

AMIDO NO MEGAGAMETÓFITO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* (BERT.) O. KTZE: DEGRADAÇÃO DURANTE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO ESPORÓFITO¹

Rosa Maris Rosado²

Alfredo Gui Ferreira^{2,3}

Jorge Ernesto de Araujo Mariath^{2,3}

Alfredo Elio Cocucci^{2,4}

Recebido em 17-03-93. Aceito em 15-01-94.

RESUMO - (Amido no megagametófito de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze: Degradação durante a germinação e desenvolvimento do esporófito). O pinheiro brasileiro possui um diásporo de grandes dimensões, o pinhão, rico em reservas amiláceas. A mobilização dessas reservas pelo embrião foi quantificada em secções transversais do megagametófito, em cinco estágios de desenvolvimento da plântula, sob dois tratamentos, na luz e no escuro. Na luz, o consumo das reservas do megagametófito pela plântula é mais rápido do que no escuro e, existe uma tendência ao consumo do amido realizar-se primeiro na região do megagametófito próxima ao embrião.

Palavras-chave: degradação do amido; pinheiro do paraná; semente; anatomia; luz/escuro.

ABSTRACT - (Starchy reserve of the megagametophyte of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze: Mobilization during germination and on the developing sporophyte). The parana pine has a very large dispoire, the "pinhão", rich in starchy reserves. The mobilization of these reserves by the embryo was quantified in transversal sections of the megagametophyte, in five stages of seedling development, sampled in the light and in the darkness. The consumption of starch grains was in plantlets grown in light than those grown in darkness. There was a tendency to quicker use up of the the megagametophyte starch near to embryo.

Key words: starch degradation; parana pine; seed; anatomy; light/darkness.

¹ Condensado da monografia de bacharelado do primeiro autor.

² Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Paulo Gama 40. CEP 90046-900 - Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Bolsistas do CNPq.

⁴ Professor Visitante - Departamento de Botânica - UFRGS -Bolsista do CNPq / IMBIV - Córdoba - Argentina.

Introdução

O pinheiro do Paraná, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze., apresenta um diásporo de grandes dimensões, pesando de 6 a 7 gramas (Ferreira 1977), rico em reservas amiláceas (Pastore 1939; Ferreira 1981) sendo alimento para a fauna silvestre (Reitz & Klein 1966) e para o homem (Mota & Cramer 1953). A semente está constituída por testa e embrião, este alojado na porção central do megagametófito ou prótalo, com a radícula orientada para a porção proximal. Não há continuidade de tecidos entre estas estruturas (Ferreira 1981). A semente é envolta por uma bráctea e uma escama ovulífera soldadas que formam um envoltório de cor castanha. Este envoltório é constituído interna e externamente por fibras longitudinais, mediada por uma camada de fibras transversais (Mattos 1982), o qual restringe a emergência da radícula na germinação (Aquila & Ferreira 1984).

A primeira etapa do processo germinativo é a embebição, a qual é seguida da ativação do sistema enzimático com início da mobilização das reservas (Bidwell 1974). Esta mobilização leva a síntese de matéria e crescimento do embrião, ocorrendo assim a emergência da radícula e o desenvolvimento da plântula (Kozlowski 1971, Street & Cockburn 1972). A ativação do metabolismo consiste, essencialmente, na mobilização de enzimas pré-existentes na semente e síntese de novas enzimas (Leopold & Kriedmann 1975). O processo de utilização das reservas é de hidrólise, reverso ao de síntese (Kramer & Kozlowski 1979), e pode ser dividido em duas etapas, mobilização das reservas do embrião e das reservas do megagametófito (Bewley & Black 1978).

O amido é formado por cadeias ramificadas de amilopectina e não-ramificadas de amilose. Estas unidades estruturais podem ser agrupadas de acordo com a espécie que a origina (Whister & Colbert 1957). Na análise do amido de *A. angustifolia* foi constatado que 41% é amilose, o que é uma alta proporção quando comparada a amido de cereais (Bobbio *et al.* 1978) sendo o gel, obtido pelo aquecimento dos grãos de amido, resistente e pouco susceptível à degradação (Bobbio *et al.* 1978, Cereda & Wosiacki 1985).

