

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA,
FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO
DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS E
SEMENTES DE SERINGUEIRA (*Hevea* spp.)**

SUERLANI APARECIDA FERREIRA MOREIRA

2009

SUERLANI APARECIDA FERREIRA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA, FISIOLÓGICA
E BIOQUÍMICA DO DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS E
SEMENTES DE SERINGUEIRA (*Hevea spp.*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Moreira, Suerlani Aparecida Ferreira.

Caracterização morfo-anatômica, fisiológica e bioquímica do desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira (*Hevea spp.*) / Suerlani Aparecida Ferreira Moreira. – Lavras : UFLA, 2009.
67 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.
Bibliografia.

1. *Hevea spp.* 2. Caracterização de sementes. 3. Desenvolvimento. 4. Açúcares. 5. Enzimas. 6. Proteínas resistentes ao calor. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.950413
– 633.89527

SUERLANI APARECIDA FERREIRA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA FISIOLÓGICA E
BIOQUÍMICA DO DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS E
SEMENTES DE SERINGUEIRA (*Hevea spp.*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 05 de março de 2009

Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome UFLA

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Ao nosso DEUS pai todo poderoso que sempre esteve comigo nas diferentes etapas da minha vida, realizações e vitórias.

Aos meus pais, Raimundo Nonato Moreira e Suely Ferreira Moreira, por não medirem esforços para proporcionarem escolarização de qualidade, pelo apoio em todas as etapas da minha vida, e por sempre terem feito o máximo para me verem progredir, eu, que estarei sempre lembrando desses ensinamentos. Amo vocês.

Aos meus irmãos Suerla e Moisés, pelo apoio e força de sempre. Amo vocês.

As minhas sobrinhas Iasmim e Daniele, pelo carinho e alegria que trouxe para nossas vidas.

Ao meu esposo Leonardo, pelo amor incondicional, e que DEUS possa nos abençoar sempre.

Com Amor Dedicado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, proteção e por permitir mais esta conquista.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

Ao meu orientador, professor Luiz Edson Mota de Oliveira, por toda a sua amizade e conselhos durante estes dois anos de convívio.

Ao meu coorientador Lisandro Bonome, pelos ensinamentos, ajuda e paciência.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal, por todos os ensinamentos transmitidos.

A minha amiga e irmã, Emanuelle, por tudo, pela amizade, carinho, paciência e companhia.

Aos amigos Aretusa, Elma, Marilza e Thiago, pela força e amizade.

Aos funcionários técnico-administrativos do Setor de Fisiologia Vegetal: Celen, Lena, Dartagnan, Joel e Odorêncio, por toda a ajuda.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Sementes de seringueira.....	3
2.2 Desenvolvimento de sementes.....	4
2.3 Alterações bioquímicas durante o desenvolvimento de sementes	5
2.4 Alterações fisiológicas durante o desenvolvimento de sementes	11
2.5 Tolerância à dessecação por proteção de açúcares	12
2.6 Tolerância à dessecação por proteção de proteínas resistentes ao calor	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Determinação do teor de água e da matéria seca das sementes	18
3.2 Análise morfológica por estereoscopia.....	19
3.3 Extração e quantificação de amido	19
3.4 Extração e quantificação de proteínas solúveis, açúcares redutores, açúcares solúveis totais e sacarose	19
3.5 Extração e quantificação de lipídios	20
3.6 Extração e atividade invertásica.....	20
3.7 Extração e atividade da sacarose sintase (Susy)	20
3.8 Análise de proteínas resistentes ao calor	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Caracterização morfo-anatômicas durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira	22
4.2 Teor de água durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira	31

4.3 Porcentagem de matéria seca durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira	32
4.4 Avaliação das características bioquímicas durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira	34
4.5 Análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira	54
5 CONCLUSÕES	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

RESUMO

MOREIRA, Suerlani Aparecida Ferreira. **Caracterização morfo-anatômica, fisiológica e bioquímica do desenvolvimento de sementes de seringueira (*Hevea spp.*)**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Neste estudo teve-se o objetivo de avaliar as transformações morfo-anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento da semente de seringueira, caracterizar as fases do desenvolvimento dessas sementes e verificar a presença de proteínas responsáveis pela tolerância à dessecação, durante o desenvolvimento dessas sementes. O experimento foi realizado em uma planta de seringueira pé-franco, oriundo de sementes do clone RRIM 600, cultivada na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Em coleta realizada no decorrer de seis meses e meio de desenvolvimento do fruto (38, 65, 95, 120, 155, 195 dias após a polinização) aproximadamente 10 frutos (30 sementes) foram coletados os frutos e realizadas as seguintes avaliações: teor de água, matéria seca e análise morfológica. Também foram quantificados amido, proteínas solúveis, açúcares e atividade enzimática da Susy e invertase nos tecidos: pericarpo do fruto, endosperma, embrião e tegumento da semente, sendo o embrião e o tegumento avaliados a partir de 120 DAP (quando foi possível sua separação da semente). Para análise de proteínas resistentes ao calor (sHSPs), foram avaliados embriões de sementes também a partir de 120 DAP. O lípideos foram quantificados na amêndoa da semente e pericarpo do fruto. As sementes de seringueira atingem seu tamanho máximo entre os três e quatro meses de desenvolvimento. A mudança da fase de divisão e expansão celular para o de armazenamento de reserva e maturação parece ocorrer próximo aos 100 DAP em sementes de seringueira. E sua maturidade fisiológica é alcançada aos 195 DAP. O acúmulo de amido e proteínas solúveis no endosperma dessas sementes ocorre, principalmente, a partir dos 95 DAP. No endosperma, há uma alta concentração de açúcares redutores no início do desenvolvimento das sementes, até 95 DAP, o qual declina com a sua maturação. A sacarose permanece em baixas concentrações no início do desenvolvimento das sementes e, a partir dos 95 DAP, eleva-se superando o teor de açúcares redutores. No embrião ocorre aumento nos teores de açúcares solúveis totais, redutores e de sacarose com o avanço do desenvolvimento das sementes de seringueira. No tegumento ocorre redução no teor de açúcares solúveis totais e redutores com o avanço do desenvolvimento das sementes e o teor de sacarose permanece inalterado. A

¹ Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA

atividade da invertase ácida aumenta no endosperma das sementes até 95 DAP, enquanto, a da SuSy permanece inalterada. A partir deste período ocorre uma inversão, com a atividade da invertase ácida declinando e a da SuSy aumentando. No embrião, a atividade da invertase ácida declina com o avanço do desenvolvimento das sementes e a atividade da invertase neutra aumenta, superando a atividade da ácida próximo dos 150 DAP. A SuSy permanece baixa durante todo o desenvolvimento do embrião. No tegumento ocorreu redução na atividade de todas as enzimas avaliadas com o avanço do desenvolvimento das sementes de seringueira. As sHSPs estão presentes nas sementes de seringueira, existindo um aumento da intensidade das bandas que correspondem a estas proteínas com o avanço do desenvolvimento das sementes.

ABSTRACT

MOREIRA, Suerlani Aparecida Ferreira. **Morpho-anatomical, physiological and biochemical characterization of development of rubber tree (*Hevea spp.*) seeds.** 2009. 67 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.²

In this study the objective was to evaluate the morpho-anatomical, physiological and biochemical transformations that occur during the development of the rubber tree seed, to characterize the development phases of those seeds and verify the presence of proteins responsible for desiccation tolerance during their development. The experiment was carried out on a non-grafted rubber tree plant, originating from clone RRIM 600 seeds, cultivated in the experimental area of the Plant Physiology Sector of the Biology Department of the Federal University of Lavras. At collection, carried out after six and a half months of fruit development (38, 65, 95, 120, 155, 195 days after pollination), approximately 10 fruits (30 seeds) were collected and subjected to the following evaluations: water level, dry matter and morphological analysis. Also quantified were starch, soluble proteins, sugars and SuSy and invertase enzymatic activity in the tissues: fruit pericarp, endosperm, embryo and seed tegument, the embryo and the tegument being evaluated starting from 120 DAP (when separation from seed was possible). For analysis of heat resistant proteins - small Heat Shock Proteins (sHSPs), embryos of seeds were appraised, also starting from 120 DAP. The lipids were quantified in the seed kernel and fruit pericarp. The rubber tree seeds reach their maximum size between three and four months of development. The change of the division and cellular expansion phase to that of storage reservation and maturation seems to occur close to 100 DAP in rubber tree seeds and their physiological maturity is reached at 195 DAP. The accumulation of starch and soluble proteins in the endosperm of those seeds occurs, mainly, starting from 95 DAP. In the endosperm, there is a high concentration of reducing sugars at the beginning of seed development, until 95 DAP, which declines with their maturation. The sucrose remains at low concentrations at the beginning of the seed development and, starting from 95 DAP, rises, surpassing the reducing sugar levels. In the embryo, there occurs an increase in the levels of total soluble sugars, reducers and sucrose with the progress of the rubber tree seed development. In the tegument, there occurs a reduction in the levels of total soluble sugars and reducers with seed development progress and the sucrose level remains unaffected. The activity of the acid invertase increases in the endosperm of the seeds up to 95 DAP, while, that of SuSy remains

² Adviser: Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA

unaffected. Starting from this period an inversion occurs, with the activity of the acid invertase declining and the SuSy increasing. In the embryo, the activity of the acid invertase declines with seed development progress and the neutral invertase activity increases, surpassing the activity of the acid close to 150 DAP. SuSy stays low during the whole development of the embryo. In the tegument a reduction occurs in the activity of all of the enzymes appraised during the rubber tree seed development progress. The sHSPs are present in the rubber tree seeds, having an increase in the intensity of the bands that correspond to the proteins during the seed development progress.

1 INTRODUÇÃO

A seringueira é uma planta pertencente à família Euphorbiaceae, nativa da região amazônica. A sua madeira pode ser empregada para tabuado, forros e caixotaria. Seu maior valor reside no látex extraído do seu tronco, que é transformado em borracha de excelente qualidade; sua exportação representou no passado a maior atividade econômica da região Amazônica, colocando o Brasil durante muito tempo como o único produtor e exportador desse produto.

Atualmente, a borracha natural é um artigo onipresente na vida dos seres humanos, com mais de 50 mil itens produzidos a partir de sua exploração. Devido à importância da borracha, a grande maioria das pesquisas envolvendo seringueira destina-se à produção de látex, sendo dada pouca atenção às outras partes da planta, inclusive as sementes (Bonome, 2006).

No entanto, nos últimos anos, além do látex e da madeira, a semente de seringueira tem despertado interesse no mercado, devido ao seu potencial de utilização em diversas atividades econômicas. Países asiáticos têm desenvolvido pesquisas sobre possibilidades de aproveitamento destas sementes, como fonte de biodiesel, sabão, cosméticos, resinas para produção de adesivos, vernizes, tintas e alimentação animal. Assim, o conhecimento do metabolismo da semente de seringueira em especial, do acúmulo de materiais de reserva, os quais têm origem nas transformações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem nos diferentes estádios do seu desenvolvimento é de fundamental importância.

Além do potencial de utilização econômica das sementes de seringueira, existem outros aspectos que justificam investigações acerca das transformações que ocorrem durante o seu desenvolvimento. O seu caráter recalcitrante é um dos principais entraves para cultivos comerciais. A propagação dessa espécie ocorre quase que exclusivamente, por enxertia em porta enxertos oriundos de sementes. Dessa maneira, a disponibilidade de sementes em qualidade e

quantidade adequada é de fundamental importância para a exploração econômica dessa cultura.

A característica recalcitrante dessas sementes faz com que elas percam, rapidamente, o poder germinativo, desta forma a dificuldade de armazenamento de sementes de seringueira inviabiliza a instalação de viveiros em época adequada ao desenvolvimento das plântulas, gerando restrição de oferta de mudas em determinadas épocas do ano, ou tornando-as disponíveis em épocas inadequadas ao plantio.

Os estudos que visam amenizar as características indesejáveis da recalcitrância são voltados, principalmente, para a melhoria das condições de armazenamento, tipos de embalagens e utilização de fungicidas, como o estudo realizado por Bonome (2006). Em geral, estes estudos têm em comum a busca de alternativas para os efeitos – e não as causas – da recalcitrância, com o intuito de prolongar a viabilidade das sementes.

A tolerância à dessecação é uma característica adquirida pelas sementes ortodoxas durante o seu desenvolvimento. Na maioria das espécies, isso ocorre, principalmente, na fase de maturação.

Com esse trabalho, teve-se por objetivo avaliar as transformações morfo-anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento da semente de seringueira, bem como, caracterizar as fases do desenvolvimento dessas sementes e também verificar a presença de açúcares e proteínas responsáveis pela tolerância à dessecação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sementes de seringueira

O fruto de seringueira é capsular do tipo tricoca contendo três sementes. Segundo Roosmalen (1985), esse tipo de fruto é característico da família Euphorbiaceae, embora possam ser encontrados, com menor frequência, outros tipos de fruto como drupa ou baga. A deiscência do fruto é explosiva; esse tipo de deiscência é característico das plantas de regiões tropicais e subtropicais e segundo Berg (1975), deve constituir uma característica primitiva da família Euphorbiaceae.

As sementes de seringueira são geralmente grandes, normalmente pesando de 3,5 a 6,0g de forma oval ligeiramente achatada. O tegumento é duro e brilhante de cor marrom com numerosos matizes sobre a superfície dorsal. É possível identificar a árvore ou clone mãe que deu origem as sementes pelas matizes do dorso e pelo seu formato, visto que, o tegumento é tecido maternal e o formato deste é determinado pela pressão externa da cápsula durante seu desenvolvimento (Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, 2004).

As plantas de seringueira oriundas de sementes apresentam grande variabilidade vegetativa e produtiva, sendo as sementes usadas somente para a formação de porta-enxertos em viveiros, e não para plantios a campo.

Por possuírem deiscência explosiva e não tolerarem sol, a coleta de sementes deve ser realizada a cada dois dias. As sementes da espécie são recalcitrantes, tendo potencial de germinação de no máximo 80% .

A característica recalcitrante dessas sementes faz com que percam, rapidamente, o poder germinativo, principalmente, quando as condições climáticas propiciam rápida redução do seu teor de água. Essas sementes, mesmo quando mantidas sob condições consideradas adequadas para o

armazenamento, apresentam longevidade relativamente curta se comparadas às sementes ortodoxas (Vieira, 1991).

Existe uma grande variação na quantidade produzida de sementes em cada ano, podendo variar de 73 a 424 Kg/ha, devido a influências climáticas, incidência de doenças e a diferenças entre e dentro dos clones.

Entre os países produtores de borracha natural a Índia foi o primeiro país a explorar comercialmente as sementes de seringueira visando à extração de óleo e, posteriormente, a Nigéria e a Malásia, embora ainda em condições rudimentares.

2.2 Desenvolvimento de sementes

O desenvolvimento da semente é um processo fundamental no ciclo de vida da planta. Ele inicia-se com um processo de dupla fertilização, o qual culmina com o desenvolvimento do embrião e do endosperma. Em plantas diplóides, o desenvolvimento do embrião é seguido da fertilização do óvulo haplóide por uma célula espermática, o qual dá origem a um zigoto diplóide. Em contraste, o desenvolvimento do endosperma, que é um tecido triplóide, é iniciado quando os núcleos polares do saco embrionário diplóide são fertilizados por uma segunda célula espermática.

Em termos conceituais, o desenvolvimento de sementes de uma angiosperma pode ser dividido em três fases distintas. A primeira é denominada de histodiferenciação ou morfogênese inicial, durante o qual se estabelece o plano em que o embrião é formado. Isso acontece por meio de intensas divisões celulares, ocorrendo à formação do eixo embrionário e dos tecidos de reserva. A segunda é a expansão celular concomitante com o acúmulo de reservas, mudanças de tamanho, peso fresco e peso seco da semente e, por fim, a terceira fase que corresponde ao dessecamento da semente. A aquisição da tolerância à dessecação parece acontecer entre o final da fase de expansão e início da fase de

dessecação, antes que as sementes sofram uma severa queda no seu conteúdo de água. Porém, não se pode afirmar se a tolerância é adquirida antes ou em resposta à perda de água.

