

MECANISMO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE
Annona cacans WARM. (ANNONACEAE)

SAMANTA JAQUELINE DALANHOL

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
(Botânica), Área de Concentração: Fisiologia
e Bioquímica Vegetal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

MECANISMO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE

Annona cacans WARM. (ANNONACEAE)

SAMANTA JAQUELINE DALANHOL

PROF^a DR^a GISELA FERREIRA
ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
(Botânica), Área de Concentração: Fisiologia
e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dalanhol, Samanta Jaqueline.

Mecanismo de dormência em sementes de *Annona cacans* Warm.
(Annonaceae) / Samanta Jaqueline Dalanhol. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Gisela Ferreira

Capes: 20303009

1. Sementes - Dormência. 2. Fruta-de-conde. 3. Anonacea.
4. Fenóis. 5. Acido abscísico. 6. Hipóxia. 7. Giberelina.

Palavras-chave: Ácido abscísico; Compostos fenólicos;
Giberelina; Hipóxia; Tegumento.

O impossível existe
até quando alguém duvide dele
e prove o contrário.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ouvir minhas preces e me permitir crescer espiritualmente nesses quatro anos.

Aos meus pais, Celso Dalanhól e Marlene Peiter Dalanhól por terem sempre incentivado meus estudos, terem me dado suporte para chegar onde estou hoje e pelo apoio incondicional mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Gisela Ferreira pela paciência e dedicação.

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) pela oportunidade de ingressar no doutorado.

Aos professores Carlos Ducatti (*in memoriam*), Carmen Regina Marcati, Edivaldo Domingues Velini, Elizabeth Orika Ono, Fernando Broetto, João Carlos Palazzo de Mello, Martha Maria Mischan e Michele Fernanda Bortolini que autorizaram o uso de seus laboratórios para que eu pudesse realizar as análises e me ajudaram com esclarecimentos a respeito de metodologias.

Ao pessoal do Departamento de Botânica, Heloíza, Inara, José Eduardo, Leonice e Maria Helena por toda disposição em ajudar e pela amizade.

Ao Beto e ao Thiago do Nupam pela ajuda com a quantificação dos fitormônios.

A todos os colegas da Pós-Graduação, que fizeram esses anos se tornarem mais leves, em especial aos amigos que também me ajudaram com avaliações e análises: Juliana, Magnun, Luís Paulo, Renata, Marília e Amanda.

À Marcela, que além de me ajudar com a anatomia, aceitou o desafio de morar comigo mesmo me conhecendo pouco, mas que proporcionou um convívio agradável, sempre disposta a ouvir meus desabafos durante esses quatro anos.

Às minhas amigas de Toledo/PR, Cibelly, Leidimar, Marlene, Taciara e Thaís, por estarem ao meu lado depois de muitos anos de amizade e sempre me ouvindo e me confortando quando precisei.

Aos estagiários da UNESP, UFSCar e PUCPR pela ajuda com coleta e beneficiamento de frutos e instalação de experimentos.

A todos que permitiram a coleta de frutos de *ariticum-cagão* em sua propriedade.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 GERMINAÇÃO E DORMÊNCIA EM SEMENTES	4
2.2 CLASSIFICAÇÃO DA DORMÊNCIA	5
2.2.1 Dormência fisiológica	6
2.2.2 Dormência morfológica e morfofisiológica	9
2.2.3 Dormência física e fisiofísica.....	10
2.3 DORMÊNCIA NA FAMÍLIA ANNONACEAE	10
2.4 <i>Annona cacans</i> WARM.....	11
3 CAPÍTULO 1 – ARMAZENAMENTO DOS FRUTOS DE <i>Annona cacans</i> WARM. E SUA RELAÇÃO COM A VIABILIDADE E DORMÊNCIA DE SEMENTES	13
Resumo	14
Introdução	14
Material e Métodos	15
<i>Material vegetal</i>	15
<i>Superação da dormência com reguladores vegetais e escarificação mecânica</i>	16
<i>Efeito do repouso após a coleta dos frutos na germinação e dormência</i>	17
<i>Características químicas dos frutos submetidos ao repouso após a coleta</i>	18
<i>Análise estatística</i>	19
Resultados	19
<i>Superação da dormência com reguladores vegetais e escarificação mecânica</i>	19
<i>Efeito do repouso após a coleta dos frutos na germinação e dormência</i>	23
<i>Características químicas dos frutos submetidos ao repouso após a coleta</i>	26
Discussão	27
Referências	29

4 CAPÍTULO 2 – LIMITAÇÃO ÀS TROCAS GASOSAS NO TEGUMENTO E MANUTENÇÃO DA DORMÊNCIA EM SEMENTES DE <i>Annona cacans</i> WARM.	33
RESUMO.....	34
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
<i>Material vegetal</i>	36
<i>Delineamento experimental</i>	36
<i>Avaliações e análises experimentais</i>	37
<i>Análise estatística</i>	41
RESULTADOS.....	41
<i>Caracterização das sementes</i>	42
<i>Germinabilidade</i>	44
<i>Teor de água</i>	46
<i>Anatomia e morfologia</i>	47
<i>Fenóis totais</i>	51
<i>Atividade da enzima polifenoloxidase</i>	53
<i>Papel do tegumento na respiração das sementes</i>	55
<i>GA₄</i>	56
<i>Enzimas hidrolíticas</i>	58
DISCUSSÃO.....	62
LITERATURA CITADA.....	66
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
6 CONCLUSÕES.....	73
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

