



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MAGDA LAIARA BEZERRA DE LIMA

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E MOLECULAR DO DESENVOLVIMENTO
DO INTEGUMENTO INTERNO DE SEMENTES DE
Jatropha curcas L.

FORTALEZA
2017

MAGDA LAIARA BEZERRA DE LIMA

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E MOLECULAR DO DESENVOLVIMENTO DO
INTEGUMENTO INTERNO DE SEMENTES DE
Jatropha curcas L.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Francisco A. P. Campos.

FORTALEZA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L699a Lima, Magda Laiara Bezerra de.
Análise ultraestrutural e molecular do desenvolvimento do integumento interno de sementes de *Jatropha curcas* L. / Magda Laiara Bezerra de Lima. – 2017.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.
1. Ricinossomos. 2. Gerontoplasto. 3. Morte celular programada. 4. Peptidases. 5. Microscopia eletrônica de transmissão. I. Título.

CDD 572

MAGDA LAIARA BEZERRA DE LIMA

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E MOLECULAR DO DESENVOLVIMENTO DO
INTEGUMENTO INTERNO DE SEMENTES DE

Jatropha curcas L.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Francisco A. P. Campos.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Francisco A. P. Campos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Fábio César Sousa Nogueira
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Prof. Arlete Aparecida Soares
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Sebastião Medeiros Filho
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho
Universidade Federal do Ceará-UFC

A Deus

Minha base, Minha vida, Fonte de sabedoria e amor,

Meu protetor, Ajuda nos momentos mais difíceis e
sabedoria nas escolhas.

À minha mãe **Antonia Lima**, meu pai **Osman Lima**, aos
meus irmãos **Porfírio** e **Machael Lima** e meus sobrinhos
Mariana Lima e **Enzo Lima**, meus eternos amores.

À minha avó **Sely Batista** e minhas tias **Oci** e **Diva Costa**
(*in memoriam*).

Ao meu grande amor **Willian Gomes**.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, a base de tudo, por me proporcionar todas as conquistas, proteção e amor.

À toda **minha família**, pela confiança, compreensão e carinho empregados na realização do meu sonho. Por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis, sem o apoio de vocês nada disso seria possível. Amo todos vocês.

Ao meu orientador **Prof. Francisco A. P. Campos** pelos ensinamentos, confiança, paciência e oportunidade de concluir uma das etapas da minha vida acadêmica. Muito obrigada!

Aos professores **Arlete Soares, Fábio Nogueira, Sebastião Medeiros e Fabricio Carvalho** pelas contribuições para melhoria deste trabalho. A todos os demais professores que fizeram parte da minha formação, não somente na Universidade Federal do Ceará, mas também na Universidade Federal do Acre. Minha eterna gratidão. Em especial ao **Prof. Ítalo Coutinho** pelo auxílio na finalização desta tese.

Ao curso de **Pós-Graduação em Bioquímica** da Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – **CAPES**, pelo auxílio financeiro.

Agradeço imensamente a pesquisadora da EMBRAPA/Agroindústria Tropical **Celli Muniz** pelos ensinamentos e apoio no decorrer da execução dos experimentos.

Ao Laboratório de Microscopia Ótica e Eletrônica do INPA/Manaus, especialmente ao pesquisador **Wilson Meirelles**, que foi fundamental na construção deste trabalho.

Às minhas grandes amigas e irmãs de coração, conquistadas ao longo desses seis anos: **Viviane Ruppenthal, Tatiana Silva, Aline Madeira, Amanda de Paula, Gracielle Verçoza, Andreza Raquel e Jessica Moraes**. Muito obrigada por terem me proporcionado o privilégio de ter vocês ao meu lado. Pelo grande carinho, amor e dedicação em cada detalhe da construção do meu sonho. Certamente sem vocês nada disso teria se concretizado. Pessoas que mesmo conhecendo meus defeitos e fraquezas, não tiveram dúvidas em ajudar nos momentos que mais precisei, principalmente com os cuidados com minha saúde (risos). Amo todas vocês, cada uma com sua particularidade. Amizades sinceras e verdadeiras que guardarei sempre comigo.

Aos meus amigos que passaram e os que fazem parte atualmente do Bioplant: **Verônica (Vevezinha), Camila (Camilinha), Fabiano, Woshington, Mohib, Roberto, Ícaro, Derick, Claudiane, Isabelle, Daniel, João Soares, João Alves, Domingos, Moab, Thais, Evanildo, Raquel e Jessica**. Agradeço imensamente pelos conhecimentos, paciência e carinho dedicados ao longo de todo esse tempo. Em especial agradeço a **Emanoella Soares** que além de ser uma grande amiga, foi imprescindível durante todo o período em que fiz parte desse grupo de pesquisa.

Aos amigos da Pós graduação em Fitotecnia (mestrado) e Bioquímica (doutorado): **Francelino, Karina, Wanderlucia, Ramom, Lívia, Bruno, Lineker, Maria Lucilânia, Mariana, Ana Luiza** e aos demais que direta ou indiretamente estiveram presentes ao longo de todo o tempo, me apoiando e compartilhando todos os momentos.

Aos amigos que Deus me deu ao longo dessa caminhada: **Nayara, Elquilândia, Sandra, Gemes** que fizeram da distância apenas um detalhe e a todos os demais, todos estão presentes no meu dia-a-dia. Muito obrigada pelas palavras de apoio, pelos abraços que me levantaram e nunca me deixaram fraquejar.

A todos os amigos e colegas de graduação, especialmente: **Aliny, Júlia, Déborah e Liberdade**, pessoas que levarei no meu coração sempre. Agradeço imensamente pelo apoio nos momentos difíceis ao longo da árdua caminhada em busca da tão sonhada realização profissional.

Gostaria de agradecer imensamente à minha primeira professora: **Raimunda Vaz Magalhães**, representando minha força de vontade e por fazer despertar a busca constante pelo conhecimento. Muito obrigada.

Aos meus pais: **Osman e Antonia Lima**, meus irmãos e cunhadas **Machael e Porfírio Lima, Dalmaria Parente e Joseany Silva**, minhas primas **Lady (e família), Rayane, Gleicy, Icília, Izabela** e todos os outros, minhas tias e tios **Oneil, Omar, Antônio, Ociete, Maria Zenaide, Raimunda, Maria** e todos os outros. Pessoas que cuidaram de vários momentos ao longo da minha caminhada até aqui. Sou grata a todos e certamente sem a ajuda de vocês não teria conseguido alcançar meus objetivos.

Ao meu amor e futuro esposo **Willian Gomes**, por me proporcionar diariamente apoio, carinho e respeito em busca da realização deste sonho. Obrigada por compartilhar minhas vitórias e derrotas ao longo desta batalha. Sua paciência e amor foram fundamentais. Agradeço a todo instante ao nosso maravilhoso Deus por sua presença em minha vida e que a construção da nossa família seja iluminada por Ele. Te amo.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Jatropha curcas L. é uma espécie de planta oleaginosa que desperta interesse econômico por ser uma fonte alternativa para a produção de biodiesel muito embora, pouco se sabe sobre a biologia do desenvolvimento desse organismo vegetal. Esses conhecimentos podem servir de base para a domesticação desta espécie e a descoberta de prováveis soluções para toxicidade das sementes devido a presença dos ésteres de forbol nas sementes, por exemplo. As sementes de *J. curcas* são constituídas pelo embrião e endosperma, ambos envolvidos pela testa e o tegma. Estes últimos são provenientes do desenvolvimento dos integumentos externo (ie) e interno (ii). É sabido que o ii pode atuar como tecido de armazenamento transeunte de fontes de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento dos tecidos filiais, endosperma e embrião. Relatos científicos indicam que durante o desenvolvimento do ii as células sofrem morte celular programada (MCP). Buscou-se observar as modificações na ultraestrutura do ii em decorrência do seu desenvolvimento; além de validar as características da MCP por meio da avaliação do padrão de expressão de sete hidrolases (arabinofuranosidase, glucanase, peptidase cisteínica com cauda RDEL, peptidase cisteínica com cauda KDEL, peptidase aspártica, peptidase serínica e subtilisina) e dois inibidores de peptidase (inibidor de peptidase cisteínica e serpina). Além do óvulo, os estágios utilizados neste estudo (sementes aos 5, 10 e 25 DAP) foram selecionados com base nas modificações morfológicas do ii obtidas através da análise histológica. A vacuolização e a expansão celular foram as características mais conspícuas observadas no início do desenvolvimento do ii. Além disso, as primeiras mudanças morfológicas relacionadas a MCP foram observadas aos 5 DAP, incluindo, surgimento dos espaços periplasmáticos, aparecimento dos ricinossomos, e colapso do tonoplasto. A sequência do processo degradativo foi observada nos estágios mais avançados (10 e 25 DAP) com expansão do volume celular, acompanhado de citoplasma menos denso, presença de peroxissomos, núcleo lobado, cromatina condensada, invaginações e ruptura da membrana plasmática e, finalmente a ruptura da parede celular, além do surgimento dos gerontoplastos (25 DAP). Nos estágios iniciais (óvulo, 5 e 10 DAP) o padrão de expressão relativa dos genes que codificam para peptidase cisteínica KDEL, peptidase serínica e subtilisina foi maior aos 10 DAP quando comparados com o óvulo. Na região proximal do ii das sementes com 25 DAP a expressão de todas as peptidases (exceto peptidase aspártica), a arabinofuranosidase e glucanase foi estatisticamente superior quando comparada à região distal desse mesmo estágio. A correlação dos achados ultraestruturais e o padrão de expressão transcricional indica que a ocorrência da MCP no integumento interno pode atuar no fornecimento de fontes de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento do embrião e endosperma.

Palavras-chave: Ricinossomos. Gerontoplasto. Morte celular programada. Peptidases. Microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. is a species of oleaginous plant that arouses economic interest because it is an alternative source for biodiesel production although little is known about the biology of the development of this plant organism. This knowledge can serve as a basis for the domestication of this species and the discovery of probable solutions for seed toxicity due to the presence of the phorbol esters in the seeds, for example. *J. curcas* seeds are made up by the embryo, endosperm as well as the surrounding seed coat. The latter is derived from the development of both outer (oi) and inner (ii) integuments. It is known that the ii may act as a transient storage tissue providing carbon and nitrogen sources for the development of the filial tissues, endosperm and embryo. Scientific reports indicate that during ii development the cells undergo programmed cell death (PCD). The aimed at observing the changes in the ultrastructure of the ii during its development and confirm the PCD characteristics by assessing the gene expression pattern for seven different hydrolases (arabinofuranosidase, glucanase, peptidase cysteine tailed RDEL, peptidase cysteine tailed KDEL, aspartic peptidase, serine peptidase and subtilisin) and two inhibitors (inhibitor peptidase cysteine and serpin). The stages used in this study (ovule and seeds at 5, 10 and 25 DAP) were selected based on the morphological changes in the ii observed in light microscopy. The vacuolization and cell expansion were the most conspicuous characteristics observed in the early development of the ii. Furthermore, the first related morphological changes related to PCD were observed at 5 DAP, including rising the periplasmic spaces and ricinossomos and collapse of tonoplasto. In later stages, at 10 and 25 DAP, it was observed enlargement of the cell volume, followed by less dense cytoplasm, presence of peroxisomes, lobed nucleus, condensed chromatin, invaginations and disruption of the plasma membrane and finally cell wall breakdown as well as the rising of gerontoplasts (25 DAP). In the early stages (ovule, 5 and 10 DAP) the expression pattern of genes encoding cysteine peptidase tailed KDEL, serine peptidase and subtilisin it was higher at 10 DAP if compared to the calibrator (ovule). In the ii proximal region of seeds with 25 DAP the expression of all peptidases (other than aspartic peptidase), the arabinofuranosidase and glucanase was statistically superior when compared to the distal region. The correlation of the ultrastructural findings and the transcriptional expression pattern indicates that the occurrence of CCM in the internal integument can act in the supply of carbon and nitrogen sources for the development of the embryo and endosperm.

Keywords: Ricinosomes. Gerontoplasts. Programmed cell death. Peptidase. Transmission electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Representação esquemática do desenvolvimento do óvulo de <i>Arabidopsis thaliana</i> . | 17 |
| Figura 2 | Anatomia do óvulo de <i>J. curcas</i> . | 45 |
| Figura 3 | Ultraestrutura do integumento interno do óvulo de <i>J. curcas</i> , camada 1. | 47 |
| Figura 4 | Ultraestrutura celular do integumento interno do óvulo de <i>J. curcas</i> , camada 9. | 48 |
| Figura 5 | Ultraestrutura celular do integumento interno do óvulo de <i>J. curcas</i> , camada 17. | 50 |
| Figura 6 | Anatomia de sementes de <i>J. curcas</i> , 5 dias após a polinização (DAP). | 51 |
| Figura 7 | Ultraestrutura celular do integumento interno de sementes de <i>J. curcas</i> com 5 dias após a polinização, camada 1. | 53 |
| Figura 8 | Ultraestrutura celular do integumento interno de sementes de <i>J. curcas</i> com 5 DAP, camada 9. | 54 |
| Figura 9 | Ultraestrutura celular do integumento interno de sementes de <i>J. curcas</i> com 5 DAP. | 56 |
| Figura 10 | Anatomia de sementes de <i>J. curcas</i> , 10 dias após a polinização (DAP). | 58 |
| Figura 11 | Ultraestrutura celular da região distal do integumento interno de sementes de <i>J. curcas</i> com 10 dias após a polinização (DAP). | 59 |
| Figura 12 | Ultraestrutura celular da região proximal do integumento interno de sementes de <i>J. curcas</i> com 10 dias após a polinização (DAP). | 60 |
| Figura 13 | Anatomia de sementes de <i>J. curcas</i> , 25 dias após a polinização (DAP). | 62 |
| Figura 14 | Ultraestrutura da região distal do integumento do interno de sementes de <i>J. curcas</i> com 25 dias após a polinização (DAP). | 64 |
| Figura 15 | Ultraestrutura da região proximal do integumento interno de sementes de <i>J. curcas</i> com 25 dias após a polinização (DAP). | 65 |
| Figura 16 | Ultraestrutura das mitocôndrias do integumento interno de <i>J. curcas</i> | 67 |
| Figura 17 | Ultraestrutura dos plastídios do integumento interno do óvulo e de sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> com 5 dias após a polinização (DAP). | 69 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 18 | Ultraestrutura dos plastídios do integumento interno de sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> com 10 e 25 dias após a polinização (DAP). | 70 |
| Figura 19 | Curva de fusão dos genes alvos utilizados na análise de expressão relativa do integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento (5, 10 e 25 DAP) de <i>J. curcas</i> L. | 72 |
| Figura 20 | Expressão relativa da arabinofuranosidase e glucanase no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> (5, 10 e 25 DAP). | 74 |
| Figura 21 | Expressão relativa da peptidase cisteínica com cauda RDEL e peptidase aspártica no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> (5, 10 e 25 DAP). | 75 |
| Figura 22 | Expressão relativa da peptidase cisteínica com cauda KDEL no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> (5, 10 e 25 DAP) e ultraestrutura dos ricinossomos. | 77 |
| Figura 23 | Expressão relativa da peptidase serínica e subtilisina no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> (5, 10 e 25 DAP). | 78 |
| Figura 24 | Expressão relativa do inibidor de peptidase cisteínica e serpina no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> (5, 10 e 25 DAP). | 79 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Formação do óvulo e sementes | 15 |
| 1.1.1 | <i>Desenvolvimento do revestimento das sementes</i> | 19 |
| 1.2 | Morte celular programada | 22 |
| 1.2.1 | <i>Características ultraestruturais associadas à morte celular programada</i> | 24 |
| 1.3 | Proteínas relacionadas à morte celular programada | 28 |
| 1.4 | <i>Jatropha curcas</i> L. | 31 |
| 2 | OBJETIVOS | 37 |
| 2.1 | Geral | 37 |
| 2.2 | Específicos | 37 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 3.1 | Material vegetal | 38 |
| 3.2 | Análise anatômica por microscopia de luz | 38 |
| 3.3 | Microscopia eletrônica de transmissão | 39 |
| 3.4 | Análise de expressão gênica | 40 |
| 3.4.1 | <i>Preparo do material vegetal</i> | 40 |
| 3.4.2 | <i>Extração do RNA total</i> | 40 |
| 3.4.3 | <i>Digestão do DNA genômico</i> | 41 |
| 3.4.4 | <i>Transcrição reversa (RT)</i> | 42 |
| 3.4.5 | <i>RT-qPCR</i> | 42 |
| 4 | RESULTADOS | 44 |
| 4.1 | Análise histológica e ultraestrutural | 44 |
| 4.1.1 | <i>Características ultraestruturais do integumento interno do óvulo de <i>J. curcas</i></i> | 44 |
| 4.1.2 | <i>Características ultraestruturais do integumento interno de sementes com cinco dias após a polinização (DAP)</i> | 49 |
| 4.1.3 | <i>Características ultraestruturais do integumento interno de sementes com 10 DAP</i> | 57 |
| 4.1.4 | <i>Características ultraestruturais do integumento interno de sementes com 25 DAP</i> | 61 |
| 4.1.5 | <i>Mudanças ultraestruturais das mitocôndrias em células do integumento interno de <i>J. curcas</i></i> | 66 |
| 4.1.6 | <i>Ultraestrutura da transição de plastídios a gerontoplastos no integumento interno de <i>J. curcas</i></i> | 68 |
| 4.2 | Análise de expressão gênica | 71 |
| 4.2.1 | <i>Hidrolases de parede celular</i> | 73 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.2 Peptidases..... | 73 |
| 4.2.3 Inibidores de peptidases..... | 76 |
| 5 DISCUSSÃO | 80 |
| 5.1 Desenvolvimento inicial do integumento interno de sementes de <i>J. curcas</i> | 80 |
| 5.2 Modificações na ultraestrutura do integumento interno de sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> relacionadas a MCP | 82 |
| 5.2.1 Aspectos ultraestruturais das mitocôndrias | 86 |
| 5.2.2 Ultraestrutura dos gerontoplastos do integumento interno de <i>J. curcas</i> | 87 |
| 5.3 Atividade de hidrolases relacionadas a mcp no integumento interno de óvulo e sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> | 89 |
| 5.3.1 Expressão relativa de hidrolases relacionadas a degradação da parede celular | 89 |
| 5.3.2 Expressão relativa de peptidases e inibidores de peptidases..... | 90 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 94 |
| REFERÊNCIAS | 95 |

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das sementes, de modo geral, envolve várias modificações morfofisiológicas e bioquímicas dos tecidos filiais e maternos que ocorrem após a fertilização do óvulo (SREENIVASULU e WOBUS, 2013). Inicialmente, o nucelo e os integumentos ocupam a maior porção das sementes em desenvolvimento, entretanto, grande parte desses tecidos é consumida ao final do processo de maturação (GREENWOOD, HELM e GIETL, 2005). O integumento interno (ii) pode desempenhar a função de armazenar transitoriamente reservas que, quando mobilizadas, servirão de nutrição para o desenvolvimento do embrião e do endosperma (SOARES *et al.*, 2014). O desenvolvimento do ii é mediado por uma rápida fase de divisão e expansão seguido da degeneração celular, provavelmente, por morte celular programada (MCP) (LOMBARDI *et al.*, 2007).

As sementes de *Jatropha curcas* L. possuem elevados teores de lipídios, proteínas e aminoácidos essenciais, conferindo a esta espécie grande interesse para a produção de biodiesel bem como a utilização dos resíduos, provenientes da extração do óleo, na alimentação animal (SAETA E SUNTORNSUK, 2011). Mesmo com propriedades nutricionais desejáveis, a utilização da torta é limitada pela presença dos ésteres de forbol, uma classe de diterpenos tóxicos (MAKKAR, 2016).

O primeiro passo para a exploração e utilização de uma planta na indústria é a busca pelo conhecimento bioquímico, agrônomico e também ao que tange a biologia do desenvolvimento da espécie, conhecimentos úteis no seu processo de domesticação. Entretanto, para *J. curcas*, pouco se sabe sobre tais aspectos. Dessa forma, o preenchimento dessas lacunas pode permitir, neste caso, a aplicação de estratégias biotecnológicas para obtenção de genótipos com baixo ou nulo teor desses diterpenóides,

uma vez que, as vias biossintéticas que levam a formação desses compostos já estão esclarecidas.

Em *J. curcas*, um total de 3270 proteínas foram identificadas no endosperma, integumento interno e plastídios isolados destes tecidos de sementes em desenvolvimento (PINHEIRO *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2015, 2016; SOARES *et al.*, 2014). Estas são agrupadas em diversas classes funcionais incluindo aquelas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos e aminoácidos, além de, uma ampla variedade de proteínas de reserva e hidrolases. A expressão de genes no integumento interno e endosperma que podem estar relacionados à MCP e na maturação de proteínas de armazenamento também foi investigada (ROCHA *et al.*, 2013). Os conhecimentos fornecidos por esses estudos possibilitam não apenas uma melhor compreensão do desenvolvimento de ambos os tecidos, mas também poderão ser utilizados como pré-requisito para o entendimento da biologia do desenvolvimento dessas sementes.

Neste estudo, foi realizada uma análise detalhada das modificações ocorridas nas células que constituem o integumento interno de sementes de *J. curcas* em desenvolvimento, características estas, que podem ser visualizadas por meio de estudos ultraestruturais dos componentes celulares dessa estrutura e análise de expressão gênica. Estas investigações podem indicar quais processos relacionados à ontogenia deste tecido estão ocorrendo em determinado momento.

1.1 FORMAÇÃO DO ÓVULO E SEMENTES

O óvulo forma-se no interior do ovário, a partir da placenta, e no início do seu desenvolvimento possui três regiões distintas: nucelo, onde ocorre a diferenciação das células germinativas; a região funicular, que conecta o óvulo à placenta e a região da calaza que dá origem aos integumentos (SHI e YANG, 2011). O gametófito feminino se

desenvolve a partir de uma única célula localizada abaixo da epiderme do nucelo denominada de célula arquesporial; esta é facilmente reconhecida pelo grande volume celular, principalmente quando comparada as células adjacentes (ZOU *et al.*, 2016). Essa célula se diferencia em célula mãe do megásporo ($2n$) que, por sua vez, sofre duas divisões meióticas para formar quatro megásporos haploides e em seguida, somente um dos megásporos (funcional) sofre três divisões mitóticas sucessivas até a formação de sete células haploides e oito núcleos que irão compor o saco embrionário (Fig. 1). Este último conta com quatro tipos de células: duas sinérgides, uma oosfera, uma célula central com dois núcleos polares e três antípodas; células envolvidas pelo nucelo e os integumentos (YANG *et al.*, 2016).

Em *Feijoa sellowiana* B., a epiderme do nucelo sofre rápida mitose formando o integumento interno (ii) primordial (ZOU *et al.*, 2016). O integumento interno se desenvolve antes do externo, entretanto, pode ocorrer simultaneamente (SIEBER *et al.*, 2004). Ambos integumentos externo e interno se desenvolvem em volta do nucelo, restando apenas uma abertura pela qual ocorre a entrada do tubo polínico a qual é denominada micrópila (ZOU *et al.*, 2016) e após a fertilização estes tecidos vão se desenvolver e formar a testa e o tegma, respectivamente. Durante a formação das sementes, o seu revestimento tem um papel importante na condução de nutrientes durante a embriogênese e o desenvolvimento do endosperma. Além disso, a testa e o tegma atuam na proteção do embrião contra danos mecânicos e ambientais e na regulação da entrada e saída de água durante a germinação (DEBEAUJON, LÉON-KLOOSTERZIEL e KOORNNEEF, 2000; WOBUS e WEBER, 1999).

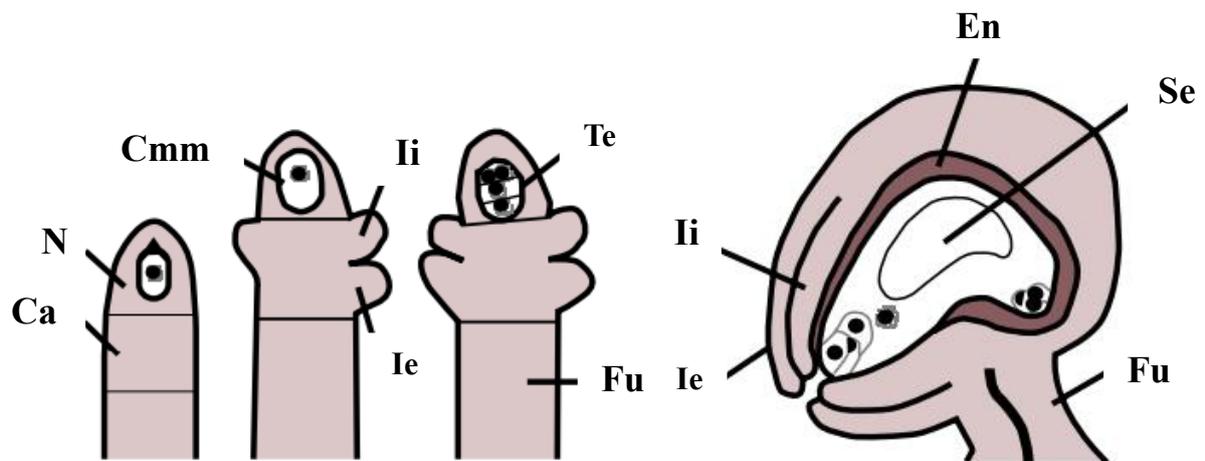


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento do óvulo de *Arabidopsis thaliana*. Legenda: N, nucelo; Ca, calaza; Fu, funículo; Cmm, Célula mãe do megásporo; Ii, integumento interno; Ie, integumento externo; Te, tetrade; En, endotélio; Se, saco embrionário.

Adaptado de: Sieber *et al.*, (2004)

Nas angiospermas, o processo de fertilização se inicia com o crescimento e orientação do tubo polínico pela micrópila, seguido da recepção e liberação das células gaméticas masculinas (i.e. células generativas) no gametófito feminino e finalmente a ocorrência da fertilização dupla, onde uma célula generativa fecunda a oosfera e a outra se funde com a célula central binucleada, formando o zigoto e o endosperma, respectivamente (CHEUNG *et al.*, 2010). Dumas e Rogowsky (2008) esclarecem que o desenvolvimento do zigoto leva a formação do embrião (i.e. esporófito jovem), indivíduo multicelular que irá determinar o desenvolvimento da planta adulta, enquanto que, na maioria das espécies, o endosperma é um tecido que irá nutrir o desenvolvimento do embrião após a germinação. Além disso, após a fertilização, o nucelo logo degenera através da morte celular programada (MCP), funcionando como células de transferência, fornecendo assimilados para o desenvolvimento do endosperma (RADCHUK *et al.*, 2011; GREENWOOD, HELM e GIETL, 2005).

A embriogênese vegetal leva a formação do embrião a partir do desenvolvimento do zigoto por meio de uma série de divisões celulares mitóticas. Nas dicotiledôneas, o desenvolvimento do embrião ocorre em fases distintas incluindo, o estágio globular, coração e torpedo (SMET *et al.*, 2010). Adicionalmente, em ambas mono e dicotiledôneas o desenvolvimento embrionário é marcado, principalmente, pela aquisição de uma polaridade apical-basal, a diferenciação da epiderme e a formação dos meristemas apical e radicular (DUMAS e ROGOWSKY, 2008; LAU *et al.*, 2010). Após a fertilização da célula central, inicia-se o desenvolvimento do endosperma que pode ser definido como celular, helobial ou nuclear. Neste último, o núcleo inicial do endosperma triploide se divide repetida e sucessivamente sem a formação da parede celular, sendo os processos de celularização e formação da parede celular posteriores (BEGCY e WALIA, 2015).

1.1.1 Desenvolvimento do revestimento das sementes

O embrião das sementes maduras é separado do ambiente externo pelo revestimento da semente. É uma estrutura maternal que se desenvolve a partir dos integumentos (interno e externo) que circundam o óvulo antes da fertilização. Além disso, seu desenvolvimento ocorre de maneira coordenada com o embrião e o endosperma (MOÏSE *et al.*, 2005). Além de funcionar como proteção, os integumentos podem atuar na liberação de nutrientes necessários ao desenvolvimento do embrião e também nos mecanismos relacionados à dormência e germinação das sementes maduras (MILLAR *et al.*, 2015).

Embora os integumentos não participem do processo de fertilização do óvulo, eles sofrem mudanças drásticas em resposta a esse processo (XU *et al.*, 2016). Durante o desenvolvimento do tegma, as células sofrem uma rápida fase de divisão e expansão celular seguida de uma fase redutora em relação ao número de células e conseqüentemente camadas celulares (WAN *et al.*, 2002). No entanto, dependendo da espécie, algumas dessas células permanecem parenquimáticas e na maturidade das sementes são comprimidas; outras sofrem espessamento da parede formando uma paliçada (MOÏSE *et al.*, 2005), características comuns observadas no integumento externo. Nas sementes maduras, o integumento interno pode desaparecer total ou parcialmente através da MCP, como em sementes de *Brassica napus* L. (WAN *et al.*, 2002). Além disso, algumas camadas celulares, principalmente do integumento externo, acumulam certas substâncias tais como, mucilagem e pigmentos que podem contribuir para a coloração e morfologia das sementes (HAUGHN e CHAUDHURY, 2005; MOÏSE *et al.*, 2005). O número de camadas celulares que constituem o revestimento das sementes varia enormemente entre as espécies. Em sementes de *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, o revestimento das sementes é composto de cinco camadas de células, sendo duas delas

referentes ao integumento externo e três ao interno (RADCHUK e BORISJUK, 2014). Já nas leguminosas este tecido apresenta tipicamente várias camadas celulares (VERDIER *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do embrião e do endosperma é facilitado pela interação coordenada entre ambos, bem como a troca de sinais e nutrientes entre os tecidos maternos (BAUD *et al.*, 2002; RADCHUK e BORISJUK, 2014). De acordo com Weber *et al.* (1995), a liberação e transporte desses nutrientes estão associados à atividade de invertases, sacaroses sintases e transportadores de sacarose.

