

FISIOLOGIA DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DA *Annona squamosa* L., FRUTA-DO-CONDE

Nelson Délu Filho², Roberto Luiz Queiroz³,
Cleudson Soares Ferreira⁴, Gustavo Rennó Reis de Almeida⁵,
José Crispim Reis de Moraes⁶

Resumo: A germinação das sementes é um processo que envolve a expressão coordenada de vários genes que irão suportar a retomada do crescimento do embrião, até então num estado latente. Procurando investigar o programa metabólico durante a germinação de sementes, foi realizado o presente trabalho utilizando como modelo biológico sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa*), por apresentar conteúdos significativos de amido e lipídios, as principais substâncias de reserva da maioria das sementes. O experimento foi conduzido em condições de laboratório, com as sementes colocadas para germinar em caixa de areia, tendo sido retiradas amostras aos 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias de germinação. Nessas sementes foram analisados os conteúdos de amido, lipídios e proteínas, as atividades das isoformas invertásicas, da sintase da sacarose (SUSY), da α -amilase e da isocitrato liase. Os resultados obtidos suportam a hipótese do programa metabólico durante a germinação, com variações nas atividades das enzimas avaliadas acopladas à retomada do desenvolvimento do embrião.

PALAVRAS-CHAVES: Programa metabólico, Fonte-dreno, Remobilização de reservas.

SEED PHYSIOLOGY GERMINATION OF *Annona squamosa* L., SUGAR APPLE

Abstract: The seed germination is a process that involves the coordinate expression of some genes that will go to support the retaken one of the embryo growth, until then in a latent state.

²Fisiologia Vegetal, Engenheiro Agrônomo, Prof. Doutor, UNIS/Varginha - MG, nelsondelu@unis.edu.br

³Produção Vegetal, Engenheiro Agrônomo, Prof. Doutor, UNIS/Varginha – MG, robertoqueiroz@unis.edu.br

⁴Entomologia, Engenheiro Agrônomo, Prof. Doutor, UNIS/Varginha-MG, cleidsonsoares@yahoo.com.br

⁵Produção Vegetal, Engenheiro Agrônomo, Prof. Doutor, UNIS/Varginha-MG, gustavo.renno@unis.edu.br

⁶Biólogo, Mestre em Biotecnologia, j.crispim@yahoo.com.br

Looking for to investigate the metabolic program during the seed germination, the present work was carried through using as biological model sugar apple seeds (*Annona squamosa*), for presenting significant contents starch and lipids, the main seeds storage substances. The experiment was lead in laboratory conditions, with the placed seeds to germinate in sandbox, having been removed samples to the 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days of germination. In these seeds the starch, lipids and protein contents had been analyzed, the enzymatic activity of the isoforms invertases, sucrose synthase (SUSY), α -amilase, and isocitrate lyase was determinates. The gotten results support the hypothesis of the metabolic program during the germination, with variations in the activities of enzymes evaluated connected to the retaken one of the embryo development.

KEYWORDS: Metabolic program, Sink-source, Storage remobilization

INTRODUÇÃO

A germinação de sementes e o crescimento pós-germinativo são cruciais para a manutenção do ciclo de vida das plantas superiores. O processo de germinação é tido como a retomada do crescimento embrionário, após suspensão por tempo variável de espécie para espécie. Para suportar esse crescimento embrionário, a semente em germinação necessita remobilizar suas reservas, sendo o amido, proteínas e lipídios as principais formas de reserva das sementes da maioria das espécies vegetais (Soutani e Zeinali, 2006). A germinação é um processo bastante complexo durante o qual, pela embebição em condições ideais, uma semente quiescente é transformada em um vigoroso sistema metabolizante. Esta transição envolve o desenvolvimento de

várias capacidades bioquímicas de uma maneira programada, finamente controlada e coordenada.

