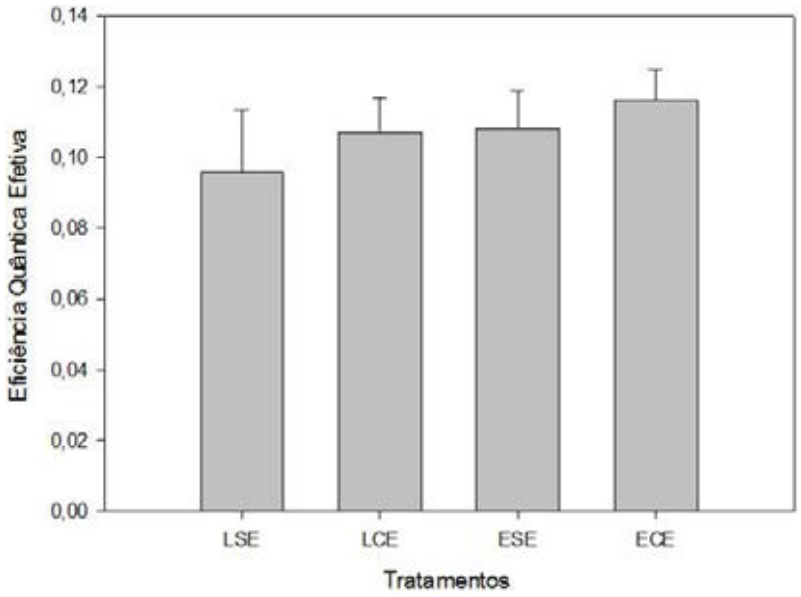

Figura 26: Eficiência Quântica Efetiva do fotossistema II da plântula de P. edulis. As barras de erro mostram o desvio padrão.

- Fração da luz utilizada no PSII, calor dissipado no complexo antena e calor dissipado no centro de reação

A fração da luz utilizada na fotoquímica pelo PSII (P) não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Já o calor dissipado no complexo antena (D) diferiu significativamente entre os tratamentos ESE x LCE, ESE x LSE e ECE x LCE ($P<0,05$). Neste tratamento, não houve diferença significativa entre os dois tratamentos de sementes que germinaram na luz (LSE x LCE) e entre os dois tratamentos de sementes que germinaram no escuro (ESE x ECE). Para o último parâmetro, o calor dissipado no centro de reação (E), houve diferença significativa entre os tratamentos de luz e escuro, ou seja, diferiram com significância estatística os tratamentos LSE x ESE, LSE x ECE, LCE x ESE e LCE x ECE ($P<0,05$), não havendo então diferença significativa entre os tratamentos dentro do grupo de sementes germinadas sob luz branca contínua ou sob escuro contínuo (figura 27).

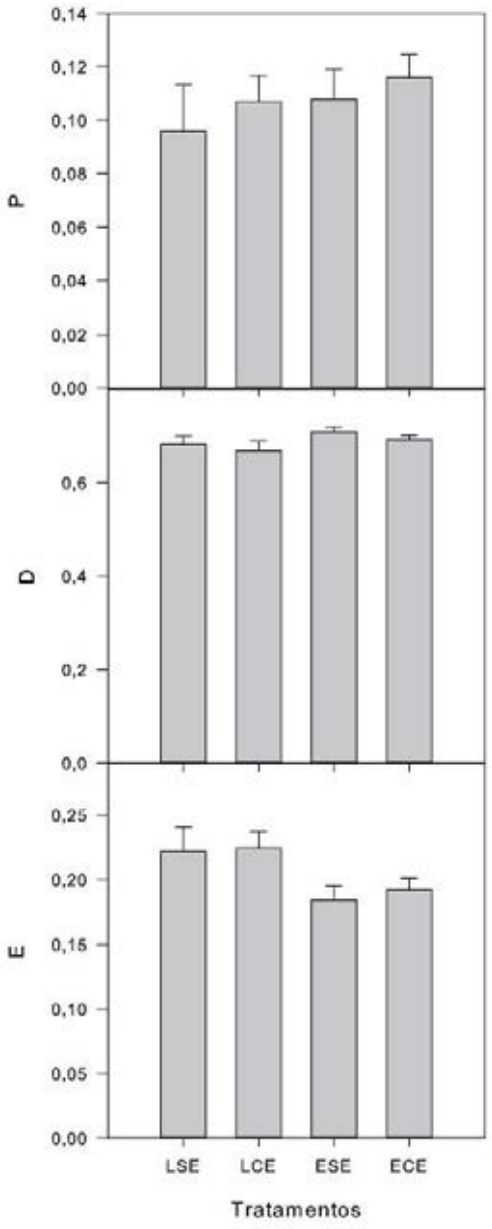

Figura 27: Fração da luz utilizada na fotoquímica pelo PSII (P), dissipação do calor no sistema antena (D) e dissipação do calor nos centros de reação (E) nas folhas da plântula de *P. edulis*. As barras de erro representam o desvio padrão.

DISCUSSÃO

Microscopia eletrônica – consumo de reservas

Os resultados nos mostraram que ainda há grande quantidade de material de reserva intra-celular em 8 e 10 DAS, e uma vez que a protrusão da raiz primária acontece entre 4 e 6 DAS tanto para sementes germinadas sob luz branca quanto sob escuro contínuo, pode ser inferido que, apesar do uso das reservas para a germinação, boa parte do material de reserva encontrado no endosperma é consumido durante o período de estabelecimento da plântula.

A grande quantidade de corpos lipídicos observada era esperada, uma vez que a semente desta espécie é classificada como oleaginosa (CORNER, 1976). A disposição em corpos discretos é semelhante ao encontrado em *Passiflora cincinnata* Mast. (ROCHA et al., 2011). Essa disposição provavelmente se deve a presença de oleosinas. Estas proteínas funcionam como mantedoras da integridade das gotas lipídicas como organelas discretas no citoplasma aquoso, e o tamanho da gota lipídica depende da razão oleosina:óleo. A vantagem das oleosinas está na criação de uma grande superfície de contato, devido à formação de muitas organelas discretas e evitando a aglutinação dessas gotas (LEPRINCE et al., 1998). Como a ação de lipases depende diretamente do contato com a interface das gotas lipídicas, a organização ultra-estrutural observada em *P. edulis* é otimizada para a mobilização das reservas lipídicas.

As organelas elétron densas que aparecem próximas das gotas lipídicas no endosperma são glioxissomos. Evidências como sua elétron-densidade e a presença de um cristaloide em seu interior são características chave na identificação, e sua estrutura é semelhante à observada em *Passiflora cincinnata* (ROCHA et al., 2011). Sua proximidade de gotas lipídicas é muito importante na mobilização de reservas, uma vez que essas organelas atuam diretamente na mobilização de lipídios, possuindo enzimas fundamentais do ciclo do glioxilato (GRAHAM, 2008).