DALANHOL, S. J. **MECANISMO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE *Annona cacans* WARM. (ANNONACEAE)**. 2017. 83p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO – Sementes dormentes de *Annona cacans* Warm. não respondem ao tratamento com giberelina como observado em outras espécies da família Annonaceae. Mesmo sendo permeáveis à água, é sugerida a escarificação do tegumento das sementes para melhorar sua germinação, fato que se deve possivelmente aos compostos fenólicos presentes na sua composição. Além disso, é recomendado o repouso dos frutos após a coleta, sem o conhecimento do que isto poderia acarretar à germinação e dormência das sementes. O objetivo deste estudo foi avaliar se o repouso após a coleta dos frutos e o tegumento estão envolvidos na dormência de sementes de *Annona cacans*. Para avaliar o efeito do repouso dos frutos sobre a germinação, as sementes foram beneficiadas logo após a coleta e a cada dois dias até completar o período de dez dias, sendo avaliadas as características físico-químicas dos frutos e a germinabilidade das sementes a cada época. Para investigar como os compostos fenólicos estão envolvidos com a dormência das sementes, estudou-se o efeito da escarificação e da embebição em regulador nas sementes ao longo do tempo e, para tanto, foram avaliados a germinabilidade, a anatomia das sementes, o teor de fenóis totais, a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), a atividade respiratória das sementes, o hormônio GA₄ e a atividade de enzimas hidrolíticas. O repouso após a coleta dos frutos por até os quatro dias causa aumento na dormência das sementes, e a partir deste momento, observa-se perda gradativa da viabilidade das sementes conforme o tempo que estas permanecem nos frutos. Observou-se efeito sinérgico da escarificação das sementes e a embebição em regulador, pois estes tratamentos em conjunto aumentam a velocidade e a sincronização da germinação, além de apresentarem maior atividade respiratória e elevado teor de GA₄ após a embebição, o que aumentou a atividade de enzimas amilolíticas e proteolíticas neste mesmo período, contribuindo para a superação da dormência dessas sementes. Conclui-se que o repouso após a coleta dos frutos é prejudicial à germinação de sementes de *Annona cacans* e que o tegumento intacto destas sementes promove condição natural de hipóxia ao embrião, o que contribui para a manutenção de sua dormência.

Palavras-chave: ácido abscísico, compostos fenólicos, giberelina, hipóxia, tegumento.

DALANHOL, S. J. **MECHANISM OF SEED DORMANCY IN *Annona cacans* WARM. (ANNONACEAE)**. 2017. 83p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

ABSTRACT – Dormant seeds of *Annona cacans* Warm. do not respond to treatment with gibberellin as observed in other species of the Annonaceae family. Although permeable to water, it is suggested seed coat scarification to improve its germination, a fact possibly due to the phenolic compounds present in its composition. In addition, it is recommended storage after fruit collection, without the knowledge of what this could induce to the germination and dormancy of the seeds. The aim of this study was to evaluate if the storage after fruit collection and the seed coat are involved in seed dormancy of *Annona cacans*. In order to evaluate the effect of the storage of the fruits on the germination, the seeds were benefited soon after the collection and every two days until completing the period of ten days, being evaluated the physical-chemical characteristics of the fruits and the germinability of the seeds at each time. To investigate how phenolic compounds are involved in seed dormancy, we studied the effect of seed scarification and seed imbibition in plant growth regulator over time, and, for this purpose, it were evaluated the germinability, seed anatomy, seed total phenols, polyphenoloxidase (PPO) activity, seed respiration, GA₄ and activity of hydrolytic enzymes. Storage after fruit collection for up to four days causes an increase in the seed dormancy, but from this moment on, a gradual loss of the seed viability was observed according to the time they remain in the fruits. A synergistic effect of seed scarification and imbibition in regulator was observed, because these treatments together increase germination speed and synchronization, in addition it had higher respiratory activity and a high GA₄ content after imbibition, which increased the activity of amylolytic and proteolytic enzymes in the same period, contributing to overcome seed dormancy. It is concluded that the storage after fruit collection is harmful to *Annona cacans* seed germination and that the seed coat promotes a natural condition of hypoxia to the embryo, which contributes to the maintenance of seed dormancy.

Key words: abscisic acid, phenolic compounds, gibberellin, hypoxia, seed coat.

1 INTRODUÇÃO

A dormência é uma estratégia de distribuição da germinação das sementes no tempo, com a finalidade de oferecer vantagens adaptativas para a espécie, evitando condições temporárias que prejudicam o estabelecimento das mudas e também ajuda na formação de bancos de sementes no solo (Gubler et al., 2008; Bewley et al., 2013). Sementes dormentes não tem a capacidade de germinar em um período específico de tempo sob uma variedade de fatores ambientais que seriam favoráveis à germinação em sementes não dormentes (Baskin; Baskin, 2014). No entanto, a dormência dificulta o planejamento de viveiristas para a obtenção de mudas de espécies nativas, pois requerem tratamentos específicos, às vezes desconhecidos, para que a germinação ocorra (Zaidan; Barbedo, 2004; Hartmann et al., 2011).

Na literatura há relatos de que sementes de *Annona cacans* Warm. (Annonaceae) possuem dormência, porém não há consenso quanto aos métodos de superação, pois Carvalho (2003) sugere a estratificação em areia úmida, mas Lorenzi (2016) indica o repouso dos frutos após a coleta e também sugere a escarificação mecânica das sementes. Além disso, a semeadura sem tratamentos de superação de dormência atinge no máximo 21% de germinação em um período de 23 semanas (Suganuma et al., 2008). Isto demonstra a importância do esclarecimento dos mecanismos de dormência da espécie, com os quais poderão ser definidas estratégias de reprodução da mesma.

Ao contrário de outras espécies da família Annonaceae, sementes de *Annona cacans* não germinaram após serem embebidas em solução de giberelina (GA_3), demonstrando que esta espécie poderia apresentar outro mecanismo de dormência ainda não relatado nesta família, provavelmente relacionado com compostos fenólicos (Dalanhol et al., 2013). Além disso, verificou-se que os frutos entram em processo fermentativo intenso após se desprenderem da planta mãe, o que poderia interferir de maneira negativa na germinação das sementes e também na dormência, uma vez que esta espécie possui compostos fenólicos (taninos) nas sementes (Dalanhol et al., 2013) e o processo fermentativo está relacionado com o aumento no conteúdo de fenóis em sementes (Gachons; Kennedy, 2003). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar se o repouso após a coleta dos frutos e se o tegumento estão envolvidos na dormência de sementes de *Annona cacans*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GERMINAÇÃO E DORMÊNCIA EM SEMENTES

A germinação inicia com a absorção de água pelas sementes e termina com a emergência do eixo embrionário através das estruturas que o circundam, sendo que este último evento é, às vezes, referido como germinação visível, pois é o momento em que ocorre o aparecimento do embrião (Nonogaki et al., 2010). O sucesso na germinação é um fator determinante na propagação de plantas e, devido à sua vulnerabilidade a estresses ambientais, pode ser considerada uma fase crítica no ciclo de vida da planta (Rajjou et al., 2012).