A síntese e a degradação de compostos celulares, responsáveis pela manutenção do metabolismo celular, envolvem uma série de enzimas atuando, muitas vezes, em processos divergentes. Embora diversas pesquisas tenham focado vários aspectos do mecanismo de germinação, pouco é o conhecimento sobre a ação coordenada de enzimas envolvidas na hidrólise de substâncias de reserva de sementes durante o processo de germinação. Amilases, glicosidases e fosforilases, atuam sobre o amido, de maneira diferenciada, determinando uma mistura de açúcares solúveis com oligossacarídeos (Rosseto et al, 2004).

Este processo coordenado, em última análise, visa permitir adaptar o metabolismo e seu programa de desenvolvimento a condições ambientais enquanto as reservas estão sendo exauridas, até que a nova planta atinja a condição de fotoautotrófico (Santana et al, 2008).

Dessa forma, programas metabólicos especializados que envolvam a utilização rápida e eficiente das reservas das sementes são acionados desde os primeiros momentos em que a semente inicia seu processo de germinação.

A composição de reservas das sementes e o órgão no qual elas são depositadas diferem entre as espécies. Possivelmente, isso leva a uma variação no padrão de hidrólise de substâncias de reservas das sementes entre diferentes espécies vegetais.

Poucos são os estudos desenvolvidos que procurem focar o metabolismo da germinação de sementes, sendo que a maioria dos trabalhos concentra basicamente nos processos relacionados à superação de dormência, estudos sobre fotoblastimos e efeitos de fatores físicos, como temperatura, sobre a germinação, sem se preocupar com os aspectos fisiológicos envolvidos na germinação. Estes fatos podem ser verificados pelos estudos referentes

algumas espécies nativas (Oliveira et al., 2010; Missio et al., 2011).

O conhecimento detalhado dos passos envolvidos na hidrólise de diferentes reservas e o nível no quais determinadas espécies vegetais são dependentes dessas reservas para a germinação de suas sementes, considerando-se também o estabelecimento da plântula, é importante sob vários aspectos, já que muitas das principais culturas agrícolas têm nas sementes o principal objetivo da produção e perpetuação da espécie, ainda, a hidrólise do amido acontece por desdobramento, total, das moléculas de amilose e amilopectina, que ao romper resultam-se em dextrinas, cada vez mais simples e por fim em glicose (Torres, 2009).

Assim, procurou-se neste trabalho analisar a possível ação coordenada de enzimas envolvidas no processo de remobilização de reservas das sementes de fruta-do-conde ou ata, pertencente a família *Annonaceae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal: As sementes foram obtidas de frutas adquiridas junto ao comércio local no município de Lavras-MG, situada à latitude 21°14'S, longitude 45°00'W e altitude de 918 m. Inicialmente,

as sementes foram retiradas dos frutos e lavadas em água corrente para retirada da mucilagem aderente ao tegumento, sendo na seqüência colocadas para secar a sombra. Depois, foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em condições de ambiente até o momento das análises. Foram analisados os teores de proteínas (Bradford, 1976), amido (por açúcares redutores, Muller, 1959) e lipídios (Instituto Adolfo Lutz, 1977). O peso seco das sementes foi obtido por desidratação em estufas de circulação de ar a 55°C por 4 dias.

Experimentos: 3 grupos de 25 sementes cada foram esterilizadas por 5 minutos com solução de 2% NaCl, e após lavadas com água deionizada, sendo, posteriormente, colocados em papel germitest embebidos em solução de 100 ppm GA e mantidas a 25°C por 5 horas

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para elucidar o papel de algumas enzimas do metabolismo de carboidratos envolvidas no processo de germinação, foram avaliadas as atividades das enzimas α -amylase, sucrose synthase, invertases isoenzymes and isocitrate lyase em sementes de *A. squamosa*. Os resultados indicam a existência de um programa metabólico coordenado, envolvendo as

(Ferreira et al., 2002). Em seguida, as sementes foram transferidas para caixas plásticas contendo areia lavada umedecida com água destilada e mantidas a 25°C. Sementes com diferentes tempos de germinação (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias) foram coletadas e transferidas para nitrogênio líquido. Após a retirada do embrião, os cotilédones foram utilizados para determinação da atividade das enzimas α -amilase (Skadsen, 1993), isoformas invertásicas e sintase da sacarose (Delú-Filho et al., 2000) e isocitrato liase (Baleroni et al., 1997; Khan et al., 1979).