A sacarose produzida na degradação do amido ao megagametófito é transportada para as regiões de crescimento do embrião, tendo sido encontrada a enzima invertase na periferia dos cotilédones (Cardemil & Varner 1984). Rosa (1986) verificou que a glicose e a frutose ocorriam na interface entre megagametófito e embrião de *A. angustifolia*, sugerindo que a sacarose existente seria hidrolisada e suas oses passariam para o interior dos cotilédones onde haveria ressíntese. A atividade das amilases no início do desenvolvimento é baixa (Ferreira *et al.* 1979), sendo as fosforilases as principais enzimas da degradação inicial do amido (Cardemil & Varner 1984).

Este trabalho teve como objetivo verificar o consumo de grãos de amido no megagametófito de *A. angustifolia* durante o desenvolvimento inicial da plântula e a influência da luz no processo.

Material e métodos

Sementes de *A. angustifolia*, coletadas no município de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, foram desinfestadas por 10 minutos com hipoclorito de sódio a 20% (1% de cloro ativo) e, posteriormente, lavadas com água destilada. As sementes foram esscarificadas mecanicamente, removendo-se a porção proximal das brácteas involucrais (Ferreira 1977) e colocadas em caixas "gerbox" (12x12 cm), previamente forradas com papel absorvente, e umedecidas com água. Os experimentos foram mantidos a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 horas de luz. A medida que germinavam as plântulas eram transferidas para potes contendo vermiculita úmida. Estes foram divididos em dois tratamentos: na luz, no fotoperíodo acima descrito e no escuro. As plantas foram cultivadas nestas condições até atingirem o estágio em que continham 50 folhas.

Ao longo do processo de germinação e cultivo foram colhidos megagametófitos, intactos ou semi-consumidos, para contagem dos grãos de amido. Eles foram colhidos em cinco estágios de desenvolvimento (Ferreira 1977): 1- quiescentes; 2- emergência da radícula; 3- emergência da parte aérea; 4- vinte e cinco folhas; 5- cinquenta folhas. Nos dois últimos estágios não foram considerados os primórdios foliares do ápice caulinar, apenas as folhas completamente expandidas. Esta escolha deve-se ao fato de haver grande variabilidade temporal na germinação e desenvolvimento das plântulas.

A contagem dos grãos de amido foi feita em amostras obtidas a partir da fixação em Formaldeído, Ácido acético e Etanol a 50% (Johansen 1940). Corte transversal na região mediana do eixo mais longo da semente propiciou um segmento com 1 cm de comprimento e este foi orientado quanto à região proximal ou distal da semente na pinha (Figura 1 a, 1 b, 1 c). O embrião foi mantido no interior da cavidade para facilitar a orientação do segmento.

O material fixado foi processado pelos meios tradicionais com inclusão em parafina (Sass 1951). Cortes foram efetuados em micrótomo rotatório com 15 µm de espessura. Obtiveram-se vários cortes de cada uma das faces distal e proximal do segmento abrangendo as áreas mais internas e externas (Figuras 1 d, 1 e). Os cortes aderidos às lâminas foram corados com safranina hidroalcoólica e "fast-green" e montados em bálsamo do Canadá (Johansen 1940). Sob luz polarizada procedeu-se a contagem dos grãos de amido, que se situavam sobre uma transecta imaginária traçada na direção 6-12 horas do campo do microscópio.

Os segmentos de megagametófito foram obtidos de três diferentes sementes, sendo de cada uma preparadas 12 lâminas com os cortes. Efetuou-se 4 contagens por corte, duas transectas em campos da porção interna e duas transectas em campos externos, tanto no lado distal quanto no proximal do megagametófito. Os campos de contagem foram obtidos ao acaso a partir da quarta célula do lado interno e terceira do lado externo (Figura 1 e).