Desenvolvimento do revestimento das sementes de J. curcas

Ao longo do desenvolvimento das sementes de *J. curcas* ocorrem diversas transformações na morfologia, dentre as quais podemos citar: aumento no tamanho e modificação na coloração externa devido a formação da testa e do tegma, estruturas derivadas da diferenciação dos integumentos interno e externo, respectivamente. No óvulo, o integumento externo possui em torno de 6-8 camadas de células, sendo comumente observada a presença de células laticíferas; o integumento interno possui mais de 15 camadas de células ricas em citoplasma, que afunilam em direção ao ápice (SINGH, 1970). Essas camadas são divididas em três regiões: endo, meso e exotesta no integumento externo e endo, meso e exotegma no interno (SOARES *et al.*, 2014).

Após o processo de fertilização, ambos os integumentos sofrem mudanças anatômicas marcantes. A primeira delas refere-se ao aumento do integumento externo. De acordo com Singh (1970) ambas as epidermes deste tecido são formadas por uma única camada de células que se dividem anti e periclinalmente; e, somente na epiderme externa essas divisões culminam na formação de uma paliçada. Todas as camadas do ie

ermanecem até a maturação das sementes diferentemente do ii, no qual camadas de células são consumidas, inclusive a epiderme interna do tecido.

Inicialmente, as células do ii também sofrem divisões anti e periclinais aumentando o número de camadas celulares; além disso, o sistema vascular está presente nessa estrutura. No entanto, com a progressão da embriogênese, a camada de células adjacentes à cavidade central começa a vacuolizar até entrar em colapso formando uma camada de restos celulares (ROCHA *et al.*, 2013). Essas modificações foram descritas no ii por Shah *et al.* (2016) em quatro estágios (óvulo, 5, 10 e 25 dias após a polinização - DAP) por meio de análises histológicas e ultraestruturais dos plastídios (resultados provenientes desta tese). As células do mesotegma do óvulo e de sementes com 5 DAP estão em processo ativo de divisão e com conseqüente aumento de tamanho desta estrutura devido ao aumento do número de camadas de células; aos 10 e 25 DAP o endotegma não está mais presente e as células do mesotegma são altamente vacuoladas e algumas destas apresentam ruptura da membrana plasmática e parede celular.

Todas as características anatômicas relacionadas à fase reducional do ii descritas nessas investigações são condizentes com a ocorrência de morte celular programada (MCP). Desse modo, Soares *et al.* (2014) indicam ainda que, o integumento interno de *J. curcas* atua como um tecido de armazenamento transitório, onde fotoassimilados provenientes das folhas são translocados e armazenados para futura mobilização. Esses mesmos autores descrevem que a redução do tamanho do ii ocorre concomitantemente a formação do endosperma, sugerindo um possível papel no armazenamento dos fotoassimilados para o desenvolvimento desse tecido, uma vez que na análise proteômica foram identificadas várias classes de proteínas de reserva incluindo globulinas, glutelinas, leguminas dentre outras.

Dentre as características observadas durante o desenvolvimento do integumento interno podemos citar o consumo de algumas camadas de células, presumidamente, por MCP. Sendo assim, é necessário conhecer como e por quais razões ocorre esse tipo de morte, bem como a descrição das características ultraestruturais das células e suas organelas a fim de determinar a sequência de eventos no processo degenerativo desta estrutura.

1.2 MORTE CELULAR PROGRAMADA

O processo de morte celular programada é caracterizado pela eliminação controlada de células causada por estresses bióticos e abióticos, ou mesmo, como parte do processo de desenvolvimento e diferenciação de células ou tecidos específicos (HUYSMANS *et al.*, 2017). Esse recurso é bem estabelecido no desenvolvimento das plantas em processos tais como: desenvolvimento do tecido vascular, florescimento, frutificação e desenvolvimento das sementes (SUN *et al.*, 2015).

A MCP vem sendo extensivamente estudada como um processo que ocorre no interior das células seja ele desencadeado por sinais de desenvolvimento, infecções patogênicas (COLL *et al.*, 2014) ou por outros tipos de estresse como, por exemplo, a exposição das plantas a metais pesados (ARASIMOWICZ-JELONEK *et al.*, 2012). van Doorn *et al.* (2011), categorizaram a morte celular nos vegetais em duas classes baseadas na morfologia, definidas como: morte celular vacuolar e necrose. Esses autores descrevem que, durante a morte celular vacuolar o conteúdo celular é degradado pela combinação de processos autofágicos e liberação de hidrolases após a ruptura dos vacúolos, contudo, a necrose é caracterizada pela ruptura inicial da membrana plasmática e condensação do protoplasto.

É sabido que os processos de formação e germinação das sementes requerem a ocorrência da MCP. Domínguez e Cejudo (2014) esclarecem que nos estágios iniciais de desenvolvimento das sementes de cereais ocorre a progressiva degeneração dos tecidos maternos, como nucelo e integumentos que permitem a remobilização dos nutrientes para nutrir os tecidos filiais; nas sementes germinadas, ocorre a produção de enzimas hidrolíticas para a mobilização de componentes do endosperma para suportar o crescimento inicial das plântulas.

As flores, por sua vez, sofrem transformações de órgãos dreno para fontes quando são submetidas ao processo de morte celular programada. De acordo com Zhou *et al.* (2005), a senescência das flores é responsável pelo reaproveitamento de nutrientes e reserva de energia nos vegetais, de modo que as proteínas e os lipídios são degradados e exportados. O desenvolvimento da MCP é também investigado no remodelamento de lâminas foliares de algumas espécies de monocotiledôneas, onde são formadas perfurações ao longo da folha madura que podem servir como mecanismo de defesa e aumento da área foliar; nesses locais é possível observar degradação do DNA celular, condensação da cromatina e do citoplasma e rompimento do tonoplasto (GUNAWARDENA, 2008).

Segundo Pinto, Locato e Gara (2012), o envolvimento de distintos tipos de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), diferentes locais de produção, além da sua interação com outras moléculas, é crucial para ativação da morte celular programada em resposta a estímulos específicos. Nesse sentido Zapata *et al.* (2005) elucidam que a elevação da quantidade de ROS é frequentemente associada com MCP, e os cloroplastos são uma das principais fontes dessas moléculas em tecidos foliares. De modo geral, o desenvolvimento da degeneração celular reflete na alteração

do metabolismo das células que pode ser acompanhada por meio da visualização e interpretação das transformações ultraestruturais dos componentes citoplasmáticos.

1.2.1 Características ultraestruturais associadas à morte celular programada

A literatura científica relata investigações relacionadas as modificações ultraestruturais das células vegetais que estão sofrendo MCP, através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Dentre estas, estão a senescência de flores (BATTELLI *et al.*, 2011), a formação de aerênquimas (GUNAWARDENA *et al.*, 2001; NI *et al.*, 2014), a embriogênese (BOZHKOVA *et al.*, 2005), senescência foliar (SELGA, SELGA e PAVILA, 2005), a formação de cavidades secretoras (ZHOU *et al.*, 2014) e o desenvolvimento de sementes (BRIGHIGNA *et al.*, 2006). De maneira geral, as mudanças na ultraestrutura das células que estão sofrendo MCP incluem a condensação e transferência da cromatina para a periferia do núcleo, fusão dos vacúolos e rompimento do tonoplasto, degradação das organelas citoplasmáticas e, finalmente a degradação de parede celular (KROEMER *et al.*, 2009).

Vacúolos

As células vegetais apresentam um elaborado sistema vacuolar que pode ocupar a maior parte do volume celular. Estas organelas apresentam diversas funções tais como, manutenção da turgescência, armazenamentos de produtos derivados do metabolismo e digestão dos constituintes citoplasmáticos (MARTY, 1999). A classificação funcional e morfológica desta organela inclui os compartimentos armazenadores de proteínas encontrados em tecidos de reserva de sementes e frutos, além destes, têm-se os vacúolos líticos que são compartimentos com pH ácido e abrigam uma gama de hidrolases no seu lúmen tais como peptidases e nucleases (MARTY, 1999; ROGERS, 1998).

Durante a progressão da MCP, as células vegetais apresentam características marcantes na ultraestrutura dos vacúolos. No processo de senescência de flores de *Lilium longiflorum* T., o aumento da permeabilidade seguida da ruptura do tonoplasto foi um dos primeiros sinais que determinaram a ocorrência da degeneração das células (BATTELLI *et al.*, 2011).

Essas organelas podem atuar em processos autofágicos, engolfando e degradando fragmentos citoplasmáticos. A macroautofagia baseia-se no sequestro de porções citoplasmáticas ou até mesmo organelas que em seguida são degradadas no interior de estruturas similares aos autofagossomos, presumidamente, pela atividade de enzimas hidrolíticas (van DOORN e PAPINI, 2013). A microautofagia, por sua vez, é a captação de constituintes celulares pela invaginação do tonoplasto, resultando em vesículas que se movem para o interior dos vacúolos onde são degradadas (BASSHAM *et al.*, 2006). Em células de mesofilo de tépalas de *Dendrobium* cv. Lucky Duan, foi possível observar um grande aumento no volume vacuolar devido principalmente a fusão dessas organelas, além disso, a ultraestrutura mostrou vesículas de vários tipos no lúmen, contudo, essa característica não foi suficiente para concluir que, a presença dessas inclusões é devido aos processos de macro e microautofagia (van DOORN, KIRASAK e KETSA, 2015).

Núcleo

O núcleo detém grande parte da informação genética de uma célula. Essa organela é separada do restante do citoplasma por um sistema de dupla membrana no qual estão inseridos poros nucleares que permitem o tráfico de íons e moléculas entre o nucleoplasma e o citosol (BRIÈRE *et al.*, 2006). Mesmo com ausência de membrana circundante, o nucléolo é uma região distinta dentro do núcleo que tem como função

principal a biogênese dos ribossomos, transcrição do DNA e formação do RNA ribossomal (BÁRTOVÁ *et al.*, 2010). Desse modo, normalmente, as células apresentam núcleo volumoso com nucléolo evidente.

Adicionalmente, o núcleo é o principal alvo da MCP, principalmente, no início do processo de degradação celular. Essa organela sofre dramáticas modificações na sua estrutura, sendo uma das mais evidentes a condensação e deposição da cromatina próximo a membrana interna, seguida da deformação do envelope nuclear que determina a forma lobada desta organela (DOMÍNGUEZ e CEJUDO, 2012). É válido salientar que a condensação da cromatina é causada pela degradação endonucleolítica do DNA nuclear (SIMEONOVA *et al.*, 2000).

Mitocôndrias

Nas plantas, as mitocôndrias desempenham uma ampla gama de funções na célula que variam desde o fornecimento de energia e intermediários de vias metabólicas, através da biossíntese de coenzima bem como, a sinalização de degradação celular. Além disso, por conter seu próprio DNA, essas organelas são autônomas no processo de replicação, transcrição e tradução (RAO *et al.*, 2016).

Zhan *et al.* (2014) indicam que as mitocôndrias são um dos principais sítios de produção de ROS e, portanto, desenvolvem um papel crucial na degeneração celular mediada por esses compostos químicos. Além disso, a MCP também leva a diminuição do potencial transmembranar dessas organelas provocando a liberação do citocromo c no citosol (SCOTT e LOGAN, 2007). Essas afirmativas podem estar relacionadas com o que é observado na ultraestrutura de células que estão sofrendo MCP, tendo em vista o que foi visualizado em alguns estudos. Zhou *et al.* (2014) investigaram as mudanças

ultraestruturais ocorridas na formação de cavidade secretoras em folhas de *Dictamnus dasycarpus* e notaram que as mitocôndrias começam a apresentar formas irregulares, com distintos tamanhos e elétrons densidades, além disso essas características foram observadas já no início do desenvolvimento da MCP. Na degeneração do nucelo de sementes de *Tillandsia* L., essa organela persistiu até os estágios finais de MCP, muito embora a integridade das cristas mitocondriais não foi observada (BRIGHIGNA *et al.*, 2006). Adicionalmente, durante a MCP em células do mesófilo foliar de *Pisum sativum* L., *Cucumis sativus* L., *Secale cereale* L., a matriz mitocondrial se torna elétrons translúcida, além do aumento no diâmetro de suas cristas (SELGA, SELGA e PAVILA, 2005).

Plastídios

Os plastídios são organelas envoltas por dupla membrana, que contêm DNA, capazes de reproduzir-se por fissão e também são locais de síntese e armazenamento de produtos químicos importantes (van DOORN e YOSHIMOTO, 2010), além de estarem presentes em todas as células vegetais à exceção do grão de pólen. Existem várias formas distintas de plastídios, tais como cloroplastos que são aqueles presentes em tecidos fotossintetizantes, os cromoplastos que estão presentes em frutos de diversas cores e nas pétalas das flores, os amiloplastos presentes em tecidos de armazenamento e não exibem coloração alguma e os proplastídios que são constituintes de células meristemáticas (HSU *et al.*, 2010).

Todos os tipos de plastídios provêm da diferenciação dos proplastídios. Estes são desprovidos de cor, suas membranas internas são pobremente desenvolvidas, possuem um número reduzido de sacos achatados chamados de lamelas e podem ser encontrados em células meristemáticas de órgãos e tecidos (LI e YUAN, 2013).

Os gerontoplastos são os cloroplastos que são submetidos a alterações degenerativas, em tecidos que estão sofrendo senescência e adicionalmente vão perdendo potencial biossintético (THOMAS *et al.*, 2003). De modo geral, a conversão dos cloroplastos em gerontoplastos ocorre em tecidos que estão sofrendo MCP e esse processo é comumente estudado na senescência foliar. No entanto, Shah *et al.* (2016) observaram as mudanças associadas à diferenciação de plastídios em gerontoplastos no ii de sementes em desenvolvimento de *J. curcas*, um tecido não fotossintético.

O aparecimento de folhas cloróticas pode indicar o “status” do desenvolvimento dos gerontoplastos, além disso, essas organelas sofrem gradativas transformações estruturais tais como modificações das membranas dos tilacóides (BISWAL, MOHAPATRA e BISWAL, 2012). Além disso, a formação desse tipo de plastídio está correlacionado com o aumento na atividade proteolítica no interior dessa organela, onde as principais proteínas a serem degradadas são aquelas encontradas no estroma e também nas membranas dos tilacóides (LIN e WU, 2004). Ainda nesse sentido, Biswal, Mohapatra e Biswal (2012) esclarecem que as peptidases plastidiais são dependentes de ATP, portanto, necessitam de energia para desempenhar suas atividades.

As modificações morfológicas das organelas citoplasmáticas estão relacionadas com a atividade de proteínas que possuem a função de romper ligações peptídicas, denominadas de peptidases. Portanto, a análise da expressão gênica tem a capacidade de esclarecer temporal e espacialmente a atividades dessas proteínas.

1.3 PROTEÍNAS RELACIONADAS À MORTE CELULAR PROGRAMADA

O estudo das enzimas proteolíticas é complementar a análise das características morfológicas em investigações relacionadas a progressão da MCP. As plantas, por sua vez, possuem uma ampla variedade de enzimas com atividade proteolítica

que podem ser classificadas em cinco classes distintas: as peptidases cisteínicas, aspárticas, serínicas, treoninas e metalopeptidases (ZAMYATNIN, 2015). As enzimas de processamento vacuolar (VPEs) foram as primeiras peptidases identificadas envolvidas na MCP. Estas pertencem a família das legumainas e contém um peptídeo sinal na porção N-terminal que funciona como guia para o transporte partindo do retículo endoplasmático, local da síntese, para o interior do vacúolo onde atuará na proteólise (HATSUGAI *et al.*, 2015). Essas enzimas clivam ligações peptídicas no lado C-terminal dos resíduos asparagina e aspartato (HARA-NISHIMURA *et al.*, 2005).

A endopeptidase cisteínica, um tipo de papaína, apresenta uma sequência de aminoácidos H/KDEL localizada na extremidade C-terminal que tem a função de retenção no retículo endoplasmático (HÖWING *et al.*, 2014). A ação dessa enzima em diversos mecanismos vem sendo amplamente estudada incluindo, senescência (BATTELLI *et al.*, 2014), defesa vegetal (HÖWING *et al.*, 2014), MCP do endosperma, nucelo e integumento (ROCHA *et al.*, 2013; TROBACHER *et al.*, 2013; GREENWOOD, HELM e GIETL, 2005). As caspases são uma família conservada de peptidases cisteínicas que clivam sítios alvos com aspartato, que estão envolvidas na apoptose em células animais (HO e HAWKINS, 2005). No entanto, nos vegetais as metacaspases (LAM e ZHANG, 2012) são peptidases cisteínicas envolvidas na autodestruição celular e compartilham uma similaridade estrutural com as caspases, muito embora, essas enzimas clivem especificamente resíduos adjacentes a Arginina ou Lisina (WATANABE e LAM, 2005).

As subtilisinas pertencentes a classe das peptidases serínicas também atuam na degradação celular nos vegetais. Uma das suas principais características é a clivagem das ligações peptídicas em um sítio catalítico tríade envolvendo resíduos de aspartato, histidina e serina (DODSON e WLODAWER, 1998). Além disso, as peptidases serínicas

estão aparentemente envolvidas na proteólise da Rubisco no processo de MCP em *Avena sativa* (COFFEEN e WOLPERT, 2004). As fitaspases, peptidases vegetais dependentes de serina, também estão envolvidas na morte celular programada e possuem exclusiva especificidade para clivar resíduos flanqueados por aspartato, analogamente as caspases (CHICHKOVA *et al.*, 2012). Em *A. thaliana* é possível encontrar aproximadamente 50 genes que codificam peptidases aspárticas, que podem ser divididas em três grupos: peptidase aspártica típica, peptidases tipo nucelinas e peptidases atípicas (FARO e GAL, 2005). A expressão de genes que codificam para duas peptidases aspárticas foi observada em células de *tapetum* de *O. sativa* que passam pelo processo de MCP (NIU *et al.*, 2013).

As metalopeptidases, são peptidases que apresentam um peptídeo sinal prodomínio, e o sítio catalítico contendo um motivo ligado ao zinco (ZAMYATNIN, 2015). O desligamento do prodomínio do sítio catalítico dessas enzimas por meio da clivagem proteolítica é o responsável pela ativação das metalopeptidases (HADLER-OLSEN *et al.*, 2011). Nos animais, essas enzimas estão relacionadas ao remodelamento da matrix extracelular, no entanto, pouco se sabe sobre a atuação das metalopeptidase nos vegetais. No genoma vegetal é possível observar a presença de alguns homólogos; em *C. sativus*, por exemplo, foi detectada a expressão do gene que codifica para uma metalopeptidase em órgãos senescentes (DELORME *et al.*, 2000).

Baseado no padrão de expressão de algumas peptidases e em características morfológicas marcantes é possível ampliar os conhecimentos acerca da progressão da MCP, processo amplamente investigado em diversos momentos do desenvolvimento de uma espécie em particular.

1.4 *Jatropha curcas* L.

O aumento na demanda do mercado por energia traz muito interesse para o estudo de fontes renováveis para produção energética em todo o mundo. Desse modo, investiga-se a utilização de algumas espécies vegetais para a produção de biocombustíveis, dentre elas a *J. curcas*. Essa espécie, em particular, vem ganhando ~~muito~~ interesse econômico por conta da boa qualidade do óleo extraído de suas sementes, uma vez que ele pode ser utilizado para produção de biocombustível (CASTRO GONZÁLES, 2016). Dentre as características que elegem o óleo das sementes de *J. curcas* como fonte potencial para a produção de biodiesel temos: baixa acidez, boa estabilidade em relação ao óleo de soja, baixa viscosidade quando comparada ao óleo de mamona, melhores propriedades quando exposto ao frio em relação ao óleo de palma (KOH e TINIA, 2011). Não apenas o óleo de *Jatropha*, mas também os subprodutos provenientes do processo de extração, não podem ser utilizados na alimentação animal devido, a presença de um componente tóxico conhecido como éster de forbol (LEUNG, WU e LEUNG, 2010).

Os ésteres de forbol são metabólitos secundários pertencentes a classe dos diterpenóides. Nos vegetais, a síntese desses compostos ocorre a partir de um precursor básico denominado de isopentenil difosfato (IPP) que é sintetizado por duas vias principais: via do mevalonato (MVA) e a via do metileritritol-fosfato (MEP) que ocorrem no citoplasma e nos plastídios, respectivamente. Em seguida, ocorre a condensação das unidades de IPP para formar difosfatos intermediários, incluindo geranil difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) e o geranilgeranil difosfato (GGPP). Finalmente, esses compostos irão funcionar como substrato para as terpeno ciclases/sintases para a formação de uma variedade de diterpenóides (SINGH e SHARMA, 2015; VRANOVÁ, COMAN e GRUISSEM, 2012), dentre os quais podemos citar os ésteres de forbol.

Estruturalmente, os ésteres de forbol são formados por um esqueleto de carbono tetracíclico conhecido como tigliane que contém uma hidroxila localizada nas posições C13 e C16; e são combinados com um ácido dicarboxílico para formar uma ampla variedade desses compostos (KONGMANY *et al.*, 2016). Pouco se conhece sobre a síntese dos ésteres de forbol. Contudo presume-se que a biossíntese desses compostos ocorre a partir da conversão do GGPP para um diterpeno monocíclico, o casbano, por meio da atividade catalítica de uma terpeno sintase conhecida como, sintase do casbano (NAKANO *et al.*, 2012). Seis tipos diferentes de ésteres de forbol foram caracterizados em *J. curcas* e sugere-se que todos eles são derivados da mesma estrutura do forbol (DEVAPPA, MAKKAR e BECKER, 2010).

Nas sementes maduras de *J. curcas*, altas concentrações de ésteres de forbol são encontradas no tegma, seguido do endosperma, enquanto que, no embrião essa quantidade é bem menor e ausente na testa (HE *et al.*, 2011). Além disso, esses autores analisaram o endosperma isoladamente e observaram que, maiores concentrações dos ésteres de forbol estão presentes na região adjacente ao tegma comparado a porção do endosperma voltado para o embrião.

Diante do exposto, percebeu-se a necessidade de um estudo mais acurado da proteômica dos tecidos das sementes dessa espécie buscando identificar as enzimas envolvidas na síntese dos ésteres de forbol. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa realizou análises proteômicas do endosperma, integumento interno e dos plastídios de ambos os tecidos de sementes em desenvolvimento e maduras de *J. curcas*. (PINHEIRO *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2015, 2016; SOARES *et al.*, 2014). Essas investigações podem contribuir para o conhecimento e entendimento das vias biossintéticas, inclusive relacionadas a síntese dos diterpenóides. Por conseguinte, de todas as proteínas identificadas nessas investigações nenhuma delas foi identificada como uma

sintase/ciclase de terpeno e os autores sugerem que os ésteres de forbol podem ser sintetizados em outros órgãos da planta e transportados para as sementes.

Adicionalmente, esses estudos forneceram um amplo conhecimento sobre outras vias metabólicas importantes que ocorrem na ontogenia dessas sementes. Dessa forma, Pinheiro *et al.* (2013) identificaram 923 proteínas de plastídios isolados do endosperma de sementes em desenvolvimento de *J. curcas*. Interessantemente, apenas cinco delas são codificadas pelo genoma dos plastídios. De acordo com a classificação funcional essas proteínas estão envolvidas no metabolismo dos carboidratos e lipídeos, metabolismo energético e, principalmente, no metabolismo de aminoácidos. Além destas, 14% das proteínas identificadas foram classificadas como transportadores; o que é justificado pela necessidade de uma intensa troca de metabólitos entre os plastídios e o restante da célula. No tocante ao metabolismo dos aminoácidos foram identificadas, por exemplo, proteínas relacionadas a via do ácido chiquímico para a síntese de triptofano, tirosina e fenilalanina. Além disso, a maioria das enzimas envolvidas na via glicolítica e a via das pentoses fosfato também foram identificadas indicando a disponibilidade de compostos de carbono e poder redutor para utilização na síntese de ácidos graxos. Finalmente, enzimas envolvidas na biossíntese dos ácidos graxos também foram observadas.

Soares *et al.* (2014) realizaram uma análise proteômica da região distal e proximal do integumento interno de sementes aos 25 DAP. Esses autores identificaram 1526, 1192 e 1062 proteínas na região proximal, distal e em todo o integumento interno, respectivamente. Dentre as proteínas identificadas neste trabalho estão diversas enzimas hidrolíticas que podem desenvolver um papel fundamental na MCP que está ocorrendo neste estágio; além destas, identificou-se também proteínas relacionadas a arquitetura e modificação da parede celular. Adicionalmente, este trabalho também contou com a

análise da expressão relativa de algumas hidrolases nas porções proximal e distal do tecido em estudo. De modo geral, a expressão desses genes foi significativamente maior na região proximal do integumento interno das sementes de *J. curcas*.

Em 2015, Shah e colaboradores identificaram mais de 1700 proteínas no endosperma de sementes em desenvolvimento e maduras. Esse estudo indica que ocorre um decréscimo no padrão de expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e lipídeos a medida que esse tecido se desenvolve. Por outro lado, proteínas de armazenamento de sementes (globulinas, albuminas, leguminas e vicilinas) e oleosinas apresentaram um aumento no padrão de expressão. Aproximadamente 7% das proteínas identificadas são peptidases e inibidores de peptidases que podem estar envolvidas em diversos processos incluindo, defesa contra vários tipos de estresses, maturação das proteínas de reserva bem como na execução da MCP. Além destas, muitas outras proteínas relacionadas a degradação para fornecimento de energia e fontes de C e N utilizados em atividades metabólicas também foram identificadas. Nossos estudos possibilitaram, ainda, a identificação de 1923 proteínas de gerontoplastos do integumento interno de sementes com 25 DAP que estão envolvidas em diversas funções metabólicas, incluindo síntese de aminoácidos e ácidos graxos; além destas, foram identificadas hidrolases (peptidases, lipases e carboidrases) que podem estar envolvidas no processo de degeneração dos gerontoplastos (SHAH *et al.*, 2016).

Em um estudo prévio obteve-se a análise da expressão relativa de três VPEs (*Jc-βVPE*, *Jc-γVPE* e *Jc-δVPE*) e duas endopeptidases cisteínicas (*Jc-CysEP1* e *Jc-CysEP2*) por meio RT-qPCR no integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e madura (ROCHA *et al.*, 2013). De acordo com esses autores esses genes podem estar relacionados com a ocorrência de MCP e também podem estar envolvidos no processo de maturação de proteínas de armazenamento. Além disso, essas

enzimas foram identificadas na análise proteômica de ambos os tecidos (SHAH *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2014). Os resultados mostraram que a expressão dos genes *Jc-CysEP1*, *Jc-CysEP2*, *Jc-βVPE* e *Jc-γVPE* procederam rapidamente a partir do estágio de 25 DAP, no entanto, a expressão do *Jc-CysEP1* não foi ascendente no endosperma de nenhum dos estágios analisados. Ademais, o padrão de expressão foi correlacionado com as mudanças anatômicas ocorridas no integumento interno e no endosperma celular, permitindo sugerir que ambas classes de peptidases podem atuar no processo de degeneração celular e maturação das proteínas de armazenamento.

Em suma, esses estudos contribuem para o entendimento do desenvolvimento do endosperma dessas sementes, principalmente, sobre o metabolismo e armazenamento de proteínas e lipídios de reserva, além da biossíntese de compostos tóxicos e a presença de enzimas proteolíticas. Interessantemente, o integumento interno de sementes em desenvolvimento é responsável não somente pela transferência, mas também pelo armazenamento transitório de reservas para o crescimento do embrião e endosperma. Além disso, a expressão e identificação de enzimas relacionadas a atividade proteolítica no ii também foram amplamente discutidas, no entanto, é interessante a possibilidade de poder correlacionar esses conhecimentos com as alterações da ultraestrutura ao longo do desenvolvimento desse tecido.

A descrição prévia desses conceitos fornece embasamento para o estudo das características ultraestruturais e moleculares inerentes ao desenvolvimento do integumento interno no óvulo e sementes de *J. curcas*. Observações anatômicas indicam que o desenvolvimento deste tecido é dividido em duas etapas incluindo, o aumento no número de camadas de células seguida de uma etapa reducional caracterizada pelo consumo de algumas dessas camadas. Desse modo, objetiva-se aqui conhecer os aspectos morfológicos das organelas que caracterizam ambas etapas do desenvolvimento do ii. A

análise ultraestrutural irá permitir ainda a observação de características relacionadas a etapa reducional que ocorre, presumidamente, por MCP e relacioná-las com o padrão de expressão de genes que podem estar envolvidos nesse processo. A correlação desses resultados pode contribuir para o melhor entendimento do desenvolvimento deste tecido, tendo em vista que será possível conhecer as distinções na morfologia das células ao longo do integumento interno durante seu desenvolvimento.

A escolha dos estágios foi baseada em estudos anatômicos prévios, no qual buscou-se evidenciar células em processo de diferenciação e divisão e também estágios de desenvolvimento que mostram a modificação morfológica das células em resposta a ocorrência da MCP.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Identificar as características ultraestruturais inerentes ao desenvolvimento do integumento interno do óvulo e de sementes em desenvolvimento de *J. curcas*, além de determinar as diferenças no padrão de expressão relativa de hidrolases que ocorrem com a progressão da morte celular programada.

