

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LOBEIRA
(*Solanum lycocarpum* St. Hil):
MECANISMO E REGULAÇÃO

LILIAN VILELA ANDRADE PINTO

2007

LILIAN VILELA ANDRADE PINTO

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LOBEIRA
(*Solanum lycocarpum* St. Hil): MECANISMO E REGULAÇÃO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Doutorado em Engenharia Florestal, área de concentração em Manejo Ambiental, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador
Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

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

Pinto, Lilian Vilela Andrade

Germinação de sementes de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil):
mecanismo e regulação / Lilian Vilela Andrade Pinto. -- Lavras: UFLA,
2007.

67 p. : il.

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Endo- β -mananase. 2. Ácido abscísico. 3. Endosperma micropilar.
4. Potencial de pressão. 5. Morfo-anatomia. 6. Amolecimento.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título

CDD-634.97379
-634.9562

LILIAN VILELA ANDRADE PINTO

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LOBEIRA
(*Solanum lycocarpum* St. Hil): MECANISMO E REGULAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Doutorado em Engenharia Florestal, área de concentração em Manejo Ambiental, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 27 de fevereiro de 2007

Prof. Dr. Antonio Claudio Davide	DCF - UFLA
Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria	DCF - UFLA
Dr. Henk W. M. Hilhorst	Wageningen University
Dr. Peter E. Toorop	Royal Botanic Gardens-Kew

Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado permissão de hoje estar aqui.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Florestais, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao professor Edvaldo Aparecido Amaral da Silva pela dedicação na orientação, incentivo, ensinamentos técnicos, colaboração, tolerância e, principalmente por acreditar em mim.

Ao professor Antônio Claudio Davide pelo incentivo, experiência transmitida e amizade.

Ao professor José Roberto Soares Scolforo pela bolsa do Projeto Mapeamento e inventario da flora nativa e reflorestamentos de Minas Gerais.

Aos professores Luciano Vilela Paiva, Dulcinéia de Carvalho, Fabiana Queiroz, Maria Laene Moreira de Carvalho e Eduardo Alves pela permissão do uso dos respectivos laboratórios: Central de Biologia Molecular, Melhoramento Florestal e Recursos Genéticos, Microestrutura e Arquitetura Alimentar, Sementes e Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural.

Aos professores José Márcio Rocha Faria, Renato Mendes Guimarães, Édila Vilela de Resende Von Pinho, Maria Laene Moreira de Carvalho e Dulcinéia de Carvalho pelas valiosas críticas e sugestões deste trabalho.

Aos colegas José Pedro de Oliveira e José Carlos Martins, pela coleta dos frutos.

Aos amigos Anderson Cleiton José, Tathiana Elisa Masetto, Olívia Alvina Oliveira Tonetti, Guilherme e Keila pela amizade, apoio, incentivo e colaboração nos trabalhos de laboratório.

À Valquíria pelo preparo das amostras de sementes para microscopia eletrônica de varredura e pela obtenção das fotos, importantes para a finalização deste estudo.

Aos colegas do Laboratório de Sementes Florestais (Juliano, Daniele, Sue Ellen), do Laboratório de Melhoramento Florestal (Alisson, Fábio, Cristiane e Miriam), do Laboratório de Sementes da Agricultura (Kenia, dona Elsa, dona Dalva e Elenir) e do Laboratório Central de Biologia Molecular (Anderson), pelos incentivos e otimismo durante o trabalho.

Aos amigos da EAFI, Kátia, Luciana, Eder, Luiz Carlos, Verônica, Jamil, Márcia, Ademir, Lúcia, Rodrigo, Claudino, Gerson, Adriana, Zulmara, Maura, José Jorge e Danúzia, por todo apoio, carinho e por me ensinarem muito durante nossa convivência.

A todos os meus familiares pelo carinho, estímulo e encorajamento nos momentos difíceis desta batalha.

Ao meu esposo, Luis Fernando Rocha Borges, pelo amor, carinho, amizade, compreensão e gargalhadas a cada dia para que eu pudesse vencer mais essa etapa da minha vida.

A todos aqueles que, de maneira direta e ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
RESUMO.....	I
ABSTRACT	III
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Caracterização da espécie	5
2.2 Germinação e embebição.....	7
2.3 Crescimento da radícula.....	9
2.4 Papel da endo- β -mananase na hidrólise da parede celular	11
2.5 Dormência de sementes	12
2.6 ABA impõe dormência endógena.....	15
2.7 ABA impõe dormência exógena.....	16
2.8 Regulação da germinação pelo balanço hormonal.....	18
2.9 Modelos de germinação	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Coleta dos frutos e beneficiamento das sementes.....	22
3.2 Determinação do grau de umidade	23
3.3 Germinação.....	23
3.4 Caracterização morfológica do fruto e da semente.....	25
3.5 Caracterização morfo-anatômica do endosperma micropilar e lateral a partir da microscopia eletrônica de varredura	25
3.6 Curva de embebição.....	27
3.7 Peso fresco dos embriões durante a embebição	27
3.8 Determinação da força de ruptura.....	28
3.9 Quantificação da atividade de endo- β -mananase.....	29
3.10 Localização da atividade de endo- β -mananase.....	30
3.11 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32

4.1 Germinação.....	32
4.2 Morfologia do fruto e da semente de <i>Solanum lycocarpum</i>	35
4.3 Morfo-anatomia das células do endosperma micropilar e lateral	37
4.4 Curva de embebição.....	38
4.5 Peso fresco dos embriões durante a embebição	39
4.6 Força de ruptura do endosperma micropilar	42
4.7 Quantificação da atividade de endo- β -mananase.....	43
4.8 Força de ruptura do endosperma micropilar X atividade de endo- β -mananase	45
4.9 Localização da atividade de endo- β -mananase.....	46
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
GA	Giberelina
GA ₃	Ácido giberélico
IVG	Índice de velocidade de germinação
N	Newton

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Classificação dos tipos de dormência.....	14
TABELA 2 Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes colhidas intactas, de sementes coletadas intactas e de sementes coletadas com endosperma micropilar removido ao final dos 40 dias de embebição sob diferentes condições de germinação.....	34
TABELA 3 Parâmetros morfo-anatômicos do endosperma micropilar e do endosperma lateral.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Germinação de sementes em <i>Arabidopsis thaliana</i> 15
FIGURA 2	Germinação de sementes de <i>S. lycocarpum</i> sob diferentes condições..... 33
FIGURA 3	Protrusão da radícula e desenvolvimento da plântula sob luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas 35
FIGURA 4	Frutos e sementes de <i>S. lycocarpum</i> 36
FIGURA 5	Microscopia eletrônica de varredura de sementes de <i>S. lycocarpum</i> embebidas em água por 24 horas..... 37
FIGURA 6	Curva de embebição de sementes de <i>S. lycocarpum</i> 39
FIGURA 7	Ganho de peso fresco de embriões de <i>S. lycocarpum</i> isolados de sementes embebidas em água e em 100µM ABA, antes e após a protrusão da radícula 40
FIGURA 8	Sementes de <i>S. lycocarpum</i> embebidas em água..... 41
FIGURA 9	Força requerida para ruptura do endosperma micropilar de sementes de <i>S. lycocarpum</i> durante a embebição em água e em 100µM ABA..... 43
FIGURA 10	Atividade da enzima endo-β-mananase em endospermas micropilares de sementes intactas embebidas em água ou em 100µM ABA..... 44
FIGURA 11	Regressão linear entre a força de ruptura do endosperma micropilar e a atividade da enzima endo-β-mananase de sementes de <i>S. lycocarpum</i> durante a embebição em água e em 100µM ABA..... 45
FIGURA 12	Impressão dos tecidos de sementes de <i>S. lycocarpum</i> mostrando a atividade da enzima endo-β-mananase..... 46

RESUMO

PINTO, Lilian Vilela Andrade. **Germinação de sementes de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil): mecanismo e regulação.** Lavras: UFLA, 2007. 67p. (Tese – Doutorado em Manejo Ambiental).¹

Os objetivos deste estudo foram: i) determinar o melhor método de coleta dos frutos de *S. lycocarpum* no campo, ii) definir a melhor condição de ambiente para a germinação, iii) caracterizar morfológicamente os frutos e morfo-anatomicamente as sementes, iv) estudar o mecanismo de germinação de sementes, v) estudar o efeito de ABA exógeno na regulação da germinação e vi) comparar o mecanismo e regulação da germinação de *S. lycocarpum* com o mecanismo e regulação da germinação em sementes de tomate. Como principais resultados foram verificados que os frutos de *S. lycocarpum* devem ser coletados após a dispersão natural; a melhor condição de germinação é a de alternância de luz e temperatura de 20/30°C, a cada 12 horas; o efeito da alternância da temperatura é no endosperma micropilar; o fruto consiste em uma baga de coloração verde mesmo quando maduro e apresenta endocarpo polposo, amarelado, aromático e em média 545 sementes; as sementes apresentam tegumento rígido de coloração marrom-escura, o qual não impede a embebição de água; o embrião encontra-se encaixado no endosperma e apresenta forma espiral, sendo que os cotilédones localizam-se na parte interna e o hipocótilo e a radícula de forma curvilínea, na parte externa; o endosperma micropilar é formado por 7 a 8 camadas de células poligonais alongadas que apresentam valores do diâmetro médio e da espessura da parede celular estatisticamente inferiores aos presentes nas células do endosperma lateral; após um prolongado período na fase II de embebição, os embriões isolados de sementes embebidas em água apresentaram aumento no peso fresco significativo antes da protrusão da radícula, coincidindo com o rompimento do tegumento das sementes, mas não do endosperma que para ser rompido necessita que as sementes ainda fiquem sob condições de germinação por mais 1 a 2 dias; a força de ruptura do endosperma micropilar apresentou dois estágios de queda significativa em seus valores ao longo da embebição em água; a atividade da enzima endo- β -mananase de sementes embebidas em água iniciou-se após o primeiro dia de embebição e mostrou-se crescente ao longo de todo o período de embebição; a

¹ Comitê Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA (Orientador) e Antonio Claudio Davide – UFLA (Co-orientador).

força de ruptura do endosperma micropilar apresentou correlação significativa com o aumento da atividade de endo- β -mananase; a atividade de endo- β -mananase ocorreu antes da protrusão da radícula apenas no endosperma micropilar de sementes embebidas em água e, apenas após a protrusão radicular, foi observada atividade de endo- β -mananase no endosperma lateral; o ABA inibiu o aumento de peso fresco dos embriões após o início da fase II de embebição, o segundo estágio de amolecimento do endosperma micropilar e a atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar durante a embebição; as sementes de *S. lycocarpum* na presença de ABA comportaram-se semelhantemente com as sementes de tomate, considerando o segundo estágio de redução da força de ruptura do endosperma micropilar, a atividade de endo- β -mananase e a localização da enzima. Assim, o amolecimento do endosperma micropilar é necessário para a ocorrência de germinação em sementes de *S. lycocarpum*, e ocorre em dois estágios que coincidem com o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase, sendo o segundo estágio, também, influenciado pelo aumento do potencial de pressão das células do embrião.

Palavras-chave: endo- β -mananase, ácido abscísico; endosperma micropilar, potencial de pressão; morfo-anatomia, amolecimento.

ABSTRACT

PINTO, Lilian Vilela Andrade. **Germination of *Solanum lycocarpum* St. Hil seeds: mechanism and regulation.** Lavras: UFLA, 2007. 67p. (Thesis – Doctorate in Environmental Management).¹

The aims of this study were i) to determine the method to collect fruits at field condition, ii) to define the best germination condition, iii) to characterize morphologically the fruits and morpho-anatomically the seeds, iv) to study the germination mechanism of the seeds, v) to study the control of this process by ABA and vi) to compare the mechanism and regulation of germination of *S. lycocarpum* and tomato seeds. The results showed that fruits of *S. lycocarpum* must be dispersed after natural dispersion. The best germination condition found was by alternating light/dark and temperature (20-30°C), 12 hours. The effect of the alternation of temperature during the germination is in endosperm cap. The fruit is a berry, greenish even when mature, with fleshy, yellowish, fragrant endocarp. The seeds (545 per fruit, in average) have a rigid, dark-brown seed coat which does not avoid water uptake. The embryo is spiralled, encircled by the endosperm, with the cotyledons at the inner part and the hypocotyl and radicle, curved, at the outer part. The endosperm cap has 7-8 layers of elongated polygonal cells with average diameter and cell wall thickness statistically lower than those of the cells of the lateral endosperm. After a prolonged period at the phase II of imbibition, the embryos isolated from seeds imbibed in water showed a significant increase of fresh weight before radicle protrusion coinciding with the rupture of the seed coat, but not of the endosperm, which is only ruptured after seeds remain under germination conditions for 1-2 more days. The puncture force of the endosperm cap showed two stages of significant decrease throughout the imbibition course in water. The activity of endo- β -mannanase in water-imbibed seeds started after the first day of imbibition and increased throughout the imbibition course. The puncture force of the endosperm cap showed significant correlation with the increase of the activity of endo- β -mannanase. Before radicle protrusion, activity of endo- β -mannanase occurred only in the endosperm cap in water-imbibed seeds. Activity of this enzyme in the lateral endosperm was observed only after radicle protrusion. ABA inhibited the increase of the embryo weight after the beginning of phase II of imbibition, the

¹ Advising committee: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA (Supervisor) and Antonio Claudio Davide – UFLA (Co-supervisor).

second stage of weakening of the endosperm cap and the activity of endo- β -mannanase in the endosperm cap throughout the imbibition course. In the presence of ABA, seeds of *S. lycocarpum* behaved similarly to the tomato seeds, considering the second stage of decrease in the rupture force of the endosperm cap, the activity of endo- β -mannanase and its location. Thus, the weakening of the endosperm cap is necessary for the germination of *S. lycocarpum* seeds which occurs in two stages. The first and the second stages coincide with the increase of the activity of endo- β -mannanase, with the embryo contributing to the second stage through increasing its fresh weight which indicates increase of the pressure potential of its cells, before radicle protrusion.

Key-words: endo- β -mannanase, abscisic acid; endosperm cap, pressure potential; morpho-anatomy, weakening.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Solanum lycocarpum* St.Hil pertence à família Solanaceae e é popularmente conhecida como lobeira, fruta-de-lobo, berinjela e jurubebão (Rizzini, 1971), sendo encontrada em abundância no bioma Cerrado (Oliveira-Filho & Oliveira, 1988). *S. lycocarpum* apresenta porte arbóreo ou arbustivo grande que pode atingir 4 metros de altura (Corrêa, 1984) e grande importância ecológica pelo fato de seus frutos servirem de alimento ao lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus* Illiger) (Motta Júnior & Martins, 2002), à anta (*Tapirus terrestris*) (Pinto, 1998), ao cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) (Rodrigues, 2002), à raposa do campo (*Lycalopex vetulus*) (Dalponte & Lima, 1999) e ao lagarto teiú (*Tupinambis merianae*) (Castro & Galetti, 2004). Os frutos de *S. lycocarpum* também apresentam propriedades alimentícias (Corrêa, et al., 2000) e medicinais (Marciano, 1997; Dall'Agonol & von Poser, 2000 e Rocha, 2006). A espécie se destaca, ainda, pelo fato da planta crescer e se desenvolver em condições ambientais desfavoráveis tais como: estresse hídrico, terras ácidas e pobres em nutrientes (Vidal et al., 1999), como em áreas degradadas e em pastagens (Oliveira Filho & Oliveira, 1988 e Lombardi & Mota-Junior, 1993).

Embora *S. lycocarpum* tenha muitos usos e importância, ainda pouco se conhece sobre as características morfo-anatômicas de seus frutos e sementes e sobre o mecanismo e regulação da germinação de suas sementes.

O estudo das características morfológicas das sementes é importante nas análises de identificação e de diferenciação das espécies (Oliveira & Pereira, 1984 e Amorim, 1996), na definição da condição de armazenamento, dos métodos de semeadura (Kuniyoshi, 1983), no tipo de substrato durante o teste de germinação (Araújo & Matos, 1991) e em estudos de manejo visando à

conservação da fauna mediante estudos de dieta de herbívoros (Kuniyoshi, 1983). Outro fato relevante é que estes estudos permitem a identificação de espécies no banco de sementes do solo, contribuindo para melhor compreensão da regeneração e sucessão vegetal nos ecossistemas florestais (Beltrati, 1994), além de auxiliar quais estratégias tecnológicas, fisiológicas e moleculares podem ser utilizadas para compreender o mecanismo e regulação da germinação de sementes (da Silva et al., 2007).