Diversos autores denominam este conjunto de eventos que ocorrem durante o desenvolvimento das sementes como maturação de sementes, sendo este considerado como o resultado de todas as alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que se sucedem desde a fertilização do óvulo até o momento em que as sementes atingem o máximo acúmulo de matéria seca, ou seja, o ponto de maturidade fisiológica (Popinigis, 1985; Carvalho & Nakagawa, 2000). A maturidade fisiológica é o ponto em que as sementes se desligam da planta mãe, cessando a translocação de fotoassimilados e, no caso de sementes ortodoxas (tolerantes a dessecação), levando a planta a acionar mecanismos para promover a desidratação das sementes. É importante ressaltar que o ponto de maturidade fisiológica pode ou não coincidir com o máximo de qualidade fisiológica da semente, além disso, pode variar em função da espécie e do ambiente.

A permanência da semente na planta, depois de atingida sua maturidade fisiológica, compromete sua qualidade, pois corresponde a um armazenamento no campo, sujeito às variações climáticas, dando início, assim, ao processo de deterioração das sementes, cuja velocidade é influenciada pelas condições ambientais.

2.3 Alterações bioquímicas durante o desenvolvimento de sementes

Nos últimos anos, maior atenção tem sido dada às alterações bioquímicas que ocorrem durante a formação das sementes. Diversos genes regulatórios e hormônios que participam do processo estão sendo identificados (Wobus & Weber, 1999a,b). O papel de metabólitos, como açúcares, atuando

como sinais moleculares no desenvolvimento de sementes, ao lado de seu papel como nutriente, tem atraído muita atenção dos pesquisadores.

A sacarose exerce um papel central no crescimento e desenvolvimento de plantas e sementes, como uma forma primária de transporte de carbono e energia na maioria das espécies vegetais e também como um regulador da expressão de genes. Órgãos drenos não fotossintetizantes como, por exemplo, sementes em formação, são altamente dependentes de sua importação. A hidrólise da sacarose é o primeiro passo em direção ao metabolismo e a síntese de produtos de armazenamento; assim, a clivagem da sacarose em hexose é vital a todas as plantas, não somente para a alocação de carbono, mas também para a indução de sinais em importantes estruturas (Koch, 2004). As únicas rotas enzimáticas conhecidas de hidrólise de sacarose em plantas são catalisadas por meio de invertases e sacarose sintase (Susy). Ambas as rotas degradam sacarose *in vivo*, no entanto, um dos produtos destas reações se difere (Winter & Huber, 2000). As invertases formam glicose e frutose, que são fosforiladas, posteriormente, por várias hexoses e frutoquinases (Taiz & Zeiger, 2004), requerendo, para isso, duas moléculas de ATP. Já a Susy forma UDP-Glicose e frutose, sendo necessário, para isso apenas uma molécula de PPi (Geigenberger, 2003).

Em geral, tem sido evidenciado que hexoses favorecem a divisão e a expansão celular, enquanto que a sacarose favorece a diferenciação e a maturação de sementes (Baud et al., 2002; Borisjuk et al., 2002, 2003). Estas informações têm sugerido que o controle de invertase/Susy é de fundamental importância para a transição das fases do desenvolvimento de sementes (Borisjuk et al., 2002, 2003). Alta atividade da invertase e alta razão hexose/sacarose têm sido encontradas nos estádios iniciais de desenvolvimento de diversos cereais, como milho (Cheng & Chourey, 1999), arroz (Hirose et al., 2002) e cevada (Winter & Huber, 2000).

As invertases são β -frutosidases que costumam ser classificadas por, pelo menos, três critérios: (1) de acordo com o pH ótimo para a sua atividade, podem ser ácidas, neutras ou alcalinas; (2) em função da sua solubilidade, podem ser solúveis ou insolúveis e (3) quanto à sua localização, a invertase ácida solúvel é vacuolar, a invertase insolúvel ácida é extracelular (associada à parede celular) e as invertases alcalina e neutra são citossólicas (Quick, 1996; Winter & Huber, 2000). Estas enzimas, além de fornecer hexoses para o metabolismo celular, participam no controle do crescimento, diferenciação celular e desenvolvimento de plantas e sementes, regulando a razão sacarose/hexose. Em células se semente de cenoura, a diferenciação é induzida quando a atividade da invertase ácida diminui, porém, a permanência desta enzima em estádios mais avançados do desenvolvimento pode reduzir a diferenciação pela diminuição do nível de sacarose (Sturm & Tang, 1999). De acordo com Kock & Zeng (2002), as invertases são as responsáveis pelo início da divisão e da expansão celular em diversos tecidos drenos.

Em sementes, a hexose é, primeiramente, proveniente da hidrólise da sacarose realizada por uma invertase ácida da parede celular de células parenquimatosas que revestem o interior da parte líquida do endosperma. Mediante a disponibilização de hexose, inicia-se a expansão do embrião até o ponto em que este começa a pressionar as células do endosperma, ocorrendo, a partir daí, sua morte, provavelmente, por apoptose (Hill et al., 2003). Nesse ponto, a atividade da SuSy torna-se maior do que a da invertase que, por sua vez, começa a diminuir sua atividade até praticamente seu desaparecimento. Como consequência, o nível de hexose cai e a sacarose torna-se o principal açúcar do endosperma, induzindo uma mudança na expressão de genes a favor da acumulação de produtos de armazenamento (Hill et al., 2003).

Essa mudança na concentração de hexose para sacarose no endosperma, durante o desenvolvimento de sementes, também foi observada em ervilha, por

Borisjuk et al. (2002). Segundo Déjardin et al. (1997), a passagem do estágio de expansão do embrião para o de armazenamento de reservas é acompanhada por uma queda na atividade invertásica, que permanece muito baixa, tanto no tegumento como no embrião. Resultados semelhantes foram observados por Weber et al. (1996), em sementes de *Vicia faba*.

Quanto a Susy, em geral, admite-se que sua atividade é relacionada com a síntese de parede celular e de amido (Winter & Huber, 2000), mas também pode estar associada com a síntese de sacarose. Apesar de a reação catalisada pela Susy ser reversível, existe evidências de que a ação predominante desta enzima é no sentido da clivagem da sacarose, produzindo UDP-glicose e frutose para a síntese de parede celular e amido. De acordo com Kruger (1993), pelo menos três argumentos sustentam essas evidências. O primeiro argumento tem relação com a distribuição da Susy em diferentes tecidos. A atividade da Susy é, geralmente, baixa em células fotossintéticas e gliconeogênicas, e é, muitas vezes, alta em tecidos com intensa atividade de crescimento, os quais dependem da sacarose como o seu substrato respiratório. Em segundo lugar, em alguns tecidos, a atividade das invertases é muito menor que a da Susy, mostrando-se insuficiente para catalisar o metabolismo da sacarose. Um bom exemplo disso é o tubérculo da batata, no qual as invertases ácida e alcalina têm atividades tão baixas que a Susy parece assumir, quase integralmente, a clivagem da sacarose. Por fim, estudos realizados com mutantes de milho revelam que uma redução dos níveis de Susy em endosperma em desenvolvimento restringe a capacidade desse tecido de metabolizar sacarose.

Em sementes, resultados de diversas pesquisas indicam que a expressão de genes para as invertases ocorre, predominantemente, durante os primeiros estádios, enquanto os da Susy ocorrem nas etapas intermediárias e finais do desenvolvimento. Essa mudança se correlaciona com a transição da divisão celular para o de expansão celular e armazenamento e foi interpretada,

inicialmente, como uma resposta à regulação por sensores de açúcares (Borisjuk et al., 1998). De acordo com Kock (2004), em revisão sobre o papel do metabolismo de sacarose no desenvolvimento de diferentes tecidos drenos, as invertases vacuolar e de parede celular iniciam a hidrólise de sacarose nos primeiros estádios do desenvolvimento, aumentando a respiração e gerando, em troca, hexoses sinais. Segundo a autora, as hexoses sinais regulam diversos genes dos estádios iniciais do desenvolvimento, incluindo aqueles envolvidos na divisão celular. Com a mudança da fase de divisão celular e a expansão para o de armazenamento e maturação, a Susy torna-se mais importante.

Além do seu papel como nutriente, a sacarose funciona também como um sinal, o qual ativa uma prematura interrupção da mitose e da expansão celular e induz à expressão de genes associados ao armazenamento e à acumulação de amido (Weber et al., 1997). Trabalhando com sementes de colza, Hill et al. (2003) verificaram que, no início do desenvolvimento do embrião, o conteúdo endospermático era rico em glicose e frutose, porém, pobre em sacarose. Com o desenvolvimento do embrião, o conteúdo de hexoses do endosperma foi reduzindo e o de sacarose foi aumentando, semelhantemente ao que ocorre em *Vicia* spp (Wobus & Weber, 1999b) e em canola. Diversos autores associam esta mudança no conteúdo de açúcares, durante o desenvolvimento de sementes, à mudança na atividade de enzimas, como invertases e Susy (Weber et al., 1996). Entretanto, uma explicação alternativa à mudança na atividade das enzimas está relacionada às reduções nas concentrações de oxigênio que ocorrem à medida que a semente se desenvolve. Em raízes de milho e tubérculos de batata, por exemplo, baixos níveis de oxigênio reprimem a invertase e induzem genes específicos da Susy. Essas adaptações bioquímicas têm o propósito de conservar energia sob condições em que a disponibilidade de oxigênio é limitante.

Tomlinson et al. (2004), trabalhando com sementes oleaginosas de fumo transgênico, verificaram, semelhantemente ao que ocorre em sementes de diversas outras espécies, uma alta atividade da invertase ácida de parede celular no período inicial de seu desenvolvimento, com posterior queda no decorrer do mesmo. No entanto, diferentemente do observado em sementes de leguminosa, por Borisjuk et al. (2003) e em colza, por Hill et al. (2003), a queda na atividade da invertase ocorreu após o acúmulo do principal material de reserva da semente que, no caso, é o lipídeo, não apresentando, assim, nenhum “interruptor” de passagem da invertase para Susy. De acordo com os resultados, fica evidenciada a associação entre a alta atividade da invertase e a alta acumulação de lipídeos, sugerindo que, enquanto a sacarose utilizada para a síntese de amido ocorre via Susy, a rota da invertase predomina para síntese de lipídeo (Tomlinson et al., 2004).

Os autores relatam ainda, que, em sementes de fumo, assim como em sementes de *Vicia faba* (Borisjuk et al., 1998) e milho (Cheng & Chourey, 1999), as hexoses provenientes da sacarose hidrolisada pelas invertases parecem regular a atividade mitótica. No entanto, a proposta de que a mudança na razão de açúcares (hexose/sacarose) funciona como indutor da função de armazenamento de reservas é menos suportada, pois, em experimento realizado com sementes de fumo geneticamente transformadas para aumentar a quantidade de invertase e hexoquinase no apoplasto e no citoplasma, respectivamente, foi observado um normal funcionamento de acúmulo de reservas, mesmo mediante uma alta atividade da invertase. Este resultado indica que, nas sementes de fumo não transgênicas, a maior parte do acúmulo de lipídeos e de proteínas ocorre quando estas apresentam alta atividade da invertase e alta razão hexose/sacarose, não sendo necessária, portanto, uma condição de baixa atividade da invertase e alta razão sacarose/hexose para a ocorrência do acúmulo dos materiais de reserva. Assim, os autores afirmam que o modelo de açúcares como sinalizador

molecular no desenvolvimento de sementes (Wobus & Weber, 1999b) não deve ser utilizado de maneira generalizada como vem ocorrendo.

2.4 Alterações fisiológicas durante o desenvolvimento de sementes

Para o estudo de maturação de sementes, além dos aspectos bioquímicos, devem ser contemplados também aspectos relacionados com as características de natureza física e fisiológica das sementes, tais como: tamanho, peso de sementes, teor de água e massa seca (Carvalho & Nakagawa, 2000) que, analisadas em conjunto, permitem uma estimativa do estágio de maturação, possibilitando a identificação da maturidade fisiológica das sementes. Estes são importantes parâmetros que podem ser usados como indicadores da maturidade fisiológica, dadas à facilidade e a rapidez de utilização, comparada com os índices bioquímicos.

O grau de umidade da semente é considerado o parâmetro mais adequado para definir o ponto de maturidade fisiológica de sementes de algodoeiro. Outros estudos com sementes de diversas espécies, como *Dalbergia nigra* e *Cnidoculus phyllacanthus* (Silva et al., 2002), indicam o teor de água, quando analisado com outras características, como um dos principais índices que evidenciam o processo de maturação das sementes, constituindo-se em um importante indicador das suas condições fisiológicas.

Alves et al. (2005), trabalhando com sementes de *Mimosa caesalpinifolia*, verificaram que o teor de água e a matéria seca foram eficientes parâmetros para avaliação da maturidade fisiológica.

Em estudo realizado sobre a maturação fisiológica de sementes, Lopes et al. (2005) verificaram que, para a quaresmeira (*Tibouchina granulosa*), a maturidade fisiológica das sementes ocorreu entre 84 e 105 dias e que a colheita deve ser realizada entre 84 e 98 dias, um pouco antes da deiscência dos frutos, que ocorre 105 dias após a antese. Segundo os autores, o teor de água e a massa

de matéria seca foram os índices que melhor caracterizaram a maturação fisiológica e a época de colheita das sementes. Entretanto, o tamanho dos frutos e a coloração das sementes também se revelaram bons indicadores do ponto de maturidade fisiológica.

Assim, o estudo da maturação dos frutos e sementes deve permitir, por meio da análise e da associação de um conjunto de características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, a identificação do melhor momento para a colheita de frutos, com vistas à obtenção de maior viabilidade das sementes.

2.5 Tolerância à dessecação por proteção de açúcares

Três estádios gerais são reconhecidos durante o desenvolvimento de sementes de uma angiosperma. O primeiro estágio é caracterizado pela fertilização, pela divisão celular e pela histodiferenciação de todos os principais tecidos. Durante o segundo estágio, ocorrem a expansão celular concomitante à fase de acúmulo de reservas e a fase final, que corresponde ao dessecação. O dessecação constitui um evento integrante do processo do desenvolvimento da maioria das sementes, especialmente as ortodoxas. Nesse grupo, o desenvolvimento só se completa quando a semente apresenta baixos teores de umidade, sendo a dessecação considerada necessária para a conclusão de seu ciclo de vida.

Esse padrão de desenvolvimento ocorre em sementes de espécies ortodoxas em relação a sua habilidade de resistir ao armazenamento com um reduzido conteúdo de água. Em contraste, existem espécies de sementes que não podem sofrer uma secagem durante o seu desenvolvimento e maturação. Seu conteúdo de água deve permanecer alto durante todo o seu desenvolvimento, até a germinação. Desse modo, já que não podem resistir à dessecação, são inaptas para o armazenamento por longos períodos de tempo. Esse grupo de sementes é chamado de recalcitrante e incluem muitas espécies de árvores tropicais, como

canela-amarela, maçaranduba e seringueira e também algumas de clima temperado, como o carvalho.

A água, além de ser um solvente para reações bioquímicas, é um importante estabilizador estrutural para os organismos, proporcionando, por meio de suas interações hidrofílicas e hidrofóbicas, estrutura para macromoléculas e organelas dentro da célula. Estruturas de membranas, consideradas como local primário de danos por dessecação, em particular, dependem dessas complexas interações (Senaratna & Mckersie, 1983). Assim, a perda de água nos estágios finais do desenvolvimento de sementes pode causar danos irrecuperáveis a algumas espécies, como as recalcitrantes. No entanto, outras, como as sementes ortodoxas, apresentam habilidade para resistir à dessecação. Alguns estudos têm evidenciado que proteínas acumuladas durante a maturação, sacarose e alguns oligossacarídeos da série rafinose são importantes fatores na aquisição de tolerância à dessecação (Vertucci & Farrant, 1995).