2.2 ESPECÍFICOS

- Detalhar a ultraestrutura das organelas do integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento (5, 10 e 25 DAP) de *J. curcas*;

- Comparar o padrão de expressão gênica de sete hidrolases e dois inibidores de peptidases no integumento interno do óvulo e de sementes com 5 e 10 DAP; e, também entre as regiões proximal e distal dessa estrutura em sementes com 25 DAP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado nesse estudo foi coletado de plantas cultivadas na Universidade Federal do Ceará localizada no município de Fortaleza, Ceará, Brasil.

O óvulo foi isolado do botão floral completamente fechado indicando que a fertilização ainda não havia ocorrido. Esse estágio foi escolhido com base no comprimento (~1 mm) e utilizado como controle para as mudanças ocorridas na semente. As sementes em desenvolvimento foram coletadas com base no número de dias após a polinização (DAP), identificadas por meio do comprimento, onde, sementes com 5, 10 e 25 DAP apresentam 2, 6 e 15 mm respectivamente (PINHEIRO, 2010). O óvulo e as sementes foram coletados de diferentes plantas na mesma área experimental.

3.2 ANÁLISE ANATÔMICA POR MICROSCOPIA DE LUZ

O óvulo e as sementes nos estágios utilizados foram coletados e isolados com auxílio de microscópio estereoscópico (Olympus® – modelo SZ61) e fixados em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,2 - KARNOVSKY, 1965), por 24 h, lavados com tampão fosfato de sódio a 0,2 M, pH 7,2, por 5 vezes (3 min cada troca). Em seguida, o material foi desidratado e emblocado em resina tipo metacrilato Leica® conforme orientação do fabricante, modificando-se apenas o tempo de infiltração, o qual foi de 21 dias. Os blocos foram cortados com 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica® – modelo 2065). A coloração dos cortes foi realizada com azul de toluidina a 0,12% por 15 min e, em seguida, fucsina básica a 0,05% por até 1 min de acordo com Junqueira (1990). Para montagem das lâminas foi utilizada resina sintética Entellan (Merck®) e, posteriormente, as análises

e obtenção das imagens foram feitas em microscópio óptico (Leica® DM4000 com sistema digital de captura de imagens).

3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fragmentos do integumento interno com aproximadamente 1 mm² de cada estágio foram cuidadosamente isolados com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Olympus® – modelo SZ61). No óvulo e nas sementes com 5 DAP, foi possível o isolamento total do integumento interno. Aos 10 e 25 DAP dividiu-se essa estrutura em duas regiões principais: a primeira delas englobou as células entre a epiderme interna e o sistema vascular do tecido (região distal), a outra compreendeu as células abaixo do sistema vascular até a cavidade central (região proximal).

As amostras foram imediatamente fixadas em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2) por 24 h e lavados em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 10 min por três vezes. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1% por duas horas, sendo em seguida lavados cinco vezes em tampão fosfato de sódio por 10 min. As amostras foram tratadas com acetato de uranila 2% à 4 °C por 12 h e então desidratadas em soluções de concentrações de etanol progressivamente crescentes de 17%, 35%, 50%, 70%, 85%, 95% (2x) e 99,5% (3x) durante 10 min em cada solução e, em acetona (2x) por 15 min. As amostras foram infiltradas em resina epóxi Spurr EMS® utilizando como solução de troca a acetona nas seguintes proporções: 1:2, 1:1 e 2:1 de resina e acetona, respectivamente e, finalmente a adição de resina pura. Em seguida as amostras foram emblocadas em resina Spurr EMS® e polimerizadas a 60 °C por 24 h. Secções ultra-finas (70 nm) foram feitas com navalha de diamante em ultramicrótomo Reichert OM U3. Os cortes foram coletados em grades de cobre de 200 mesh cobertas com formvar (Electron

Microscopy Sciences, EMS[®]) e contrastados com acetato de uranila (5%) e citrato de chumbo. A obtenção das micrografias eletrônicas foi realizada com a utilização de um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 operado em 80 kV.

3.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

3.4.1 *Preparo do material vegetal*

Para avaliar a expressão gênica, o integumento interno do óvulo e de sementes com 5 e 10 dias após a polinização (DAP) foram isolados. No entanto, em sementes com 25 DAP o tecido em estudo foi dividido em duas regiões: distal e proximal em relação à cavidade central dessas sementes. O isolamento do material foi realizado como descrito anteriormente e imediatamente imerso em N₂ líquido e em seguida armazenado para posterior utilização.

Foram avaliados a expressão relativa de sete hidrolases e dois inibidores de peptidases: arabinofuranosidase, glucanase, peptidase cisteínica com cauda RDEL, peptidase cisteínica com cauda KDEL, peptidase aspártica, peptidase serínica, subtilisina, inibidor de peptidase cisteínica e serpina. A sequência dos iniciadores utilizados estão de acordo com Soares *et al.* (2014).

3.4.2 *Extração do RNA total*

Para extração do RNA total, o material isolado foi imediatamente imerso em N₂ líquido e macerado, em seguida utilizou-se o Plant RNA Purification Reagent (INVITROGEN[®]) de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 100 mg do material macerado de cada estágio foi colocado em microtubos de centrifuga tipo Eppendorf de 1,5 mL autoclavados e adicionou-se 500 µL do Plant RNA Reagent, em seguida o material ficou incubado por 10 min na posição horizontal para aumentar a

superfície de contato. Passado esse tempo o material foi centrifugado à 12 000 g por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para um novo microtubo e acrescentou-se um volume de 100 µL de NaCl 5 M e 300 µL de clorofórmio, em seguida todos os componentes foram homogeneizados por leve inversão. Centrifugou-se o material por 10 min a 4 °C, formando 3 camadas bem distintas. A camada superior foi cuidadosamente retirada e transferida para um novo microtubo e a ele adicionou-se igual volume de isopropanol para precipitação do RNA. A incubação do material durou 10 min seguido de uma centrifugação a 12 000 g por 10 min, 4 °C. Nesta etapa, o sobrenadante foi retirado e descartado e ao precipitado adicionou-se 1 mL de etanol 70% para lavagem, retirando todos os resquícios do isopropanol. As amostras foram novamente centrifugadas a 12 000 g por 2 min a 4 °C. Todo o etanol foi retirado cuidadosamente e o precipitado foi colocado para secar em capela de fluxo laminar vertical. Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em 30 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC, SIGMA) 0,1% e quantificado por espectrofotometria utilizando-se Nanodrop (ND 1000) em leituras a 260 nm.

A avaliação da integridade do RNA total extraído foi realizada com a aplicação de 1 µg do material obtido em gel de agarose 1,2% em tampão ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (MOPS 20mM; acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM, pH 7,0) contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio. A corrida eletroforética procedeu-se a 100 V.

3.4.3 Digestão do DNA genômico

Para a remoção do DNA genômico do RNA total extraído utilizou-se a DNase I (INVITROGEN[®]) de acordo com as etapas disponibilizadas pelo fabricante (<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/18068015.pdf>). Inicialmente, de

cada amostra utilizou-se 1 µg do RNA total juntamente com 1 µL de tampão de reação e 1 µL de DNase I (1 U/µL) e água tratada com DEPC q.s.p. 10 µL. Os componentes foram homogeneizados levemente e incubados por 15 min a temperatura ambiente e em seguida a DNase foi inativada com a adição de 1 µL de EDTA 25 mM e aquecimento a 65 °C por 10 min.

3.4.4 *Transcrição reversa (RT)*

A síntese do DNA complementar (cDNA), através da reação de transcrição reversa foi feita utilizando 0,5 µg de RNA tratado com DNase I (5,5 µL). Na primeira etapa desse processo o RNA foi combinado com 0,5 µg de oligo (dT)₁₅ (PROMEGA), e em seguida incubado a 70 °C por 5 min e imediatamente colocado para resfriar em banho de gelo por no mínimo 5 min. Em seguida, adicionou-se o mix da reação de transcrição reversa composto por dNTPs 0,5 mM (PROMEGA); MgCl₂ 2,5 mM; tampão de reação 1 X; 1 µL da enzima transcriptase reversa ImProm-II™ Reverse Transcription System (PROMEGA) e água livre de RNases (q.s.p. 13,5 µL). Após a adição do mix, as amostras foram submetidas as seguintes condições: anelamento a 25 °C por 5 min; extensão a 42 °C por 1 hora e, finalmente a inativação da transcriptase reversa a 70 °C por 15 minutos. O cDNA obtido foi quantificado por espectrofotometria utilizando Nanodrop (ND 1000) com leituras a 260nm e em seguida armazenado a -20 °C até a utilização.

3.4.5 *RT-qPCR*

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o Mastercycler® ep realplex (Eppendorf AG, Hamburg) em placas de 96 poços (Eppendorf) segundo as instruções do kit *BRYT Green GoTaq®qPCR Master Mix* (PROMEGA) (<https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/101/gotaq-qpcr->

[master-mix-protocol/](#)). Em cada reação utilizou-se 10 μ L do *GoTaq[®]qPCR Master Mix* 2X; 20 ng de cDNA; 200 nM dos iniciadores forward e reverse e água RNase free q.s.p. 20 μ L. O controle negativo, sem cDNA, foi realizado para cada combinação entre amostra e iniciador. Após a preparação das amostras e aplicação na placa, utilizou-se uma película adesiva para selar cada poço. Em seguida, a placa foi disposta no termociclador utilizando o seguinte programa: 5 min a 95 °C para ativação da enzima, em seguida 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 60 °C por 15 s e a extensão a 60 °C por 20 s. Para avaliar a especificidade dos iniciadores, adicionou-se a curva de fusão com os seguintes parâmetros: 95 °C por 15 s; 60 °C por 15 s; aquecimento de 60 °C para 90 °C por 20 min e 95 °C por 15 s. O delineamento experimental foi realizado com duas replicatas biológicas e três replicatas técnicas em triplicata (n=18).

Os dados obtidos do RealPlex 1.5 foram exportados para o programa Excel e analisado por meio do método $\Delta\Delta$ Ct conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001). Quatro genes de referência foram utilizados para normalização dos dados (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase-GAPDH, fator de alongação alfa 1- EF1, enzima conjugadora de ubiquitina- UCP e fosfatase alcalina 2A-PP2A) (ROCHA *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2014).

Para o cálculo de expressão relativa do óvulo e sementes com 5 e 10 DAP utilizou-se como calibrador o óvulo e para as sementes com 25 DAP utilizou-se a região distal como calibrador. Os três primeiros estágios (óvulo, 5 e 10 DAP) foram comparados estatisticamente pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$), enquanto que em sementes com 25 DAP, o integumento interno foi dividido em região distal e proximal e a análise de expressão gênica relativa se deu comparando ambas as regiões dentro desse estágio pelo teste t de Student ($\alpha=0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL

4.1.1 Características ultraestruturais do integumento interno do óvulo de J. curcas

O óvulo de *J. curcas* é constituído pelo nucelo, e por dois integumentos, o externo e o interno; tecidos que juntos envolvem o saco embrionário (Fig. 2A). O integumento externo é constituído por 6 a 8 camadas de células parenquimáticas (Fig. 2A). O integumento interno é vascularizado e constituído por, aproximadamente, 19 camadas de células com citoplasma denso, sendo que duas delas constituem a epidermes da face interna e externa e as demais o mesofilo (Fig. 2B).

A análise ultraestrutural foi realizada no mesofilo do integumento interno, nas camadas celulares 1, 9 e 17 conforme mostrado na Fig. 2B. A camada 1 refere-se as células localizadas logo abaixo da epiderme externa, a camada 9 aquelas próximas ao sistema vascular e a camada 17 são as células adjacentes à epiderme interna deste tecido (Fig. 2B). Essas camadas celulares foram escolhidas com o intuito de mostrar características ultraestruturais marcantes incluindo, a vacuolização e o afastamento do citoplasma e organelas para a periferia dessas células.

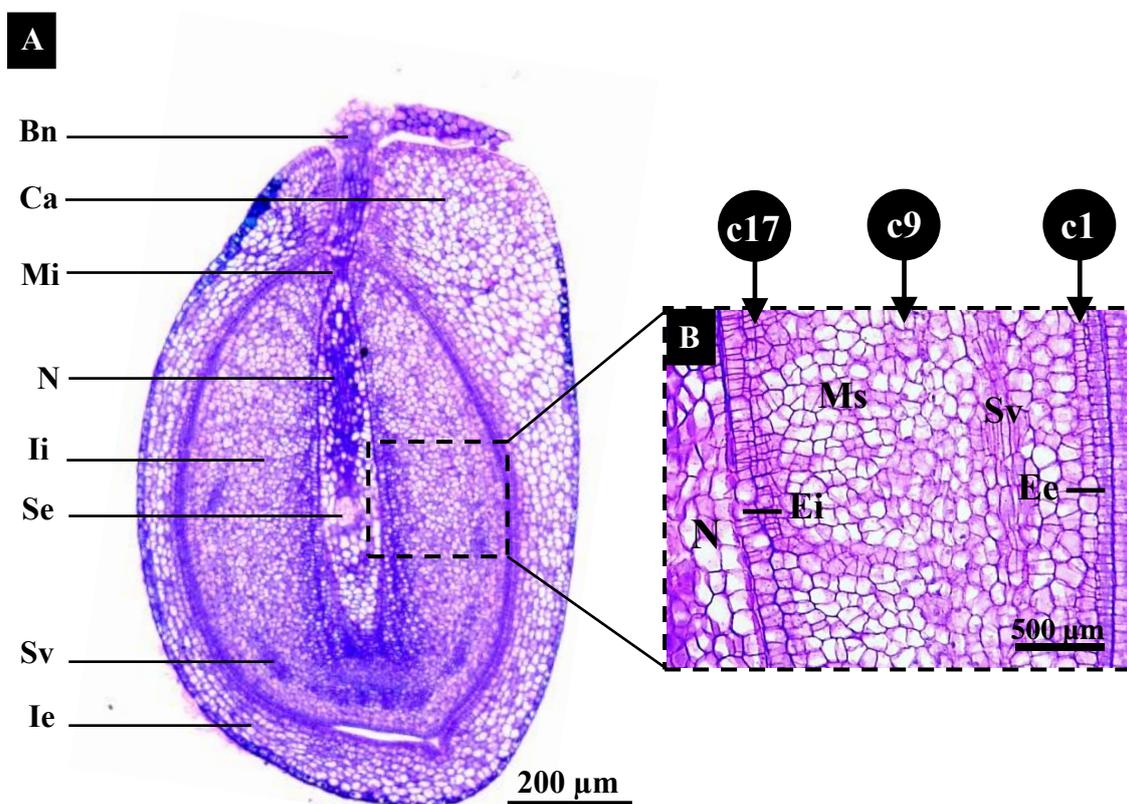


Figura 2. Anatomia do óvulo de *J. curcas*. **(A)** Secção longitudinal mostrando os tecidos que constituem o óvulo. **(B)** Ampliação do integumento interno mostrando a localização das células estudadas na análise de microscopia eletrônica de transmissão. Legenda: Bn, bico nucelar; Ca, carúncula; Ee, epiderme externa do integumento interno; Ei, epiderme interna do integumento interno; Ie, integumento externo; Ii, integumento interno; Mi, micrópila; Ms, mesofilo; N, nucelo; Se, saco embrionário; Sv, sistema vascular; c1, camada 1; c9, camada 9; c17, camada 17.

A camada 1 (Fig. 2B, c1) apresentou células com citoplasma denso e ribossomos abundantes, núcleo esférico, conspícuo e volumoso, além de pequenos vacúolos dispostos no citoplasma (Fig. 3A). Os vacúolos são preenchidos, quase sempre, por pequenas inclusões elétrons densas e algumas vesículas (Fig. 3A e D). Mitocôndrias com cristas proeminentes, retículo endoplasmático liso e rugoso (Fig. 3B) e dictiossomas com suas cisternas aparentes (Fig. 3C) foram comumente observados nessas células. Plastídios contendo grãos de amido em seu estroma e vacuoma formado por pequenos vacúolos apresentando prováveis pontos de fusão também foram observados (Fig. 3D).

Na camada 9 (Fig. 2B, c9) observou-se células mais vacuoladas, em comparação ao observado na c1; o núcleo ainda é evidente e os plastídios e mitocôndrias estão dispostos ao seu redor, além da presença de vários plasmodesmas na parede celular, conectando as células do mesofilo (Fig. 4A). Observou-se também invaginações da membrana plasmática, envolvendo material elétron denso e pequenas vesículas, que aparentemente se projetam para o interior do vacúolo (Fig. 4B e C).

Além disso, observou-se a integridade do tonoplasto, membrana circundante dos vacúolos (Fig. 4D). A presença de corpo multivesicular no interior do vacúolo foi observado (Fig. 4E). A presença de vacúolos menores com pontos de fusão também foi identificada (Fig. 4F); o lúmen destas organelas ainda apresenta material floculento e inúmeras vesículas. De modo geral, observaram-se muitas mitocôndrias e plastídios localizados próximos a parede celular.

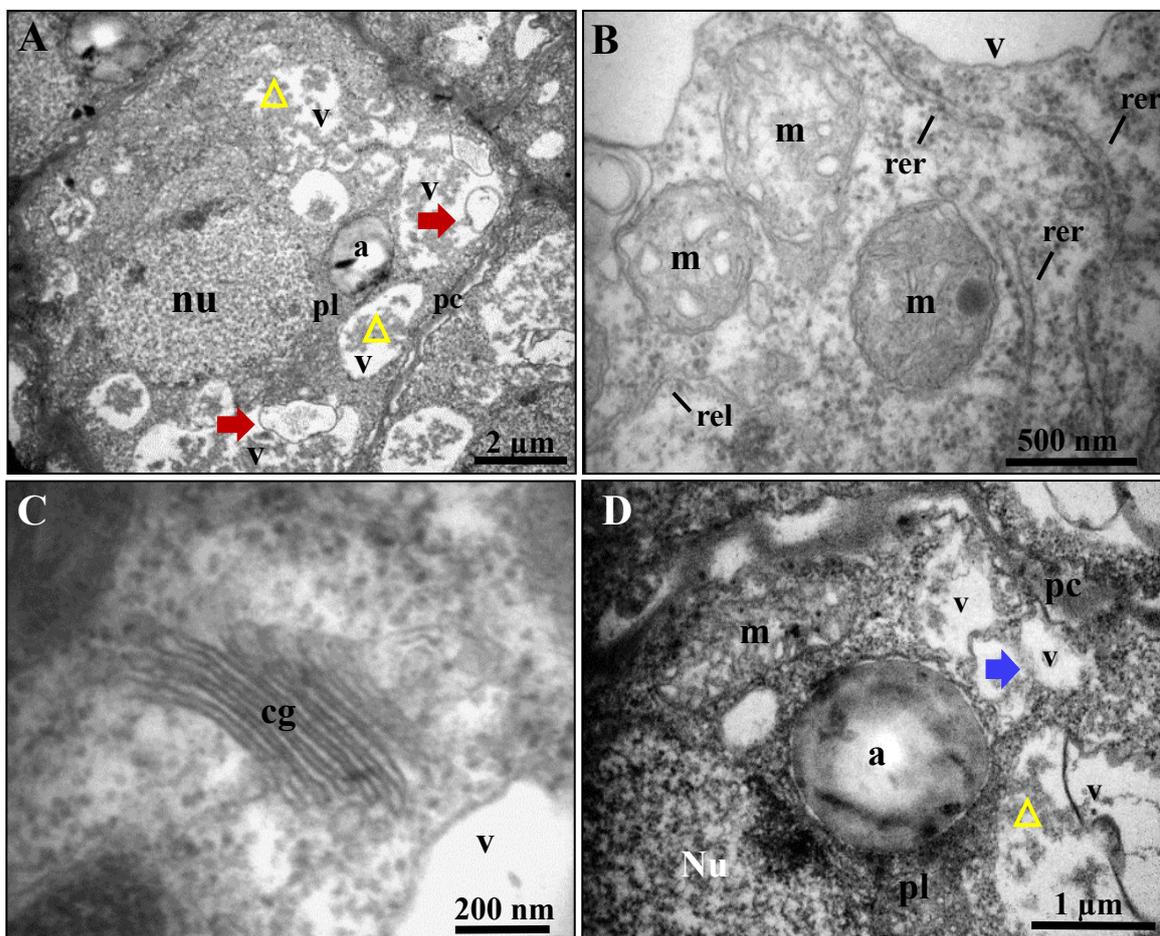


Figura 3. Ultraestrutura do integumento interno do óvulo de *J. curcas*, camada 1 (A) Visão geral de uma célula com organelas dispersas no citoplasma. (B) Mitocôndrias com cristas proeminentes e retículo endoplasmático liso e rugoso. (C) Complexo de Golgi com inúmeras cisternas. (D) Plastídio e vacuoma composto de pequenos vacúolos se fundindo. Legenda: a, amido; cg, complexo de Golgi; m, mitocôndria; nu, núcleo; pc, parede celular; pl, plastídio; rer, retículo endoplasmático rugoso; rel, retículo endoplasmático liso; v, vacúolo; seta vermelha, vesículas e membranas; seta azul, pontos de fusão de vacúolos; triângulo amarelo, compostos fenólicos.

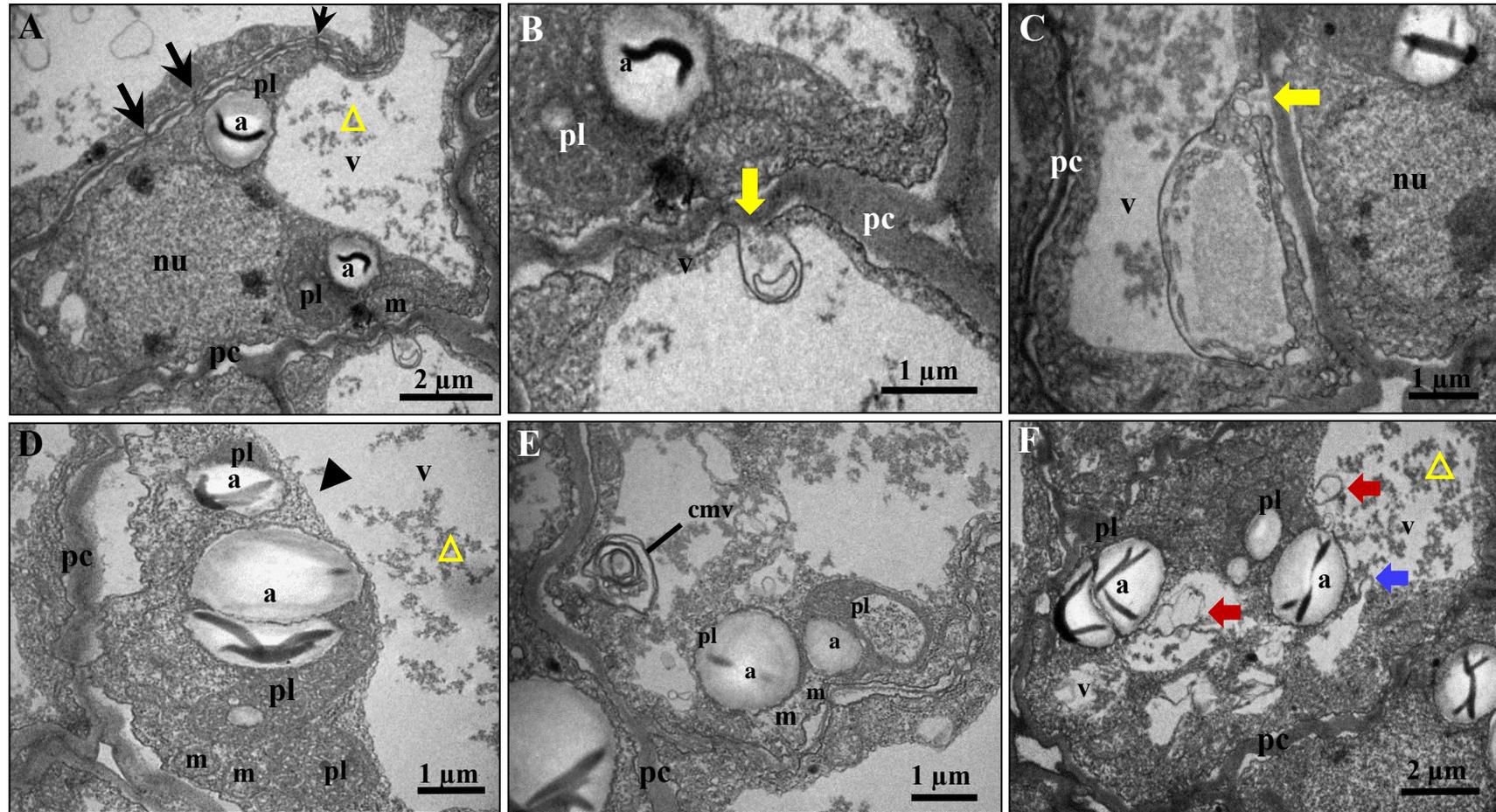


Figura 4. Ultraestrutura do integumento interno do óvulo de *J. curcas*, camada 9. (A) Visão geral da célula com plastídios e mitocôndria ao redor do núcleo e a presença de plasmodesmas dispostos na parede celular. (B) e (C) Invaginações da membrana plasmática. (D) Citoplasma periférico e tonoplasto íntegro. (E) Corpo multivesicular no interior do vacúolo e organelas adjacentes a parede celular. (F) Pontos de fusão de vacúolos. Legenda: a, amido; cmv, corpo multivesicular; m, mitocôndria; nu, núcleo; pc, parede celular; pl, plastídio; v, vacúolo; seta preta, plasmodesma; seta vermelha, vesículas e membranas; seta azul, ponto de fusão de vacúolos; seta amarela, invaginações da membrana plasmática; ponta de seta, tonoplasto; triângulo amarelo, compostos fenólicos.

A camada 17 do mesofilo (Fig. 2B, c17), adjacente à epiderme interna, possui células com vacúolo amplo, na maioria das vezes, situado na região central e, ainda o aumento de cordões transvacuolares, sinais evidentes de que essas organelas estão em processo de fusão (Fig. 5A). Além disso, foi possível observar vesículas de variados tamanhos preenchidas por material amorfo no interior dos vacúolos (Fig. 5C e D). De maneira geral, os plastídios ameboidais, mitocôndrias, complexo de Golgi e o núcleo na periferia das células foram observados (Fig. 5A-D).

As células do integumento interno do óvulo possuem citoplasma denso e rico em ribossomos, além de evidentes organelas celulares incluindo, mitocôndrias, plastídios, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Contudo, à medida que a análise progrediu em direção ao saco embrionário observou-se aumento da vacuolação e expansão celular. Além de outras características tais como: invaginação da membrana plasmática e vacúolos quase sempre preenchidos com vesículas e material amorfo.

4.1.2 Características ultraestruturais do integumento interno de sementes com cinco dias após a polinização (DAP)

Em sementes com 5 dias após a polinização (DAP), o integumento interno possui, aproximadamente 23 camadas de células na sua grande maioria vacuoladas, exceto as camadas de células referentes às epidermes externa e interna (Fig. 6A). Dentre as quais selecionou-se as camadas que constituem o mesofilo 1, 9, 12 e 21, respectivamente; partindo da região distal do ii até a camada celular adjacente a epiderme interna (Fig. 6B).

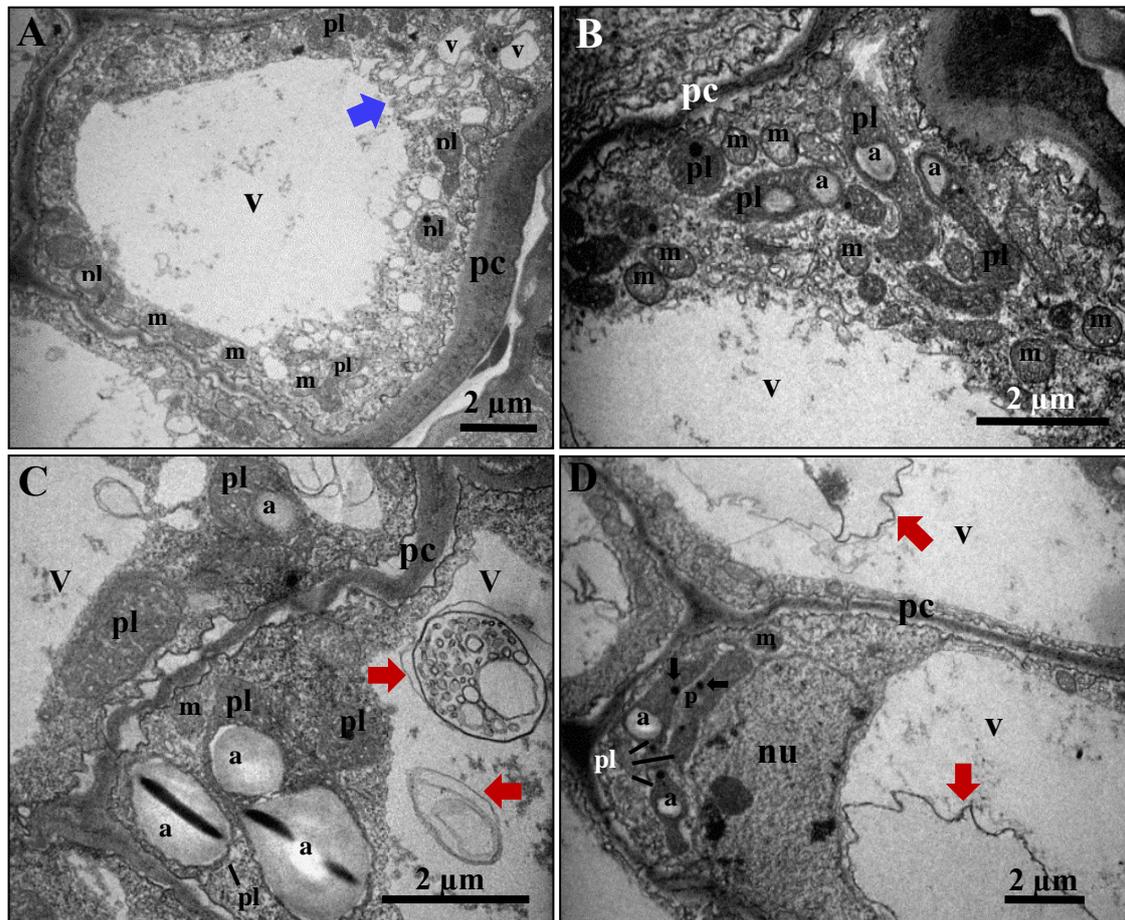


Figura 5. Ultraestrutura celular do integumento interno do óvulo de *J. curcas*, camada 17. (A) Visão geral da célula com vacúolo ocupando a parte central. (B) Plastídios, mitocôndrias e complexo de Golgi dispostos na periferia da célula. (C) e (D) Vesículas no interior dos vacúolos. Legenda: a, amido; m, mitocôndria; nu, núcleo; p, plastoglobulos; pc, parede celular; pl, plastídio; v, vacúolo; seta vermelha, vesículas e membranas; seta azul, fusão de vacúolos.