O consumo dos corpos protéicos é bem evidente nos dez primeiros dias pós-semeadura tanto nos cotilédones como no endosperma. No endosperma,

ocorre de maneira semelhante ao observado por Zienkiewicz et al. (2011) em cotilédones de *Olea europaea* L., ocorrendo a formação de pequenos vacúolos no interior desses corpos, provavelmente devido a atividade de endo- e exo-peptidases presentes no seu interior (BEWLEY & BLACK, 1994, MÜNTZ, 2001), com posterior fusão de corpos protéicos menores para a formação de maiores. Não fica claro se a formação dos vacúolos no endosperma de *P. edulis* se dá da mesma maneira proposta por Zienkiewicz e colegas (2011), mas a ocorrência da aglutinação de corpos protéicos é uma forte evidência, assim como as marcações elétron densas vistas dentro do vacúolo na figura 2, que podem ser restos de matriz protéica de corpos que se fundiram, formando o grande vacúolo presentes nas células do endosperma. Vale ressaltar que padrão semelhante não foi observado nas células dos cotilédones, porém, pode ser em razão do período estudado ser curto para que estes processos sejam acompanhados.

A alteração no formato do núcleo, de compacto e fibrilar para seu formato arredondado e granuloso, está condizente com outras espécies de sementes ortodoxas, como o milho (DELTOUR et al, 1979). A grande presença de eucromatina e um nucléolo bem desenvolvido indicam alta atividade metabólica, especialmente no endosperma, onde pouca heterocromatina foi observada. Não obstante, o consumo das reservas se deu de uma maneira rápida, uma vez que cerca de 16 dias após o início da embebição ocorreu a senescência do endosperma. Adicionalmente, a presença de um núcleo ativo e a observação de retículo endoplasmático rugoso indicam que o endosperma realiza a síntese de proteínas

A não observação de alterações nas paredes celulares do endosperma é um indicativo de que não há polissacarídeos de reserva de parede. Com a observação mais detalhada provida pela microscopia eletrônica de transmissão, é de se concluir que a perda da integridade do endosperma alguns dias antes de sua senescência (em torno de 16 dias) deva-se em grande parte à perda de turgor das células que tiveram o seu conteúdo utilizado. O deslocamento da membrana celular pode ser observado em algumas micrografias, indicando não só a perda de turgor mencionada, como também a perda de função celular e o empacotamento de membranas e organelas.

Mobilização de ácidos graxos

Os resultados de ácidos graxos foram diferentes do observado por Sant'Anna (2001) e Ferrari (2004), sendo no trabalho destes autores encontrado predominantemente o ácido linoléico (C 18:2), enquanto que nos nossos resultados o ácido graxo predominante, tanto no endosperma como no cotilédone, foi o ácido oléico (C 18:1). Na nossa amostra, o ácido linoléico é o segundo ácido graxo predominante tanto no endosperma quanto no cotilédone, porém sua quantidade é cerca de ¼ menor do que a de oléico no endosperma, e pouco mais de 1/3 no cotilédone. O ácido linoleico é considerado um ácido graxo essencial. Vale ressaltar que nos trabalhos dos autores acima mencionados não houve separação entre cotilédone e endosperma para as análises.

Ainda, a composição de ácidos graxos tanto no endosperma quanto no cotilédone é similar no que tange proporção e ácidos presentes, variando somente na quantidade presente, e sua mobilização acontece de maneira ligeiramente diferente nos dois tecidos.

A presença de luz influencia a taxa de mobilização dos ácidos graxos no endosperma. Se levarmos em consideração que a germinação da semente de *P. edulis* começa a ocorrer entre o quarto e o quinto dia no escuro, e entre o quinto e sexto dia sob luz contínua, podemos inferir que as reservas de ácidos graxos são utilizadas no período pré-germinativo no escuro, e no pós-germinativo na luz. Dessa maneira, de acordo com as condições luminosas, os ácidos graxos podem servir como reserva energética para o processo de germinação, e na sequência para o desenvolvimento da plântula, sendo isto o mais comumente encontrado na literatura (CORTE et al, 2006, CORTE et al., 2008, YANG et al., 2009, QUETTIER & EASTMOND, 2009, ALENCAR et al., 2012). Ainda ressaltamos que, por ser uma semente oleaginosa e ter a capacidade de germinar tanto sob luz contínua quanto no escuro, o consumo das reservas lipídicas deve estar sujeito a esse fator ambiental. Quando a semente de *P. edulis* for submetida à luz branca contínua, suas reservas lipídicas serão utilizadas exclusivamente para o crescimento da plântula, enquanto que em uma situação de escuro, as reservas lipídicas, serão

mobilizadas para o processo germinativo e na manutenção do metabolismo da plântula enquanto uma condição luminosa não for alcançada.

Quando comparamos os cotilédones em relação à luz branca contínua e escuro durante os 10 dias de germinação, a ausência de diferenças significativas entre os dois tratamentos é um fato interessante. Mesmo sob a falta de luz e não havendo diferenças entre os cotilédones nos dois tratamentos, é possível inferir que o consumo de reservas diferenciado no endosperma ajuda a evitar que a situação de falta de luminosidade afete negativamente no desenvolvimento inicial dos cotilédones, sendo que no maracujá eles servem como o primeiro par de folhas. O consumo de ácidos graxos nos cotilédones pode não estar somente ligado ao fornecimento de energia, mas principalmente colaborando com a formação de cloroplastos e estruturas membranares, como observado na ervilha (TRÉMOLIÈRES, 1971), e em *Arabidopsis* ocorre a modulação de ácidos graxos de membrana quando a planta está submetida a algum tipo de estresse, seja abiótico ou biótico, e dessa forma remodelando a sua fluidez (UPCHURCH, 2008). A manutenção dos cotilédones é de extrema importância para a sobrevivência da plântula, pois com seu metabolismo e funções mantidas, assim que a luz é fornecida, essas estruturas se tornam verdes e o estiolamento é cessado.

A maneira como os ácidos graxos do endosperma fornecem energia ao embrião em desenvolvimento ainda não está bem esclarecida na literatura. São propostas 3 maneiras para este processo: 1 – como triacilgliceróis (TAGs) intactos; 2 – como ácidos graxos livres (AGLs), a partir da sua quebra dos TAGs pela atividade das lipases; ou 3 – na forma de açúcares (degradação de AGLs pela β-oxidação e posterior gluconeogênese) (LENOVA et al., 2010). Uma vez que o endosperma de *P. edulis* é vivo, e portanto pode realizar os diferentes procedimentos da β-oxidação em suas organelas, e não foi observado um aumento nos níveis de AGLs nos cotilédones à medida que os AGLs do endosperma diminuíram, podemos inferir que o endosperma provê energia aos cotilédones vinda dos AGLs na forma de açúcares livres. Os níveis semelhantes de glucose aos 10 DAS tanto em sementes germinadas sob luz contínua quanto em sementes germinadas no escuro contínuo (discutido adiante) são outra evidência de que este deve ser o caso nas sementes de *P. edulis*.