Os resultados foram analisados seguindo um desenho experimental completa-

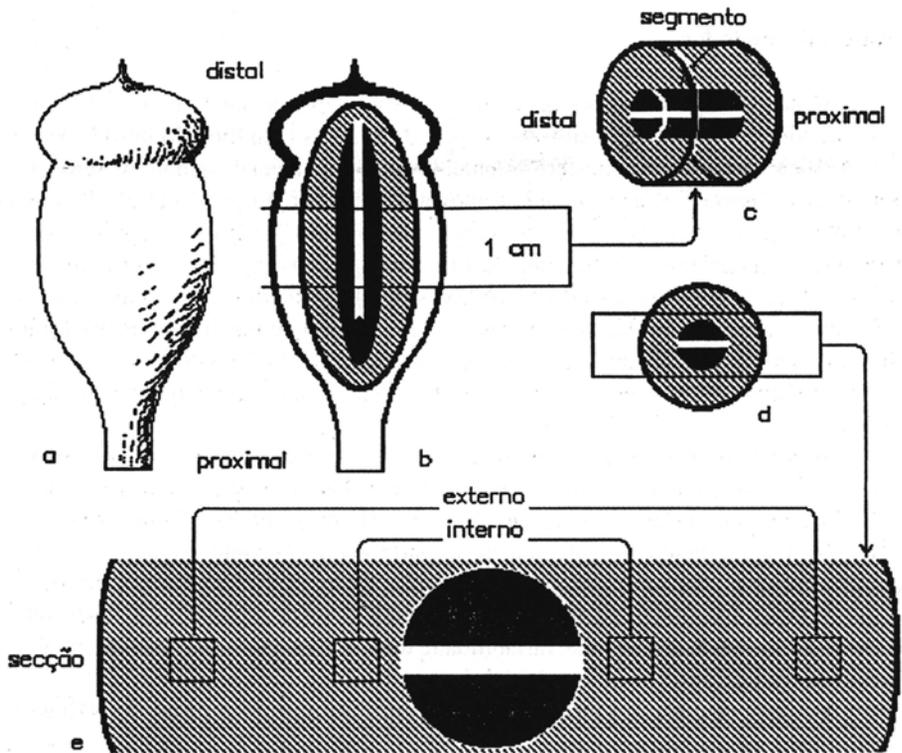


Figura 1.a-e: Representação esquemática do diásporo e semente de *A. angustifolia*.

a. Aspecto geral do diásporo; b. Secção longitudinal de a com a localização do segmento analisado; linha hachurada = gametófito, área preta = embrião; c. Esquema tridimensional do segmento, com a orientação proximal e distal; d. Secção transversal do segmento delimitando a área analisada; e. Esquema de um corte montado sobre lâmina, com indicação dos campos internos e externos.

mente casualizado e as médias diferenciadas através da diferença mínima significativa (DMS) de Fisher a uma probabilidade de $\alpha \leq 0,05$.

Resultados e discussão

As células do megagametófito de *A. angustifolia* são preenchidas totalmente por grãos de amido na semente quiescente (Figura 2a). A atividade enzimática nesta fase é baixa (Cardemil & Varner 1984), porém, logo após a germinação cresce rapidamente (Ferreira *et al.* 1979), apresentando uma queda no número de grãos de amido na fase de emergência da radícula (Tabela 1). As reservas amiláceas são degradadas e direcionadas à plântula em crescimento (Ferreira 1977). Na plântula com, aproximadamente, 50 folhas as células do megagametófito encontram-se, prati-

camente, sem amido (Tabela 1). Essa rápida digestão talvez reflita o rápido uso dos produtos terminais pela plântula em desenvolvimento (fonte-dreno), embora este mecanismo pareça não servir de controle em outras espécies como regulador da atividade enzimática tipo inibição pelo produto (Davis 1983).

As plântulas cultivadas no escuro mobilizam as reservas mais lentamente do que as cultivadas à luz e ficaram estioladas. Nas plantas cultivadas à luz, as folhas são pungentes devido a epiderme pluriestratificada de paredes muito reforçadas, com acúmulo de polissacarídeos do tipo celulose (Monteiro *et al.* 1977). Embora a fotossíntese nestas plantas possa estar contribuindo com assimilados, é possível que parte substancial do material de reserva tenha sido usado para estruturar este tecido resistente. A atividade amilolítica é mais baixa em plantas cultivadas no escuro (Ferreira *et al.* 1979), o que revela uma possível menor demanda de açúcares. Em plantas estioladas já havia sido observada uma menor demanda das reservas (Davis 1979).