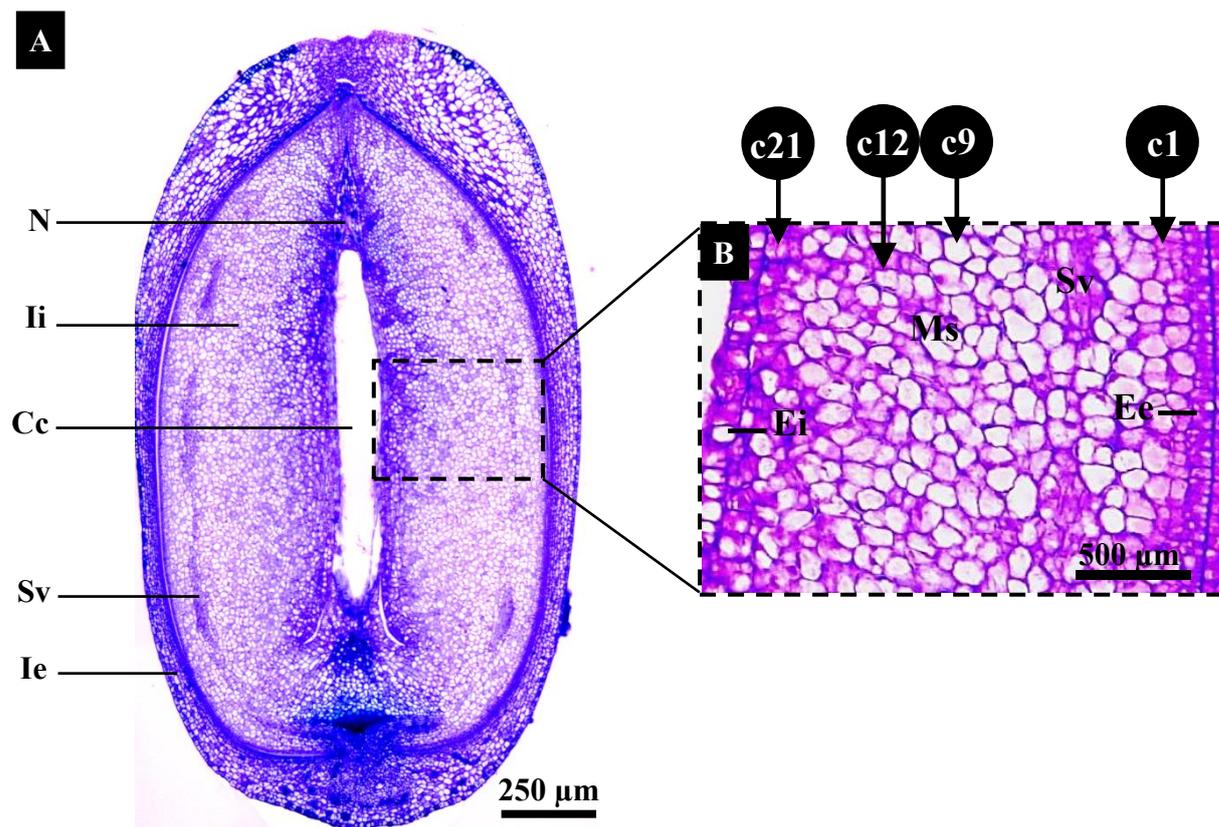


Figura 6. Anatomia de sementes de *J. curcas*, 5 dias após a polinização (DAP). (A) Secção longitudinal mostrando os tecidos que constituem a semente com 5 DAP. (B) Ampliação do integumento interno mostrando a localização das células estudadas na análise de microscopia eletrônica de transmissão. Legenda: Cc, cavidade central; Ee, epiderme externa; Ei, epiderme interna; N, nucelo; Ie, integumento externo Ii, integumento interno; Ms, mesofilo; Sv, sistema vascular; c1, camada 1; c9, camada 9; c12, camada 12; c21, camada 21.

As células da camada 1 (Fig. 6B, c1), localizadas imediatamente abaixo da epiderme externa, possuem paredes delgadas com inúmeros plasmodesmas, pequenos vacúolos e plastídios com membranas internas pouco desenvolvidas e núcleo central (Fig. 7A), similarmente ao que foi observado na mesma região do ii do óvulo (Fig. 3A). Espaços periplasmáticos são definidos como o afastamento da plasmalema da parede celular preenchidos ou não por algumas vesículas e, foram frequentemente observados (Fig. 7A). A maioria dessas vesículas, também chamadas de corpos paramurais, apresentam membrana externa íntegra.

Nesta mesma camada de células, identificou-se fusão de vacúolos margeados pelo complexo de Golgi, indicando algum tipo de transporte entre ambas (Fig. 7B). Nota-se ainda a formação de vesículas dispostas próximas à membrana plasmática (Fig. 7C) e plasmodesmatas foram constantemente observados (Fig. 7C e D). Os plastídios apresentaram grãos de amido no seu estroma, além de estarem quase sempre flanqueados pelo retículo endoplasmático rugoso periplastidial (Fig. 7C e D). Observou-se também tonoplasto íntegro (Fig. 7D).

Na camada 9 (Fig. 6B, c9), localizada região mediana do mesofilo, as células apresentam grande vacúolo central, núcleo lobado e organelas citoplasmáticas dispostas na periferia celular (Fig. 8A). Características tais como: a formação de grande espaço periplasmático ocupado por restos de membranas, vacúolo ocupado por grandes vesículas, uma fina faixa de citoplasma contendo complexo de Golgi e plastídios com plastoglóbulos em seu estroma foram frequentemente observadas nesta região do ii (Fig. 8B e C). Observou-se também, a presença de inúmeras vesículas secretoras dispostas no citoplasma que parecem brotar da face *cis* e *trans* do complexo de Golgi e estão quase sempre próximas as inúmeras cisternas do retículo endoplasmático liso (Figs. 8B, C, E e F).

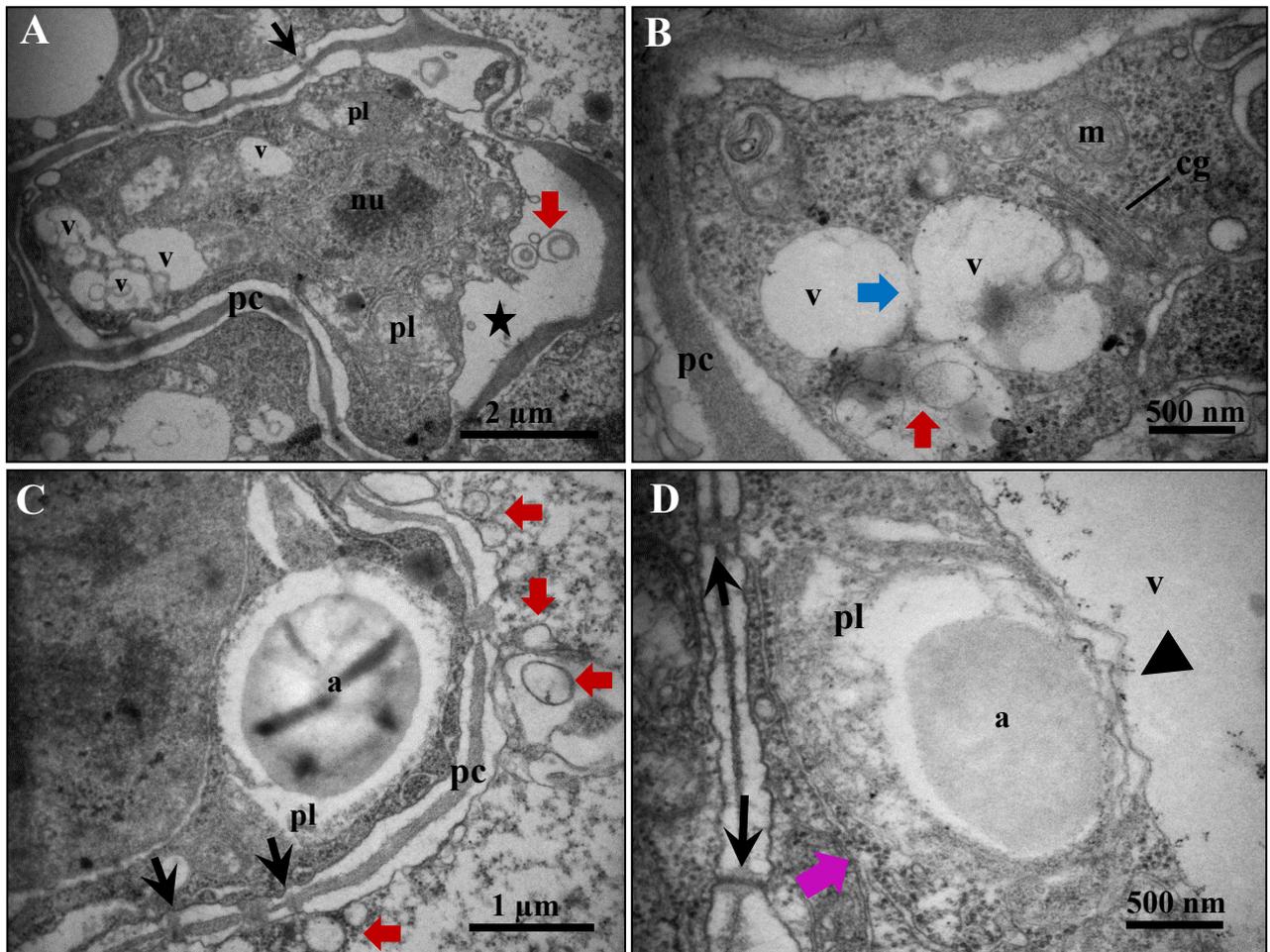


Figura 7. Ultraestrutura do integumento interno de sementes de *J. curcas* com 5 dias após a polinização (DAP), camada 1. **(A)** Visão geral da célula com organelas dispostas ao redor do núcleo, pequenos vacúolos e espaço periplasmático. **(B)** Fusão de vacúolos. **(C)** Plasmodesmas e corpos paramurais. **(D)** Plastídio flanqueado por retículo periplastidial, plasmodesmas e tonoplasto íntegro. Legenda: a, amido; cg, complexo de Golgi; m, mitocôndria; nu, núcleo; pc, parede celular; pl, plastídio; v, vacúolo; estrela, espaço periplasmático; seta vermelha, vesículas, membranas e corpos paramurais; seta azul, fusão de vacúolos; ponta de seta, tonoplasto; seta roxa, retículo periplastidial; seta preta, plasmodesma.

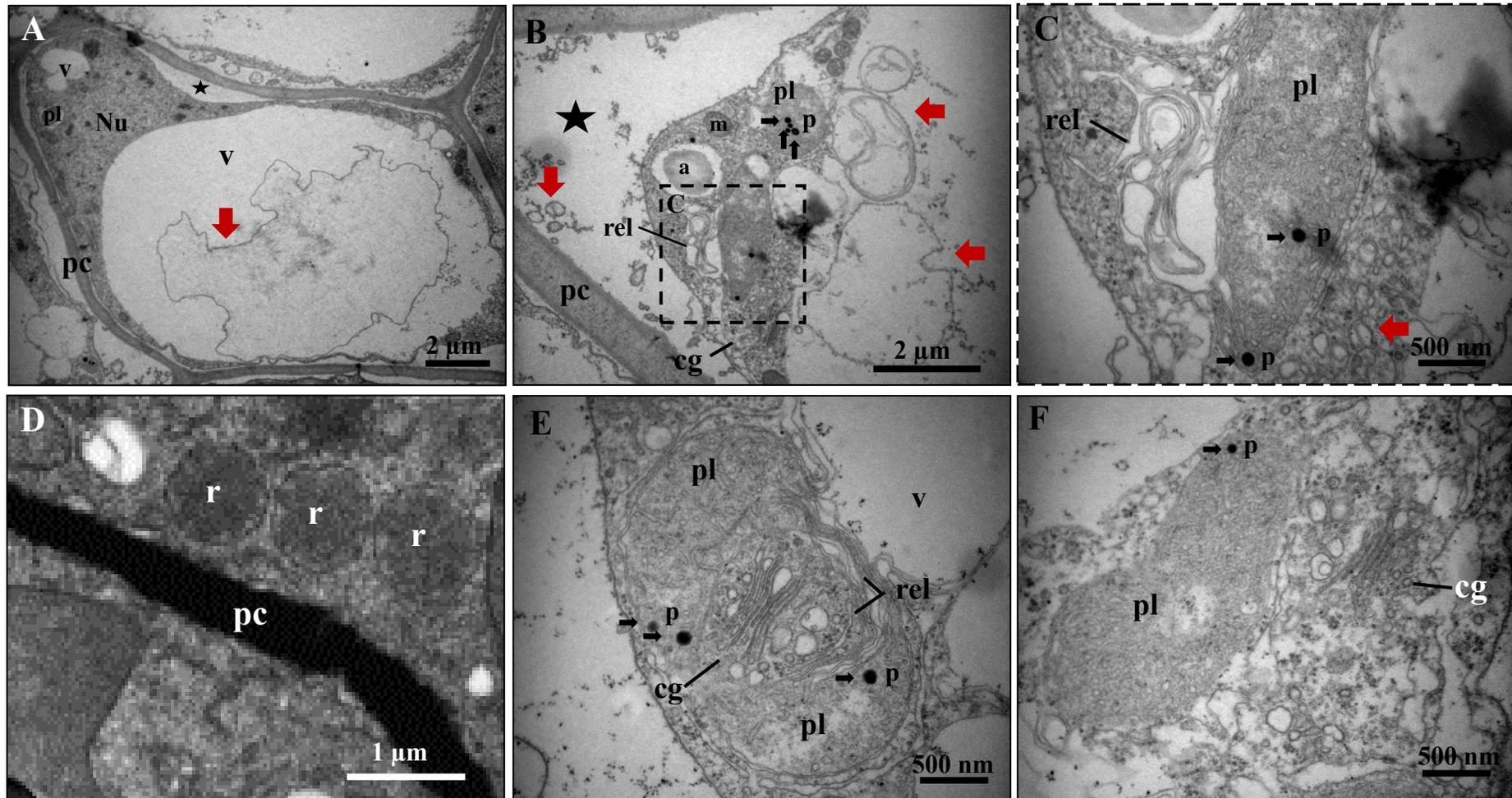


Figura 8. Ultraestrutura do integumento interno de sementes de *J. curcas* com 5 dias após a polinização (DAP), camada 9. **(A)** Visão geral da célula com espaço periplasmático e citoplasma periférico. **(B)** Inúmeras cisternas do retículo endoplasmático e vesículas provenientes do complexo de Golgi. **(C)** Ampliação da região quadriculada em B **(D)** Presença de ricinossomos. **(E)** e **(F)** Complexo de Golgi com vesículas secretoras, retículo endoplasmático liso e plastídios com plastoglobule. Legenda: a, amido; cg, complexo de Golgi; m, mitocôndria; nu, núcleo; p, plastoglobule; pc, parede celular; pl, plastídio; rel, retículo endoplasmático liso; r, ricinossomos; v, vacúolo; estrela, espaço periplasmático; seta vermelha, vesículas e membranas.

Não obstante, nota-se também a presença dos ricinossomos que são organelas derivadas de retículo endoplasmático, encontradas exclusivamente em células vegetais, além disso, identificamos ribossomos aderidos à membrana que delimita esta organela (Fig. 8D). A camada 12 apresentou as mesmas características observadas na camada 9, entretanto, nessa camada (c12) observou-se os primeiros sinais evidentes da ruptura do tonoplasto do vacúolo central (Fig. 9A).

Na camada 21 (Fig. 6B, c21), adjacente a epiderme interna do ii, observou-se células mais vacuoladas em comparação as camadas anteriores e com uma estreita camada de citoplasma periférico contendo plastídios e núcleo lobado (Fig. 9B). O complexo de Golgi libera vesículas secretoras, no entanto, com menor intensidade do que foi observado nas células das camadas superiores (Fig. 9C e D). Os plastídios ladeados por retículo periplastidial são associados com ribossomos indicando, provavelmente, síntese de proteínas (Fig. 9C). Nesse estágio, as células do integumento interno apresentam núcleo lobado, além de agregados de cromatina condensada dispostos próximos a carioteca (Fig. 9D).

Em suma, a análise ultraestrutural das células que compõe o ii das sementes com 5 DAP mostrou diferenças relevantes daquelas observadas nas células do ii óvulo, das quais podemos citar: a formação de grandes espaços periplasmáticos, presença de um grande número de cisternas de retículo endoplasmático liso, liberação de inúmeras vesículas do complexo e Golgi, presença de alguns ricinossomos e a ruptura do tonoplasto.

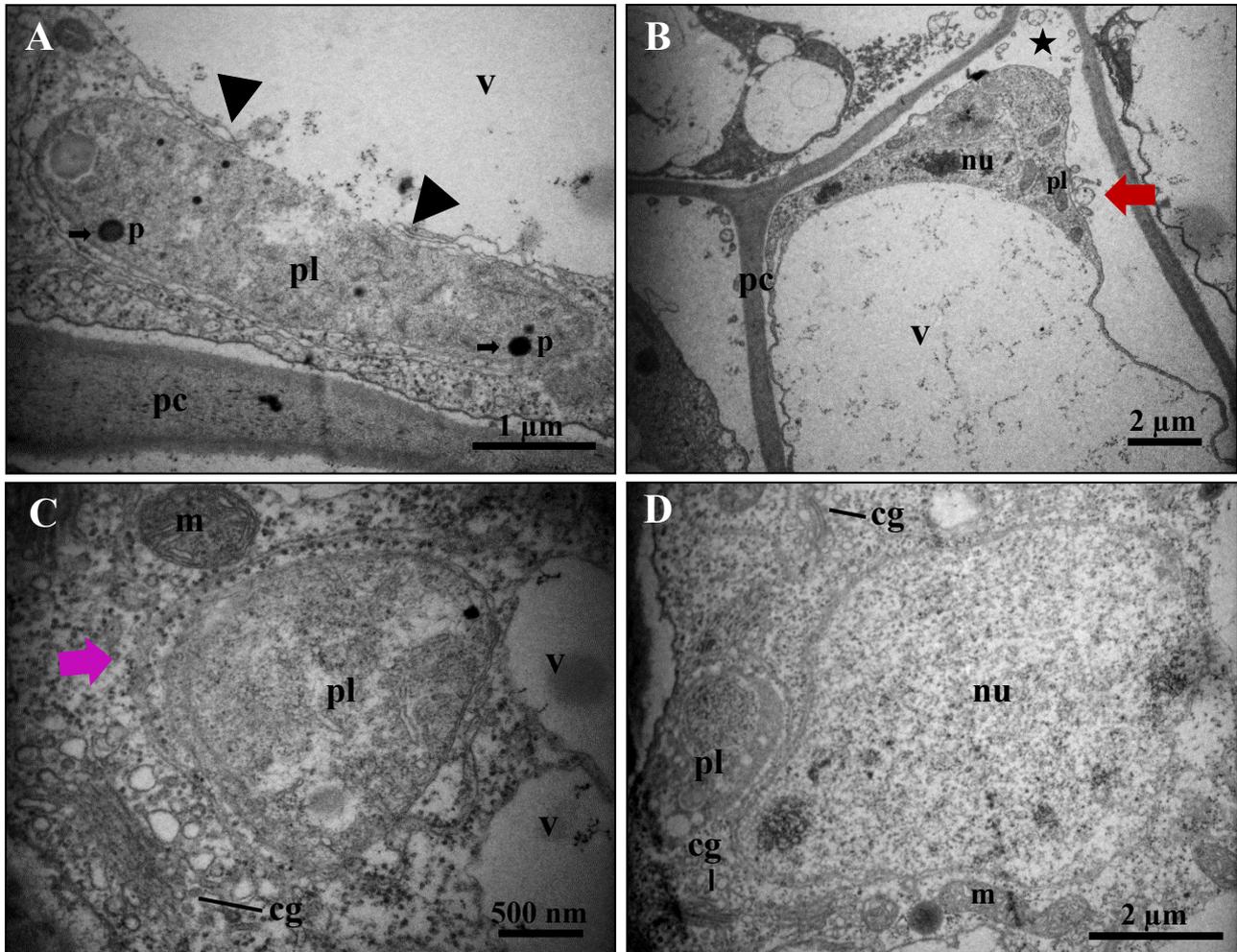


Figura 9. Ultraestrutura do integumento interno de sementes de *J. curcas* com 5 dias após a polinização (DAP). (A) Ruptura do tonoplasto, especificamente na camada 12. (B) Visão geral da célula com citoplasma periférico, vacúolo e núcleo lobado, camada 21. (C) e (D) Complexo de Golgi liberando vesículas secretora e núcleo lobado em D, camada 21. Legenda: cg, complexo de Golgi; m, mitocôndria; nu, núcleo; pl, plastídio; pc, parede celular; v, vacúolo; p, plastoglóbule; estrela, espaço periplasmático; seta roxa, retículo periplastidial; seta vermelha, vesículas e membranas; ponta de seta, tonoplasto.

4.1.3 Características ultraestruturais do integumento interno de sementes com 10 DAP

O integumento interno das sementes com 10 DAP é constituído por, aproximadamente, 30 camadas de células bem mais vacuoladas que aquelas observadas no mesmo tecido do óvulo e sementes aos 5 DAP (Fig. 10A). Adicionalmente, observou-se a ausência da camada de células referente à epiderme interna e o consumo de células do mesofilo adjacentes à cavidade central, sinais de degradação celular (Fig. 10B). As regiões distal e proximal, em relação à cavidade central, foram analisadas por MET e estão identificadas na figura 10B.

Nas camadas subjacentes à epiderme (região distal), as células possuem uma fina camada de citoplasma periférico, onde estão mitocôndrias e plastídios, estes últimos com membranas internas bem formadas (Fig. 11A e B) e por vezes apresentam grãos de amido mergulhados em seu estroma (Fig. 11B). A presença de núcleo lobado com cromatina condensada aderidos ao invólucro nuclear foi frequentemente observado (Fig. 11A e B). O complexo de Golgi apresentou, aparentemente, número reduzido de cisternas e vesículas secretoras, quando comparado ao estágio anterior (5 DAP) (Fig. 11C). Notou-se invaginações da membrana plasmática e preenchimento do espaço formado com pequenas vesículas, além da ausência do tonoplasto (Fig. 11D).

As células das camadas próximas à cavidade central (região proximal) também são vacuoladas, com citoplasma periférico e espaços periplasmáticos ocupados por inúmeras vesículas, além da presença de plastídios com sistema de membranas internas bem definidos. Todavia, não foi possível observar tonoplasto íntegro; apenas resquícios de material citoplasmático delimitados pela membrana plasmática e parede celular (Fig. 12A, B e C). Os ricinossomos estão presentes em grande número

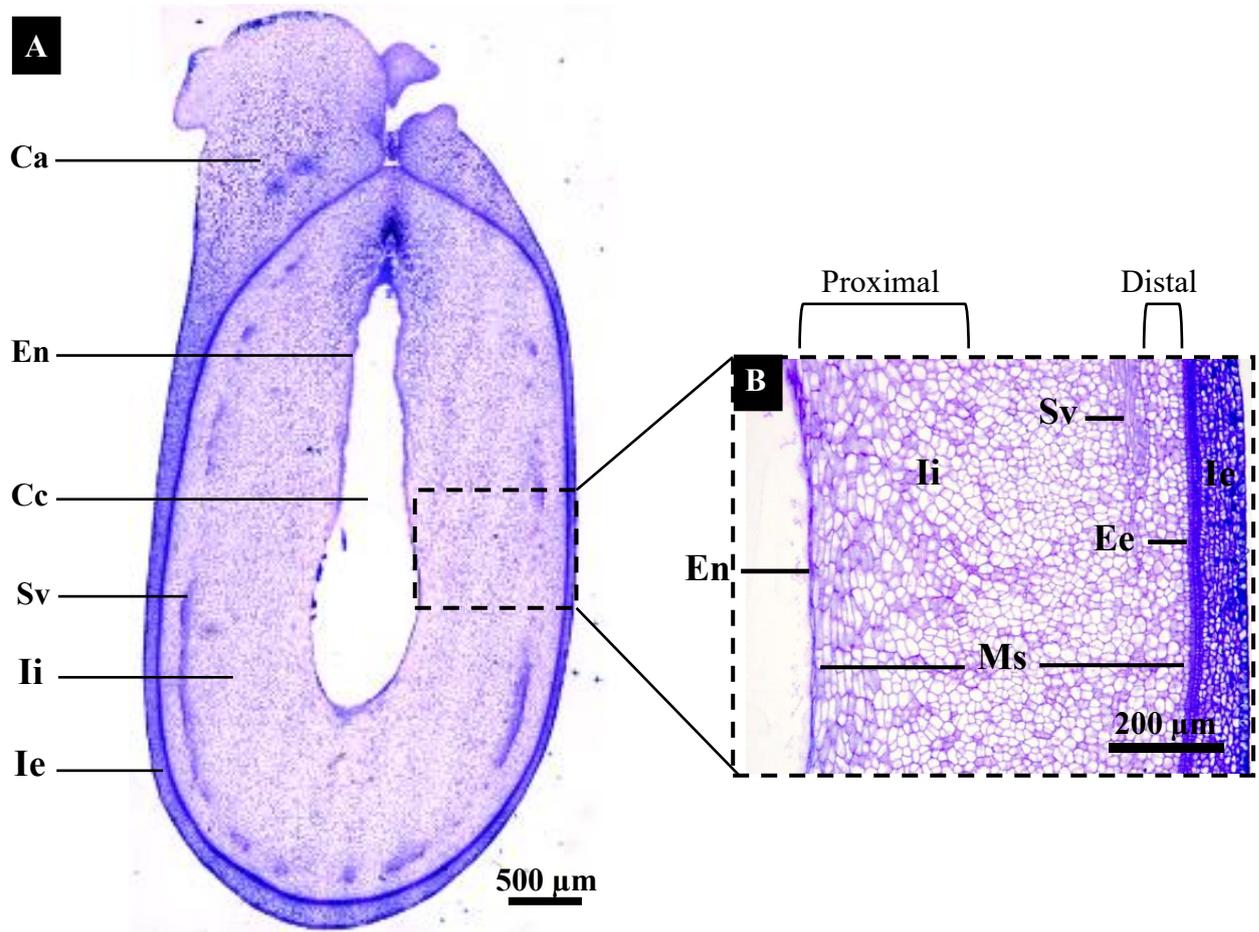


Figura 10. Anatomia de sementes de *J. curcas*, 10 dias após a polinização (DAP). (A) Secção longitudinal mostrando os tecidos que constituem a semente com 10 DAP. (B) Ampliação do integumento interno mostrando a localização das células estudadas na análise de microscopia eletrônica de transmissão. Observa-se a ausência da epiderme interna do integumento interno e a presença de uma fina camada de citoplasma. Legenda: Ca, carúncula; Cc, cavidade central, Ee, epiderme externa. En, endosperma; Ie, integumento externo; Ii, integumento interno; Ms, mesofilo.