S. lycocarpum pertence à mesma família do tomate (*Solanum esculentum*). Todavia *S. lycocarpum* é uma espécie selvagem, enquanto tomate é uma espécie domesticada e considerada modelo para estudos de desenvolvimento e germinação de sementes (Hilhorst et al., 1998). As sementes de tomate apresentam endospermas rígidos, que apresentam correlação com o amolecimento dos mesmos por enzimas para que a germinação ocorra (Groot & Karssen, 1987 e Toorop et al., 2000). Outras espécies, tais como pimenta (*Capsicum annuum*) (Watkins & Cantliffe 1983), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Leubner-Metzger et al., 1995), melão (*Cucumis melo*) (Welbaum et al., 1995), *Datura* sp (Sanchez et al., 1986, 1990) e café (*Coffea arabica*) (da Silva et al., 2004), também têm endosperma que precisa ser amolecido por enzimas para que haja a germinação (protrusão radicular).

Endo- β -mananase (E.C.3.2.1.78) é uma enzima envolvida no amolecimento das paredes celulares do endosperma de sementes de tomate (Nonogaki & Morohashi, 1996; Voigt & Bewley, 1996; Toorop et al., 1996; Dahal et al., 1997; Still & Bradford, 1997 e Still et al., 1997). A atividade de endo- β -mananase em sementes de tomate ocorre antes da protrusão da radícula no endosperma micropilar e, apenas após a protrusão da radícula, foi observado sua atividade no endosperma lateral (Toorop et al., 2000). No início da germinação o aumento da atividade de endo- β -mananase mostrou-se correlacionar com a queda na força necessária para o embrião romper o

endosperma (Toorop et al., 2000). Além disso, mudanças estruturais no endosperma micropilar antes da germinação como células comprimidas e aumento da porosidade na parede celular, também foram observadas em sementes de tomate (Toorop et al., 2000).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio conhecido por induzir dormência, por inibir a germinação de sementes (Bewley & Black, 1994) e por regular a expressão gênica (Ni & Bradford, 1993; Bradford et al., 2003). Em sementes de tomate, o ABA inibe a germinação pela inibição do segundo estágio de amolecimento do endosperma micropilar. Todavia a atividade de endo- β -mananase não é inibida (Nomaguchi et al., 1995 e Toorop et al., 1996, 2000). Portanto, esse resultado mostra que a atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar de tomate não é suficiente para que ocorra a germinação. Além disso, esse resultado também sugere que outras enzimas que degradam paredes celulares estejam envolvidas com o amolecimento do endosperma das sementes de tomate (Nomaguchi et al., 1995 e Toorop et al., 1996, 2000).

Além do efeito de ABA exógeno no endosperma micropilar, tem sido mostrado que esse hormônio também tem efeito importante nas células do embrião durante a germinação. Por exemplo, Schopfer e Planchy (1985) observaram que ABA inibe expansão celular das células do embrião em sementes de *Brassica napus*. da Silva et al. (2004), mostrou que existe um aumento no conteúdo de ABA endógeno no embrião de sementes de café durante a germinação, e que ABA exógeno inibe o aumento no potencial de pressão (turgor) das células do embrião durante a germinação. Esses resultados levaram da Silva et al. (2004) a sugerirem que ABA inibe a extensão das paredes celulares das células do embrião durante a germinação.

Estudos morfológicos e anatômicos de sementes e frutos e estudos do mecanismo e regulação da germinação de *S. lycocarpum* podem ser comparados com espécies modelos, tal como o tomate, possibilitando encontrar algo não

relatado com relação ao mecanismo e regulação da germinação, servindo de apoio à germinação desta e de outras espécies.

Assim, os objetivos do presente estudo foram: a) determinar o melhor método de coleta dos frutos de *S. lycocarpum* no campo; b) definir a melhor condição de ambiente para a germinação; c) caracterizar morfológicamente os frutos e morfo-anatomicamente as sementes; d) estudar o mecanismo de germinação de sementes; e) estudar o efeito de ABA exógeno na regulação da germinação; f) comparar o mecanismo e regulação da germinação de *S. lycocarpum* com o mecanismo e regulação da germinação em sementes de tomate.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

A espécie *Solanum lycocarpum* St.Hil pertence à família Solanaceae e é popularmente conhecida como fruta-de-lobo, lobeira, berinjela e jurubebão (Almeida et al., 1998 e Rizzini, 1971). No Cerrado do Brasil Central (Oliveira-Filho & Oliveira, 1988), a espécie é encontrada em abundância nas vegetações do tipo Campo Sujo, Cerradão e Cerrado (Almeida et al., 1998 e Silva et al., 1994). Apresenta porte arbóreo ou arbustivo grande que atinge até 4 metros de altura, possuindo muitos ramos, os quais são cilíndricos, lenhosos, fistulosos, um pouco tortuosos e revestidos por densíssimos pêlos estrelados (Corrêa, 1984). As folhas são duras, espinhosas (Ferry, 1969), simples, alternas e pecioladas (Almeida et al., 1998).

É uma espécie andromonóica, ou seja, apresenta no mesmo indivíduo flores hermafroditas e flores funcionalmente masculinas (Oliveira-Filho & Oliveira, 1988). Apresenta floração durante todo o ano, principalmente de março a novembro (Almeida et al., 1998), fato constatado por Oliveira-Filho & Oliveira (1988), que verificaram que o número de flores abertas e de novas inflorescências aumentam após as chuvas. As inflorescências são do tipo cimeira monacásia helicoidal e distribuem-se por toda a copa dos arbustos e nas extremidades dos ramos (Oliveira-Filho & Oliveira, 1988). Segundo Symon (1979) o gênero *Solanum* apresenta abundância de pólen, o que reflete na necessidade de se manter um bom número de polinizadores especializados para assegurar a polinização cruzada, já que o gênero é autoimcompatível.

Os frutos são produzidos durante todo o ano (Dalponte & Lima, 1999) não apresentando variação sazonal na quantidade de frutos no chão (Diets, 1984 e Rodrigues, 2002).

S. lycocarpum tem importância ecológica, econômica-social e silvicultural, sendo portanto, utilizada de várias maneiras. A função ecológica se resguarda no fato de seus frutos servirem de alimento ao lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus* Illiger) (Rodrigues, 2002; Motta Júnior & Martins, 2002; Martins & Motta Júnior, 2000; Aparecido, et al., 1998; Pinto, 1998 e Lombardi & Mota-Junior, 1993), ao cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) (Rodrigues, 2002), à anta (*Tapirus terrestris*) (Pinto, 1998), à raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) (Dalponte & Lima, 1999) e ao lagarto teiú (*Tupinambis merianae*) (Castro & Galetti, 2004).

Quanto às importâncias econômico-sociais, destacam-se suas propriedades alimentícias em função dos baixos teores de fenóis em seus frutos (Corrêa, et al., 2000), podendo a polpa ser consumida “in natura” (Oliveira-Júnior, 2002) ou ser utilizada para se fazer geléias (Silva et al., 1994). Ainda, a polpa dos frutos de *S. lycocarpum* apresenta propriedades medicinais, podendo ser utilizada no controle de diabetes mellitus (Marciano, 1997; Dall’Agonol & von Poser, 2000 e Rocha, 2006) e obesidade (Dall’Agonol & von Poser, 2000), no decréscimo no nível de colesterol-LDL (lipoproteína de baixa densidade) (Dall’Agonol & von Poser, 2000, Rocha, 2006) (Dall’Agonol & von Poser, 2000), no combate à hepatite, à asma e à tosse (Corrêa, 1984) e com princípio antiinflamatório (Vieira et al., 2003).

Já a importância silvicultural é assegurada pelo fato da planta crescer e se desenvolver em condições ambientais desfavoráveis, tais como estresse hídrico, terras ácidas e pobres em nutrientes (Vidal et al., 1999), podendo se destacar na recuperação de áreas de empréstimo do bioma Cerrado. A espécie é colonizadora de áreas degradadas pelo homem e de pastagens (Oliveira Filho & Oliveira, 1988). Segundo Lombardi & Mota-Junior (1993), em áreas abertas pelo homem, como pastos, a germinação e o estabelecimento de plântulas de *S. lycocarpum* são superiores que em áreas de Cerrado não perturbado. Uma

justificativa para esta afirmativa pode ser o fato das sementes de *S. lycocarpum* apresentarem germinação epígea, onde o hipocótilo alonga-se e expõe os cotilédones à luz (Pinto, 1998). Segundo Ng (1978), plântulas epígeas tendem a ser intolerantes ao sombreamento, desenvolvendo-se melhor em locais com menor competição por luz.

2.2 Germinação e embebição

Sob o ponto de vista fisiológico, a germinação é o evento que inicia com a embebição de água pela semente e termina com a elongação do eixo embrionário e protrusão da radícula (Bewley, 1997a).

Este fenômeno inclui inúmeros processos, tais como hidratação de proteínas, mudanças estruturais sub-celulares, respiração, síntese de macromoléculas e elongação celular, sendo nenhum deles único no processo de germinação (Bewley & Black, 1994).

A embebição das sementes é um processo físico, relacionado basicamente às propriedades colodais dos seus constituintes e às diferenças de potencial hídrico (ψ) entre a semente e o meio externo (Bewley & Black, 1994).

A absorção da água não ocorre de maneira igual pelos diferentes tecidos das sementes e varia com a espécie, permeabilidade do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área de contato da semente com a água, forças intermoleculares, composições químicas e condições fisiológicas (Popinigis, 1985).

De maneira geral, durante a germinação, a embebição é um tipo de difusão que segue um padrão trifásico (Bewley & Black, 1994).

A fase I inicia-se com uma rápida embebição de água, determinada principalmente pelo potencial matricial (ψ_m) extremamente baixo da semente ortodoxa seca e caracteriza-se por ser um processo puramente físico, ou seja, ocorre independentemente da semente ser viável ou morta e dormente, a não ser

que trate de dormência imposta pela impermeabilidade do tegumento. A embebição promove a reativação do metabolismo das sementes, sendo esta fase, bioquimicamente, caracterizada pelo aumento acentuado da atividade respiratória, ativação das enzimas, início do desdobramento dos materiais de reserva em substâncias menores, capazes de serem transportadas até o embrião, e início da reorganização das membranas fosfolipídicas.

A fase II é de estagnação no ganho de água pelo fato das forças matriciais se equilibrarem e não mais serem significantes (Bewley & Black, 1994). Esta fase é longa, sendo sua duração 8 a 10 vezes maior que a fase I, podendo se prolongar por semanas, meses e até anos antes do fim da germinação. A atividade respiratória se estabiliza ou cresce de maneira muito lenta em relação à fase anterior. No início desta fase, é verificado o aumento do tamanho do retículo endoplasmático, ribossomos e RNA ribossômico, preparando as células para quebra, transporte e síntese de substâncias utilizadas ao longo do processo germinativo. A ativação das enzimas é iniciada pela ação de giberelinas (GA), que atuam na síntese de enzimas hidrolíticas como α -amilase, ribonucleases, endo- β -gluconase e fosfatases resultando na degradação do endosperma e suas paredes celulares. Grande parte das enzimas da germinação são sintetizadas através de mRNA que são formados durante a fase II, apesar de inicialmente, a síntese de proteínas depender do mRNA que foi formado durante o desenvolvimento e ter permanecido no período seco. Há transporte ativo das substâncias desdobradas na fase anterior, do tecido de reserva para o tecido meristemático onde serão ressintetizadas em substâncias utilizadas no crescimento do embrião. Embora o eixo embrionário já esteja recebendo algum nutriente, ainda não consegue crescer (Bewley, 1997a). Sementes mortas e profundamente dormentes não vão além deste ponto (Guimarães, 1999).

Na terceira fase há a retomada da embebição de água auxiliada pelo crescimento da radícula, que primeiramente ocorre por alongação celular, após ter tido seu ciclo celular ativado com a embebição, e somente após o rompimento do tegumento começa haver divisões mitóticas (Coperland & McDonald, 1999), ou seja, o início da germinação visível (Bewley & Black, 1994). Há síntese de DNA e a atividade respiratória aumenta (Bewley, 1997a). Bioquimicamente, as substâncias desdobradas são reorganizadas em substâncias mais complexas, dando origem a componentes celulares, permitindo o crescimento do eixo embrionário (Coperland & McDonald, 1999 e Bewley, 1997a).

2.3 Crescimento da radícula

A expansão da radícula é um processo dirigido pelo potencial de pressão do embrião, requerendo que as paredes celulares das células do eixo embrionário, que estão entre a ponta da radícula e a base do hipocótilo, cedam. Para Bewley (1997a), o crescimento da radícula, de um modo geral, pode ocorrer em função de três razões.

A primeira razão é que, próximo a protrusão da radícula, o potencial osmótico (ψ_s) das células da radícula torna-se mais negativo por causa do acúmulo de solutos, possivelmente como resultado da hidrólise de reservas presentes dentro das próprias células da radícula. O decréscimo no ψ_s poderia levar ao aumento da embebição de água, fazendo com que haja aumento do turgor e este, por sua vez, promoveria a extensão das células (Bewley, 1997a). Giberelinas (GA) não apresentam efeito nos parâmetros osmóticos, por outro lado, pesquisas mostram que o GA age sobre o metabolismo de carboidratos envolvidos no fornecimento de energia às células do embrião e que podem contribuir para tornar o potencial osmótico celular mais negativo, fazendo com

que a entrada de água ocorra mais rapidamente nas células do embrião, favorecendo assim sua expansão (Taiz et al., 2004).

A segunda possibilidade consiste no fato de que há extensibilidade e afrouxamento da parede celular das células da radícula em resposta à pressão de turgor interna, levando a sua elongação (Bewley, 1997a). A expansina é uma proteína induzida por GA na parede celular da radícula (Kende et al., 1998) e tem sido proposto que ela esteja relacionada ao processo de elongação celular por enfraquecer a parede celular, interpondo-se entre a celulose e o xiloglucano, e podendo, até mesmo, romper as ligações não covalentes entre os polímeros da parede celular (Cosgrove, 1999 e 2000). Chen et al. (2001) verificou que o gene *leEXP8* é expresso apenas na zona de elongação da radícula.

A terceira possibilidade é que os tecidos que circundam o embrião amolecem, permitindo dessa forma a elongação da radícula. Neste processo não há mudança no potencial osmótico (ψ_s) e o potencial de pressão (ψ_p) no embrião é insuficiente para levar à expansão das paredes celulares. A redução da resistência mecânica, imposta pelo endosperma, à elongação da radícula, é controlada pela ação de hidrolases (endo- β -mananase, α -galactosidase e β -manosidase) produzidas e excretadas pelo próprio endosperma (Bewley, 1997a). Dentre as espécies dicotiledôneas que necessitam da síntese de enzimas hidrolíticas que resultam na degradação das paredes celulares do endosperma micropilar e conseqüente amolecimento do endosperma micropilar, permitindo assim, a elongação da radícula, destacam-se: tomate (Groot & Karssen, 1987; Groot et al., 1988; Chen & Bradford, 2000; Toorop et al., 2000 e Ni & Bradford, 1993), pimenta (Watkins & Cantliffe, 1983) tabaco (Leubner-Metzger et al., 1995), melão (Welbaum et al., 1995), *Datura* sp (Sanchez et al., 1986, 1990 e de Miguel & Sanchez, 1992) e *Coffea arabica* (da Silva et al., 2004).

Em sementes de tomate, apenas o amolecimento do endosperma à frente da radícula é suficiente para que ocorra a protrusão da radícula (Groot &

Karssen, 1987). A ocorrência do amolecimento do endosperma foi verificada por meio da quantificação da força requerida para o embrião penetrar o endosperma em sementes de tomate (Toorop et al., 2000). Neste caso, a redução da força necessária para a penetração coincide com a atividade de endo- β -mananase na região do endosperma localizada em frente à radícula, chamado de endosperma micropilar (Toorop et al., 2000).

Em sementes de café (*Coffea arabica*), o crescimento do embrião é controlado pelo aumento no potencial de pressão nas células do embrião e pela extensão das paredes celulares (da Silva et al., 2004). Concomitante com o crescimento do embrião, existe um declínio da força exercida pelo endosperma à penetração do embrião, coincidindo com o aumento na atividade de endo- β -mananase e de porosidades nas paredes celulares na região do endosperma micropilar (da Silva et al., 2004). Esses resultados confirmam que, em sementes de café, além do crescimento do embrião, há degradação das paredes celulares do endosperma, com a finalidade de facilitar a protrusão da radícula (da Silva et al., 2004).

2.4 Papel da endo- β -mananase na hidrólise da parede celular

A endo- β -mananase, uma das enzimas mais estudadas em sementes de tomate, está envolvida na hidrólise da parede celular do endosperma durante a germinação e pós-germinação, estando associada com o amolecimento dos tecidos e mobilização de reservas, respectivamente (Groot et al., 1988; Nonogaki et al., 1992, 1995, 1998a, 1998b, 2000; Nonogaki & Morohashi, 1996; Toorop et al., 1996; Voigt & Bewley, 1996; Dahal et al., 1997; Still & Bradford, 1997 e Still et al., 1997).