No estágio de emergência da parte aérea de plântulas cultivadas na luz, houve diferenças significativas (Tabela 1) entre o número médio de grãos na região proximal e distal, bem como entre os lados interno e externo. Na maioria dos outros estágios isso não ocorreu. Também não houve diferenças entre as atividades enzimáticas de degradação entre estas partes do megagametófito (Bill Davis, comunicação pessoal). Isto sugere que por todo o cotilédone há uma mobilização uniforme das reservas do megagametófito para a plântula, funcionando o cotilédone como um "haustório" (Lozada & Cardemil 1983).

Em cereais a degradação do amido pela α -amilase, é uma resposta a giberelinas produzidas no embrião (Briggs 1973, Varner & Ho 1976, Roberts & Hooley 1988). Em *A. araucana* foi constatado um aumento da atividade da fosforilase do amido antes da germinação (Cardemil & Varner 1984) sugerindo haver um controle via mensagem emanada do embrião.

A análise anatômica comparada, entre os núcleos do megagametófito e os do embrião, de *A. angustifolia* constatou diferenças de funcionamento. Os núcleos do megagametófito se acham muito comprimidos e deformados pela pressão dos grãos de amido acumulados no citoplasma, de tal modo que seu perfil se acomodou aos contornos deles (Figura 2h). Esses núcleos perderam a cariolinfa e a cromatina exibe uma marcada condensação, indicando uma pobre ou nenhuma geração de mRNA. Os nucléolos se mostram muito pequenos, praticamente invisíveis, tanto em estado quiescente como em sementes germinadas (Figuras 2h, 2i), e sem vacúolos ativos o que indica falta de produção de rRNA e tRNA (Risueño *et al.* 1988). Estas células, por conseguinte, não se acham em condições de efetuar síntese protéica.

Por outro lado, núcleos das células embrionárias no momento da germinação, embora deformados pela acumulação de amido, apresentam maior quantidade de cariolinfa e a cromatina se encontra menos condensada em comparação com os núcleos do megagametófito. Seus nucléolos estão bem desenvolvidos e exibem vacúolos ativos, indicadores de atividade de síntese de rRNA e tRNA (Figuras 2e, 2g — compare com a Figura 2f em estado quiescente). Existe uma graduação no estado fisiológico dos núcleos que vai desde a epiderme cotiledonar até a zona mais interna