Alguns autores associam a acumulação de oligossacarídeos e sacarose durante a maturação de sementes com a aquisição de tolerância à dessecação (Vertucci & Farrant, 1995). De acordo com Hottiyer et al. (1994), alguns açúcares são substâncias consideradas eficientes em estabilizar macromoléculas e estrutura de membranas (Leprince et al., 1993), durante a dessecação. Açúcares redutores, como glicose, frutose, galactose e maltose estão ausentes ou presentes em baixas quantidades, em sementes maduras e secas, sendo estes característicos em tecidos intolerantes à dessecação. Açúcares redutores, especialmente monossacarídeos, promovem produtos da reação de Maillard. Esta é uma reação que ocorre entre os aminoácidos ou proteínas e os açúcares redutores e que conduz a uma inativação de proteínas e danos ao DNA, estimula a respiração (Leprince & Vertucci, 1995) e aumenta a formação de radicais livres. Por outro lado, açúcares não redutores, como a sacarose e oligossacarídeos, são menos reativos e considerados componentes protetores dos

tecidos. Segundo Vertucci & Farrant (1995), o grupo hidroxil dos açúcares solúveis pode substituir a água durante a dessecação das sementes, promovendo interações hidrofílicas fundamentais para a estabilização de membranas e proteínas.

A tolerância à dessecação parece ser um processo gradual e a acumulação de sacarose se correlaciona com seus estádios iniciais, todavia, sacarose sozinha não é suficiente para conferir tal atributo às sementes. A proporção de oligossacarídeos da família da rafinose e estaquinose também é importante para o mecanismo de tolerância à dessecação em sementes (Blackman et al., 1991). A hipótese é a de que estes oligossacarídeos previnem a cristalização da sacarose durante a desidratação, permitindo a ocorrência de um estado vítreo no citoplasma crucial para a tolerância à dessecação e armazenabilidade. A vitrificação do citoplasma consiste na criação de uma solução líquida, com propriedades de viscosidade de um sólido, que não forma cristais, mesmo em temperaturas muito baixas e com estabilidade em uma larga faixa de temperatura.

Oligossacarídeos da série rafinose e a sacarose são acumulados tradicionalmente em sementes em desenvolvimento, continuando após a maturidade e dessecação. Segundo Horbowicz & Obendorf (1994), a acumulação de oligossacarídeos da série rafinose, durante a formação de sementes, prolonga sua armazenabilidade. No entanto, esse mecanismo só deve ser aplicado a sementes que toleram a dessecação, pois, em tecidos intolerantes, a umidade requerida para a formação do estado vítreo é muito mais elevada (Sun et al., 1994).

Embora diversas pesquisas evidenciem a participação dos açúcares não redutores na tolerância à dessecação de sementes, deve-se levar em consideração que tais açúcares não atuam sozinhos, sendo, provavelmente, incapazes de tolerar a dessecação nesta condição (Blackman et al., 1991; Leprince et al.,

1993). Tanto isso é verdadeiro que alguns autores relatam uma alta concentração de sacarose e oligossacarídeos, durante o desenvolvimento de sementes recalcitrantes, sugerindo que a capacidade de tolerar a desidratação não é somente por causa da presença destes sacarídeos.

2.6 Tolerância à dessecação por proteção de proteínas resistentes ao calor

Na maioria das espécies, o crescimento e o desenvolvimento das sementes são paralisados no final da maturação. Essa fase é marcada pela queda no conteúdo de água que, provavelmente, é resultante da desconexão entre a semente e a planta-mãe. Nessa fase de amadurecimento, a semente sofre uma adaptação estratégica para tornar-se apta a tolerar as severas condições ambientais, garantindo, assim, melhor sobrevivência das espécies durante o armazenamento e disseminação (Guimarães, 2000). Entretanto, em algumas espécies, como as recalcitrantes, as sementes não podem resistir à dessecação, devendo seu conteúdo de água permanecer alto durante todo o seu desenvolvimento e maturação.

A aquisição da tolerância à dessecação ocorre durante a maturação, antes que as sementes sofram uma severa queda no seu conteúdo de água. Porém, não se pode afirmar que a tolerância é adquirida antes ou em resposta à perda de água. Além da presença de açúcares não redutores que funcionam como substitutos da água estabilizando macromoléculas e estruturas de membrana, outros mecanismos têm se destacado por conferir as sementes tolerância à dessecação. Dentre estes, merece atenção um grupo de proteínas de pequeno peso molecular, 15 a 42 kD, denominadas proteínas resistentes ao calor (Small Heat-Shock Proteins – sHSPs) (Vierling, 1997). Este grupo de proteínas está presente, predominantemente, em plantas e, normalmente, é acumulada em resposta a algum tipo de estresse, como, por exemplo, altas temperaturas e estresse hídrico severo. No entanto, a expressão destas proteínas tem sido

relatada também em tecidos não estressados, como, por exemplo, em sementes em desenvolvimento (Hong et al., 2003).

Segundo Walters et al. (1997), em plantas, as sHSPs podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares, dando origem a, pelo menos, cinco classes de proteínas: citossólicas I, citossólicas II, cloroplastídica, mitocondrial e retículo endoplasmático localizada. A expressão de mRNA e/ou proteínas sHSPs das classes citossólicas I e II tem sido frequentemente encontrada durante os últimos estádios de maturação e o início da tolerância à dessecação em sementes de diferentes espécies, como ervilha (Derocher & Vierling, 1994), trigo (Helm & Abernathy, 1990) e girassol (Coca et al., 1994).

Em embriões de ervilha, as classes citossólicas I e II de sHSPs apareceram durante a síntese de reservas até a fase média de maturação, havendo um elevado aumento com a desidratação das sementes (Derocher & Vierling, 1994). Uma acumulação similar de sHSPs citossólicas classe II foi observada em girassol, porém, a classe I acumulou num período mais tardio da maturação (Coca et al., 1994). Em embriões de *Arabidopsis*, a acumulação de sHSPs citossólicas da classe I iniciou-se na fase média da maturação e apresentou um pico na fase tardia.

Zur Nieden et al. (1995), estudando a acumulação de sHSPs durante o desenvolvimento de sementes de tomate, *Nicotiana glauca*, milho, ervilha e *Vicia faba*, relataram que esta ocorre em diferentes períodos após a antese, porém, sua expressão sempre foi observada antes de uma perceptível dessecação da semente. Segundo Guimarães et al. (2002), as proteínas resistentes ao calor contribuem para a tolerância à dessecação de sementes de café.

Embora uma diversidade de trabalhos associe o aparecimento das sHSPs à aquisição de tolerância à dessecação em sementes, existem relatos do aparecimento destas proteínas em sementes recalcitrantes, que não a toleram. Collada et al. (1997) relataram o isolamento de grande quantidade de proteínas

homologas as smHSPs em cotilédones de *Castanea sativa*, uma espécie recalcitrante. As smHSPs foram encontradas em sementes ortodoxas e associadas à aquisição de tolerância à dessecação (Coca et al., 1994; Derocher & Vierling, 1994). No entanto, segundo os autores, este não deve ser o caso das Cs smHSP I encontradas em sementes de *Castanea sativa*, que parecem estar mais associadas ao alto conteúdo de água das sementes. Concluindo, os autores relatam que a presença de grande quantidade de Cs smHSP I encontrada em sementes de *Castanea sativa* pode não ter sido suficiente para conferir a elas tolerância à dessecação, embora a expressão de smHSPs da classe I em vários mutantes de *Arabidopsis thaliana* (insensíveis ao ABA) tenha sido correlacionada com a tolerância à dessecação. De acordo com Farrant et al. (1993), a habilidade de tolerância à dessecação em sementes é função de um conjunto de sistemas mais complexos, não podendo, dessa maneira, ser atribuída a um único mecanismo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em uma planta de seringueira cultivada na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A árvore de seringueira selecionada, pé-franco, oriunda de sementes do clone RRIM 600, possuía aproximadamente 20 anos de idade. O florescimento da árvore foi acompanhado e os galhos marcados com etiquetas quando se iniciou a senescência das flores femininas, que ocorre 96 horas após a sua abertura. Neste momento foi considerada a fecundação do ovário pelo grão de pólen. Em coleta realizada no decorrer de seis meses e meio de desenvolvimento do fruto (38, 65, 95, 120, 155 e 195 dias após a polinização), aproximadamente 10 frutos (30 sementes) foram coletados em cada coleta e, imediatamente, realizou-se a retirada de sua cápsula, por processo manual. Depois de concluída

esta operação, o lote de fruto e sementes coletado foi dividido em duas amostras. Uma delas foi utilizada para as seguintes avaliações: teor de água, matéria seca e análise morfológica por estereoscopia. A segunda amostra de sementes foi destegumentada e quando possível, quando o embrião encontrava-se formado, separou-se o embrião do endosperma, em seguida os diferentes tecidos do fruto/semente foram armazenados em freezer -80°C para posterior realização das análises onde foram quantificados amido, lipídios, proteínas solúveis, açúcares e proteínas resistentes ao calor, bem como a atividade das enzimas Susy e invertase.

Os teores de amido, proteínas solúveis e açúcares foram dosados separadamente em cada tecido do fruto e semente: pericarpo, endosperma, embrião e tegumento da semente, em coletas realizadas no decorrer dos seis meses e meio de desenvolvimento do fruto (38, 65, 95, 120, 155 e 195 dias após a polinização), sendo o embrião e o tegumento avaliados a partir do quarto mês de desenvolvimento do fruto (quando foi possível sua separação da semente) e a determinação das proteínas resistentes ao calor foram realizados em embriões também a partir do quarto mês de desenvolvimento.

A atividade da sacarose sintase (Susy) e das invertases (ácida e neutra) foi avaliada nos mesmos tecidos e períodos que as biomoléculas citadas anteriormente. Já o teor de lipídeo foi quantificado no pericarpo do fruto e na amêndoa da semente nos mesmos períodos já citados.

3.1 Determinação do teor de água e da matéria seca das sementes

Para cada época de coleta, foi determinado o teor de água das sementes e do pericarpo do fruto, por meio do método de estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas (Brasil, 1992). A porcentagem de matéria seca foi obtida pela relação entre o peso da matéria seca final e o peso inicial (peso fresco).

3.2 Análise morfológica por estereoscopia

A cada época de coleta, as sementes foram destegumentadas e cortadas longitudinalmente e transversalmente em sua parte mediana com o auxílio de um bisturi. Após esse procedimento, os fragmentos da semente foram conduzidos à lupa estereoscópica no qual foram feitas imagens dos diferentes tecidos que compõem a semente, segundo metodologia descrita por Estanislau (2002).

3.3 Extração e quantificação de amido

A extração de amido seguiu o protocolo utilizado por Alencar (2003), utilizando 0,2 g de material oriundo de 10 sementes moídas de cada época de coleta. A quantificação do conteúdo de amido foi realizada pelo método da antrona (Yemm & Coccking, 1954).

3.4 Extração e quantificação de proteínas solúveis, açúcares redutores, açúcares solúveis totais e sacarose

Para a extração das proteínas solúveis, açúcares redutores e solúveis totais, 0,2 g do material oriundo de 10 sementes coletados em cada época foram moídos com nitrogênio líquido e centrifugado com tampão de extração Fosfato de Potássio, 0,1 M, pH 7,0 e em seguida levado ao banho-maria, a 40⁰C, por 30 minutos e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido duas vezes e os sobrenadantes unidos. O teor de proteínas solúveis foi determinado segundo metodologia descrita por Bradford (1976). E os açúcares redutores de acordo com Miller (1959). Os açúcares solúveis totais foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Yemm & Coccking (1954).

As concentrações de sacarose foram determinadas pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, multiplicada pelo fator 0,95, segundo Martim (2003).

3.5 Extração e quantificação de lipídios

A extração e a quantificação de lipídeos das sementes foram realizadas pelo método gravimétrico, sendo realizada na amêndoa da semente e no pericarpo do fruto. Para esta análise o material vegetal foi seco em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ até alcançar peso constante e depois foi moído. Um grama desse material foi colocado em cartuchos de papel-filtro e transferido para o conjunto Soxhlet, por um período de quatro horas. Foi realizada a extração contínua com refluxo, em presença de éter etílico. Após a completa evaporação e recuperação do solvente, as amostras foram pesadas e o teor de lipídeos determinado (Silva, 1990).

3.6 Extração e atividade invertásica

Para extração da invertase (e suas isoformas), uma amostra de 10 sementes coletada em cada época, foi moída em almofariz na presença de nitrogênio líquido, posteriormente, 0,2 g dessa amostra foi pesado e acrescido de 200 μL de tampão acetato de sódio a 1 M pH 4,7; 100 μL de MgCl_2 0,1 M e 400 μL de sacarose 1 M, sendo o restante completado com água até totalizar 2000 μL . Em seguida as amostras foram incubadas em banho-maria, a 37°C durante trinta minutos. Para a extração da invertase neutra usou-se o mesmo procedimento, porém o tampão foi substituído pelo tampão fosfato pH 7,0; 1M.

3.7 Extração e atividade da sacarose sintase (Susy)

Para extração da Susy, 0,1 g de material oriundo de 10 sementes coletadas em cada época e moídas na presença de nitrogênio líquido foi pesado e acrescido de 200 μL de tampão de extração HEPES–KOH 1M pH 6,0; 100 μL de MgCl_2 , 0,1M; 100 μL de UDP 0,1 M e 400 μL de sacarose 1,0 M; sendo restante completado com água até totalizar 2000 μL . O ensaio foi mantido em banho-maria, a 25°C durante 60 minutos. A reação foi iniciada com a adição do

extrato protéico e a atividade da enzima obtida de acordo com a metodologia descrita por Geromel (2001).

3.8 Análise de proteínas resistentes ao calor

Para análise das proteínas resistentes ao calor, 10 eixos embrionários de sementes coletadas aos 120, 155 e 195 dias após a polinização foram moídos na presença de nitrogênio líquido em almofariz. Posteriormente, 100 mg do material foram pesados e colocados em microtubos de 1.500 μL com 270 μL de solução tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF) e agitados em vortex. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 g, por 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi incubado em banho-maria a 85°C, por 15 minutos e novamente centrifugado. Após esta operação, o sobrenadante foi vertido em microtubos e o precipitado, descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos contendo 70 μL de extrato + 40 μL de solução tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46 g de SDS, 20 mg de azul de bromofenol e o volume completado para 20 mL de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 30 μL da amostra (extrato + tampão da amostra) por canaleta no gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 4 horas e os géis foram corados durante 12 horas em Coomassie Blue Brilliant a 0,05%, conforme Alfenas et al. (1991) e descorados em solução de ácido acético 10%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfo-anatômicas durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira

Através da análise morfológica foi possível observar que o fruto da seringueira é uma cápsula tricoca (com três mericarpos) que em corte transversal se apresenta trilobado. As sementes são subovais a elíptico-oblongas e se encontram no interior do fruto, normalmente em número de três, uma em cada mericarpo do fruto.

O pericarpo pode ser analisado estruturalmente mediante a delimitação de regiões, em geral denominadas exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo é constituído apenas pelo tecido epidérmico externo; o endocarpo, somente pelo tecido epidérmico interno ou tecido multiestratificado de natureza parenquimática ou esclerenquimática; e o mesocarpo, por um ou mais tecidos compreendidos entre o exo e o endocarpo. O mesocarpo pode ser de natureza parenquimática, colenquimática ou esclerenquimática; nele estão imersos os feixes vasculares colaterais, bicolaterais ou concêntricos (Souza et al., 2003).