Microscopia Eletrônica e Microscopia Confocal – Observação de Cloroplastos

Com as informações fornecidas pelas imagens, as evidências da presença de cloroplastos no estágio de crescimento inicial da plântula de *P. edulis* são marcantes. Não só a observação de plastídios no interior das células do endosperma, como a resposta diferenciada à luz e escuro quando submetidos à análise por microscopia confocal a laser mostram que o seu aparecimento é, de alguma maneira, modulado pela luz.

Nos cotilédones, a resposta fluorescente foi similar tanto em plântulas que foram inicialmente mantidas sob luz quanto escuro contínuo. Dessa forma, a resposta fluorescente nestes dois casos pode ser em razão do modo de síntese da clorofila. Os passos iniciais da síntese de clorofila ocorrem tanto na luz quanto no escuro em angiospermas. No entanto, quando em escuro contínuo, a síntese de clorofila é interrompida na molécula de protoclorofilídeo, sendo a redução de protoclorofilídeo para clorofilídeo dependente de luz (RUNGE, 1995). Portanto, é de se admitir que nas sementes germinadas no escuro houve um acúmulo de protoclorofilídeo nos etioplastos das células dos cotilédones, enquanto nas sementes germinadas sob luz branca houve a foto-redução da protoclorofilídeo em clorofilídeo, e consequentemente a síntese de clorofila nos cloroplastos. A resposta fluorescente no escuro pode ser explicada pelo fato de que o protoclorofilídeo é fluorescente quando excitada no azul, assim como a clorofila (MESKAUSKIENE et al., 2001). Além disso, tecidos com acúmulo de protoclorofilídeo apresentam aspecto clorótico enquanto os tecidos com clorofila apresentam-se verdes.

Adicionalmente, evidências de diferenças de desenvolvimento nos plastídios dos cotilédones foram confirmadas por sua morfologia. Os cloroplastos dos cotilédones crescidos sob luz branca contínua apresentaram grãos de amido e tilacóides desenvolvidos, formando grana. Já os etioplastos dos cotilédones de sementes germinadas no escuro contínuo não apresentaram morfologia definida e tampouco grãos de amido, e aos 14 DAS apresentaram corpos prolamelares bem definidos, o que mostra que não houve desenvolvimento de membranas, e por consequência, síntese completa de clorofila.

Dessa maneira, esperávamos que uma resposta parecida também ocorresse no endosperma, com a observação de etioplastos pouco desenvolvidos em sementes germinadas no escuro, e cloroplastos desenvolvidos quando a germinação ocorresse em luz contínua. No entanto, a falta de fluorescência observada no endosperma de sementes germinadas no escuro contínuo, e a fluorescência observada no endosperma de sementes germinadas sob luz contínua foi diferente do esperado. Assim, a observação de cloroplastos pela Microscopia Eletrônica de Transmissão nos endospermas de sementes germinadas sob luz branca torna evidente a presença dessa organela nos tecidos, e seu desenvolvimento condiz com o observado para cloroplastos de outros tecidos, onde primeiramente há uma baixa complexidade de membranas, e ao passo que a síntese de clorofila procede na presença de luz, o sistema de membranas se torna mais complexo (GUNNING, 1965). Ainda tendo em foco o desenvolvimento dos cloroplastos, sua estrutura assemelha-se com relatos da literatura, como visto em Schnepf (1962), que destaca a presença de corpos prolamelares, além da observação de tilacóides e grana desenvolvidos em cloroplastos de nectários extra-florais de *P. caerulea*, cujo aspecto é semelhante ao observado em nosso material.

Assim, o aparecimento de cloroplastos no endosperma de sementes germinadas em luz contínua, e sua ausência nesse tecido em escuro contínuo nos levam a crer que não somente a síntese de clorofila é modulada pela luz, como também o aparecimento dessa organela no tecido. O excesso de conteúdo de reserva celular no endosperma durante os primeiros DAS dificultam a observação de organelas, de maneira que não podemos afirmar se o etioplasto que formará o cloroplasto já se encontra presente no tecido e durante a germinação no escuro se degrada, ou se é gerado somente na presença de luz.

Não está clara a função desses cloroplastos presentes no endosperma. Em trabalhos realizados com sementes em desenvolvimento que apresentam cloroplastos, foi proposto que a fotossíntese nessas sementes possa participar no metabolismo de 3 maneiras principais: a produção de NADPH e ATP para a síntese de ácidos-graxos; a evolução do O_2 pode prevenir a anoxia dentro da semente, e as reações de fixação do CO_2 (reações do escuro) podem refixar o CO_2 vindo da respiração, fornecendo intermediários para o metabolismo

(ROLLETSCHEK et al., 2002; RUUSKA et al, 2004). É provável que no caso de sementes de *P. edulis* a evolução do oxigênio e refixação do CO2 da respiração possam ter um papel importante, uma vez que os cotilédones ficam alocados dentro do endosperma, que por sua vez pode ser uma barreira à difusão de oxigênio. Adicionalmente, as reservas do endosperma estão consumidas quase por completo em 10 DAS. Provavelmente, a presença de cloroplastos pode continuar a fornecer intermediários metabólicos mesmo depois que as reservas tenham se esgotado, até que os cotilédones atinjam um estado plenamente autotrófico. O endosperma permanece aderido à plântula até cerca de 16 DAS, e após 14 DAS, apesar de apresentar sinais de degradação avançada, tanto morfologicamente quanto anatomicamente e ultraestruturalmente, o endosperma ainda está verde.

De outra forma, o aparecimento de cloroplastos no endosperma pode não ter uma relação direta com a germinação da semente em si, uma vez que a germinação ocorreu, tanto na luz quanto no escuro, por volta de 5 DAS, antes da observação de cloroplastos. Provavelmente sua real função esteja relacionada com o crescimento inicial da plântula, fornecendo esqueletos de carbono após boa parte das reservas do endosperma ter sido consumida. A diferença no amido acumulado nos plastídios dos cotilédones entre a luz contínua e escuro contínuo pode ser um reflexo da capacidade fotossintética do endosperma na luz, já que a formação de amido pode não ser explicada somente por um excesso no fluxo de carbono proveniente da quebra das reservas, mas também por um aumento na taxa fotossintética do tecido (BROWN & HUBER, 1988). Assim, a presença de cloroplastos no endosperma pode representar uma segunda fonte de energia para o crescimento inicial da plântula, possibilitando uma maior chance de estabelecimento no ambiente. Sua presença durante a germinação pode afetar a vitalidade da planta, seu crescimento e sua produção de sementes (POGSON & ALBRECHT, 2011).