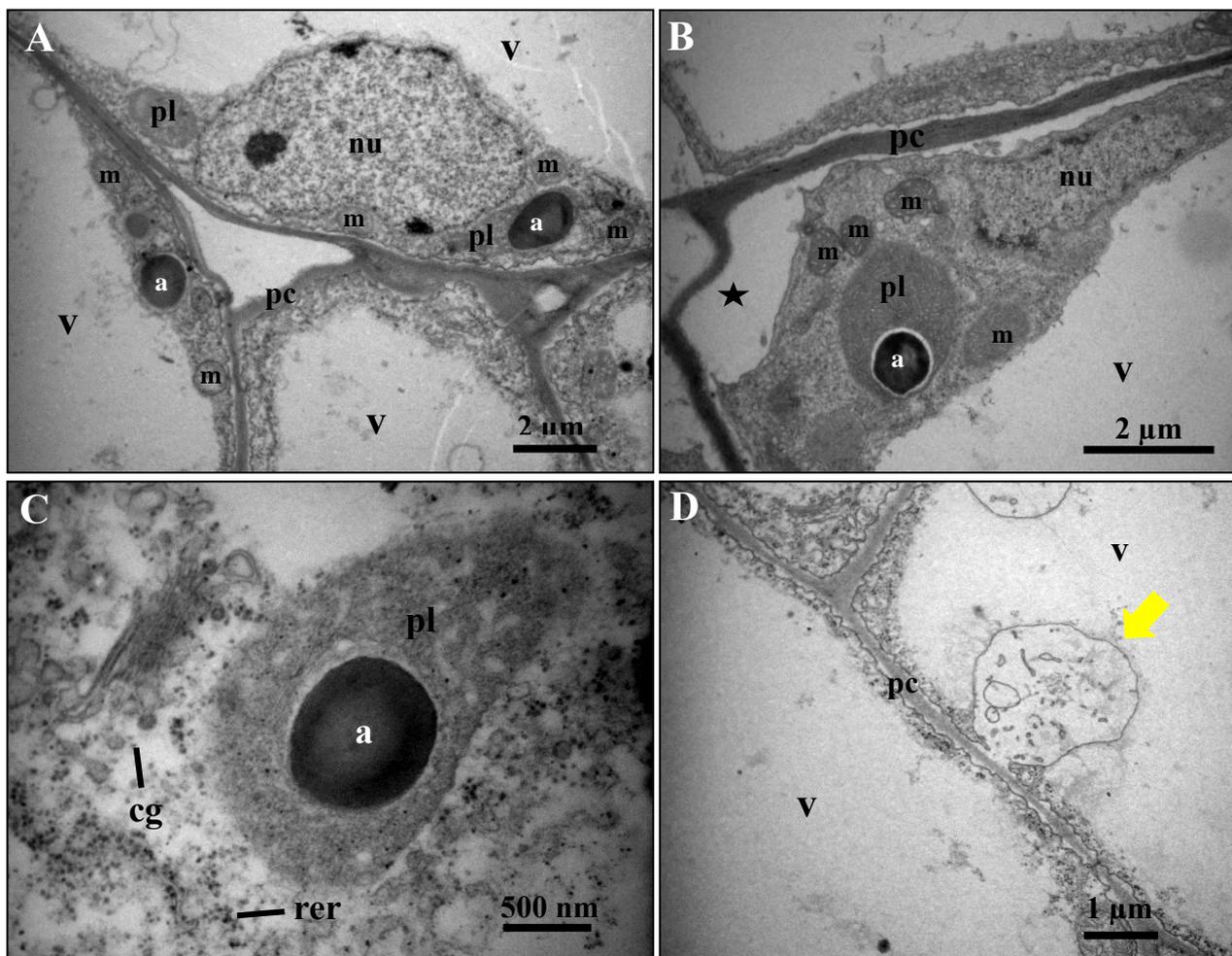


Figura 11. Ultraestrutura da região distal do integumento interno de sementes de *J. curcas* com 10 dias após a polinização (DAP). (A) e (B) Faixa estreita de citoplasma periférico com mitocôndrias, núcleo e plastídios, além de, espaços periplasmáticos. (C) Complexo de Golgi com número reduzido de cisternas. (D) Invaginação da membrana plasmática. Legenda: a, amido; cg, complexo de Golgi; nu, núcleo; m, mitocôndria; pl, plastídio; pc, parede celular; rer, retículo endoplasmático rugoso; v, vacúolo; estrela, espaço periplasmático; seta amarela, invaginação da membrana plasmática.

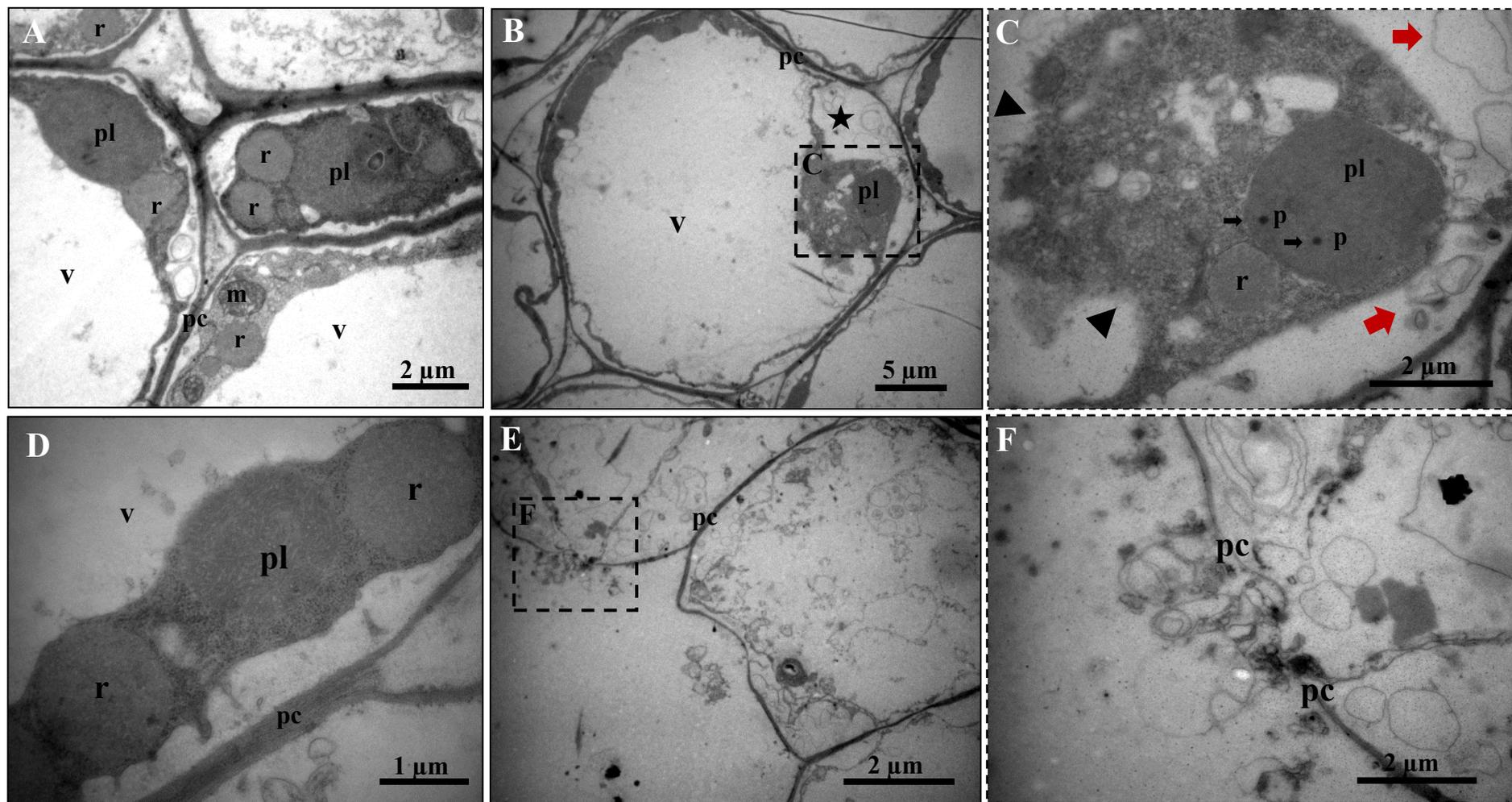


Figura 12. Ultraestrutura da região proximal do integumento interno de sementes de *J. curcas* com 10 dias após a polinização (DAP). (A)-(D) Faixa estreita de citoplasma periférico com mitocôndrias, plastídios, espaço periplasmático, ausência do tonoplasto íntegro e grande número de ricinossomos. (E) Rompimento da parede celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático. (F) Ampliação de E. Legenda: m, mitocôndria; p, plastoglobule; pl, plastídio; pc, parede celular; r, ricinossomos; v, vacúolo; estrela, espaço periplasmático; seta vermelha, membrana e vesículas; ponta de seta, tonoplasto.

exclusivamente na região proximal do integumento interno (Fig. 12A-D). E finalmente, na última camada de células, observou-se a ruptura da parede celular (Figura 12E) com liberação de restos celulares como detalhado na figura 12F.

Em geral, observou-se modificações evidentes nas células do ii em comparação ao óvulo. A vacuolização e expansão dessas células foi significativa, no qual uma fina camada de citoplasma contendo as organelas está aderido a membrana plasmática. Núcleo lobado com cromatina condensada, redução no número de vesículas secretadas pelo complexo de Golgi e invaginações da membrana plasmática são características comumente observadas. A presença dos ricinossomos em quase todas as células e a ruptura da parede celular foram notadas apenas na região proximal do ii.

4.1.4 Características ultraestruturais do integumento interno de sementes com 25 DAP

As sementes com 25 DAP possuem integumento interno constituído por aproximadamente 25 camadas de células bastante expandidas. Observou-se uma fina camada de endosperma entre a cavidade central e o mesofilo do ii (Fig. 13A). As células localizadas entre o sistema vascular e o endosperma são mais alongadas (vacuoladas, maiores) que aquelas próximas à epiderme externa (Fig. 13B). Diferentemente do que foi visto aos 10 DAP, a epiderme externa apresenta células alongadas formando uma paliçada. Analisou-se, portanto, as camadas de células subjacentes à epiderme (região distal) e adjacentes a cavidade central (região proximal) (Fig. 13B).

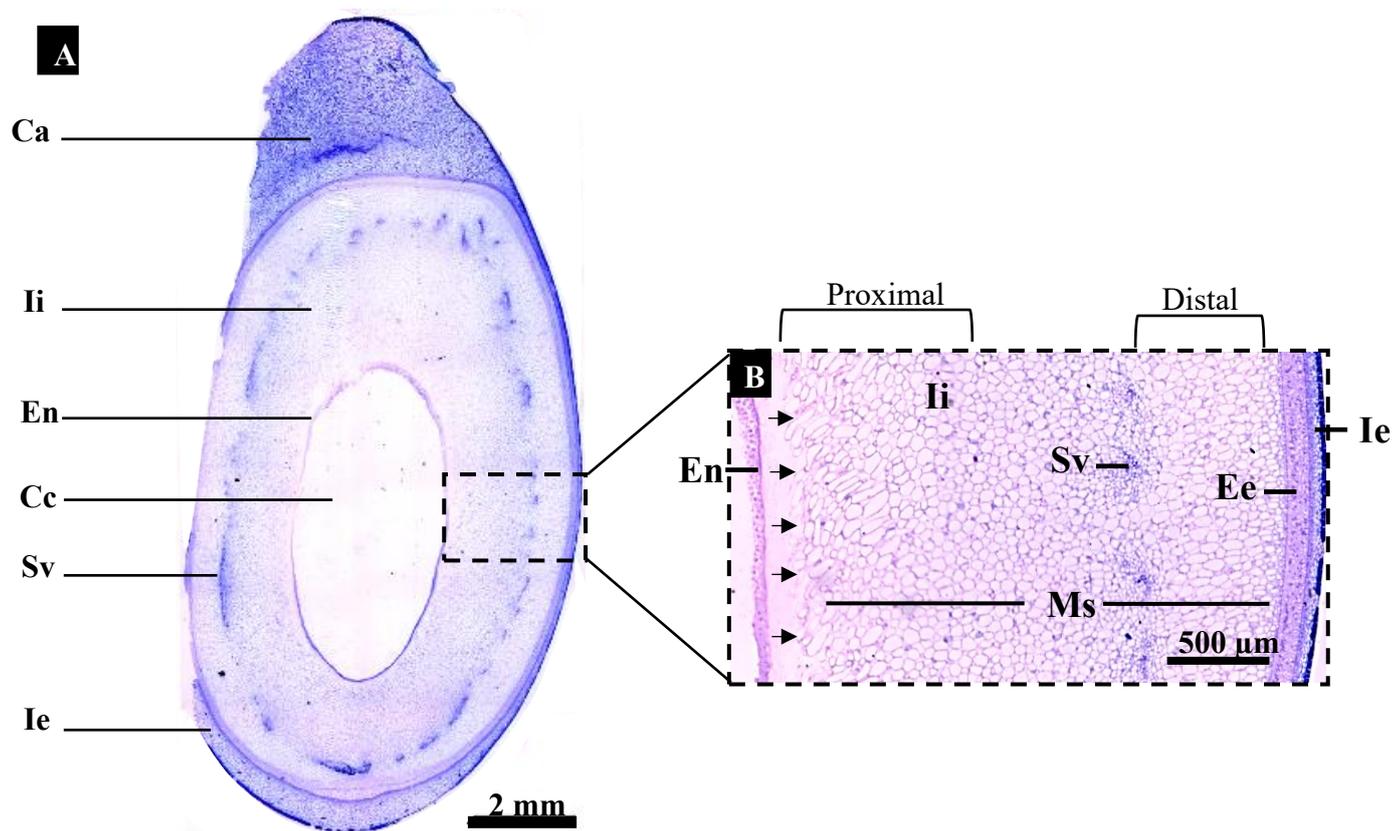


Figura 13. Anatomia de sementes de *J. curcas*, com 25 dias após a polinização (DAP). (A) Secção longitudinal mostrando os tecidos que constituem a semente com 25 DAP. (B) Ampliação do integumento interno mostrando a localização das células estudadas na análise de microscopia eletrônica de transmissão. Observa-se a ausência da epiderme interna do integumento interno e a presença de uma fina camada de endosperma. Setas indicam células lisadas. Legenda: Ca, carúncula; Cc, cavidade central; Ee, epiderme externa; En, endosperma; Ie, integumento externo; Ii, integumento interno; Ms, mesofilo; Sv, sistema vascular.

Nas células localizadas na região distal observou-se pouco citoplasma, no entanto, organelas tais como: mitocôndria, plastídios, peroxissomos e núcleo lobado estão presentes na periferia das células (Fig. 14A). Nas micrografias com maior aumento (Fig. 14B, C e D), evidenciou-se plastídios com sistema de membranas internas em processo de degradação bem como, mitocôndrias com cristas irregulares e membranas externas deformadas. Adicionalmente, apenas neste estágio foi possível identificar a presença dos peroxissomos com núcleo paracrystalino bem formado (Fig. 14B). Nota-se também retículo periplastidial rugoso flanqueando os plastídios, plasmodesmas (Fig. 14B e C) e cisternas de retículo endoplasmático rugoso dilatadas dispersos no citosol (Fig. 14B). Nas células das camadas celulares adjacentes a cavidade central, observou-se o acúmulo de vesículas, sempre próximas a membrana plasmática, além de organelas deformadas (Fig. 15A e C). Os plastídios, mitocôndrias e peroxissomos apresentaram-se disformes e com sinais de ruptura (Fig. 15B, C e E). Finalmente, identificou-se o rompimento da membrana plasmática e da parede celular (Fig. 15C e D).

Diferentemente do óvulo e dos demais estágios (5 e 10 DAP), a análise ultraestrutural do ii das sementes com 25 DAP mostrou células quase sem conteúdo citoplasmático, além de, mitocôndrias, plastídios e peroxissomos com sinais de degradação e localizados na periferia das células. A ruptura da membrana plasmática e parede celular ocorreu exclusivamente nas células adjacentes a cavidade central.

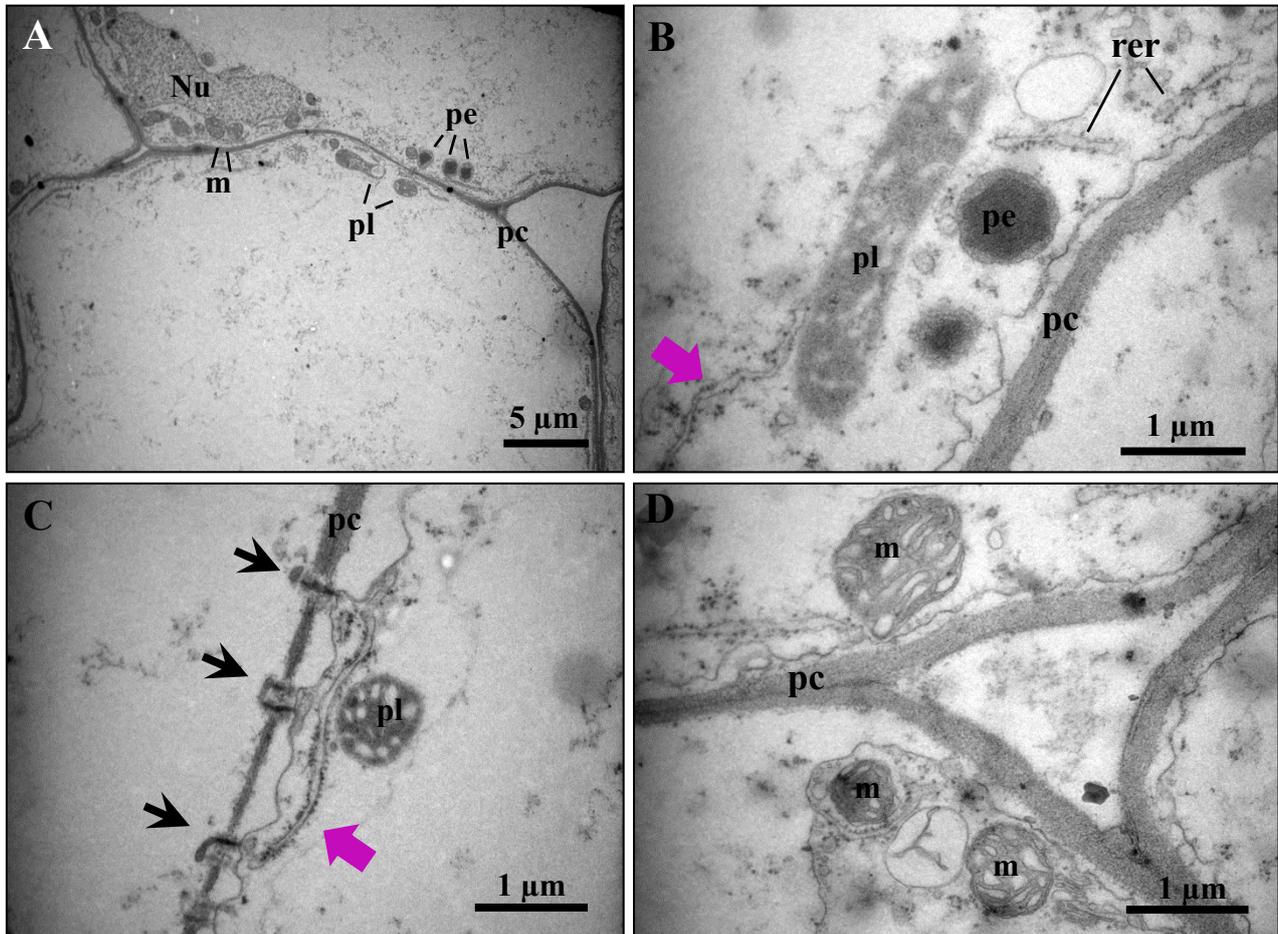


Figura 14. Ultraestrutura da região distal do integumento do interno de sementes de *J. curcas* com 25 dias após a polinização (DAP). (A) Visão geral da célula com muito pouco citoplasma e organelas dispostas na periferia. (B) Peroxissomos e retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas. (C) Plasmodesmas e plastídio com retículo periplastidial. (D) Mitocôndrias com cristas irregulares. Legenda: m, mitocôndria; p, plastoglobule; pe, peroxissomos; pc, parede celular; pl, plastídio; v, vacúolo; seta roxa, retículo periplastidial; seta preta, plasmodesmas.

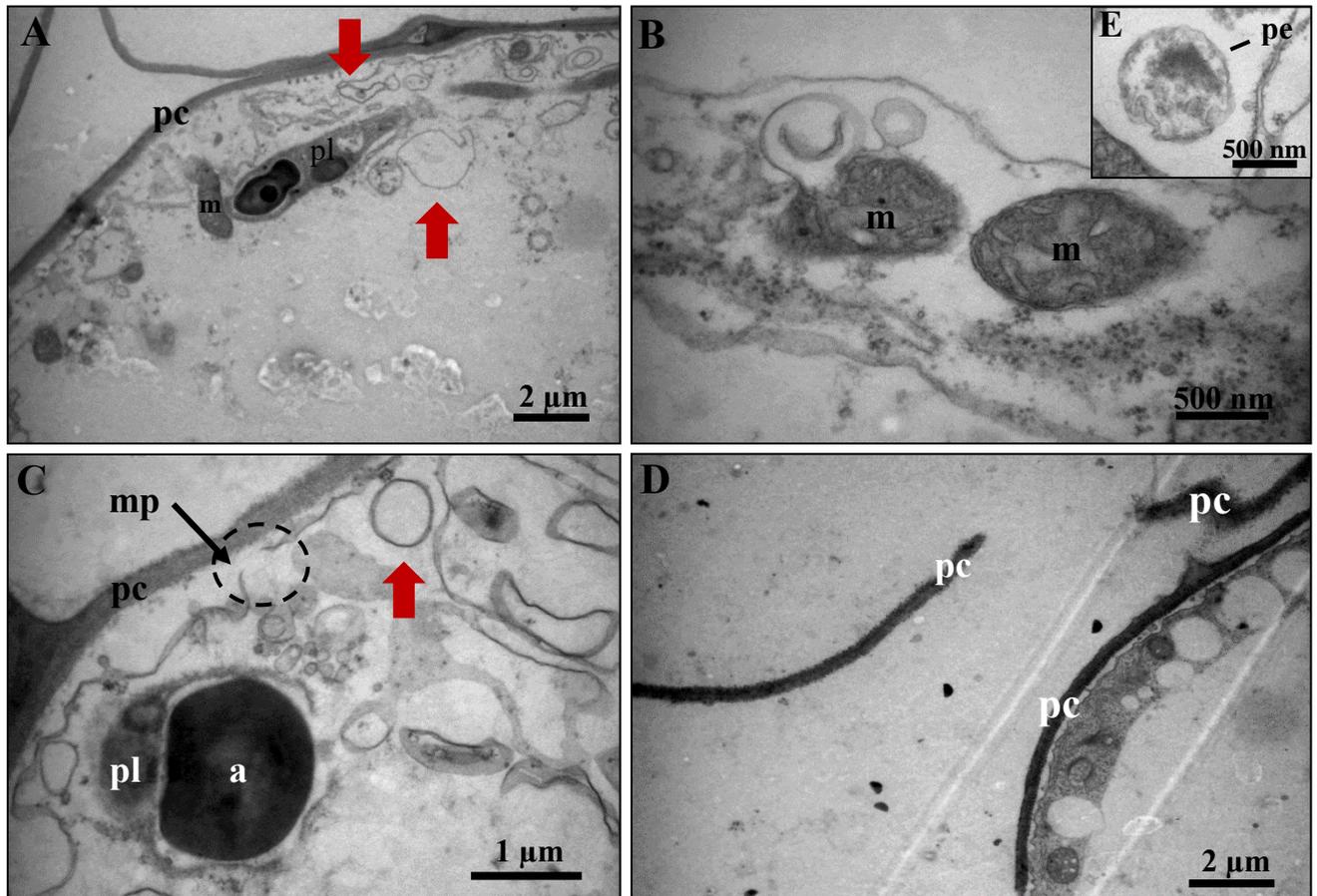


Figura 15. Ultraestrutura da região proximal do integumento interno de sementes de *J. curcas* com 25 dias após a polinização (DAP). **(A)** Visão geral da células com organelas deformadas na próximas a parede celular. **(B)** Mitocôndrias com sinais de degradação. **(C)** Plastídio com membrana circundante rompida e ruptura da membrana plasmática. **(D)** Ruptura da parede celular. **(E)** Peroxossomo com sinais de degradação, barra: 500 nm. Legenda: a, amido; m, mitocôndria; mp, membrana plasmática; pe, peroxissomo; pc, parede celular; pl, plastídio; seta vermelha, membrana e vesículas.

4.1.5 Mudanças ultraestruturais das mitocôndrias em células do integumento interno de *J. curcas*

As mudanças ultraestruturais das mitocôndrias foram acompanhadas por MET no integumento interno do óvulo e de sementes em desenvolvimento (5, 10 e 25 DAP) de *J. curcas*. Observou-se principalmente as diferenças quanto à forma e o diâmetro dessas organelas à medida que o processo de degeneração das células progredia.

De modo geral, as mitocôndrias presentes no integumento interno do óvulo apresentaram forma esférica com poucas, mas, bem evidentes, cristas no seu lúmen (Fig. 16A). Estas organelas apresentaram matriz elétron-densa envolvida por uma dupla membrana visível. Aos 5 DAP, a grande diferença está na diminuição da elétron-densidade da matriz mitocondrial, muito embora, a forma e o tamanho em ambos os estágios pareça muito similar (Fig. 16B). No integumento interno de sementes com 10 DAP e 25 DAP, observou-se mitocôndrias aparentemente maiores que os estágios anteriores (Fig. 16C e D), e aos 25 DAP observou-se a dilatação das cristas mitocondriais e da membrana que envolve esta organela. Portanto, observou-se modificações aparentes na ultraestrutura das mitocôndrias, especialmente, quanto a forma que variou de esférica a alongadas. Além das cristas e membranas mitocondriais dilatadas.

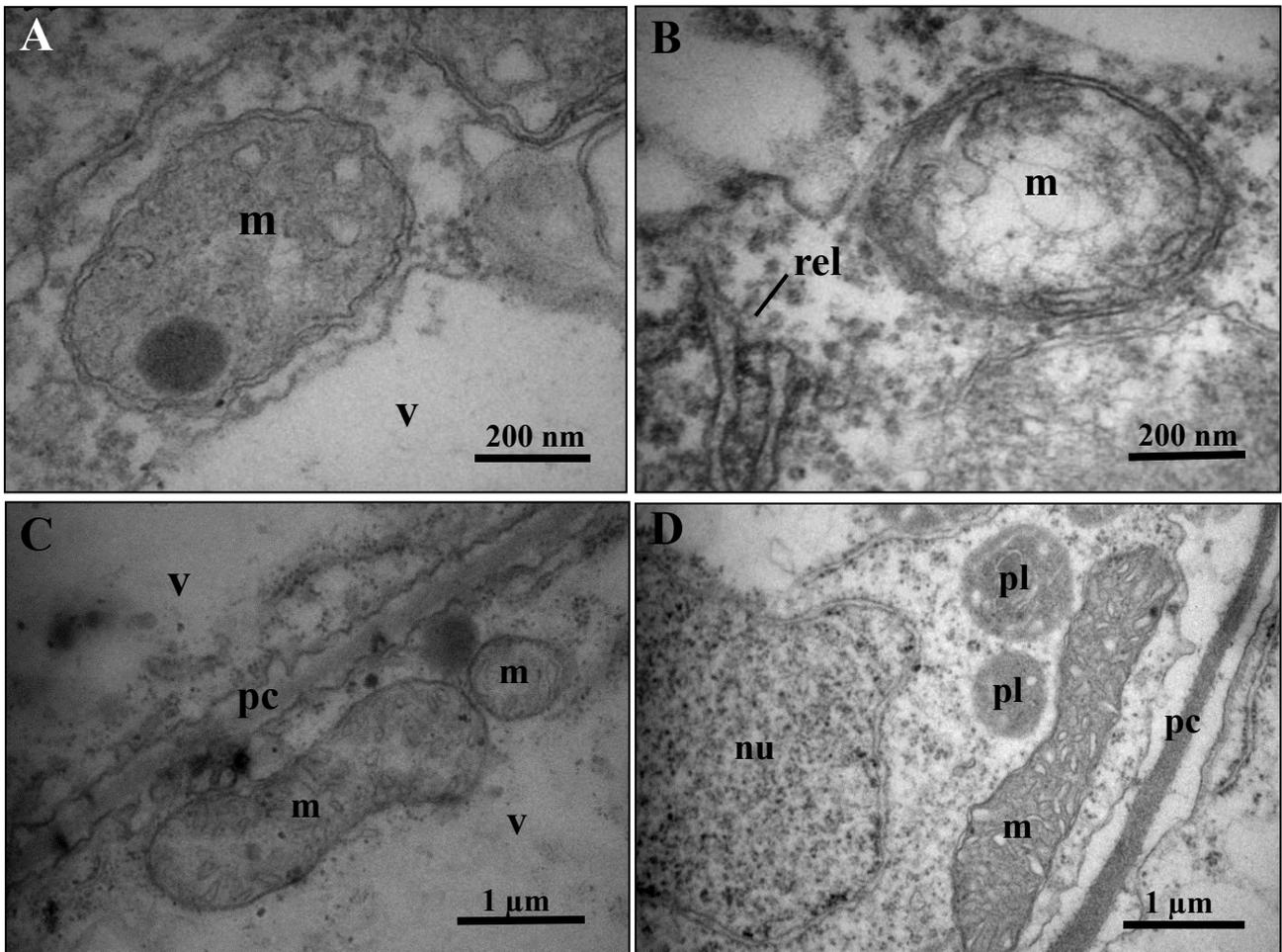


Figura 16. Ultraestrutura das mitocôndrias do integumento interno do óvulo e de sementes em desenvolvimento de *J. curcas*. (A) Mitocôndrias do integumento interno do óvulo. (B) 5 DAP. (C) 10 DAP. (D) 25 DAP. Legenda: nu, núcleo; pl, plastídio; m, mitocôndria; pc, parede celular; v, vacúolo; rel, retículo endoplasmático liso.

4.1.6 Ultraestrutura da transição de plastídios a gerontoplastos no integumento interno de J. curcas

As mudanças na ultraestrutura dos plastídios também foram estudadas através da MET. Neste caso observou-se as mudanças ao longo do integumento interno dos estágios avaliados (óvulo e sementes com 5, 10 e 25 DAP), como demonstrado nas figuras 17A, E e 18A, D.

No óvulo, os plastídios apresentaram, em sua maioria, grãos de amido mergulhados no estroma (Fig. 17B-D). Adicionalmente, observou-se uma diferenciação na ultraestrutura dessa organela ao longo do integumento interno. Os plastídios encontrados nas células abaixo da epiderme externa apresentaram forma esférica com estroma denso (Fig. 17B). No entanto, na camada mediana constatou-se plastídios com sistema de endomembranas bem formado e plastoglóbulos dispersos no seu interior (Fig. 17C), semelhante a ultraestrutura que foi notada destas organelas presentes nas células adjacentes a cavidade central, muito embora, com ausência de plastoglóbulos (Fig. 17D). Além disso, em ambas as regiões os plastídios apresentaram formas ameboidais.

