

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**EXPRESSÃO DE GENES EM SEMENTES DE LOBEIRA (*Solanum  
Lycocarpum* St. Hill) SUBMETIDAS AO CONDICIONAMENTO  
FISIOLÓGICO.**

**BRUNA LUIZA DE SOUZA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Março - 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**EXPRESSÃO DE GENES EM SEMENTES DE LOBEIRA (*Solanum  
Lycocarpum* St Hill) SUBMETIDAS AO CONDICIONAMENTO  
FISIOLÓGICO.**

**BRUNA LUIZA DE SOUZA**

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Agricultura).

BOTUCATU – SP

Março – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S586e Souza, Bruna Luiza de, 1988-  
Expressão de genes em sementes de lobeira (*Solanum lycocarpum* St Hill) submetidas ao condicionamento fisiológico/ Bruna Luiza de Souza. - Botucatu : [s.n.], 2014  
xii, 63 f. : tabs., ils. color., grafos., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014  
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva  
Inclui bibliografia

1. Sementes - Dormência. 2. Fisiologia vegetal. 3. Germinação. 4. Genética vegetal. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EXPRESSÃO DE GENES EM SEMENTES DE LOBEIRA (*Solanum Lycocarpum* St. Hill) SUBMETIDAS AO CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO"

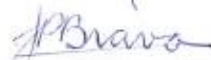
ALUNA: BRUNA LUIZA DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



\_\_\_\_\_  
PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA



\_\_\_\_\_  
PROFª DRª JULIANA PEREIRA BRAVO



\_\_\_\_\_  
PROF. DR. EDSON SEIZO MORI

Data da Realização: 11 de março de 2014.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe; só levo a certeza de que muito pouco sei, ou que nada sei.” (Almir Sater e Renato Teixeira).

Aos meus pais, Francisco e Lourdes, por serem meu chão, minha estrutura e minha maior motivação.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, Francisco e Lourdes, por serem os melhores pais do mundo, me amando e me apoiando em todos os momentos.

As minhas irmãs, Roberta e Gabriela, pela amizade verdadeira e carinho sem medida.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva pela orientação, ensinamentos e grande crescimento profissional que me proporcionou.

À Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista-UNESP, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

Aos membros da banca pela disponibilidade e valiosa contribuição.

À amiga Juliana, me faltam palavras para agradecer a sua ajuda e carinho. “Não esqueço quem me estende a mão. Minha memória não é curta. Apesar de eu esquecer nomes, jamais deixo passar batido o que fazem por mim. Porque aprendi que ajudar o outro é bonito. Mas ser grato é mais bonito ainda”. (Clarissa Corrêa)

Aos professores e funcionários.

Aos amigos dos Laboratórios de Sementes, pela amizade e conhecimentos divididos e em especial, agradeço a ajuda da Patrícia por em momento algum ter me negado ajuda e da estagiária Gabriela, por me ajudar até mesmo em finais de semana.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento, não só profissional, mas também e de não menor importância, pessoal.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
4.1. <i>Solanum lycocarpum</i> St Hill .....	7
4.2. Dormência mecânica.....	9
4.3. Polissacarídeos e a superação da dormência mecânica .....	11
4.3.1. Endo- $\beta$ -mananase.....	13
4.3.2. $\beta$ -manosidase e $\alpha$ -galactosidase .....	14
4.3.3. Expansinas e Poligalacturonases.....	15
4.4. Características relacionadas à germinação de <i>Solanum lycocarpum</i> comparadas a <i>Solanum lycopersicum</i> .....	16
4.5. Condicionamento fisiológico.....	17
4.6. Expressão de genes .....	18
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
5.1. Sementes .....	20
5.2. Condicionamento fisiológico.....	20

5.3. Germinação de sementes condicionadas e não condicionadas de <i>Solanum lycocarpum</i> .....	21
5.4. Desenho de ‘primers’ .....	22
5.5. Extração de RNA .....	25
5.6. Confeção de cDNA .....	26
5.7. Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real.....	27
5.8. Análise Estatística.....	28
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> “Primers” específicos de embrião e endosperma micropilar de sementes de lobeira utilizados para análises de PCR em tempo real.....	23
<b>Tabela 2.</b> Genes (mRNAs) estudados no embrião e no endosperma micropilar durante a germinação de sementes de lobeira .....	24
<b>Tabela 3.</b> Reações padronizadas para PCR em tempo real para cada gene.....	27

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotos de *Solanum lycocarpum* mostrando; a) semente inteira, b) embrião, c) corte longitudinal, com setas indicando o endosperma lateral (EL), o endosperma micropilar (EM) e embrião (E). Barras representam 0,5 mm ..... 8
- Figura 2.** Diagrama esquemático dos principais componentes da parede celular primária e seu provável arranjo. (FONTE: BRETT e WALDRON, 1996) ..... 12
- Figura 3.** Fluxograma para desenho de "primers" para uso em RT-qPCR ..... 23
- Figura 4.** Porcentagem de germinação de sementes de *Solanum lycocarpum* em sementes secas (testemunha), condicionadas com PEG (-0,2 Mpa) e com água, hidrocondicionamento. As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de cinco repetições biológicas. \*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade ..... 30
- Figura 5.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Solanum lycocarpum* em sementes secas (testemunha), condicionadas com PEG (-0,2 MPa) e com água, hidrocondicionamento. As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de cinco repetições biológicas. \*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade ..... 30
- Figura 6.** Tempo médio de germinação de sementes de *Solanum lycocarpum* em sementes secas (testemunha), condicionadas com PEG (-0,2 MPa) e com água, hidrocondicionamento. As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de cinco repetições biológicas. \*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade ..... 32
- Figura 7.** Frequência relativa de germinação de sementes de *Solanum lycocarpum*. a) com água, hidrocondicionamento, b) condicionadas com PEG (-0,2 MPa), c) sementes secas (testemunha) ..... 33
- Figura 8.** A) RNA total de M, marcador, 1, 2, 3, embriões de sementes não condicionadas com 1, 5 e 10 dias de embebição, respectivamente e 4, 5, 6, embriões de sementes hidrocondicionadas com 1, 5 e 10 dias de embebição, respectivamente. B) RNA total de M,

marcador, 1, 2, 3, região micropilar de sementes não condicionadas com 1, 5 e 10 dias de embebição, respectivamente e 4, 5, 6, região micropilar de sementes hidrocondicionadas com 1, 5 e 10 dias de embebição, respectivamente ..... 34

**Figura 9.** Expressão relativa do gene da endo- $\beta$ -mananase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, e não condicionadas, testemunha, em relação ao período de um dia de embebição . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*)..... 35

**Figura 10.** Expressão relativa da endo- $\beta$ - mananase, em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 36

**Figura 11.** Expressão relativa do gene da  $\beta$ -manosidase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, e não condicionadas, testemunha, em relação ao período de um dia de embebição . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*)..... 38

**Figura 12.** Expressão relativa da endo- $\beta$ -manosidase, em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento , em relação a testemunha, sem condicionamento . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 39

**Figura 13.** Expressão relativa do gene da  $\alpha$ -galactosidase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*)..... 40

**Figura 14.** Expressão relativa do gene da  $\alpha$ -galactosidase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento , em relação a testemunha, sem condicionamento . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 40

**Figura 15.** Expressão relativa do gene da poligalacturonase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em

água, hidrocondicionamento e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*)..... 42

**Figura 16.** Expressão relativa do gene da poligalacturonase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 43

**Figura 17.** Expressão relativa do gene da poligalacturonase em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 44

**Figura 18.** Expressão relativa do gene da poligalacturonase em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento—. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*)..... 44

**Figura 19.** Expressão relativa do gene da EXP8 em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 45

**Figura 20.** Expressão relativa do gene EXP8 em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 46

**Figura 21.** Expressão relativa do gene da EXP10 em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 47

**Figura 22.** Expressão relativa do gene EXP10 em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 47

**Figura 23.** Expressão relativa do gene da  $\alpha$ -galactosidase em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*) ..... 48

**Figura 24.** Expressão relativa do gene da  $\alpha$ -galactosidase em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento . Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*)..... 49

## 1. RESUMO

Sementes de *Solanum lycocarpum*, lobeira, apresentam resistência mecânica ao crescimento do embrião causada por polissacarídeos da parede celular presentes no endosperma micropilar. Para que a germinação ocorra é necessário que haja a hidrólise desses polissacarídeos para promover enfraquecimento do endosperma, permitindo crescimento do embrião. Assim, enzimas associadas com o crescimento do embrião e enfraquecimento do endosperma podem ser importantes durante a germinação. O condicionamento fisiológico é uma técnica que aumenta a velocidade e a uniformidade da germinação e promove a superação da dormência de algumas espécies. Logo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do hidrocondicionamento na qualidade fisiológica das sementes e estudar a expressão de genes associados com o crescimento do embrião e degradação do endosperma micropilar em sementes de *Solanum lycocarpum*. As sementes de lobeira foram submetidas ao hidrocondicionamento e condicionamento com PEG (-0,2 MPa) e avaliadas com relação a sua qualidade fisiológica, determinando-se; porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação e frequência relativa da germinação. A expressão gênica foi realizada usando a técnica de PCR em tempo real. Para isso, o RNA foi extraído e cDNA foi confeccionado. Os genes estudados no embrião foram expansina (*EXP8* e *EXP10*),  $\alpha$ -galactosidase (*LeaGal*) e poligalacturonase(*XOPG1*), e no endosperma micropilar foram a  $\alpha$ -galactosidase (*LeaGal*),  $\beta$ -manosidase (*LeMside1*), endo- $\beta$ -mananase (*LeMAN2*) e poligalacturonase

(*XOPGI*). A maior velocidade, menor tempo médio e a maior sincronização da germinação das sementes hidrocondicionadas coincidem com o pico de expressão dos genes estudados na região micropilar e no embrião no quinto dia de embebição.

**PALAVRAS-CHAVES:** dormência, crescimento do embrião, enfraquecimento do endosperma.

**Expression of genes in seeds of *Solanum lycocarpum* L. subjected to priming.** Botucatu, 2014. **61p.** Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: BRUNA LUIZA DE SOUZA

Orientador: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

## 2. ABSTRACT

Priming is a technique that increases the speed and uniformity of germination and promotes the break of dormancy in some species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of priming on seed quality and to study the expression of genes associated with embryo growth and degradation of the micropylar endosperm of seeds of *Solanum lycocarpum*. The seeds were subjected hydropriming and osmopriming conditioning with PEG (-0.2 MPa). There were evaluated the germination percentage, the germination speed index (GSI), the average time to germination and relative frequency of germination. The gene expression was performed using the real-time PCR technique. For this, RNA was extracted and cDNA synthesis was performed. The genes studied in the embryo were expansins (*EXP8* and *EXP10*),  $\alpha$ -galactosidase (*LeaGal*) and polygalacturonase (*XOPG1*), and in the micropylar endosperm were  $\alpha$ -galactosidase(*LeaGal*),  $\beta$ -mannosidase (*LeMside1*), endo- $\beta$ -mannanase (*LeMAN2*) and polygalacturonase(*XOPG1*). The highest speed, lowest average time to germination and higher synchronization of germination coincided with the peak of expression of the genes studied in the micropylar region and the embryo at five days of imbibition.

**KEYWORDS:** dormancy, embryo growth and endosperm weakening.

### 3. INTRODUÇÃO

*Solanum lycocarpum* L., conhecida como lobeira pertencente à família Solanaceae e está presente no bioma do Cerrado. O fruto da espécie serve de alimento ao lobo guará, sendo utilizado na produção de doces. Além disso, a lobeira é uma espécie com alto potencial para recuperação de áreas degradadas, sendo tolerante a solos de baixo potencial hídrico.

As sementes de lobeira têm dormência mecânica, onde os polissacarídeos da parede celular do endosperma exercem uma resistência mecânica que impedem a expansão do embrião e, conseqüentemente, a protrusão radicular. O principal polissacarídeo responsável pela dureza mecânica do endosperma é o manano ou galactomananos que são degradados pela ação das hidrolases como a endo- $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase.

Pinto et al.(2007) enfatizou que o enfraquecimento do endosperma micropilar e crescimento do embrião de lobeira é essencial para que ocorra a germinação. A degradação do endosperma micropilar ocorre em dois estágios. Inicialmente, ocorre a queda da força de ruptura do endosperma micropilar e aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase. O segundo estágio é influenciado pelo aumento do potencial de pressão das células do embrião.

Em sementes de tomate, o enfraquecimento do endosperma envolve a síntese de endo- $\beta$ -mananase que provoca um enfraquecimento parcial do endosperma, todavia há a necessidade da ação de outras enzimas (TOOROP et al., 1996; BEWLEY, 1997; BRADFORD,1997).

Além da ação das hidrolases no endosperma para favorecer a germinação, o crescimento do embrião também é importante. Chen e Bradford (2000) mostraram em sementes de tomate que expansinas expressas no embrião promovem a extensão das células da parede celular da radícula, promovendo o crescimento do embrião.

O condicionamento fisiológico envolve a embebição de água pela semente, sob condições controladas, incentivando o metabolismo das sementes durante a fase I e II da embebição, mas impedindo que ocorra a protrusão da raiz primária ( BEWLEY e BLACK, 1982). Sementes quando condicionadas têm a porcentagem e velocidade de germinação superior, em comparação com as sementes que não foram condicionadas, além de apresentarem maior uniformidade de germinação (MARCOS FILHO, 2005).

Em sementes de lobeira hidrocondicionadas, foi observado resultados superiores quanto à velocidade de germinação. Foi visto também que há uma diminuição da força de resistência do endosperma micropilar ao alongamento do embrião durante a germinação. Além disso, durante o condicionamento e, paralelamente a diminuição da força de ruptura, houve aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase ( ANESE et al.,2011).

Embora alguns estudos mostrem a importância da técnica de condicionamento fisiológico na melhoria da qualidade de sementes e a associação com eventos bioquímicos, ainda faltam trabalhos em nível molecular, principalmente de genes associados com a degradação do endosperma micropilar e com o crescimento do embrião, em sementes condicionadas.

Este trabalho buscou provar que o condicionamento das sementes promove uma melhoria na qualidade das sementes tanto fisiológico como bioquímico.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do condicionamento fisiológico na qualidade fisiológica e por meio da expressão de genes associados com o crescimento do embrião e degradação do endosperma micropilar em sementes de *Solanum lycocarpum*.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

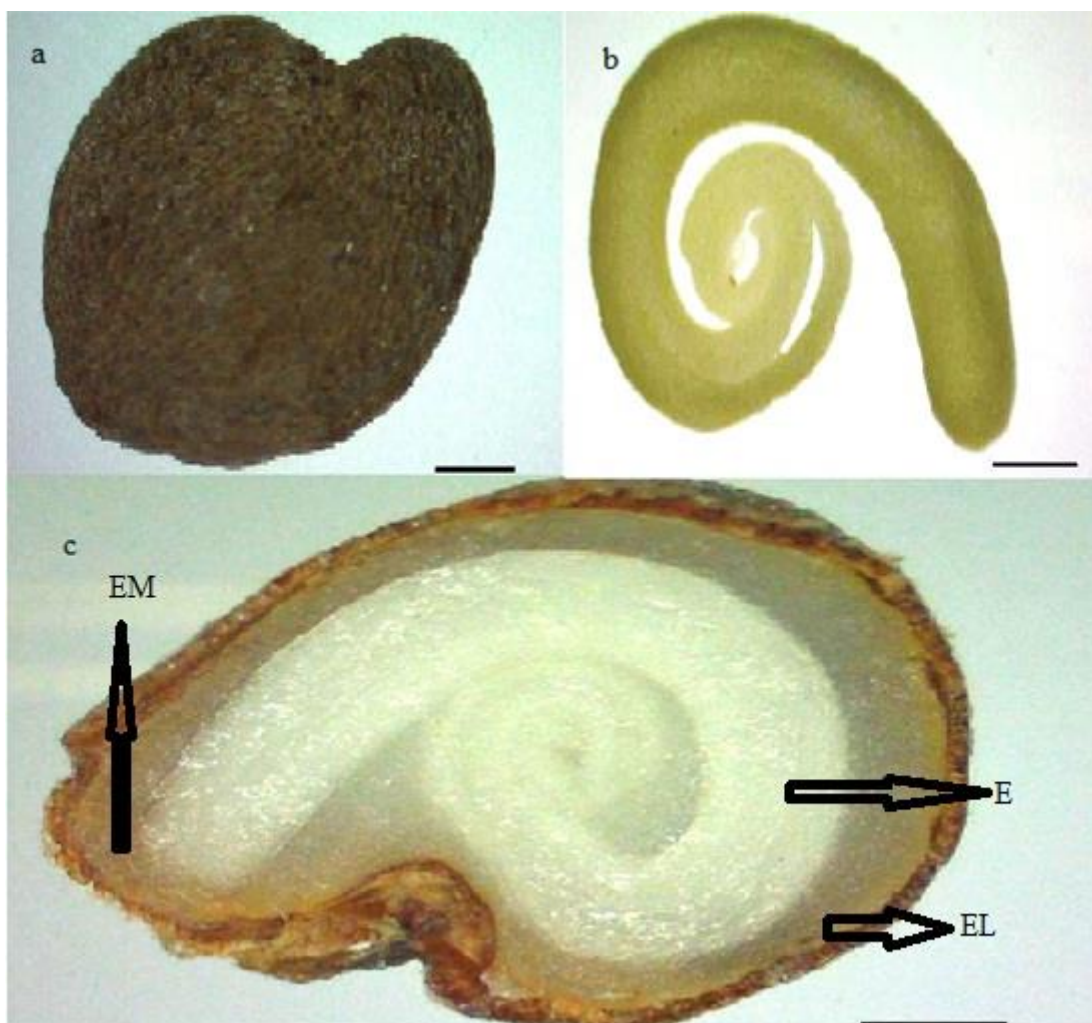
### 4.1 *Solanum lycocarpum* St Hill

*Solanum lycocarpum* é uma espécie conhecida como fruta do lobo ou lobeira, da família das Solanáceas, de porte arbustivo a arbóreo e de ampla distribuição no Brasil central, de ocorrência em áreas perturbadas pelo homem e em pastagem (CORRÊA, 1984; LORENZI, 2002). A lobeira é o principal item alimentar do logo-guará e de outros mamíferos e roedores. A espécie possui potencial medicinal (DALL' AGONOL e VON POSER, 2000; PEREZ, 2006; TIOSSI, 2010) e alimentar, na produção de doces e massas (Corrêa, 1984), tendo altos valores nutricionais (JUNIOR et al., 2003).