Outra característica que pode indicar a função do cloroplasto no endosperma está na formação de grãos de amido. Na luz, há um balanço finamente ajustado para que, durante o período de fotossíntese, a planta consiga os esqueletos de carbono para o seu funcionamento e armazene uma parte na forma de amido, a fim de utilizar essa reserva durante o período sem luz (Stitt et al., 2010). Assim, era de se esperar que os cloroplastos no

endosperma apresentassem grãos de amido. No entanto, este não foi o caso. Os cloroplastos observados no endosperma quase não apresentavam grãos de amido, e quando apresentavam, o seu tamanho e quantidade era reduzida, enquanto os cloroplastos presentes nos cotilédones apresentavam clara formação de grãos de amido, ocupando quase a área completa da organela. Já que tilacóides desenvolvidos foram observados nos cloroplastos dos cotilédones aos 14DAS, pode-se pensar que aos 10DAS os cotilédones ainda não atingiram total competência fotossintética, enquanto que os tilacóides já se encontram desenvolvidos no endosperma aos 10 DAS. Além disso, a total cobertura que o endosperma proporciona aos cotilédones pode alterar significativamente a qualidade da luz que chega à esses tecidos. Baroja-Fernández e colegas (2004) propuseram que a síntese de amido no cloroplasto pode ocorrer também a partir de precursores sintetizados no citosol das células, como a ADP-glucose (adenosina difosfato glucose), produzida a partir da retirada da frutose de uma molécula de sacarose e adição de uma molécula de ADP. Uma possível hipótese seria que o açúcar da fotossíntese no cloroplasto do endosperma pode ser transportado às células dos cotilédones e lá convertido a amido.

Os resultados mostram claramente que há cloroplastos no endosperma de sementes de *P. edulis* germinadas sob luz branca contínua. No entanto, ainda não há uma certeza sobre a sua função, e tampouco se é somente um resquício evolutivo ou um fenômeno apresentado somente nesse cultivar, obtido a partir do cruzamento de outros cultivares selecionados a partir de caracteres de interesse, como tamanho dos frutos e produtividade por área plantada (comunicação pessoal da professora Laura Maria Molina Meletti, maiores informações em Meletti et al., 2000). Novas análises serão feitas para tentar elucidar a sua função. Experimentos com trocas gasosas e fixação de CO_2, assim como a avaliação do crescimento da plântula em casa de vegetação e o surgimento das primeiras folhas podem conter as primeiras respostas para a função de um endosperma fotossintetizante.

Massa seca de endospermas e cotilédones ao longo da germinação e crescimento inicial

Os resultados obtidos se mostraram bastante interessantes quando colocados sob o prisma da mobilização de reservas e a possibilidade de realização de fotossíntese do endosperma. É visível o decréscimo de massa seca no endosperma em sementes mantidas no escuro contínuo, ao passo que esse decréscimo é muito mais lento no endosperma de sementes mantidas sob luz contínua. Pode-se propor que as diferenças na massa seca refletem um consumo diferencial de reservas, que provavelmente foi mais intenso no escuro visando buscar uma condição luminosa favorável.

Dessa forma, podemos pressupor que durante a germinação na luz contínua, a condição luminosa influencia na velocidade de consumo das reservas no endosperma, e portanto na germinação como um todo, e assim observamos uma maior massa seca neste tecido aos 10 DAS, além de um decréscimo com um aparente “atraso” em relação ao escuro contínuo. Então, uma condição de capacidade fotossintética do endosperma pode servir como uma maneira de manter as reservas energéticas por mais tempo, drenando mais lentamente o endosperma de suas reservas. Foi mostrado em *Arabidopsis thaliana* L. que a administração de açúcares exógenos retarda o consumo de lipídios de reserva (TO, 2002). Algo semelhante pode ocorrer no endosperma de *P. edulis*, porém o açúcar não é exógeno, e sim proveniente da fotossíntese no próprio tecido.

Contudo, somando a massa seca dos endospermas e cotilédones, hipocótilo e raiz de cada tratamento luminoso, observamos que não há em nenhum dos tratamentos incorporação de massa seca, visto que em ambos os tratamentos há um decréscimo similar. Sendo assim, se há qualquer assimilação de massa em decorrência de fotoassimilados, esta não pôde ser percebida nas condições do nosso experimento.

Análise do Crescimento em Casa de Vegetação

Alguns caracteres fenotípicos, como massa seca de folhas, raiz e caules, podem apresentar diferenças quando plantas são submetidas a diferentes condições ambientais de crescimento ou quando passam por alguma situação de estresse. Geralmente, os caracteres mais comumente utilizados

nessas análises são o ganho de massa seca nos diversos tecidos como folha, caule e raiz, o crescimento em tamanho destes tecidos, e a área foliar específica. O que é observado é que o ganho natural de tamanho e massa nos diferentes tecidos é inversamente proporcional ao nível de estresse. Por exemplo, estresse de inundação (ANDRADE et al., 1999) e estresse de baixa irradiância e disponibilidade de nutrientes (MEZIANE & SHIPLEY, 1999) afetou o ganho de massa e o crescimento da área foliar nas espécies estudadas. Da mesma forma, em nosso experimento, a condição de escuro contínuo e a retirada do endosperma, mesmo 10 dias após a semeadura, afetou negativamente parâmetros como massa seca de folhas, raiz e caule ao fim de 50 DAS, sendo que deste tempo as plântulas foram submetidas às mesmas condições luminosas por 40 dias, em casa de vegetação. Para a semente de *P. edulis* verificamos que a germinação no escuro e a retirada do endosperma, mesmo após 10 dias de germinação, são situações que afetaram negativamente o desenvolvimento inicial das plântulas. A retirada de parte do endosperma em sementes de *Triticum aestivum* L. antes da semeadura, por exemplo, afetou negativamente o ganho de massa seca, número e dimensões de folhas e o número de raízes nodais, assim como atrasou o aparecimento dos dois primeiros filocronos (PETERSON et al., 1989).