Aos 38 dias após a polinização (DAP), os frutos da seringueira apresentavam em média 1 cm de diâmetro e 0,96 cm de largura. O pericarpo encontrava-se tenro e com coloração verde, sendo que o exocarpo e o endocarpo possuíam coloração verde escuro e o mesocarpo coloração verde claro (Figura 1A). Aparentemente, todos os tecidos que compunham o pericarpo eram capacitados de realizar fotossíntese. Segundo Zamski (1995), em muitas espécies de plantas os tecidos de frutos verdes podem contribuir para a geração de fotoassimilados, os quais serão utilizados na formação do próprio fruto bem como no desenvolvimento das sementes.

As sementes, em número de três, no interior do fruto apresentavam coloração esbranquiçada e algumas manchas avermelhadas, principalmente, próximo ao funículo. O funículo é a região que liga a semente (tecido filial) ao

fruto (tecido maternal), ou seja, é o local onde chega os fotoassimilados provenientes das fontes.

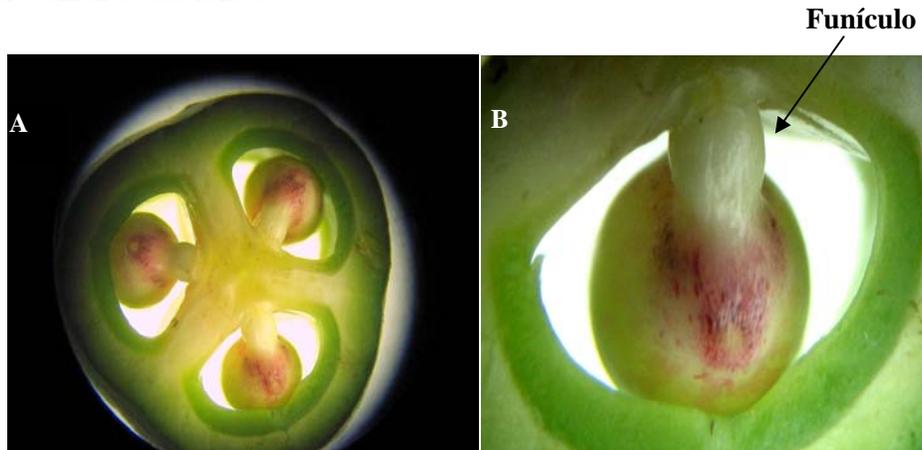


FIGURA 1 Fotografia do fruto da seringueira aos 38 DAP em corte transversal (A). Fotografia da semente de seringueira ligada ao fruto através do funículo, aos 38 dias após a polinização (B).

Aos 65 DAP o fruto já exibia, em média, diâmetro de 3,97 cm e largura de 2,94 cm, apresentava o pericarpo mais lignificado, com ambos os tecidos, exocarpo e endocarpo, apresentando coloração verde escuro, semelhante ao observado aos 38 DAP. Entretanto, o mesocarpo exibia coloração esbranquiçada, sendo, portanto, incapaz de realizar fotossíntese. O fruto aos 65 DAP, diferentemente do observado aos 38 DAP, exsudava látex quando danificado, sugerindo que os vasos laticíferos no fruto são formados a partir dos 38 DAP (Figura 2).

As sementes apresentavam tamanho até duas vezes superiores às aquelas observadas aos 38 DAP (Figura 3). Entretanto, o tamanho das sementes variava bastante entre os frutos e até mesmo dentro de cada fruto.



FIGURA 2 Fotografia de fruto de seringueira aos 65 dias após a polinização.



FIGURA 3 Fotografia das sementes de seringueira aos 65 dias após a polinização. Variação entre frutos.

Também foi verificado que, aos 65 DAP, o interior do endosperma apresentava uma massa de células com aspecto gelatinoso que, provavelmente, dará origem ao embrião. Segundo Secco (2008), entre os cotilédones da semente de seringueira há um espaço vazio, que se apresenta cheio de uma substância nutritiva, líquida, quando a semente, muito nova, está ainda em formação.

Aos 95 DAP, foi observada uma maior lignificação do pericarpo em comparação ao observado aos 65 DAP. Além disso, foi verificado que neste

estádio do desenvolvimento do fruto tanto o mesocarpo quanto o endocarpo encontravam-se com coloração esbranquiçada, diferentemente do exocarpo que ainda possuía coloração verde. O fruto neste estágio apresentava, em média, diâmetro de 5,03 cm e largura de 3,70 cm e quando danificado exsudava maior quantidade de látex em relação ao fruto coletado aos 65 DAP (Figura 4).

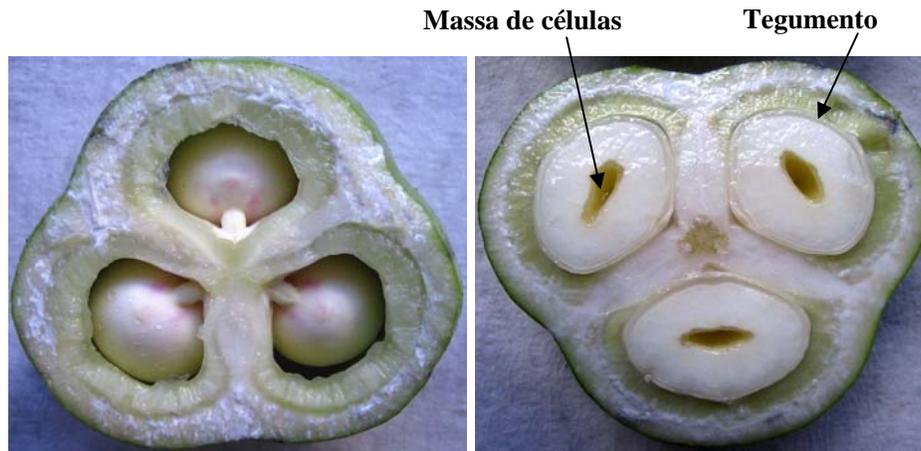


FIGURA 4 Fotografias dos frutos de seringueira, aos 95 dias após a polinização. Fruto em corte transversal (A). Fruto e sementes em corte transversal (B).



FIGURA 5 Fotografias das sementes de seringueira, aos 95 dias após polinização.

As sementes apresentavam tamanho até, duas vezes maior do que aquelas avaliadas aos 65 DAP (Figuras 5). O embrião, aos 95 DAP ainda se encontrava gelatinoso e o tegumento da semente começava a se diferenciar visualmente do endosperma.

Quando os frutos estavam com 120 DAP, ainda apresentavam coloração verde escuro no exocarpo. Entretanto, o endocarpo encontrava-se altamente lenhoso o que lhe conferia elevada resistência a choques mecânico. Nesta data os frutos apresentavam, em média, 5,24 cm de diâmetro e 3,71 cm de largura, valores bastante similares aos observados nos frutos com cerca de 3 meses de desenvolvimento (Figura 6). Tais resultados indicam que o fruto atinge o seu tamanho máximo entre os três e quatro meses de desenvolvimento.

Com relação às sementes, estas também atingiram seu tamanho máximo entre os três e quatro meses de desenvolvimento. Já o tegumento se apresentava mais endurecido quando comparado ao observado nas sementes com 95 DAP (Figura 7).

O endosperma, aos 120 DAP, apresentava uma textura mais maciça em relação ao endosperma das sementes avaliadas nos estádios anteriores, sugerindo que a deposição dos materiais de reservas estava se acentuando por esta data. Tal observação é sustentada pelos resultados apresentados nas Figuras 4, 8, 9 e 13, as quais mostram as variações nos teores de amido, lipídeos e atividades enzimáticas no endosperma das sementes de seringueira durante o desenvolvimento, respectivamente.

Quanto ao embrião, aos 120 DAP este se encontrava em plena formação e semelhante ao observado no endosperma apresentava uma textura mais maciça em comparação às observações anteriores. Nesta data, o embrião exibia cerca da metade do tamanho da semente e já era possível identificar o eixo embrionário e os cotilédones.

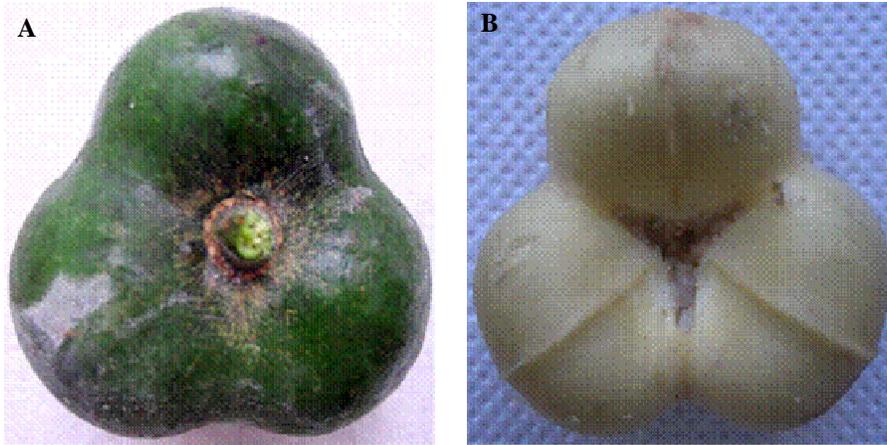


FIGURA 6 Fotografias de frutos de seringueira, aos 120 dias após a polinização. Fruto com pericarpo completo (A). Endocarpo recobrimdo as sementes. (B).



FIGURA 7 Fotografias de sementes de seringueira, aos 120 dias após polinização.

Aos 155 DAP os frutos apresentavam, em média, 5,32 cm de diâmetro e 3,73 cm de largura, tamanho similar aos frutos com 120 DAP. O exocarpo, ainda exibia uma coloração verde e o endocarpo uma elevada resistência.

As sementes apresentavam o tegumento, que envolve e protege a amêndoa, mais endurecido e com uma coloração amarronzada, característica do

tegumento de sementes completamente desenvolvidas (Figura 8). Entretanto, o tegumento ainda não apresentava o brilho intenso e as manchas pintalgadas bem formadas, comum em sementes maduras.



FIGURA 8 Fotografia das sementes de seringueira, aos 155 dias após a polinização.

A amêndoa da semente, aos 155 DAP, se encontrava mais consistente e envolvida por uma película prateada, provavelmente o espermoderma (Figura 9A). Na semente de café madura, o perisperma fica restrito a 2 ou 3 camadas de células, conhecida como película prateada (Cavalari, 2004).

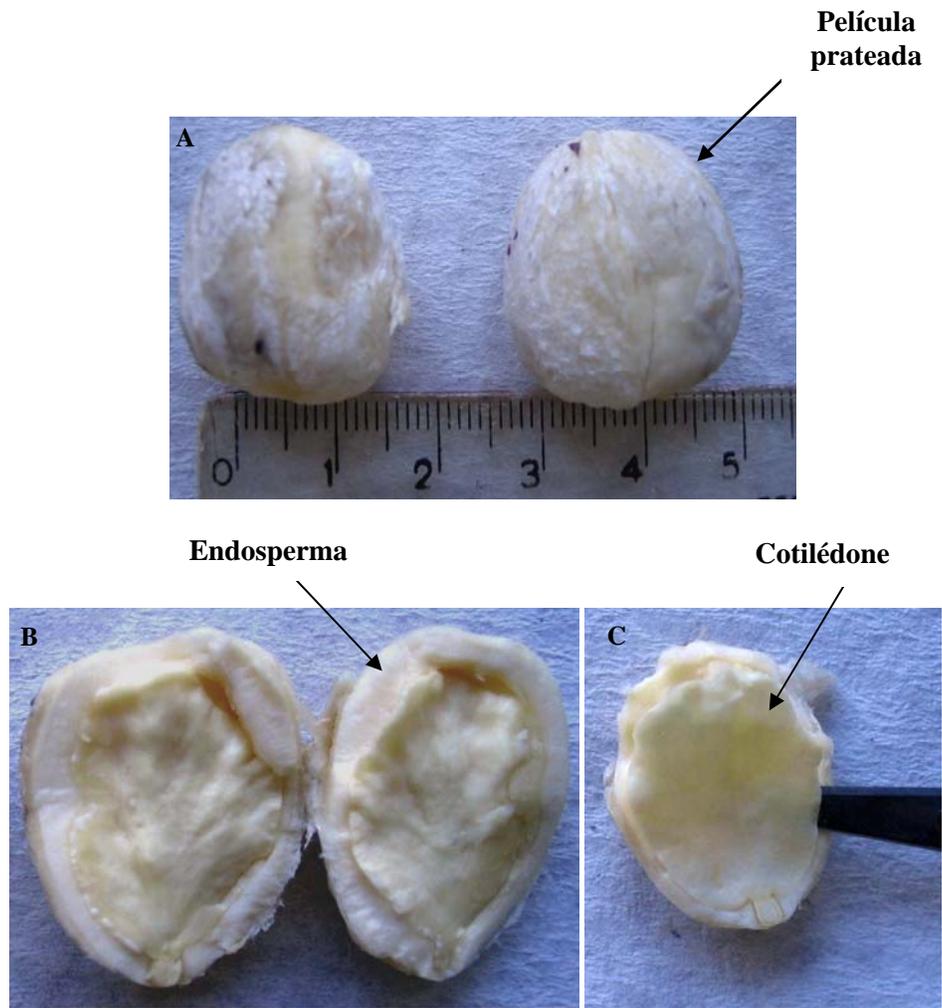


FIGURA 9 Fotografias de sementes de seringueira, aos 155 dias após a polinização. Amêndoas das sementes de seringueira (A); Amêndoa da semente de seringueira cortada longitudinalmente (B); Embrião da semente de seringueira (C).

Aos 155 DAP o endosperma aparentava estar completamente formado, com formato grosso e oleoso (Figura 9 A e B). No seu interior encontravam-se os dois cotilédones plano-foliáceos, dispostos no sentido do plano que passa pela

coluna placentar (Secco, 2008), bem como o eixo embrionário. Entretanto, os cotilédones não aparentavam estar completamente desenvolvidos.

Aos 195 DAP, período em que ocorreu a deiscência dos frutos e a dispersão das sementes foi verificado o endocarpo altamente lenhoso e o mesocarpo bastante fibroso (Figura 10). O exocarpo, em questão de dias perde sua coloração verde e se torna amarronzado, indicando de que a deiscência dos frutos está próxima.

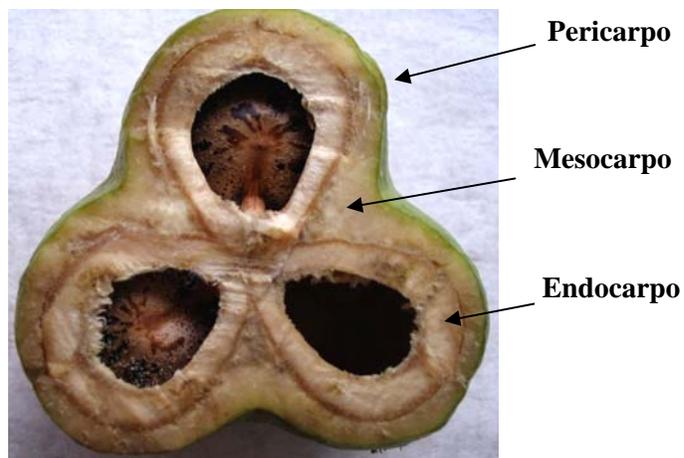


FIGURA 10 Fotografia do fruto da seringueira. A foto foi tirada cerca de uma semana antes da deiscência dos frutos.

O tegumento, aos 195 DAP, apresentava a testa crustácea, com a superfície externa lisa de cor marrom e brilhante e com numerosas manchas na parte dorsal (Figura 11 A) e com pouca ou quase nenhuma na parte ventral, cujo padrão de desenhos pode servir para distinguir variedades e clones da mesma espécie (Gonçalves & Marques, 2008). Segundo Webster & Paardekooper (1989), além do clone, é possível identificar o parental feminino de uma semente através de suas manchas e da sua forma. Segundo os autores, a testa da semente é formada pelo tecido maternal e de forma determinada pela pressão exercida pela cápsula do fruto durante seu desenvolvimento. Essas características

proporcionam os meios reais de identificação de clones e do parental feminino em sementes clonais de polinização aberta (Gonçalves & Marques, 2008).