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Tukey. Os dados de percentagens foram transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$. O programa utilizado para análise dos dados foi o software SISVAR (Ferreira, 2003).

enzimas estudadas, sendo suas atividades máximas identificadas em diferentes épocas de germinação das sementes.

A análise da composição das principais substâncias de reserva de *Annona squamosa* indica que amido, lipídio e proteínas compõem 39, 25 e 8%, respectivamente, do peso seco das sementes, resultando em 72% do total de substâncias de uma semente (dados não

apresentados). Possivelmente, demais substâncias de reserva não quantificadas neste trabalho, como minerais, ácidos orgânicos, açúcares solúveis possam completar a totalidade da massa das sementes. Todavia, há que se considerar ainda que nem toda matéria seca está disponível como material de reserva, sendo constituído de membranas, parede celular, etc. Foi verificado ainda que essas sementes possuíam 65% de umidade. Nota-se que pela composição das sementes de *A. squamosa* estas são excelentes modelos biológicos para estudos de metabolismo da germinação de sementes, particularmente aqueles envolvendo programas metabólicos.

Sementes de *A. squamosa* apresentam como principais substâncias de reserva amido, lipídios e proteínas. Assim, a retomada do desenvolvimento embrionário, suspenso nas sementes, ocorre a partir da remobilização dessas substâncias, que serão utilizadas para

suportar o requerimento embrionário por energia e metabólitos intermediários para a síntese de novos constituintes celulares. No processo de remobilização das reservas, os carboidratos solúveis desempenham importante função, atuando como um elo entre a substância de reserva recém-hidrolisada e síntese de novos compostos celulares. Isto pode ser verificado em *A. squamosa* onde nota-se uma redução da concentração de amido com conseqüente aumento no conteúdo de açúcares solúveis (Figura 1). Magalhães et al. (2010) contrariamente a esta pesquisa, identificaram uma diminuição no conteúdo de carboidratos solúveis nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake durante a germinação.

Verifica-se uma relação direta e inversa entre o teor de amido e o teor de açúcares redutores em sementes em germinação de *A. squamosa* (Figura 1).