Diferentes isoformas eletroforéticas e genes de endo- β -mananase são sequencialmente expressos nas diferentes partes do endosperma (Nonogaki &

Morohashi, 1996 e Nonogaki et al., 2000). A isoforma $M\alpha$ (Nonogaki & Morohashi, 1996) e o gene *LeMan2* (Nonogaki et al., 2000) são expressos no endosperma micropilar, e estão envolvidos com o amolecimento do endosperma micropilar antes da protrusão da radícula (Nonogaki & Morohashi, 1996 e Nonogaki et al., 2000). Já as isoformas M1 (Nonogaki & Morohashi, 1996 e Bewley et al., 1997), M2, M3 (Nonogaki & Morohashi, 1996) e o gene *LeMan1* (Bewley et al., 1997 e Nonogaki et al., 2000) são expressos no endosperma lateral e estão envolvidos com a mobilização de reservas de galactomanas do endosperma lateral (Nonogaki & Morohashi, 1996; Bewley et al., 1997 e Nonogaki et al., 2000). Isto implica que o amolecimento do endosperma micropilar e a degradação dos carboidratos de reserva da parede celular no endosperma lateral são processos fisiológicos distintos que utilizam isoformas de enzimas específicas (Chen et al., 2002).

A endo- β -mananase também parece estar envolvida com o amolecimento do endosperma em sementes de pimenta (Watkins et al., 1985), datura (Sanchez & de Miguel, 1997) e café (*Coffea arabica*) (da Silva et al., 2004).

2.5 Dormência de sementes

Durante a maturação da semente, o embrião entra em uma fase quiescente em resposta à dessecação. Estas sementes germinarão se forem submetidas a condições ótimas como níveis adequados de água e oxigênio, temperatura adequada e ausência de inibidores. Em muitos casos, sementes viáveis não irão germinar, apresentando, portanto, o fenômeno denominado de dormência (Taiz et al., 2004).

Componentes do processo de germinação tais como embebição, respiração, síntese de ácidos nucléicos e proteínas e inúmeros outros eventos metabólicos, podem ocorrer em uma semente dormente, sem que haja protrusão

da radícula (Bewley & Black, 1994). Este processo, caracterizado pelo atraso da germinação, pode ser entendido como uma adaptação das espécies, permitindo que estas sobrevivam e colonizem novos ambientes após superar situações estressantes que as sementes venham a enfrentar (Baskin & Baskin, 1998).

Várias são as formas em que a dormência se manifesta, podendo ser desde alguma resistência à entrada de água para a germinação até os mais complexos mecanismos hormonais que controlam o desenvolvimento da semente (Bewley & Black, 1994).

De acordo com Nikolaeva (1969 e 1977) a dormência em sementes é classificada em endógena e exógena. Esta classificação foi ampliada por Baskin & Baskin (1998), que introduziram os conceitos de dormência primária e secundária. A classificação de dormência encontra-se resumida na tabela 1.

Na dormência endógena, algumas características do embrião previnem a germinação. Segundo Bewley (1997a), o próprio embrião é dormente promovendo a dormência embrionária. Na dormência exógena, alguma característica da estrutura, incluindo endosperma, tegumento ou fruto cobrindo o embrião, previne a germinação. Esta dormência é conhecida por dormência mecânica e quando os embriões são isolados das sementes e embebidos em condições apropriadas, germinam (Bewley & Black, 1994).

Segundo Baskin & Baskin (1988), a dormência primária ou inata se estabelece na semente antes de sua dispersão exigindo tratamentos ou condições específicas para se tornar uma semente quiescente, e a dormência secundária se instala na semente após a dispersão. Na dormência secundária, duas situações podem ocorrer: a semente com dormência primária perde a dormência após a dispersão, mas, sob uma condição desfavorável à germinação, adquire novamente dormência; ou a semente é dispersa sem qualquer tipo de dormência, passando a dormente sob uma condição desfavorável ou estressante.

TABELA 1 Classificação dos tipos de dormência (Baskin & Baskin, 1998).

Categorias	Grupos	Causada por	Mecanismo
Dormência primária (pré-dispersão)	Exógena (fora do embrião)	Tecidos maternos ou endosperma	- Inibição da absorção de água (dormência física); - Mecanismo que restringe a expansão do embrião e a protrusão da radícula (dormência mecânica); - Modificação de trocas gasosas; - Prevenção dos lixiviados inibidores do embrião; - Fornece inibidores ao endosperma (dormência química).
	Endógena (dentro do embrião)	1. Imaturidade do embrião (dormência morfológica); 2. Bloqueio metabólico (dormência fisiológica) 3. Dormência morfo-fisiológica (1 e 2 combinadas)	- Embrião tem que completar o desenvolvimento para depois germinar; - Mecanismo fisiológico pouco conhecido.
	Combinada	Combinação de dormência exógena e endógena	
Dormência secundária (pós-dispersão)		Bloqueio metabólico, induzida em sementes não dormentes quando as condições ambientais não são favoráveis à germinação.	- Mecanismo fisiológico pouco conhecido

2.6 ABA impõe dormência endógena

Acredita-se que a dormência do embrião deva-se à presença de inibidores, especialmente o ABA, bem como à ausência de promotores de crescimento, como a giberelina (Taiz et al., 2004).

Mutantes ABA-deficientes (*aba*) de *Arabidopsis* mostraram-se não dormentes na maturidade. Quando foram realizados cruzamentos recíprocos entre *aba* e plantas tipo selvagem, as sementes apresentaram dormência somente quando o embrião foi capaz de produzir ABA. Nem o ABA materno nem a aplicação exógena foram eficazes na indução da dormência do embrião *aba*. Por outro lado, o ABA derivado do tecido materno constitui o principal pico presente nas sementes e é necessário para outros aspectos do desenvolvimento dessas, como, por exemplo, evitar a viviparidade na fase intermediária da embriogênese. A dormência é também muito reduzida em sementes do mutante ABA-insensível (*abi1*, *abi2* e *abi3*), ainda que tais sementes contenham concentrações mais altas de ABA do que aquelas do tipo selvagem durante todo o desenvolvimento (Figura 1) (Taiz et al., 2004).

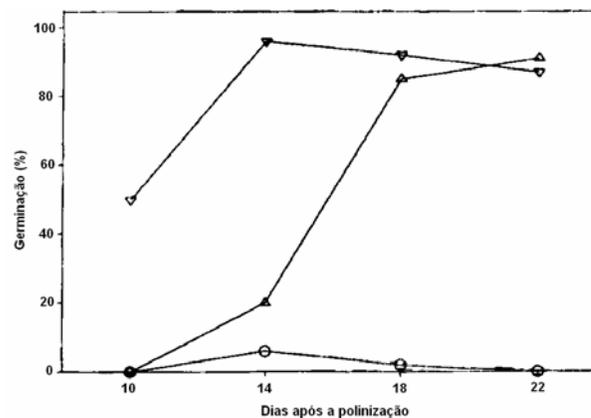


FIGURA 1 Germinação de sementes em *Arabidopsis thaliana*. (o) Forma selvagem; (Δ) Mutantes ABA-deficientes; (∇) mutante ABA-insensível (Taiz et al., 2004).

Segundo Liu (1996), a presença de ABA nas sementes de tomate e seu efeito na dormência estão relacionados com a inibição da expansão da radícula e principalmente alongação da radícula, uma vez que as sementes não apresentaram um padrão de absorção de água trifásico.

O crescimento do embrião antes da protrusão da radícula é comum em sementes com embrião imaturo, como por exemplo, em aipo (*Apium graveolens*) (Jacobsen & Pressman, 1979 e van der Torn & Karssen, 1992). Sementes de café têm o embrião maduro completamente diferenciado, mas este ainda tem que crescer antes de completar a germinação (da Silva et al., 2004). Valio (1976) propôs que o ABA inibe a germinação de sementes de café por inibir o crescimento do embrião. da Silva et al. (2004) mostraram que o ABA inibiu o aumento do turgor no embrião, controlando assim, o crescimento potencial do embrião durante a germinação. Em sementes de café, o ABA é sintetizado de novo no embrião durante a embebição das sementes. Hilhorst (1995) sugere que o ABA possa suprimir a hidrólise de enzimas que atuam no afrouxamento da parede celular das células do embrião e, assim, inibir a alongação e extensão. Schopfer & Plachy (1985) e da Silva et al. (2004) propuseram que o ABA inibiu a expansão do embrião em *Brassica napus* e do embrião em café, respectivamente, por inibir o afrouxamento da parede celular das células e assim, limitando o crescimento do embrião.

2.7 ABA impõe dormência exógena

Karssen et al. (1987), estudando sementes de tomate mutantes deficientes em ABA (*aba^w*), verificaram que o ABA é essencial para a indução de dormência em sementes. Em sementes de tomate, o primeiro sítio de ação do ABA é provavelmente no endosperma micropilar, onde sua presença pode inibir a expressão de enzimas hidrolíticas nas células da parede que são responsáveis pelo amolecimento dessas células (Groot et al., 1987, 1988). Ni & Bradford

(1992) propuseram que baixos níveis de ABA podem apenas diminuir a atividade de enzimas, enquanto altas concentrações poderiam inibir completamente a atividade enzimática. Este amolecimento ocorre durante a embebição e antes da protrusão da radícula, sendo assim imprescindível para a germinação de sementes de alface (Pavlista & Valdovinos, 1978), pimenta (Wakins & Cantliffe, 1983), tomate (Groot & Karssen, 1987 e Toorop et al., 2000) e café (da Silva et al., 2004). Em sementes de alface, ABA endógeno inibiu a atividade de endo- β -mananase e celulase (Bewley, 1997b). Em sementes de fenugreek e carob, o ABA suprimiu atividade de endo- β -mananase no endosperma (Kontos et al., 1996). Em sementes de tabaco, a β -1,3-glucanase foi correlacionada com ruptura do endosperma micropilar, e quando as sementes foram embebidas em ABA, verificou-se diminuição dessa ruptura (Leubner-Metzger et al., 1995). No endosperma micropilar de tomate, ABA não inibiu a celulase (Toorop, 1998 e Bradford et al., 2000), a endo- β -mananase (Toorop et al., 1996; Still & Bradford, 1997 e Toorop, 1998), a α -galactosidase, a β -manosidase, a β -glucosidase ou a exo-poligalacturonase (Toorop, 1998), mas a protrusão da radícula foi prevenida. Em sementes de café, o ABA reduziu a atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar para aproximadamente 10% ou menos da atividade de endo- β -mananase encontrada em endosperma micropilar de sementes embebidas em água, não reduziu a atividade de endo- β -mananase no restante do endosperma, não inibiu a atividade de celulase no endosperma, mas inibiu a germinação (da Silva et al., 2004). De acordo com da Silva et al. (2004), o ABA inibiu ainda a segunda fase do amolecimento do endosperma micropilar, presumivelmente por inibir a atividade de pelo menos duas isoformas de endo- β -mananase e ou, indiretamente, por inibir o turgor da radícula. Por meio de estudos com sementes de tomate, verificou-se que o ABA

inibe a emergência da radícula, no entanto, não impede o amolecimento inicial do endosperma micropilar (Toorop et al., 1996).

2.8 Regulação da germinação pelo balanço hormonal

Controles hormonais e ambientais que regulam a germinação são caracterizados com relação aos seus efeitos na germinação visível, protrusão da radícula, e na expressão de genes associadas com mobilização de reservas (Finkelstein & Gibson, 2001).

A teoria do balanço hormonal de sementes é principalmente baseada nos efeitos da aplicação dos reguladores de crescimento ABA, hormônio inibidor do crescimento, e GA, hormônio promotor do crescimento (Groot et al., 1987). O ABA é inibidor do crescimento por induzir dormência e inibir a germinação de sementes (Bewley & Black, 1994). Já o ácido giberélico é promotor do crescimento por agir na extensibilidade da parede celular, na atividade enzimática e na variação do potencial osmótico, interferindo, portanto, diretamente na germinação, mobilização de açúcares e na superação de dormência (Karssen, 1995).

Dúvidas na validade da teoria do balanço hormonal em sementes foram relatadas por Bewley & Black (1982). Todavia, Groot et al. (1987) realizaram a separação da ação do ABA e do GA no tempo e lugar, afirmando que este fato seja um forte argumento para sustentar a existência do balanço hormonal na regulação da dormência de sementes. Os autores verificaram que o ABA é restrito ao desenvolvimento, impondo dormência, enquanto GA é requerido apenas durante a germinação.

Segundo Taiz et al. (2004), a perda da dormência do embrião está frequentemente associada à queda acentuada na razão entre ABA e GA. Cunha & Casali (1989) salientam que o efeito inibidor do ABA na germinação pode ser revertido pelo GA₃, quando utilizado em concentrações que superam o seu teor,

mas, a partir de um nível crítico de ABA, sua ação inibidora prevalece. A aplicação exógena de GA, além de contrabalançar a inibição imposta pelo ABA, induz o crescimento do embrião e estimula o processo germinativo, confirmando sua participação na superação da dormência das sementes (Wang et al., 1998).

Por meio de estudos com sementes de mutantes deficientes em GA foi observado que a germinação de sementes de tomate é totalmente dependente de GA endógena ou exógena (Groot & Karssen, 1987). Tanto os níveis como a sensibilidade ao GA apresentam importância no controle da germinação e dormência (Hilhorst et al., 1986). Sementes que são deficientes tanto de ABA como de GA requerem níveis de GA muito menor para sua germinação (Karssen e Lačka, 1986).

Ni & Bradford (1993) afirmaram que a dormência de sementes de tomate seria controlada pelo balanço entre GA e ABA, de forma que os dois hormônios atuariam promovendo e inibindo respectivamente a síntese de enzimas necessárias ao processo de germinação dessas sementes.

2.9 Modelos de germinação

Vários modelos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de explicar os mecanismos e regulação da germinação de sementes de tomate (Groot, 1987 e Toorop et al., 2000) e café (*Coffea arabica*) (da Silva et al., 2004).

O modelo de germinação proposto por Groot (1987) é influenciado pela ação endógena do ABA e GA. Para o autor, a ação dos dois hormônios é separada no tempo e local da semente. O ABA atua durante o desenvolvimento da semente, promove a inibição do amolecimento do endosperma e reduz o crescimento do embrião. O primeiro efeito do ABA é diminuído durante o armazenamento, mas o último ainda é visível mesmo após longos períodos de armazenamento a seco. Já o GA, produzido no embrião e excretado para as células do endosperma, é ativo apenas durante a germinação e age de duas

maneiras. Primeiramente na hidrólise das células da parede do endosperma, resultando no amolecimento das camadas celulares que oferecem resistência mecânica ao embrião e, por último, estimulando o crescimento do embrião.

Toorop et al. (2000) sugerem que o amolecimento do endosperma em sementes de tomate constitui um processo que ocorre em dois estágios. O primeiro estágio do amolecimento do endosperma micropilar não é inibido pelo ABA e está correlacionado com a atividade de endo- β -mananase, até as 45h de embebição, e, com o aparecimento de poros nas células da parede do endosperma micropilar. A presença desta enzima no endosperma micropilar não está relacionada com o segundo estágio que ocorre entre as 45h de embebição e a protrusão da radícula, concluindo que neste segundo estágio, outros fatores tornam-se limitantes para completar a germinação. Este fator não seria a resistência da testa, visto que Groot & Karssen (1987) mostraram que a força de ruptura da testa é pequena, 0,1 Newton, sendo o endosperma micropilar o principal componente de resistência mecânica. Este segundo estágio é controlado pelo ABA, o qual pode regular as enzimas associadas com o futuro amolecimento do endosperma micropilar.