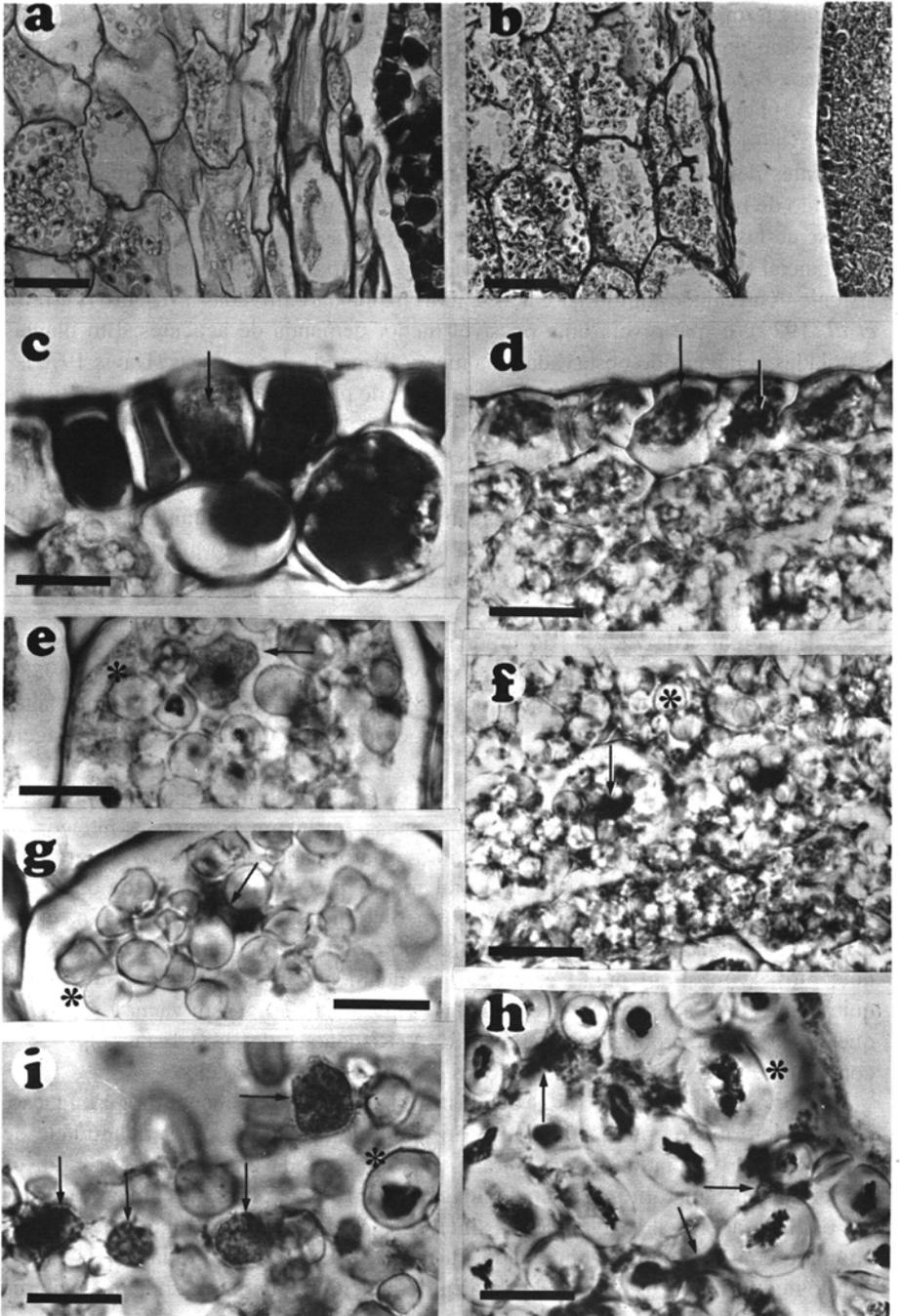


Tabela 1. Número médio de grãos de amido (e desvio padrão) nas transectas em cada região do megagametófito de *Araucaria angustifolia* colhidos em diferentes estágios de desenvolvimento do processo de germinação e cultivo, sob luz ou no escuro.

Estágio	Região do megagametófito				Média Geral
	Proximal		Distal		
	interno	externo	interno	externo	
Quiescente	41.54ab (±6.46)	40.74a (±5.53)	43.53b (±6.16)	41.13a (±7.07)	41.74
Emergência Radícula	26.46a (±5.35)	27.40a (±6.85)	27.38a (±3.91)	26.97a (±5.28)	27.05
Emergência da parte aérea					
Luz	19.72ab (±6.00)	21.93c (±4.62)	19.01a (±4.89)	21.04bc (±5.66)	20.43
Escuro	25.31b (±5.08)	23.01a (±5.57)	23.32a (±4.70)	21.83a (±6.06)	23.37
Plântulas com 25 Folhas					
Luz	11.83a (±4.38)	12.33a (±4.47)	11.86a (±3.74)	12.10a (±3.78)	12.03
Escuro	23.04b (±3.24)	21.71a (±3.48)	22.07ab (±4.13)	22.11ab (±4.37)	22.23
Plântulas com 50 Folhas					
Luz	3.04b (±2.28)	1.93a (±2.20)	2.63ab (±2.88)	2.19ab (±2.52)	2.45
Escuro	3.75b (±2.90)	2.74a (±2.44)	3.29ab (±2.71)	2.88a (±2.67)	3.17

Médias com a mesma letra dentro de cada linha não são significativamente diferentes entre si (DMS; $P \leq 0,05$)

Figura 2.a-i: Aspectos histológicos em sementes germinadas (coluna da esquerda) e quiescentes (coluna da direita) de *A. angustifolia*.