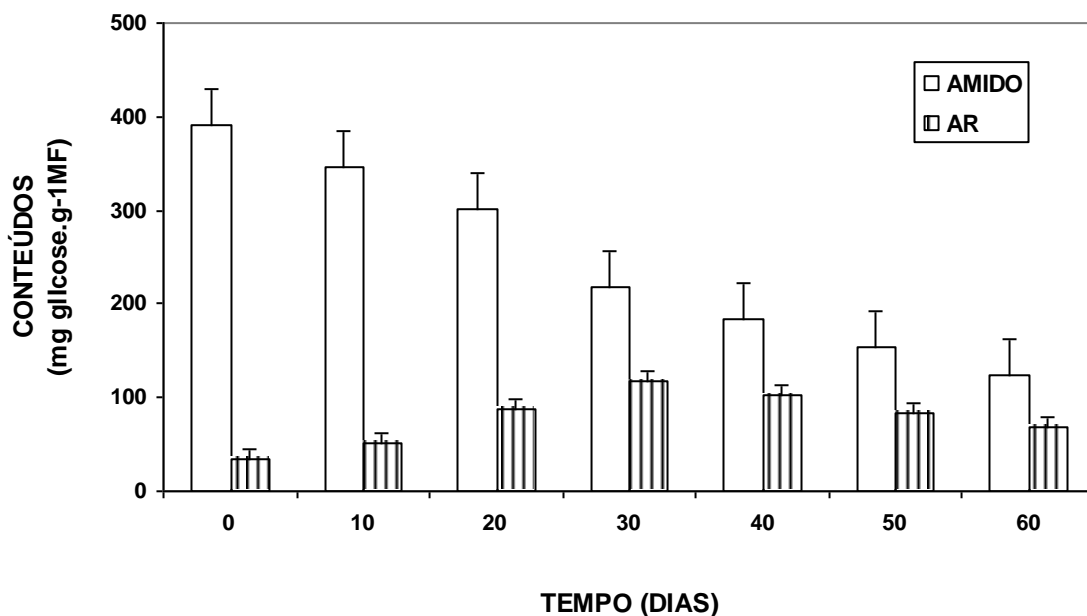


Figura 1. Conteúdos de Amido e Açúcares Redutores (AR) de sementes em germinação de *A. squamosa* (Média de 3 repetições. Barras indicam o erro padrão da média).

Observa-se ainda uma relação direta e proporcional entre a atividade da α -amilase (Figura 2) e os teores de açúcares redutores, já que são o resultado final do processo de degradação e hidrólise do amido, para fornecer substrato respiratório para a retomada do desenvolvimento do embrião.

Foi avaliada também a atividade α -amilase em diferentes tempos de germinação (Figura 2). O amido é preferencialmente hidrolisado pela α -amilase, cujo gene é altamente expresso em sementes em germinação sob influência de fitormônios, sobretudo pelas múltiplas formas do ácido giberélico (Rangaswamy et al., 2008). Em sementes de *A. squamosa* nota-se um aumento da atividade da

amilase até o 20º dia, embora a atividade da enzima seja detectada até o final do experimento (Figura 2). Esses dados juntamente com os da (Figura 1) confirmam a hidrólise do amido e conseqüente aumento de carboidratos solúveis. As amilases podem ser divididas em dois grandes grupos baseados em suas propriedades físico-químicas e são codificadas por 2 famílias multi-gênicas. O Grupo I tem um pI próximo a 5,8 e é cálcio-independente e possui alta dependência da presença de GA. O Grupo II é caracterizado por um pI próximo a 4,5 e representa 60% do total da atividade de α -amilase e requer cálcio para sua atividade e são sintetizadas durante a

germinação, induzidas por GA (Perata et al., 1997).

Tem sido verificada a presença da atividade da α -amilase em sementes de um grande número de espécies vegetais (Sana et al., 2009; Coimbra, et al., 2009; Bako et al., 2011) e também no processo de maturação de sementes de cevada

(Rodenburg et al., 2000) e trigo (Mrva et al., 2006). Em cereais, a regulação hormonal e do desenvolvimento em sementes de cereais é bem estudada, com a indução da expressão do gene da α -amilase promovida por GA (Subbarao, Datta & Sharma, 1998) e reprimida por ABA (Zhao et al., 2009).