Com relação à área foliar específica, a diferença de tratamentos luminosos aparentemente mostrou influência. As maiores médias de área foliar específica observadas em plântulas oriundas de sementes germinadas no escuro contínuo podem então ser um reflexo da ausência de irradiância durante os 10 dias iniciais de tratamento, resultando em uma plântula que tende a apresentar uma menor área foliar, mas uma maior área foliar específica. Em experimentos com irradiância em outras espécies como *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (CARVALHO et al., 2006) e *Euterpe edulis* Mart. (NAKAZONO et al., 2001) foi observado que as plantas estudadas apresentaram menor área foliar e uma maior área foliar específica quando submetidas à baixa irradiância durante todo o seu crescimento inicial. Em nosso estudo, as plântulas que tiveram seu endosperma retirado após germinarem no escuro mostraram a maior média de AFE ao fim de 50 dias, enquanto que a menor média de AFE observada foi de plantas que tiveram seu endosperma retido após germinarem em luz contínua. Assim, podemos

observar que não só a condição luminosa durante a germinação como também o endosperma e suas reservas influenciam os parâmetros de crescimento iniciais.

Além do discutido nos parágrafos acima nesta sessão, tem sido muito comum também a verificação dos efeitos de diferentes condições de crescimento na eficiência quântica potencial e na eficiência quântica efetiva do fotossistema II nas folhas. É sabido que plantas sob algum tipo de estresse tendem a ter sua eficiência quântica potencial reduzida (JAMES et al., 2002; BAKER, 2008). Em nossos testes, era esperada uma diferença significativa na eficiência quântica potencial entre os tratamentos, uma vez que a retirada precoce do endosperma é considerada como estresse neste trabalho, além da diferença causada pelos diferentes tratamentos luminosos. Tínhamos como hipótese o fato de que as plântulas oriundas de sementes germinadas no escuro teriam as menores médias de eficiência quântica potencial, e dentro de cada tratamento luminoso, as plântulas que teriam as menores médias seriam as que tiveram seu endosperma retirado. Parte disto foi verdadeiro, pois realmente as menores médias de eficiência quântica potencial foram observadas em plântulas de sementes germinadas no escuro. Entretanto, as plântulas que tiveram o endosperma retido apresentaram a menor média dentre os tratamentos, sendo diferente do esperado. Ainda assim, a diferença entre as duas médias foi demasiada pequena para ser considerada significativa.

Em nosso experimento, podemos inferir que os tratamentos não causaram qualquer dano ao PSII, uma vez que a fração de luz absorvida em todos os tratamentos foi semelhante. Sendo assim, a germinação no escuro seguida de plantio a pleno sol em casa de vegetação não causou danos subsequentes às plantas. Por outro lado, a diferença na energia dissipada em forma de calor no complexo antena chama a atenção. Nas plântulas oriundas de sementes germinadas no escuro, a quantidade de energia dissipada no complexo antena é maior em relação às plântulas originadas de sementes germinadas sob luz branca contínua. Já a energia dissipada nos centros de reação segue um padrão inverso: muito mais foi dissipado em plântulas que germinaram sob luz branca, enquanto as menores médias foram observadas em plântulas germinadas no escuro. Isto pode indicar que as primeiras folhas

de sementes germinadas em escuro contínuo possuem um sistema de fotoproteção no complexo antena maior, provavelmente em razão do ambiente de desenvolvimento inicial da semente. Os 10 dias de germinação no escuro podem ter causado uma maior sensibilidade luminosa às plântulas. A dissipação de calor é um mecanismo de proteção do PSII presente em outras espécies (HUANG et al., 2006, GALMÉS et al., 2007), e ao que tudo indica é mais vantajosa a dissipação de calor no complexo antena do que nos centros de reação para as plantas de *P. edulis* germinadas no escuro.

A assimilação de CO_2 também é um dos fatores que sofre alteração quando uma espécie estudada é submetida à diferentes condições ambientais ou de estresse. Normalmente, a assimilação de CO_2 diminui em situações de estresse (JAMES et al., 2002). Nós esperávamos que as plântulas provenientes de sementes germinadas no escuro apresentassem uma menor média de assimilação de CO_2, e que o tratamento que teve o endosperma removido apresentasse as menores médias. No entanto, os resultados não poderiam estar mais longe do esperado, especialmente porque não houve diferença significativa entre os tratamentos, tanto para a assimilação de CO_2 quanto assimilação de CO2 x AFE, mostrando que a assimilação de CO_2 é balanceada pela plasticidade da área foliar, e apresentando, em comparação a outras espécies, uma alta capacidade fotossintética (GALMÉS et al., 2007). Além disso, a assimilação de CO_2 é diretamente ligada à eficiência quântica dos fotossistemas, e uma vez que não houve diferença significativa na eficiência quântica potencial e efetiva entre os tratamentos, era de se esperar que a assimilação de CO_2 também não fosse alterada. Dessa maneira, a retirada do endosperma 10 dias após a semeadura e a germinação no escuro parecem não afetar diretamente o rendimento quântico das plântulas, assim como sua assimilação de CO_2.

Análise de Açúcares Livres

Uma vez observada a presença de cloroplastos no endosperma de sementes de *P. edulis*, esperávamos que a dinâmica dos açúcares livres, em especial glicose, fosse diferente neste tecido. Nós imaginávamos que as médias de glicose seriam maiores em sementes germinadas sob luz contínua, em razão da presença de cloroplastos. O fato de as médias de glicose serem

semelhantes aos 10DAS tanto nas sementes germinadas sob luz contínua quanto nas sementes germinadas sob escuro contínuo nos leva a crer que a dinâmica de mobilização das reservas deve atingir certos níveis de glicose livre; no entanto, a maneira como esses níveis de glicose são atingidos pode variar dependendo da condição ambiental. Assim, sendo os níveis de glicose semelhantes sob luz contínua e escuro contínuo aos 10 DAS, é possível estipularmos que a glicose que fornece energia para o crescimento e desenvolvimento do embrião provém da quebra de reservas e da fotossíntese do endosperma em sementes germinadas sob luz contínua, mesmo nas condições de baixa luminosidade do germinador (cerca de 100 mol m^{-2} s^{-1}), uma vez que em luminosidades tão baixas quanto 100 µmol m^{-2} s^{-1} mais de 80% da energia luminosa absorvida seria utilizada (LONG et al., 1994). Já no escuro contínuo, a glicose seria proveniente somente da mobilização de reservas.

No endosperma, variações em açúcares como galactose, manose, arabinose e fucose, e o incremento em seus níveis nos tempos tardios da germinação podem indicar a quebra de açúcares estruturais que conferem firmeza às paredes celulares, já que as paredes do endosperma precisam ser digeridas para abrir espaço para o crescimento do embrião. O endosperma possui duas funções definidas: mobilizar suas reservas e prover energia para o embrião em crescimento, e produzir enzimas hidrolíticas para degradar tanto suas paredes celulares como as do tegumento, removendo a barreira mecânica para o crescimento da radícula e, posteriormente, abertura dos cotilédones (PENFIELD, 2004). A perda de integridade estrutural das paredes do endosperma pode ser observada nos tempos tardios de germinação, quando vemos as paredes celulares com um formato menos definido do que o observado nos tempos iniciais de germinação, quando a célula possui um formato retangular mais definido.