De maneira geral, as características ultraestruturais destas organelas no integumento interno de sementes com 5 DAP foram similares ao descrito anteriormente (Fig. 17F-H), contudo, grande parte dos plastídios deste tecido apresentaram forma esférica. Ademais, aos 10 DAP observou-se plastídios com sistema de membranas internas bem formado na região distal do integumento interno (Fig. 18B), entretanto, estas organelas já apresentam sinais de degradação na porção proximal do tecido, marcadamente pela dilatação destas membranas (Fig. 18C).

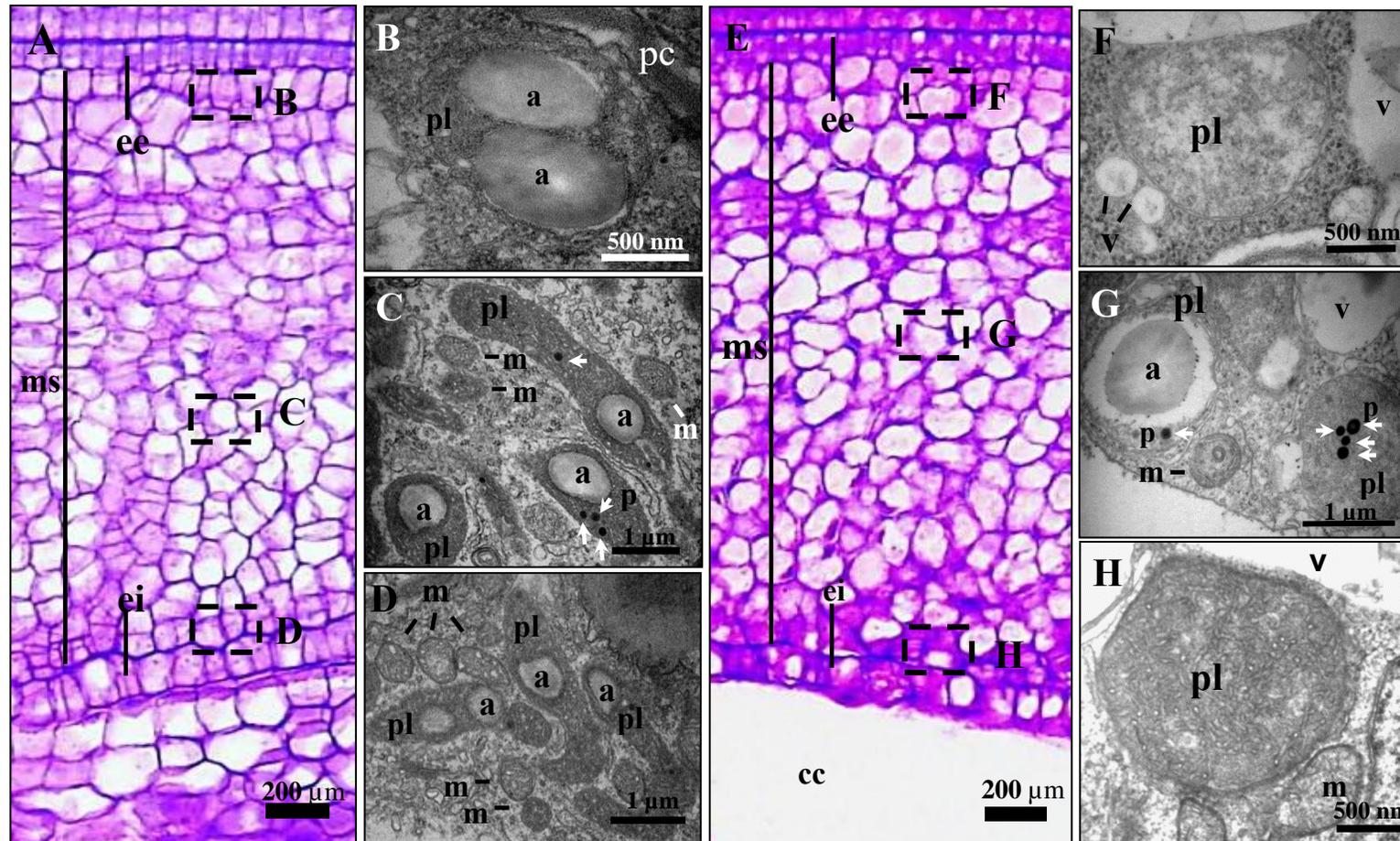


Figura 17. Ultraestrutura dos plastídios do integumento interno do óvulo e de sementes em desenvolvimento de *J. curcas* com 5 dias após a polinização (DAP). (A) e (E) Anatomia do integumento interno do óvulo e sementes com 5 DAP indicando as localizações estudadas por microscopia eletrônica de transmissão. (B), (C) e (D) Plastídios observados nas células abaixo da epiderme externa, região mediana e adjacente a cavidade central do óvulo, respectivamente. (F), (G) e (H) Plastídios observados nas células abaixo da epiderme externa, região mediana e adjacente a cavidade central de sementes com 5 DAP, respectivamente. Legenda: a, amido; cc, cavidade central; ee, epiderme externa; ei, epiderme interna; pl, plastídio; m, mitocôndria; ms, mesofilo; pc, parede celular; p, plastoglobule; v, vacúolo.

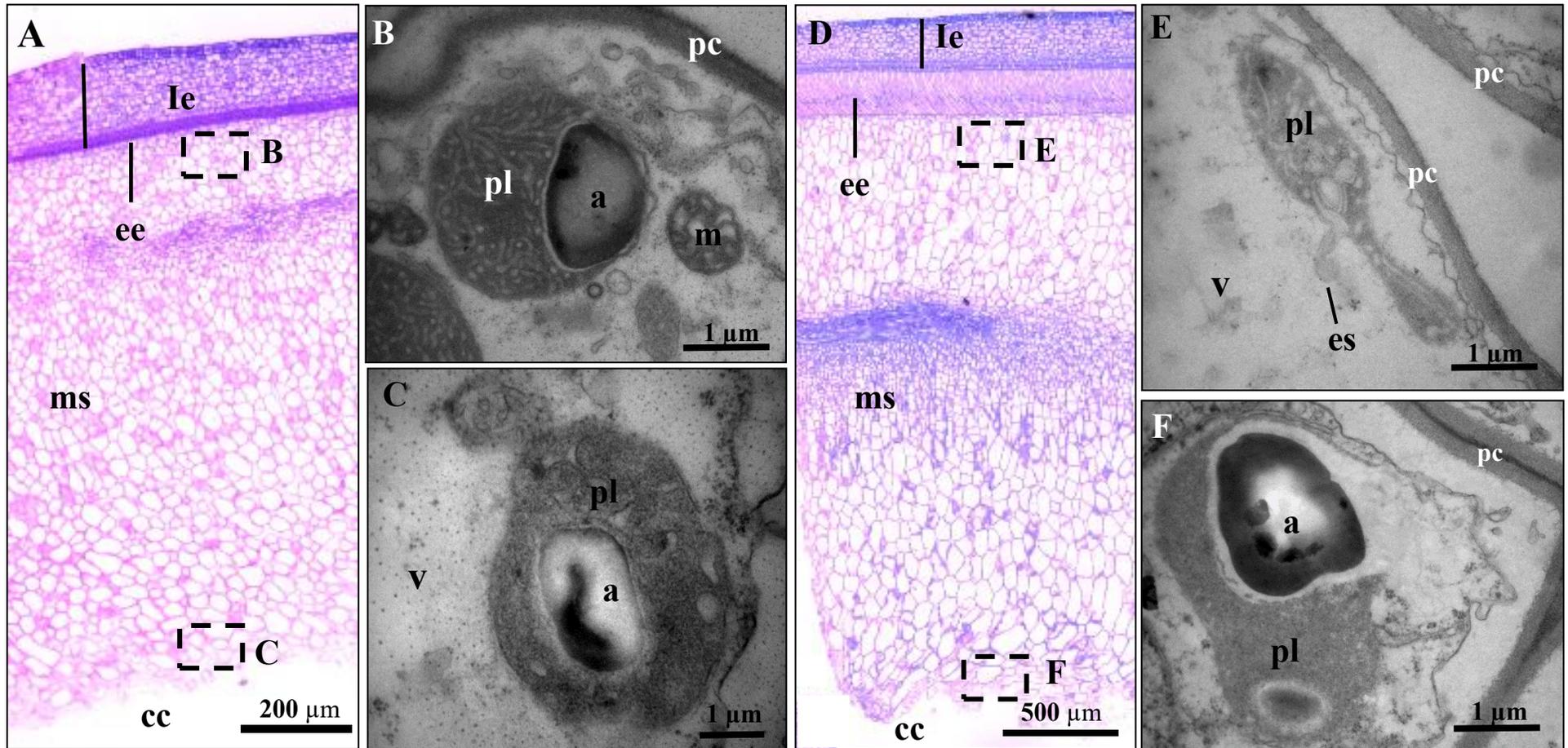


Figura 18. Ultraestrutura dos plastídios do integumento interno de sementes em desenvolvimento de *J. curcas* com 10 e 25 dias após a polinização (DAP). (A) e (D) Anatomia do integumento interno de sementes com 10 e 25 DAP indicando as localizações estudadas por MET. (B) e (C) Plastídios observados nas células abaixo da epiderme externa (região distal) e adjacente a cavidade central (região proximal) de sementes com 10 DAP, respectivamente. (E) e (F) Plastídios observados nas células da região distal e região proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP, respectivamente. Legenda: a, amido; cc, cavidade central; ee, epiderme externa; es, estrômulo; m, mitocôndria; ms, mesofilo; pc, parede celular; pl, plastídio; v, vacúolo.

No último estágio analisado (25 DAP), essas características são bem mais evidentes (Fig. 18E e F), ou seja, na região distal gerontoplastos já com membranas internas dilatadas e estrômulos, e por fim observou-se ausência de endomembranas e ruptura do seu envoltório. É válido salientar que a grande parte dos gerontoplastos observados nas micrografias eletrônicas armazenavam grãos de amido no seu interior. Desse modo, durante o desenvolvimento do integumento interno, os plastídios parecem sofrer alterações morfológicas, especialmente quanto as membranas internas que surgem em células da região mediana e proximal do ii do óvulo e sementes aos 5 DAP. Aos 10 e 25 DAP essas membranas parecem dilatar progredindo até a degradação destas organelas.

4.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Analisou-se a expressão gênica de nove genes alvo, incluindo sete hidrolases relacionadas à MCP (arabinofuranosidase, glucanase, peptidase cisteínica com cauda RDEL, peptidase aspártica, peptidase cisteínica com cauda KDEL, peptidase serínica e subtilisina) e dois inibidores de peptidases (inibidor de peptidase cisteínica e serpina) no integumento interno do óvulo e sementes com 5, 10 e 25 (região distal e proximal). A especificidade de cada iniciador foi verificada pela presença de apenas um pico na curva de fusão (Fig. 19). Para o cálculo de expressão relativa do óvulo e sementes com 5 e 10 DAP utilizou-se como calibrador o óvulo e para as sementes com 25 DAP utilizou-se a região distal como calibrador.

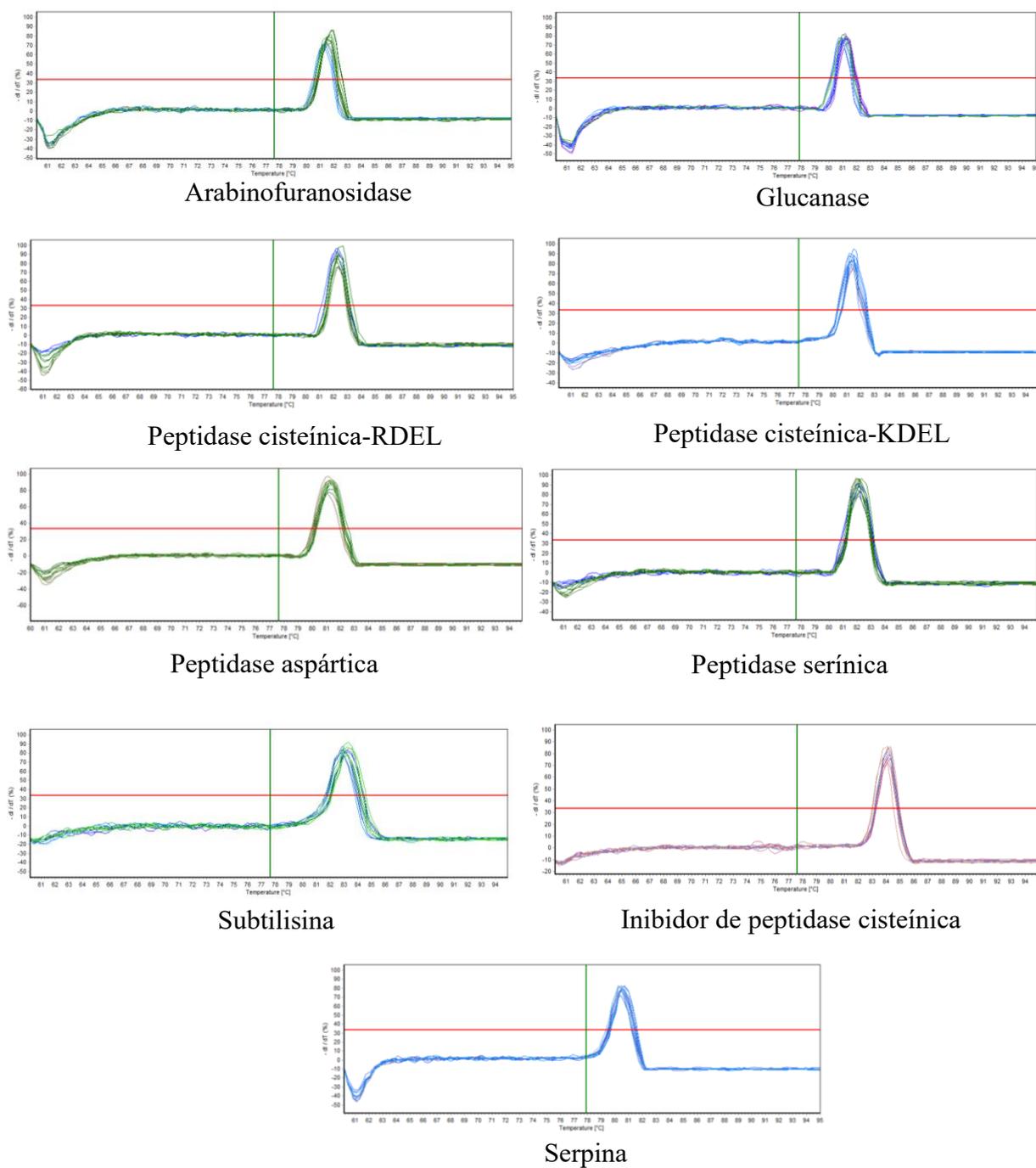


Figura 19. Curva de fusão dos genes alvos utilizados na análise de expressão relativa do integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento (5, 10 e 25 DAP) de *J. curcas*.

4.2.1 *Hidrolases de parede celular*

Avaliou-se a expressão gênica da arabinofuranosidase e glucanase, ambas hidrolases que catalisam a modificação e/ou degradação da parede celular. Em relação ao padrão de expressão para a arabinofuranosidase, observa-se que os níveis de transcritos no integumento interno do óvulo não diferiu estatisticamente ao ser comparado com 5 e 10 DAP. (Fig. 20A). Similarmente, a expressão relativa do gene que codifica para glucanase no ii também não diferiu estatisticamente entre os estágios estudados (Fig. 20C). Aos 25 DAP, a região proximal do integumento interno apresentou níveis de expressão 28 e 5 vezes maior para arabinofuranosidase e glucanase, respectivamente, quando comparado a porção distal da estrutura estudada (Fig. 20B e D).

4.2.2 *Peptidases*

Das hidrolases estudadas, cinco delas pertencem a classe das peptidases: peptidase cisteínica com cauda RDEL (Cis-RDEL), peptidase aspártica, peptidase cisteínica com cauda KDEL (Cis-KDEL), peptidase serínica e subtilisina.

A expressão relativa de Cis-RDEL não diferiu estatisticamente no integumento interno do óvulo e sementes aos 5 e 10 DAP (Fig. 21A). No entanto, aos 25 DAP a região proximal do ii expressou, aproximadamente, 5 vezes mais este transcrito do que na porção distal (Fig 21B). O padrão de expressão da peptidase aspártica também não diferiu estatisticamente entre os estágios iniciais avaliados (5 e 10 DAP) quando comparado ao calibrador (óvulo). Ao comparar a expressão desta peptidase entre as regiões do ii (distal e proximal) não se observou diferença significativa.

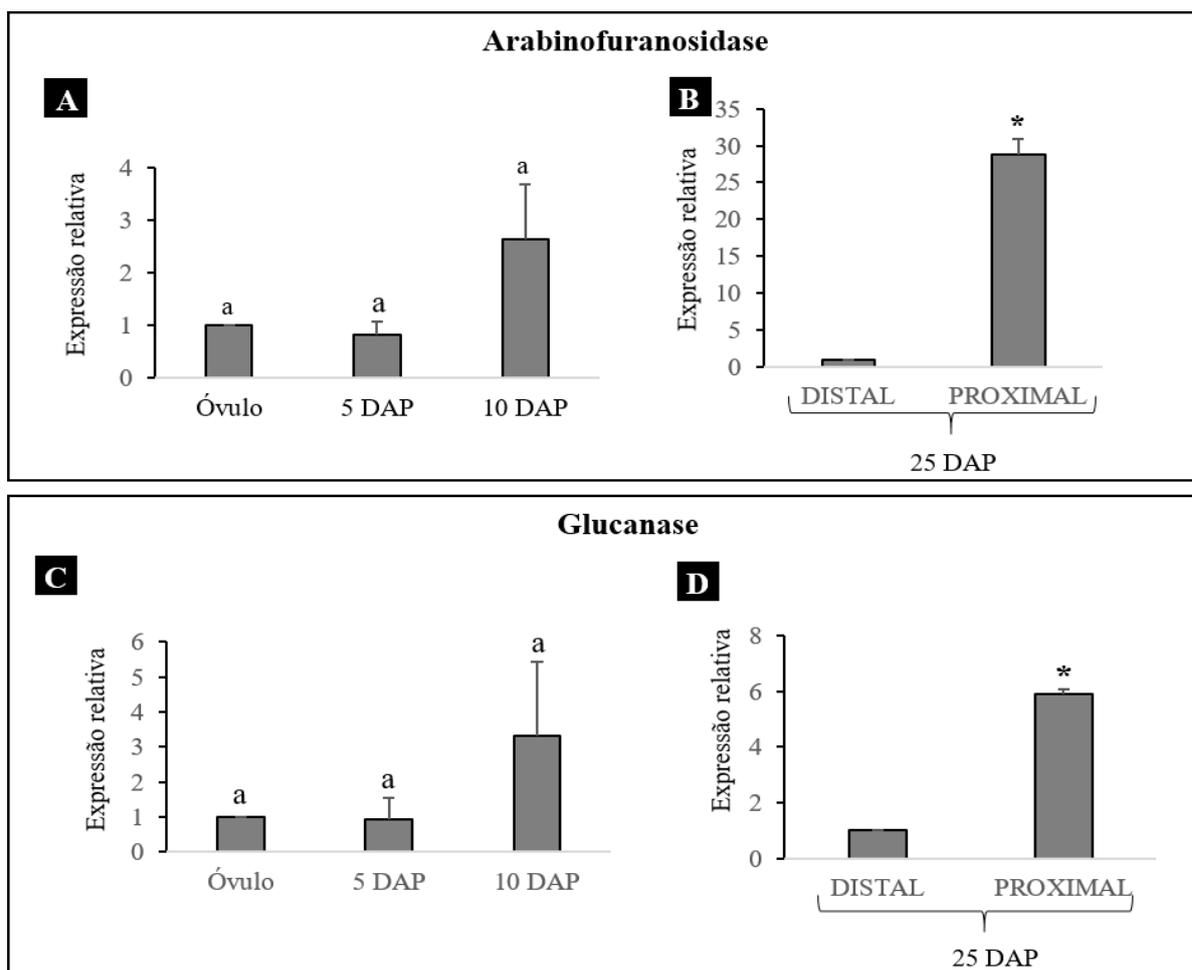


Figura 20. Expressão relativa da arabinofuranosidase e glucanase no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de *J. curcas* (5, 10 e 25 DAP). **(A) e (B)** Expressão relativa da arabinofuranosidase no integumento interno óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. **(C) e (D)** Expressão relativa da glucanase no óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. Em (A) e (C) utilizou-se como calibrador o óvulo; Em (B) e (D) utilizou-se como calibrador a região distal.

Em (A) e (B) barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Em (B) e (D) * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student. (ns) indica que não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

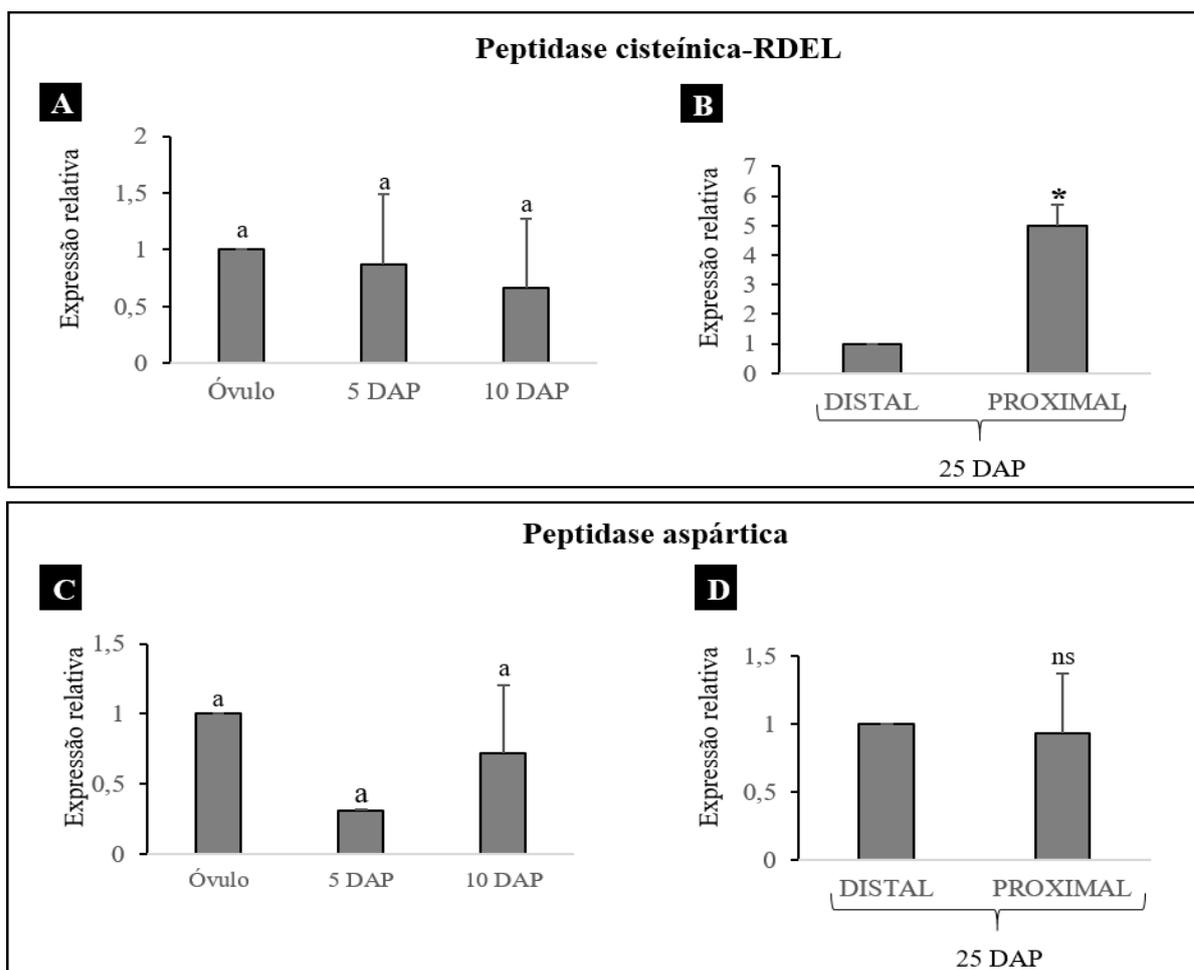


Figura 21. Expressão relativa da peptidase cisteínica com cauda RDEL e peptidase aspártica no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de *J. curcas* (5, 10 e 25 DAP). **(A)** e **(B)** Expressão relativa da cisteínica com cauda RDEL no óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. **(C)** e **(D)** Expressão relativa da peptidase aspártica no óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. Em **(A)** e **(C)** utilizou-se como calibrador o óvulo; Em **(B)** e **(D)** utilizou-se como calibrador a região distal.

Em **(A)** e **(B)** barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Em **(B)** e **(D)** * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

(ns) indica que não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

Os transcritos que codificam para a peptidase cisteínica com cauda KDEL, armazenada nos ricinossomos (Fig. 22B e D) foram 163 vezes mais expresso no integumento interno de sementes com 10 DAP (Fig. 22A) ao ser comparado com o óvulo. Adicionalmente, aos 25 DAP observa-se que o nível de expressão relativa desta enzima na região proximal do integumento interno é de aproximadamente 169 vezes mais que na região distal (Fig. 22C). A expressão relativa dos genes que codificam para a peptidase serínica e a subtilisina no ii de sementes com 10 DAP foi 5 e 14 vezes maior, respectivamente, em relação ao observado no óvulo (Fig. 23A e C). Além disso, na região proximal do ii de sementes com 25 DAP a expressão gênica da peptidase serínica foi 20 vezes maior do que na região distal (Fig. 23B). Notou-se grande diferença no nível de expressão dos transcritos da subtilisina entre ambas porções do ii de sementes com 25 DAP onde, a região proximal expressou 244 vezes mais que a região distal (Fig. 23D).

4.2.3 Inibidores de peptidases

Avaliou-se também a expressão relativa de dois inibidores de peptidases, o inibidor de peptidase cisteínica (Fig. 24A e B) e a serpina (Fig. 24C e D). Em ambos inibidores de peptidases, o padrão de expressão no integumento interno dos três primeiros estágios avaliados (óvulo e sementes com 5 e 10 DAP) não diferiu estatisticamente. A expressão dos transcritos para o inibidor de peptidase cisteínica foi, aproximadamente, 3 vezes maior na porção proximal do ii quando comparado a região distal da mesma estrutura. Diferentemente, do observado para a serpina, onde, não houve diferença estatística para ambas porções do tecido analisado.

Peptidase cisteínica-KDEL

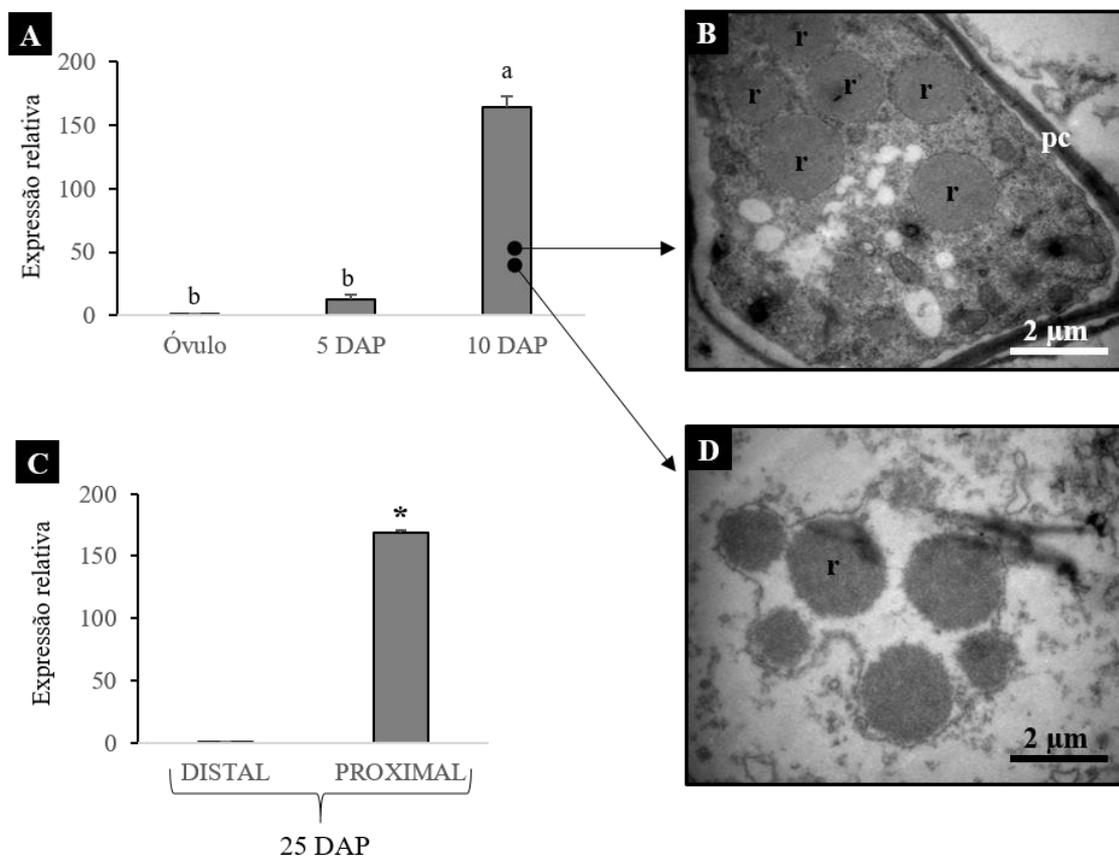


Figura 22. Expressão relativa da peptidase cisteínica com cauda KDEL no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de *J. curcas* (5, 10 e 25 DAP) e ultraestrutura dos ricinossomos. **(A)** e **(C)** Expressão relativa da cisteínica com cauda RDEL no óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. **(B)** e **(D)** Ultraestrutura dos ricinossomos observados no integumento interno de sementes com 10 DAP. Legenda: r, ricinossomos. Em (A) utilizou-se como calibrador o óvulo; Em (C) utilizou-se como calibrador a região distal.