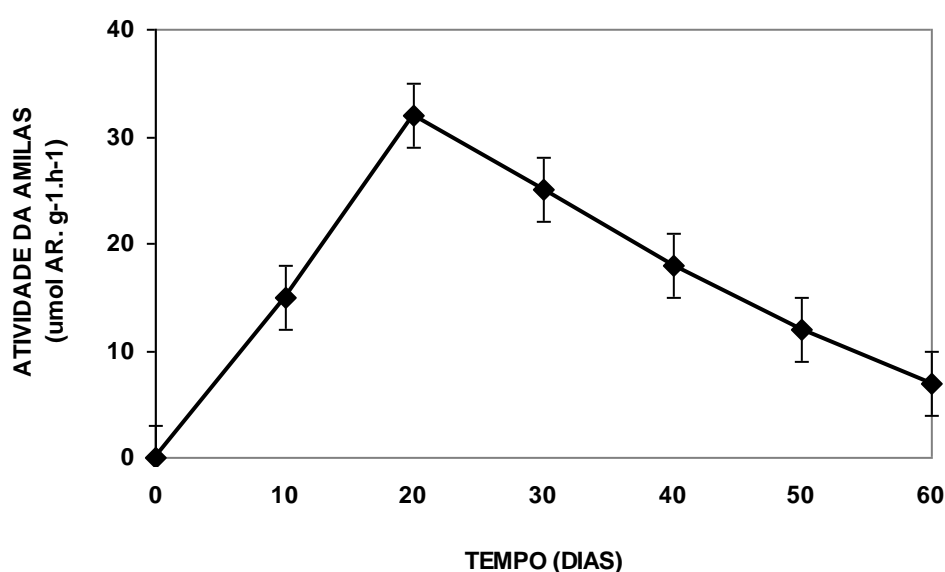


Figura 2. Atividade da α -Amilase de sementes em germinação de *A. squamosa* (Média de 3 repetições. Barras indicam o erro padrão da média).

A atividade das isoformas invertásicas em sementes em germinação de *A. squamosa* apresentam valores máximos aos 20 dias, para todas as três isoformas (Figura 3).

Tem sido relatado a presença de invertases na germinação de sementes (Molle, et al., 2009), embora a função dessas enzimas durante o processo seja pouco conhecido. Mitsuhashi et al., (2004)

sugerem que as atividades das invertases solúveis podem disparar o processo de expansão do embrião em sementes de *A. thaliana*, apesar de que o acúmulo de mRNA não é paralelo aos eventos de germinação. Esses autores verificaram ainda que a aplicação exógena de GA promove a germinação das sementes e que a síntese *de novo*, pela expressão dos genes

das invertases ácidas, está provavelmente sob controle da ação conjunta do GA e do fitocromo. Em *M. domestica* a atividade da isoenzima vacuolar nem foi detectada, enquanto valores significativos foram observados para a enzima citosólica. No presente trabalho verifica-se uma significativa participação das isoformas da parede e do citosol (Figura 3).

Esses resultados se enquadram no modelo proposto por Koch (2004), exceto para a isoforma citosólica. Possivelmente isso se deve à função de hidrólise da sacarose que é produzida em grandes quantidades na semente em germinação, a qual será hidrolisada preferencialmente pela isoenzima apoplástica ou pela citosólica, uma vez que durante a

germinação não parece provável que as células irão acumular sacarose no vacúolo, devido à grande demanda por carboidratos redutores que existente em outras partes da célula, tanto para a atender a demanda energética quanto para a síntese de novos constituintes celulares. Consistente com esse padrão, as máximas atividades das invertases (Figura 3) e da α -amilase (Figura 2) são obtidas no 20º dia de germinação. Nota-se um padrão semelhante entre as diferentes isoformas, apenas com diferenças nos valores específicos de cada atividade, sendo que a NCI apresentou as maiores atividades e a CWI a menores. Interessantemente, o padrão de atividade das invertases é bastante semelhante ao da α -amilase.