Da Silva et al. (2004) desenvolveram um modelo para a germinação de sementes de café (*Coffea arabica*), as quais precisam tanto do crescimento do embrião como de degradação do endosperma micropilar pelas enzimas endo- β -mananase e celulase. Como no modelo desenvolvido por Toorop et al. (2000), o amolecimento do endosperma micropilar ocorre ao final de dois estágios e a presença do ABA controla apenas o segundo estágio. O aumento da atividade de celulase coincidiu com o primeiro estágio do amolecimento e o aumento da atividade de endo- β -mananase com o segundo estágio. A inibição do segundo estágio ocorreu presumivelmente pelo fato do ABA inibir a atividade de duas isoformas de endo- β -mananase. O aumento na atividade de endo- β -mananase e celulase coincidiu com a diminuição da força requerida para ruptura do

endosperma e com a surgimento dos poros nas células da parede. Impressão dos tecidos mostrou que a atividade de endo- β -mananase foi espacialmente regulada no endosperma. Durante a embebição há uma breve elevação do conteúdo de ABA no embrião, sugerindo que o ABA endógeno possa controlar além do amolecimento do endosperma, o potencial crescimento do embrião em sementes de café (*Coffea arabica*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos frutos e beneficiamento das sementes

Para definir o método de coleta do fruto no campo para o processamento, frutos de coloração verde de *S. lycocarpum* que aparentavam estarem maduros foram colhidos na planta ou coletados após dispersão natural (coletados sobre o solo) em agosto de 2004, em áreas do município de Lavras, MG, situadas na bacia hidrográfica do Ribeirão Santa Cruz entre as coordenadas geográficas 21° 09'39" e 21° 20'14" de latitude sul e 44° 51'36" e 45° 00'00" de longitude oeste de Greenwich. As características externas dos frutos avaliadas para classificá-los como maduros foram: tamanho grande, menos pilosidade, menos brilho e coloração verde fosca com manchas amarronzadas. Os frutos foram transportados para o galpão de beneficiamento do Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e beneficiados. O beneficiamento dos frutos ocorreu após apresentarem-se moles e consistiu em cortá-los ao meio seguido da retirada da polpa e passagem da mesma em peneiras sob água corrente para a separação das sementes. Os frutos colhidos na planta e coletados após dispersão natural foram beneficiados separadamente e as sementes dos respectivos frutos compuseram dois lotes de sementes denominados de lote de sementes colhidas e de lote de sementes coletadas. Assim, neste estudo considerou-se que: sementes originadas de frutos colhidos na planta = semente colhida; e, sementes originadas de frutos coletados no chão = sementes coletadas.

Danos mecânicos às sementes foram evitados e, quando ocorreram, as mesmas foram eliminadas. Para a obtenção de um lote homogêneo, as sementes pequenas e mal formadas foram descartadas. Após a retirada da água superficial com papel mata-borrão, as sementes foram mantidas na sala de secagem (20°C e

60% UR) até alcançarem 8% de umidade. As sementes foram armazenadas em sacos plásticos selados dentro da câmara fria ($5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) até o início dos experimentos.

3.2 Determinação do grau de umidade

O grau de umidade das sementes colhidas e das sementes coletadas foi determinado submetendo-se 4 repetições de aproximadamente 0,5 g de sementes à estufa regulada a 103°C por 17 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

3.3 Germinação

Para avaliar se havia diferença no potencial de germinação de sementes de *S. lycocarpum* entre as sementes colhidas e as sementes coletadas, foi realizado um experimento de germinação, utilizando 4 repetições de 25 sementes. As sementes que tiveram a superfície externa previamente esterilizada com hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos foram colocadas para embeber entre folhas de papel de germinação umedecidas com 6 ml de água destilada ou 6 ml de uma solução de 100 μM ABA (Sigma) em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. As placas de Petri foram colocadas em câmara de germinação tipo BOD reguladas sob luz e temperatura constantes de 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C e sob luz e temperatura alternadas de 20/ 30°C a cada 12 horas. A solução de ABA foi preparada com KOH seguido de neutralização por 1N HCl (da Silva et al., 2004). Em paralelo, 4 repetições de 25 sementes originadas de frutos coletados tiveram a superfície externa previamente esterilizada com hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos. As sementes tiveram o endosperma micropilar removido com o auxílio de um bisturi e foram colocadas para embeber entre folhas de papel de germinação umedecidas com 6 ml de água destilada em placas de Petri

de 90 mm de diâmetro que foram incubadas em BOD, regulada sob luz e temperatura contantes de 20, 25 e 30°C, e luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas. Este experimento teve o intuito de verificar se a germinação das sementes era facilitada após a remoção do endosperma micropilar e o efeito da temperatura no endosperma micropilar. Os experimentos de germinação foram avaliados diariamente tendo a protrusão da radícula (1mm de comprimento) como critério.

A germinação foi avaliada através da porcentagem final de germinação e o vigor, através do índice de velocidade de germinação (IVG) utilizando a equação de Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

onde:

G_1, G_2, G_n = número de sementes com protrusão da radícula com pelo menos 1mm de comprimento presentes na primeira contagem, na segunda contagem, até na última contagem.

N_1, N_2, N_n = número de dias de embebição à primeira, segunda contagem, até a última contagem.

Após a protrusão da radícula as sementes foram transportadas para uma placa de petri de 90 mm de diâmetro contendo duas folhas de papel de germinação embebidas em 6ml de água destilada para que imagens da semente imediatamente após a protrusão da radícula e diariamente durante o desenvolvimento da plântula fossem obtidas a partir de uma câmara digital Cânon Power Shot S40, 4.0M pixels.

3.4 Caracterização morfológica do fruto e da semente

Frutos coletados no chão e suas sementes tiveram suas cores e formas avaliadas visualmente e as dimensões quantificadas com o auxílio de um paquímetro digital. A quantificação das dimensões dos frutos e das sementes foi obtida a partir da média de 10 frutos e de 100 sementes, respectivamente. Os frutos foram cortados no sentido transversal e as sementes cortadas no sentido longitudinal, utilizando um estilete, para observação das estruturas internas da semente. Imagens dos frutos e das sementes foram obtidas com o uso de uma câmara digital (Cânon Power Shot S40, 4.0M pixels) acoplada a um microscópio estereoscópico (modelo Leica MZ 75).

3.5 Caracterização morfo-anatômica do endosperma micropilar e lateral a partir da microscopia eletrônica de varredura

Os parâmetros morfo-anatômicos avaliados no endosperma micropilar foram espessura, diâmetro das células e espessura da parede celular e no endosperma lateral, foram diâmetro das células e espessura da parede celular.

A quantificação da espessura do endosperma micropilar foi realizada a partir da média do comprimento das camadas de células que constituem o endosperma micropilar de três sementes. Para a quantificação do diâmetro das células foram realizadas duas medições em cada célula, uma no sentido de maior comprimento e a outra no sentido de menor comprimento, obtendo um valor médio por célula em dez células de três sementes. A quantificação da espessura da parede celular foi realizada a partir da média da espessura da parede celular de dez células de três sementes.

A quantificação destes parâmetros foi feita a partir do programa Arc Map, utilizando as eletromicrografias geradas através de microscópio eletrônico de varredura (Leo Evo 40). As eletromicrografias geradas, considerando a distância de trabalho, tamanho do feixe de elétrons, brilho, contraste, velocidade

de varredura e aceleração de voltagem, foram gravadas no formato tif e impressas.

Todas as etapas de preparo da amostra até a sua visualização em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, utilizando a metodologia de Alves (2004).

As sementes de *S. lycocarpum* originadas de frutos coletados foram semeadas entre folhas de papel de germinação, embebidas em 6 ml de água destilada em placas de Petri de 90mm de diâmetro que foram incubadas em BOD regulada sob luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas por um período de 24 horas.

Para a obtenção das amostras, foram feitos cortes longitudinais, com auxílio de lâminas de barbear, em três sementes. Em seguida, as amostras foram fixadas permanecendo por 24 horas imersas no fixador Karnovsky modificado - Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2 e CaCl₂ 0,001M - à temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas em aldeído com três passagens de 10 minutos em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 e em seguida realizada a pós-fixação das amostras, imergindo-as em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e em solução tampão cacodilato 0,1 M com pH 7,2, durante 1 hora. As amostras fixadas em tetróxido de ósmio foram lavadas três vezes com água destilada e, em seguida, desidratadas em soluções de concentração crescente de acetona de 25% e de 50%, onde as amostras permaneceram por 10 minutos em cada concentração. Depois, as amostras foram imersas em concentração de 75% de acetona onde permaneceram por 2 horas. Em seguida as amostras foram colocadas na concentração 90% durante 10 minutos, e, finalmente submetidas à concentração de 100%, por três vezes durante 10 minutos cada. As amostras, ainda úmidas de

acetona, foram levadas a uma câmara hermeticamente fechada e resfriadas a 5° C para a secagem ao ponto crítico. A secagem ao ponto crítico foi realizada para que a tensão superficial da acetona ao final da secagem não destruísse detalhes superficiais das amostras. Em seguida, os stubs (suporte para as amostras), foram envoltos em papel alumínio e as amostras presas sobre o mesmo. Sobre o papel alumínio foi colocado fita adesiva de carbono para fixar as amostras de modo a permitir a visualização das estruturas das sementes. Depois, as amostras receberam um banho de ouro para aumentar sua resistência e condutividade elétrica, permitindo, assim, uma melhor visualização das estruturas internas da semente.

3.6 Curva de embebição

A determinação da curva de embebição foi realizada para as sementes originadas de frutos coletados, utilizando-se 8 repetições de 8 sementes esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos. As sementes foram semeadas em rolos de papel de germinação umedecidos em água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso inicial do papel. Os rolos contendo as sementes foram incubados em BOD regulada sob luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas. As sementes tiveram o peso fresco quantificado de hora em hora até a sexta hora de embebição, de três em três horas até as 48 horas do início da embebição e diariamente até o 30^o dia de embebição.

3.7 Peso fresco dos embriões durante a embebição

Para avaliar o peso fresco do embrião durante a germinação de sementes de *S. lycocarpum*, dez embriões tiveram o seu peso fresco monitorado. Os embriões foram isolados diariamente de sementes originadas de frutos coletados que foram inicialmente esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% por 10

minutos e colocadas para germinar entre folhas de papel de germinação umedecidas em 6 ml de água destilada ou em 6 ml de uma solução de 100 μ M ABA. A placa de Petri de 90mm de diâmetro contendo as sementes foi incubada em BOD regulada sob luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas.

Durante a embebição foram obtidas imagens das sementes com o uso de uma câmara digital (Cânon Power Shot S40, 4.0M pixels) acoplada a um microscópio estereoscópico (modelo Leica MZ 75). As imagens foram obtidas de sementes com tegumento intacto no início da fase II de embebição, de sementes com tegumento rompido no momento que antecede a protrusão da radícula, de sementes com parte do tegumento rompido removido mostrando a presença do endosperma micropilar e de sementes com o endosperma micropilar removido mostrando o embrião.

3.8 Determinação da força de ruptura

A força de ruptura do endosperma micropilar foi determinada seguindo a metodologia utilizada por Groot & Karssen (1987), Toorop et al. (2000) e da Silva et al. (2004). Sementes intactas originadas de frutos coletados foram embebidas em água destilada ou em solução de 100 μ M ABA, conforme descrito no item 3.3 por 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias sob a condição de luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas. O aparelho utilizado foi um texturômetro (Stable Microsystems Texture Analyser) do Laboratório de Microestrutura e Arquitetura Alimentar do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA. Na parte superior do aparelho foi acoplada uma sonda de ponta hemisférica de 2mm de diâmetro e, na sua base, um bloco de polivinil que apresenta um orifício de 2,2mm de diâmetro. O endosperma micropilar foi removido da semente intacta por meio de um bisturi e o embrião foi retirado sem que houvesse danos ao endosperma micropilar. O endosperma micropilar (com tegumento presente), foi posicionado na sonda e perfurado pela mesma. A

penetração da sonda no endosperma micropilar foi possível devido ao movimento vertical da sonda para baixo. A força requerida para a ruptura do endosperma micropilar expressa em Newton (N), foi usada como um parâmetro de resistência mecânica do endosperma micropilar durante a germinação das sementes. O dado de resistência foi obtido da média de 30 sementes individuais retiradas de forma aleatória durante a embebição das sementes.

3.9 Quantificação da atividade de endo- β -mananase

Para a extração e quantificação da atividade da enzima endo- β -mananase foram utilizados os mesmos 30 endospermas micropilares embebidos em água destilada e em 100 μ M ABA usados para determinar a força de ruptura do endosperma micropilar mencionada no item 3.8. A extração da enzima foi feita em 200 μ l de tampão de extração Hepes (0,1M pH 8,0) com 0,5M de NaCl. A atividade de endo- β -mananase foi analisada em gel de 0,75 mm de espessura, contendo 0,5% (peso/volume) de locust bean gum (Sigma) em tampão McIlvaine (pH 5,0) e 0,8% de Agarose tipo III-A (Sigma). O gel que se encontrava sobre gelbond film (Pharmacia) foi perfurado de modo a obter orifícios de tamanho suficiente para receber a aplicação de 2 μ l do estrato da amostra. O gel foi colocado em uma BOD úmida na ausência de luz sob 25°C por 21 horas e, em seguida, revelado. A revelação do gel foi feita pela imersão do mesmo em solução tampão McIlvaine por 30 minutos, lavado em água destilada para remover o excesso do tampão, imerso em Vermelho Congo (Sigma) 0,5% por 10 minutos, em etanol 96% por 10 minutos para remoção do excesso do Vermelho Congo, lavado em água destilada para a remoção do etanol e, finalmente, imerso em solução 1M de NaCl até revelação. Todas as etapas da revelação foram realizadas em uma plataforma agitadora com movimentos rotatórios na horizontal. A atividade da endo- β -mananase foi identificada pela

ocorrência de círculos brancos no gel. Para a quantificação da endo- β -mananase foi calculada a média das medidas do diâmetro de cada amostra em duas direções com um paquímetro digital. O cálculo da atividade de endo- β -mananase nas amostras foi feita por meio de comparação com uma curva padrão gerada com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme, North Rocks, Sydney, Austrália). Fotos do gel foram obtidas com câmera digital (Cânon Power Shot S40, 4.0 M pixels) para o cálculo da atividade da enzima de acordo com Downie et al. (1994).

3.10 Localização da atividade de endo- β -mananase

Dez sementes, originadas de frutos coletados, tiveram a superfície externa esterilizada com hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, sendo colocadas para embeber em 6 ml de água destilada ou em 6 ml de uma solução de 100 μ M ABA (Sigma), conforme descrito no item 3.3, por 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias sob luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas. Depois, foram cortadas no sentido longitudinal com auxílio de uma lâmina de barbear. O excesso de umidade das partes da semente foi removido com papel de filtro, e imediatamente as partes foram colocadas sobre um gel de 0,75 mm de espessura contendo 0,5% (peso/volume) de locust bean gum (Sigma) em tampão McIlvaine (pH 5,0) e 0,8% de Agarose tipo III-A (Sigma). O gel, que se encontrava sobre gelbond film (Pharmacia), foi transferido para uma incubadora úmida por 3 horas sob temperatura ambiente. Após esse período, as partes das sementes foram removidas do gel com auxílio de uma espátula e, em seguida, o gel foi revelado, conforme descrito acima no item 3.9. A localização da atividade de endo- β -mananase foi identificada pela ocorrência de pontos claros no gel. O gel foi fotografado com câmara digital (Cânon Power Shot S40, 4.0 M pixels).

3.11 Análise estatística

Os dados dos itens 3.3, 3.5, 3.7, 3.8 e 3.9 foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, usando-se o programa Sisvar 4.3 (Furtado, 2000). Foi realizado o ajuste de equações de regressão para descrever a redução da força de ruptura do endosperma micropilar em função da atividade da enzima endo- β -mananase, usando-se o programa SigmaPlot2000. A correlação entre a força de ruptura do endosperma micropilar e a atividade da enzima endo- β -mananase foi comparada usando-se o teste t a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

4.1 Germinação

A germinação das sementes de *S. lycocarpum* foi lenta tanto para as sementes colhidas como para as sementes coletadas. A maior porcentagem de germinação para as sementes colhidas ao longo de 40 dias de embebição em água foi de 40%, enquanto que no mesmo período de embebição em água, a maior porcentagem de germinação alcançada pelas sementes coletadas foi de 91% (Figura 2A e 2B). O maior valor do índice de velocidade de germinação (IVG) apresentado pelas sementes colhidas foi de 1,49 e pelas sementes coletadas foi de 4,14 (Tabela 2). Os valores da porcentagem de germinação e do IVG encontrado para as sementes colhidas e coletadas foram estatisticamente diferentes pelo teste de Scott-Knott a 5%, indicando que as sementes coletadas mostram-se menos dormentes que as sementes colhidas (Tabela 2).

Dentre as sete condições de germinação avaliadas, a que se mostrou ótima para a germinação das sementes coletadas de *S. lycocarpum* foi a condição de luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas. Sob estas condições foi alcançada a máxima porcentagem de germinação (91%) no menor tempo (Figuras 2B e Tabela 2). A protrusão da radícula (Figura 3) iniciou-se no sexto dia e atingiu 50% no vigésimo sexto dia de embebição (Figuras 2B).

A germinação das sementes coletadas que tiveram o endosperma micropilar removido (Figura 2C) não apresentou diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade quando embebidas em água sob as condições de temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C e a condição de luz e temperatura alternadas de 20/30°C, a cada 12 horas (Tabela 2). Os valores de germinação, e, principalmente a velocidade de germinação de sementes

coletadas com endosperma micropilar removido, foram superiores aos resultados da germinação de sementes coletadas intactas (Tabela 2).