A germinação segue um padrão trifásico de absorção de água pela semente. A primeira fase, também chamada de embebição, é caracterizada pela entrada rápida de água em resposta ao baixo potencial matricial na semente seca, fase que ocorre em sementes permeáveis à água, sendo elas viáveis ou não, e dormentes ou não. A segunda fase ocorre quando o potencial água da semente fica próximo ao equilíbrio com a fonte de água externa, levando a reduzido movimento de água para dentro da semente. Durante esta fase ocorrem eventos metabólicos essenciais como a recuperação da integridade celular e o reparo mitocondrial e do DNA. Entre a segunda e a terceira fase há diminuição no potencial osmótico das células devido à produção de substâncias osmoticamente ativas que contribuem com o gradiente de movimento da água para dentro da semente, ocorrendo alongamento celular, que culmina com a emergência da raiz primária, caracterizando a terceira fase (Bewley et al., 2013).

Sementes maduras, com baixo teor de água (5-15%) e com atividade metabólica reduzida podem ser chamadas de quiescentes, as quais necessitam apenas de hidratação em condições adequadas de temperatura e oxigênio para que ocorra a germinação (Bewley et al., 2013). Além desses requerimentos básicos, sementes não dormentes tem a capacidade de germinar em várias condições ambientais possíveis para a sua sobrevivência, ou seja, não necessitam de estímulos ambientais específicos para que ocorra a germinação (Finch-Savage; Leubner-Metzger, 2006).

Por outro lado, as sementes dormentes possuem algum bloqueio que precisa ser removido ou superado antes da germinação ser completada (Bewley et al., 2013), e não têm a capacidade de germinar em um período específico de tempo submetidas a fatores ambientais que seriam favoráveis à germinação de sementes não dormentes (Baskin; Baskin, 2014).

A dormência é um fator determinante na distribuição e diversificação evolutiva de espécies. Sementes não dormentes podem estar aptas para explorar novos ambientes, pois não dependem de estímulos específicos de superação de dormência, enquanto sementes dormentes,

que necessitam de estímulos específicos, podem colonizar locais com sazonalidade adequada às suas exigências, reduzindo o risco de extinção (Willis et al., 2014). Assim, a incidência de sementes dormentes muitas vezes é maior em locais com alguma limitação, por exemplo, em savanas e florestas decíduas, onde a precipitação é menor, pode haver maior número de sementes dormentes do que em florestas perenes e semidecíduas onde a precipitação é maior (Baskin; Baskin, 2005).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DA DORMÊNCIA

A dormência pode ser classificada quanto a origem, com base no momento em que ela é adquirida, sendo denominada primária ou secundária (Bewley et al, 2013). A dormência primária é adquirida ainda na planta mãe, durante o desenvolvimento e maturação das sementes, podendo incluir bloqueios metabólicos à germinação como também, bloqueios no tegumento, como a impermeabilidade à água ou oxigênio, enquanto que a dormência secundária é imposta em sementes após a perda da dormência primária (Hilhorst, 1995; Hilhorst, 2007), ou em sementes não dormentes quando submetidas a um estresse ambiental, como suprimento insuficiente de água (Murdoch; Ellis, 2000; Finkelstein et al., 2008).

Classificação semelhante de dormência já havia sido sugerida por Harper (1977), como dormência inata (primária), induzida (secundária) e forçada (quiescência). Na inata, a dormência era adquirida na planta mãe, incluindo sementes com tegumentos impermeáveis, embriões morfológicamente incompletos no momento da dispersão e presença de inibidores de germinação. Na induzida, as sementes eram incapazes de germinar após alguma experiência desfavorável após a dispersão. Na forçada, a semente apresentava impedimento de germinação devido a alguma restrição ambiental como água insuficiente ou em excesso, temperatura inadequada ou baixa oxigenação.

Porém, a diversidade anatômica e fisiológica da dormência das sementes implica em um complexo histórico de evolução, o que tem levado pesquisadores a sistematizarem os tipos de dormência em mais níveis de classificação (Baskin; Baskin, 2014). Os principais sistemas foram propostos por Crocker (1916), Lang et al. (1985; 1987) e por Nikolaeva (Baskin; Baskin, 1998, 2014).

Crocker (1916) propôs um sistema com sete níveis de classificação da dormência: (1) Embriões rudimentares que precisam estar maduros antes da germinação começar; (2) inibição na absorção de água; (3) restrição mecânica ao crescimento do embrião; (4) limitação às trocas gasosas pelo embrião; (5) bloqueio no próprio embrião que o impede de germinar mesmo

quando retirado de dentro da semente; (6) combinações entre dois ou mais fatores entre os citados e (7) dormência secundária.

No sistema de Lang et al. (1985; 1987) a classificação é mais simples, com três diferentes tipos: (1) endodormência, no qual o bloqueio está no próprio embrião e este quando excisado não tem capacidade para germinar; (2) paradormência, quando há um bloqueio no tegumento, devido à produção de substâncias inibidoras de germinação e (3) ecodormência, em que o tegumento promove um ambiente desfavorável ao embrião, como por bloqueio de entrada de água ou oxigênio.

Nikolaeva propôs um sistema de classificação baseado nas características morfológicas e fisiológicas das sementes, porém como a maioria de suas publicações são no idioma russo, Baskin e Baskin (1998; 2014), baseando-se nessas publicações, desenvolveram um sistema hierárquico para a classificação da dormência das sementes. Em 1998, a dormência era dividida em endógena e exógena. A endógena poderia ser fisiológica, morfológica ou morfofisiológica, enquanto que a exógena poderia ser física, mecânica ou química. Porém, Baskin e Baskin (2004) mudaram esta classificação, incluindo as dormências mecânica e química na dormência fisiológica e apresentaram também a dormência combinada (física + fisiológica). Desta forma, atualmente o sistema de classificação contém cinco classes que agrupam características gerais das sementes (fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e fisiofísica), dentro das quais podem haver níveis de dormência, como por exemplo, profunda, intermediária ou não profunda, e ainda dentro de níveis podem ser categorizadas em tipos de acordo com suas respostas às temperaturas necessárias para a superação da dormência (Baskin; Baskin, 2014). Como este sistema é o mais atual, será apresentado nos tópicos a seguir.