Quanto ao embrião, aos 195 DAP, este estava completamente desenvolvido, com os cotilédones plano-foliáceos ocupando toda a superfície do endosperma (Figura 11 B).



FIGURA 11 Fotografias das sementes de seringueira (A) e da amêndoa da seringueira em corte longitudinal (B), aos 195 DAP.

4.2 Teor de água durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira

Aos 38 DAP as sementes e o pericarpo dos frutos apresentavam valores muito próximos de umidade, aproximadamente 85 % (Figura 12). Aos 65 DAP houve um acréscimo na umidade das sementes e do pericarpo chegando a valores próximos de 90 %. Nas sementes, o valor de umidade continuou aumentando até 95 DAP, declinando a partir daí até atingir o grau de umidade de 45 % aos 195 DAP. Por outro lado, no pericarpo a umidade declinou a partir dos 65 DAP, sendo que até os 155 DAP essa redução foi gradual e a partir daí o declínio na umidade foi súbito. Estes resultados corroboram com os observados por Li et al. (1999) que avaliando as alterações morfológicas e fisiológicas durante o desenvolvimento do fruto e das sementes de *Rhus aromatica* e *Rhus glabra*, verificaram que o grau de umidade das sementes da espécie *R. aromática* aumentou de 87,8% para 92,26% nas primeiras quatro semanas após

a antese e os da espécie *R. glabra* aumentou de 71,3% para 84,69% nas primeiras 3 semanas após a antese. Em ambas as espécies, depois de atingido o máximo teor de água foi observado um declínio gradual na umidade das sementes, sendo que na última semana que precedeu a maturidade fisiológica foi verificado um decréscimo súbito na umidade das sementes de ambas as espécies.

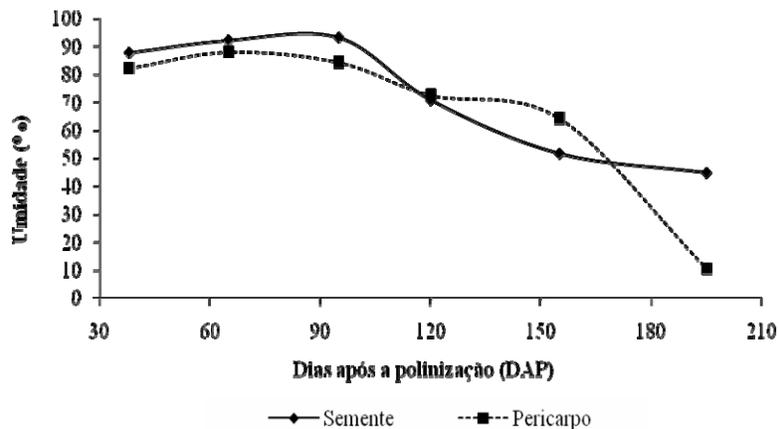


FIGURA 12 Médias, em porcentagem, do grau de umidade das sementes e do pericarpo do fruto de seringueira durante o desenvolvimento.

4.3 Porcentagem de matéria seca durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira

A porcentagem de matéria seca reduziu nos primeiros 95 DAP tanto na semente quanto no pericarpo do fruto (Figura 13). Cavalari (2004), também verificou queda inicial na porcentagem de matéria seca de frutos de café em desenvolvimento e, atribuiu isto, ao acúmulo de água no fruto durante o crescimento do perisperma.

Na amêndoa da seringueira com 155 DAP foi verificada a presença de uma película prateada recobrando o endosperma, provavelmente, trata-se do perisperma, o qual é um tecido que se desenvolve de partes da nucela, quando esta não é completamente absorvida durante a formação do embrião (Marcos Filho, 2005). Dessa maneira, a queda na porcentagem de matéria seca (Figura

13) e o aumento da umidade (Figura 12) nos estádios iniciais de desenvolvimento das sementes de seringueira podem ser devido ao aumento de volume das células do perisperma ou do endosperma em formação.

No intervalo de tempo entre 95 DAP a 155 DAP ocorreu um incremento gradual na porcentagem de matéria seca das sementes. Após este período, houve uma estabilização neste valor até o final da maturação das sementes. Por outro lado, no pericarpo, houve um pequeno incremento na porcentagem de matéria seca a partir de 95 DAP, o qual se estendeu até os 155 DAP. Após este período, houve um aumento brusco na porcentagem de matéria seca deste tecido, o qual coincide com a dessecação do fruto que está se preparando para a deiscência.

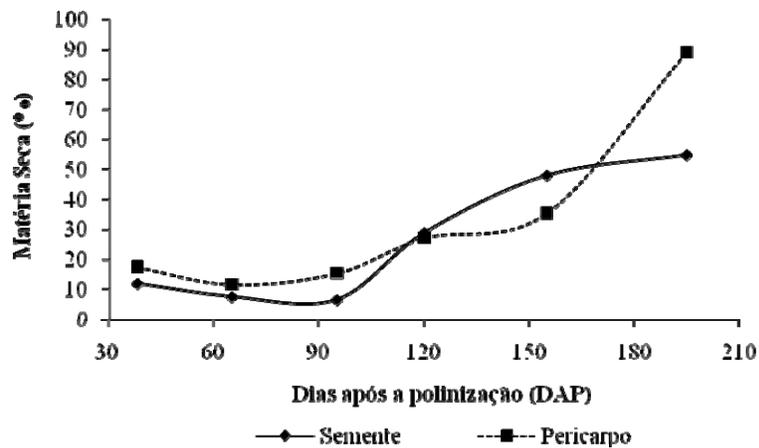


FIGURA 13 Médias, em porcentagem, da matéria seca das sementes e do pericarpo do fruto de seringueira durante o desenvolvimento.

4.4 Avaliação das características bioquímicas durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira

4.4.1 Teor de amido

Os maiores teores de amido no endosperma das sementes de seringueira foram encontrados no final do amadurecimento do fruto e conseqüente maturidade fisiológica das sementes. O acúmulo de amido no endosperma ocorreu gradativamente com o decorrer do desenvolvimento do fruto/sememente, variando de 2,0 mg.g⁻¹ de MF, aos 38 DAP para 8,93 mg.g⁻¹ de MF aos 195 DAP (Figura 14). Este resultado corrobora com os observados por Amaral et al. (2001), em sementes de *Bixa orellana*, os quais observaram pequenos grânulos de amido com forma elíptica e em reduzida quantidade, já, nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente. Entretanto, a partir do V estágio, os grãos se tornaram maiores, com formato mais arredondado, estando presente em grande número até o final do desenvolvimento, estágio VII.

O teor de amido observado no endosperma das sementes, aos 195 DAP, encontra-se entre os valores observados por Paula (1997) e Alencar (2003). Segundo Marcos Filho (2005), alguns fatores como genótipo, condições climáticas, idade das sementes, fertilidade do solo e idade da planta mãe, podem afetar a composição química das sementes, o que pode justificar tal variação entre os estudos.

No pericarpo, para o teor de amido, foi observado comportamento contrário ao observado no endosperma, onde ocorreu um acúmulo máximo de amido aos 65 DAP e, posterior declínio, que se manteve até o final do desenvolvimento do fruto/sememente.

Em várias espécies, como soja, ervilha e feijão, a sacarose produzida, via fotossíntese, em folhas e vagens, pode ser armazenada temporariamente como amido, nas vagens, antes da remobilização e transferência para as sementes (Marcos Filho, 2005). Pode ser que na seringueira ocorra algo

semelhante, ou seja, a sacarose oriunda de folhas e até mesmo carboidratos produzidos no próprio fruto (pericarpo), cuja coloração é verde nos estádios iniciais de desenvolvimento (Figura 1), sejam armazenados na forma de amido em amiloplastos presentes neste tecido. Por outro lado, nos estádios mais avançado do desenvolvimento do fruto/semente, quando endosperma e embrião encontram-se em plena formação é provável que o amido armazenado no pericarpo da semente, seja clivado, transformado em sacarose e, posteriormente, transportado para a semente em formação, visando o fornecimento de esqueletos de carbono para a síntese de proteínas e lipídios ou até mesmo servir como substrato para a respiração.

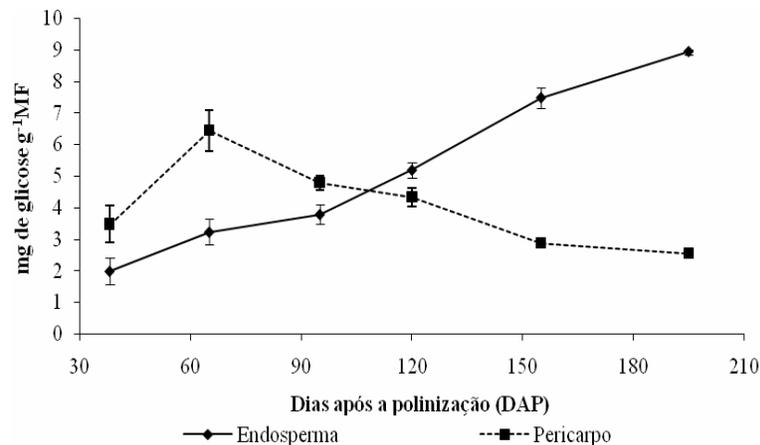


FIGURA 14 Estimativa do teor de amido no endosperma das sementes e no pericarpo de frutos de seringueira em função do estágio de desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

Tanto no embrião como no tegumento da semente o teor de amido foi quantificado a partir de 120 DAP, período em que foi possível separar estes tecidos dos demais presentes na semente.

No embrião aos 120 DAP, havia aproximadamente 2 mg.g^{-1} de MF de amido, este valor elevou-se para cerca de $4,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de MF e $5,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de MF aos 155 DAP e 195 DAP, respectivamente (Figura 15).

Por outro lado, no tegumento da semente o teor de amido permaneceu baixo e constante até o final do desenvolvimento da semente.

Sabe-se que o amido não é o principal componente de reserva das sementes de seringueira, entretanto, Alencar (2003) e Bonome (2006) encontraram valores expressivos dessa macromolécula em endosperma de sementes de seringueira, 5 % e 7 % respectivamente, indicando que o amido possui um papel importante na geração de açúcares menores para o início da germinação da semente, provavelmente, para o catabolismo na respiração.

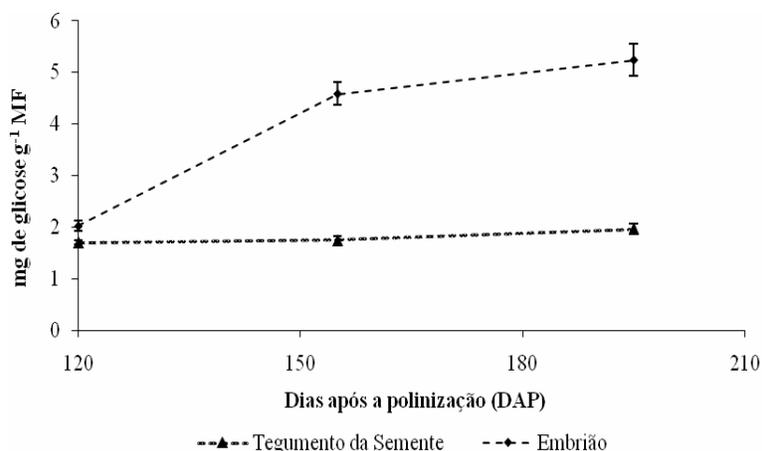


FIGURA 15 Estimativa do teor de amido no embrião e no tegumento das semente de seringueira em função do estágio de desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

4.4.2 Teor de proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis no endosperma aumentou com o decorrer do desenvolvimento da semente, de aproximadamente 5 mg.g^{-1} de MF aos 38 DAP para 18 mg.g^{-1} de MF aos 195 DAP, período em que ocorreu a dispersão das sementes (Figura 16).

O incremento no teor protéico no endosperma das sementes, nos primeiros 95 DAP, foi menos expressivo do que o observado a partir desta data. Amaral et al. (2001) também verificaram um acréscimo mais expressivo no teor protéico de sementes de *Bixa orellana*, quando estas se encontravam em estádios mais avançados do desenvolvimento (entre o 2° e 4° estágio). Em sementes de *Vicia faba*, Weber et al. (1997) relatam que o incremento no teor protéico das sementes ocorre somente a partir do final do 4° estágio de desenvolvimento, atingindo valor máximo no último estágio (7°). Segundo os autores, o acúmulo de amido ocorre mais tardiamente, a partir do final do 5° estágio de desenvolvimento.

Bitencourt et al. (1990) também observaram elevação no teor protéico com o decorrer do desenvolvimento de sementes de girassol.

No pericarpo, a semelhança do observado para o teor de amido, foi verificada um acúmulo máximo de proteínas solúveis aos 65 DAP e decréscimo gradual neste valor com o decorrer do desenvolvimento do fruto/sememente. Possivelmente, a redução no teor de proteínas solúveis neste tecido esteja relacionada ao fornecimento de aminoácidos para a formação do endosperma e do embrião das sementes.

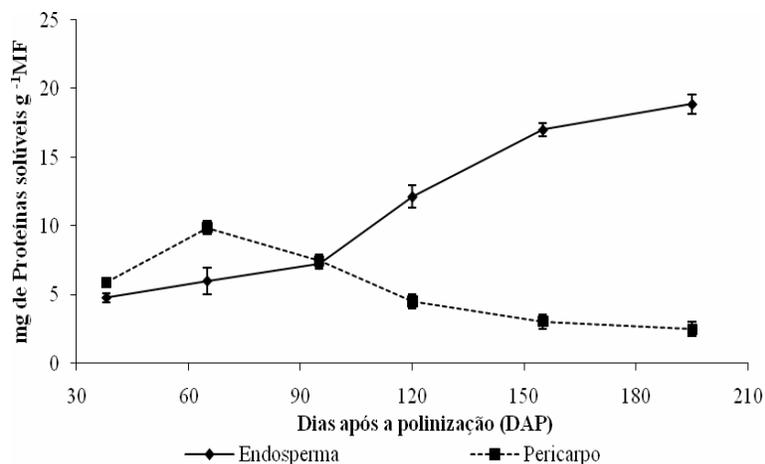


FIGURA 16 Estimativa do teor de proteínas solúveis no endosperma das sementes e no pericarpo do fruto de seringueira em função do estágio de desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

No embrião, assim como no endosperma, os maiores teores de proteínas solúveis ocorreram em sementes mais desenvolvidas, quando atingido o ponto de maturidade fisiológica (Figura 17). Diversos trabalhos, como o de Alves et al. (2005) com sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. e o de Ragagnin & Dias (1987) com sementes de *Tabebuia chrysotricha*, relacionam o máximo acúmulo de matéria seca com a aquisição da maturidade fisiológica das sementes.

No tegumento ocorreu comportamento contrário ao encontrado no endosperma e embrião das sementes, onde o teor de proteínas solúveis tendeu a decrescer com a aproximação da maturidade fisiológica das sementes (Figura 17).

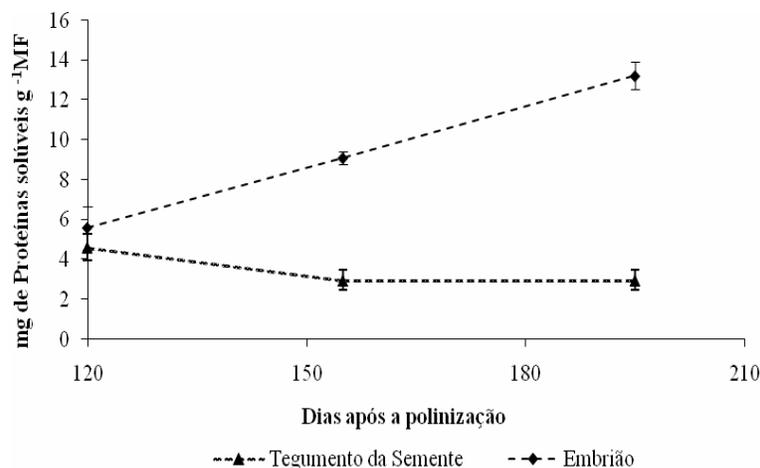


FIGURA 17 Estimativa do teor de proteínas solúveis no embrião e no tegumento das sementes de seringueira em função do estágio de desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

4.4.3 Teor de lipídeos

Na amêndoa das sementes de seringueira ocorreu um incremento no teor de lipídeos ao longo do seu desenvolvimento, principalmente a partir dos 65 DAP, apresentando aos 195 DAP um teor de 40% de lipídeos. Segundo Aigbodion (1994), estas sementes contêm uma quantidade média de 43% de óleo, podendo variar de 38 até 46%.