A lobeira é uma planta pioneira e potencialmente útil na recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2002; SANTOS et al., 2002). Vidal, et al.(1999) mostrou que em condições de baixo potencial hídrico, plântulas de *Solanum lycocarpum* investem em crescimento radicular, podendo ser este um mecanismo adaptativo, importante em condições adversas.

As sementes de *Solanum lycocarpum* quando secas a 8% de umidade, apresentam tegumento rígido, coloração marrom-escuro, forma achatada, com comprimento, largura, e espessura médios de 7 mm, 5,17 mm, 1,78 mm, respectivamente e um quilo de sementes tendo em média 35000 unidades. O embrião apresenta forma espiral

encaixado no endosperma, os cotilédones localizam-se na parte interna e o hipocótilo e a radícula, de forma curvilínea, na parte externa (PINTO, 2007)



**Figura 1.** Fotos de *Solanum lycocarpum* mostrando; a) semente inteira, b) embrião , c) corte longitudinal, com setas indicando o endosperma lateral (EL), o endosperma micropilar (EM) e embrião (E). Barras representam 0,5 mm.

#### 4.2 Dormência Mecânica

A dormência é a ausência de germinação de uma semente intacta e viável, sob condições favoráveis, durante determinado período de tempo (HILHORST, 1995).

Sementes de muitas espécies se tornam dormentes durante o desenvolvimento na planta-mãe e esta resistência à germinação pode persistir após as sementes serem disseminadas. A este fenômeno dá-se o termo “dormência primária”,

considerado parte de uma estratégia de sobrevivência em períodos onde as condições não são favoráveis (OSBORNE, 1981).

Marcos Filho (2005) enfatiza que a dormência mecânica é aquela onde a expansão do embrião é limitada pela resistência exercida pelo tegumento da semente, pelo pericarpo (parede do fruto) ou pelas paredes celulares do tecido de reserva. Logo, é necessário um enfraquecimento, degradação dos tecidos do endosperma para que ocorra a germinação. Sitrit et al.(1999) afirmou que a penetração da radícula de sementes no endosperma é dependente de processos envolvendo perda de coesão de célula e penetração dos tecidos existentes.

Em espécies de *Datura SP*, solanácea, a dormência é imposta pelos tecidos que circundam o embrião, o endosperma, promovendo uma barreira física e restringindo o crescimento do embrião. A luz, responsável por promover a germinação em algumas espécies de *Datura*, age promovendo o afrouxamento das células das paredes celulares do endosperma (SANCHEZ e MIGUEL, 1985; SANCHEZ et al.,1990). Sanchez et al. (1990) observaram que o polissacarídeo mais degradado no endosperma micropilar é o mannano, e este é reduzido cerca de 70% antes da germinação.

Leubner-Metzger, et al. (1995) mostraram que sementes de tabaco rompem o tegumento e o endosperma em fases distintas e quando as sementes são tratadas com ABA, o rompimento do tegumento e crescimento do embrião não são afetados, mas o crescimento radicular é afetado e a radícula só volta a crescer quando o endosperma micropilar se rompe. Lee et al.(2012) observaram no endosperma micropilar de sementes de tabaco uma degradação de heteromananos durante a germinação.

Welbaum e Bradford (1990) relataram que em sementes de melão o endosperma não forma uma barreira física para o movimento de água e sim, uma barreira química e áspera que impede o desenvolvimento do embrião, controlando a germinação como também fornecendo proteção contra patógenos e limitando a exsudação de solutos.

Welbaum et al.,(1995) observaram em sementes de melão que a força de ruptura necessária para romper o endosperma, diminuiu de forma constante após hidratação e que depois de 20 horas, foi visível grandes fissuras no endosperma micropilar de sementes de melão, conseqüentemente a germinação ocorreu após 21 horas de embebição.

Jacobsen e Pressman (1979) mostraram que em sementes de aipo, o embrião é pequeno, centralmente localizado e rodeado por endosperma, sendo o endosperma micropilar de espessura de 3 a 4 células. A partir do 2º dia de embebição, o embrião começa sua expansão e no sexto dia a radícula já penetra no endosperma micropilar, ocorrendo a protrusão da radícula, sendo que a medida que ocorre o alongamento do embrião, há também a degradação do endosperma.

O endosperma de café é composto por um tecido duro esverdeado com células poliédricas, é dividido em um endosperma externo, rígido e um interno, macio (Dedecca, 1957). Da Silva et al.(2004) observaram que a força de resistência do endosperma diminui em dois estágios, sendo que o primeiro estágio deve-se a ação de enzimas que degradam a parede celular. Já a segunda fase é controlada por ABA, que inibe parcialmente a ação de endo-  $\beta$  -mananase e o crescimento do embrião.

O aumento do potencial de pressão das células do embrião ocorre, pois, ao chegar próximo à protrusão da radícula, o potencial osmótico das células da radícula torna-se mais negativo, por causa do acúmulo dos solutos, possivelmente como resultado da hidrólise de reservas presentes dentro das células da radícula e essa diminuição no potencial osmótico leva a um aumento do potencial de pressão com consequente extensão das células (BEWLEY, 1997).

Já em sementes de tomate mutantes, deficientes em ABA, foi visto que o embrião é cercado por uma área de endosperma menor e se tem maior alteração e acumulação do metabolismo de carboidratos, mas mesmo assim não houve diferença de velocidade de germinação destas sementes com as selvagens (Ni e Bradford, 1993).

Groot e Karssen (1987) mostraram que o embrião de sementes de tomate é completamente cercado por uma camada de endosperma rígido, necessitando então de enfraquecimento mecânico da região micropilar de sementes de tomate. Em sementes de alface, há também restrição da expansão do embrião imposta pelos tecidos do endosperma (PAVLISTA e HABER, 1970).

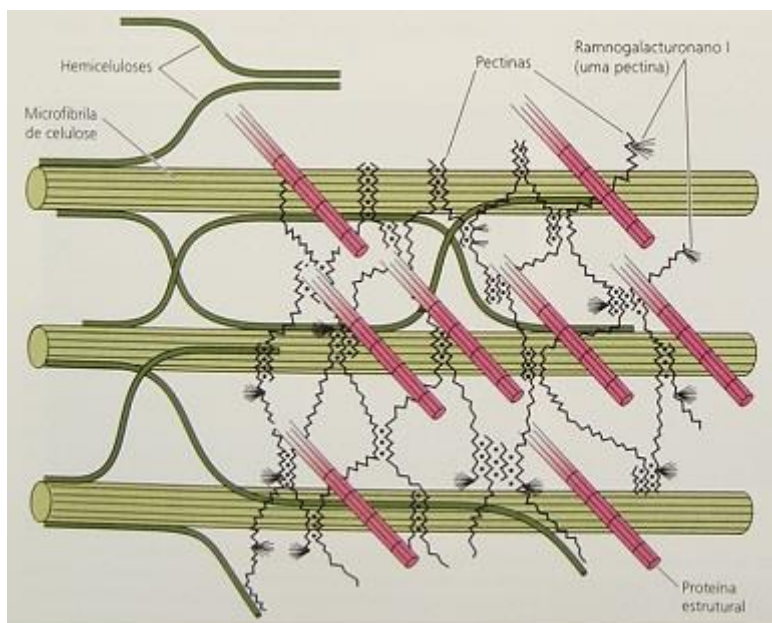
Pinto et al.(2007) e Anese et al.(2011) demonstraram em seus resultados que o enfraquecimento do endosperma micropilar em paralelo ao crescimento do embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* é essencial para a ocorrência da germinação.

#### 4.3 Polissacarídeos e a superação da dormência mecânica.

Durante muito tempo pensava-se que a única função da parede celular era de dar forma e rigidez à célula. Atualmente, sabe-se que esta estrutura também previne à ruptura da membrana plasmática pela entrada de água, é portadora de enzimas relacionadas a vários processos metabólicos, atua na defesa contra bactérias e fungos, promove a junção das células evitando o deslizamento dessas e sua ruptura leva à formação de, por exemplo, polissacarídeos (KRAUS et al.,2006; TAIZ e ZEIGER,2006).

A estrutura da parede celular primária é formada por microfibrilas de celulose, um polímero de D-glucose, imersas em uma matriz contendo polissacarídeos não celulósicos: hemiceluloses e pectinas. Encontra-se nas paredes celulares substâncias orgânicas como ligninas, proteínas e lipídeos, sendo proteínas importantes, as extensinas e a  $\alpha$ -expansina. Ocorre também enzimas peroxidases, fosfatases, endoglucanases, xiloglucano-endotransglicosilases e pectinases, substâncias lipídicas como suberina e cutina e inorgânicas, como sílica e cristais (KRAUS et al., 2006).

Os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) são classificados em três grupos distintos: os mananos, os xiloglucanos e os (arabino) galactanos. Esta classificação é baseada essencialmente na estrutura química desses polímeros, sendo os mananos subdivididos em mananos puros, glucomananos e galactomananos (BUCKERIDGE et al., 2000a). Os mananos puros são artificialmente definidos como contendo mais de 90% de manose, formando uma cadeia linear podendo ou não o restante estar ramificado com galactose. Quando a cadeia principal contém glucanos, o polímero é chamado glucomanano e ambos, mananos e glucomananos, podem ser substituído com unidades de galactoses (DEA et al.,1986; BUCHERIDGE et al., 2000b)



**Figura 2.** Diagrama esquemático dos principais componentes da parede celular primária e seu provável arranjo. (FONTE: BRETT e WALDRON, 1996).

Existem espécies em que o endosperma das sementes possui duas funções biológicas: em primeiro lugar, como em outros tipos de sementes, para fornecer as reservas para a germinação de sementes e crescimento das plântulas e, segundo, formando uma barreira mecânica que impede o crescimento do embrião. Isto ocorre em tomate, tabaco, pimenta e *Datura* sp (todos os quais estão na família Solanaceae), alface, (Compositae); melão (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae) e café (*Coffea arábica*, Rubiaceae) (NONOGAKI et al., 2007).

A parede celular vegetal possui uma combinação de força e flexibilidade, permitindo resistir a grandes pressões de turgescência. Como as microfibrilas de celulose são efetivamente inextensíveis, a expansão da parede celular ocorre por deslizamento, o rearranjo dos polímeros da matriz que revestem as microfibrilas, feito que ocorre pela ação de hidrolases e proteínas (NONOGAKI et al., 2007).

Segundo Buckeridge (2010b) ao estudar a biossíntese e degradação de polissacarídeo juntamente com o comportamento fisiológico, os modelos gerados podem levar a futuras aplicações biotecnológicas. Diversas proteínas da parede celular e hidrolases que têm como função o enfraquecimento do endosperma e o crescimento do embrião tiveram seus genes identificados. Endo- $\beta$ -mananase (*LeMAN2*),  $\alpha$ -galactosidase (*LeaGal*),  $\beta$ -Manosidase (*LOC543698*), expansinas (*EXP8* e *EXP10*) e polygalacturonase (*XOPG1*), são alguns exemplos.

#### 4.3.1 Endo- $\beta$ -mananase

Nonogaki e Mororashi (1996) observaram que em sementes de tomate existem diferentes formas da endo-  $\beta$ -mananase, sendo que a isoenzima responsável pelo afrouxamento da parede celular do endosperma, ocorre somente na área micropilar em eventos pré-germinativos e aquelas que ocorrem após a germinação, ocorrem somente no endosperma lateral e são responsáveis pela mobilização de galactomananos.

O enfraquecimento dos tecidos do endosperma em sementes de tomate envolve a síntese de endo- $\beta$ -mananase, que está associada com a hidrólise da parede celular. Todavia, endo- $\beta$ -mananase provoca enfraquecimento parcial do endosperma, necessitando da atividade de outras hidrolases de parede celular (TOOROP et al., 1996; BEWLEY, 1997; BRADFORD, 1997).

A análise da expressão dos genes de endo- $\beta$ -mananase em sementes de tomate, mostrou que LeMAN1 ocorre após a germinação no endosperma lateral, enquanto que LeMAN2 tem expressão antes da germinação, apenas no endosperma micropilar (NONOGAKI et al. 2000). Em sementes de lobeira a atividade da enzima endo- $\beta$  -mananase antes da protrusão da radícula se mostra apenas no endosperma micropilar (PINTO et al., 2007). Estes resultados juntos mostram a importância de endo- $\beta$ -mananase no enfraquecimento do endosperma micropilar nestas espécies

Groot e Karsen (1987) observaram que a aplicação de giberelina (GA) em sementes de tomate mostrou um enfraquecimento do endosperma, sendo este evento pré- germinativo e mediado pela indução da atividade de endo- $\beta$ -mananase, resultando em uma digestão parcial das paredes celulares do endosperma.

Toorop et al. (1996) observaram que o ABA não diminui a quantidade de endo- $\beta$ -mananase, consideravelmente, nas paredes celulares do endosperma micropilar de sementes de tomate, e que isto ocorreu porque esta enzima não é o único fator para que ocorra o afrouxamento da parede celular.

#### 4.3.2 $\beta$ -manosidase e $\alpha$ -galactosidase

O papel da  $\beta$ -manosidase na hidrólise de galactomananos da parede celular do endosperma de sementes de tomate é dependente do papel da endo- $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -galactosidase, uma vez que ela hidrolisa oligomananos anteriormente clivados pelas outras duas (BEWLEY e MO, 2002).

Bewley e Mo (2002) observaram que há atividade e expressão de endo- $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase de sementes de tomate na região do endosperma micropilar, antes e após a protrusão da radícula, indicando regulação similar das duas enzimas.

Trabalhos têm relatado comportamento molecular diferenciado das enzimas, enquanto Nonogaki et al. (2000) encontrou pelo menos quatro genes de endo- $\beta$ -mananase, Feurtado et al. (2001) e Bewley e Mo (2002) não identificaram a ocorrência de cópias do gene de  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -manosidase.

Em sementes de alface os produtos da hidrólise de galactomannanos das paredes celulares do endosperma, gerados pela enzima endo- $\beta$ -mannanase, são transportados para os cotilédones, onde eles entram em contato com  $\beta$ -manosidase nas paredes celulares e, então, são clivados, produzindo a manose e galactose (OUELLETTE e BEWLEY, 1986).

Em sementes de tomate há atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase em toda a semente; embrião, endosperma lateral, endosperma micropilar-, antes e após a protrusão da radícula (BASSEL et al., 2001; FEURTADO et al., 2001).

#### 4.3.3 Expansinas e Poligalacturonase

Pensava-se anteriormente à descoberta da expansina, que a expansão da parede celular ocorria unicamente pela hidrólise dos polissacarídeos da matriz, mas a descoberta das expansinas revelou outro mecanismo de afrouxamento da parede. A expansina em contraste a outras teorias enzimáticas convencionais de afrouxamento da parede, não faz hidrólise, ela enfraquece a ligação não covalente entre polissacarídeos da parede celular. Apesar de não ser uma hidrolase, a expansina faz os glucanos das microfibrilas, serem mais acessíveis ao ataque enzimático (COOSGROVE, 2000).

Chen e Bradford (2000) mostraram que apesar de existirem diversas expansinas, em sementes de tomate, há a expressão antes da protrusão da radícula do gene LeEXP4 o qual está localizado no endosperma micropilar, a do LeEXP8 que é expresso especialmente na ponta da radícula e a do LeEXP10 que acumula tanto na ponta da radícula como no resto da semente. Os dois últimos promovem a extensão das células da parede celular da radícula.

Vários eventos fisiológicos na planta dependem do afrouxamento das células, como o crescimento do tubo polínico (MU et al, 1994), e o crescimento de hifas dos fungos (HAHN et al., 1989). Todos esses eventos são acompanhados pela hidrólise parcial da pectina de parede celular e são correlacionadas com a presença e atividade de poligalacturonase.

Sitrit et al., (1999) observaram a expressão do gene de LeXPG1 (poligalacturonase), antes da germinação, na área micropilar e ponta da radícula em sementes de tomate.

O gene LeEXP4 apresenta expressão na área micropilar de sementes de tomate é afetado positivamente por giberelina (GA), negativamente por baixo potencial osmótico e luz vermelho distante. Esses fatores influenciam do mesmo modo a germinação das sementes e a baixa expressão de LeEXP4 e quando em baixo potencial de água e luz vermelho distante leva o embrião a fazer uma maior força de ruptura para que ocorra a germinação. Isto leva a conclusão que o gene LeEXP4, juntamente com outras hidrolases de parede celular, estão envolvidos na degradação e afrouxamento das células da parede celular do endosperma micropilar, levando à superação da dormência (CHEN e BRADFORD, 2000).