Em (A) barras seguidas de mesma letra não diferem entre pelo teste de Tukey 5%

Em (C) * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

(ns) indica que não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

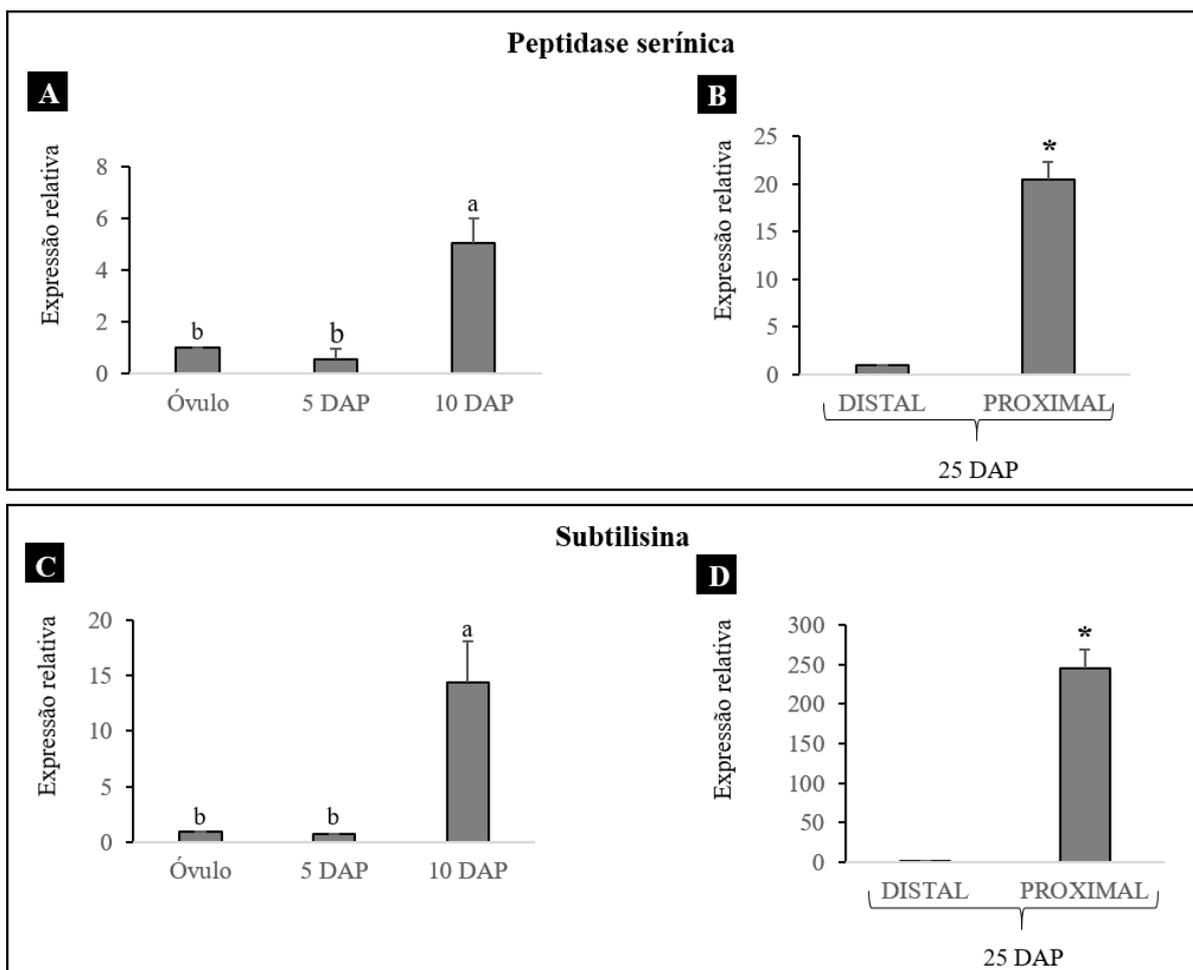


Figura 23. Expressão relativa da peptidase serínica e subtilisina no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de *J. curcas* (5, 10 e 25 DAP). **(A) e (B)** Expressão relativa da peptidase serínica no óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. **(C) e (D)** Expressão relativa da subtilisina no óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. Em (A) e (C) utilizou-se como calibrador o óvulo; Em (B) e (D) utilizou-se como calibrador a região distal.

Em (A) e (B) barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Em (B) e (D) * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

(ns) indica que não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

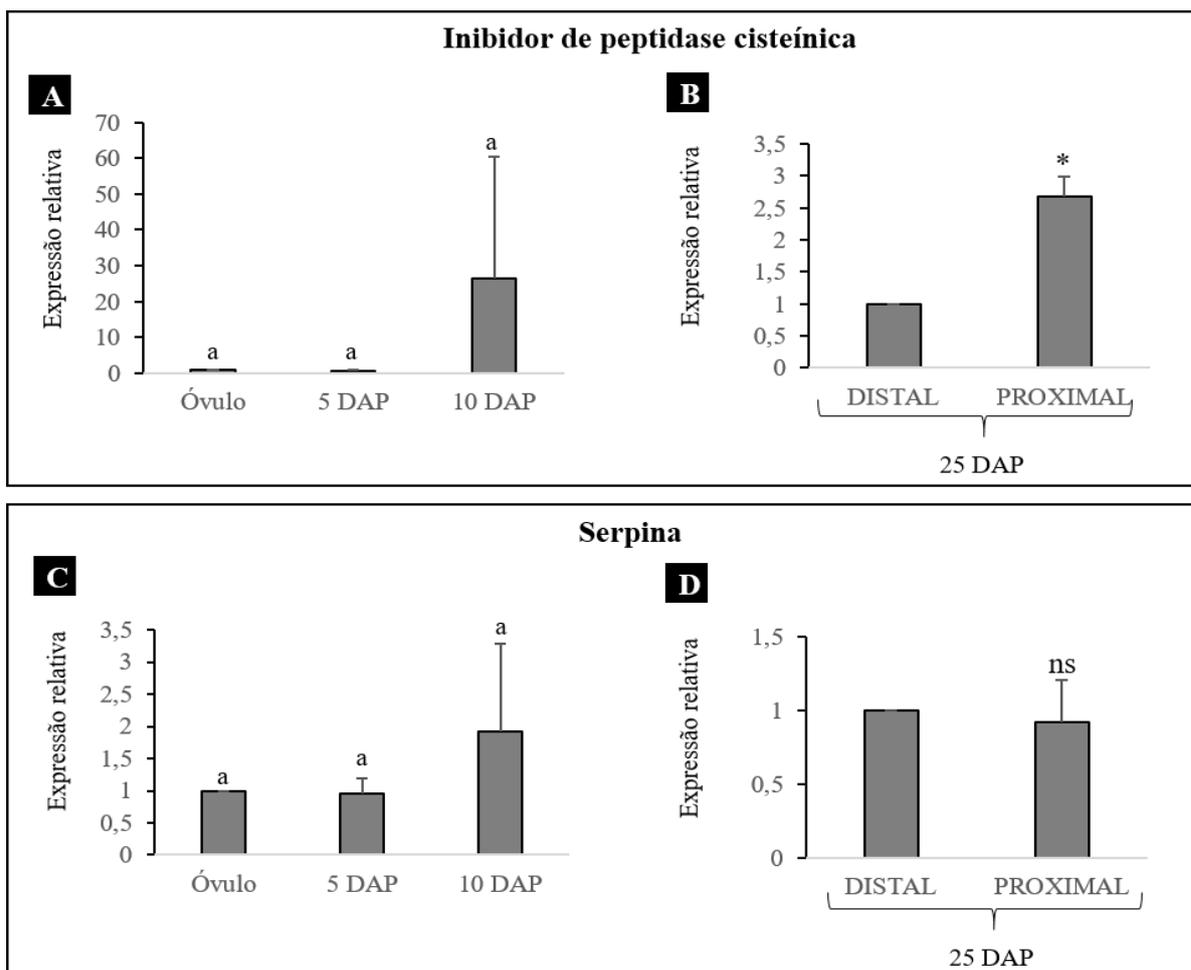


Figura 24. Expressão relativa do inibidor de peptidase cisteínica e serpin no integumento interno do óvulo e sementes em desenvolvimento de *J. curcas* (5, 10 e 25 DAP). (A) e (B) Expressão relativa do inibidor de cisteína peptidase no óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. (C) e (D) Expressão relativa da serpin no óvulo e em sementes com 5 e 10 DAP e nas regiões distal e proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP. Em (A) e (C) utilizou-se como calibrador o óvulo; Em (B) e (D) utilizou-se como calibrador a região distal.

Em (A) e (B) barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Em (B) e (D) * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

(ns) indica que não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias pelo teste t de Student.

5. DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO INICIAL DO INTEGUMENTO INTERNO DE SEMENTES DE *J. curcas*

Características comumente observadas em células em processo de diferenciação como núcleo central com nucléolo evidente, citoplasma denso e rico em organelas estão presentes nas células localizadas nas camadas imediatamente abaixo da epiderme externa do integumento interno do óvulo e sementes com 5 DAP. Aspectos similares também foram observados no início da formação do revestimento das sementes de *Juglans regia* L. (WU, LIU e SILVA, 2009).

Por outro lado, notou-se a progressiva expansão das células ao longo do mesofilo. Desse modo, os resultados mostraram que as células do ii do óvulo e de sementes com 5 DAP localizadas adjacentes à epiderme externa possuem vacuoma composto por vacúolos pequenos, enquanto que, nas camadas mais abaixo, verificou-se o inverso, a presença de vacúolos maiores ocupando a região central das células. Sugere-se, portanto a ocorrência da fragmentação do tonoplasto desses pequenos vacúolos preexistentes que se fundem para a formação de um único e grande vacúolo que, eventualmente, restringe o citoplasma e as organelas à periferia das células. Esse comportamento foi descrito por van Doorn, Kirasak e Ketsa (2015) e Ni *et al.* (2014) em células do mesofilo de sépalas de *Dendrobium* e na formação de aerênquima em folhas de *Typha angustifolia*, respectivamente. Todas essas características indicam a maturação das células e conseqüente desenvolvimento do ii nas sementes de *J. curcas*.

A presença de plasmodesmas e retículo endoplasmático, principalmente o rugoso nas células do ii do óvulo e também de sementes aos 5 DAP indicam metabolismo celular ativo com síntese de proteínas e lipídios e transferência de substâncias de uma célula a outra pelo transporte via simplasto (WU, LIU e SILVA, 2009).

Células do integumento interno do óvulo apresentaram invaginações da membrana plasmática, preenchidas por vesículas e material elétron denso, que aparentemente se projetam para o interior dos vacúolos e provavelmente, adentram totalmente para o interior destas organelas onde são digeridas. O aparecimento dessas estruturas parece ser comum em células imaturas de *Vinca rosea* L. e aumentam em volume durante a vacuolização (MAHLBERG, OLSON E WALKINSHAW, 1971). An *et al.* (2006) estudando células de folhas de *Hordeum vulgare* L. observaram que essas vesículas podem ser engolfadas pelo vacúolo para posterior degradação como parte do mecanismo de endocitose, visando balancear materiais de membrana na secreção mediada por vesículas.

As células vegetais possuem um extenso conjunto de membranas intracelulares, que juntos compõem o sistema de endomembranas, formado pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Este último, por sua vez, está envolvido com o armazenamento, transformação e destinação de substâncias produzidas na síntese celular, inclusive na síntese de polissacarídeos destinados a parede celular. No integumento interno de sementes com 5 DAP o complexo de Golgi é formado por vários dictiosomos, com mais vesículas secretoras adjacentes, tanto do lado *cis* quanto *trans*, se comparado ao óvulo. Isso sugere uma intensa atividade do Golgi uma vez que essas vesículas podem estar associadas à proteínas transportadas do retículo endoplasmático para processamento no complexo de Golgi com posterior liberação para seus eventuais destinos (EVERT, 2006; MATHESON, HANTON E BRANDIZZI, 2006; SILVA *et al.*, 2004). Além das proteínas, os lipídios e polissacarídeos (MACHADO *et al.*, 2012) também passam por esse processamento, que ocorre, justamente, nas cisternas do Golgi partindo da face *cis* em direção a região *trans*, que atua como centro de triagem e distribuição. Portanto, essas observações indicam que as células do ii estão metabolicamente ativas, principalmente, em relação ao processo de divisão celular que é comumente observado neste estágio.

5.2 MODIFICAÇÕES NA ULTRAESTRUTURA DO INTEGUMENTO INTERNO DE SEMENTES EM DESENVOLVIMENTO DE *J. curcas* RELACIONADAS A MCP

Estudos anatômicos indicam que a MCP em células do integumento interno de sementes de *J. curcas* ocorre de maneira espacialmente gradual, iniciando nas células adjacentes a cavidade central progredindo em direção à epiderme externa desta estrutura. Aos 5 DAP um dos primeiros indícios observados de ocorrência de MCP foi o rompimento do tonoplasto, visto nas cinco camadas próximas a cavidade central, similarmente ao que foi observado por Gunawardena, Greenwood e Dengler (2004). Porém, em folhas senescentes, a ruptura da membrana vacuolar foi observada apenas nos estágios finais do processo de degradação (LIM, KIM e NAM, 2007). Hara-Nishimura e Hatsugai (2011) descrevem dois tipos de vacúolos: aqueles que acumulam grandes quantidades de proteínas de armazenamento e os chamados vacúolos líticos que contêm enzimas hidrolíticas que ao serem liberadas no citosol são responsáveis pela degradação de material celular. Estes últimos são comumente relacionados à MCP. Portanto, sugere-se que os vacúolos observados neste estudo sejam do tipo lítico, uma vez que foram observadas invaginações da membrana plasmática em direção a esses vacúolos bem como a presença de corpos multivesiculares dentro dos mesmos. Além disso, a ruptura do tonoplasto pode funcionar como um interruptor para o aparecimento dos sinais de ocorrência da degeneração celular (van DOORN e WOLTERING, 2005).

Células do integumento interno de sementes com 5, 10 e 25 DAP apresentaram núcleo disforme (lobado) e agregados de cromatina condensada no nucleoplasma, características comuns de MCP que também foram observados por Zhan *et al.* (2014) em células de raiz de *Arachis hypoganea* L. que estão em degeneração induzida por alumínio. De acordo com Domínguez e Cejudo (2012) a senescência e a reciclagem dos nutrientes são processos altamente regulados e requerem a expressão diferencial de uma gama de genes, desta forma, o núcleo é totalmente degradado apenas no estágio final da MCP.

Outro aspecto observado foi a presença de vesículas, também chamadas de corpos paramurais, localizadas no espaço periplasmático, nos estágios com 5 e 10 DAP. De acordo com Kamdee *et al.* (2015), essas vesículas podem ter duas funções: transporte de enzimas líticas que irão auxiliar na degradação da parede celular e estarem envolvidas na liberação de produtos da degradação celular. Algumas destas vesículas foram observadas dispostas no citoplasma e no interior dos vacúolos de células do integumento interno de sementes com 5 DAP. Battelli *et al.* (2011) indicam que a intensa formação de vesículas no citoplasma é responsável por sua diluição e consequente diminuição da sua elétron densidade característica observada, principalmente, nos estágios mais desenvolvidos (10 e 25 DAP). Por conseguinte, a translocação dessas vesículas para o interior dos vacúolos pode ter ocorrido devido aumento da permeabilidade do tonoplasto.

A degradação das organelas indica o avanço no processo de degeneração das células do ii de *J. curcas*. Contudo observou-se o acúmulo de amido no interior dos plastídios, especialmente, no ii de sementes aos 25 DAP. É sabido que o balanço entre a síntese e degradação de amido é fundamental para o fornecimento de fontes de carbono que irão ser utilizados em processos celulares importantes, divisão e crescimento. Sugere-se que umas das mais importantes enzimas que degradam o amido, a α -amilase, pode ser transportada para os plastídios pela via secretora do complexo de Golgi (KITAJIMA *et al.*, 2009) que também apresentaram sinais de degradação incluindo, diminuição do número de cisternas e vesículas secretadas. Indicando que pode haver uma possível relação entre a diminuição da secreção do Golgi e o aumento na deposição de amido nos plastídios. Hummel *et al.*, (2010) observaram um aumento significativo de amido no estroma dos plastídios de células de *Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow 2, ao promoverem a degradação do complexo de Golgi e, presumidamente bloquear o transporte da α -amilase para o interior dos plastídios.

Organelas com núcleo elétron denso e envolvida por uma membrana com ribossomos aderidos foram observadas em células da região proximal do ii de sementes aos 5 e, em maior número, aos 10 DAP. Estas organelas são denominadas de ricinossomos por terem sido primeiramente identificadas em endosperma de *Ricinus communis* L. (MOLLENHAUER e TOTTEN, 1970). Acredita-se que os ricinossomos são organelas derivadas de retículo endoplasmático e possuem um papel importante nos eventos de MCP por conter uma pro-cisteína endopeptidase KDEL. Todavia, no final do estágio de desintegração celular, ocorre o colapso do tonoplasto e acidificação do citoplasma, que por sua vez promove a ruptura da membrana dos ricinossomos e a liberação dessa enzima na sua forma ativa que atua no final do processamento dos componentes celulares (SENATORE, TROBACHER e GREENWOOD, 2009). Essas organelas também foram documentadas por Schmid, Simpson e Gietl (1999), Matsushima *et al.*, (2003), Greenwood, Helm e Gietl, (2005) e, recentemente por Trobacher *et al.* (2013) em diversas espécies vegetais como *A. thaliana* L., *Solanum lycopersicum* L., *R. communis* e agora em *J. curcas*.

Aos 10 DAP, verificou-se a invaginação da membrana plasmática em diversos pontos, como similarmente observado por Ni *et al.* (2015) no remodelamento de folhas de *Allium fistulosum* L. e por Gunawardena *et al.* (2001) na formação de aerênquima em raiz de *Zea mays* L., ambos os casos através de MCP. De acordo com Ni *et al.*, (2015), a invaginação da membrana plasmática dá origem aos vacúolos secundários preenchidos por vesículas e estruturas fibrilares e membranosas, todavia, esse material será degradado gradualmente.

Neste estudo, observou-se peroxissomos esféricos e com conteúdo paracristalino bem evidente. Peroxissomos são organelas delimitadas por uma única membrana capazes de responder a estímulos e alterações extracelulares alterando seu conteúdo enzimático e sua morfologia (DELILLE, ALVES E SCHRADER, 2009). Essas organelas contem, comumente, enzimas que catalisam as reações de oxidação, incluindo sistema de β -oxidação de ácidos

graxos e a catalase que protege as células de danos oxidativos causados, principalmente, pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KIM e HETTEMA, 2015). Além da atividade oxidativa dessa organela, Distefano *et al.*, (1997) observaram alta atividade endopeptidásica em folhas senescentes de ervilha, além disso, identificaram duas peptidases serínicas em peroxissomos purificados. Portanto, estas características podem sugerir que a presença evidente dos peroxissomos nas células do integumento interno de sementes com 25 DAP tem relação com os processos de degeneração do integumento interno, justamente por conter hidrolases em sua matriz, que podem atuar na degradação de proteínas dentro e fora dessas organelas (PALMA *et al.*, 2002). É importante destacar que os peroxissomos presentes na porção proximal do integumento interno de sementes com 25 DAP mostraram sinais de degradação, apresentando-se disforme e membrana circundante dilatada.

As características mais conspícuas observadas nos estágios mais avançados de MCP são a desintegração da membrana plasmática e a ruptura da parede celular acompanhada do extravasamento dos restos celulares (10 e 25 DAP). A ruptura da parede celular também é observada em folhas senescentes de *Nicotiana tabacum* L. (UZELAC *et al.*, 2016), assim como observado no processo de formação das cavidades secretoras (MARINHO, OLIVEIRA e TEIXEIRA, 2016; ZHOU *et al.*, 2014). Além disso, supõe-se que as vesículas que extravasam das células com paredes rompidas podem estar envolvidas com a captação e transporte de substâncias destinadas ao desenvolvimento do embrião e do endosperma. Tal aspecto foi observado por Johansson e Walles (1994) ao estudarem a anatomia e ultraestrutura do óvulo e sementes em desenvolvimento de *Vicia faba* L.

A ruptura do tonoplasto do vacúolo lítico foi acompanhada pelo aparecimento de núcleo lobado com agregados de cromatina, formação de espaços periplasmáticos preenchidos por corpos paramurais e acúmulo de amido nos plastídios foram observadas nas células localizadas em toda a estrutura. Ademais, aspectos ultraestruturais marcantes foram

observados durante a progressão da MCP, incluindo o aparecimento dos ricinossomos, invaginações da membrana plasmática e rompimento da parede e membrana plasmática foram notados exclusivamente em células próximas a cavidade central.

5.2.1 Aspectos ultraestruturais das mitocôndrias

Com base na análise ultraestrutural foi possível observar as mudanças na morfologia das mitocôndrias encontradas em células do integumento interno do óvulo e de sementes em desenvolvimento (5, 10 e 25 DAP) de *J. curcas*. De modo geral, observou-se variação na forma e diâmetro destas organelas à medida que o ii se desenvolve. Balk e Leaver (2001) esclarecem que as mudanças na morfologia das mitocôndrias podem estar relacionadas com a progressão da MCP, uma vez que estas organelas podem liberar e translocar citocromo c para o citosol. Por conseguinte, a liberação dessa proteína pode interferir na atividade da cadeia respiratória e, conseqüentemente, síntese de ATP. Adicionalmente, as mitocôndrias podem mediar a fragmentação da cromatina do núcleo de células de *A. thaliana* cultivadas em suspensão através da produção e liberação de endonucleases (BALK *et al.*, 2003), um evento marcante no desenvolvimento da MCP. Essas observações podem indicar que o núcleo e as mitocôndrias mantêm uma conexão durante a progressão da degradação celular e permanecem intactas até o final desse processo (DOMÍNGUEZ e CEJUDO, 2012; ZHAN *et al.*, 2014). Logo, observou-se ambas organelas disformes, porém, íntegras no integumento interno de sementes com 25 DAP que, dentre os estágios estudados está em processo de degradação celular mais avançado.

Selga, Selga e Pavila (2005) mostraram que a destruição mitocondrial no mesófilo de folhas durante a senescência de *S. cereale*, *C. sativus* e *P. sativum*, ocorreu, principalmente, por processos autofágicos, contrariamente ao que foi observado em nosso estudo, onde, presumidamente as cristas se dilatam e conseqüentemente as mitocôndrias se fragmentam

(Fig. 15B e 16D). Estas características também foram observadas em mitocôndrias de células que estão sofrendo MCP na formação de aerênquima de raízes de *Z. mays* (GUNAWARDENA *et al.*, 2001) e em cavidades secretoras em folhas de *Dictamnus dasycarpus* (ZHOU *et al.*, 2014) e pericarpo de *Triticum aestivum* L. (ZHOU *et al.*, 2009).

5.2.2 Ultraestrutura dos gerontoplastos do integumento interno de *J. curcas*

Os plastídios desempenham um papel fundamental no funcionamento celular por sintetizar e armazenar componentes químicos importantes para o funcionamento das células. Deste modo, analisou-se a ultraestrutura destas organelas no integumento de óvulo e sementes em desenvolvimento que estão sofrendo MCP.

Essas organelas estão presentes nas células do integumento interno de sementes em desenvolvimento de *J. curcas* e passam por uma transição de plastídios (óvulo) para gerontoplastos (25 DAP) em associação com diversas outras mudanças que ocorrem nas células com a progressão da MCP (SHAH *et al.*, 2016), similarmente ao observado em senescência foliar, onde ocorre a transição de cloroplastos a gerontoplastos (MULISCH e KRUPINSKA, 2013). Shah *et al.* (2016) discorrem sobre a proteômica dos gerontoplastos do ii em sementes aos 25 DAP, onde, identificou-se lipases, transportadores, proteínas envolvidas no metabolismo secundário e as peptidases.

Plastídios com sistema de membranas internas também foram observados em células de nectário extrafloral de *Hibiscus pernambucensis* (ROCHA e MACHADO, 2009) e em células de suspensor e embrião de espécies da família Crassulaceae (KOZIERADZKA-KISZKURNO e PŁACHNO, 2012). No entanto, a função destas endomembranas permanece desconhecida. Em nosso estudo, foram observadas também extensões tubulares denominadas de estrômulos, que são estruturas utilizadas para trocas de proteínas e pequenas moléculas (NATESAN, SULIVAN e GRAY, 2005), além de serem utilizados para interagir com outras

organelas celulares como núcleo, retículo endoplasmático e até mesmo membrana plasmática (KRUPINSKA *et al.*, 2012). Desse modo, Shah *et al.* (2016) propuseram que as hidrolases destinadas à degradação dos gerontoplastos do ii de sementes de *J. curcas*, são sintetizadas no retículo endoplasmático e transportadas para o interior destas organelas através das vesículas derivadas de estrômulos.

Gotículas de lipídios fortemente elétrons densas, denominadas de plastoglóbulos foram observadas no estroma de plastídios do integumento interno do óvulo e sementes de *J. curcas*. Essas estruturas estão associadas ao armazenamento e síntese de lipídios (LUNDQUIST *et al.*, 2012). Além disso, os plastoglóbulos estão associados a diferenciação dos plastídios, induzido por estresse ou estágio de desenvolvimento vegetal. Rottet, Besagni e Kessler (2015) elucidam que essas estruturas podem estar associadas a formação das membranas de tilacóides na biogênese de cloroplastos.

De modo geral, as primeiras mudanças morfológicas relacionadas a MCP durante o desenvolvimento do ii foram observadas no estágio de 5 DAP, incluindo, surgimento dos espaços periplasmáticos, aparecimento dos ricinossomos, e colapso do tonoplasto. A sequência do processo degradativo foi observada nos estágios mais avançados (10 e 25 DAP) com expansão do volume celular, acompanhado de citoplasma menos denso, presença de peroxissomos, núcleo lobado e cromatina condensada, invaginações e ruptura da membrana plasmática e, finalmente a ruptura da parede celular, além da transição de plastídios (óvulo) a gerontoplastos (25 DAP). A megaautofagia ou morte vacuolar baseia-se na ruptura do tonoplasto, em células que estão sofrendo MCP, resultando na liberação de hidrolases e degradação dos componentes celulares (van DOORN e PAPINI, 2013; van DOORN e WOLTERING, 2005) e tem sido reportado em outras investigações como, a MCP de células da raiz (DUAN *et al.*, 2010), senescência de nectário floral (GUI e LIU, 2014) e na formação de cavidades secretoras (ZHOU *et al.*, 2014). Portanto, podemos sugerir que a MCP sofrida

pelas células do integumento interno de *J. curcas* pode ser classificada como megautofagia, uma vez que, após a ruptura do tonoplasto houveram grandes transformações na ultraestrutura evidenciando a progressão da degeneração celular.

5.3 ATIVIDADE DE HIDROLASES RELACIONADAS A MCP NO INTEGUMENTO INTERNO DE ÓVULO E SEMENTES EM DESENVOLVIMENTO DE *J. curcas*

A análise da ultraestrutura das células do integumento interno do óvulo e de sementes em desenvolvimento (5, 10 e 25 DAP) de *J. curcas*, indica sinais evidentes da ocorrência de MCP a medida que a semente se desenvolve. É sabido que células que estão sofrendo MCP, possuem um processo ativo de catabolismo levando à degradação de macromoléculas, envolvendo a ação de várias enzimas hidrolíticas. Desse modo, avaliou-se a expressão relativa de sete hidrolases, incluindo aquelas relacionadas a degradação da parede celular, peptidases, e inibidores de peptidases. Essas proteínas foram identificadas na análise proteômica do integumento interno de sementes de *J. curcas* e, provavelmente, estão relacionadas com o processo de MCP (SOARES *et al.*, 2014).

5.3.1 Expressão relativa de hidrolases relacionadas a degradação da parede celular

A parede celular é constituída principalmente de hemicelulose na forma de arabinoxilanas, que por sua vez é degradada eficientemente pela alfa-L-arabinofuranosidase (JIA *et al.*, 2016), processo comum em células que estão sofrendo morte celular programada. No presente estudo observou-se que a expressão relativa do gene que codifica pra essa proteína não diferiu nos estágios iniciais, somente em sementes com 25 DAP (região proximal), características condizentes com o observado na ultraestrutura de ambos os estágios, ou seja, a ruptura da parede celular. Além disso, outras proteínas relacionadas a degradação e modificação da parede celular, tais como alfa-mannosidase lisossomal, pectinesterase, alfa- e

betaglucosidases, beta-xilosidases, alfa-galactosidases, dentre outras foram identificadas no integumento interno de sementes com 25 DAP (SOARES *et al.*, 2014).