As sementes coletadas embebidas em 100 μM ABA tiveram a germinação completamente inibida (Figura 2D).

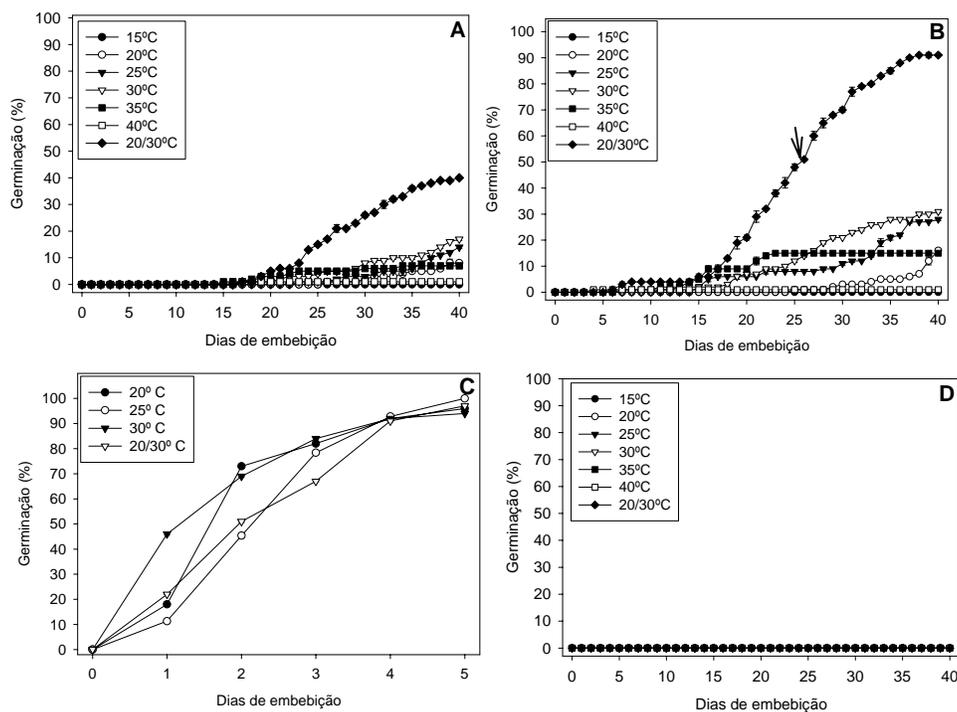


FIGURA 2 Germinação de sementes de *S. lycocarpum* sob diferentes condições: A) Sementes colhidas embebidas em água; B) Sementes coletadas embebidas em água; C) Sementes coletadas com endosperma micropilar removido; D) Sementes coletas embebidas em 100 μM ABA. Pontos representam a média de germinação de 100 sementes e as barras os desvios padrões médios de 4 repetições. Seta indica 50% de germinação.

TABELA 2 Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes colhidas intactas, de sementes coletadas intactas e de sementes coletadas com endosperma micropilar removido ao final dos 40 dias de embebição sob diferentes condições de germinação.

Condições de germinação	Germinação (%)						IVG					
	Sementes colhidas intactas		Sementes coletadas intactas		Sementes coletadas com endosperma micropilar removido		Sementes colhidas intacta		Sementes coletadas intacta		Sementes coletadas com endosperma micropilar removido	
15°C	0	Ca	0	Da			0,00	Aa	0,00	Ba		
20°C	8	Ca	16	Ca	100	Aa	0,27	Aa	0,51	Ba	51,80	Aa
25°C	14	Ba	28	Ba	97	Aa	0,42	Aa	1,09	Ba	43,06	Aa
30°C	17	Ba	31	Ba	94	Aa	0,58	Aa	1,26	Ba	64,90	Aa
35°C	7	Ca	15	Ca			0,33	Aa	0,97	Ba		
40°C	1	Ca	1	Da			0,06	Aa	0,25	Ba		
20/30°C	40	Ab	91	Aa	97	Aa	1,49	Ab	4,14	Aa	49,03	Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

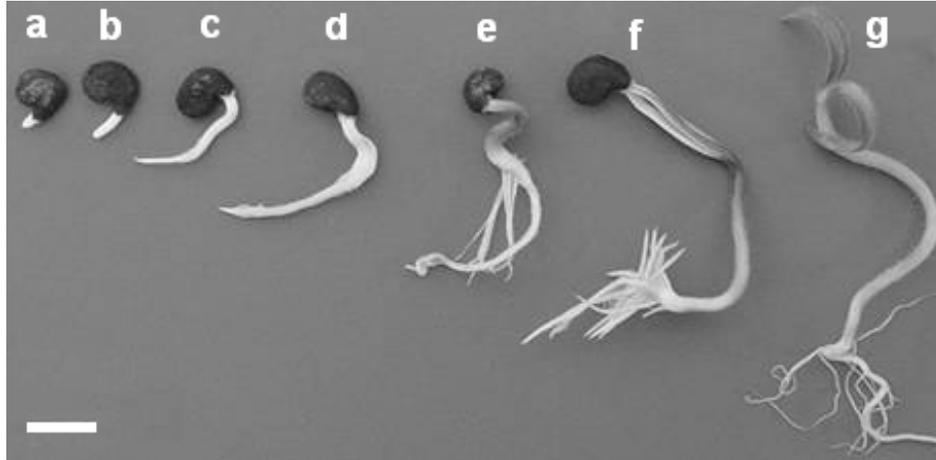


FIGURA 3 Protrusão da radícula e desenvolvimento da plântula sob luz e temperatura alternadas de 20/30°C a cada 12 horas. (a) representa a protrusão da radícula; e (b a g) representa o desenvolvimento da plântula. Barra indica 1 cm.

4.2 Morfologia do fruto e da semente de *Solanum lycocarpum*

O fruto de *S. lycocarpum* é uma baga que pode atingir 13 cm de diâmetro, apresenta coloração verde mesmo quando maduro (Figura 4A) e apresenta endocarpo polposo, amarelado (Figura 4B) e aromático. Em média, os frutos de *S. lycocarpum* apresentam 545 ± 99 sementes.

As sementes de *S. lycocarpum*, quando secas a 8,0% de umidade, apresentam tegumento rígido de coloração marrom-escuro, forma achatada (Figura 4C), comprimento, largura e espessura médios de 7mm, 5,17mm e 1,78mm, respectivamente. Um quilo de sementes, eliminando as sementes mal formadas, contém em média 35.000 sementes. O embrião apresenta forma espiral e encontra-se encaixado no endosperma. Os cotilédones localizam-se na parte interna e o hipocótilo e a radícula, de forma curvilínea, na parte externa. O

endosperma é dividido em duas partes, sendo, que a parte do endosperma oposta à ponta da radícula é denominada endosperma micropilar e a parte restante do endosperma é denominada endosperma lateral (Figura 4D).

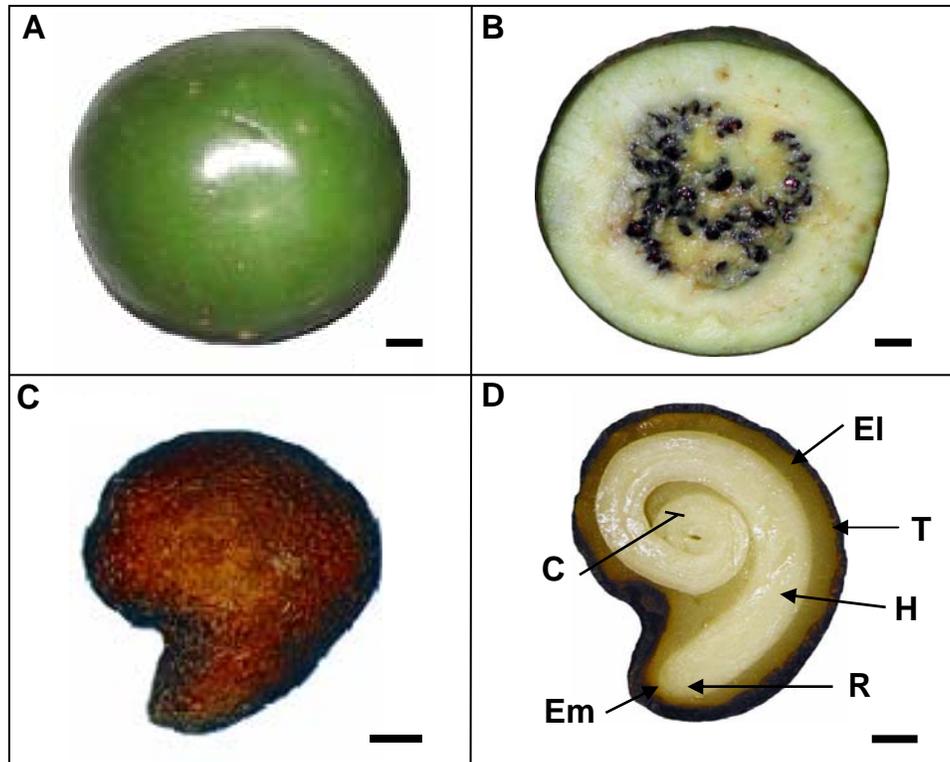


FIGURA 4 Frutos e sementes de *S. lycocarpum*. A) Fruto, B) Corte transversal do fruto maduro, C) Face externa da semente intacta embebida em água por 24 horas, D) Corte longitudinal da semente embebida em água por 24 horas com detalhes do endosperma micropilar (Em), endosperma lateral (El), radícula (R), hipocótilo (H), cotilédones (C) e tegumento (T). (Barra indica 1 cm para as Figuras A e B e 1 mm para as figuras C e D).

4.3 Morfo-anatomia das células do endosperma micropilar e lateral

O endosperma micropilar das sementes de *S. lycocarpum* é formado por 7 a 8 camadas de células poligonais alongadas (Figura 5A e 5B) que, juntas, correspondem a uma espessura de $118,25 \pm 20,04 \mu\text{m}$ (Tabela 3) e ocupam 16,89% do comprimento da semente. As células do endosperma micropilar apresentam diâmetro médio de $19,63 \mu\text{m}$ e espessura média da parede celular de $2,28 \mu\text{m}$ (Tabela 3).

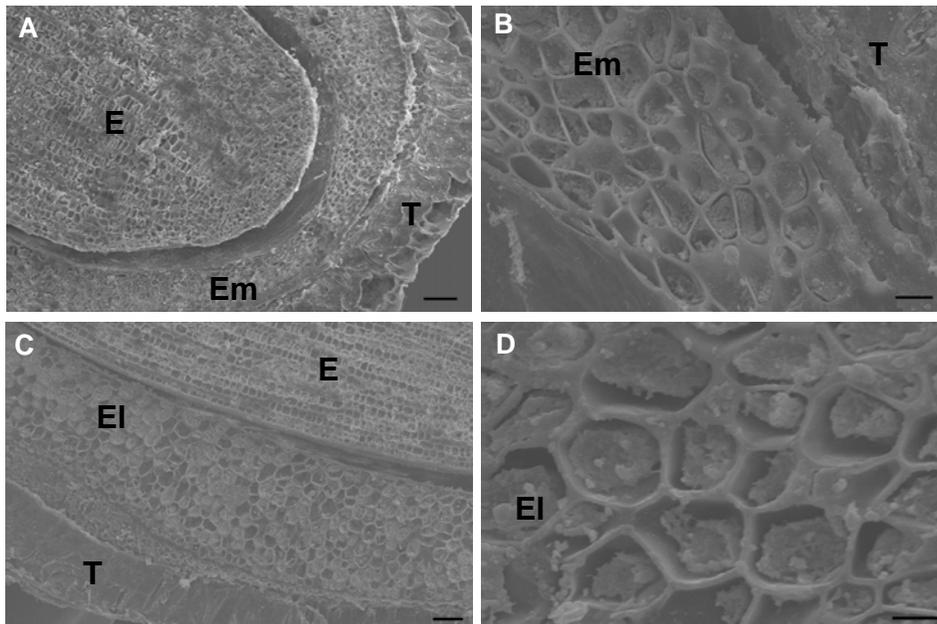


FIGURA 5 Microscopia eletrônica de varredura de sementes de *S. lycocarpum* embebidas em água por 24 horas: A) Endosperma micropilar, embrião e tegumento, B) Detalhe das células e das camadas de células do endosperma micropilar, C) Endosperma lateral, embrião e tegumento, D) Detalhe das células do endosperma lateral. (Em) endosperma micropilar, (El) endosperma lateral, (E) embrião e (T) tegumento. Barras indicam $100 \mu\text{m}$ para as Figuras A e C e $20 \mu\text{m}$ para as Figuras B e D.

Avaliando a forma destas células ao longo das camadas do endosperma micropilar, verificou-se que as células localizadas próximas ao embrião são poligonais mais achatadas que as células do endosperma micropilar localizadas próximas ao tegumento, que também são poligonais, no entanto, menos achatadas (Figura 5B).

O endosperma lateral apresenta células com diâmetro médio de 36,77 μm e espessura da parede celular média de 4,39 μm , valores estatisticamente superiores aos presentes nas células do endosperma micropilar (Tabela 3). As células do endosperma lateral também apresentam a forma poligonal, no entanto, são menos alongadas que as células do endosperma micropilar (Figura 5C e 5D).

TABELA 3 Parâmetros morfo-anatômicos do endosperma micropilar e do endosperma lateral.

Endosperma	Parâmetros	Média (μm)	Desvio padrão (μm)
Micropilar	Espessura	118,25	20,04
	Diâmetro	19,63 B	7,45
	Espessura da parede celular	2,28 b	0,42
	Diâmetro	36,77 A	9,24
Lateral	Espessura da parede celular	4,39 a	0,76

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si para a variável diâmetro e médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si para a variável espessura, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.4 Curva de embebição

A curva de embebição demonstrou que as sementes de *S. lycocarpum* apresentam um padrão trifásico de embebição de água (Figura 6) no período de 30 dias de avaliação. Durante a fase I verificou-se uma rápida embebição de água pela semente e conseqüentemente aumento de 53,11% no seu peso fresco até atingir a fase II, em torno de 36 horas de embebição. A fase II consistiu na fase mais longa, na qual, em média, as sementes permaneceram sem aumento

significativo de peso fresco por no mínimo seis dias. A fase III teve seu início quando as sementes voltaram a apresentar aumento no peso fresco, como consequência da germinação.

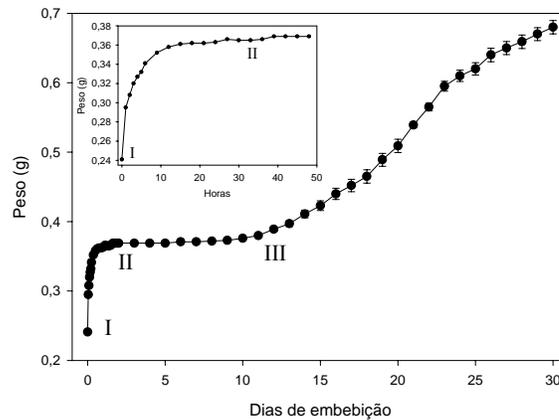


FIGURA 6 Curva de embebição de sementes de *S. lycocarpum* mostrando as fases I, II e III da embebição. Pontos representam a média de 8 repetições com 8 sementes cada e as barras os desvios padrões médios. Observe que houve uma rápida embebição de água pela semente.

4.5 Peso fresco dos embriões durante a embebição

Os embriões isolados de sementes embebidas em água que se encontravam no início da fase II de embebição e após pelo menos 5 dias nesta fase, não adquiriram nenhum aumento de peso fresco significativo (Figura 7) e as sementes não apresentaram nenhuma modificação morfológica externa (Figura 8A). Após um prolongado período de embebição, dentro da fase II de embebição, os embriões de sementes embebidas em água apresentaram aumento no peso fresco significativo antes da protrusão da radícula de aproximadamente 13,78% (Figura 7 – diferença entre os pontos B e C de embebição). Esse aumento no peso fresco foi seguido do rompimento do tegumento das sementes

(Figura 8 B). Após o rompimento do tegumento, as sementes, em média, ainda precisaram permanecer sob condições de germinação por mais 1 a 2 dias para que houvesse o rompimento do endosperma micropilar (Figura 8 C), e, enfim a protrusão da radícula (Figura 8D).

Obviamente, quando as sementes embebidas em água romperam o endosperma micropilar e a protrusão da radícula ocorreu, houve novamente aumento significativo de peso fresco dos embriões (Figura 7). Já os embriões isolados de sementes embebidas em 100 μ M ABA não apresentaram aumento significativo de peso após atingir o início da fase II de embebição, e as sementes não apresentaram rompimento do tegumento e em nenhum momento ocorreu protrusão radicular como observado para sementes embebidas em água (Figura 7).