O acúmulo deste composto na amêndoa das sementes foi crescente desde as primeiras fases de desenvolvimento até a semente se encontrar madura e superior aos valores encontrados no pericarpo do fruto (Figura 18).

As sementes das espécies de Euphorbiaceae possuem endosperma farto, carnoso e rico em reservas oleaginosas.

O pericarpo apresentou um reduzido incremento do teor de lipídio até os 95 DAP, após este período este teor declinou e ao fim das avaliações encontrava-se constante. Os valores de lipídeos observados apresentados no

pericarpo são bastantes inferiores àqueles observados na amêndoa. O fato é esperado uma vez que as sementes de seringueira armazenam seus compostos no endosperma, tendo o pericarpo função de proteção.

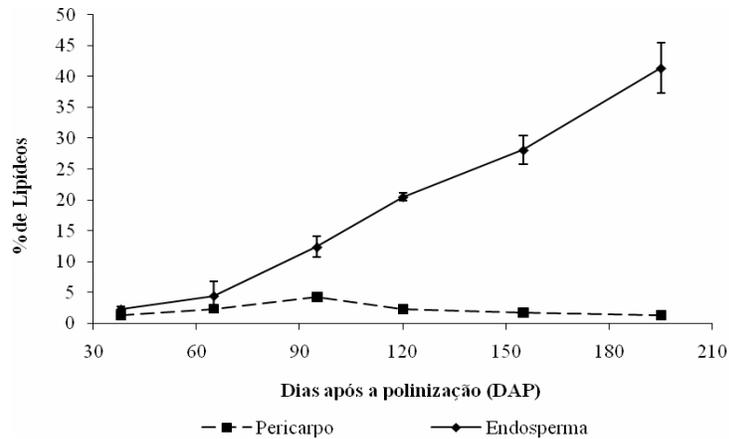


FIGURA 18 Estimativa do teor de lipídeos no pericarpo do fruto e na amêndoa das sementes de seringueira em função do estágio de desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

Segundo Bradford (2002), o início do desenvolvimento das sementes está relacionado com o crescimento destas através da divisão celular, sendo que o acúmulo de reservas ocorre posteriormente, porém, no presente estudo o acúmulo de lipídeos em sementes de seringueira (seu maior composto de reserva), não apresentou este padrão, uma vez que estas apresentaram um acúmulo deste composto desde as primeiras fases de seu desenvolvimento, este fato também foi observado por Tomlinson et al. (2004), ao avaliar sementes de fumo.

4.4.4 Teores de açúcares

4.4.4.1 Endosperma

As alterações nos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e de sacarose em endosperma de sementes de seringueira durante o desenvolvimento são observadas por meio da Figura 19.

O teor de açúcares solúveis totais (AST), aumentou gradualmente durante todo o desenvolvimento da semente, atingindo valor próximo a 60 mg/g MF⁻¹ quando as sementes foram dispersas da planta mãe. Bonome (2006) encontrou valor de AST em endosperma de sementes de seringueira recém colhidas próximo ao observado no presente trabalho, quando levado em consideração o grau de umidade das sementes.

Quanto ao teor de açúcares redutores (AR), este aumentou até os 95 DAP e depois decresceu até o final do desenvolvimento da semente. Já o teor de sacarose permaneceu estável nos primeiros 3 meses de desenvolvimento das sementes e aumentou subitamente a partir desse período, atingindo valor próximo a 45 mg g MF⁻¹ no endosperma das sementes dispersas da planta mãe.

A sacarose exerce um papel central no crescimento e desenvolvimento de plantas e sementes, como uma forma primária de transporte de carbono e energia na maioria das espécies vegetais e também como um regulador da expressão de genes (Koch, 2004). Órgãos drenos não fotossintetizantes como, por exemplo, sementes em formação, são altamente dependentes de sua importação. A hidrólise da sacarose é o primeiro passo em direção ao metabolismo e a síntese de produtos de armazenamento; assim, a clivagem da sacarose em hexose é vital a todas as plantas, não somente para a alocação de carbono, mas também para a indução de sinais em importantes estruturas (Koch, 2004).

Assim é possível que o aumento no teor de AR nos primeiros meses de desenvolvimento das sementes de seringueira seja em decorrência da maior

clivagem de sacarose, pelas enzimas sacarolíticas, cuja concentração permaneceu estável até os 95 DAP (Figura 23). A partir de 95 DAP o teor de sacarose começou a subir abruptamente no endosperma das sementes e o teor de AR começou a decrescer. Este resultado sugere que o aumento de AR no endosperma das sementes nos meses iniciais de desenvolvimento é resultante da clivagem da sacarose. Diversos trabalhos evidenciam uma maior concentração de hexoses nos estádios iniciais de desenvolvimento das sementes e a correlacionam com o favorecimento da divisão celular, enquanto que o incremento no teor de sacarose é observado normalmente mais tardiamente e é correlacionado com o favorecimento da diferenciação e maturação das sementes (Winter & Huber, 2000; Baud et al., 2002; Borisjuk et al., 2002, 2003). A inversão entre os teores de AR e de sacarose com o desenvolvimento das sementes também foi observado em *Vicia* spp por (Wobus & Weber, 1999a).

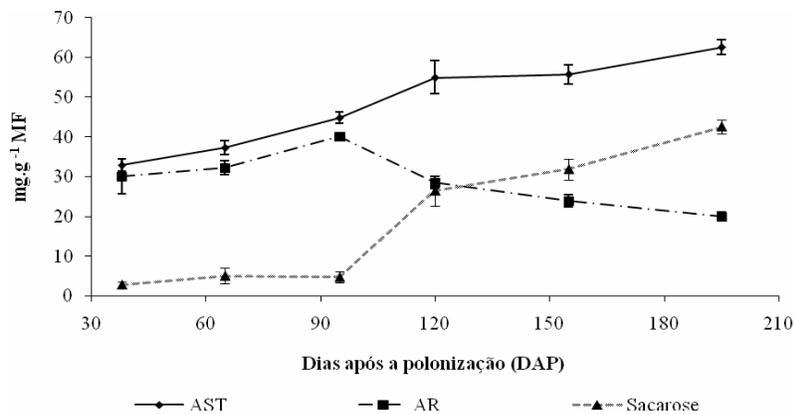


FIGURA 19 Estimativa do teor de açúcares (AST, AR e Sacarose) em endosperma de semente de seringueira em função do desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

Diversos autores associam esta mudança no conteúdo de açúcares, durante o desenvolvimento das sementes, à mudança na atividade de enzimas, como as invertases (ácida e neutra) e a sacarose sintase (SuSy) (Weber et al., 1996; Winter & Huber, 2000). Segundo Borisjuk et al. (1998) a expressão de genes para as invertases ocorre predominantemente durante os primeiros estádios, enquanto, os da SuSy ocorrem mais nas últimas etapas do desenvolvimento. Alta atividade da invertase e uma alta razão hexose/sacarose têm sido encontradas nos estádios iniciais de desenvolvimento de diversos cereais como milho (Cheng & Chourey, 1999), arroz (Hirose et al., 2002) e cevada (Winter & Huber, 2000).

Geromel et al. (2006) afirma que, em órgãos dreno da maioria das espécies de plantas, as diferenças entre as concentrações de açúcares são controladas por enzimas que degradam e (re) sintetizam a sacarose como as invertases e a SuSy, respectivamente.

4.4.4.2 Embrião

No embrião ocorreu uma tendência de aumento nos teores de AR, AST e sacarose com o avanço do desenvolvimento das sementes (Figura 20). Este resultado difere dos observados por Weber et al. (1995), os quais observaram aumento nos teores de açúcares redutores, em cotilédones de sementes de *Vicia faba*, até os 22 dias após a fertilização, decaindo severamente após este período até o final do desenvolvimento das sementes. Wobus & Weber (1999b) em uma revisão sobre a atuação de açúcares como sinais moleculares em sementes em desenvolvimento relatou que diversas pesquisas têm evidenciado altas concentrações de AR e baixa concentração de sacarose no início do desenvolvimento do embrião das sementes, porém, numa fase mais tardia do desenvolvimento há uma inversão no teor destes açúcares, onde a concentração de sacarose aumenta e a de AR decresce. Estes resultados diferem do observado

no embrião das sementes do presente trabalho (Figura 20), entretanto, corrobora com os observados no endosperma das sementes (Figura 19).

Durante todo o período de desenvolvimento da semente houve uma superioridade na concentração de AST sobre a de AR e de sacarose, sendo este último, o açúcar encontrado em menor quantidade no embrião.

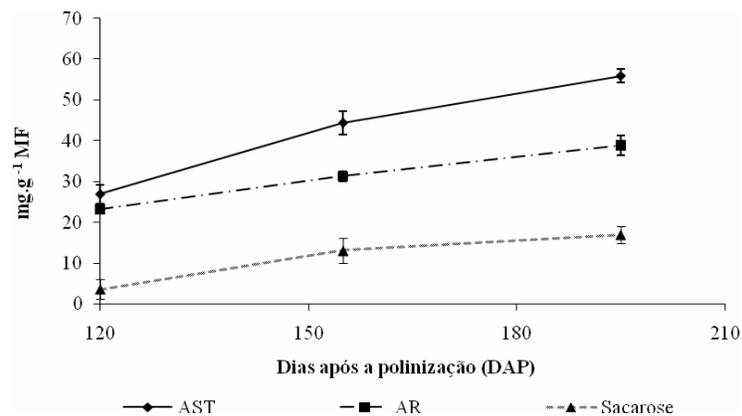


FIGURA 20 Estimativa do teor de açúcares solúveis totais, redutores e de sacarose em embrião de semente de seringueira em função do desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

4.4.4.3 Tegumento da semente

No tegumento, tanto o teor de AST quanto o de AR decresceram com o avanço do desenvolvimento do fruto/semente. Por outro lado, o teor de sacarose permaneceu baixo e estável neste tecido até o final da maturação do fruto/semente (Figura 21).

Sabe-se que o tegumento das sementes é proveniente do óvulo, ou seja, do tecido maternal e, portanto, não possui ligação com o endosperma e com o embrião das sementes, cujos tecidos são provenientes da união de um dos gametas masculinos do grão de pólen aos dois núcleos polares do saco embrionário (fusão tripla) e da união do outro núcleo reprodutivo do grão de

pólen à oosfera, respectivamente. Estes dois tecidos (embrião e endosperma) são chamados de tecido filial.

O desenvolvimento da semente é dependente de fotoassimilados oriundos de tecidos fonte. Certamente, as folhas são as fontes primárias de fotoassimilados, mas tecidos de frutos verdes também podem contribuir substancialmente em algumas plantas (Zamski, 1995). Todo o fotoassimilado proveniente dos tecidos fonte com destino as sementes chegam, através do floema, primeiramente no tegumento que é um tecido maternal. Como o tecido maternal não tem ligação com o embrião e/ou endosperma o fotoassimilado é transportado para os tecidos filiais por uma rota denominada apoplástica, ou seja, via espaço extracelular.

Dessa maneira, é possível que a alta concentração de AR no tegumento da semente aos 120 DAP, seja em decorrência da clivagem da sacarose - por uma invertase ácida - que está sendo descarregada pelo floema neste tecido. Weber et al. (1995) também encontraram uma alta atividade de invertase ácida no tegumento de sementes de *Vicia faba*. Este fato justifica o baixo teor de sacarose no tegumento ao longo do desenvolvimento da semente.

Por outro lado, a redução no teor de AR no tegumento, após os 120 DAP, sugere que esteja ocorrendo um transporte deste açúcar para o embrião (Figura 20), o qual servirá como substrato para a respiração e como esqueleto de carbono para a produção de proteínas e lipídios.

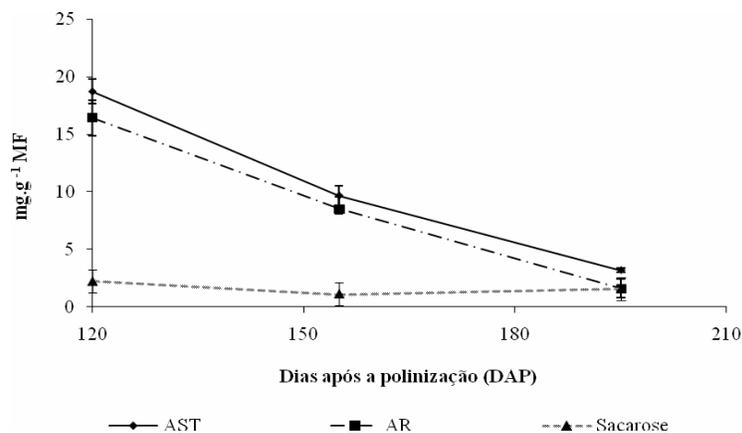


FIGURA 21 Estimativa do teor de açúcares solúveis totais, redutores e de sacarose no tegumento de semente de seringueira em função do desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

4.4.4.4 Pericarpo

No pericarpo, os teores de AST e AR aumentaram até os 95 DAP e depois decresceram gradualmente com o avanço do desenvolvimento do fruto/semente. Aos 195 DAP, período em que ocorreu a dispersão das sementes, não houve diferença estatística entre os teores de AST e de AR. A concentração de sacarose elevou-se ligeiramente até os 95 DAP, reduzindo drasticamente após este período até atingir valor próximo de zero na época de dispersão das sementes (Figura 22).

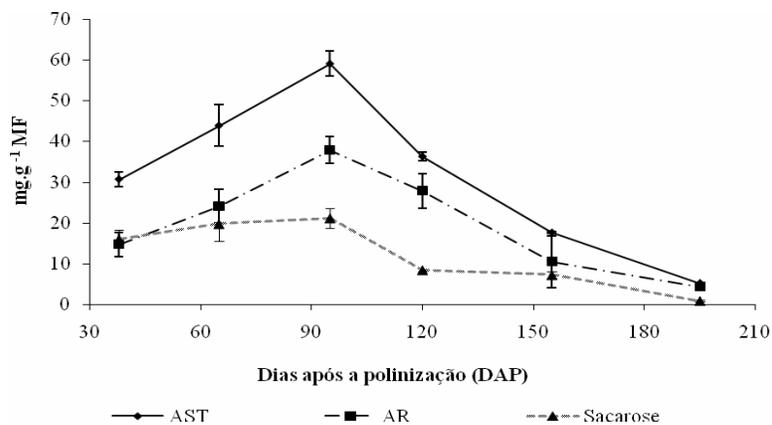


FIGURA 22 Estimativa do teor de açúcares solúveis totais, redutores e sacarose no pericarpo de fruto de seringueira em função do desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

Provavelmente, a maior concentração de AST e AR no pericarpo dos frutos, nos 3 meses iniciais do desenvolvimento, deva-se a maior atividade fotossintética deste tecido neste período. Com a maturação do fruto, o aparato fotossintético do pericarpo pode ter perdido a sua funcionalidade e os açúcares acumulados neste tecido translocados para o tegumento da semente, os quais posteriormente, seriam direcionados para o endosperma e o embrião em formação. Este fato justificaria o declínio no teor destes açúcares no tegumento após os 95 DAP.

O aumento nos teores de AR do pericarpo, nos estádios iniciais do desenvolvimento dos frutos, pode ainda estar relacionado com a necessidade hídrica do fruto, pois, o AR diminui o potencial osmótico do tecido, garantindo o suprimento de água. Rogers et al. (1999) e Cavalari (2004), trabalhando com sementes em desenvolvimento de café encontraram maiores valores de AR no perisperma das sementes em comparação aos outros tecidos e, associaram isto, à necessidade do perisperma acumular água para depois repassá-la ao endosperma.