#### 4.4 Características relacionadas à germinação de sementes de *Solanum lycocarpum* comparadas à *Solanum lycopersicum*

As sementes de *Solanum lycocarpum*, têm estruturas internas arranjadas de forma muito semelhante a *Solanum lycopersicum*, tomate, sendo que as células do endosperma micropilar apresentam tanto o diâmetro médio, como a espessura da parede celular menor que no endosperma lateral. O endosperma micropilar da lobeira possui de sete a oito camadas de células (PINTO et al, 2007) contra quatro camadas de células nas sementes de tomate (TOOROP et al.,2000) fazendo com que a primeira necessite de uma tempo maior de embebição para germinar (PINTO et al.,2007).

Em sementes de tomate o afrouxamento das células da parede celular do endosperma micropilar ocorre em duas fases, a primeira fase é dependente de GA (GROOT e KARSSSEN, 1987) e a segunda fase é sensível ao ácido abscísico, sendo este, regulador das enzimas responsáveis pelo enfraquecimento do endosperma micropilar (Toroop et al. 2000). Em tomate à superação da dormência mecânica ocorre apenas com o afrouxamento das células da parede celular do endosperma micropilar, não há aumento do potencial de pressão no embrião (TOOROP et al., 2000)

Toorop (1996) mostrou que a barreira imposta a expansão e crescimento das sementes de tomate não é consequência da incapacidade do sistema radicular de crescer, pois, quando foi retirado o endosperma micropilar das sementes embebidas, mesmo com a aplicação de ácido abscísico (ABA), houve crescimento da radícula.

Já em sementes de lobeira, segundo Pinto et al. (1997) o enfraquecimento do endosperma micropilar é essencial para a ocorrência da germinação. O enfraquecimento do endosperma micropilar ocorre em dois estágios, onde no primeiro estágio ocorre a queda da força de ruptura do endosperma micropilar e se relaciona com o aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase. O segundo estágio se relaciona com o crescimento do embrião.

Segundo Hilhorst et al., (1998) o tomate é uma espécie considerada modelo para estudos de desenvolvimento e germinação de sementes. *Solanum lycocarpum* além de ser uma espécie da mesma família do tomate tem características germinativas bem

parecidas com o tomate. Além disso, é uma espécie nativa e pouco estudada, podendo então, contribuir para a compreensão do mecanismo molecular de germinação da família Solanaceae, com o melhoramento de plantas e com a produção e tecnologia de sementes.

#### 4.5 Condicionamento fisiológico de Sementes

O condicionamento fisiológico, *priming*, envolve a embebição de água pela semente, sob condições controladas, favorecendo o metabolismo germinativo das sementes durante a fase I e II da embebição, mas impedindo que ocorra a protrusão da raiz primária (BEWLEY e BLACK, 1982).

Segundo Marcos Filho (2005) o condicionamento fisiológico eleva a velocidade de germinação e emergência de plântulas, aumenta a sincronização do processo de germinação das sementes e estimula uma maior tolerância ao estresse pelas sementes, após a semeadura ou durante a germinação, além de melhor formação de mudas.

De acordo com Bray (1995) e Marcos Filho (2005) com o uso da técnica do *priming*, as sementes chegam à fase II de embebição, sendo que na fase I, proteínas são sintetizadas usando mRNA e DNA existente e mitocôndrias são reparadas, já na fase II há síntese de mRNA (RNA mensageiro) novos e síntese de novas mitocôndrias.

Soeda et al., (2005) observaram em sementes de *Brassica oleraceae* que os níveis de RNA, as subunidades ribossomais e fatores de alongamento, aumentam durante o osmocondicionamento. *Priming* aumenta a síntese de proteína promovendo e melhorando o funcionamento da maquinária de síntese protéica, sendo que o reparo do DNA durante o *priming* com a manutenção da integridade do DNA através da reparação dos danos sofridos é importante para a geração do modelo livre de erros de transcrição e replicação (VARIER et al., 2010).

Nascimento et al. (2001) verificaram que sementes de alface não condicionadas resultam em uma germinação muito baixa em comparação com as sementes condicionadas, e que as sementes condicionadas aumentam a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase.

Sementes de alface tem termodormência e o osmocondicionamento reduz essa dormência imposta por temperaturas acima da ótima (NASCIMENTO e CANTLIFFE, 1998). O *priming* em sementes de alface leva a uma iniciação do

alongamento celular, aumento do potencial de crescimento do embrião, superando assim a termodormência (NASCIMENTO, 2001).

Nakaune et al. (2012) ao compararem o condicionamento fisiológico (*priming*) em sementes de tomate com solução de Cloreto de Sódio (NaCl), com o condicionamento em água (hidropriming) observaram que apesar da germinação final dos tratamentos serem iguais, a velocidade de germinação do tratamento com NaCl, foi maior, e aumentou o teor de giberelina (GA4). Além disso, os autores relatam maior expressão das enzimas, expansina (EXP), b-1,3-glucanase (GulB), endo- $\beta$ -mananase (MAN) e xiloglucano endotransglucosilase (XTH), presentes no endosperma micropilar e responsáveis pelo enfraquecimento da região micropilar.

Anese et al. (2011), observaram que em sementes de *Solanum lycocarpum*, o condicionamento com água, por 15 dias a 15°C promoveu efeitos positivos sobre o vigor das sementes, expresso pelo resultado de IVG (Índice de Velocidade de Germinação) e T50 (Tempo necessário para a germinação chegar a 50%). Foi visto também que há uma diminuição da força de ruptura, parâmetro de resistência mecânica do endosperma micropilar ao alongamento do embrião durante a germinação. Paralelamente à diminuição da força de ruptura, houve aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase.

#### 4.6. Expressão gênica

A comparação entre perfis transcricionais contrastantes (genótipos, condições fisiológicas ou ontológicas diversas) pode auxiliar na identificação dos genes responsáveis pelo processo fisiológico em estudo (MEYERS et al., 2004).

De acordo com Farah (2007), genes com a mesma função frequentemente são similares em organismos diferentes, por isso, quanto mais próximas forem as espécies, maior a semelhança entre os genes.

Os métodos usados para estudar a expressão gênica, como hibridização de *Northern Blot*, a reação PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo, e ensaios de proteção RNase, podem apresentar falta de sensibilidade (DESROCHE et al., 2005). Já o método de PCR em tempo real (RT q PCR) que é amplamente utilizado para a quantificação dos níveis de mRNA no estado estacionário é uma ferramenta fundamental para a pesquisa básica, medicina molecular e biotecnologia,

é de fácil execução, de alto rendimento e combina alta sensibilidade com especificidade confiável (BUSTIN, 2002).

A técnica de PCR em tempo real depende da utilização de corantes fluorescentes para quantificar a transcrição do gene alvo, com o número do ciclo de amplificação em que transcrições são detectadas, apresentando indicação quanto à abundância relativa das moléculas-alvo. A sensibilidade da técnica de PCR em tempo real constitui uma poderosa ferramenta para medição da expressão gênica, sobretudo quando as quantidades de amostra são limitadas ou a transcrição é expressa em um nível baixo. Porém, essa sensibilidade também significa que uma grande dose de cuidado é necessária com relação ao design experimental e aplicação do procedimento (WALKER et al., 2009).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Sementes**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análise Sementes do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu.

Os frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) foram colhidos quando maduros e caídos no chão na região de Lavras, MG, com altitude, segundo Brasil (1992), de 919 metros, latitude de 21°14' S e longitude de 45°00' W GRW em fevereiro de 2010. Em seguida os frutos foram beneficiadas por meio da retirada da polpa e da passagem da mesma em peneiras, sob água corrente, para a separação das sementes. Após o beneficiamento as sementes foram secas e mantidas em saco plástico fechado em ambiente de 4 ° C (geladeira).

Para determinar o teor de água, foram retiradas três repetições de oito sementes, sendo que o método de secagem utilizado foi o método de estufa a 105 °C por 17 horas (BRASIL, 2009).

## 5.2. Condicionamento Fisiológico

O condicionamento fisiológico das sementes de lobeira foi feito em solução de polietilenoglicol (PEG) 6000 com um potencial osmótico de  $-0,2$  MPa (osmocondicionamento) e em água destilada (hidrocondicionamento). Primeiramente, as sementes foram desinfetadas com hipoclorito (1%) por 10 minutos, depois colocadas em um tubo Falcon e condicionadas nas soluções já citadas, durante 15 dias e mantidas em BOD a  $15$  °C (ANESE, 2007). A aeração da solução de PEG foi possível através da utilização do aparelho Mixer, que faz a agitação dos tubos possibilitando sua aeração. A solução de PEG foi trocada a um, cinco e dez dias após o início do condicionamento. Após a lavagem das sementes condicionadas com PEG por dois minutos, efetuou-se a secagem com uma solução de cloreto de magnésio por 16 horas até as sementes voltarem a umidade de 9%. Para isto, as sementes foram acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  e colocadas sobre uma tela de alumínio dentro de uma caixa tipo gerbox, onde se depositou no fundo a solução de cloreto de magnésio. A solução foi preparada com 35g de cloreto de magnésio, mais 3 ml de água e triturada até o ponto de formar uma pasta. Foi utilizada uma testemunha (semente seca, sem qualquer pré-tratamento de embebição) para a comparação com as sementes condicionadas.

## 5.3. Germinação de sementes condicionadas e não condicionadas de *Solanum lycocarpum*.

Após a secagem, as sementes foram pré-umidificadas por 24 horas, a fim de diminuir possíveis danos por embebição. A pré umidificação foi feita utilizando caixas tipo gerbox, às quais se adaptou uma tela de alumínio, onde as sementes foram colocadas após a adição de 20 ml de água no fundo de cada gerbox em uma BOD de  $25^{\circ}\text{C}$ . Após 24 horas, as sementes foram novamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos e colocadas para germinar. Os testes de germinação em sementes condicionadas e não condicionadas foram feitos dispendo as sementes entre papel, duas camadas de papel germitest em baixo das sementes e uma em cima, umedecidas em 2,5 o peso do papel em caixas tipo gerbox acondicionadas em uma câmara de germinação do tipo BOD, a uma temperatura alternada de  $20-30^{\circ}\text{C}$  com fotoperíodo de 12/12 horas, por 15 dias. Foram utilizados cinco repetições de 25 sementes para cada tratamento. Realizou-se contagem de germinação diária, considerando sementes germinadas, àquelas com raiz

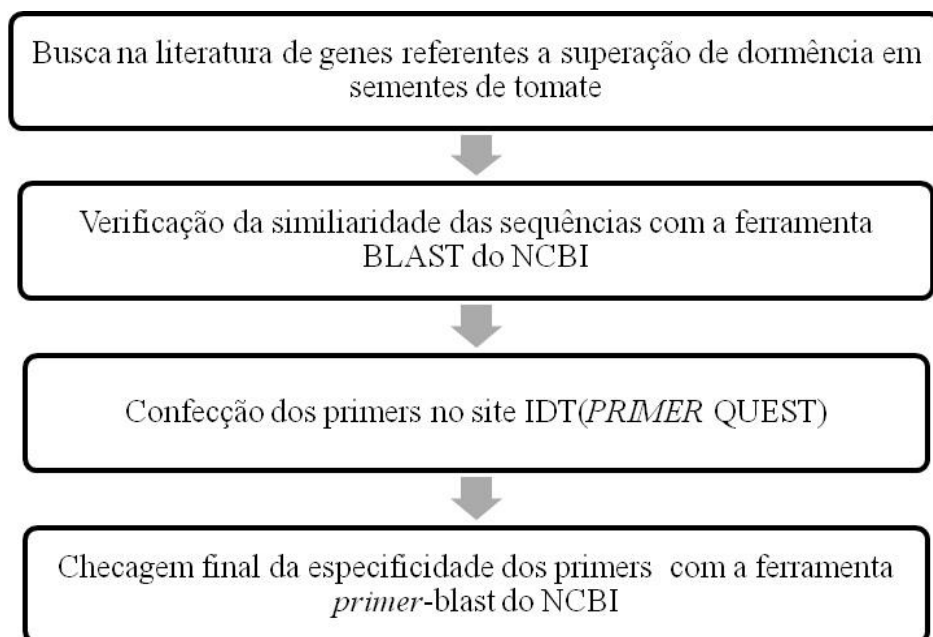
primária maior ou igual a 1 mm. A avaliação foi feita por meio da porcentagem de germinação, do índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), frequência de germinação (LABOURIAU e AGUDO, 1987), tempo médio de germinação (LABOURIAU, 1983) para sementes secas, condicionadas com PEG (-0,2 MPa) e condicionadas com água.

#### 5.4 Desenhos de ‘primers’

Os genes estudados foram identificados por buscas na literatura de genes associados à dormência mecânica imposta pelos polissacarídeos das paredes celulares do endosperma. Devido a ausência destas sequências nucleotídicas em *Solanum lycocarpum*, foram usadas sequências de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*), uma espécie da mesma família da lobeira, com o mesmo tipo de dormência e anatomicamente semelhantes.

A sequência dos genes estudados e depositados no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para sementes de tomate, foram usadas no desenho de primers. Para desenhar os primers foi utilizado o software PRIMER QUEST (<https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>). Após a confecção dos primers, os mesmos foram verificados quanto sua especificidade no banco de dados do NCBI (Figura 3) (Tabela 1,2).

Os parâmetros utilizados no desenho dos primers foram: *amplicon* de 100 a 200, temperatura de anelamento de 60°C +1, porcentagem de GC de 50 a 60% e 18 a 22 pares de bases.



**Figura 3.** Fluxograma para design de “primers” para uso em RT-qPCR.

**Tabela 1.** “Primers” específicos de embrião e endosperma micropilar de sementes de lobeira utilizados para análises de PCR em tempo real.

Nome	Forward	Reverse
Endo- $\beta$ - mananase <sup>1</sup>	CTCGCGATCAAGCTGACTATT	CAATAGAGACTCGCAGGGAAATA
$\beta$ -manosidase <sup>1</sup>	GGATTGTCCCTGTTGCTTACA	GACGTCTGGGATGACTTGAATC
$\alpha$ -galactosidase <sup>1</sup>	GATTCCGCTACTGAGCCTTATATT	GATCACAATGATGGACCACAAAC
Expasina 8 <sup>1</sup>	CCCTCCATTCCAACCTCTAAC	CTGAGTCCCAGCATCAGAATAA
Expansina 10 <sup>1</sup>	GCCAAACTTCCCTTTCTGTTTC	CCGCCATCTCCATCCTAAAT
Polygalacturonase <sup>1</sup>	CGTTCGTCACCAGCACTAAA	TCCTGGCCCCATAACCATCTATAA
18S ribossomal <sup>2</sup>	TGACGGAGAATTAGGGTTTCG	CCTCCAATGATCCTCGTTA

<sup>1</sup>Confeccionado pelo autor; <sup>2</sup> Kim et al. (2010)

**Tabela 2.** Genes (mRNAs) estudados no embrião e no endosperma micropilar durante a germinação de sementes de lobeira.

Gene alvo	Nº Acesso	Sigla	Tecido/ Semente	Função
Endo- $\beta$ -mannanase	AF 184238.2	LeMAN2	Endosperma micropilar	Hidrólise dos polissacarídeos da parede celular <sup>1</sup>
$\beta$ -mannosidase	NM_001247691.1	<i>LeMside1</i>	Endosperma micropilar	Hidrólise dos polissacarídeos da parede celular <sup>2</sup>
$\alpha$ -galactosidase	AF191823	LeaGal	Endosperma micropilar/embrião	Hidrólise dos polissacarídeos da parede celular <sup>3</sup>
Expansina 8	AF311953.1	Exp8	Ponta da radícula	Enfraquece a ligação não covalente entre polissacarídeos da parede celular (Extensão) <sup>4</sup>
Expansina 10	NM_001247435	EXPA10	Ponta da radícula e resto da semente.	Enfraquece a ligação não covalente entre polissacarídeos da parede celular (Extensão) <sup>4</sup>
Poligalacturonase	AF138858.1	XOPG1	Todo embrião e na região micropilar	Reduz o tamanho molecular de polímeros pécnicos por clivagem dos resíduos de cadeia lateral <sup>5</sup>
18S				Normalizador <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Nonogaki et al.(2000); <sup>2</sup>Mo e Bewley(2002); <sup>3</sup>Feurtado et al.(2001); <sup>4</sup>Chen et al.(2001);<sup>5</sup>Sitrit et al.(1999); <sup>6</sup> Kim et al. (2010)