2.2.1 Dormência fisiológica

Na dormência fisiológica, as sementes são permeáveis à água e apresentam um mecanismo de inibição fisiológico no embrião ou nas estruturas que o circundam que previne a emergência da raiz primária. As sementes variam em relação à força do mecanismo de inibição, resposta à promotores de germinação e requerimentos para superação da dormência. Conforme aumenta o nível da dormência (não profunda, intermediária e profunda), menor é a sensibilidade a promotores e mais específico será o método de superação (Baskin; Baskin, 2014).

A superação da dormência no campo, após a dispersão, pode envolver os mesmos fatores que são comumente usados em laboratório, como a pós-maturação em estado seco, ou

tratamentos que envolvem a embebição das sementes, como a estratificação à frio ou quente, luz, giberelinas e outros hormônios, substâncias de fumaça como butenolide e óxido nítrico (Fink-Savage; Leubner-Metzger, 2006). De qualquer forma, verifica-se que a dormência fisiológica é mantida principalmente por um balanço entre ácido abscísico (ABA) e giberelinas (GAs) no embrião, os quais podem ser alterados tanto por fenômenos ambientais quanto por tratamentos de laboratório e podem ser decisivos na perda ou manutenção da dormência (Bewley et al., 2013).

Os bloqueios metabólicos observados na dormência fisiológica são geralmente associados com o aumento no conteúdo de ABA durante o desenvolvimento da semente (Fink-Savage; Leubner-Metzger, 2006; Hilhorst, 2007). O ABA é um inibidor de germinação e seu acúmulo está relacionado com o início da dormência (Finkelstein et al., 2008). Em muitas espécies é observado um pico de ABA durante o desenvolvimento das sementes e, neste caso, sua via de biossíntese é localizada em tecidos maternos como a testa e o funículo, que primeiro previnem o aborto das sementes e promovem o crescimento do embrião e, depois, induz à aquisição da tolerância à dessecação no embrião e impede sua germinação precoce (Nambara; Marion-Poll, 2005; Hilhorst, 2007; Finkelstein et al., 2008; Bewley et al., 2013). Após o embrião se tornar tolerante à dessecação, a semente desidrata, o metabolismo é reduzido e a semente se torna quiescente ou dormente (Taiz; Zeiger, 2013). Neste momento, para que ocorra a indução da dormência, é requerido aumento nos conteúdos do ABA, que agora precisa ser produzido pelo próprio embrião e não mais pelos tecidos maternos (Hilhorst, 2007; Finkelstein et al., 2008).

A superação dessas restrições geralmente envolve os hormônios GAs (promotor) e ABA (inibidor), os quais, de acordo com a teoria do balanço hormonal, são os mais determinantes da dormência e germinação de sementes (Bewley et al., 2013), ou seja, não é a quantidade absoluta desses hormônios que controla a germinação e dormência, mas sim o balanço entre os dois, sendo que quando o ABA está presente em maiores quantidades há a inibição da germinação e quando o GA está em maiores quantidades, há estímulo à germinação (Fink-Savage; Leubner-Metzger, 2006; Taiz; Zeiger, 2013). Outros hormônios também estão envolvidos com a dormência das sementes, influenciando de alguma maneira a dormência, alterando o balanço entre ABA/GA (Shu et al., 2016).

Além dos fitormônios, alterações ambientais também podem alterar o balanço entre giberelinas e ácido abscísico (Shu et al., 2016). A luz vermelha pode aumentar a expressão de genes envolvidos com a síntese de GAs, enquanto que o escuro e o vermelho distante tem atividade inibitória sobre esses mesmos genes. Sementes embebidas quando expostas ao frio

(estratificação à frio), podem ter sua germinação acelerada pela expressão de genes de biossíntese de GA (Yamaguchi et al., 2007). A pós-maturação a seco pode superar a dormência, pois regula negativamente a biossíntese do ABA (Shu et al., 2016).

As GAs promovem a germinação aumentando o potencial de crescimento do embrião e induzindo a síntese de enzimas que causam o enfraquecimento dos tecidos que envolvem a radícula, como o endosperma e o tegumento. Geralmente em sementes que possuem restrição mecânica à germinação, apenas um aumento nos níveis de GA podem ser suficientes para ocorrer a superação da dormência. Este hormônio pode ser sintetizado na radícula de onde é liberado para atuar na degradação de envoltórios do embrião (Kucera et al., 2005). Porém, antes disso, é necessário que ocorra a degradação de proteínas DELLA (proteínas com domínio N-terminal com cinco aminoácidos permanentes: ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), leucina (L), leucina (L) e alanina (A)), que inibem a germinação por impedir a transcrição de genes induzidos por GA ou por aumentar transcrição de genes de síntese do ABA (Piskurewicz et al., 2008). Estas proteínas DELLA, por sua vez, tem sua síntese induzida por ABA e degradação induzida por GA, formando um circuito de retroalimentação positiva (Sun; Gubler, 2004; Piskurewicz et al., 2008). Além disso, o efeito do ABA na manutenção da dormência está relacionado com a inibição da terceira fase da germinação, impedindo o embrião de absorver água por meio da regulação da atividade de canais iônicos, abundância de aquaporinas e outras alterações em tecidos específicos de absorção de água, não ocorrendo o alongamento do embrião e a emergência da raiz primária, o que previne a germinação (Kucera et al., 2005).

Várias espécies com dormência fisiológica, mesmo sendo permeáveis à água, podem ter a germinação promovida pela retirada de estruturas que cobrem as sementes (Baskin; Baskin, 2014), as quais podem ter efeitos como a restrição mecânica ao crescimento da radícula, interferência nas trocas gasosas, prevenção à saída de inibidores, suprimento de inibidores ao embrião e interferência na absorção luminosa (Debeaujon et al., 2007). Esses efeitos, em sua maioria são causados pela presença de compostos fenólicos, os quais podem contribuir com a dureza do tegumento resultando na dormência de sementes de *Rubus* sp. (Wada et al., 2011), ou então, limitar as trocas gasosas em sementes de *Grevillea* spp. (Briggs et al., 2005). Alguns compostos fenólicos também podem agir como inibidor bioquímico do metabolismo das giberelinas (Debeaujon et al., 2007).