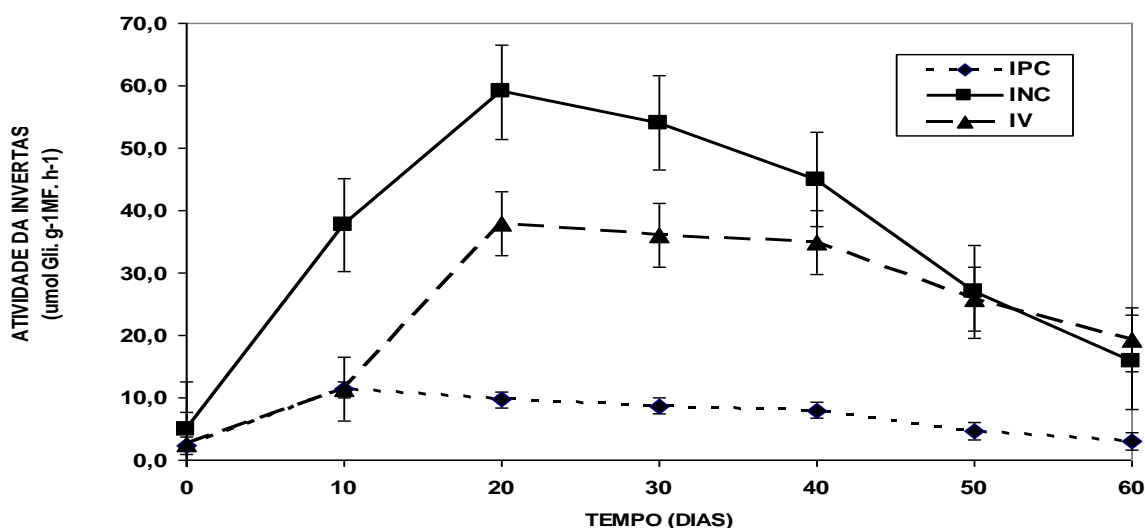


Figura 3. Atividade de isoformas da invertase da parede celular (IPC), invertase neutra do citosol (INC) e ácida do vacúolo (IV) de sementes em germinação de *A. squamosa* (Média de 3 repetições. Barras indicam o erro padrão da média).

A atividade da Susy (Figura 4) apresentou maior atividade aos 30 dias de germinação, indicando que esta enzima está envolvida no processo de germinação

em um estágio posterior ao das demais enzimas avaliadas anteriormente neste trabalho (α -amilase e invertase, Figuras 2 e 3, respectivamente).

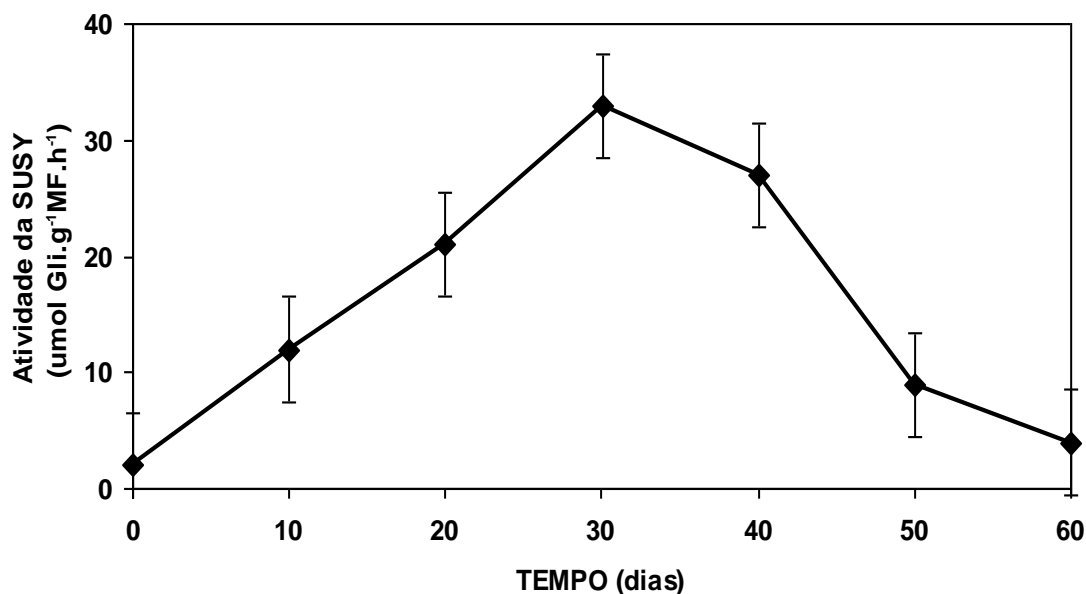


Figura 4. Atividade da SUSY de sementes em germinação de *A. squamosa* (Média de 3 repetições. Barras indicam o erro padrão da média).

O papel da ICL tem sido relatado em várias espécies, como nas sementes de *Glycine max* (Carvalho et al., 2014). A função básica da ICL é catalisar a clivagem do isocitrato, produzido durante a hidrólise de lipídios de reserva em sementes, para produzir succinato e glioxilato. Finalmente, a atividade da isocitrato lyase,

avaliada durante o processo de germinação de sementes de fruta-do-conde atingiu o maior valor aos 40 dias, reduzindo a seguir, mas ainda assim, mantendo níveis significativos de atividade em relação ao início do processo de germinação (Figura 5).