Nos cotilédones, o aumento expressivo de glucose aos 10 DAS sob luz branca e após 8 DAS no escuro podem ajudar a indicar um ponto de mudança nas fases de desenvolvimento da plântula. Entretanto, há uma diferença muito grande entre a quantidade de glicose observada nos cotilédones germinados sob luz branca e nos cotilédones germinados no escuro. Essa diferença pode ser derivada principalmente da formação de amido dentro dos cloroplastos.

Nos cotilédones crescidos em luz branca, nós pudemos observar a formação de amido, enquanto que no escuro não há formação destes grânulos. Portanto, a diferença pode ser explicada pelo armazenamento secundário da glicose em amido nos cotilédones germinados sob luz branca, enquanto não há esse armazenamento de glicose no escuro.

Um detalhe interessante observado nos cotilédones é o aumento do mio-inositol aos 10 DAS. É sabido que o mio-inositol pode ser conjugado com auxinas (EPSTEIN et al, 1980; COHEN & BANDURSKI, 1982; LOEWUS & MURTHY, 2000) e o aumento nos níveis de mio-inositol por nós observado ocorre concomitantemente com o momento onde há um aumento no comprimento das células dos cotilédones, após a divisão celular (TOZZI & TAKAKI, 2011). Já que as auxinas participam ativamente do alongamento celular, esta relação pode ser relevante. Isso explicaria também o porquê do valor médio de mio-inositol estar superior em cotilédones de sementes germinadas no escuro do que em cotilédones de sementes germinadas sob luz branca. O estiolamento no escuro depende do alongamento celular, e maiores níveis de mio-inositol podem estar relacionados a maiores níveis de auxina, explicando o maior comprimento de raízes e cotilédones observados no escuro. Adicionalmente, o conjugado mio-inositol-auxina protege a auxina de ataques peroxidativos (COHEN & BANDURSKI, 1982), já que a germinação de sementes é um evento que gera espécies reativas de oxigênio (SCHOPFER et al., 2001) e também é considerado como uma reserva “inativa” de auxinas, para a planta armazenar o excesso de produção de auxina (LOEWUS & MURTHY, 2000).

Adicionalmente, o mio-inositol participa de vias metabólicas importantes no desenvolvimento das plantas. Possui um papel importante no metabolismo de hexoses/pentoses e na formação de parede celular pela participação na síntese de pectina e hemiceluloses, através da conversão do mio-inositol em ácido glicurônico pela via da mio-inositol oxigenasse (LOEWUS & MURTHY, 2000; VALLURU & ENDE, 2011). Como mostrado em Tozzi & Takaki (2011), observamos que aos 10 DAS os cotilédones já passaram por um primeiro ciclo de divisão celular, sendo o crescimento e desenvolvimento celular acompanhado também da síntese de parede celular. Assim, um aumento nos

níveis de mio-inositol pode indicar também a ocorrência de síntese de parede celular nos cotilédones de *P. edulis.*

A rafinose é um oligossacarídeo de grande importância na tolerância à dessecação em sementes de *Arabidopsis thaliana* L. e *Brassica campestris* L. durante a maturação da semente (LEPRINCE et al., 1990; OOMS, 1993). Com sua observação aos 0 DAS no endosperma e aos 2 DAS nos cotilédones tanto em luz branca quanto no escuro, podemos estabelecer, a princípio, que este oligossacarídeo tem um papel similar na semente de *P. edulis*, embora neste contexto da germinação, e não da maturação da semente em si. O início da germinação é uma fase na qual a semente é sensível à mudança de hidratação, e uma vez passado um determinado tempo após o início da absorção de água, se houver desidratação a semente cessa sua germinação e morre. Uma vez que a rafinose tem essa importância, e é um oligossacarídeo osmoticamente ativo, sua importância na semente de *P. edulis* durante a germinação pode ser o de uma proteção contra a dessecação.

CONCLUSÕES

- O consumo das reservas lipídicas no endosperma acontece principalmente no momento de protrusão da raiz primária e durante o crescimento inicial da plântula. Os ácidos graxos livres são consumidos no endosperma e nos cotilédones, e a energia dos ácidos graxos mobilizados no endosperma é transportada aos cotilédones provavelmente na forma de açúcar.

- Apesar do processo de germinação da semente de *P. edulis* ser semelhante ao de outras sementes como *Arabidopsis thaliana* e *Ricinus comunis*, apresentar cloroplastos no endosperma durante a germinação é uma característica que a difere não somente destas duas espécies, mas também das demais sementes ortodoxas.

- As diferenças nos parâmetros de crescimento inicial das plântulas podem ser explicadas pela condição luminosa à qual a semente foi submetida durante a germinação como também pelo tempo que o endosperma fornece compostos de reserva ao embrião/plântula.

BIBLIOGRAFIA

ALENCAR, N.L.M.; INNECCO, R.; GOMES-FILHO, E.G.; GALLÃO, M.I.; ALVAREZ-PIZARRO, J.C.; PRISCO, J.T.; OLIVEIRA, A.B. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. spp. *jamacaru* (Cactaceae).**Anais da academia brasileira de ciências**, v.84, n.3, pp. 823-832, 2012.

ANDRADE, A.C.S.; RAMOS, F.N.; SOUZA, A.F.; LOUREIRO, M.B.; BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cytharexyllum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. **Brazilian Journal of Botany** v.22, pp. 281-285, 1999.

ASHTON, F.M. Mobilization of storage proteins of seeds. **Ann. Rev. Plant Physiol.** v. 27, pp. 95-117, 1976.

BAKER, N.R. Chlorophyll Fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annu. Rev. Plant Biol.**v. 59, pp89-113, 2008.

BAROJA-FERNÁNDEZ, E.; MUÑOZ, F.J.; ZANDUETA-CRIADO, A.; MORÁN-ZORZANO, M.T.; VLALE, A.M.; ALONSO-CASAJÚS, N.; POZUETA-ROMERO, J.Most of ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the cloroplast in source leaves. **Proceedings of the national academy of sciences** vol. 101, n.35, pp. 13080-13085, 2004.

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

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.;ÖQUIST, G.O. Chlorophyllfluorescence as a tool in photosynthesis research. – In: HALL,D.O., SCURLOCK, J.M.O., BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R. *et al*.(ed.): Photosynthesis and production in a changing environment:A field and laboratory manual. Pp. 193-206. Chapman& Hall, London 1993.