Em algumas sementes, os compostos fenólicos presentes nas camadas que cobrem o embrião podem fixar o oxigênio pela oxidação, tornando-o indisponível para o embrião (Debeaujon et al., 2007). Apesar desse bloqueio ao oxigênio não ser limitante para a respiração do embrião, pode ocorrer inibição da germinação pelo atraso na degradação do ABA por

oxidação (Baskin; Baskin, 2014), bem estudado em sementes de cevada, em que se verifica, em condições de hipóxia, aumento da sensibilidade ao ABA (Benech-Arnold et al., 2006) e diminuição de sensibilidade ao GA, sendo necessárias maiores concentrações desse último hormônio para ocorrer a superação da dormência (Bradford et al., 2008).

2.2.2 Dormência morfológica e morfofisiológica

A dormência morfológica ocorre em sementes albuminosas, nas quais o embrião ocupa 1% ou menos do volume da semente (Baskin; Baskin, 2014). Nestes embriões, seu comprimento em relação ao da semente é pequeno, aumentando antes de ocorrer a emergência da raiz primária, o que ocorre dentro de quatro semanas ou menos (Finch-Savage; Leubner-Metzger, 2006; Baskin; Baskin, 2014). Os requerimentos para germinação neste caso são substrato úmido e temperaturas adequadas, embora algumas espécies possam ter requerimentos específicos de luz:escuro (Baskin; Baskin, 2014).

Apesar do embrião possuir cotilédones e eixo hipocótilo-radícula diferenciados, Baskin e Baskin (2014) o denominam como subdesenvolvido no sentido de que ele é pequeno e precisa crescer dentro da semente antes da emergência da raiz primária. Entre os embriões subdesenvolvidos, temos os rudimentares que são tão compridos quanto largos, os subdesenvolvidos lineares, quando o embrião é mais comprido do que largo e os subdesenvolvidos espatulares, nos quais o embrião tem formato de colher (Martin, 1946; Baskin; Baskin, 2014).

A dormência morfofisiológica é uma combinação da dormência morfológica e fisiológica, ou seja, as sementes apresentam embriões subdesenvolvidos com algum bloqueio metabólico, citados anteriormente. Nesse caso, para a semente germinar é necessário superar a dormência fisiológica do embrião, que precisa crescer dentro da semente até determinado tamanho antes de ocorrer a emergência da raiz primária. A superação da dormência geralmente ocorre por combinações de estratificação a frio ou quente, dependendo da espécie (Baskin; Baskin, 2014).

A dormência morfofisiológica é o estado de dormência mais ancestral observado nas plantas, sugerindo que a sensibilidade das sementes dormentes a estímulos ambientais é uma característica primitiva. A partir desse tipo de dormência observou-se maior evolução para a dormência fisiológica do que para a morfológica, demonstrando que o embrião subdesenvolvido é uma característica mais fácil de ser perdida ao longo da evolução, enquanto que o embrião completamente desenvolvido é uma característica derivada (Willis et al., 2014).

Sementes com embrião subdesenvolvido tendem a ocorrerem em locais mais úmidos, sendo observadas com maior frequência em florestas perenes e semidecíduas do que em savanas e florestas decíduas, onde a precipitação é menor (Baskin; Baskin, 2005). Tanto na dormência morfológica quanto morfofisiológica, o solo deve permanecer úmido por um período mais longo de tempo, quando comparado com sementes com embrião completamente desenvolvido, pois a semente precisa estar úmida até que o embrião complete seu desenvolvimento (Kos et al., 2012).

2.2.3 Dormência física e fisiofísica

A dormência física é observada em sementes cujas camadas de cobertura (tegumento ou pericarpo) são impermeáveis à água, impedindo a germinação. Nestas sementes geralmente é observada uma ou duas camadas de células em paliçada, as quais estão impregnadas ou repletas de substâncias hidrofóbicas, que repelem a água (Baskin et al., 2000). Há sementes que além da dormência física também possuem dormência fisiológica e a germinação não ocorre até que ambos os tipos de dormência tenham sido superados, sendo neste caso denominada fisiofísica ou combinada física e fisiológica (Baskin; Baskin, 2014).

Sugere-se que estes dois tipos de dormência sejam os mais derivados dentre os tipos estudados, não sendo observados em sementes de gimnospermas e angiospermas basais (Willis et al., 2014). Além disso, podem ter surgido como estratégia de adaptação a ambientes mais secos, como a savana (Baskin; Baskin, 2005), ou como uma proteção física contra patógenos ou predadores e não como um controle de germinação, uma vez que a superação desse tipo de dormência no ambiente requer condições específicas, como o fogo (Willis et al., 2014), elevada flutuação de temperatura, temperaturas extremas, ação de micro-organismos ou animais (Baskin; Baskin, 2014).

2.3 DORMÊNCIA NA FAMÍLIA ANNONACEAE

Sementes de Annonaceae apresentam um padrão de características como formato achatado, sem ornamentações superficiais, pericalazais, com mesotesta fibrosa e rinação desenvolvida pelos tegumentos, além de amplamente albuminosas. Em algumas espécies há o desenvolvimento de arilo externamente à região micropilar (Svoma, 1998; Galastri, 2008). A família Annonaceae também é caracterizada por apresentar sementes com embriões pequenos, podendo-se inferir que as espécies dessa família apresentam dormência morfológica ou

morfofisiológica, de acordo com o sistema de classificação de Nikolaeva (Baskin; Baskin, 2005).

Pode-se dizer que as sementes na família Annonaceae possuem adaptações para permitir a germinação evitando a predação por insetos, o que favoreceu sua sobrevivência ao longo do processo evolutivo. Como exemplo, na espécie *Mezzettia parviflora* verifica-se que as células do tegumento são adensadas, com exceção da região da pericalaza, em que o tegumento é mais espesso. Esta região apresenta um canal de enfraquecimento que permite a fratura do tegumento para promover a germinação, ou seja, o tegumento é suficientemente duro ou espesso para impedir a predação, mas a pressão interna exercida pelo aumento de volume do endosperma e do embrião é capaz de fazê-lo romper, promovendo a germinação (Lucas et al., 2012; Martinez-Maldonado et al., 2013).