4.4.5 Atividade enzimática durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira

Nas Figuras 23, 24, 25, 26 estão apresentados os resultados da atividade das enzimas Invertase Ácida (IA), Invertase Neutra (IN) e Susy nos diferentes tecidos do fruto/semente (embrião, endosperma, tegumento e pericarpo) em função do desenvolvimento.

4.4.5.1 Endosperma

No endosperma das sementes houve um alto incremento na atividade da IA nos primeiros 95 DAP (Figura 23). Aos 120 DAP ocorreu um decréscimo abrupto na atividade desta enzima atingindo ao final do desenvolvimento da semente valor inferior ao observado aos 38 DAP. Por outro lado, a atividade da Susy foi estável até os 95 DAP, apresentando incremento a partir desta data até o final do desenvolvimento das sementes. Próximo dos 100 DAP houve uma inversão na atividade das enzimas IA e Susy, a qual permanece até a maturação das sementes. Alguns trabalhos evidenciam uma alta atividade da invertase e uma alta razão hexose/sacarose nos estádios iniciais do desenvolvimento de sementes de cereais, como arroz (Hirose et al., 2002) e cevada (Winter & Huber, 2000). Tais resultados corroboram com os observados no presente trabalho (Figuras 19 e 23).

Segundo Hill et al. (2003) mediante a disponibilização de hexoses, proveniente da hidrólise da sacarose, principalmente, pela ação de uma invertase ácida de parede celular, inicia-se a divisão celular e a expansão do embrião até o ponto em que este começa a pressionar as células do endosperma. Neste momento do desenvolvimento da semente a atividade da Susy começa a aumentar e a da invertase começa a diminuir e, como consequência, o nível de hexose cai e a sacarose torna-se o principal açúcar do endosperma, induzindo uma mudança na expressão de genes a favor da acumulação de produtos de armazenamento. Esta mudança na concentração de hexose para sacarose no

endosperma durante o desenvolvimento de sementes também foi observado em ervilha por Borisjuk et al. (1998). Esta alteração na concentração de açúcares também foi observada no endosperma de sementes de seringueira em desenvolvimento (Figura 19).

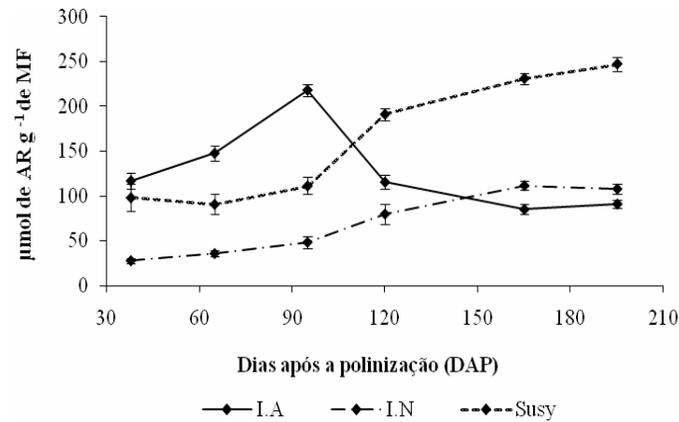


FIGURA 23 Atividade da invertase ácida (I.A), neutra (I.N) e Susy em endosperma de sementes de seringueira em função do desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho (Figuras 19 e 23) sugerem que em sementes de seringueira, a mudança da fase de divisão e expansão celular para o de armazenamento de materiais de reserva e maturação inicia-se ao redor dos 100 DAP.

A IN apresentou um pequeno incremento em sua atividade até os 95 DAP, a partir desta data, observa-se uma atividade mais expressiva desta enzima, superando a atividade da IA no final do desenvolvimento da semente. Alta razão na atividade da invertase neutra/ácida tem sido evidenciada durante a maturação de diversas sementes de leguminosas (Cooper & Greenshields, 1961; Pridham & Walter, 1964).

4.4.5.2 Embrião

No embrião, a atividade enzimática foi avaliada a partir dos 120 DAP, nesta data houve uma alta atividade da IA, a qual tende a decrescer com o avanço do desenvolvimento da semente/embrião (Figura 24). Segundo Weber et al. (1997), em estudos com *Vicia faba*, a atividade da IA é alta durante as primeiras fases de desenvolvimento da semente resultando em alta relação hexose/sacarose. Segundo o autor esta elevada relação favorece a divisão e expansão celular. Sturm & Tang (1999) relatam que a clivagem de sacarose em glicose e frutose pode aumentar significativamente a pressão osmótica das células, sugerindo uma possível função das invertases no alongamento celular e crescimento de plantas, por isso está relacionada com tecidos jovens.

Por outro lado, a atividade da IN aos 120 DAP é relativamente baixa em comparação a observada para a IA, porém, sua atividade, diferentemente do verificado para a IA eleva-se com a maturação das sementes, tornando-se superior a da IA aos 155 e 195 DAP. Elevada razão na atividade da invertase neutra/ácida também foi evidenciada no final do desenvolvimento de sementes de *Phaseolus vulgaris* (Cooper & Greenshields, 1961) e de *Vicia faba* (Pridham & Walter, 1964). Segundo Déjardin et al. (1997), a passagem do estágio de expansão do embrião para o de armazenamento de reservas é acompanhada por uma queda na atividade da invertase ácida, que permanece muito baixa, tanto no tegumento como no embrião.

A atividade da Susy, no embrião, foi mais baixa do que a observada para IA e neutra em todas as épocas de avaliação (Figura 24). Ocorreu ainda uma tendência de queda na atividade desta enzima com a maturação das sementes. Este resultado difere dos observados por Hill et al. (2003), os quais verificaram acréscimo na atividade da Susy, no embrião de *Brassica napus*, com o avanço do desenvolvimento das sementes. De acordo com Kock (2004) a atividade da

Susy é mais expressiva durante a fase de armazenamento de materiais de reserva e de maturação do tecido vegetal.

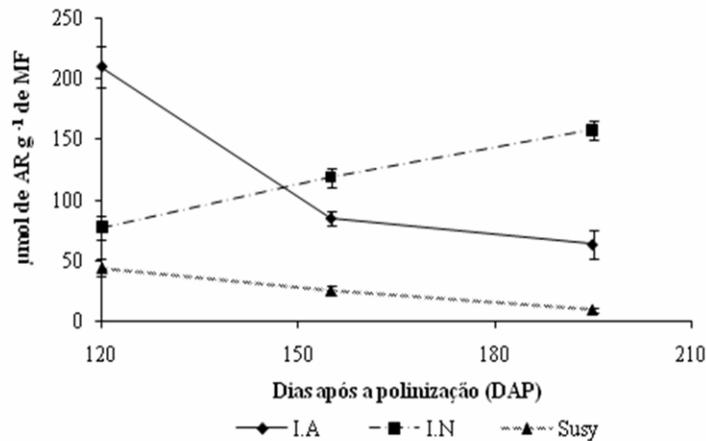


FIGURA 24 Atividade da invertase ácida (I.A), neutra (I.N) e Susy no embrião de semente de seringueira em função do desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

Uma possível explicação para a baixa atividade da Susy no embrião das sementes de seringueira é que neste tecido a reduzida atividade desta enzima seja compensada pela alta atividade da IN, uma vez que, ambas as enzimas atuam sobre o mesmo substrato, a sacarose, sob o mesmo pH, aproximadamente 7,0 (Déjardin et al., 1997) e estão localizadas na mesma região da célula, o citoplasma (Taiz & Zeiger, 2004).

4.4.5.3 Tegumento da semente

Como no embrião, a atividade enzimática no tegumento foi avaliada a partir dos 120 DAP. A atividade das três enzimas avaliadas decresceu gradualmente com o avanço do desenvolvimento do fruto/semente, exceção feita para a IA que reduziu sua atividade entre os períodos de 120 e 155 DAP e,

posteriormente, tendeu a aumentar no final da maturação do fruto/semente (Figura 25).

A atividade da IA aos 120 DAP foi quase duas vezes superior a atividade da IN e da Susy, estas duas últimas enzimas por sua vez, apresentaram atividades similares durante todo o período de desenvolvimento do tegumento. Vale ressaltar ainda que, aos 155 DAP as três enzimas avaliadas apresentaram atividades semelhantes, diferindo novamente aos 195 DAP, com a IA superando a atividade da IN e da Susy.

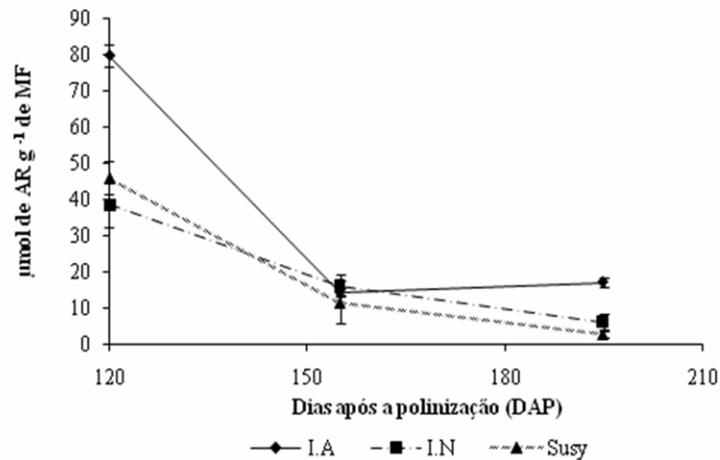


FIGURA 25 Atividade da invertase ácida (I.A), neutra (I.N) e Susy no tegumento de semente de seringueira em função do desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

A alta atividade da IA aos 120 DAP, no tegumento das sementes, provavelmente, esteja relacionada com a formação dos cotilédones. Em sementes de *Vicia faba* a histodiferenciação do embrião foi classificada em sete estádios, sendo que a organogênese e a morfogênese ocorrem entre os três primeiros estádios de desenvolvimento da semente e a formação dos cotilédones, a partir do quarto estádio, se estendendo até o último (Borisjuk et al., 1995).

Segundo Weber et al. (1995) no tegumento há uma elevada atividade de invertases, principalmente a ácida, que tem a função de criar um ambiente com alta concentração de monossacarídeos, os quais são direcionados para os cotilédones, por meio de células de transferências (Borisjuk et al., 2003), induzindo a atividade mitótica neste tecido. Assim, a alta atividade de IA no tegumento das sementes de seringueira aos 120 DAP (Figura 25) sugere que nesta data, esta enzima, esteja gerando hexoses, necessárias, para a indução da atividade mitótica nos cotilédones. Todavia, conforme os cotilédones foram finalizando o seu desenvolvimento a atividade das invertases bem como a da Susy foi declinando, possivelmente, porque este tecido vai perdendo sua função de receptor de fotoassimilados e vai tornando-se mais lignificado, cuja função, agora, esta relacionada com a proteção da semente (Boesewinkel & Bouman, 1995).

4.4.5.4 Pericarpo

Aos 38 DAP houve uma maior atividade da IA seguida da IN e da Susy, respectivamente (Figura 26). Provavelmente, a elevada atividade da IA, no pericarpo das sementes, no início do desenvolvimento, esteja associada a maior atividade mitótica neste período. Diversos trabalhos associam alta atividade da IA a atividade mitótica (Weber et al., 1996; Wescheke et al., 2000).

No período compreendido entre 65 DAP à 120 DAP ocorreu tendência de queda na atividade das invertases, ácida e neutra, porém não se observa diferença entre a atividade de ambas. Aos 155 DAP e 195 DAP a atividade da IN continua a declinar, entretanto, a da IA mantém-se estável.

Quanto a Susy, foi verificado um súbito incremento na sua atividade, logo aos 65 DAP. Após esta data há um expressivo declínio na atividade desta enzima até os 120 DAP, permanecendo estável a partir daí até o final do desenvolvimento do fruto/sememente. A alta atividade da Susy, no pericarpo, no início do desenvolvimento do fruto, pode justificar a maior concentração de

sacarose nesse tecido no mesmo período (Figura 22), uma vez que essa enzima pode tanto hidrolisar como sintetizar a sacarose. Cavalari (2004) também associou a maior atividade da Susy no pericarpo de sementes de café em desenvolvimento a síntese de sacarose. Entretanto, diferentemente do observado no presente trabalho o incremento da Susy e da sacarose no pericarpo das sementes de café ocorreu no final do amadurecimento do fruto e não no início.

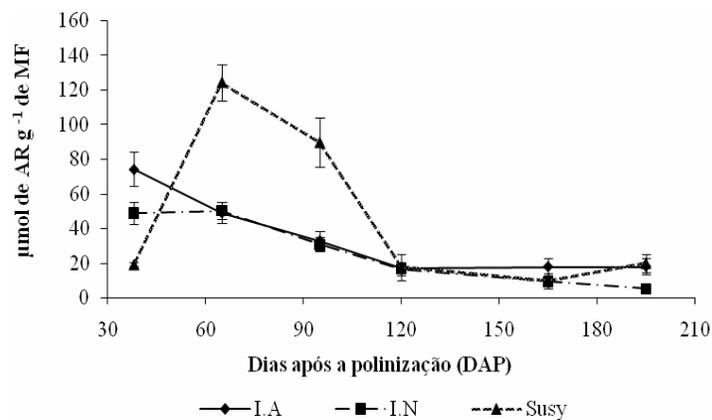


FIGURA 26 Atividade da invertase ácida, neutra e Susy no pericarpo do fruto de seringueira em função do desenvolvimento. As barras exibem o erro padrão da média de três repetições.

4.5 Análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira

Os perfis eletroforéticos de proteínas do tipo sHSPs extraídas pelo calor em eixo embrionário das sementes de seringueira aos 120, 155 e 195 dias após a polinização, são apresentados na Figura 27.

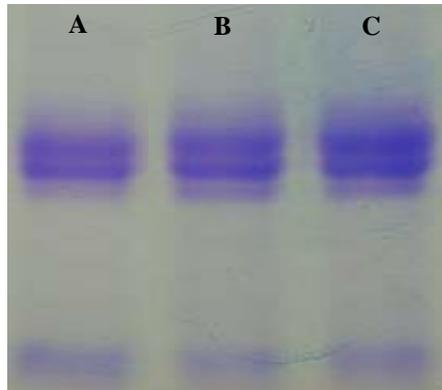


FIGURA 27 Perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor em embriões de sementes de seringueira nos estádios de desenvolvimento (A) 120 DAP, (B) 155 DAP e (C) 195 DAP.

As sementes de seringueira apresentaram em seus eixos embrionários a presença de proteínas resistentes ao calor (sHSPs).

Tais proteínas (sHSPs), vêm sendo utilizadas como sinal do desenvolvimento de tolerância à dessecação em várias espécies ortodoxas, porém ao se analisar os padrões de bandas apresentados, fica evidente a presença destas proteínas resistentes ao calor no eixo embrionário de sementes de seringueira, mesmo tendo esta espécie, característica recalcitrante. Este fato também foi observado por Greggains et al. (2000), que ao avaliar a presença de bandas eletroforéticas correspondentes a proteínas do tipo sHSPs em duas espécies de sementes sendo uma ortodoxa a *Acer Platanoides* e outra recalcitrante a *Acer Pseudoplatanus*, verificaram a presença dessas proteínas em ambas as espécies.