Avaliou-se também a expressão relativa dos transcritos que codificam para a glucanase. Como já mencionado, a ultraestrutura mostra a ruptura de parede celular já aos 10 DAP e, presumidamente a atividade proteolítica da glucanase foi maior em comparação aos demais estágios (óvulo e 5 DAP), contudo a expressão relativa não diferiu. Aos 25 DAP, o nível de expressão dessa enzima foi superior na região proximal concordando com a ultraestrutura, onde apenas nessa região observou-se a ruptura da parede celular. Esta enzima está relacionada com o desenvolvimento da semente e tem elevada expressão no revestimento de sementes de *P. sativum* (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2012) e desempenham um papel importante no enfraquecimento do endosperma e da testa durante a germinação (DOGRA e SREENIVASULU, 2014), hidrolisando os componentes da parede celular.

5.3.2 Expressão relativa de peptidases e inibidores de peptidases

Diferentes padrões de expressão foram observados entre as duas peptidases cisteínicas estudadas. A expressão relativa dos genes que codificam para a Cis-KDEL e a Cis-RDEL foi superior na região distal do ii de sementes com 25 DAP, indicando atividade dessas enzimas. Rocha *et al.* (2013) avaliaram a expressão relativa destas peptidases cisteínicas no integumento interno e no endosperma de sementes em desenvolvimento de *J. curcas*. Esses autores demonstraram que, ambas as enzimas foram expressas, principalmente, a partir do estágio de 25 DAP onde o ii está em processo de MCP, entretanto, a expressão relativa de uma das peptidases cisteínicas no endosperma em formação pode estar relacionada ao processo de maturação das proteínas.

A análise ultraestrutural revelou que os ricinossomos estão presentes nas células do ii próximas a cavidade central de sementes com 5 e 10 DAP, sendo que neste último estágio

a presença desta organela foi significativa, inclusive com a formação de uma estrutura que se assemelha a agregados de núcleos dos ricinossomos envolvidos por uma única membrana. Além disso, aos 10 DAP grande parte das células, principalmente da região proximal do ii, não apresentam tonoplasto íntegro. Ao correlacionar os dados obtidos por meio de RT-qPCR e as características ultraestruturais sugere-se uma possível sequência de eventos relacionados a liberação e atuação desta enzima na MCP: inicialmente, o rompimento do tonoplasto e acidificação do citosol provocou a ruptura dos ricinossomos e finalmente a liberação e maturação da Cis-KDEL, que mostrou alto nível de expressão relativa aos 10 DAP. Ademais, não identificamos ricinossomos íntegros no integumento interno de sementes com 25 DAP, muito embora, notamos acentuada expressão dos transcritos para essa enzima na região proximal. Wan *et al.* (2002) identificaram uma peptidase cisteínica (*Bn CysPI*) que é expressa somente no ii de sementes de *Brassica napus* durante a ocorrência da morte celular programada. A Cis-KDEL, tem sido amplamente estudada em células que estão sofrendo MCP associada ao desenvolvimento de órgãos e tecidos ou a mecanismos de defesa (HÖWING *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2014). A sequência de aminoácidos que compõem a cauda KDEL, funciona como um sinal de retenção e acúmulo dessa enzima em endomembranas derivadas de retículo endoplasmático (TOYOOKA, OKAMOTO e MINAMIKAWA, 2000), denominadas de ricinossomos. De acordo com Battelli *et al.* (2014), a acidificação do citosol, provocada pela permeabilização do tonoplasto, promove a ruptura dos ricinossomos e maturação da Cis-KDEL.

Os maiores níveis de expressão dos transcritos que codificam para a peptidase serínica foram observados no ii de sementes com 10 e 25 DAP (região proximal), estágios onde não se observa a integridade da membrana dos vacúolos centrais. De acordo com Antão e Malcata (2005) células que estão sofrendo MCP, requerem o influxo de Ca^{2+} levando ao rompimento do tonoplasto e conseqüente liberação da Ser-EP no citoplasma onde ocorrerá a

proteólise. A peptidase serínica é uma enzima proteolítica localizada no vacúolo (PARROTT *et al.*, 2007) que possui um resíduo de serina em seu sítio catalítico.

No grupo das peptidases serínicas, observou-se também o padrão de expressão relativa de uma subtilisina. O aumento no padrão de expressão dessa enzima foi identificado nos estágios iniciais de desenvolvimento (10 DAP), indicando a atividade desta enzima na proteólise dos componentes celulares do ii. A subtilisina está envolvida em inúmeros processos metabólicos celulares, incluindo a MCP (FERNÁNDEZ, DALEO e GUEVARA, 2015). De acordo com Dodson e Wlodawer (1998), a subtilisina possui em seu sítio ativo um conjunto de três aminoácidos (aspartato, histidina e serina), denominado de tríade catalítico, característica comum de peptidases serínicas. Essa enzima também foi identificada por Soares *et al.* (2014) em integumento interno de sementes de *J. curcas* aos 25 DAP, significativamente na região proximal, concordando ao observado neste estudo; onde, a expressão relativa para esta enzima foi superior também na região proximal.

Os resultados mostraram que, a expressão relativa da peptidase aspártica foi menor aos 5 e 10 DAP, quando comparados ao calibrador (óvulo) e aos 25 DAP a expressão relativa não indicou diferença significativa ao comparar as regiões distal e proximal do ii. Portanto, sugere-se que essa enzima não participou do processo de MCP deste tecido. Contudo, a atividade da peptidase aspártica foi observada em senescência foliar e também em sementes maduras e germinadas (PORET, CHANDRASEKAR e HOORN, 2016; TAMURA *et al.*, 2007), ambos processos que envolvem MCP. Em sementes, a peptidase aspártica é encontrada nos vacúolos na forma inativa e possui dois resíduos de aspartato no seu sítio catalítico, além disso, sua atividade enzimática é obtida em pH ácido (CHEN *et al.*, 2015; SCHAAF, RESKI e DECKER, 2004).

Os inibidores de peptidases, por sua vez, funcionam na regulação da atividade enzimática das peptidases (GUERRA *et al.*, 2016). Avaliou-se os níveis de expressão dos

transcritos que codificam para o inibidor de peptidase cisteínica e a serpina (inibidor de peptidase serínica). Apenas o inibidor de peptidase cisteínica foi mais expresso na região proximal em relação a distal do integumento interno de sementes com 25 DAP, desse modo, não houve diferença significativa entre os estágios avaliados para a serpina. Indicando que houve um controle na degradação da peptidase cisteínica no estágio onde a MCP mostra sinais mais evidentes.

6. CONCLUSÃO

O estudo ultraestrutural do desenvolvimento do integumento interno de sementes de *J. curcas* dá suporte a hipótese de ocorrência de MCP no processo de formação do integumento interno, uma vez que foi observado rompimento do tonoplasto, degradação de organelas, aparecimento dos ricinossomos, ruptura da membrana plasmática bem como da parede celular. Atrelado às características ultraestruturais, está a expressão de algumas hidrolases como a peptidase cisteínica KDEL e subtilisina que podem estar envolvidas nesse processo. A correlação dos achados ultraestruturais e o padrão de expressão transcricional indica que a ocorrência da MCP no integumento interno pode atuar no fornecimento de fontes de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento do embrião e endosperma.

REFERÊNCIAS

- AN, Q. *et al.* Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 1009–1019, 2006.
- ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases : biochemical , physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. June, p. 637–650, 2005.
- ARASIMOWICZ-JELONEK, M. *et al.* Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 58, p. 124–134, 2012.
- BALASUBRAMANIAN, V. *et al.* Plant b -1 , 3-glucanases : their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. **Biotechnol Lett**, n. July, 2012.
- BALK, J. *et al.* The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. **Plant Journal**, v. 34, n. 5, p. 573–583, 2003.
- BALK, J.; LEAVER, C. J. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. **The Plant cell**, v. 13, n. 8, p. 1803–1818, 2001.
- BÁRTOVÁ, E. *et al.* Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 58, n. 5, p. 391–403, 2010.
- BASSHAM, D. C. *et al.* Autophagy in development and stress responses of plants. **Autophagy**, v. 2, n. 1, p. 2–11, 2006.
- BATTELLI, R. *et al.* Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum*. **Plant Science**, v. 180, n. 5, p. 716–725, 2011.
- BATTELLI, R. *et al.* Expression and localisation of a senescence-associated KDEL-cysteine protease from *Lilium longiflorum* tepals. **Plant Science**, v. 214, p. 38–46, 2014.
- BAUD, S. *et al.* An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 151–160, 2002.
- BEGCY, K.; WALIA, H. Drought stress delays endosperm development and misregulates genes associated with cytoskeleton organization and grain quality proteins in developing wheat seeds. **Plant Science**, v. 240, p. 109–119, 2015.
- BISWAL, B.; MOHAPATRA, P. K.; BISWAL, U. C. Leaf Senescence and Transformation of Chloroplasts to Gerontoplasts. *In: Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation, Advances in Photosynthesis and Respiration*. [s.l: s.n.]. v. 34p. 217–230.
- BOZHKOVA, P. V. *et al.* Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 40, p. 14463–14468, 2005.
- BRIÈRE, C. *et al.* Autonomous regulation of free Ca²⁺ concentrations in isolated plant cell nuclei: A mathematical analysis. **Cell Calcium**, v. 39, n. 4, p. 293–303, 2006.

BRIGHIGNA, L. *et al.* Programmed cell death in the nucellus of *Tillandsia* (Bromeliaceae). **Caryologia**, v. 59, n. 4, p. 334–339, 2006.

CASTRO GONZÁLES, N. F. International experiences with the cultivation of *Jatropha curcas* for biodiesel production. **Energy**, v. 112, p. 1245–1258, 2016.

CHEN, H. *et al.* Sweet potato SPAP1 is a typical aspartic protease and participates in ethephon-mediated leaf senescence. **Journal of Plant Physiology**, v. 180, p. 1–17, 2015.

CHEUNG, A. Y. *et al.* The pollen tube journey in the pistil and imaging the in vivo process by two-photon microscopy. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 7, p. 1907–1915, 2010.

CHICHKOVA, N. V. *et al.* Plant phytaspases and animal caspases: Structurally unrelated death proteases with a common role and specificity. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, p. 77–84, 2012.

COFFEEN, W. C.; WOLPERT, T. J. Purification and Characterization of Serine Proteases That Exhibit Caspase-Like Activity and Are Associated with Programmed Cell Death in *Avena sativa*. **The Plant Cell Online**, v. 16, n. 4, p. 857–873, 2004.

COLL, N. S. *et al.* The plant metacaspase AtMC1 in pathogen-triggered programmed cell death and aging: functional linkage with autophagy. **Cell death and differentiation**, v. 21, n. 9, p. 1–10, 2014.

DEBEAUJON, I.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KOORNNEEF, M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 122, n. 2, p. 403–414, 2000.

DELILLE, H. K.; ALVES, R.; SCHRADER, M. Biogenesis of peroxisomes and mitochondria: Linked by division. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 131, n. 4, 441–446, 2009.

DELORME, V. G. *et al.* A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. **Plant Physiology**, v. 123, n. 3, p. 917–927, 2000.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6543–6555, 2010.

DISTEFANO, S. *et al.* Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. **The Biochemical journal**, v. 327, p. 399–405, 1997.

DODSON, G.; WLODAWER, A. **Catalytic triads and their relatives** Trends in Biochemical Sciences, 1998.

DOGRA, V.; SREENIVASULU, Y. Cloning and functional characterization of β -1, 3-glucanase gene from *Podophyllum hexandrum* — A high altitude Himalayan plant. **Gene**, v. 1, n. 554, p. 25–31, 2014.

DOMÍNGUEZ, F.; CEJUDO, F. J. A comparison between nuclear dismantling during plant and animal programmed cell death. **Plant Science**, v. 197, p. 114–121, 2012.

- DOMÍNGUEZ, F.; CEJUDO, F. J. Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. July, p. 366, 2014.
- DUAN, Y. *et al.* An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in Arabidopsis. **New Phytol**, v. 186, n. 3, p. 681–695, 2010.
- DUMAS, C.; ROGOWSKY, P. Fertilization and early seed formation. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 331, n. 10, p. 715–725, 2008.
- EVERT, R. F. **Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development**. New Jersey, USA.: John Wiley & Sons, 2006.
- FARO, C.; GAL, S. Aspartic proteinase content of the Arabidopsis genome. **Current protein & peptide science**, v. 6, n. 6, p. 493–500, 2005.
- FERNÁNDEZ, M. B.; DALEO, G. R.; GUEVARA, M. G. Isolation and characterization of a *Solanum tuberosum* subtilisin-like protein with caspase-3 activity (St SBTc-3). **Plant Physiology**, v. 86, p. 137–146, 2015.
- GREENWOOD, J. S.; HELM, M.; GIETL, C. Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 6, p. 2238–2243, 2005.
- GUI, M. Y.; LIU, W. Z. Programmed cell death during floral nectary senescence in *Ipomoea purpurea*. **Protoplasma**, v. 251, n. 3, p. 677–685, 2014.
- GUNAWARDENA, A. H. L. A. N. *et al.* Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v. 212, n. 2, p. 205–214, 2001.
- GUNAWARDENA, A. H. L. A. N. Programmed cell death and tissue remodelling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 445–451, 2008.
- GUNAWARDENA, A. H. L. A. N.; GREENWOOD, J. S.; DENGLER, N. G. PCD Remodels Lace Plant Leaf Shape during Development. **The Plant Cell**, v. 16, n. January, p. 60–73, 2004.
- HADLER-OLSEN, E. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **FEBS Journal**, v. 278, n. 1, p. 28–45, 2011.
- HARA-NISHIMURA, I. *et al.* Vacuolar processing enzyme : an executor of plant cell death. **Current Opinion in Plant Biolog**, v. 8, p. 404–408, 2005.
- HARA-NISHIMURA, I.; HATSUGAI, N. The role of vacuole in plant cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1298–1304, 2011.
- HATSUGAI, N. *et al.* Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. April, p. 234, 2015.
- HAUGHN, G.; CHAUDHURY, A. Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. **TRENDS in Plant Science**, v. 10, n. 10, p. 10–15, 2005.

- HE, W. *et al.* Analysis of seed phorbol-ester and curcumin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1183–1190, 2011.
- HO, P.; HAWKINS, C. J. Mammalian initiator apoptotic caspases. **The FEBS journal**, v. 272, n. 21, p. 5436–5453, 2005.
- HÖWING, T. *et al.* Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of *Arabidopsis* (AtCEP1) is involved in pathogen defense. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. February, p. 58, 2014.
- HSU, S. C. *et al.* Indispensable Roles of Plastids in *Arabidopsis thaliana* Embryogenesis. **Curr Genomics**, v. 11, n. 5, p. 338–349, 2010.
- HUMMEL, E. *et al.* Inhibition of Golgi function causes plastid starch accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 10, p. 2603–2614, 2010.
- HUYSMANS, M. *et al.* Dying two deaths — programmed cell death regulation in development and disease. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 35, p. 37–44, 2017.
- JIA, L. *et al.* Synergistic degradation of arabinoxylan by free and immobilized xylanases and arabinofuranosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, n. July, p. 268–275, 2016.
- JOHANSSON, M.; WALLEES, B. Functional Anatomy of the Ovule in Broad Bean (*Vicia Faba* L.): Ultrastructural Seed Development and Nutrient Pathways. **Annals of Botany**, v. 74, n. March, p. 233–244, 1994.
- JUNQUEIRA, C. U. O uso de cortes finos de tecidos na Medicina e Biologia. **Meios e Métodos**, v. 66, p. 167–171, 1990.
- KAMDEE, C. *et al.* Vesicles between plasma membrane and cell wall prior to visible senescence of *Iris* and *Dendrobium* flowers. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, p. 37–43, 2015.
- KARNOVSKY, M. J. J. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use In Electron Microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137–138, 1965.
- KIM, P. K.; HETTEMA, E. H. Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 6, p. 1176–1190, 2015.
- KITAJIMA, A. *et al.* The Rice α -Amylase Glycoprotein Is Targeted from the Golgi Apparatus through the Secretory Pathway to the Plastids. **The Plant cell**, v. 21, n. September, p. 2844–2858, 2009.
- KOH, M. Y.; TINIA, T. I. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 5, p. 2240–2251, 2011.
- KONGMANY, S. *et al.* Semi-preparative HPLC separation followed by HPLC/UV and tandem mass spectrometric analysis of phorbol esters in *Jatropha* seed. **Journal of Chromatography B**, v. 1038, p. 63–72, 2016.
- KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; PŁACHNO, B. J. Are there symplastic connections between the endosperm and embryo in some angiosperms—a lesson from the Crassulaceae family. **Protoplasma**, v. 249, n. 4, p. 1081–1089, 2012.
- KROEMER, G. *et al.* Classification of Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

- KRUPINSKA, K. *et al.* An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 144, n. 2, p. 189–200, 2012.
- LAM, E.; ZHANG, Y. Regulating the reapers: Activating metacaspases for programmed cell death. **Trends in Plant Science**, v.17 n. 8, p. 487-494, 2012.
- LAU, S. *et al.* Cell-cell communication in Arabidopsis early embryogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 2–3, p. 225–230, 2010.
- LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v.87, n.4, p. 1083-1095, 2010.
- LI, L.; YUAN, H. Chromoplast biogenesis and carotenoid accumulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 2, p. 102-109, 2013.
- LIM, P. O.; KIM, H. J.; NAM, H. G. Leaf Senescence. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 115–136, 2007.
- LIN, J. F.; WU, S. H. **Molecular events in senescing Arabidopsis leaves** **Plant Journal**, 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LOMBARDI, L. *et al.* Programmed cell death of the nucellus during *Sechium edule* Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 11, p. 2949–2958, 2007.
- LUNDQUIST, P. K. *et al.* The Functional Network of the Arabidopsis Plastoglobule Proteome Based on Quantitative Proteomics and Genome-Wide Coexpression Analysis. **Plant Physiology**, v. 158, n. 3, p. 1172–1192, 2012.
- MACHADO, S. *et al.* Dendroid colleters on vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. **Flora**, v. 207, n. 12, p. 868–877, 2012.
- MAHLBERG, P.; OLSON, K.; WALKINSHAW, C. Origin and development of plasma membrane derived invagination in *Vinca rosea* L. **American Journal of Botany**, v. 58, n. 5, p. 407–416, 1971.
- MAKKAR, H. P. S. State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 222, p. 87–99, 2016.
- MARINHO, C. R.; OLIVEIRA, R. B.; TEIXEIRA, S. P. The uncommon cavitated secretory trichomes in *Bauhinia* s.s. (Fabaceae): the same roles in different organs. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 180, n. 1, p. 104–122, 2016.
- MARTY. Plant vacuoles. **The Plant cell**, v. 11, n. 4, p. 587–600, 1999.
- MATHESON, L. A.; HANTON, S. L.; BRANDIZZI, F. Traffic between the plant endoplasmic reticulum and Golgi apparatus : to the Golgi and beyond. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 601–609, 2006.

- MATSUSHIMA, R. *et al.* The ER Body , a Novel Endoplasmic Reticulum-Derived Structure in Arabidopsis. **Plant Cell Physiol**, v. 44, n. 7, p. 661–666, 2003.
- MILLAR, J. L. *et al.* Chalazal seed coat development in *Brassica napus*. **Plant Science**, v. 241, p. 45–54, 2015.
- MOÏSE, J. A. *et al.* Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 5, p. 620–644, 2005.
- MOLLENHAUER, H. H.; TOTTE, C. Studies on Seeds. **Plant Physiology**, v. 46, n. April, p. 794–799, 1970.
- MULISCH, M.; KRUPINSKA, K. Ultrastructural Analyses of Senescence Associated Dismantling of Chloroplasts Revisited. *In: Plastid Development in Leaves During Growth and Senescence: Advances in Photosynthesis and Respiration*. [s.l: s.n.]. v. 36p. 307–335.
- NAKANO, Y. *et al.* Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). **Plant Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 185–189, 2012.
- NATESAN, S. K. A.; SULLIVAN, J. A.; GRAY, C. J. Stromules: a characteristic cell-specific feature of plastid morphology. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 413, p. 787–797, 2005.
- NI, X. L. *et al.* Programmed cell death during aerenchyma formation in *Typha angustifolia* leaves. **Aquatic Botany**, v. 113, p. 8–18, 2014.
- NI, X. L. *et al.* Leaf-shape remodeling: Programmed cell death in fistular leaves of *Allium fistulosum*. **Physiologia Plantarum**, v. 153, n. 3, p. 419–431, 2015.
- NIU, N. *et al.* EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. **Nature communications**, v. 4, p. 1445, 2013.
- PALMA, J. M. *et al.* Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, n. December, p. 1–34, 2002.
- PARROTT, D. L. *et al.* Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence , facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. **New Phytologist**, v. 176, n. May, p. 56–69, 2007.
- PINHEIRO, C. B. **Isolamento de plastídios do Endosperma de sementes em desenvolvimento de Pinhão Manso (*Jatropha curcas*)**, 2010.
- PINHEIRO, C. B. *et al.* Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 11, 2013.
- PINTO, M. C.; LOCATO, V.; GARA, L. DE. Redox regulation in plant programmed cell death. **Plant, cell and environment**, v. 35, n. 2, p. 234–44, 2012.
- PORET, M.; CHANDRASEKAR, B.; HOORN, R. A. L. VAN DER. Plant Science Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape. **Plant Sc**, v. 246, n. February, p. 139–153, 2016.
- RADCHUK, V. *et al.* Development of maternal seed tissue in barley is mediated by regulated cell expansion and cell disintegration and coordinated with endosperm growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 1217–1227, 2011.

- RADCHUK, V.; BORISJUK, L. Physical , metabolic and developmental functions of the seed coat. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. October, p. 1–17, 2014.
- RAO, R. S. P. *et al.* The proteome of higher plant mitochondria. **Mitochondrion**, v. 16, 2016.
- ROCHA, A. J. *et al.* Differential expression of cysteine peptidase genes in the inner integument and endosperm of developing seeds of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Plant Science**, v. 213, p. 30–37, 2013.
- ROCHA, J. F.; MACHADO, S. R. Anatomy, ultrastructure and secretion of *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae) extrafloral nectary. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 3, p. 489–498, 2009.
- ROGERS, J. C. Compartmentation of Plant Cell Proteins in Separate Lytic and Protein Storage Vacuoles. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, p. 653–658, 1998.
- ROTTET, S.; BESAGNI, C.; KESSLER, F. The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1847, n. 9, p. 889–899, 2015.
- SAETAE, D.; SUNTORNSUK, W. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 66–77, 2011.
- SCHAAF, A.; RESKI, R.; DECKER, E. L. A novel aspartic proteinase is targeted to the secretory pathway and to the vacuole in the moss *Physcomitrella patens*. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. March, p. 145–152, 2004.
- SCHMID, M.; SIMPSON, D.; GIETL, C. Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. **Pnas**, v. 96, n. 24, p. 14159–14164, 1999.
- SCOTT, I.; LOGAN, D. C. Mitochondrial Dynamics: The Control of Mitochondrial Shape, Size, Number, Motility, and Cellular Inheritance. *In: Plant Mitochondria*. [s.l.: s.n.]. p. 1–35, 2007.
- SELGA, T.; SELGA, M.; PAVILA, V. Death of mitochondria during programmed cell death of leaf mesophyll cells. **Cell Biology International**, v. 29, n. 12, p. 1050–1056, 2005.
- SENATORE, A.; TROBACHER, C. P.; GREENWOOD, J. S. Ricinosomes Predict Programmed Cell Death Leading to Anther Dehiscence in Tomato 1 [C][W][OA]. **Plant Physiology**, v. 149, n. February, p. 775–790, 2009.
- SHAH, M. *et al.* Proteomic analysis of the endosperm ontogeny of *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 6, p. 2557–2568, 2015.
- SHAH, M. *et al.* Deep proteome analysis of gerontoplasts from the inner integument of developing seeds of *Jatropha curcas*. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 346–352, 2016.
- SHI, D. Q.; YANG, W. C. Ovule development in Arabidopsis: Progress and challenge. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 74–80, 2011.
- SIEBER, P. *et al.* Organ polarity in Arabidopsis. NOZZLE physically interacts with members of the YABBY family. **Plant Physiol**, v. 135, n. 4, p. 2172–2185, 2004.

- SIEBER, P. *et al.* Pattern formation during early ovule development in *Arabidopsis thaliana*. **Developmental Biology**, v. 273, n. 2, p. 321–334, 2004.
- SILVA, LUIS, L. P. *et al.* Endoplasmic Reticulum Export Sites and Golgi Bodies Behave as Single Mobile Secretory Units in Plant Cells. **The Plant cell**, v. 16, n. July, p. 1753–1771, 2004.
- SIMEONOVA, E. *et al.* Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. **Protoplasma**, v. 214, n. 1–2, p. 93–101, 2000.
- SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **Biotech**, v. 5, p. 129–151, 2015.
- SINGH, R. P. Structure and development of seeds in Euphorbiaceae: *Jatropha* species. **Beitr. Biol. Pflanzen**, v. 47, p. 79–90, 1970.
- SMET, I. *et al.* Embryogenesis - The humble beginnings of plant life. **Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 959–970, 2010.
- SOARES, E. L. *et al.* Proteome Analysis of the Inner Integument from Developing *Jatropha curcas* L. Seeds. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 8, p. 3562–3570, 2014.
- SREENIVASULU, N.; WOBUS, U. Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. **Annual review of plant biology**, v. 64, n. February, p. 189–217, 2013.
- SUN, L. *et al.* Mechanistic study of programmed cell death of root border cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) induced by copper. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 412–419, 2015.
- TAMURA, T. *et al.* Differential expression of wheat aspartic proteinases , WAP1 and WAP2 , in germinating and maturing seeds. **Journal of Physiology**, v. 164, p. 470–477, 2007.
- THOMAS, H. *et al.* Defining senescence and death. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n.385, p.1127-1132, 2003.
- TOYOOKA, K.; OKAMOTO, T.; MINAMIKAWA, T. Mass Transport of Proform of a KDEL-tailed Cysteine Proteinase (SH-EP) to Protein Storage Vacuoles by Endoplasmic Reticulum – derived Vesicle Is Involved in Protein Mobilization in Germinating Seeds. **The Journal of Cell Biology**, v. 148, n. 3, p. 453–463, 2000.
- TROBACHER, C. P. *et al.* Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid. **Planta**, v. 237, n. 3, p. 665–679, 2013.
- TURNER, S.; GALLOIS, P.; BROWN, D. Tracheary Element Differentiation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 407–433, 2007.
- UZELAC, B. *et al.* Characterization of natural leaf senescence in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown in vitro. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 259–275, 2016.
- VAN-DOORN, W. G. *et al.* Morphological classification of plant cell deaths. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1241–6, 2011.

VAN-DOORN, W. G.; KIRASAK, K.; KETSA, S. Macroautophagy and microautophagy in relation to vacuole formation in mesophyll cells of *Dendrobium* tepals. **Journal of Plant Physiology**, v. 177, p. 67–73, 2015.

VAN-DOORN, W. G.; PAPINI, A. Ultrastructure of autophagy in plant cells: A review. **Autophagy**, v. 9, n. 12, p. 1922–1936, 2013.

VAN-DOORN, W. G.; WOLTERING, E. J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 3, p. 117–122, 2005.

VAN-DOORN, W. G.; YOSHIMOTO, K. Role of chloroplasts and other plastids in ageing and death of plants and animals: A tale of Vishnu and Shiva. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 117–130, 2010.

VERDIER, J. *et al.* A combined transcriptome analysis unravels In *Posidonia* histology oceanica and cadmium induces changes in DNA novel questions *Medicago truncatula* seed coat methylation and on chromatin patterning. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 2, p. 1–12, 2012.

VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. **Molecular Plant**, v. 5, n. 2, p. 318–333, 2012.

WAN, L. *et al.* Early stages of seed development in *Brassica napus*: A seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. **Plant Journal**, v. 30, n. 1, p. 1–10, 2002.

WATANABE, N.; LAM, E. Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14691–14699, 2005.

WEBER, H. *et al.* Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. **The Plant cell**, v. 7, n. 11, p. 1835–1846, 1995.

WOBUS, U.; WEBER, H. Seed maturation: Genetic programmes and control signals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, n. 1, p. 33–38, 1999.

WU, G. L.; LIU, Q. L.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Ultrastructure of pericarp and seed capsule cells in the developing walnut (*Juglans regia* L.) fruit. **South African Journal of Botany**, v. 75, n. 1, p. 128–136, 2009.

XU, W. *et al.* Endosperm and Nucellus Develop Antagonistically in Arabidopsis Seeds. **The Plant Cell**, v. 28, n. June, p. 1343–1360, 2016.

YANG, L. *et al.* Genome-wide transcriptome analysis of female-sterile rice ovule shed light on its abortive mechanism. **Planta**, v. 244, p. 1011–1028, 2016.

ZAMYATNIN, A. A. Plant Proteases Involved in Regulated Cell Death. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 80, n. 13, p. 1701–15, 2015.

ZAPATA, J. M. *et al.* Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. **Cell death and differentiation**, v. 12, n. 10, p. 1277–84, 2005.

ZHAN, J. *et al.* Mitochondrial alterations during Al-induced PCD in peanut root tips. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 75, p. 105–113, 2014.

ZHOU, Y. *et al.* Programmed cell death in relation to petal senescence in ornamental plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 6, p. 641–650, 2005.

ZHOU, Y. F. *et al.* Programmed cell death: A mechanism for the lysigenous formation of secretory cavities in leaves of *Dictamnus dasycarpus*. **Plant Science**, v. 225, p. 147–160, 2014.

ZHOU, Z. *et al.* Study on programmed cell death and dynamic changes of starch accumulation in pericarp cells of *Triticum aestivum* L. **Protoplasma**, v. 236, n. 1–4, p. 49–58, 2009.

ZOU, F. *et al.* Microsporogenesis, megasporogenesis and male and female gametophyte development in *Feijoa sellowiana* (Myrtaceae). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 3, p. 637–642, 2016.