Nos estudos em Annonaceae são relatadas sementes com dormência morfofisiológica (Finneseth et al., 1998; Sautu et al., 2007; Silva et al., 2007), sementes em que parte da população tem dormência morfológica e, em outra parte, morfofisiológica (Chen et al., 2015) e sementes com dormência fisiológica (Ferreira et al., 2016). Muitos estudos focam o método de superação da dormência e não a explicação biológica do processo. Desta forma, esses estudos investigam a ação de giberelinas na superação da dormência, tais como em *Annona cherimola* (Smet et al., 1999), *Annona x atemoya* (Braga et al., 2010), *Xylopia aromatica* (Socolowski; Cicero, 2011), *Annona emarginata* (Corsato et al., 2012), *Annona squamosa* (Chagas et al., 2013) e *Annona coriacea* (Dresch et al., 2014). Também é verificado o efeito estimulante do frio (Dresch et al., 2014) e da pós maturação à seco (González-Esquinca et al., 2015), que podem atuar na superação do componente fisiológico da dormência nessas sementes.

2.4 *Annona cacans* WARM.

Annona cacans Warm., popularmente conhecido por ariticum-cagão, é uma árvore decídua e heliófita que pertence ao domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, sendo encontrada no Brasil e Paraguai (Grandtner; Chevrette, 2014). Suas flores são avermelhadas, com floração ocorrendo entre outubro e novembro; os frutos possuem aréolas apenas delimitadas e permanecem com coloração verde mesmo após a maturação, que ocorre de fevereiro a abril (Rainer 2001; Maas et al., 2001).

Annona cacans possui frutos saborosos, porém não muito recomendados para o consumo humano devido ao efeito purgativo que provoca diarreia (Grandtner; Chevrette, 2014). Mesmo assim, são muito procurados por aves, répteis e mamíferos, seus principais dispersores,

ajudando na recuperação ambiental (Carvalho, 2003). Seus frutos fazem parte da dieta de vários animais, tais como: *Tupinambis merianae* (Lagarto Teiú) (Castro; Galetti, 2004), *Tapirus terrestris* (Anta) (Tófoli et al., 2007) e *Penelope superciliaris* (Jacupemba) (Mikich, 2002).

Annona cacans é citado na farmacologia guarani pelas propriedades antirreumática e emoliente, sendo potencial para realização de pesquisas etnofarmacológicas (Noelli, 1998). A análise dos componentes químicos presentes no caule, casca, lenho e folhas de *Annona cacans*, constatou maior quantidade de flavonoides no verão e ausência destes compostos na primavera, época em que há a maior concentração de alcaloides, o qual tem seu teor diminuído significativamente no inverno, evidenciando a importância de estudos em diferentes épocas do ano (Saito; Oliveira, 1994). Nascimento et al. (2006) isolaram acetogeninas inéditas da madeira e dos frutos de *Annona cacans* e Farias et al. (2005) verificaram que apesar do óleo das sementes não exibirem atividade toxicológica nem citotóxica, o extrato hidroalcoólico apresentou significativa citotoxicidade, mesmo em pequenas concentrações.

CAPÍTULO 1
ARMAZENAMENTO DOS FRUTOS DE *Annona cacans* WARM. E SUA RELAÇÃO
COM A VIABILIDADE E DORMÊNCIA DE SEMENTES¹

¹Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico Seed Science Research.

Armazenamento dos frutos de *Annona cacans* Warm. e sua relação com a viabilidade e dormência de sementes

Resumo

Frutos carnosos quando permanecem em repouso após a coleta podem iniciar processo de fermentação da polpa. Este processo fermentativo facilita o beneficiamento das sementes, mas também pode ser prejudicial para a germinação das sementes. Neste estudo foi avaliado se o repouso dos frutos após a coleta foi prejudicial à germinabilidade e se influenciou a dormência das sementes de *Annona cacans*. Quando os frutos foram beneficiados no mesmo dia da coleta, as sementes apresentaram maior sincronização da germinação, já aos quatro dias de repouso houve aumento no conteúdo de fenóis e aumento das sementes dormentes. A partir dos seis dias o conteúdo de fenóis foi igual ao inicial iniciais e verificou-se aumento crescente das sementes mortas, devido ao aumento na acidez dos frutos. Desta forma, o repouso dos frutos é prejudicial à germinação de sementes de *Annona cacans*, sendo recomendado o seu beneficiamento imediato após a coleta dos frutos.

Palavras-chave: ácido acético, ariticum-cagão, fenóis, fermentação, germinação

Introdução

O tempo de repouso dos frutos após a coleta, muitas vezes, não é levado em consideração e, seu efeito sobre a germinação das sementes depende da espécie e das características de cada fruto. Alguns trabalhos relacionam o repouso dos frutos com aumento na germinabilidade de sementes (Passam et al., 2010; Mahajan; Kumawat, 2013), porém durante este repouso, por ação de bactérias, pode ocorrer fermentação dos frutos (Mamlouk; Gullo, 2013; Parmar; Rupasinghe, 2013), e produção de compostos que interferem na germinação das sementes, como o etanol, que pode causar aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio (Fukao; Bailey-Serres, 2004) e o ácido acético que é tóxico para a germinação das sementes (Himanen et al., 2012).

Durante a fermentação de alguns frutos como *Vitis vinifera* (uva Pinot noir), ocorre aumento no conteúdo de compostos fenólicos nas sementes (Gachons; Kennedy, 2003). Os compostos fenólicos representam mecanismo bioquímico em sementes dormentes, que ajudam na ação contra patógenos, mantendo sua longevidade, enquanto permanece no banco de

sementes (Fuerst et al., 2011). Estes compostos também estão relacionados à manutenção da dormência em sementes, pois quando localizados no tegumento, são oxidados e restringem a difusão do oxigênio até o embrião (Briggs et al., 2005), ou então, aumentam a espessura do tegumento, conferindo restrição mecânica ao crescimento embrionário (Wada et al., 2011).

Annona cacans possui frutos carnosos (Grandtner; Chevrette, 2014) e, sua fermentação é recomendada com a finalidade de facilitar o beneficiamento das sementes (Lorenzi, 2016). Contudo, ainda são desconhecidos os efeitos que a fermentação dos frutos pode causar na germinação das sementes desta espécie. Também é verificada a presença de compostos fenólicos (taninos), os quais podem ter relação com a dormência das sementes, uma vez que estas não responderam à aplicação exógena de GA₃ em estudos anteriores (Dalanhol et al., 2013).