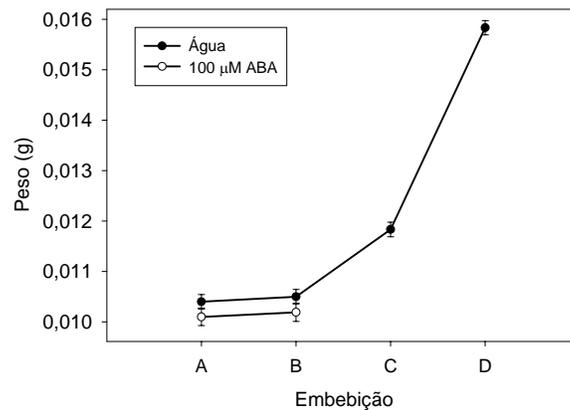


FIGURA 7 Ganho de peso fresco de embriões de *S. lycocarpum* isolados de sementes embebidas em água e em 100 μ M ABA, antes e após a protrusão da radícula. Os pontos A, B, C e D correspondem: A = ao início da fase II de embebição; B = à fase II após 5 dias de embebição nesta fase, C = às sementes com tegumento rompido; e D = às sementes germinadas. Observe que para sementes embebidas em ABA as sementes não apresentam tegumento rompido e nem ocorreu germinação.

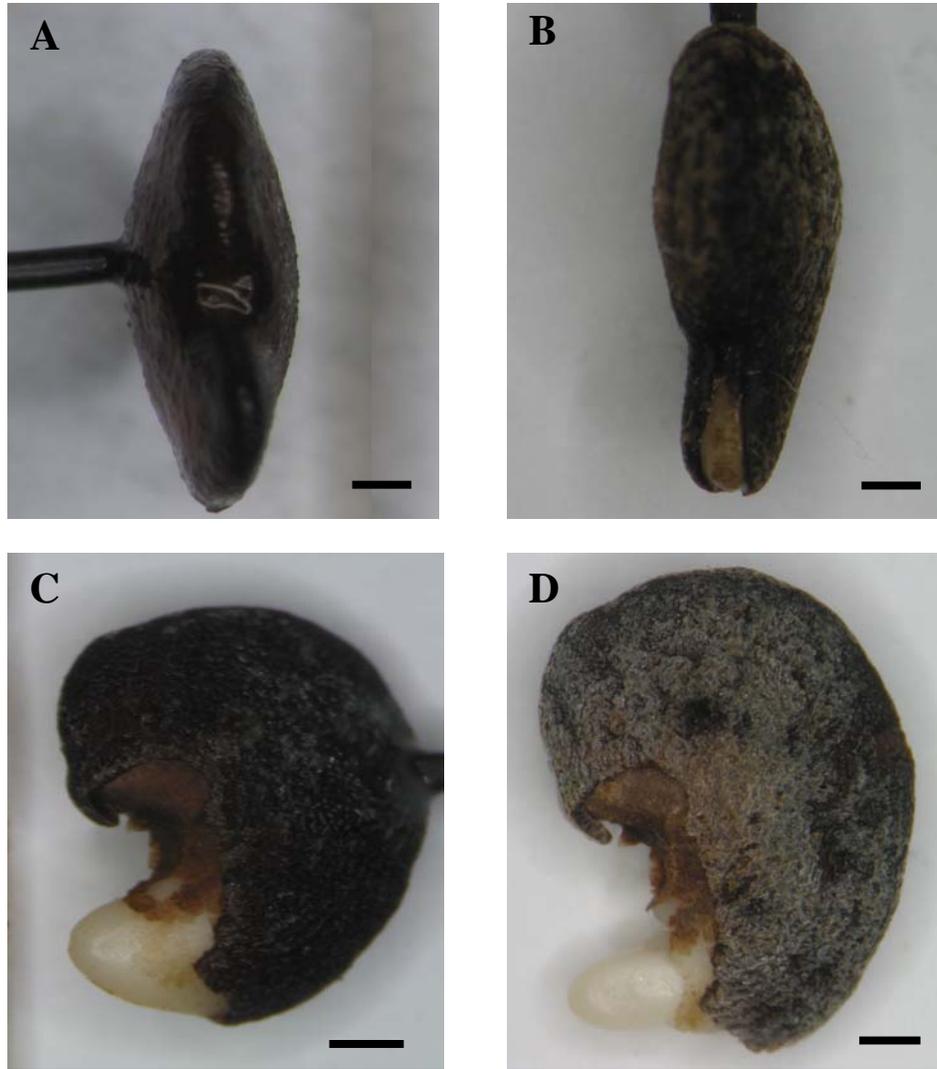


FIGURA 8 Sementes de *S. lycocarpum* embebidas em água. A) Semente com tegumento intacto; B) Semente com tegumento rompido, momento que antecede a protrusão da radícula (semente abrindo); C) Semente com parte do tegumento rompido removido mostrando a presença do endosperma micropilar; D) Semente com endosperma micropilar removido mostrando o embrião. (Barra indica 1mm).

4.6 Força de ruptura do endosperma micropilar

A força de ruptura do endosperma micropilar de sementes de *S. lycocarpum* embebidas em água e em 100 μ M ABA apresentou redução significativa em seus valores ao longo de 40 dias de embebição pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Figura 9).

A força de ruptura de sementes embebidas em água iniciou-se com 2,12 Newton (N) no início da embebição das sementes (1dia) e diminuiu significativamente até 1,82 N no décimo dia de embebição. A partir daí, manteve-se inalterada significativamente até o vigésimo quinto dia de embebição, com valores em torno de 1,73 N (Figura 9). Porém, a partir do vigésimo quinto dia, a força de ruptura apresentou queda acentuada significativa atingindo 1,2 N no trigésimo dia de embebição. A partir deste ponto, a força de ruptura não apresentou redução significativa em seus valores até o final da embebição (Figura 9). Assim, foram observados dois estágios significativos de queda na força de ruptura do endosperma micropilar de sementes embebidas em água. O primeiro estágio de queda ocorreu do início da embebição até o décimo dia e o segundo estágio, a partir do vigésimo quinto dia de embebição, sendo que entre o décimo dia e o vigésimo quinto dia, ou seja, durante quinze dias, não foi observado alteração ficando a força em torno de 1,73 N (Figura 9).

Para as sementes embebidas em 100 μ M ABA, a força de ruptura foi de 2,33 N após um dia de embebição e de 1,84 N após o quadragésimo dia de embebição. No vigésimo dia de embebição em ABA a força de ruptura apresentou redução significativa e não mais apresentou redução de valor significativo ao longo da embebição (Figura 9). Assim, em sementes embebidas em 100 μ M ABA, foi observado apenas um estágio de queda na força de ruptura do endosperma micropilar significativo.

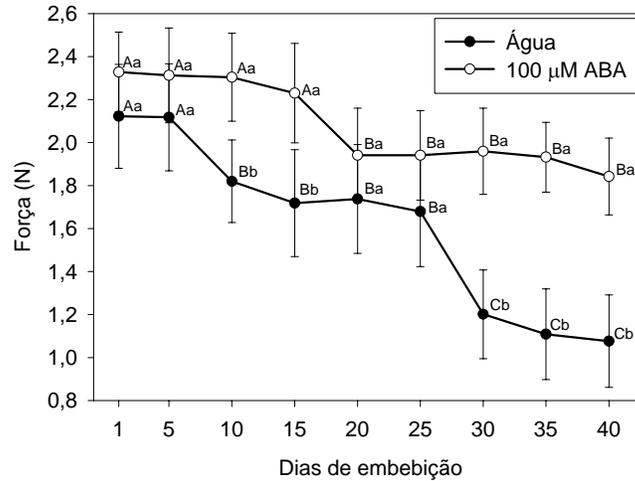


FIGURA 9 Força requerida para ruptura do endosperma micropilar de sementes de *S. lycocarpum* durante a embebição em água e em 100μM ABA. Pontos representam a média de 30 medições e as barras representam os desvios padrões. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula comparam dentro dos tratamentos (água ou ABA) e seguidas pela mesma letra minúscula comparam entre os tratamentos (água e ABA) não diferindo entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.7 Quantificação da atividade de endo-β-mananase

A atividade da enzima endo-β-mananase em endospermas micropilares de sementes embebidas em água iniciou-se no primeiro dia de embebição e apresentou aumento significativo em seus valores ao longo dos 40 dias de embebição pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Figura 10). Dois picos de aumentos significativos na atividade da enzima endo-β-mananase foram observados, ocorrendo a partir do quinto e do vigésimo quinto dia de embebição. Durante todo o período de embebição das sementes em água, apenas entre o décimo e o décimo quinto dia de embebição não foi observado aumento significativo da atividade da enzima endo-β-mananase (Figura 10).

Em endospermas micropilares de sementes embebidas em 100 μ M ABA, a atividade da enzima endo- β -mananase apresentou diferença significativa em seus valores em três momentos ao longo dos 40 dias de embebição. Os valores da atividade de endo- β -mananase não diferiram significativamente do início da atividade, que ocorreu aos cinco dias de embebição, até o décimo quinto dia de embebição, apresentando o primeiro aumento significativo a partir do décimo quinto dia de embebição e o segundo aumento significativo a partir do vigésimo quinto dia de embebição (Figura 10).

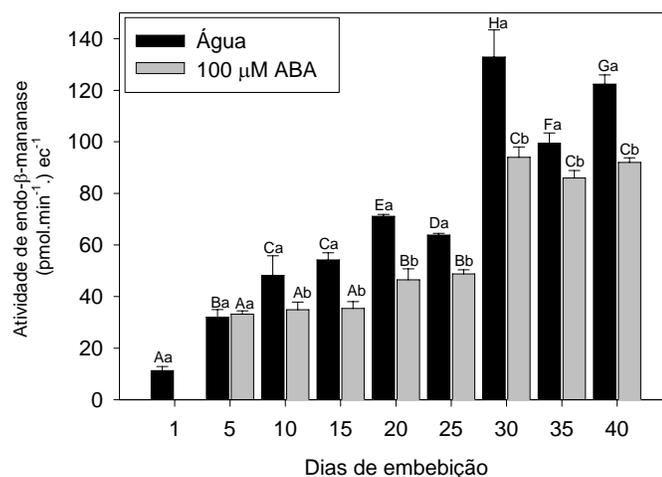


FIGURA 10 Atividade da enzima endo- β -mananase em endospermas micropilares de sementes intactas embebidas em água ou em 100 μ M ABA. Os dados da atividade de endo- β -mananase correspondem à média de 3 repetições e as barras representam os desvios padrões. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula comparam dentro dos tratamentos (água ou ABA) e seguidas pela mesma letra minúscula comparam entre os tratamentos (água e ABA) não diferindo entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Endospermas micropilar de sementes embebidas em água apresentaram maior atividade da enzima endo- β -mananase que os endospermas micropilares

de sementes embebidas em ABA ao longo de todo o período de embebição. Aos 40 dias de embebição os valores da atividade da enzima endo- β -mananase para os endospermas micropilares de sementes embebidas em água e em 100 μ M ABA foram de 122,34 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cap}^{-1}/\text{ec}$ e 92,02 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cap}^{-1}/\text{ec}$, respectivamente (Figura 10).

4.8 Força de ruptura do endosperma micropilar X atividade de endo- β -mananase

A força de ruptura do endosperma micropilar de sementes embebidas em água e em 100 μ M ABA apresentou correlação linear negativa significativa com o aumento da atividade de endo- β -mananase a 5% de probabilidade pelo teste t com valores de r^2 de 0,9014 e de 0,6726, respectivamente (Figura 11).

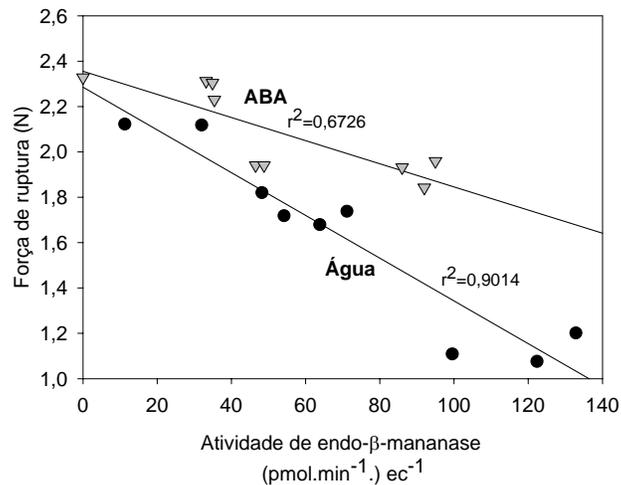


FIGURA 11 Regressão linear entre a força de ruptura do endosperma micropilar e a atividade da enzima endo- β -mananase de sementes de *S. lycocarpum* durante a embebição em água e em 100 μ M ABA.

4.9 Localização da atividade de endo- β -mananase

A localização da atividade da enzima endo- β -mananase foi verificada após a impressão dos tecidos da semente de *S. lycocarpum* sobre gel de agarose. A impressão dos tecidos revelou pontos claros no gel, evidenciando a atividade da enzima endo- β -mananase em sementes de *S. lycocarpum*. Antes da protrusão da radícula houve atividade de endo- β -mananase apenas no endosperma micropilar tanto de sementes embebidas em água quanto para semente embebidas em 100 μ M ABA (Figura 12B e 12C). Apenas após a protrusão radicular foi observada atividade de endo- β -mananase no endosperma lateral (Figura 12D) para sementes embebidas em água.

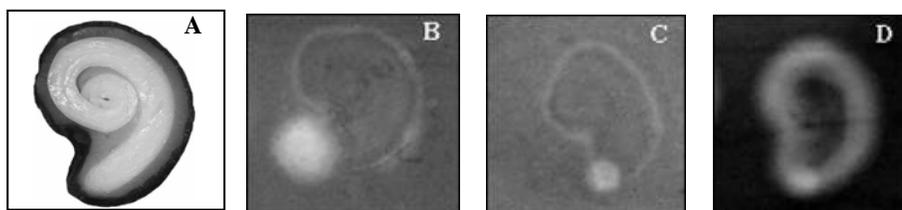


FIGURA 12 Impressão dos tecidos de sementes de *S. lycocarpum* mostrando a atividade da enzima endo- β -mananase. A) Semente cortada longitudinalmente, B) Semente embebida em água por 10 dias, C) Semente embebida em 100 μ M ABA por 10 dias, D) Semente germinada embebida em água. Pontos claros no gel evidenciam atividade de endo- β -mananase.

5 DISCUSSÃO

A germinação de sementes de *S. lycocarpum*, pertencente à família Solanaceae, mostrou-se significativamente superior para as sementes coletadas do que para as sementes colhidas (Figura 2A e 2B e Tabela 2). Ao final do teste de germinação das sementes colhidas, as sementes não germinadas, ao serem apertadas, encontravam-se firmes, não apresentavam em sua superfície a presença de fungos e ao serem cortadas longitudinalmente, o endosperma e o embrião estavam claros, com os mesmos aspectos de quando se iniciou a germinação, sendo, portanto, consideradas como viáveis de acordo com a ISTA (1999) e, portanto, indicando a ocorrência de sementes dormentes ao final dos experimentos de germinação. Uma possível explicação para a baixa porcentagem de germinação das sementes colhidas comparada com sementes coletadas pode ser devido a níveis ainda altos de ABA em sementes colhidas. Hilhorst et al. (1998) mostraram em sementes de *S. lycopersicon* que a porcentagem de germinação durante o desenvolvimento das sementes é crescente com a redução dos níveis de ABA que ocorre gradualmente durante a fase de secagem (final do desenvolvimento). Assim, sugere-se que as sementes de frutos colhidos ainda apresentam níveis suficientes de ABA para inibir a germinação. Portanto, as sementes de *S. lycocarpum* devem ser obtidas a partir de frutos coletados após dispersão natural para garantir o sucesso da germinação.

A germinação de sementes coletadas embebidas em água ocorreu entre as temperaturas de 20 e 40°C. Esta faixa de temperatura corresponde às condições de tolerância das espécies tropicais para germinação, uma vez que estas espécies são tolerantes à alta temperatura, apresentando limite máximo igual ou superior a 35°C, porém, muitas vezes, sensíveis à baixa temperatura, com limite mínimo superior a 5°C (Okusanya, 1978). Embora tenha ocorrido

germinação na faixa de temperatura fixa de 20 a 40°C, a condição de alternância de luz e temperatura de 20/30°C a cada 12 horas foi a que proporcionou a maior porcentagem e velocidade final de germinação das sementes coletadas (Figura 2B e Tabela 2). No bioma Cerrado, onde *S. lycocarpum* é abundante, observa-se uma pequena variação da temperatura média ao longo do ano, 21 a 27°C, mas há uma amplitude diária de mais de 15 °C (Sementes do cerrado, 2005). Assim, as sementes de *S. lycocarpum* germinaram em maior porcentagem e velocidade quando, em condições de laboratório, foram oferecidas de forma mais aproximada, as condições naturais de ocorrência da espécie.