BOREK, S.; RATAJCZAK, W.; RATAJCZAK, L. Ultrastructural and enzymatic research on the role of sucrose in mobilization of storage lipids in germinating yellow lupine seeds. Plant Science vol. 170, pp. 441-452, 2006.

BROWN, C.S.; HUBER, S.C. Reserve mobilization and starch formation in soybean (*Glycine max)* cotyledons in relation to seedling growth. **Physiologia plantarum** vol. 72, pp. 518-524, 1988.

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.

CARVALHO, M. A. M.; DIETRICH, S. M. C. Variations in fructan content in the underground organs of Vernonia herbacea (Vell.) Rusby at different phenological phases. **New Phytologist**, v. 123, pp. 735-740, 1993.

CARVALHO, N.O.S.; PELACANI, C.R.; RODRIGUES, M.O.S.; CREPALDI, I.C. Crescimento Inicial De Plantas De Licuri (Syagrus coronata (MART.) BECC.) Em Diferentes Níveis De Luminosidade. **Revista Árvore**, v. 30, n.3, pp. 351-357, 2006.

COHEN, J.D.; BANDURSKI, R.S. Chemistry and Physiology of the bound auxins. **Annual review of plant physiology**, v. 33, 403-430, 1982.

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-Caesalpinoideae). **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.

DELTOUR, R.; GAUTIER, A.; FAKAN, J. Ultrastructural cytochemistry of the nucleus in *Zea mays* embryos during germination. **Journal of Cell Science**, v. 40, pp. 43-62, 1979.

DIRK, L.M.A.; KROL, A. R. van der; VREUGDENHIL, D.; HILHORST, H.W.M.; BEWLEY, J.D. Galactomannan, soluble sugar and starch solubilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. **Plant Physiol. Biochem.** v. 37, n. 1, pp. 41-50, 1999.

DYKSTRA, M.J. **Manual of applied techniques for biological electron microscopy**. Plenum Publishing corporation, 1993.

EASTMOND, P.J.; GRAHAM, I.A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. **Trends in plant science,** v.6, n.2, pp. 72-77, 2001.

EPSTEIN, E.; COHEN, J.D.; BANDURSKI, R.S. Concentration and metabolic turnover of indoles in germinating kernels of *Zea mays* L. **Plant physiology**, n.65, pp. 415-421, 1980.

FERRARI, R.A.; COLUSSI, F.; AYUB, R.A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá – aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, pp. 101-102, 2004.

GALMÉS, J.; ABADÍA, A.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachia minoricensis*. **Environmental and Experimental Botany** v. 60, n.3, pp. 308-317, 2007.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta** v.990, 87-92, 1989.

GÓRECKI, R.J; PIOTROWICZ-CIESLAK, A.I.; LAHUTA, L.B.; OBENDORF, R.L. Soluble carbohydrates in desiccation tolerance of yellow lupin seeds during maturation and germination. **Seed Science Research** vol. 7, pp. 107-115, 1997.

GRAHAM, I.A. Seed storage Oil Mobilization. **Ann. Rev. Plant Biol.** v.59, pp. 115-142, 2008.

GUNNING, B.E.S.; The Greening process in plastids 1. The structure of the prolamellar body. **Protoplasma** vol. 60, pp. 111-130, 1965

HARA-NISHIMURA, I; HAYASHI, M.; NISHIMURA, M.; AKAZAWA, T. Biogenesis of protein bodies by budding from vacuoles in developing pumpkin cotyledons. **Protoplasma**, v. 136, pp. 49-55, 1987.

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.

HUANG, L.F.; ZHENG, J.H.; ZHANG, Y.Y.; HU W.H.; MAO, W.H.; ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. Diurnal variations in gas exchange, chlorophyllfluorescence quenching and light allocation in soybean leaves:the cause for midday depression in CO2 assimilation. **Scientia Horticulturae** v. 110, pp. 214-218, 2006.

ICHIE, T.; NINOMIYA, I.; OGINO, K. Utilization of seed reserves during germination and early seedling growth by Dryobalanops lanceolata (Dipterocarpaceae). Journal of tropical ecology vol. 17, n. 3, pp. 371-378, 2001.

JAMES, R.A.; RIVELLI, A.R.; MUNNS, R.; CAEMMERER, S. Factors affecting CO_2 assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. **Functional Plant Biology** v. 29, pp. 1393-1403, 2002

KITAJIMA, K. Do shade-tolerant tropical tree seedlings depend longer on seed reserves? Functional growth analysis of three Bignoniaceae species. Functional ecology vol. 16, n.4, pp. 433-444, 2002.

KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology** v. 88, pp. 302-304, 1988.

LARSON, T.R.; GRAHAM, I.A. A novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. **The Plant Journal**, v.25, n.1, pp. 115-125, 2001.

LENOVA, S.; GRIMBERG, A.; MARTTILA, S.; STYMNE, S.; CARLSSON, A.S. Mobilization of lipid reserves during germination of oat (*Avena sativa* L.), a cereal rich in endosperm oil. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n.11, pp. 3089-3099, 2010.

LEPRINCE, O.; AELST, A.C. van; PRITCHARD, H.W.; MURPHY, D.J. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and –sensitive oil seeds. **Planta**, n.204, pp. 109-119, 1998.

LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. **Plant, cell & environment**, v.13, pp. 539-546, 1990.

LIU, Q.; SINGH, S.P.; GREEN, A.G. High-stearic and High-Oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant Physiology**, v.129, pp. 1732-1743, 2002.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. myo-Inositol metabolism in plants. **Plant Science** n. 150, 1-19, 2000.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P.G. Phtoinhibition of photosynthesis in nature. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol.Biol.**, n.45, pp.633-662, 1994.

MELETTI, L.M.M.; SANTOS, R.R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar “composto IAC-27”. **Scientia agrícola** v. 57, n.3, pp. 491-498, 2000.

MESKAUSKIENE, R.; NATER, M.; GOSLINGS, D.; KESSLER, F.; CAMP, R.; APEL, K. FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*.

Proceedings of the national academy of sciences vol. 98, n. 22, pp. 12826-12831, 2001.

MEZIANE, D.; SHIPLEY, B. Interacting determinants of specific leaf area in 22 herbaceous species: effects of irradiance and nutrient availability. **Plant, cell & environment** v. 22, pp. 447-459, 1999.

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

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.

MURPHY, D.J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research** v.40, pp. 325-438, 2001.

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

NAKAZONO, E.M.; COSTA, M.C.; FUTATSUGI, K.; PAULILO, M.T.S. Crescimento inicial de Euterpe edulis Mart. em diferentes regimes de luz. **Revista Brasileira de Botânica** v.24, n.2, pp.173-179, 2001.