Com base no proposto, hipotetizamos que o repouso dos frutos influencia na dormência das sementes de *Annona cacans*. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar se o repouso após a coleta dos frutos é prejudicial à germinabilidade e se influenciou na dormência das sementes de *Annona cacans*.

Material e Métodos

Material vegetal

Annona cacans Warm. (ariticum cagão) é uma árvore heliófita com 10 a 30 m de altura (Maas et al., 2001) que pertence ao domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, ocorrendo no Brasil e no Paraguai (Rainer, 2001). A floração ocorre em outubro e novembro e a frutificação entre fevereiro e abril, suas flores são avermelhadas e seus frutos são obovoides com aréolas apenas delimitadas (Maas et al., 2001). As sementes possuem coloração marrom e formato elipsoide, endosperma ruminado e embrião pequeno (Figura 1).



Figura 1. Fruto (A), sementes (B) e semente em corte longitudinal evidenciando o embrião (C, seta). Barras representam 1 cm (A e B) e 1 mm (C).

As sementes foram secas em ambiente de laboratório ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) até atingirem entre 10% e 12% de umidade, com a finalidade de melhorar sua resposta a tratamentos de superação da dormência, antes da instalação dos experimentos.

Foi coletado material vegetal em época reprodutiva, o qual foi herborizado e tombado no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (n° 359684) e no herbário BOTU - Irina Delanova Gemtchujnicóv (n° 32452).

Superação da dormência com reguladores vegetais e escarificação mecânica

Frutos de *Annona cacans* foram coletados do chão, após queda espontânea em dez matrizes localizadas no município de Toledo, Paraná, Brasil ($24^{\circ}42'S$; $53^{\circ}44'W$). Seguindo as recomendações de Lorenzi (2016), os frutos foram mantidos em repouso após a coleta até iniciar o apodrecimento da polpa, que facilita o beneficiamento das sementes, realizado em laboratório com ajuda de peneira e água corrente.

Reguladores vegetais foram usados com a finalidade de promover a germinação das sementes, definindo-se o tempo de imersão das sementes nos reguladores de acordo com o período de duração da primeira fase da curva de aquisição de água (embebição). Para tanto, utilizou-se o método gravimétrico com quatro repetições de 50 sementes intactas, que foram imersas em água com aeração constante, pesadas a cada duas horas nas primeiras 24 horas, a cada quatro horas até completarem 48 horas e a cada oito horas até atingirem 96 horas. Ao final, as sementes foram secas em estufa à $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ para determinação do teor de água.

Com base no tempo determinado na curva de aquisição de água (28h), foram testados dois reguladores vegetais: GA₃ e GA₄₊₇₊₆-Benziladenina (BA), com seis condições: sem embebição e embebição em 0, 250, 500, 1000 e 1500 mg L⁻¹ i.a. As sementes também foram testadas com e sem escarificação mecânica (desponte com navalha) (Lorenzi, 2016), perfazendo um fatorial triplo (2 reguladores x 6 condições de embebição x 2 condições de escarificação), com quatro repetições de 50 sementes por tratamento.

As sementes foram dispostas em rolos de papel para germinação e mantidas em germinador com fotoperíodo e temperatura alternados, sendo 16 horas a 30°C na luz e 8 horas a 20°C no escuro (Costa et al., 2011). Considerou-se como germinadas as sementes com no mínimo 2 mm de raiz primária (Hadas, 1976). Foram determinados a porcentagem de germinação (%G), o tempo médio de germinação (T₅₀) (Bewley et al., 2013), o índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962) e a frequência germinativa (%F) (Laboriau; Agudo, 1987), utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\%G = \left(\frac{\sum N}{n^{\circ} \text{ total de sementes}} \right) * 100$$

$$IVG = \sum \left(\frac{N}{T} \right)$$

$$T_{50} = \frac{\sum (N * T)}{\sum N}$$

$$\%F = \frac{N}{\sum N} * 100$$

Onde:

N- número de sementes germinadas por dia;

T- dias após a instalação do experimento;

Efeito do repouso após a coleta dos frutos na germinação e dormência

Devido à baixa germinação observada no experimento de superação da dormência, inferiu-se que o repouso dos frutos após a coleta mesmo sendo recomendado para facilitar o beneficiamento das sementes, poderia estar prejudicando a germinabilidade das sementes e, por este motivo, foi realizado o estudo do efeito desse repouso sobre a germinação.

Foram coletados frutos após a queda espontânea, maduros e com casca de coloração verde (Figura 1 – A). Em seguida, parte destes foi despulpado imediatamente, caracterizando o tempo zero, e o restante foi armazenado em sacos de polietileno pretos à temperatura ambiente (25°C ± 2°C) por 2, 4, 6, 8 e 10 dias e, em seguida, beneficiados. Para avaliar a germinação das sementes, primeiramente aplicou-se o método de superação da dormência, no qual as sementes foram escarificadas e embebidas em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇₊₆-Benziladenina (definido no item anterior). Posteriormente, as sementes foram dispostas em rolos de papel para germinação (quatro repetições de 50 sementes) e mantidas em germinador com fotoperíodo e temperatura

alternados, sendo 16 horas a 30°C na luz e 8 horas a 20°C no escuro (Costa et al., 2011). Considerou-se como germinadas as sementes com no mínimo 2 mm de raiz primária (Hadas, 1976).

Foram determinados a porcentagem de germinação, o tempo médio de germinação, o índice de velocidade de germinação e a frequência germinativa seguindo as fórmulas citadas anteriormente. Determinou-se o teor de fenóis totais das sementes após cada período de repouso (Blainski et al., 2013). Procedeu-se ao teste de tetrazólio (1%, 2 horas, 30°C) nas sementes restantes ao final do teste (60 dias), obtendo-se a porcentagem de sementes dormentes (vivas), e a porcentagem de sementes mortas (Gimenez et al., 2014). Também se determinou a sincronização (U) (Laboriau; Agudo, 1987) pela fórmula abaixo.

$$U = \sum \left[\left(\frac{N}{\sum N} \right) * \log \left(\frac{N}{\sum N} \right) \right], \text{ onde: } N - \text{ número de sementes germinadas por dia.}$$

Características químicas dos frutos submetidos ao repouso após a coleta

O pH foi determinado com auxílio de pHmetro digital e o teor de sólidos solúveis (°Brix) foi obtido por meio de refratômetro. Utilizaram-se três repetições de um fruto (aprox. 400 g) para cada medida.