## 5.5 Extração de RNA

O condicionamento com água (hidrocondicionamento) obteve os melhores resultados de porcentagem de germinação e velocidade de germinação, por isso, o estudo da expressão gênica foi realizado em sementes hidrocondicionadas e semente seca. Sementes de lobeira foram novamente condicionadas em água e postas para germinar juntamente com a testemunha (semente seca). Os períodos escolhidos para realizar o estudo de expressão gênica foram de 1, 5 e 10 dias de embebição. O período de um dia de embebição foi escolhido para ser “semente seca”, o período de cinco dias por ser o intermediário ao período de dez dias que representa 50% de germinação das sementes de lobeira. Para cada período de embebição foi feito o estudo em duas localidades na semente, área micropilar e embrião. Para isso, foram retirados da semente a área micropilar e o embrião, em cada período. Todas as amostras, área micropilar e embrião (períodos de embebição; 1, 5, 10 dias), foram armazenadas à -80°C. Para a extração do RNA foi utilizado o “kit” – NucleoSpin RNA Plant<sup>®</sup> da Macherey-Nagel. O protocolo do kit sofreu alterações nos tempos de centrifugação para que o álcool pudesse ser melhor eliminado e não prejudicar a extração. Em capela foram transferidos aproximadamente 100 mg do material vegetal macerado, 350 µL de tampão de extração (RA1) e 3,5 µL de β-mercaptoethanol (β-ME) para um tubo plástico de 1,5 mL. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas com auxílio de um agitador “Vortex”, transferidas para filtros NucleoSpin Filter<sup>®</sup> acoplados a tubos coletores de 2 mL e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm, para redução da viscosidade. Foram adicionados 350 µL de etanol 70% nos filtrados de cada amostra e transferidas para colunas de NucleoSpin RNA Plant<sup>®</sup> acoplados a tubos coletores de 2 mL e centrifugadas por 1 minuto à 11.000 rpm. Após as colunas de filtração serem acondicionadas a novos tubos coletores, foram adicionados 350 µL de Membrane Desalting Buffer<sup>®</sup>, centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm até a membrana da coluna de filtração apresentar-se seca. Foram adicionados no centro da membrana de sílica da coluna de filtração 95 µL de DNase reaction mix, constituído por 10 µL de rDNase reconstituído e 90 µL de reaction mix e os tubos incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Para lavagem e secagem das membranas, as colunas de filtração foram submetidas à lavagem com 200 µL de tampão e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. Acondicionadas em novos tubos coletores, as colunas de filtração foram

submetidas a uma segunda lavagem adicionando 600  $\mu\text{L}$  de tampão RA3 e centrifugadas por 2 minutos a 11.000 rpm. Após o descarte da solução do tubo coletor, foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de tampão em colunas de NucleoSpin RNA Plant<sup>®</sup> e centrifugado por 3,5 minutos a 11.000 rpm até secar completamente a membrana. Transferidas as colunas de NucleoSpin RNA Plant<sup>®</sup> para micro tubos de 1,5 mL, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de água RNase-free nas colunas de NucleoSpin RNA Plant<sup>®</sup> e centrifugadas por 1 minuto a 11.000 rpm para obtenção do RNA extraído. Como algumas amostras após feito o gel de agarose apresentaram bandas de DNA, fez-se necessário adicionar 4  $\mu\text{L}$  de reaction buffer para rDNase e 0,4  $\mu\text{L}$  de rDNase para cada 40  $\mu\text{L}$  de RNA eluído e incubar estes a banho maria por 10 minutos a 37°C, para a digestão do DNA resistente.

Após a extração de RNA, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e seus resultados expressos em ng/ $\mu\text{L}$ . A verificação da integridade das amostras de RNA foi realizada mediante avaliação em gel de agarose 1,0%, 0,4g de agarose mais 40  $\mu\text{L}$  de TAE 1X. Soluções contendo 1  $\mu\text{L}$  de RNA extraído mais 1  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol foram colocadas em uma cuba de eletroforese a 60 volts por 45 minutos, iniciando a corrida.

O marcador utilizado foi o 1kbp DNA Lader (Jena Bioscience) na quantidade de 1  $\mu\text{L}$ . Para visualização das bandas no gel foi utilizado um fotodocumentador (Mini Bis 24 mm da DNR Bio-Imaging Systems).

## 5.6 Confeção de cDNA

Para a confecção do cDNA foi utilizado o kit First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real-Time PCR. Conforme o protocolo do kit, para fechar em uma reação de 20  $\mu\text{L}$ , usou-se para cada amostra, volumes acima de 1  $\mu\text{L}$  (o volume exato foi dependente da quantificação dadas no Nanodrop) de RNA, 2  $\mu\text{L}$  dos primers, Anchored Oligo(dt)<sub>23</sub>VN e Random Hexamers, 2  $\mu\text{L}$  de 10x RT Buffer, 1  $\mu\text{L}$  10Mm dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor e 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV RT e o restante completou-se com água DEPC. Foi utilizado o equipamento para PCR convencional (Prime, marca Techne) e as reações ocorreram nas seguintes condições, primeira fase à 44 °C por 60 minutos, segunda à 92°C por 10 minutos e terceira à 4°C. As amostras foram quantificadas no Nanodrop-2000

(Thermo Scientific) e padronizadas para 60 ng/ $\mu$ L. Após a padronização, as amostras foram armazenadas à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 5.7. Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real

Para a quantificação da expressão relativa dos genes em estudo e do normalizador (18S), foi utilizado o kit Eva Green master mix, sendo padronizadas reações para cada primer, totalizando uma solução total de 20,0  $\mu$ L (Tabela 3).

**Tabela 3.** Reações específicas para cada primer.

Nome	Syber/Eva green	Forward	Reverse	cDNA	Água
18S	10 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	6 $\mu$ L	3 $\mu$ L
Endo- $\beta$ - mannanase	10 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	2 $\mu$ L	7,3 $\mu$ L
$\beta$ -manosidase	10 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	2 $\mu$ L	7,3 $\mu$ L
$\alpha$ -galactosidase	5 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9,3 $\mu$ L
Expasina 8	5 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9,3 $\mu$ L
Expansina 10	5 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9,3 $\mu$ L
Poligalacturonase	5 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	0,35 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9,3 $\mu$ L

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em um termociclador Eco Real-Time (Illumina), com um ciclo inicial de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, seguido de 45 ciclos com desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e pareamento a  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto. Os dados foram posteriormente analisados no programa da Illumina.

Foram utilizadas três repetições biológicas, que foram produzidas durante a extração de RNA e para cada repetição foram geradas duas repetições técnicas, no momento da amplificação do Cdna, dando um total de nove amostras para cada tratamento. Com o controle negativo feito houve a certificação de não contaminação das amostras, onde ao invés de cDNA foi colocado água DEPC.

O cálculo para a determinação da expressão gênica foi o do  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001), o qual se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a

expressão  $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde QR representa o nível de expressão gênica, Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial;  $\Delta Ct$  se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência, e  $\Delta\Delta Ct$  representa a diferença entre o  $\Delta Ct$  da amostra de interesse em determinado tempo e o  $\Delta Ct$  da amostra de referência. Os resultados de expressão gênica obtidos foram apresentados em relação às sementes embebidas por 1 dia.

### 5.8 Análises estatísticas

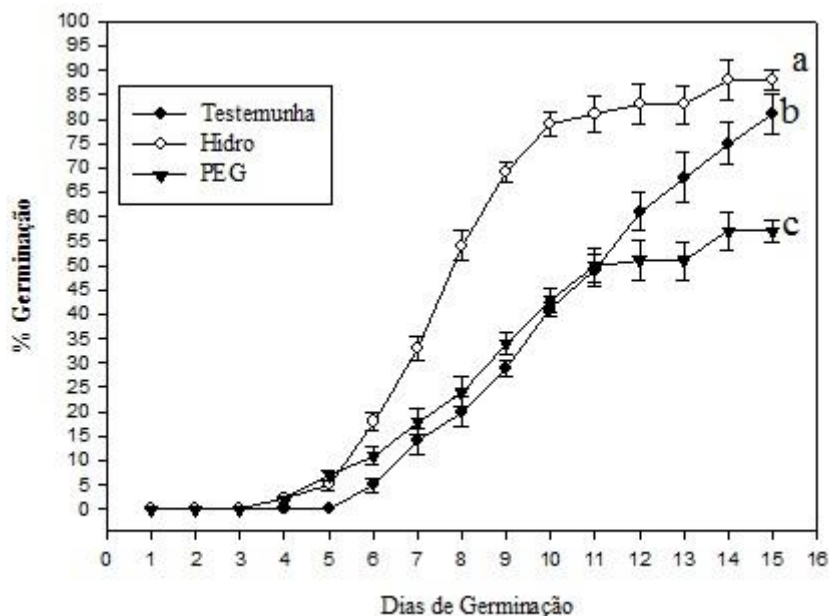
Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em todas as análises. Os dados obtidos de porcentagem de germinação, de IVG e tempo médio de germinação, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância pelo programa Sisvar 4.3 (FURTADO, 2000).

Para a realização da quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o programa REST® que realiza a quantificação comparativa pelo método de “Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test” (PFAFFL et al., 2002).

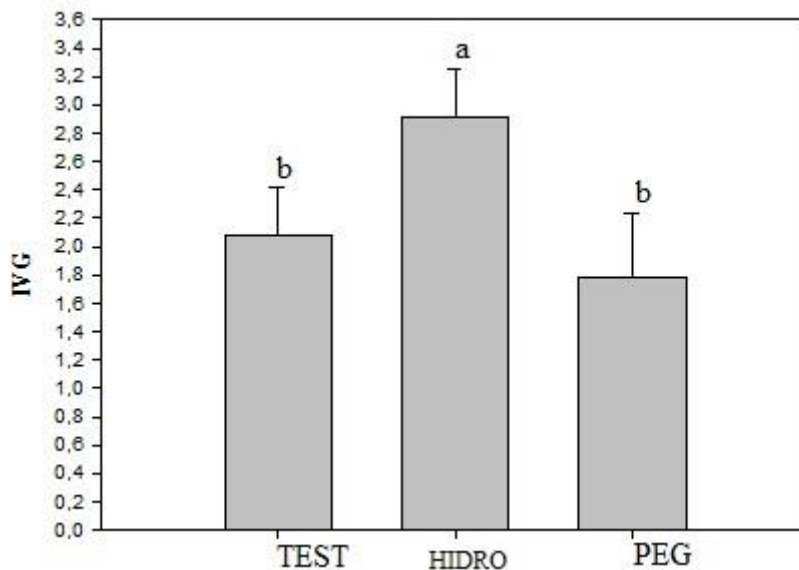
O programa REST realiza a quantificação relativa ao comparar um grupo de amostras com o grupo controle, a comparação sempre é realizada a partir de um gene normalizador (gene expresso na mesma quantidade nas condições experimentais avaliadas). Além disso, o software REST considera a eficiência individual de cada reação, realizando uma normalização subsequente dos dados de quantificação (NACHTIGALL, 2012).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água estabilizou-se em aproximadamente 9%. A porcentagem de germinação foi superior no hidrocondicionamento que não diferiu estatisticamente da testemunha e a menor porcentagem de germinação, foi do tratamento com PEG (Figura 4). O condicionamento com PEG obteve porcentagem de germinação inferior ao controle. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi significativamente superior nas sementes hidrocondicionadas em relação à testemunha e tratamento com PEG (Figura 5). Resultado semelhante foi também obtido por Anese et al. (2011), que ao condicionar sementes de lobeira com água por 15 dias à 15°C observaram, apesar de não significativo, maior porcentagem de germinação. Foi observado também por Anese et al. (2011) em sementes condicionadas com água, IVG de 4,64 enquanto sementes secas apresentaram IVG de 1,54.



**Figura 4.** Porcentagem de germinação de sementes de *Solanum lycocarpum* em sementes secas (testemunha), condicionadas com PEG (-0,2 MPa) e com água, hidrocondicionamento. As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de cinco repetições. \*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 5.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Solanum lycocarpum* em sementes secas (testemunha), condicionadas com PEG (-0,2 MPa) e com água, hidrocondicionamento. As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de cinco repetições biológicas. \*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

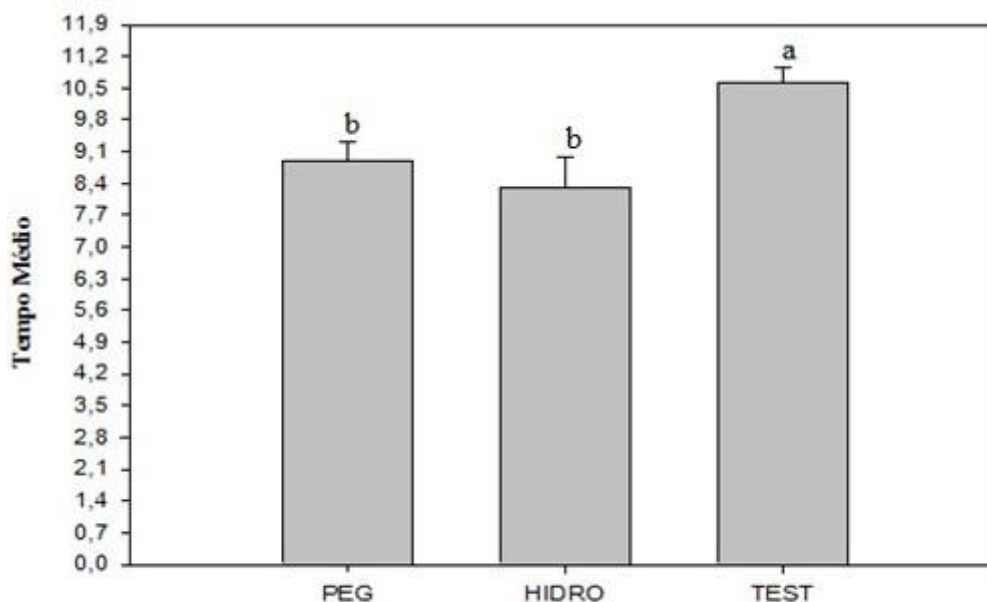
NONOGAKI et al. (1992) mostrou que com 2 dias de embebição, sementes de tomate condicionadas com PEG tinham próximo de 75% de germinação, enquanto as sementes não condicionadas tiveram germinação inferior a 1%.

Em sementes de alface, variedade sensível, quando expostas à temperatura de 35°C entram em termodormência, e se condicionadas com PEG a -1,2 MPa apresentam uma germinação de 100% e tempo para a primeira germinação de 4 horas e quando não há condicionamento, as sementes apresentam uma germinação de 4% e 18 horas para se ter a primeira germinação (NASCIMENTO et al., 2001).

O tempo médio de germinação utilizado é uma média ponderada, onde o número de sementes germinadas é o peso de ponderação do tempo (SANTANA e RANAL, 2000). O tempo médio de germinação para sementes de *Solanum lycocarpum* foi de 8,41 dias para hidrocondicionamento, 9,18 dias para sementes condicionadas com PEG e testemunha obteve tempo médio de germinação superior, significativamente, dos outros, de 10,52 dias (Figura 6).

O tempo para ocorrência de 50% de germinação (T50) em sementes de lobeira condicionadas foi de 5 dias enquanto que no controle foi de 17,3 dias (ANESE et al., 2011).

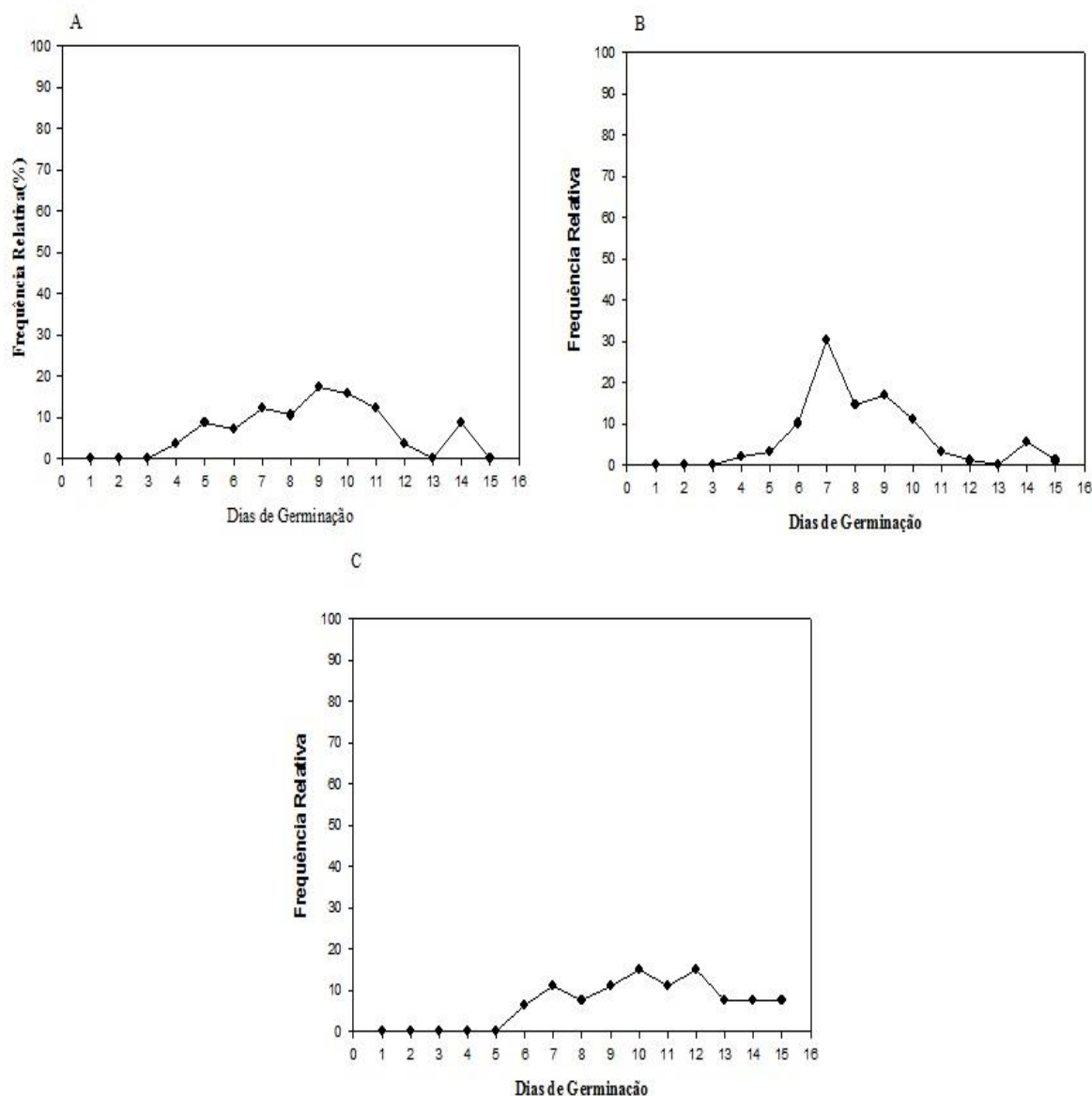
Sementes de pimenta apresentam dormência imposta pela resistência mecânica do endosperma, necessitando então de uma redução desta resistência para que ocorra a germinação (WATKINS e CANTLIFFE, 1983). Segundo Khan et al. (2012) quando se condiciona sementes de pimenta com putrescina (25, 50,75,100 Mm), uma poliamina, o tempo para que as sementes germinem 50% (T50%) é de 3 dias, enquanto que em sementes não condicionadas foi de 7 dias.