a. Aspecto geral da interface embrião/megagametófito numa semente germinada. À direita, embrião; à esquerda, gametófito. Barra igual a 100 μm . b. Como em a, porém em estágio quiescente. Barra igual a 100 μm . c. Detalhe da epiderme do cotilédone e tecido subjacente de sementes germinadas; a seta indica núcleo, com nucléolo bem desenvolvido, em uma célula epidérmica. Conteúdo escuro das células corresponde a compostos fenólicos. Barra igual a 200 μm . d. Como em c, porém em estágio quiescente; as setas indicam núcleos muito desidratados, sem nucléolos aparentes; os asteriscos indicam grãos de amido. Barra igual a 200 μm . e. Célula do parênquima subepidérmico do cotilédone em semente germinada; a seta indica núcleo ativo com nucléolo bem desenvolvido e cromatina dispersa de modo homogêneo; o asterisco, grão de amido. Barra igual a 200 μm . f. Como em e, porém em semente quiescente; a seta indica núcleo condensado, sem nucléolo aparente; o asterisco, grão de amido. Barra igual a 200 μm . g. Célula parenquimática mais interna do cotilédone em semente germinada; a seta indica núcleo lobado por pressão dos grãos de amido, com nucléolos visíveis; o asterisco, grão de amido. Barra igual a 200 μm . h. Cenócito do parênquima do gametófito em semente em estado quiescente; setas indicam núcleos picnóticos; o asterisco indica grão de amido com hilo muito desenvolvido. Barra igual a 200 μm . i. Cenócito de parênquima do gametófito em semente germinada; setas indicam núcleos com escassa cariolinfa, com condensações cromáticas de aspecto granuloso e ausência de nucléolos; o asterisco indica grão de amido. Barra igual a 200 μm .

(tanto em sementes quiescentes como em germinadas). Em sementes germinadas as células epidérmicas possuem pequenos grânulos de amido (Figura 2g). As células do parênquima vizinho possuem núcleos em estado semelhante, porém algo deformados (Figura 2e), enquanto nas zonas mais profundas os núcleos possuem menos cariolina, estando mais deformados e seu nucléolo sendo também ativo (Figura 2g). Em sementes quiescentes as células epidérmicas e o parênquima subepidérmico possuem núcleos deformados, sem nucléolos aparentes, e citoplasma com grãos de amido (Figuras 2d, 2f). Convém destacar que durante a germinação as células epidérmicas do cotilédono se preenchem de substâncias fenólicas, o mesmo ocorrendo com algumas células parenquimáticas (Figura 2c). Na zona do gametófito, próximo aos cotilédones do esporófito, existe uma seqüência gradual de degradação de matéria orgânica, de dentro para fora, quando se compara essa região em sementes quiescentes (Figura 2b) com aquela das germinadas (Figura 2a). Essa seqüência é demonstrada, nestas últimas, pela presença de: 1) apenas paredes celulares, sem conteúdo citoplasmático; 2) paredes celulares com citoplasma e sem reservas amiláceas, núcleo pequeno, mais ou menos elíptico, sem nucléolo visível; e 3) paredes celulares contendo citoplasma com grãos de amido e núcleos no mesmo estado anterior.

Essas características permitem afirmar que não havendo transcrição gênica, nem síntese protéica nas células do prótalo (megagametófito), estas não realizariam a degradação do amido acumulado nas mesmas. Ao contrário, as células do parênquima e a epiderme embrionários, particularmente nos cotilédones, possuem os mecanismos para a função de lise amilácea (Figuras 2c, 2e, 2g). Outro ponto que reforça esta afirmação é o fato de que a degradação do amido do embrião precede a do prótalo.

Concluindo, as células do megagametófito de *A. angustifolia* encontram-se preenchidas por amido, consumido após a germinação da semente, durante o desenvolvimento da plântula. O estado dos tecidos durante este desenvolvimento indica que o processo de digestão tem origem no embrião esporofítico. Por outro lado, o estado dos núcleos do gametófito demonstra incapacidade para o processo digestivo, enquanto os núcleos do embrião estão aptos para tanto. A luz acelera o consumo das reservas do megagametófito.