Apenas o fato das sementes de seringueira apresentarem o acúmulo de proteínas do tipo sHSPs durante o seu desenvolvimento, não as confere tolerância a dessecação. Acredita-se que a tolerância à dessecação não pode ser atribuída a um simples mecanismo de proteção; ao contrário ela parece ser um

fenômeno multifatorial em que cada componente é igualmente crítico, agindo em sinergismo e controlado em nível genético (Leprince et al., 1993)

Ocorreu um aumento na intensidade das bandas com o avanço do desenvolvimento das sementes, quando ocorre redução no teor de água da semente de seringueira (Figura 12), principalmente na parte superior do perfil eletroforético, onde as bandas se tornam presentes de forma mais evidente, à medida que avança o estágio de desenvolvimento das sementes. Esse resultado está de acordo com os encontrados por Blackman et al. (1991) e Black et al. (1999), que apresentaram evidências de que diversas proteínas sHSPs são acumuladas durante a secagem e maturação das sementes. Guimarães (2000), trabalhando com sementes de café, também observou a presença de bandas de proteínas resistentes ao calor em estádios mais avançados de maturação.

De acordo com Queitsch et al. (2000), embora os organismos sintetizem a proteína HSP, o balanço de proteínas sintetizadas e a relativa importância das famílias individuais de sHSPs na tolerância a dessecação variam enormemente entre organismos.

5 CONCLUSÕES

As sementes de seringueira atingem seu tamanho máximo entre os três e quatro meses de desenvolvimento. A mudança da fase de divisão e expansão celular para o de armazenamento de materiais de reserva e maturação parece ocorrer próximo aos 100 DAP em sementes de seringueira. E sua maturidade fisiológica é alcançada aos 195 dias após a polinização.

O acúmulo de amido e albuminas no endosperma das sementes de seringueira ocorre, principalmente, a partir dos 95 DAP.

No endosperma, há uma alta concentração de açúcares redutores no início do desenvolvimento das sementes, até 95 DAP, o qual declina com o avanço da sua maturação. Contrariamente, a sacarose permanece em baixas concentrações no início do desenvolvimento das sementes e, a partir dos 95 DAP, eleva-se superando o teor de açúcares redutores.

No embrião ocorre um aumento significativo nos teores de açúcares solúveis totais, redutores e de sacarose com o avanço do desenvolvimento das sementes de seringueira.

No tegumento ocorre uma redução no teor de açúcares solúveis totais e redutores com o avanço do desenvolvimento das sementes de seringueira, enquanto o teor de sacarose permanece inalterado.

A atividade da invertase ácida aumenta no endosperma das sementes nos primeiros 95 DAP, enquanto, a da SuSy permanece inalterada. A partir deste período ocorre uma inversão, com a atividade da invertase ácida declinando e a da SuSy aumentando.

No embrião, a atividade da invertase ácida declina com o avanço do desenvolvimento das sementes, enquanto que, a atividade da invertase neutra aumenta, superando a atividade da ácida próximo dos 150 DAP. Por outro lado, a invertase da SuSy permanece baixa durante todo o desenvolvimento do embrião.

No tegumento ocorreu redução na atividade de todas as enzimas avaliadas com o avanço do desenvolvimento das sementes de seringueira.

As proteínas resistentes ao calor estão presentes nas sementes de seringueira, existindo um aumento na intensidade das bandas que correspondem a estas proteínas com o avanço do desenvolvimento das sementes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIGBODION, A.I. Effect of storage of seeds on quality of rubber seed oil. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, New Delhi, v.7, n.2, p.141-143, Feb. 1994.
- ALENCAR, M.A.A. **Mobilização e distribuição de reservas de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante a germinação e o crescimento inicial**. 2003. 59p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 370p.
- ALVES, E.U.; SADER, R.; BRUNO, R. de L.A.; ALVES, A.U. Maturação fisiológica de sementes de sabiá. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.1, p.1-8, jun. 2005.
- AMARAL, L.I.V. do; PEREIRA, M. de F.D.A.; CORTELAZZO, Â.L. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. - Bixaceae). **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v.15, n.1, p.125-132, jan. 2001.
- BAUD, S.; BOUTIN, J.P.; MIQUEL, M.; LEPINIEC, L.; ROCHAT, C. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v.40, n.3, p.151-160, Dec. 2002.
- BERG, R. Fruit, seed and myrmechorus dispersal in *Micranthemum* (Euphorbiaceae). **Journal of Botany**, Columbus, v.22, n.2, p.173-194, Apr. 1975.
- BITTENCOURT, J.F.N.; SADER, E.; MORAES, R.M. Variação dos teores de proteína, óleo e ácidos oléico e linoléico durante a maturação de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v.13, n.2, p.76-88, dez. 1990.
- BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; CÔME, D. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v.120, n.2, p.463-471, June 1999.

BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation on tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.3, p.868-874, Mar. 1991.

BOESEWINKEL, F.D.; BOUMAN, F. The seed: structure and function. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: M.Dekker, 1995. p.780-853.

BONOME, L.T. da S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [Hevea brasiliensis (Willd. ex. Adr. de Juss.) Müell Arg.] durante o armazenamento**. 2006. 124p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BORISJUK, L.; ROLLETSCHEK, H.; WOBUS, U.; WEBER, H. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. **Journal of Experimental Botany**, New Delhi, v.54, n.382, p.503-512, Jan. 2003.

BORISJUK, L.; WALENTA, S.; ROLLETSCHEK, H.; MUELLER-KLIESER, W.; WOBUS, U.; WEBER, H. Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. **Plant Journal**, Oxford, v.29, n.4, p.521-530, Feb. 2002.

BORISJUK, L.; WALENTA, S.; WEBER, H.; MUELLER-KLIESER, W.; WOBUS, U. High resolution histographical mapping of glucose concentration in developing cotyledons of *V. faba* in relation to mitotic activity and starch accumulation: glucose as a possible developmental trigger. **Plant Journal**, Oxford, v.15, n.4, p.583-591, May 1998.

BORISJUK, L.; WEBER, H.; PANITZ, R.; MANTEUFFEL, R.; WOBUS, U. Embryogenesis of *Vicia faba* L.: histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.147, n.2, p.203-218, June 1995.

BRADFORD, K.J. Applications of hydrothermal time to quantifying and modelling seed germination and dormancy. **Weed Science**, Champaign, v.50, n.2, p.248-260, Nov. 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, New York, v.72, n.7, p.248-254, May 1976.

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

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CAVALARI, A.A. **Invertase ácida, sacarose sintase e o metabolismo de açúcares no desenvolvimento da semente de café (*Coffea arabica* L.)**. 2004. 62p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHENG, W.H.; CHOUREY, P.S. Genetic evidence that invertase mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, n.3, p.485-495, Mar. 1999.

COCA, M.A.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.25, n.3, p.479-492, June 1994.

COLLADA, C.; GOMEZ, L.; CASADO, R.; ARAGONCILLO, C. Purification and in vitro chaperone activity of a class I small heat-shock protein abundant in recalcitrant chestnut seeds. **Plant Physiology**, Washington, DC, v.115, n.1, p.71-77, Sept. 1997.

COOPER, R.A.; GREENSHIELDS, R.N. Sucrose in *Phaseolus vulgaris*. **Nature**, London, v.5, n.191, p.4788-4789, Aug. 1961.

DÉJARDIN, A.; ROCHAT, C.; WUILLÈME, S.; BOUTIN, J.P. Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.20, n.11, p.1421-1430, June 1997.

DEROCHER, A.E.; VIERLING, E. Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. **Plant Journal**, Oxford, v.5, n.1, p.93-102, Sept. 1994.

ESTANISLAU, W.T. **Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2002. 125p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.1, p.1-13, Mar. 1993.

GEIGENBERGER, P. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, n.380, p.457-465, Jan. 2003.

GEROMEL, C. **Atividade hidrolítica da sacarose associada ao desenvolvimento do fruto de cafeeiro**. 2001. 70p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L.P.; GUERREIRO, S.M.C.; CAVALARI, A.A.; POT, D.; PEREIRA, L.F.; LOREY, T.; VIEIRA, L.G.E.; MAZZAFERA, P.; MARRACCINI, P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, n.1, p.3243-3258, Apr. 2006.

GONÇALVES, P. de S.; MARQUES, J.R.B. Clones de seringueira: influência dos fatores ambientais na produção e recomendação para o plantio. In: ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C.A.F.S. do. **Seringueira**. Viçosa, MG: Epamig, 2008. cap.6, p.181-247.

GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.E.; QUICK, W.P.; ATHERTON, N.M. Purative desiccation tolerance mechanisms in orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.10, n.3, p.317-327, Mar. 2000.

GUIMARÃES, R.M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.)**. 2000. 180p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GUIMARÃES, R.M. de; VIEIRA, G.G.C.; FRAGA, A.C.; PINHO, E.V. de R. von; FERRAZ, V.P. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.128-139, 2002.

HELM, K.W.; ABERNATHY, R.H. Heat shock proteins and their mRNAs in dry and early imbibing embryos of wheat. **Plant Physiology**, Washington, DC, v.93, n.2, p.1626-1633, June 1990.

HILL, M.L.; SMITH, M.R.E.; RAWSTHORNE, S. Metabolism of sugar in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. **Plant Physiology**, Washington, DC, v.131, n.1, p.228-236, Jan. 2003.

HIROSE, T.; TAKANO, M.; TERAU, T. Cell wall invertase in developing rice caryopsis: molecular cloning of OsCIN1 and analysis of its expression in relation to its role in grain filling. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.43, n.4, p.452-459, Sept. 2002.

HONG, S.W.; LEE, U.; VIERLING, E. Arabidopsis hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures. **Plant Physiology**, Washington, DC, v.132, n.2, p.757-767, Apr. 2003.

HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R.L. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols: review and survey. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.4, p.385-405, Dec. 1994.

HOTTIGER, T.; VIRGILIO, C. de; HALL, M.N.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: II physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.219, n.1, p.187-193, May 1994.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Programa seringueira**.

Disponível em:

<www.iac.sp.gov.br/centros/centros_cafe/seringueira/programaseringueira.htm>

. Acesso em: 23 jun. 2008.

KOCK, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v.7, n.1, p.235-246, Feb. 2004.

KOCH, K.E.; ZENG, Y. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.127, n.1, p.474-483, June 2002.

KRUGER, N.J. Carbohydrate synthesis and degradation. In: DENNIS, D.T.; TURPIN, D.H. **Plant physiology, biochemistry and molecular biology**. 2.ed. London: Longman Scientific & Technological, 1993. p.59-76.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; McKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, Sept. 1993.

LEPRINCE, O.; VERTUCCI, C.W. A calorimetric study of the glass transition behavior in axes of bean seeds with relevance to storage stability. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, n.4, p.1471-1481, Dec. 1995.

LI, X.; BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. Comparative morphology and physiology of fruit and seed development in the two shrubs *Rhus aromatica* and *R. glabra* (Anacardiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.86, n.9, p.1217-1225, Sept. 1999.

LOPES, J.C.; DIAS, P.C.; PEREIRA, M.D. Maturação fisiológica de sementes de quaresmeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.40, n.8, p.811-816, Ago. 2005.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2005. 495p.

MARTIM, S.A. **Pulverização do cafeeiro com açúcar**: potencial de uso em mudas submetidas à deficiência hídrica e na recuperação de plantas atingidas por Glyphosate. 2003. 67p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MILLER, G.L. Use dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, DC, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

PAULA, N.F. **Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento**. 1997. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

POPINIGIS, F. Necessidades de pesquisas relacionadas à qualidade fisiológica de sementes. In: REUNIÓN DE TRABAJO SOBRE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EM PRODUCCIÓN Y TECNOLOGIA DE SEMILLAS, 1985, Cali, Colombia. **Anales...** Cali: CIAT, 1985. p.5.

QUEITSCH, C.; HONG, S.W.; VIERLING, E.; LINDQUIST, S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. **Plant Cell**, Dordrecht, v.12, n.4, p.479-492, Apr. 2000.

QUICK, W.P.; SCHAFFER, A.A. Sucrose metabolism in sources and sinks. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A.A. **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: M.Dekker, 1996. p.115-156.

PRIDHAM, J.B.; WALTER, M.W. α -Galactosidase and alkaline β -fructofuranidase activity in *Vicia faba* seeds. **Biochemical Journal**, London, v.92, n.1, p.20, July 1964.

RAGAGNIN, L.I.M.; DIAS, L.L. Maturação fisiológica de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex D.C) Standley. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5., 1987, Gramado, RS. **Resumos...** Brasília, DF: ABRATES, 1987. p.128.

ROGERS, W.J.; BÉZARD, G.; DESHAYES, A.; MEYER, I.; PÉTIARD, V.; MARRACCINI, P. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v.37, n.4, p.261-272, Oct. 1999.

ROOSMALEN, M.G.M. van. **Fruits of the Guianan Flora**. Utrecht: Institute of Systematic Botany, 1985. 483p.

SECCO, R. de S. A botânica da seringueira [(*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. Jussieu) Müell. Arg. (Euphorbiaceae)]. In: ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C.A.F.S. do. **Seringueira**. Viçosa, MG: Epamig, 2008. cap.1, p.3-24.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Characterization of solute efflux from dehydration injured soybean (*Glycine max* L. Merr) seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.72, n.4, p.911-914, Aug. 1983.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 1990. 165p.

SILVA, M.P.; PASSARINHO, J.A.P.; RICARDO, C.P.P. Alkaline invertase as a marker enzyme of in vitro somatic embryogenesis. In: CONGRESS OF THE FEDERATION OF THE EUROPEAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGY, 6., 2002, Split. **Proceedings...** Split: FESBP, 2002. p.19.

SOUZA, L.A. de; MOSCHETA, I.S.; MOURÃO, K.S.M. Fruto. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p.329-355.

STURM, A.; TANG, G.Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.4, n.1, p.401-407, June 1999.

SUN, W.Q.; IRVING, T.C.; LEOPOLD, A.C. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. **Physiology Plant**, Washington, DC, v.90, n.3, p.621-628, Mar. 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TOMLINSON, K.L.; MCHUGH, S.; LABBE, H.; GRAINGER, J.L.; JAMES, L.E.; POMEROY, K.M.; MULLIN, J.W.; MILLER, S.S.; DENNIS, D.T.; MIKI, B.L.A. Evidence that the hexose-to-sucrose ratio does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplasmic invertase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.406, p.2291-2303, Sept. 2004.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M.Dekker, 1995. p.237-271.

VIEIRA, A.R. **Efeitos de compostos fenólicos na dormência de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e eficiência de tratamentos pré-germinativos**. 1991. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

VIERLING, E. Plant HSP101/ClpB. In: GETHING, M.J. (Ed.). **Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts**. Oxford: Oxford University, 1997. p.253-255.

WALTERS, C.; RIED, J.L.; WALKER-SIMMONS, M.K. Heat-soluble proteins extracted from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v.7, n.2, p.125-134, June 1997.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; HEIM, U.; BUCHNER, P.; WOBUS, U. Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. **Plant Cell**, Dordrecht, v.7, n.2, p.1835-1846, Oct. 1995.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat associated invertases and carbohydrate state. **Plant Journal**, Oxford, v.10, n.1, p.823-830, July 1996.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Sugar import and metabolism during seed development. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.2, n.5, p.169-174, May 1997.

WEBSTER, C.C.; PAARDEKOOPEL, E.C. The botany of the rubber tree. In: WEBSTER, C.C.; BAULKWILL, W.J. (Ed.). **Rubber**. London: Longman, 1989. chap.2, p.57-84.

WINTER, H.; HUBER, S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v.35, n.4, p.253-289, Apr. 2000.

WOBUS, U.; WEBER, H. Seed maturation: genetic programmes and control signals. **Current Opinion Plant Biology**, London, v.2, n.4, p.33-38, Dec. 1999a.

WOBUS, U.; WEBER, H. Sugars as signal molecules in plant seed development. **Biology Chemical**, Washington, DC, v.380, n.4, p.937-944, June 1999b.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The stimulation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemistry Journal**, Ottawa, v.57, n.2, p.508-514, Aug. 1954.

ZAMSKI, E. Transport and accumulation of carbohydrates in developing seeds: the seed as a sink. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: M.Dekker, 1995. p.237-271.

ZUR NIEDEN, U.; NEUMANN, D.; BUCKA, A.; NOVER, L. Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. **Planta**, Berlin, v.196, n.3, p.530-538, Sept. 1995.