As razões dos efeitos da temperatura alternada na germinação de sementes ainda não são bem conhecidas. Todavia, alguma especulação pode ser feita considerando-se o experimento em que as sementes tiveram o endosperma micropilar removido e foram colocadas para germinar em diferentes temperaturas (Figura 2C). Observou-se que todas as sementes germinaram após o quinto dia de embebição, período bastante reduzido quando comparado aos 40 dias necessários para as sementes intactas atingirem porcentagem de germinação próxima a 100%. Portanto, estes resultados mostram que o efeito da alternância de temperatura durante a germinação é no endosperma micropilar. Bewley & Black (1994), afirmam que a alternância de temperatura é bastante eficiente na superação de dormência em espécies que têm um tecido circundando o embrião, que normalmente oferece barreira mecânica à passagem do mesmo. É possível que temperaturas alternadas quebrem o balanço inibidor/promotor, fazendo com que o inibidor diminua durante o ciclo de baixas temperaturas, enquanto os promotores aumentem durante o período de altas temperaturas e desta forma promova a germinação (Copeland and McDonald, 1999).

As estruturas internas da semente de *S. lycocarpum* encontram-se dispostas de forma muito semelhante às estruturas internas das sementes de tomate (Figura 4D) e Toorop, 1998). As células do endosperma micropilar

apresentam tanto o diâmetro médio quanto a espessura da parede celular menores estatisticamente que as células do endosperma lateral (Tabela 3). Estas diferenças indicam preferência ou predestinação da região onde a protrusão da radícula irá proceder. Em sementes de tomate (Toorop et al., 2000) e de *C. arabica* (da Silva et al., 2004), a preferência ou predestinação da região onde a protrusão da radícula irá ocorrer também foi sugerida. O endosperma micropilar de *S. lycocarpum* é composto por sete/oito camadas de células (Figura 5B), número superior às quatro camadas de células presentes no endosperma micropilar de sementes de tomate (Toorop et al., 2000) e às três camadas de células presentes no endosperma micropilar de sementes de *Coffea arabica* (da Silva et al., 2004). O endosperma lateral apresenta células menos alongadas (Figura 5D) e maior espessura da parede celular (Tabela 3), indicando que as paredes celulares armazenam substâncias de reservas em maior quantidade que as células do endosperma micropilar.

As sementes de *S. lycocarpum* apresentaram o padrão trifásico de embebição de água proposto por Bewley & Black (1994). A fase I de embebição foi bastante rápida, apresentando duração de 36 horas, contrastando com a fase II que foi bastante longa, permanecendo as sementes sem aumento significativo de peso fresco por pelo menos seis dias (Figura 6). A rápida absorção de água na fase I vai ao encontro dos relatos de Bewley & Black (1994), que salientam que esta fase caracteriza-se por ser um processo puramente físico, ou seja, ocorre independentemente da semente ser viável ou morta e dormente, a não ser que trate de dormência imposta pela impermeabilidade do tegumento. Observa-se, portanto, que não houve impedimento físico do tegumento à entrada de água na semente de *S. lycocarpum* (Figura 6).

A redução da força de ruptura do endosperma micropilar em sementes de *S. lycocarpum* embebidas em água apresentou dois estágios, sendo o primeiro estágio, do início da embebição até o décimo dia e o segundo estágio, a partir do

vigésimo quinto dia de embebição. A força de ruptura não apresentou redução significativa entre o décimo e o vigésimo dia (Figura 9). A ocorrência de dois estágios de redução da força de ruptura do endosperma micropilar também foi encontrada em sementes de tomate (Toorop et al., 2000) e café (da Silva et al., 2004). Em sementes de *S. lycocarpum* embebidas em água, a força inicial de ruptura do endosperma micropilar foi de 2,12N, valor bem superior quando comparado com os valores iniciais de ruptura do endosperma micropilar encontrado em sementes de tomate (0,6N) (Toorop et al., 2000). O menor valor da força requerida para romper o endosperma micropilar de sementes de *S. lycocarpum* é superior (1,05N) ao menor valor exercido observado para sementes de tomate (0,28N) (Toorop et al., 2000). O valor mais elevado para a ruptura do endosperma micropilar de sementes de *S. lycocarpum* pode estar associado com as sete/oito camadas de células presentes no endosperma micropilar (Figura 5B), número superior às quatro camadas de células presentes no endosperma micropilar de sementes de tomate (Toorop et al., 2000). A força de ruptura do endosperma micropilar de sementes de *S. lycocarpum* reduziu 49,53% durante a embebição, valor de redução próximo ao encontrado para a redução da força de ruptura do endosperma micropilar em sementes de tomate (46,67%) (Toorop et al., 2000).

A medida que houve redução da força de ruptura do endosperma micropilar verificou-se aumento na atividade da enzima endo- β -mananase antes da protrusão da radícula (Figura 11), corroborando com os resultados de Groot et al. (1987) e Toorop et al. (2000) para sementes de tomate. Os dois estágios de redução da força de ruptura do endosperma micropilar coincidiram com os picos de aumentos significativos na atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar que ocorreu a partir do quinto e do vigésimo quinto dia de embebição (Figura 10). Os valores da atividade da enzima endo- β -mananase são similares após 24 horas de embebição em sementes de *S. lycocarpum* (15

pmol.min⁻¹.cap⁻¹) e tomate (13,2 pmol.min⁻¹.cap⁻¹) (Nonogaki et al., 2000), e no momento que antecede a germinação, com valores próximos de 120 pmol.min⁻¹.cap⁻¹ para ambas as espécies (Figura 10 e Toorop et al., 2000), embora os endospermas micropilares de *S. lycocarpum* apresentem tamanhos e pesos diferentes. Pode-se inferir que o aumento da atividade dessa enzima em sementes de *S. lycocarpum* é mais lento visto ao longo período de tempo gasto, 40 dias, para que as sementes de *S. lycocarpum* atinjam a concentração de endo-β-mananase alcançada pelas sementes de tomate para o máximo de germinação, que ocorre no terceiro dia de embebição. Assim, em sementes de *S. lycocarpum* há a necessidade de maior quantidade dessa enzima para que seja eficiente para o amolecimento das sete/oito camadas de células do endosperma micropilar (Figura 5B) e a germinação ocorra com o mesmo padrão observado para sementes de tomate (Toorop et al., 2000).

A localização da atividade da enzima endo-β-mananase em sementes de *S. lycocarpum* mostrou-se idêntica à atividade desta enzima em sementes de tomate (Toorop et al., 2000). O padrão de localização espacial e temporal da enzima em ambas as espécies ocorreu antes da germinação no endosperma micropilar, enquanto que no endosperma lateral ocorreu somente após a germinação (Figura 12 e dados de Toorop et al., 2000). A presença da enzima endo-β-mananase no endosperma lateral somente após a germinação indica que as substâncias de reserva armazenadas na parede celular destas células são degradadas após a germinação e utilizadas como fonte de energia para o crescimento das plântulas. A enzima endo-β-mananase presente em sementes de *S. lycocarpum* e tomate, ambas as espécies da família Solanaceae, comportam-se diferentemente das sementes de *A. crassiflora*, pertencente à família Annonaceae (da Silva et al., 2007), que mostra atividade no endosperma lateral antes da protrusão da radícula. Esta espécie tem embrião imaturo que cresce 3

vezes o seu tamanho original antes da protrusão radicular, e, aparentemente, a atividade desta enzima oferece suporte ao crescimento do embrião.

Na presença de ABA, a germinação de sementes de *S. lycocarpum* foi completamente inibida (Figura 2D). O segundo estágio da força de ruptura do endosperma micropilar (Figura 9) e a atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar (Figura 10) também foram inibidos por ABA. Assim, sementes de *S. lycocarpum* na presença de ABA comportaram-se semelhantemente com as sementes de tomate, considerando o padrão da força de ruptura (Toorop et al., 1996, 2000, Chen & Bradford, 2000, Wu et al., 2001), a atividade de endo- β -mananase (Dahal et al., 1997, Still & Bradford, 1997) e a localização da enzima (Toorop et al., 2000).

Como ABA não inibe a atividade de endo- β -mananase, mas inibe a germinação em sementes de tomate, sugeriu-se que outras enzimas controladas por ABA poderiam estar envolvidas no controle do segundo estágio de amolecimento do endosperma (Toorop et al., 1996). Por exemplo, ABA não inibiu, em sementes de tomate, a atividade de celulase (Toorop, 1998 e Bradford et al., 2000), α -galactosidase, β -manosidase, β -glucosidase e exopolygalacturonase (Toorop, 1998). Todavia, em sementes de café (*Coffea arabica*), duas isoformas de endo- β -mananase (pI 4.5 e pI 6.5) e germinação foram inibidas por ABA (da Silva et al., 2004). Por outro lado, Gong et al. (2005) mostraram que as paredes celulares da região do endosperma micropilar em sementes de fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), caraway (*Carum carvi* L.), Chinese Senna (*Cássia tora* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) e tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) têm paredes mais finas, o que facilitaria a penetração do embrião e rompimento do endosperma micropilar. Nestas espécies a atividade de endo- β -mannanase ocorreu apenas após a protrusão da radícula, não estando, portanto, envolvida com a germinação.

Todavia não se pode excluir que o segundo estágio de amolecimento do endosperma também seja controlado pelo potencial de pressão gerado pelo embrião, visto que o ABA inibe o aumento no potencial de pressão no embrião de sementes de café (da Silva et al., 2004) e de *Brassica napus* (Schopfer & Plachy, 1985) durante a embebição. Para provar esta hipótese em sementes de *S. lycocarpum*, tentou-se medir a força de ruptura em endospermas micropilares isolados embebidos em ABA. Todavia, ocorreu grande lixiviação de compostos, atraindo microrganismos, levando ao apodrecimento durante a embebição dos endospermas micropilares, tornando-se impossível tal experimento. Porém, medidas feitas no peso fresco de embriões de sementes embebidas em água e ABA mostram que não houve aumento significativo de peso fresco de embriões oriundos de sementes embebidas em ABA, somente para as sementes embebidas em água (Figura 7). Isso indica que o embrião de sementes de *S. lycocarpum* cresceu durante a embebição e pode contribuir com o segundo estágio de amolecimento do endosperma micropilar, através da geração de aumento no potencial de pressão (turgor). Assim, é possível que o efeito de ABA no segundo estágio de amolecimento do endosperma em sementes de *S. lycocarpum* seja também no embrião, controlando o aumento do potencial de pressão. Hilhorst (1995) sugere que o ABA possa suprimir a hidrólise de enzimas que atuam no afrouxamento da parede celular das células do embrião e, assim, inibir a alongação e extensão. A expansina é uma enzima induzida por GA na parede celular da radícula (Kende et al., 1998) e tem sido proposto que ela esteja relacionada ao processo de alongação celular por enfraquecer a parede celular, interpondo-se entre a celulose e o xiloglucano, e podendo, até mesmo, romper as ligações não covalentes entre os polímeros da parede celular (Cosgrove, 1999 e 2000). O gene leEXP8 é expresso apenas na zona de alongação da radícula (Chen et al., 2001) e sua expressão é reduzida após 48 e 96 horas de embebição em ABA para sementes não germinadas (Ni & Bradford, 1993).

Em sementes de café, da Silva et al. (2004), afirmam que o segundo estágio de amolecimento do endosperma é parcialmente causado pelo embrião, pois as paredes celulares do endosperma micropilar mostram-se comprimidas devido à força exercida pelo embrião que aumenta em tamanho antes da protrusão da radícula. Assim, para sementes de *S. lycocarpum*, sugere-se que a presença de atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar durante a germinação teria função importante no primeiro estágio de amolecimento do endosperma, contribuindo para o amolecimento inicial das paredes celulares deste e na ajuda ao aumento do potencial de pressão das células do embrião, importante no segundo estágio de amolecimento do endosperma. Para reforçar que o embrião cresce durante a germinação observou-se que em sementes embebidas em água, o tegumento rompe-se antes da protrusão da radícula (Figura 8B) e o endosperma micropilar encontra-se intacto (Figura 8C), embora isso nunca ocorresse em sementes embebidas em ABA.

Portanto, o mecanismo e regulação da germinação de sementes de *S. lycocarpum* assemelham-se muito com as sementes de tomate. Todavia, as sementes de *S. lycocarpum* necessitam de período de tempo bem superior desde o início da embebição até a germinação, quando comparado com as sementes de tomate. Sugere-se que este período de tempo prolongado para que a germinação ocorra em sementes de *S. lycocarpum* pode ser explicado pelo maior número de camadas de células do endosperma micropilar (sete/oito) de *S. lycocarpum* que deve ser rompido. Todavia, esperava-se uma maior quantidade da enzima endo- β -mananase comparada com as sementes de tomate, já que existe quase o dobro de camadas de células no endosperma micropilar que poderiam contribuir para uma maior quantidade de atividade da enzima endo- β -mananase, porém, isso não foi observado. Especula-se, portanto, que para que as sementes de *S. lycocarpum* germinem, o embrião teria que ser capaz de gerar uma força (turgor) superior às sementes de tomate para poder romper as camadas de células dentro

do mesmo período de tempo, já que a atividade da enzima endo- β -mananase é a mesma para as duas espécies. Para que haja aumento de turgor no embrião talvez fosse necessário um aumento da razão GA/ABA. O aumento dessa razão deve-se à síntese de novo de giberelina que age sobre o metabolismo de carboidratos envolvidos no fornecimento de energia às células do embrião e que podem contribuir para tornar o potencial osmótico celular mais negativo, fazendo com que a entrada de água ocorra mais rapidamente para o interior da célula do embrião, favorecendo assim sua expansão (Taiz et al., 2004). Aparentemente, o aumento na razão GA/ABA demora mais tempo para ocorrer e, portanto, o maior tempo para a superação de dormência e germinação em sementes de *S. lycocarpum*.

Assim, em sementes de *S. lycocarpum* embebidas em água há aumento de peso fresco do embrião, indicando expansão celular e crescimento do embrião culminando com o rompimento do tegumento antes da protrusão da radícula. Em sementes embebidas em ABA não houve aumento de peso fresco e nem rompimento do tegumento. No endosperma micropilar a enzima endo- β -mananase apresenta atividade antes da protrusão da radícula, o que indica que esta enzima contribui para o amolecimento do endosperma micropilar nesta espécie. O amolecimento do endosperma micropilar apresentou dois estágios. ABA inibiu o segundo estágio e o aumento no ganho de peso fresco do embrião. O primeiro e segundo estágios coincidem com o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase, sendo que o embrião também contribui com o segundo estágio através do aumento do seu peso fresco que indica aumento do potencial de pressão das células do embrião, antes da protrusão da radícula.

6 CONCLUSÕES

- Os frutos de *S. lycocarpum* devem ser coletados após a dispersão natural.

- A melhor condição para a germinação de sementes de *S. lycocarpum* é a de alternância de luz e temperatura de 20/30°C a cada 12 horas.

- As sementes de *S. lycocarpum* apresentam tegumento rígido, o qual não impede a embebição de água.

- O amolecimento do endosperma micropilar é necessário para a ocorrência de germinação em sementes de *S. lycocarpum* e ocorre em dois estágios que coincidem com o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase, sendo o segundo estágio, também, influenciado pelo aumento do potencial de pressão das células do embrião.

- O ABA inibiu a germinação de sementes de *S. lycocarpum* por inibir o aumento do peso fresco dos embriões, o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar ao longo da embebição e o segundo estágio de amolecimento do endosperma micropilar.

- As diferenças entre os mecanismos de germinação de sementes de *S. lycocarpum* e tomate são que as sementes de *S. lycocarpum* necessitam de período de tempo maior de embebição para germinarem, possuem endosperma micropilar com número maior de camadas de células, apresentam força de ruptura do endosperma micropilar maior e o embrião exerce papel importante no segundo estágio de amolecimento do endosperma micropilar. Na presença de ABA as sementes de *S. lycocarpum* apresentam comportamento semelhante às sementes de tomate, considerando o segundo estágio de redução da força de ruptura do endosperma micropilar, a atividade da enzima endo- β -mananase e a localização desta enzima.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 464 p.

ALVES, E. Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura. Lavras, 2004.