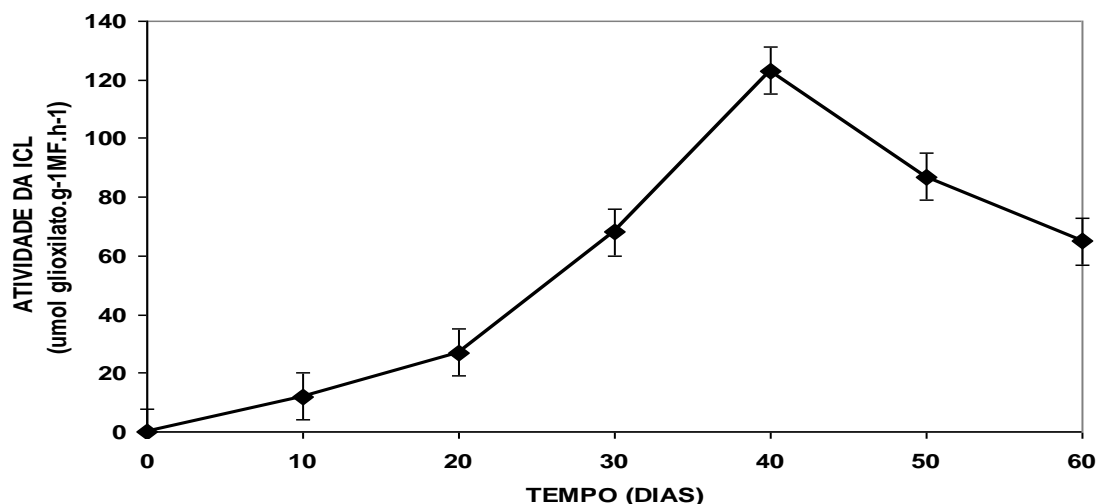


Figura 5. Atividade da ICL (Isocitrato Liase) de sementes em germinação de *A. squamosa*. (Média de 3 repetições. Barras indicam o erro padrão da média).

Interessantemente, sementes em germinação de fruta-do-conde possuem atividades máximas da α -amilase, invertases e susy e, numa fase mais avançada da germinação, aparece a atividade da ICL, indicando haver, para essa espécie, uma preferência pela degradação das reservas de carboidratos em relação aos lipídios. Possivelmente, a ICL não desempenha papel vital no processo de germinação dessas sementes, em função das atividades significativas de outras enzimas avaliadas neste trabalho, mas ela pode ter um papel fundamental no estabelecimento da plântula, fornecendo substâncias necessárias numa fase em que as reservas de carboidrato (amido), já estão se exaurindo.

CONCLUSÕES

Sementes de *A. squamosa* apresentam como principal substância de reserva o amido, que é degradado via atividade amilolítica para suportar a retomada do desenvolvimento embrionário, em um processo bioquimicamente coordenado com a atividade invertásica e de sintase da sacarose.

A atividade da ICL aparece numa fase mais avançada da germinação, possivelmente para permitir o perfeito estabelecimento da plântula.

REFERÊNCIAS

BALERONI, C.R.S.; FERRARESE, M. DE L. L.; COSTA, S.C., SOUZA, N.E & FERRARESE-FILHO, O. Isocitrate lyase activity and mobilization of lipids and carbohydrates in cotyledons of canola

(communication). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.3, p.189-192, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athenes, v. 72, n.1/2, p. 248-254, 1976.

BAKO, A.; GALL, G.; BALAZS, E. Quantification of transgene expression in maize (*Zea mays* L.) throughout the vegetation period. **Plant Breeding**, Berlim, v. 130, p. 41-45, 2011.

CARVALHO, E. R.; MAVAIEIE, D. P. DA R.; OLIVEIRA, J. A.; CARVALHO, M. V., VIEIRA, A. R. **Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 49, n. 12, p. 967-976, 2014.