Referências bibliográficas

- Aquila, M.E.A. & Ferreira, A.G. 1984. Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. *Cien. & Cult.* 36(9):1583-1590.
- Bewley, Y.D. & Black, M. 1978. *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination*. V.1. Berlin: Springer-Verlag.
- Bidwell, R.G.S. 1974. *Plant Physiology*. New York: Macmillan Pub.
- Bobbio, F.O.; El-Dash A.A.; Toledo, M.C.F. & Bobbio, P.A. 1978. Starch from the seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. *An.Acad.brasil.Cienc.* 50(2):249-53.
- Briggs, D.E. 1973. Hormones and carbohydrate metabolism in germinating cereal grains. In: B.V. Milborrow (ed.). *Biosynthesis and Its Control in Plants*. Acad.Press, New York. pp. 219-77.
- Cardemil, L. & Varner, J.E. 1984. Phosphorylase activity and sucrose translocation of the pinon seed of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. *Plant Physiology* 76 :1047-54.

- Cereda, M.P. & Wosiacki, G. 1985. Characterization of pinhao starch. Part II. Rheological Properties of the Pastes. *Starke*, 37(12):404-7.
- Davis, B.D. 1979. Influence of cotyledons upon α -amylase activity in Pea. *Plant Physiology* 63:1010-15.
- Davis, B.D. 1983. Effects of sugars on α -amylase activity in pea embryonic axis. *Amer. J. Bot.* 70(6):821-826.
- Ferreira, A.G. 1977. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze.: Germinação da semente e desenvolvimento da plântula. São Paulo: Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado.
- Ferreira, A.G. 1981. Aspectos estructurales de las semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.)O.Ktze. *Iheringia*. Ser.bot. 26(3):3-7.
- Ferreira, A.G.; Dietrich, S.M.C. & Handro, W. 1979. Changes in the metabolism of *Araucaria angustifolia* during the early phases of germination and growth. *Rev.brasil.Bot.* 2:76-81.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechniques*. Iowa: Iowa State College Press.
- Kozłowski, T.T. 1971. *Growth and Development of Trees*. Vol.I, New York: Academic Press.
- Kramer, P.J. & Kozłowski, T.T. 1979. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. New York: Academic Press.
- Leopold, A.G. & Kriedmann, P.E. 1975. *Plant Growth and Development*. New Delhi: MacGraw Hill.
- Lozada, R. & Cardemil, L. 1983. Mechanism of sucrose transport by seedling cotyledons of *Araucaria araucana*(Mol.)Koch. *Plant Physiology* 72:Suppl.p.396.
- Mattos, J.R. 1972. O Pinheiro Brasileiro. São Paulo.
- Monteiro, S.M.; Ferreira, A.G. & Flores, F.E.V. 1977. Anatomia da plântula de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. In: Anais do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências. p.393-339.
- Mota, S. & Cramer, E.R. 1953. O valor nutritivo do pinhão. *Eng. e Quim.*, 5(5):1-9.
- Pastore, A.I. 1939. Las reservas nutritivas de los piñones. *Darwiniana*, 3(3):470-9.
- Reitz, R. & Klein, R.M. 1966. Araucariaceas. In: Reitz, R. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajai.
- Risueño, M.C.; Testillano, P.S. & Sanchez-Pina, M.A. 1988. Variations of nucleolar ultrastructure in relation to transcriptional activity during G1, S, G2, periods of microscope interphase. In: Cresti, M.; Gori, P. & Pacini, E. (eds). *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Berlin: Springer-Verlag.
- Roberts, J.A. & Hooley, R. 1988. *Plant Growth Regulators*. New York: Chapman & Hall.
- Rosa, L.M.G. 1986. Translocação de açúcares e aminoácidos do megagametófito ao embrião em *Araucaria angustifolia* durante a germinação e o desenvolvimento inicial. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado.
- Sass, H.E. 1951. *Botanical Microtechniques*. Iowa: Iowa State College Press.
- Street, H.E. & Cockburn, W. 1957. *Plant Metabolism*. Oxford: Pergamon Press.
- Varner, J.E. & Ho, D.T.H. 1976. The role of hormones in the integration of seedling growth. In: Papaconstantinou, J. (ed.) *The Molecular Biology of Hormones Action*. New York: Acad.Press. p.173-194.
- Whistler, R.L. & Corbett, W.M. 1957. Polysaccharides. In: Pigman, W. *The Carbohydrates*. New York: Academic Press.