AMORIM, I. L. **Morfologia de frutos, sementes, germinação, plântula e mudas de espécies florestais de Lavras**. 1996. 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

APARECIDO, E. O.; BRANCO, M. B. C.; MOTTA JÚNIOR, J. C. O lobo guará (*Chrysocion brachiurus*) como dispersor de sementes na região central do Estado de São Paulo. In: VI Congresso de Iniciação Científica, 1998. São Carlos, SP. Disponível em: <<http://www.propg.ufscar.br>>. Acesso em: 01 dez. 2005.

ARAÚJO, S. S.; MATOS, V. P. Morfologia da semente e de plântula de *Cassia fistula* L. **Revista Árvore** Viçosa, v. 15, n. 3, p. 217-223, set./dez. 1991.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Ecology, Biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1988. 666 p.

BELTRATI, C. M. Morfologia e anatomia de sementes In: CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, ÁREA DE BIOLOGIA VEGETAL. **Apostila**. Rio Claro: Departamento de Botânica / Instituto de Biociências / UNESP, 1994. 112 p.

BEWLEY, J. D. Breaking down the walls - a role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 464-469, Dec. 1997b.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997a.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seed in relation to germination: viability, dormancy and environmental control**. Vol. 2 Berlin: Springer-Verlag, 1982. 375 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** Plenum Press: New York, 1994. 455 p.

BEWLEY, J. D.; BURTON, R. A.; MOROHASHI, Y.; FINCHER, G. B. Molecular cloning of a cDNA encoding a (1→4)-β-mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Planta**, Berlin, v. 203, n. 4, p. 454-459, Dec. 1997b.

BRADFORD, K. J.; CHEN, F.; COOLEY, M. B.; DAHAL, P.; DOWNIE, B.; FUKUNAGA, K. K.; GEE, O. H.; GURUSINGLE, S.; MELLA, R. A.; WU, C. T.; YANG, H.; YIM, K. O. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: BLACK, M.; BRADFORD, K. J.; VÁZQUEZ-RAMOS, J.; eds. **Seed biology: advances and applications.** Wallingford, UK: CABI Publishing, p. 231-251, 2000.

BRADFORD, K. J.; DOWNIE, A. B.; GEE, O. H.; ALVORADO, V.; YANG, H.; DAHAL, P. Abscisic Acid and Gibberellin Differentially Regulate Expression of Genes of the SNF1-Related Kinase Complex in Tomato Seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1560–1576, July 2003.

BRASIL. Ministério da agricultura. Regras para análise de sementes. Brasília, 1992. 365 p.

CASTRO, E. R.; GALETTI, M. Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú *Tupinambis merianae* (Reptilia: Teiidae). **Papéis Avulsos de Zoologia** (São Paulo). v. 44, n. 6, 2004, p. 91-97.

CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 3, p. 1265-1274, Nov. 2000.

CHEN F, DAHAL P, BRADFORD KJ: Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 3, p. 928-936, Nov. 2001.

CHEN, F.; NONOGAKI, H.; BRADFORD, K. J. A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 367, p. 215-223, Feb. 2002.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology.** London: kluwer Academic Publishers, 1999. 409 p.

CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D.; RIBEIRO, L. J. Constituintes Químicos da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* ST. HIL.) durante a maturação. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 130-135, jan./mar., 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 3, p.325-328.

COSGROVE, D. J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 391-417, 1999.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, London, v. 407, n. 6802, p. 321-326, Sept. 2000.

CUNHA, R.; CASALI, V. W. D. Efeito de substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de sementes de alface. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 9, n. 2, p. 121-132, 1989.

DAHAL, P.; NEVINS, D. J.; BRADFORD, K. J. Relationship of endo- β -mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 4, p. 1243-1252, Apr. 1997.

DALL'AGNOL, R.; VON POSER, G. L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 71, n. 1-2, p. 337-341, July 2000.

DALPONTE, J. C.; LIMA, E. S. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnívora-Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, p. 325-332, out. 1999. Suplemento 2.

da SILVA, E. A. A. De MELO, D. L. B.; DAVIDE, A. C. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Annals of Botany**, London, 2007. No prelo.

da SILVA, E. A. A., TOOROP, E. P., VAN AELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, Dec. 2004.

de MIGUEL, L.; SÁNCHEZ, R. A. Phytochrome induced germination, endosperm softening and embryo growth potential in *Datura ferox* seeds: sensitivity to low water potential and time of sowing to FR reversal. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 252, p. 969-974, July 1992.

DIETZ, J. M. Ecology and social organization of the maned wolf. **Smithsonian Contributions of Zoology**, Washington, v. 392, p. 1-51, 1984.

DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- β -mannanase activity using Congo red dye. **Phytochemistry**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 829-835, July 1994.

FERRY, M. G. **Plantas do Brasil e do Cerrado**. São Paulo: Edgard Blucher, 1969. 239 p.

FINKELSTEIN, R. R.; GIBSON, S. Abscisic acid and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 1, p. 26-32, Feb. 2001.

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

GONG, X.; BASSEL, G. W.; WANG, A.; GREENWOOD, J. S.; BEWLEY, J. D. The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- β -mannanase activity. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 7, p. 1165-1173, Dec. 2005.

GROOT, S. P. C. **Hormonal regulation of seed development and germination in tomato**. 1987. 107 p. Agricultural University Wageningen.

GROOT, S.P.C., JOHAN, B. & KARSSSEN, C.M. The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: studies with a gibberellin-deficient mutant. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 71, n. 2, p. 184-190, Oct. 1987.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm cap weakening: a study with gibberellin-deficient mutant. **Planta**, Berlin, v. n. 4, 171, p. 525-531, Aug. 1987.

GROOT, S. P. C.; KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSSSEN, C. M. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in

gibberellin-deficient tomato seed prior to radicle protrusion. **Planta**, v. 174. p. 500-504, 1988.

GUIMARÃES, M. G.; **Fisiologia de sementes**. Lavras, MG: UFLA/FAEPE, 1999. 79 p.

HILHORST, H. W. M. Acritical update on seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 51-73, Mar. 1995.

HILHORST, H. W. M.; SMITT, A. I.; KARSSSEN, C. M. Gibberellin-biosynthesis and sensitivity mediated stimulation of seeds of *Sisymbrium officinale* by red light and nitrate. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 67, n. 2, p. 285-290, June 1986.

HILHORST, H. W.; GROOT, M. S. P. C.; BINO, R. J. The tomato seed as a model system to study seed development and germination. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 169-183, June 1998.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 27, p. 1-333, 1999. Supplement.

JACOBSEN, J. V.; PRESSMAN, E. A structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L.) seed with emphasis in endosperm breakdown. **Planta**, Berlin, v. 144, n. 3, p. 241-248, 1979.

KARSSSEN, C. M.; LAÇKA, E. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberelin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. In: MBopp, ed, Plant Growth Substances. Springer-Verlag, Berlin, pp. 315-323. 1986.

KARSSSEN, C. M.; GROOT, S. P. C.; KOORNNEEF, M. Hormone mutants and seed dormancy in *Arabidopsis* and tomato. In: Developmental evidence has been obtained relating to its Mutants in Higher Plants. Edited by THOMAS, H.; GRIERSON, D., 1987, Cambridge University Press, Cambridge. p. 119-133.

KARSSSEN, C. M. Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. In: KIGEL, J. D.; GALILI, G. (Eds.) **Seed development and germination**. Ew York: Marcel Decker, p. 333-350, 1995.

KENDE, H.; van der KNAAP, E.; CHO, H. T. Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1105-1110, dec. 1998.

KONTOS, F; SPYROPOULOS, G. C.; GRIFFEN, A.; BEWLEY, J. D. Factors affecting endo- β -mannanase activity in the endosperms of fenugreek and carob seeds. **Seed Science Research**, Wallingford v. 6, n. 1, p. 23–29, Mar. 1996.

KUNIYOSHI, Y.S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. Curitiba. 1983, 233p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná.

LEUBNER-METZGER, G., C. FRÜNDDT, R. VÖGELI-LANGE; F. MEINS-JUNIOR. Class I β -1,3-glucanase in endosperm of tobacco during germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 3, p. 751-759, Nov. 1995.

LIU, Y. **Hormones and tomato seed germination**. 1996. 124p. Wageningen University, Holanda.

LOMBARDI, J. A.; MOTTA JUNIOR, J. C. Seed dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) by the maned wolf *Chrysocyon brachyurus* (Illiger (Mammalia: Canidae)). **Ciência e cultura**, Campinas, v. 45, n. 2, p. 126-127, Fev. 1993.

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

MARCIANO, C. S. Efeito do Amido do Fruto da Lobeira (*Solanum lycocarpum* ST. Hill) no Controle do Diabetes Mellitus. 1997. 86p. Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

MARTINS, K.; MOTTA JÚNIOR, J. C. The maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae), as seed disperser of *Solanum lycocarpum* (Solenacea) in Southeastern Brazil: a test with captive animals. In: International symposium workshop on frugivores and seed dispersal biodiversity and conservational perspectives, 3, 2000, São Pedro. Proceedings... São Pedro, 2000. p. 217.

MOTTA JÚNIOR, J.C; K. MARTINS. The frugivorous diet of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus*, in Brazil: ecology and conservation. In: Seed dispersal

and frugivory: Ecology, Evolution and Conservation. Eds. LEVEY, D.J.; SILVA, W.R.; GALETTI, M. CAB International, 2002, p. 291-303.

NG, F. S. P. Strategies of establishment in Malayan forest trees. *In* **Tropical trees as living systems** (P.B. Tomlinson & M.H. Zimmermann, eds.). University Press, Cambridge, p. 129-162. 1978.

NI, B. R.; BRADFORD, K. J. Germination and dormancy of abscisic acid and gibberellin deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. Sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin and water potential. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 2, p. 607-617, Feb. 1993.

NI, B. R.; BRADFORD, K. J. Quantitative models characterizing seed germination responses to abscisic acid and osmoticum. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 1057-1068, 1992.

NIKOLAEVA, M. G. Factors controlling the seed dormancy pattern. In: KHAN, A. A. (Ed.). **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. North-Holland, Amsterdam, 1977. p. 51-74.

NIKOLAEVA, M. G. **Physiology of deep dormancy in seeds**. Leningrad: Izdatel'stvo Nauka, 1969. (Translated from Russian by Z. Shapiro, NSF, Washington, DC.)

NOMAGUCHI, M.; NONOGAKI, H.; MOROHASHI, Y. Development of galactomannan-hydrolysing activity in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior to germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 1, p. 105-109, May 1995.

NONOGAKI, H.; MATSUSHIMA, H. MOROHASHI, Y. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 167-172, June 1992.

NONOGAKI, H.; NOMAGUCHI, M.; MOROHASHI, Y. Endo- β -mannanase in the endosperm of germinated tomato seeds. **Physiol Plant**, v. 94, p.328-334, 1995.

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

NONOGAKI, H.; NOMAGUCHI, M.; MOROHASHI, Y.; MATSUSHIMA, H. Development and localization of endo- β -mannanase in the embryo of germinating tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 326, p. 1501-1507, Sept. 1998a.

NONOGAKI, H.; NOMAGUCHI, M.; OKUMOTO, N.; KANCHO, Y.; MATSUSHIMA, H. MOROHASHI, Y. Temporal and spatial pattern of the biochemical activation of the endosperm during and following imbibition of tomato seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 102, n. 2, p. 236-342, Feb. 1998b.

NONOGAKI, H.; GEE, O. H.; BRADFORD, K. J. A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 4, p. 1235-1245, August 2000.

OKUSANYA, O. T. 1978. The effect of light and temperature on the germination and growth of *Luffa aegyptiaca*. **Physiology Plantarum**, 44:429-433.

OLIVEIRA, E.C.; PEREIRA, T.S. Myrtaceae: morfologia da germinação de algumas espécies. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2., 1984. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBB, p. 501-520.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; OLIVEIRA, L. C. A. Biologia floral de uma população de *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) em Lavras, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 11, n. 1-2, p. 22-32, dez. 1988.

OLIVEIRA JÚNIOR, E. N. **Análise Nutricional da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil) durante o amadurecimento**. 2002. 71p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PAVLISTA, A. D.; VALDOVINOS, J. G. Changes in the surface appearance of the endosperm during lettuce achene germination. **Botanical Gazette**, Chicago v. 139, n. 2, p. 171-179, 1978.

PINTO, F. S. Efeitos da dispersão de sementes por animais e dos fatores edáficos sobre a germinação, crescimento e sobrevivência das plântulas de Lobeira, *Solanum Lycocarpum*. 1998. 69 p. Universidade Federal de Brasília, Brasil.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, 2.ed., 1985. 298 p.

RIZZINI, C. T. A flora do cerrado. In: Simpósio sobre o cerrado. Ed. FERRI, M.G. Edgard Blucher, São Paulo, 1971. p. 75-96.

ROCHA, D. A. **Caracterização físico-química e química do polvilho da fruta-de lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.)**. 2006. 51p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RODRIGUES, F. H. G. **Biologia e Conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF**. 2002. 96 p. Universidade Federal de Campinas, SP.

SANCHEZ, R. A.; De MIGUEL, L.; MERCURI, O. Phytochrome control of cellulase activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 37, n. 319, p. 1574-1580, Feb. 1986.

SANCHEZ, R. A.; SUNELL, L.; LABAVITCH, J. M.; Bonner, B. A. Changes in the endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protrusion. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 1, p. 89-97, May 1990.

SANCHEZ, R. A.; DE MIGUEL, L. Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellins synthesis. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 1, p. 27-33, Mar. 1997.

SCHOPFER P., PLACHY, C. Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. **Plant. Physiology**, Rockville, v. 77, n. 3, p. 676-686, Mar. 1985.

SEMENTES DO CERRADO, 2005. Disponível em:
<<http://www.sementesdocerrado>> Acesso em: 16 jan. 2005.

SILVA, J. A.; da SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. de. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 166 p.

STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. Endo- β -mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation to germination rates. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 1, p. 21-29, Jan. 1997.

STILL, D. W.; DAHAL, P.; BRADFORD, K. J. A single-seed assay for endo- β -mananase activity from tomato endosperm and radicle tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 1, p. 13-20, Jan. 1997.

SYMON, D.E. **Sex forms in *Solanum* (Solanaceae) and the role of pollen collecting insects**. In: The biology and taxonomy of the Solanaceae (J.G. Hawkes, R.N. Lester & A.D. Skelding, eds.). Academic Press, London, p.385-397. 1979.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Tradução: SANTAREM, E. R.; et. A.,. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TOOROP, P. E.; BEWLEY, J. D.; HILLHORST, H. W. M. Endo- β -mananase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. **Planta**, Berlin, v. 200, n.2, p. 153-158, Oct. 1996.

TOOROP, P. E. **The role of endo- β -mananase activity in tomato seed germination**. 1998. 125 p. Wageningen University, Holanda.

TOOROP, P. E.; VAN AELST, A. C.; HILLHORST, H. W. M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1371-1379, Aug. 2000.

VALIO, I.F.M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, n.100, p. 983-991, Oct. 1976.

Van der TOORN, P.; KARSSSEN, C. M. Analysis of embryo growth in mature fruits of celery (*Apium graveolens*). **Plant Physiology**, Copenhagen, v. 84, n. 4, p. 593-599, Apr. 1992.

VIDAL, M. C.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; CÂMARA, H. H. L. L. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Lobeira) em casa de vegetação. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 271-274, set./dez. 1999.

VIEIRA, JR. G.; FERREIRA, P. M.; MATOS, L. G.; FERREIRA, E. C.; RODOVALDO, W.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; COSTA, E. A. **Phytotherapy Research**, Sussex, v. 17, n. 8, p. 892-896, Sept. 2003.

VOIGT, B.; BEWLEY, J. D. Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and post-germinative endo- β -mannanase: responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. **Planta**, Berlin, v. 200, n. 1, p. 71-77, Sept. 1996.

WANG, M. van der MEULEN, R. M.; VISSER, K.; van DUIJIN, B.; DE BOER, A. H. Effects to dormancy-breaking chemicals on ABA in barley grain embryos. **Seed Science Research**, Wellionford, v.8, n. 2, p. 129-137, June 1998.

WATKINS, J. T.; CANTLIFFE, D. J. Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annuum* at low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, n. 1, p. 46-150, June 1983.

WATKINS, J. T.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J.; NELL, T. A. Gibberelic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. **Journal of the American society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 1, p. 61-65, June 1985.

WELBAUM, G. E.; MUTHUI, W. J.; WILSON, J. H.; GRAYSON, R. L.; FELL, R. D. Weakening of muskmelon (*Cucumis melo* L.) V. Water relations of imbibition and germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46 p. n. 285, 391-400, Apr. 1995.

WU, C. T.; LEUBNER-METZGER, G.; MEINS F.; BRADFORD, K. J. Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed specifically in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 3, p. 1299-1313, July 2001.