**Figura 6.** Tempo médio de germinação de sementes de *Solanum lycocarpum* em sementes secas (testemunha), condicionadas com PEG(-0,2 MPa) e com água, hidrocondicionamento. As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de cinco repetições biológicas. \*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

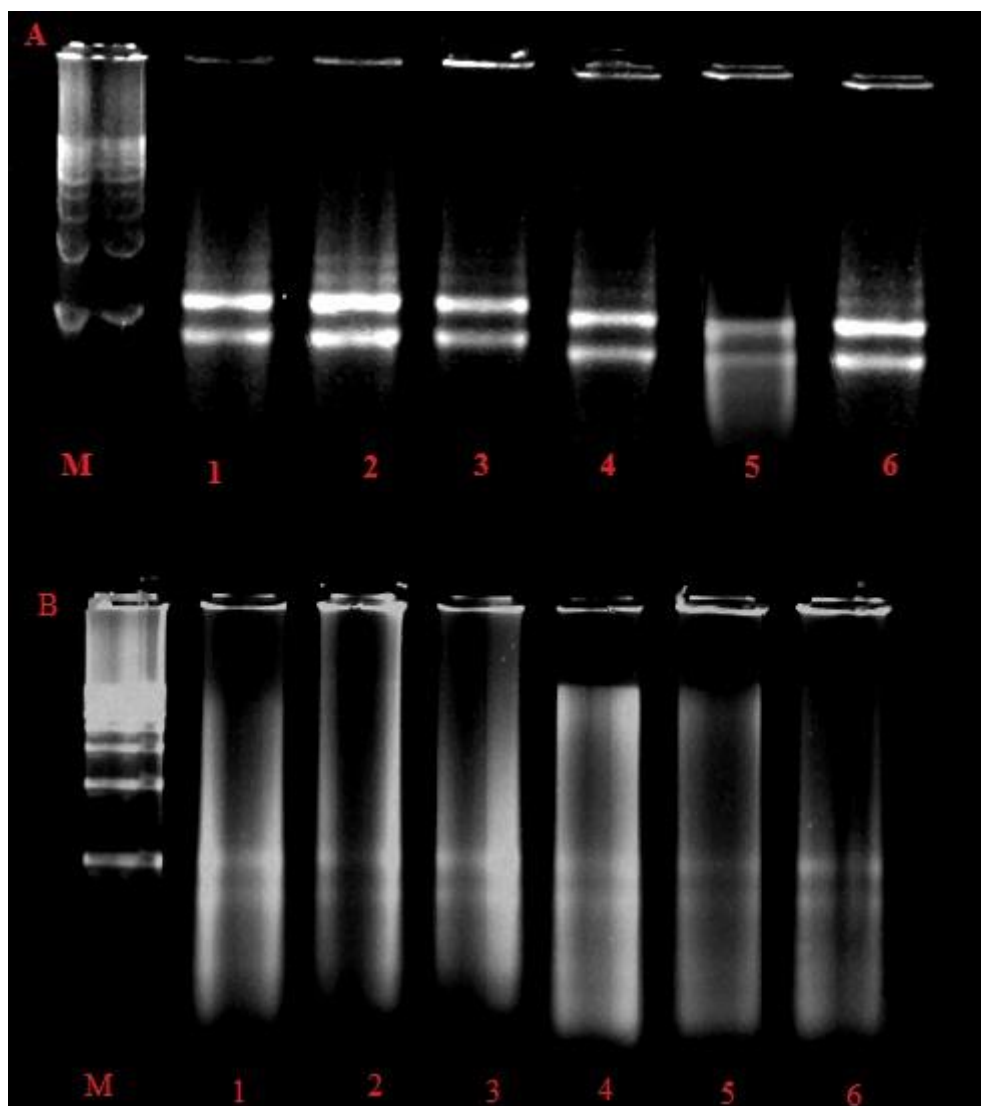
Os polígonos de frequência relativa de germinação para o condicionamento com água, hidrocondicionamento, apresentam um pico de germinação, caracterizando uma germinação mais homogênea, com 40% de germinação aos 7 dias de embebição. O tratamento condicionamento com PEG (-0,2 Mpa) e a testemunha resultou em um gráfico polimodal, caracterizando germinação heterogênea (Figura 7).

As sementes hidrocondicionadas obtiveram um maior índice de velocidade de germinação, menor tempo médio de germinação e uma germinação mais homogênea, mostrando que o condicionamento promove uma germinação mais rápida e uniforme. Isso deixou evidente a superioridade fisiológica de sementes quando são hidrocondicionadas.



**Figura 7.** Frequência relativa de germinação de sementes de *Solanum lycocarpum*. a) condicionadas com PEG (-0,2 MPa), b) com água, hidrocondicionamento, c) sementes secas (testemunha) .

A extração utilizando o " kit "– NucleoSpin RNA Plant<sup>®</sup> da Macherey-Nagel gerou RNAs totais com alta qualidade, íntegros e livres de impureza, como pode ser observado na (Figura 8), a qual apresenta os RNA's totais em gel de agarose 1% por meio da técnica de eletroforese.



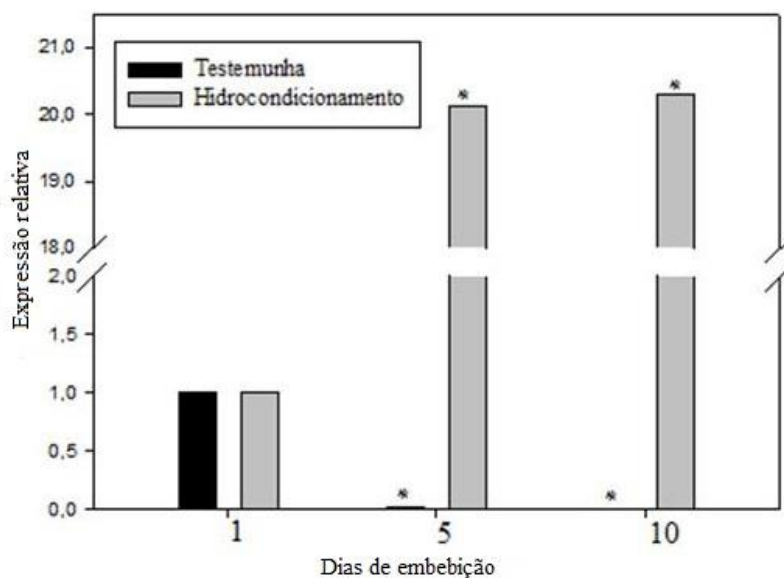
**Figura 8.** A) RNA total de sementes de *Solanum lycocarpum*. M, marcador, 1, 2, 3, embriões de sementes não condicionadas com 1, 5 e 10 dias de embebição, respectivamente e 4, 5, 6, embriões de sementes hidrocondicionadas com 1, 5 e 10 dias de embebição, respectivamente. B) RNA total de M, marcador, 1, 2, 3, região micropilar de sementes não condicionadas com 1, 5 e 10 dias de embebição, respectivamente e 4, 5, 6, região micropilar de sementes hidrocondicionadas com 1, 5 e 10 dias de embebição, respectivamente.

A eficiência da reação utilizada foi de 1 (100%). Idealmente, a eficiência de uma reação de PCR deve ser de 100%, ou seja, há duplicação de RNA após cada ciclo térmico, durante a amplificação exponencial. Porém, a eficiência real pode oferecer informações valiosas sobre a reação experimental, fatores tais como o comprimento, a estrutura secundária e conteúdo de CG dos *primers*. A dinâmica da reação

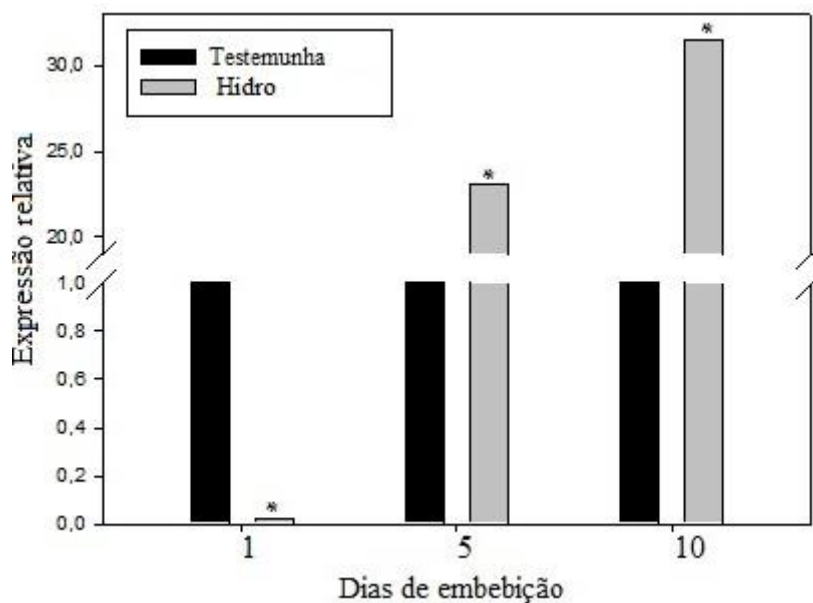
e utilização de reagentes de má qualidade também podem influenciar a eficiência da reação (LIFE TECHNOLOGIES).

A expressão do gene de endo-  $\beta$ -mananase no endosperma micropilar de sementes de lobeira condicionadas, foi quase 20 vezes superior no quinto dia de embebição em comparação ao décimo dia de embebição. Já o controle a expressão foi inferior nos períodos de 5 e 10 dias de embebição ( Figura 9). Estes resultados aliados aos da (Figura 10), onde no primeiro dia de embebição o hidrocondicionamento obteve uma expressão relativa menor em relação à testemunha e só com 5 e 10 dias o hidrocondicionamento foi superior , mostram que só a partir do quinto dia de embebição houve uma expressão considerável em sementes condicionadas.

Em sementes de lobeira, sem tratamento, Pinto et al. (2007) mostraram um resultado que atesta o resultado deste trabalho, onde houve uma redução da força de ruptura micropilar que coincidiu com aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, a partir dos 5 dias de embebição.



**Figura 9.** Expressão relativa do gene da endo-  $\beta$  -mananase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento e não condicionadas, testemunha, em relação ao período de um dia de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).



**Figura 10.** Expressão relativa da endo- $\beta$ -mananase, em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

Diferentes autores também mostraram aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase ao longo do tempo. Em endosperma micropilar de sementes de tomate, Mo e Bewley (2002) observaram que a enzima vai crescendo ao longo do tempo de embebição, tendo um valor mais alto quando as sementes atingiram uma porcentagem de germinação de 50%, próximo do terceiro dia de embebição, já Nonogaki et al. (2000) observaram, em sementes de tomate, aumento da expressão de LeMAN2 as 12, 24, 36 horas de embebição da isoforma de endo- $\beta$ -mananase expresso na área micropilar antes da germinação. Também em tomate, Mo e Bewley (2003) observaram que a atividade da endo- $\beta$ -mananase na área micropilar foi duas vezes maior quando passou de 24 horas de embebição para 48 horas e três vezes a primeira quando passou para 76 horas de embebição. Em sementes de café, Farias (2012) também observou um aumento de expressão de endo- $\beta$ -mananase ao longo dos dias de embebição na região micropilar. Já em sementes de *Sesbania virgata* a atividade de endo- $\beta$ -mananase teve um pico em 24 horas de embebição, na região micropilar e após iniciar a germinação, aos 3 dias, houve um pico da enzima no endosperma lateral, levando a conclusão que na região micropilar a enzima teria um papel de afrouxamento desta área, facilitando a protrusão radicular e na região lateral, a endo- $\beta$ -mananase teria função de mobilização de reservas (LISBOA et al., 2006). Suda et al. (2003), também verificaram a presença de alta atividade de endo- $\beta$ -

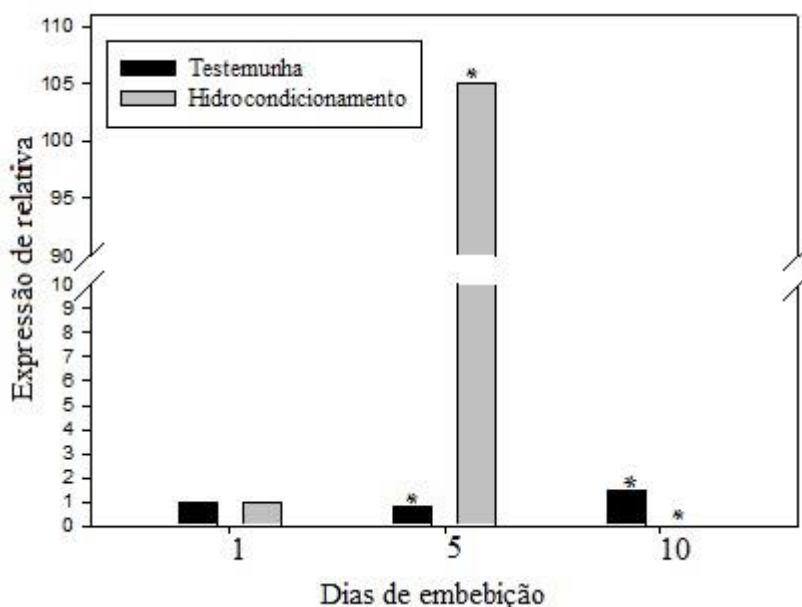
mananase no endosperma de sementes de *Euphorbia heterophylla* com dois dias de embebição, dia anterior ao tempo médio de germinação, mostrando a função da enzima durante a germinação das sementes.

Anese et al. (2011) observaram que a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase durante o hidrocondicionamento, aumentou cerca de 30 vezes e que a força de ruptura do endosperma micropilar das sementes de lobeira, ao contrário, diminuiu ao longo dos dias de hidrocondicionamento, mostrando que a atividade da enzima tem relação com o enfraquecimento da região micropilar.

Existem diversos trabalhos avaliando sistemas de regulação da germinação, como o de Marraccini et al. (2001) que ao tratar sementes de café com luz, estimula produção de GA (regulador), obteve uma atividade inicial de endo- $\beta$ -mananase baixa e esta foi aumentando até depois da germinação, simultaneamente, a radícula expandiu a medida que foi aumentando os dias de embebição. Já, Groot et al. (1988) ao utilizar endosperma de sementes de tomate mutantes, deficientes em GA, observaram que a atividade de endo- $\beta$ -mananase, aumentou quando incubadas com GA a partir de 6 horas chegando em 24 horas com uma atividade 75 vezes superior a das sementes incubadas com água que não mostraram atividade em nenhum período. Contrapondo estes trabalhos, Toorop et al. (1996) ao avaliarem o resultado da aplicação de GA na expressão de endo- $\beta$ -mananase no endosperma micropilar de sementes de tomate antes da protrusão da radícula, viram que o gene não é induzido pelo hormônio. E Hilhorst e Downie (1995) verificaram maior atividade de endo- $\beta$ -mananase em sementes mutantes de tomate, deficientes em ABA, que em sementes selvagens, em baixo potencial hídrico, porém essas sementes não apresentaram maior porcentagem e velocidade de germinação, contrariando a suposição de Ni e Bradford (1993) na qual a endo- $\beta$ -mananase seria a causa da maior qualidade fisiológica das sementes mutantes.