COIMBRA, R.A et al. **Teste de vigor utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de milho-doce (SH2)**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2402-2408, 2009.

DELÚ FILHO, N., FONTES, E. P. B., PIROVANI, C. P., MATRANGOLO, F. S., PEDRA, J. H. F., MACEDO, J., OTONI, W. C. A sucrose binding protein homologue from soybean affects sucrose uptake in suspension-cultured transgenic tobacco cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, n.5, p.353-361, 2000.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**. Versão 4.3. Lavras: UFLA, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 2. ed. São Paulo, v.1, 1977.

KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, n.3, p.235-246, 2004.

MAGALHÃES, S. R.; BORGES, E. E. de L E.; BERGER, A. P. de A. **Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake durante a germinação**. Ciência Florestal, v. 20, n. 4, p. 589-595, 2010.

MITSUHASHI, W.; SASAKI, S.; KANAZAWA, A.; YANG, Y-Y.;

KAMIYA AND TOYOMASU, T. Differential expression of acid invertase genes during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.68, n.3, p.602-608, 2004.

MISSIO, E. L.; MAURMANN, R.; TREVISAN, R.; TRENTO, R. **Resposta de sementes de flamboyant submetidas a dois métodos de superação de dormência.** Revista da FZVA, Uruguaiana, v. 18, n. 2, p. 46-55, 2011.

MOLLE, F. R. D.; BRANDÃO, A. D.; TINÉ, M. A. S. **Variação ao longo do dia da atividade de enzimas do catabolismo de sacarose em plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva.** Revista Brasileira Botânica, v. 32, n. 1, 2009.

MRVA, K.; WALLWORK, M.; MARES, D.J. α -Amylase and programmed cell death in aleurone of ripening wheat grains. **Journal Experimental Botany**, v.57, n.4,p.877-885,2006.

OLIVEIRA, L. M.; BRUNO, R. L. A.; GONÇALVES, E. P.; LIMA JÚNIOR, A. R. **Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) SW. – Leguminosae.** Revista Caatinga, Mossoró, v. 23, n. 1, p. 71-76, 2010.

PERATA P, MATSUKURA C, VERNIERI P, YAMAGUCHI J: Sugar repression of gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. **Plant Cell**, v.9, n.12,p.2197-2208, 1997.

RANGASWAMY V., MUMBAI N., BALU G. Process for gibberellic acid production with “*Fusarium moniliforme*” strains. **United States Patent**, 2008.

RODENBURG, K.W.; VALLÉE, F.; JUGE, N.; AGHAJARI, N.; GUO, X.; HASER, R.; SVENSSON, B. Specific inhibition of barley α -amylase 2 by barley α -amylase/subtilisin inhibitor depends on charge interactions and can be conferred to isozyme 1 by mutation. **European Journal of Biochemistry**, v.267, n.4, p.1019-1029, 2000.

SANA, N.K. et al. Enzyme activities and mobilization of nutrients in Brassicaceae spp. and wheat *Triticum aestivum* L. **Journal of Biosciences**, Kamataka, v. 17, p. 101-106, 2009.

SKADSEN, R.W. Aleurones from barley with low α -amylase activity become highly responsive to gibberellin when detached from the starchy endosperm.

Plant Physiology, v.102, n.1, p.195-203, 1993.

SOUTANI, A.; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.55, n.1, p. 195-2000, 2006.

SUBBARAO, K.V.; DATTA, R.; & SHARMA, R. Amylases synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p.657-666, 1998.

TORRES, L.M. **Caracterização dos parâmetros técnicos do processo de fabricação de aguardente a partir de gengibre**. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campos de Botucatu, 2009.

ZHAO, M.G.; LIU, R.J.; CHEN, L.; TIAN, Q. Y.; AHANG, W. H. Glucose-induced inhibition of seed germination in *Lótus japonicus* is alleviated by nitric oxide and spermine. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.213-218. 2009.