OOMS, J.J.J; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.M.; BARTELS, D.; KOORNNEEF, M.; KARSSEN, C.M. Aquistion of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology** n. 102, pp.1185-1191, 1993.

PALMIANO, E.P.; JULIANO, B.O. Changes in the activity of some hydrolases, peroxidase, and catalase in the rice seed during germination. **Plant Physiology**, v. 52, pp. 274-277, 1973.

PENFIELD, S.; RYLLOT, E.; 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 carboxykinase1*. **The Plant Cell** v. 16, pp. 2705-2718, 2004.

PERNOLLET, J.C. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. **Phytochemistry**, v.17, pp.1473-1480, 1978.

PETERSON, C. W.; KLEPPER, B.; RICKMAN, R.W. Seed Reserves and Seedling Development in Winter Wheat. **Agronomy Journal** v.81, n.2, pp. 245-251, 1989.

POGSON, B.J., ALBRECHT, V. Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. **Plant Physiology** vol 155, pp. 1545-1551, 2011.

QUETTIER, A.L.; EASTMOND, P.J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant physiology and biochemistry**, v.47, pp. 485-490, 2009.

RADCLIFFE, J.D.; KING, C.C.; CZAJKA-NARINS, D.M.; IMRHAN, V. Serum and liver lipids in rats fed diets containing corn oil, cottonseed oil, or a mixture of corn and cottonseed oils. **Plant foods for human nutrition**, v. 56, pp. 51-60, 2001.

RIZZO, WB; WATKINS, PA; PHILLIPS, MW; CRANIN, D; CAMPBELL, B; AVIGAN, J. Adrenoleukodystrophy: oleic acid lowers fibroblast saturated C22-26 fatty acids.**Neurology**, v.36, n.3, 357-361, 1986.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C. da; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma** v.249, n.3, pp. 747-758, 2012.

ROLLETSCHEK, H.; BORISJUK, L.; KOSCHORRECK, M.; WOBUS, U.; WEBER, H. Legume embryos develop in a hypoxic environment. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 371, pp. 1099-1107, 2002.

ROSA, M.; PRADO, C.; PODAZZA, G.; INTERDONATO, R.; GONZÁLEZ, J.A.; HILAL, M.; PRADO, F.E. Soluble sugars – metabolism, sensing and abiotic stress. **Plant Signal & Behavior**, vol. 4, n.5,pp. 388-393, 2009.

RUNGE, S.; van CLEVE, B.; LEBEDEV, N.; ARMSTRONG, G.; APEL, K. Isolation and classification of chlorophyll-deficient xantha mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** vol. 197, pp. 490-500, 1995.

RUUSKA, S.A.; SCHWENDER, J.; OHLROGGE, J.B. The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. **Plant Physiology** vol 136, pp. 2700-2709, 2004.

SANT`ANNA, E.S.; TÔRRES, R.C.O.; PORTO, A.C.S. Avaliação de diferentes métodos cromatográficos na determinação de ácidos graxos em sementes de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Boletim CEPPA**, v.19, n.1, pp. 85-94, 2001.

SANT'ANNA, E.S; TÔRRES, R.C.O.; PORTO, A.C.S. Avaliação de diferentes métodos cromatográficos na determinação de ácidos graxos em sementes de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Boletim Ceppa**, v.19, n.1, pp. 85-94, 2001.

SANTOS, H.P.; BUCKERIDGE, M.S. The role of the storage carbons of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. **Annals of Botany**, v. 94, pp. 819-830, 2004.

SCHNEPF, E. Plastidenstrukturen bei *Passiflora*. **Protoplasma** vol. 54pp. 310-313, 1962.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of Reactive Oxygen intermediates (SuperoxideRadicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) andPeroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled byLight, Gibberellin, and Abscisic Acid. **Plant Physiology**, v. 125, n.4, pp. 1591-1602, 2001.

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.

SORIANO, D.; HUANTE, P.; BUEN, A. G.; OROZCO-SEGOVIA, A. Seed reserve translocation and early seedling growth of eight tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. **Plant ecology**, vol. 214, pp. 1361-1375, 2013.

STITT, M.; LUNN, J.; USADEL, B. Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. **The Plant Journal** vol. 61, pp. 1067-1091, 2010.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C. Effect of GA_3 and Light on Polysaccharide Levels and Metabolism in Germinating Coffee Seeds. **Journal of Experimental Botany** v. 31, n. 125, pp.1643-1649, 1980.

TO, J.P.C.; REITER, W-D.; GIBSON, S.I. Mobilization of seed storage lipid by Arabidopsis seedling is retarded in the presence of exogenous sugars. **BMC Plant Biology**, 2:4, 2002.

TOZZI, H.H. Caracterização da mobilização das reservas das sementes do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg) durante a germinação. Dissertação (mestrado em ciências biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 55p., 2010.

TOZZI, H.H. &.& TAKAKI, M. Histochemical analysis of seed reserve mobilization in Passiflora edulis Sims fo. flavicarpa O. Deg. (yellow passion fruit) during germination. **Brazilian Journal of Biology**, n.71, pp. 701-708, 2011.

TRÉMOLIÈRES, A.; LEPAGE, M. Changes in lipid compostion during greening of etiolated pea seedlings. **Plant Physiology**, v.47, pp. 329-334, 1971.

TZEN, J.T.C.; CAO, Y.; LAURENT, P.; RATNAYAKE, C.; HUANG, A.H.C. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. **Plant Physiol.**, n.101, pp. 267-276, 1993.

TZEN, J.T.C.; HUANG, A.H.C. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. **The Journal of cell biology**, v.117, n.2, pp. 327-335, 1992.

UPCHURCH, R.G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. **Biotechnology Letters**, v.30, pp. 967, 977, 2008

VALLURU, R.; ENDE, W.V. Myo-Inositol and Beyond –Emerging Networks under stress. **Plant Science** n. 181, pp. 387-400, 2011.

VICK, B.; BEEVERS, H. Fatty Acid Synthesis in Endosperm of Young Castor Bean Seedlings. **Plant Physiology**, v.62, n.2, pp. 173-178, 1978.

WILSON, P.J.; THOMPSON, K.; HODGSON, J.G. Specific Leaf Area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. **New Phytologist**, v. 143, pp. 155-162, 1999.

YANG, M.F.; LIU, Y.J.; LIU, Y.; CHEN, H.; CHEN, F.; SHEN, S.H. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of *Jathropa curcas*. **Journal of proteome research**, v. 8, pp. 1441-1451, 2009.

ZIENKIEWICZ, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.C.; ZIENKIEWICZ, K. ALCHÉ, J. de D.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. **Protoplasma**, n. 248, pp. 751-765, 2011.