Em sementes de lobeira condicionadas a expressão relativa de  $\beta$ -manosidase na região micropilar, aos cinco dias de embebição, foi mais de 100 vezes superior que ao período de um dia de embebição (Figura 11) e neste mesmo período houve expressão superior deste gene quando sementes foram condicionadas em relação as não condicionadas (Figura 12). O mesmo foi observado por Mo e Bewley (2002) onde a atividade da enzima  $\beta$ -manosidase no endosperma micropilar de sementes de tomate foi aumentando ao longo do tempo, chegando a 250 vezes superior ao primeiro período,

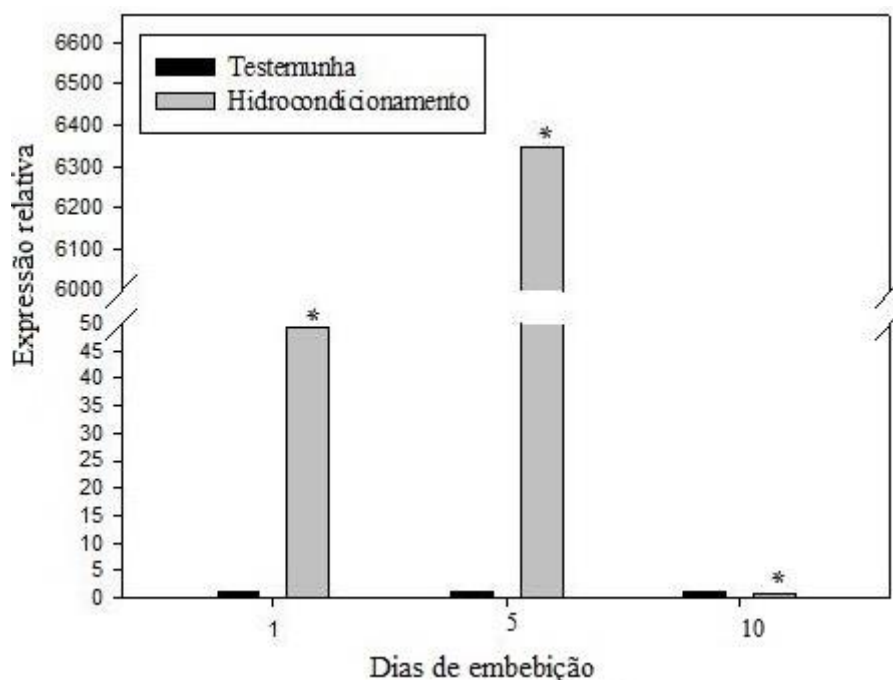
quando a porcentagem de germinação estava de 50 %. Na análise de *Northern blot* foi mostrado que nos períodos próximos ao período de 50 % de germinação de sementes de tomate, referente aos dez dias na lobeira, houve maior expressão da  $\beta$ - manosidase (MO e BEWLEY, 2002).



**Figura 11.** Expressão relativa do gene da  $\beta$ -manosidase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento e não condicionadas, testemunha, em relação ao período de um dia de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*)

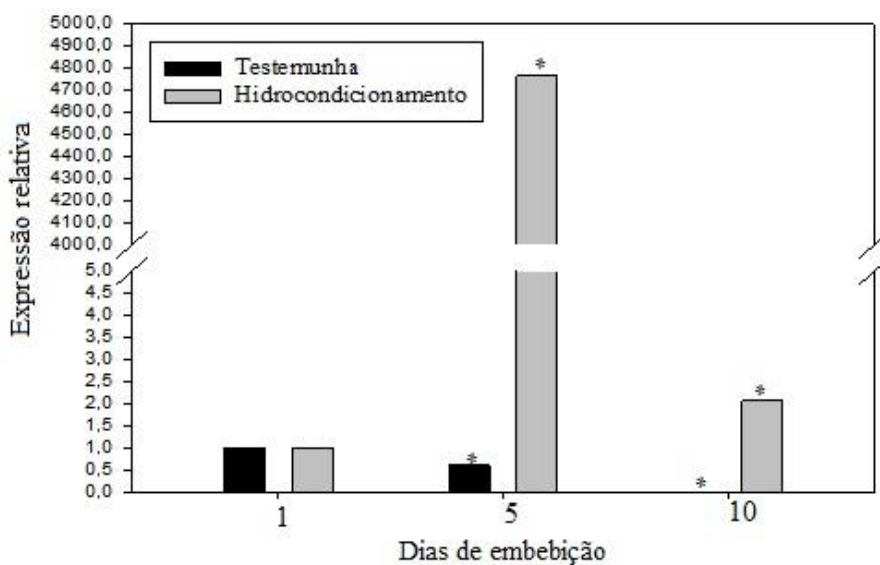
Segundo Farias (2012) em sementes de café, sem nenhum tratamento, o período onde se teve maior expressão relativa da enzima  $\beta$ - manosidase foi aos 9 dias, onde aproximadamente se teve 50% das sementes germinadas.

A atividade de  $\beta$ -manosidase em endosperma de sementes mutantes, deficientes em GA, de tomate incubadas com GA foi aumentando ao longo de 24 horas, tendo uma atividade final de cerca de 4 vezes mais forte daquelas incubadas com água (GROOT et al.,1988).

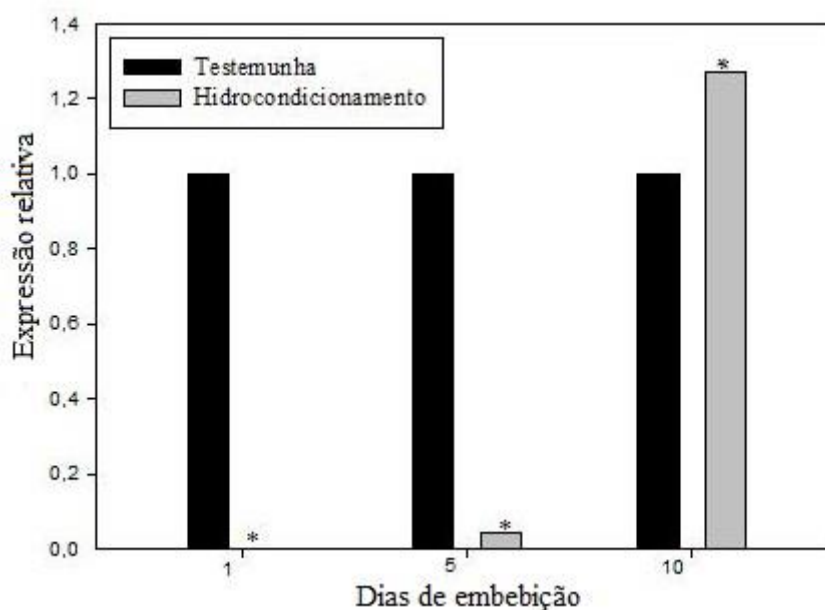


**Figura 12.** Expressão relativa da endo- $\beta$ - manosidase, em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

No endosperma micropilar de sementes de *Solanum lycocarpum* a expressão da  $\alpha$ -galactosidase em cinco dias de embebição foi 4760 vezes maior em relação a um dia de embebição (Figura 13), mas, neste mesmo período, quando se comparou o hidrocondicionamento com a testemunha, a expressão deste foi maior (Figura 14). Feurtado et al. (2001) mostraram ao avaliar a expressão por *Northern Blot* de  $\alpha$ -galactosidase, no endosperma micropilar de sementes de tomate, antes de germinarem, que a expressão desta se torna forte a partir de 36 horas (quando começa a germinação das sementes), similar aos resultados deste trabalho, porém, em lobeira, ao obter germinação próxima a 50% se tem uma queda de expressão. Shen et al. (2008) também apoiam este resultado quando foi observado que sementes de tomate ainda dormentes têm uma atividade de  $\alpha$ -galactosidase de 1,73 vezes menor que quando estão germinando. A  $\alpha$ -galactosidase tem uma atividade contrária a endo- $\beta$ -mananase, estando presente em todas as regiões das sementes antes da germinação, tendo maior concentração no endosperma lateral (TOOROP et al., 1996; VOIGT e BEWLEY, 1996).



**Figura 13.** Expressão relativa do gene da  $\alpha$ -galactosidase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).



**Figura 14.** Expressão relativa do gene da  $\alpha$ -galactosidase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

Groot et al. (1988) observaram que a atividade de  $\alpha$ -galactosidase em endosperma de sementes de tomate mutantes, deficientes em GA, manteve alta no início da embebição, mantendo-se quando embebidas com água ao longo de 24 horas e

aumentando cerca de 20% quando embebidas com GA. Farias (2012) ao estudar a expressão de  $\alpha$ -galactosidase e a regulação por ABA, em endosperma micropilar de sementes de café, pôde observar que esta aumenta durante os dias de embebição, durante a germinação, e que quando foi aplicado ABA nas sementes, a expressão relativa dessa enzima diminuiu. Esta diminuição é referente a inibição do afrouxamento da região micropilar endospermática, seguido da ausência de germinação.

A deficiência de  $\alpha$ -galactosidase restringe a germinação, esta enzima catalisa as galactoses terminais, incluindo oligossacarídeos lineares ramificados, polissacarídeos e vários substratos sintéticos (SIMERSKÁ et al., 2006).

A atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi detectada durante o desenvolvimento de sementes de tomate sendo pequena no início do desenvolvimento e superior nos estágios finais da maturação (BASSEL et al., 2001; FEURTADO et al., 2001). Diversos estudos mostram a função da enzima  $\alpha$ -galactosidase na mobilização de reservas em sementes (FIALHO et al., 2008; LIMA et al., 2004; LIMA et al., 2005).

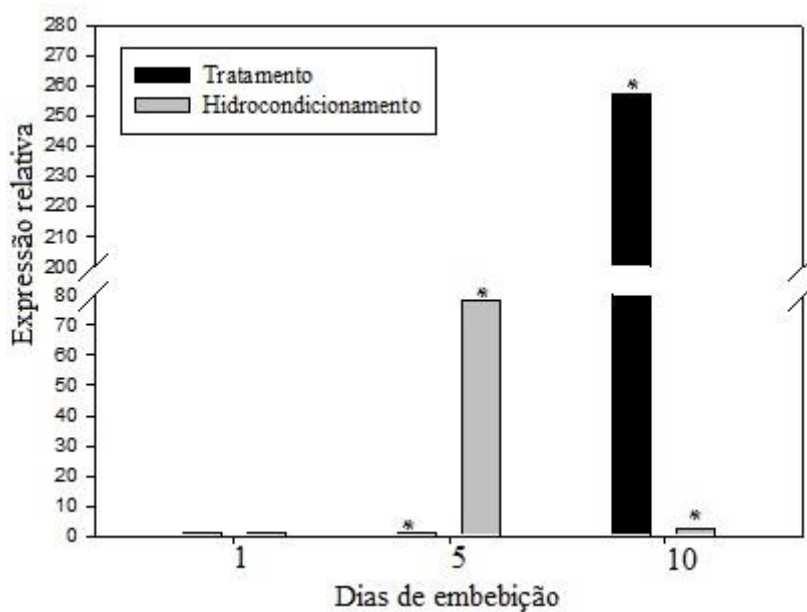
Nonogaki et al. (1992) observaram em sementes de tomate condicionadas com PEG 6000 (-0,8Mpa), quando foi iniciada a embebição destas, que já se tinha atividade das enzimas que hidrolisam galactomananos, em sementes condicionadas, o que não foi visto em sementes não condicionadas. Este aumento de atividade resultou em uma germinação inicial de sementes de tomate mais rápida, enquanto sementes condicionadas ultrapassaram 25% de germinação com um dia de embebição, sementes não condicionadas obtiveram 0%, o que não foi visto em lobeira.

A  $\alpha$ -galactosidase, a endo-  $\beta$  -mananase e a  $\beta$ -manosidase fazem a mobilização de galactomananos do endosperma micropilar em sementes de tomate, sendo que a primeira hidrolisa mananas que contém cadeias laterais de galactose, a segunda cliva as mannanas e as transforma em oligomananos e a terceira hidrolisa os oligomananos (MO e BEWLEY, 2003 e 2002, OUELLETTE e BEWLEY, 1986). A endo-  $\beta$ - mananase em conjunto com outras enzimas hidrolisam os polissacarídeos da parede celular em sementes de tomate, afrouxando esta, permitindo a expansão do embrião e posterior germinação (BEWLEY, 1997).

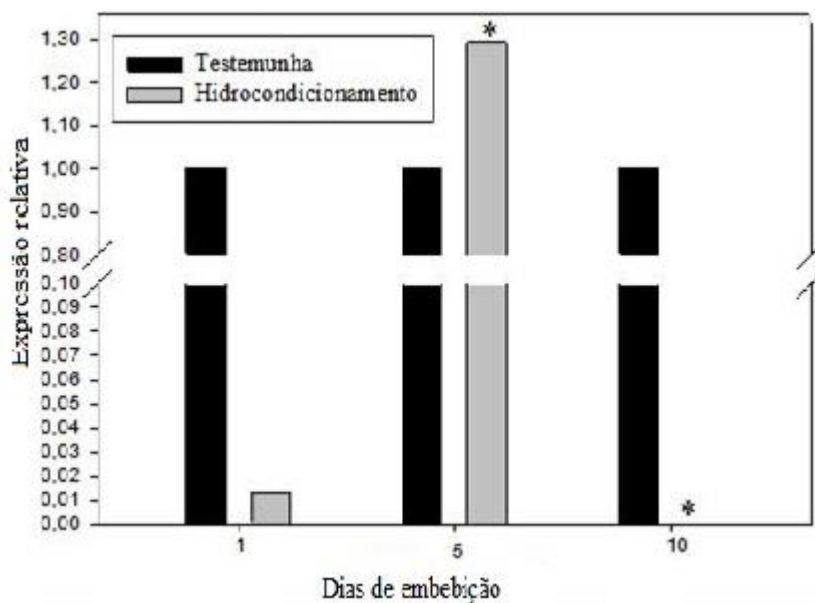
O gene da poligalacturonase em endosperma micropilar de sementes de lobeira hidrocondicionadas apontaram uma expressão de cerca de 70 vezes maior no período de 5 dias em relação ao período de um dia de embebição (Figura 15) e

quando comparado ao controle, neste mesmo período, o hidrocondicionamento também apresentou uma maior expressão (Figura 16). Sitrit et al. (1999) observaram o mesmo em sementes de tomate não germinadas, onde a expressão de poligalacturonase no endosperma micropilar foi alta nos períodos de 24 e 48 horas, início da germinação.

As exo- e endo - poligalacturonase têm a capacidade de reduzir o tamanho molecular de polímeros pécticos por clivar os resíduos da cadeia lateral (DE VEAU et al., 1993). A expressão de LeXPG1 no endosperma micropilar é correlacionada com o enfraquecimento bem caracterizados desta região necessário para ocorrer a penetração da radícula e posterior germinação (SITRIT et al., 1999). González-Carranza et al. (2007) observaram que o gene At2g43860, uma poligalacturonase é expresso na área micropilar, inferindo, então, que deve haver um mecanismo de sinalização entre os tecidos da radícula com os tecidos da área micropilar.



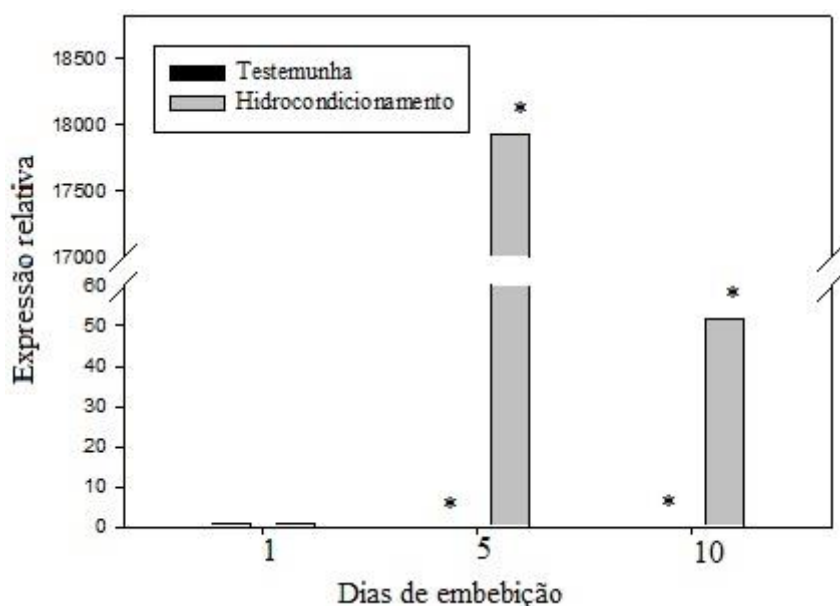
**Figura 15.** Expressão relativa do gene da poligalacturonase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).



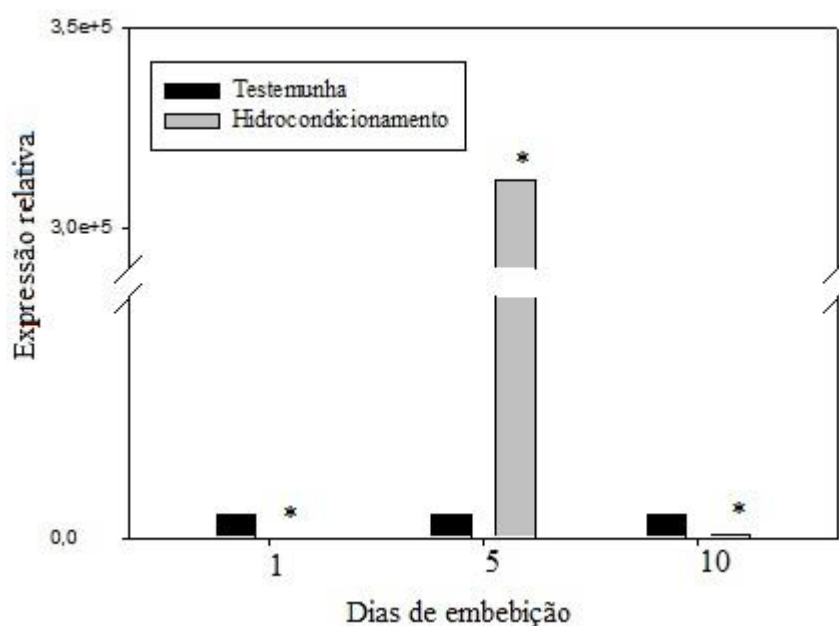
**Figura 16.** Expressão relativa do gene da poligalacturonase em endosperma (região micropilar) de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

A expressão relativa dos genes da  $\alpha$ -galactosidase, endo  $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase e poligalacturonase em endospermas micropilares de semente condicionadas, hidrocondicionamento, de *Solanum lycocarpum* mostraram um pico ao quinto dia de embebição, em relação ao primeiro dia. Aparentemente, a expressão superior dos três genes no quinto dia de embebição pode estar associada com o início da germinação de sementes de lobeira.

No embrião de sementes condicionadas o gene da enzima poligalacturonase também apresentou pico de expressão, cerca de 30000 vezes maior ao quinto dia de embebição em comparação ao primeiro (Figura 17), e neste mesmo período apresentou expressão superior à testemunha (Figura 18). Sitrit et al. (1999) enfatizou que a enzima poligalacturonase pode participar do crescimento do embrião com algum mecanismo envolvendo a radícula e que se sabe pouco da bioquímica desta enzima.



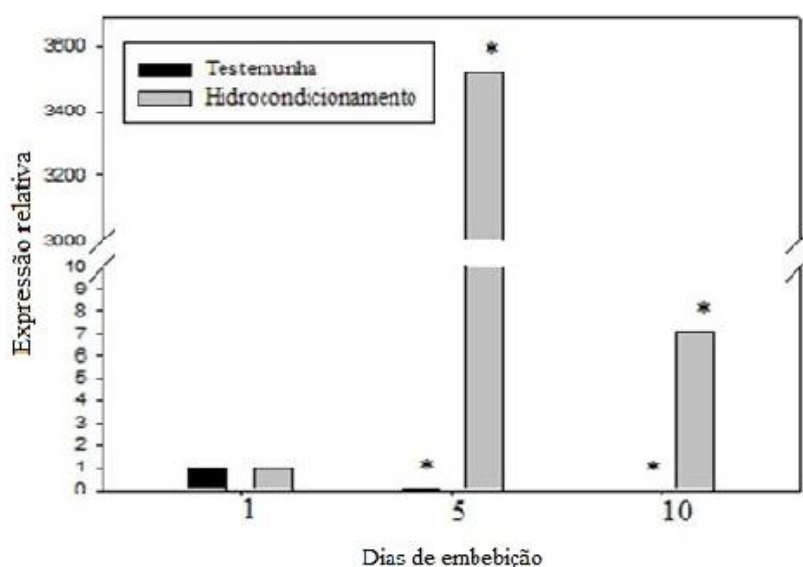
**Figura 17.** Expressão relativa do gene da poligalacturonase em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento e testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).



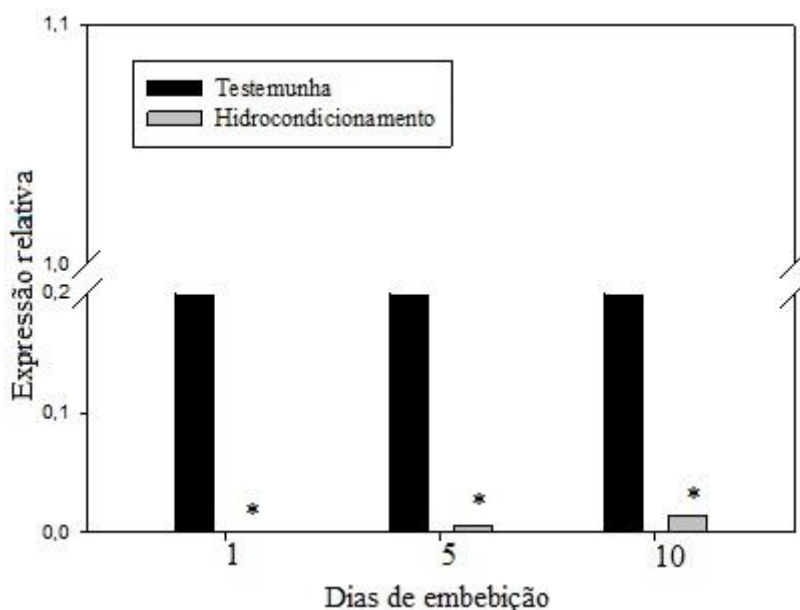
**Figura 18.** Expressão relativa do gene da poligalacturonase em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

As expansinas, tanto a EXP8 como a EXP10, apresentaram em sementes condicionadas de lobeira, em todos os períodos, expressão menor que a

testemunha, porém as duas apresentaram um pico de expressão aos cinco dias de embebição em sementes que foram hidrocondicionadas (Figuras: 19, 20, 21, 22). Em sementes de tomate, durante o desenvolvimento a expressão do gene LeEXP8 não pôde ser detectada, já em LeEXP10 houve expressão no início, desaparecendo no final do desenvolvimento. A expressão de LeEXP8 durante a embebição de sementes foi detectada em 12 horas e se manteve constante até 48 horas, onde 11% das sementes tinham germinado, o mesmo ocorreu com LeEXP10, porém a expressão se iniciou em 6 horas de embebição (CHEN et al, 2001). Farias (2012) verificou em embriões de sementes de café que o gene da expansina apresentou um aumento de expressão aos 9 dias, onde havia 50 % de germinação.



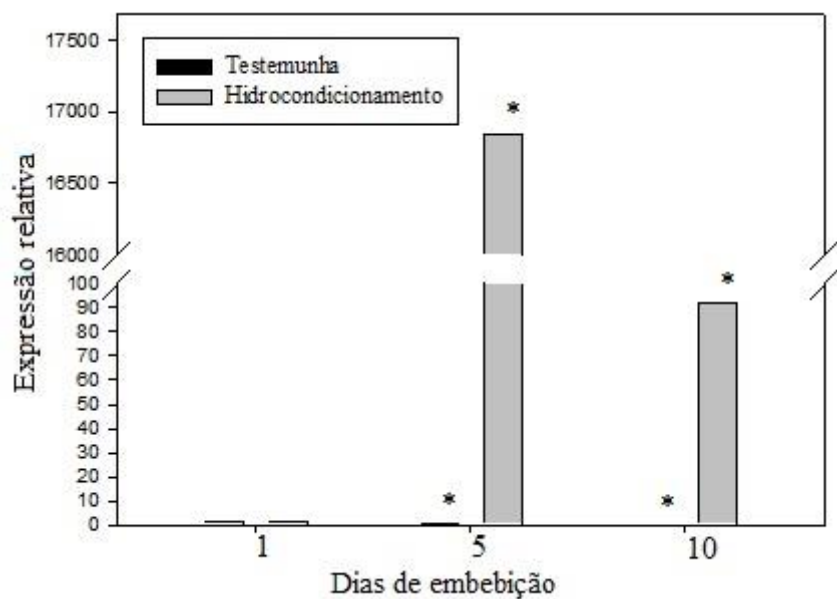
**Figura 19.** Expressão relativa do gene da EXP8 em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).



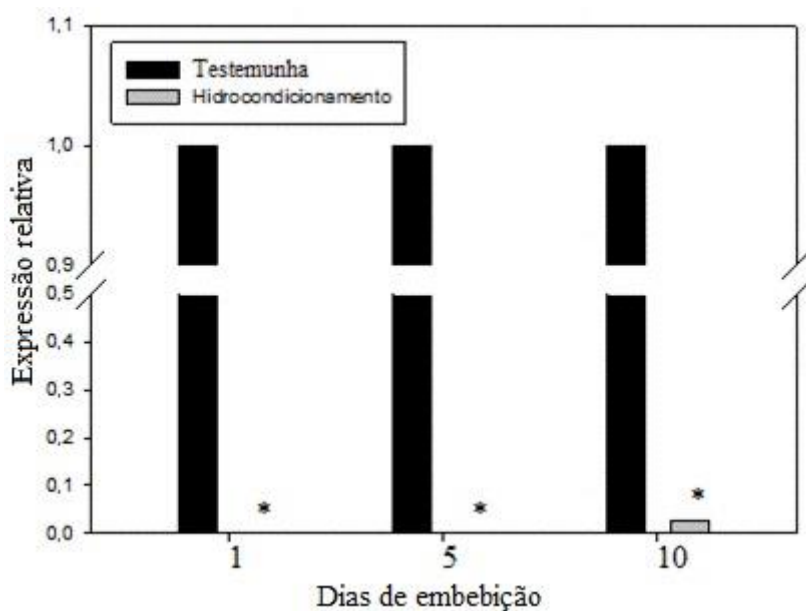
**Figura 20.** Expressão relativa do gene EXP8 em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

Chen e Bradford (2000) observaram que há expressão de LeEXP8 apenas na ponta da radícula de sementes de tomate e que LeEXP10 é expresso tanto na ponta da radícula como no resto da semente. Impressões de tecido mostraram que LeEXP8 está expresso apenas na radícula enquanto que LeEXP10 no restante do embrião (Chen et al., 2001).

McQueen-Mason e Cosgrove (1995) sugeriram que o papel das expansinas na parede celular não seria de hidrólise e sim que ela se colocaria entre as microfibrilas de celulose e os polissacarídeos, levando à expansão por catalisar o rompimento das pontes de hidrogênio entre os dois, facilitando assim, o deslizamento entre as microfibrilas de celulose e os outros componentes da parede celular. Isto foi observado por Lizana et al. (2010) que verificou que a expressão da expansina TaExpA6 se inicia justamente onde ocorre os períodos de maior crescimento precoce do grão e some ao chegar na maturidade e por Cho e Kende (1997) que verificaram que estas estão envolvidas no crescimento do coleóptilo, raiz e folha. Já na germinação de sementes de tomate foi verificado que a região do embrião onde ocorre o maior crescimento é a região onde o gene LeEXP8 (expansina) atua, na ponta da radícula (CHEN et al, 2001).

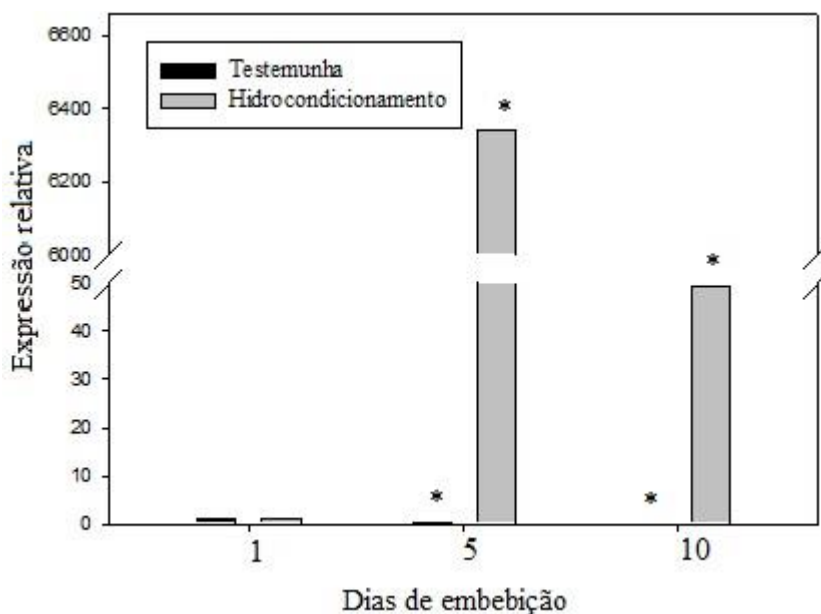


**Figura 21.** Expressão relativa do gene da EXP10 em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

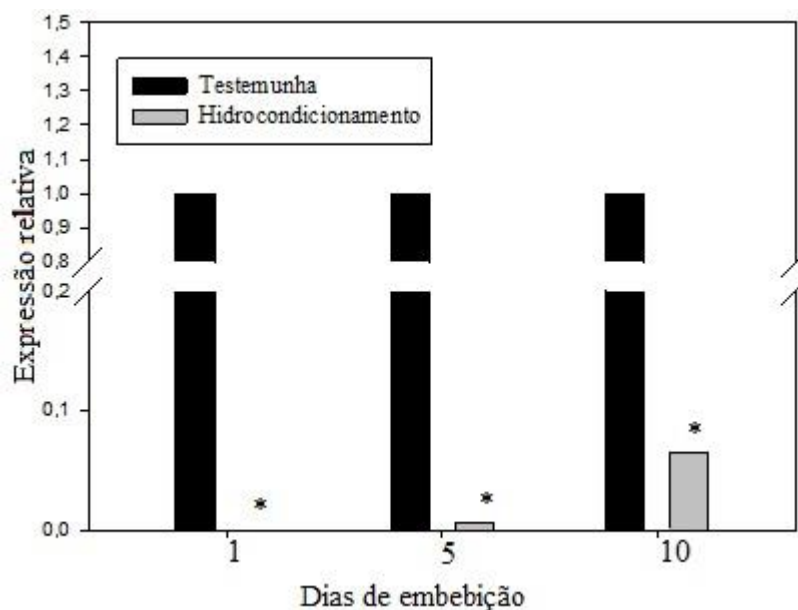


**Figura 22.** Expressão relativa do gene EXP10 em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

Na regulação de expansinas, Chen et al. (2001) observaram em sementes mutantes de tomate, deficientes em GA que não há expressão de LeEXP8 e LeEXP10 quando as sementes são embebidas com água, mais que há quando são embebidas com GA. Esta associação com GA também pode ser observado em sementes de *Datura ferox*, espécie que também apresenta expressão de expansina no embrião e na área micropilar, que ao serem expostas tanto a luz vermelho quanto ao GA aumentam os níveis de expressão de expansina (MELLA et al.,2007). Utilizando ABA, em sementes de tomate, Chen et al. (2001) verificaram uma redução da expressão em um período em que as sementes teriam atingindo sua germinação total em condições de controle, já em *Datura ferox*, Mella et al.(2007) não verificou nenhuma regulação do gene da expansina pelo ABA.



**Figura 23.** Expressão relativa do gene da  $\alpha$ -galactosidase em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento e não condicionadas, testemunha, em relação ao período um de embebição. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).



**Figura 24.** Expressão relativa do gene da  $\alpha$ -galactosidase em embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* condicionadas em água, hidrocondicionamento, em relação a testemunha, sem condicionamento. Valores significativos estão indicados com um asterisco (\*).

Apesar da expressão do gene da  $\alpha$ -galactosidase no embrião ter sido maior em sementes não condicionada que em sementes condicionada em todos os períodos (Figura 24), a expressão deste gene apresentou um pico aos 5 e aos 10 dias de embebição, com valores de cerca de 6000 e 50 vezes maior que a o período controle (Figura 23). Já em tomate, foi visto que a expressão deste gene não altera antes da protrusão da radícula e ao fazer *Northern blot* foi visto que a expressão desta enzima no embrião se inicia em 24 horas e se mantém constante até 72 horas (FEURTADO et al., 2001). Leung et al. (1979) observaram que em sementes de alface reguladas pela luz a atividade de  $\alpha$ -galactosidase é alta até 20 horas de embebição e Hilhorst e Downie (1995) concluíram que em sementes de tomate mutantes, deficientes em ABA, a atividade de  $\alpha$ -galactosidase após 44 horas de embebição foi maior que em sementes selvagens.

Os autores se contradizem em relação à função da enzima  $\alpha$ -galactosidase. Sua presença foi observada no desenvolvimento das sementes de tomate, em toda a semente durante e após a germinação, em presença ou ausência de estresse hídrico, sendo considerada por esses autores uma enzima constitutiva e não específica para a pré e pós-germinação. Isto também pode representar que o gene  $\alpha$ -galactosidase está sendo expresso para repor as enzimas que estão sendo degradadas (FEURTADO et al., 2001).

O mesmo foi visto por Ataíde et al. (2013) que encontrou atividade de  $\alpha$ -galactosidase antes da embebição e após a embebição, de uma forma constante, independente do lote, maior ou menor germinação e vigor e independente da temperatura. Já Bewley e Black (1978) inferiram que a  $\alpha$ -galactosidase, antes e após a germinação no embrião está envolvida na mobilização de oligossacarídeos de rafinose. Feurtado et al., (2001) disse que a  $\alpha$ -galactosidase está presente em vários tecidos e por isso esta enzima pode não ser específica para mobilização de rafinose e galactomananos, mas ela tem um maior papel na hidrólise de cadeias laterais de galactose em vários tecidos. Em lobeira foi visto um pico de  $\alpha$ -galactosidase para sementes condicionadas tanto no embrião como na área micropilar, mostrando que para esta espécie a expressão do gene desta enzima não foi constante, logo não se pode considerar esta, uma enzima constitutiva.

A poligalacturonase é uma enzima que catalisa cadeias laterais de pectina e no embrião de sementes de tomate, Sitrit et al. (1999) confirmam a participação no crescimento do embrião por algum mecanismo que envolve a radícula, logo a  $\alpha$ -galactosidase poderia estar envolvida neste mesmo mecanismo já que ela também catalisa cadeias laterais, só que de galactose.

Os genes expressos no embrião, que possivelmente estão envolvidos no crescimento deste, apresentaram na maioria das vezes, em sementes hidrocondicionadas de lobeira, uma menor expressão em relação à testemunha, porém também apresentaram um pico de expressão aos 5 dias de embebição, período este que representa o início da germinação. Fato que pode estar correlacionado com maior crescimento do embrião neste período, levando a uma maior velocidade de germinação, menor tempo médio de germinação e a uma maior sincronização, vistos em sementes hidrocondicionadas.

As enzimas endo- $\beta$ -mananase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ - manosidase juntas hidrolisam os galactomananos da área micropilar das sementes enquanto a polygalacturonase catalisa cadeias laterais de pectina. A poligalacturonase pode estar envolvida no crescimento do embrião por algum mecanismo envolvendo a radícula, que também pode ser caso da  $\alpha$ -galactosidase quando presente nessa região. As expansinas atuam diretamente no crescimento do embrião. Todas essas enzimas estão envolvidas na superação da dormência imposta pela resistência provocada pelo endosperma micropilar. Na literatura existem muitos trabalhos fazendo esta relação em sementes de tomate. A lobeira sendo uma espécie nativa pode ser muito útil em estudos deste tipo em espécies comerciais, como o tomate.

## 7. CONCLUSÃO

Sementes de lobeira quando hidrocondicionadas apresentaram a maior velocidade, o menor tempo médio e a maior sincronização de germinação.

Quando as sementes são hidrocondicionadas, os genes endo- $\beta$ -mananase (*LeMAN2*),  $\alpha$ -galactosidase (*LeaGal*),  $\beta$ -Manosidase (*LOC543698*), expansinas (*EXP8* e *EXP10*) e polygalacturonase (*XOPG1*) mostram picos de expressão, na região micropilar e no embrião das sementes, no quinto dia de embebição.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Empraba-CPAC, 1998. 464p.

ALVES, E. U. et al. Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert sob diferentes substratos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 439-447, 2011.

ANESE, S. et al. Seed priming improves endosperm weakening, germination, and subsequent seedling development of *Solanum lycocarpum* St. Hil. **Seed Science Technology**, v. 39, p.125-139, 2011.

ATAÍDE, G. M. et al. Activities of  $\alpha$ -galactosidase and polygalacturonase during hydration of *Dalbergia nigra*((Vell.)FR ALL.ex Benth.) seed at different temperatures. **Journal of seed Science**, v.35, 2013.

BASSEL, G.W. et al.  $\alpha$ - galactosidase is synthesized in tomato seeds during development and is localized in the protein storage vacuoles. **Canadian Journal of Botany**, v.79, p.1235-1245, 2001.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. **Springer- Verlag**, v.2, p.320-323, 1982.

BEWLEY, J. D. Breaking down the walls a role for endo-  $\beta$ -mannanase in release from seed dormancy. **Trend in plant science reviews**, v.2, n.2, 1997.

BEWLEY, J. D. et al.  $\alpha$ -galactosidase is synthesized in tomato seeds during development and is localized in the protein storages vacuoles. *Can. J. Bot.*, v.79, p.1417-1424, 2001.

BRADFORD, K.B, STILL, D.W. Endo-  $\beta$  -Mannanase Activity from Individual Tomato Endosperm Caps and Radicle Tips in Relation to Germination Rates. **Plant Physiology**, v.113, p.21-29, 1997.

BRAY, C. M. Biochemical processes during the osmopriming of seeds. I n: Kiegel, J.; Galili, G.(ed.). **Seed development and germination**. New York, Marcel Dekker Inc. p. 767-789, 1995.

BRETT, C. T.; WALDRON, K. W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell walls**. 2 ed. Chapman e Hall, 255p, 1996.

BUCKERIDGE, M.S. et al. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. n.esp, p. 137-162, 2000a.

BUCKERIDGE, M. S., et al. Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology in Biomestry**, v.38, p-141-156, 2000b.

BUCKERIDEGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v.154, p.1057-1023, 2010.

BUSTIN, S.A. Quantification of m RNA using real-time reverse transcripton PCR (RT-PCR) trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.29, p.23-29, 2002.

CHEN, F.; BRADFORD, K. S. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. **Plant Physiology**, v.124, p.1265-1274, 2000.

CHEN, F. et al. Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. **Plant Physiolog** , v. 127, p. 928–936, 2001.

CHO, H.T. ; KENDE, H. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. **Plant Cell** ,v. 9, p.1661–1671, 1997.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p-325-328, 1984.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v.407, p.321-326, 2000.

DAL'AGNOL, R.; VON POSER, G.L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of a *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n-1-2, p.337, 2000.

DA SILVA, E. A. A.; TOOROP, P.E. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee( *Coffea Arabica* cv.Rubi) seed germination. **Planta**, v.220, p.251-261, 2004.

DEA, I.C.M., et al. Effect of galactose substitution-pattern on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**,v. 147, p.275-294, 1986.

DEDECCA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arábica*. L.var. **Typica Cramer**, v.16, p.315-355, 1957.

DESROCHE, N. et al. Determination of an internal control to apply reverse transcriptional quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. **Journal of Microbiological Methods**, v.60, p.325-333, 2005

DE VEAU, I. E. J. et al. Degradation and solubilization of pectin by  $\beta$ - galactosidases purified from avocado mesocarp. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.279-285, 1993.

FARIAS, E. T. **Expressão gênica no embrião e no endosperma micropilar de sementes de café (*Coffea arábica* L.) durante a germinação**.2012.57f. Dissertação(Mestrado em Agronomia(Agricultura)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu,2012.

FARAH, S. B. **Isolamento de um gene específico**. In: FARAH, S. B. DNA: Segredos e Mistérios. 2. Ed. São Paulo: Sarvier, P.81-98,2007.

FEURTADO, J. D. et al. The cloning and characterization of  $\alpha$  -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill) seed. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.359, p.1239-1249, 2001.

FIALHO, L. S. et al. Characterization and biotechnological application of an acid- $\alpha$ -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds, **Phytochemistry**, v.69, p.2579-2585, 2008.

FURTADO, D. **Sistema de análise de variância: sisvar 4.1**. Lavras: UFLA/CAPES, 2000.

NACHTIGALL, P. G. **MicroRNAs músculo-específicos na tilapia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2012. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Genética)) - Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2012.

NI, R.B; BRADFORD, K.J. Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. **Plant Physiology**, v.101, p. 607-617, 1993.

GIBEAUT, D.M; CARPITA, N. C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **FASEB**, p. 904-915, 1994.

GONZÁLEZ-CARRANZA, Z. H. et al. Expression of polygalacturonase and evidence to support their role during cell separation process in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.3719-3730, 2007.

GROOT, S. P.C. Gibberellin induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. **Planta**, v.174, p. 500-504, 1988.

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

HAIGHT, A. M, Barlow, E. W. R. Water Journal of Plant Physiology relations of tomato seed germination. **Australian**, v.14, p. 485-92, 1987.

HAHN, M. G., et al. Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In: KOSUGE, T; NESTER, E. W. **Plant Microbe Interaction**. Mac Graw-Hill, p.131-181, 1989.

HILHORST, H. W.M. A critical update on seed dormancy. Primary dormência. **Seed Science Research**, v.5, n.1, p.61-73, 1995.

HILHORST, H. W. M. et al. The tomato seed as a model to study seed development and germination. **Acta Bot Neerl**, v. 47, p.169-183, 1998

HILHORST, H. W. M.; DOWNIE, B. Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker): studies with the sitiens mutant. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 89-97, 1995.

JACOBSEN, J. V; PRESSMAN, E. A structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L.) seed with emphases on endosperm breakdown. **Planta**, v.144, p.241-248, 1979.

JÚNIOR, O. E. et al. Análise nutricional da fruta de lobo (*Solanum lycocarpum* St.Hill) durante o amadurecimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.4, p.848- 851, 2003.

KHAN, A. A. et al. Osmotic conditioning of seeds: physiological and biochemical changes. **Acta Horticulturae**, v.83, 1978.

KHAN, H. A. et al. Exogenous application of polyamines improves germination and early seedling growth of hot pepper. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.72, 2012.

KRAUS J. E. et al. **A Célula Vegetal**. In: GLÓRIA, B. A; GUERREIRO, S. M. C. Anatomia Vegetal. Viçosa-MG: Editora UFV.,p. 32-36,2006.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da OEA, 1983

LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of seeds germination in *Salvia hispanica* L. I. temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo, v.59, n.1, p.37-56, 1987.

LEE, K. J. D. et al. Distinct cell wall architectures in seed endosperm in representatives of the brassicaceae and solanaceae. **Plant Physiology**, v.160, p.1551-1566, 2012.

LEHNINGER, A. L. **Açúcares, polissacarídeos de reserva e paredes celulares**. In: **Bioquímica: Componentes Moleculares das Células**. São Paulo-SP: Editora Edgard Blucher LTDA, p. 169-189, 1976.

LEUNG, D.W.M. et al. Degradation of the endosperm cell walls of *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids in relation to the mobilization of proteins and the production of hydrolytic enzymes in the axis, cotyledons, and endosperm. **Planta**, v.146, n.3, p.335-341, 1979.

LIFE TECHNOLOGIES. Real-time PCR handbook.2012.Disponível em <  
[http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR\\_Handbook\\_Update\\_FLR.pdf](http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf)>. Acesso em: 03 fev.2014

LIMA, E.E.et al. Caracterização de alfa-galactosidase em embrião e cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* micheli, var. pubescens (tamboril-da-mata). **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, MG, v.26, n.2, p. 82-90, jun. 2004.

LIMA, E.E.et al. Caracterização de alfa galactosidase e sua relação com a germinação das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpioideae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.29, n.4, p. 525-533, abril. 2005.

LISBOA, C.G.S. et al. Endo –  $\beta$ - mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.(leguminosae):purification,characterization and its dual role in germination and early growth.Brazilian **.Journal of Plant Physiology**, v.18, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LIZANA, X. C. et al. Expansin expression is associated with grain size dynamics in wheat(*Triticum aestivum L.*) . **Journal of Experimental Botany**, v.61, p.1147-1157,2010.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, V.2.p.342, 2002.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Dormência de Sementes**.In: FILHO, J.M. Fisiologia de Sementes de plantas cultivadas: Piracicaba: Fealq, p.252-291,2005.

MARCOS FILHO, J. et al. Tamanho do semente e desempenho do girassol: II. Vigor. **Revista Brasileira de Sementes**, v.8, n.2, p.21-32, 1986.

MARRACINI,P. et al. Molecular and biochemical characterization of endo –  $\beta$ - mannanase from germinating coffee(*Coffea Arabica*) grains. **Planta**, v.213, p.296-308, 2001.

MATHEW, C. D.; BALASUBRAMANIAM, K. Chemical modification of  $\alpha$ -galactosidase from coconut. **Phytochemistry**, v.25, 2439–2443, 1986.

McQUEEN, S.J; COSGROVE, D. J: Expansin mode of action on cell walls: analysis of wall hydrolysis, stress-relaxation, and binding. **Plant Physiology**, v. 107, p.87-100, 1995.

MELLA,R.A. et al. Expansin gene expression in *Datura ferox* L. seeds is regulated by the low-fluence response, but not by the high irradiance response, of phytochromes. **Seed Science Research**, V.4, p.61-71,2004

MEYERS, B. C. et al. Methods for transcriptional profiling in plants be fruitful and replicate . **Plant Physiology**, Lancaster, v.135, p.637-652, 2004.

MO, B, BEWLEY, J. D.  $\beta$ -mannosidase (Ec 3.2.1.25) activity during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds: purification, cloning and characterisation. **Planta**, New York, v. 215 p.141-152, 2002

MO, B; BEWLEY, J. D. The relationship between  $\beta$ -mannosidase and endo-  $\beta$ -mannanase activities in tomato seeds during and following germination a comparasion of seed populations and individual seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.392, p.2503-2510, 2003.

MU, J. H, et al. Characterization of a pollen- expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. **Plant Molecular Biology**, v.25, p. 539-544, 1996.

NACHTIGALL, P. G. **Perfil de expressão e organização genômica de microRNAs músculo- específicos na tilápia no Nilo *Oreochromis niloticus***.2012.  
Dissertação(Mestrado em Ciências Biológica(Genética)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

NAKAUNE, M. et al. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short- term low-concentration salt seed priming in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.52, p.28-57, 2012.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J. Germination of primed lettuce seeds after storage. **Florida State Horticultural Society**, V.111, p.96-99,1998.

NASCIMENTO, W. M. et al. Endo-  $\beta$ - mannanase activity and seed germination of thermosensitive and thermolerant lettuce genotypes in response to seed priming. **Seed Science Research**, v.11, p. 255-264, 2001.

NI, B.; BRADFORD, K. J. Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin and water potential. **Plant Physiology**, v. 101, p. 607–617, 1993

NONOGAKI, H; MOROHASHI, Y. An endo –  $\beta$ - mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. **Plant Physiology**, v.110, p.555-559, 1996.

NONOGAKI, H. et al. A germination specific endo-  $\beta$ - mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. **Plant Physiology**, v.123, p.1235-1245, 2000.

NONOGAKI, H. **Seed Development , dormancy and germination cap: mechanisms and genes involved in germination sensu strict.** In BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. Seed development, dormancy and germination. Annual Plant Reviews, v.27, 2007.

NONOGAKI, H, et al. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. **Plant Physiology**, v. 85, p. 167–172, 1992.

OSBORN, D. J. Dormancy as a survival stratagem. **Annals of Applied Biology**, v. 98, p. 525-31, 1981.

OUELLETE, B. F. F; BEWLEY, J. D.  $\beta$ - mannosidase mannohydrolase and the mobilization of the endosperm cell wall of lettuce seed c.v Grand rapids. **Planta**, v.169, p.333-338, 1986.

PAIVA, E. P. et al. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.10, p. 196-211, jul.2009.

PAVLISTA, A. D .; HABER, A. H. Embryo expansion without protrusion in lettuce seeds. **Plant Physiology**, v. 46, p.636-637, 1975.

PEREZ, A. C. et al. Effect of *Solanum lycocarpum* St Hill. On various haematological parameters in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p.442-444, 2006.

PINTO, L. V. A. et al. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. **Annals of Botany**, v.100, p.1175-1187, 2007.

PFAFFL, M. W. et al. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nuclei**

**Acids Research**, v. 30, 2002.

SÁNCHEZ, R. A. et al. Changes in the endosperm cell walls of two *Datura* species before radical protrusion. **Plant Physiology**. V.93, p.89-97, 1990.

SÁNCHEZ, R. A.; MIGUEL, L. C. The effect of red light, ABA and K<sup>+</sup> on the growth of *Datura ferox* embryos and their relations with photocontrol of germination. **Botanical Gazette**, v.146, p. 472–476, 1985.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p. 205-237, 2000.

SANTOS, M.O. et al. Variabilidade genética entre populações de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. HILL.). **Floresta e Ambiente**, v.9, n.1, p.158, 2002.

SHEN, W. et al. New source of  $\alpha$ -D-galactosidase: germinating Coffee beans. **Food Chemistry**, v.110, p.962-966, 2008.

SIMERSKA, P. et al. Unique transglycosylation potential of extracellular  $\alpha$ -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.39, p.128–134, 2006.

SITRIT, Y. et al. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. **Plant Physiology**, v.121, p.419-428, 1999

SOEDA, Y. et al. Gene expression programs during *Brassica oleraceae* seed maturation osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level, **Plant Physiology**, v.137, p.354-368, 2005.

STILL, D.W, BRADFORD, K, J. Endo- -  $\beta$ -mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radical tips in relation to germination rates. **Plant Physiology**, v.113, p.21-29, 1997.

STILL, D. W. et al. A single-seed for endo-  $\beta$ - mannanase activity from tomato endosperm and radicle tissues. **Plant Physiology**, v.113, p.13-20, 1997.

SUDA, C. N. K. et al. Cell wall hydrolases in the seeds of *Euphorbia heterophylla* L. during germination and early seedling development. **Brazilian Journal of plant physiology**, v.15, 2003.

SUNG, F. J. M.; CHANG, Y. H., Biochemical activities associated with priming of sweet corn seeds to improve vigor. **Seed Science Technology**, 1993, v. 21, p. 97–105, 1999.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. Ed. Porto Alegre, RS:ARTMED, 2006.

TIOSSI, R. F. J. **Obtenção de extrato padronizado de *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. Contendo glicoalcalóides, desenvolvimento do método analítico por CLAE e de forma farmacêutica de uso tópico**. 2010. Dissertação (Mestre em Ciências)- Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto-SP, 2010.

TOOROP, P.E et al. Endo –  $\beta$ -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. **Planta**, v.200, p.153-158, 1996.

TOOROP, P.E., et al. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under the control of ABA. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1371–1379, 2000.

VARIER, A. et al. The subcellular bases of seed priming. **Current Science**, v.99, n.4, 2010.

VIDAL, M. C. et al. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hill. (lobeira) em casa de vegetação. **Acta Botânica Brasílica**, v.13, n.3, p.271-274, 1999.

VOIGT, B; BEWLEY, J. D. Developing tomato seeds when removed from the fruit tissue produce multiple forms of germinative and post-germinative a endo  $\beta$  – mannanase . Response to desiccation, abscisic acid and osmoticum. **Planta**, v.200, p.71-77, 1996.

WALKER, C.G. et al. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. **BMC Molecular Biology**, v. p. 10- 100, 2009.

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

WELBAUM, G. E; BRADFORD, K. J. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Plant Physiology**, n.92, p.1046-1052, 1990.

WELBAUM, G. E. et al. Weakening of muskmelon perisperm envelope tissue during germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, n.285, p. 391-400, 1995.

WU, C. et al. Class I  $\beta$ -1,3 - glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radical emergence. **Plant Physiology**, v.126, p.1299-1313,2001