Para a acidez total titulável, foram pesadas três repetições de 5 g de polpa triturada, as quais foram tituladas com NaOH 0,1 N. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido acético por grama de massa fresca (mg AcOH g MF⁻¹), utilizando-se a seguinte fórmula: Acidez = V*N*Eq/P, onde: V: volume gasto em NaOH (mL); N: normalidade do NaOH (0,1 N); Eq: equivalente grama do ácido acético (60,05 g); P: peso da amostra (g) (Brasil, 2011).

A atividade respiratória (liberação de CO₂) foi determinada pelo aparelho de Pettenkofer (Müller, 1964), utilizando-se três repetições de 100 g de frutos. Neste método, o ar ambiente impulsionado por um aerador foi “lavado” em dois frascos com NaOH 25%, nos quais o CO₂ do ambiente fica retido, em um terceiro frasco foi colocada a amostra e no último frasco o CO₂ proveniente da amostra foi fixado em uma solução de 100 mL de Ba(OH)₂ 0,1N. Após uma hora, três alíquotas de 10 mL foram tituladas com HCl 0,05N. Para o branco foi feito o mesmo procedimento com o frasco da amostra vazio. Os resultados foram expressos em miligramas de CO₂ fixados por grama de massa fresca por hora (mg CO₂ g MF⁻¹ h⁻¹), utilizando-se a seguinte fórmula: AR = [(B-V)*10]*N*22/P, onde: AR: atividade respiratória; B: volume de HCl gasto na titulação do branco (mL); V: volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL); N: normalidade do HCl (0,05 N); P: peso da amostra (g).

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos. As que se mostraram homogêneas foram submetidas ao teste F (ANOVA) e suas médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0.05$). Os dados não homogêneos foram transformados para a realização da análise estatística, porém nas tabelas e gráficos mantiveram-se os dados originais. Para as características químicas dos frutos, com a finalidade de se observar a tendência dos dados ao longo do tempo, procedeu-se à regressão polinomial.

Resultados

Superação da dormência com reguladores vegetais e escarificação mecânica

Para a curva de aquisição de água, observou-se que as sementes, com umidade inicial de 10,5%, absorveram água rapidamente, atingindo 22% de umidade após 28 horas de imersão e estabilizando-se nas horas seguintes (Figura 2). Portanto, a primeira fase da aquisição de água pelas sementes (embebição) apresentou duração de 28 horas, tempo este usado na imersão das sementes em água e nos reguladores.

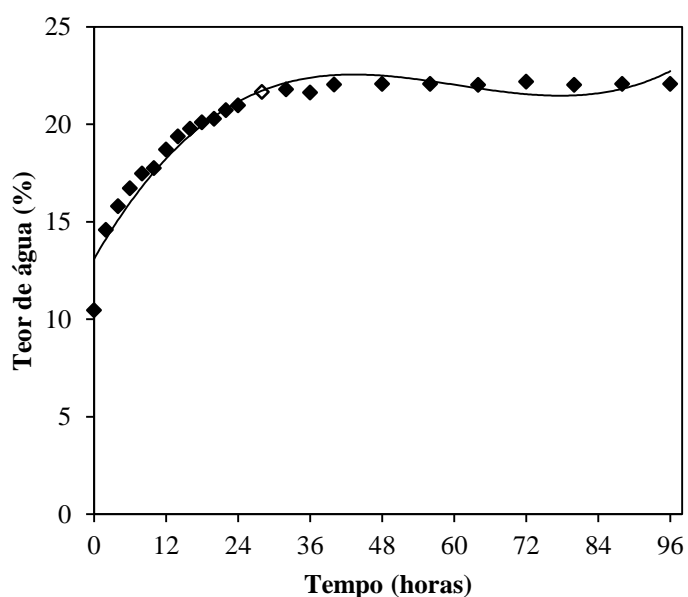


Figura 2. Curva de aquisição de água em sementes de *Annona cacans*. Losango aberto indica o momento de estabilização da curva ou o final da fase I após 28 horas de imersão em água.

Para a porcentagem de germinação, tempo médio de germinação e índice de velocidade de germinação não foi observada interação tripla entre os fatores estudados, porém a interação dupla foi verificada entre os fatores escarificação e condição de embebição. O fator regulador tanto isolado como em interação com outros fatores não foi significativo pelo teste F (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância para as variáveis porcentagem de germinação (%G), tempo médio de germinação (T₅₀) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Annona cacans* escarificadas ou não, sem embebição prévia e embebidas em 0, 250, 500, 1000 e 1500 mg L⁻¹ dos reguladores GA₃ ou GA₄₊₇₊₆-Benziladenina.

	Quadrados médios		
	%G	T ₅₀	IVG
Regulador (F1)	0,04 ^{ns}	99,3 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Escarificação (F2)	900,4 ^{**}	914,2 ^{**}	1,32 ^{**}
Condição de Embebição (F3)	88,44 ^{**}	1629,1 ^{**}	0,12 ^{**}
F1xF2	0,04 ^{ns}	119,9 ^{ns}	0,001 ^{ns}
F1xF3	4,44 ^{ns}	90,4 ^{ns}	0,002 ^{ns}
F2xF3	30,97 ^{**}	4337,3 ^{**}	0,028 [*]
F1xF2xF3	4,64 ^{ns}	38,8 ^{ns}	0,002 ^{ns}
CVexp. (%)	61,3	20,2	42,7

^{ns} não significativo, * e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F. CVexp.(%) – coeficiente de variação experimental.

A escarificação promoveu a germinação das sementes, aumentando sua velocidade média e diminuindo seu tempo médio de germinação. Quando as sementes foram escarificadas e, em seguida, embebidas em regulador, as sementes apresentaram cerca de 10% de germinação e 0,3 de índice de velocidade, significativamente superior àquelas que foram só escarificadas ou só embebidas no regulador que apresentaram no máximo 3% de germinação e 0,1 de índice de velocidade. As sementes intactas sem embebição ou embebidas em água não germinaram (Figura 3).

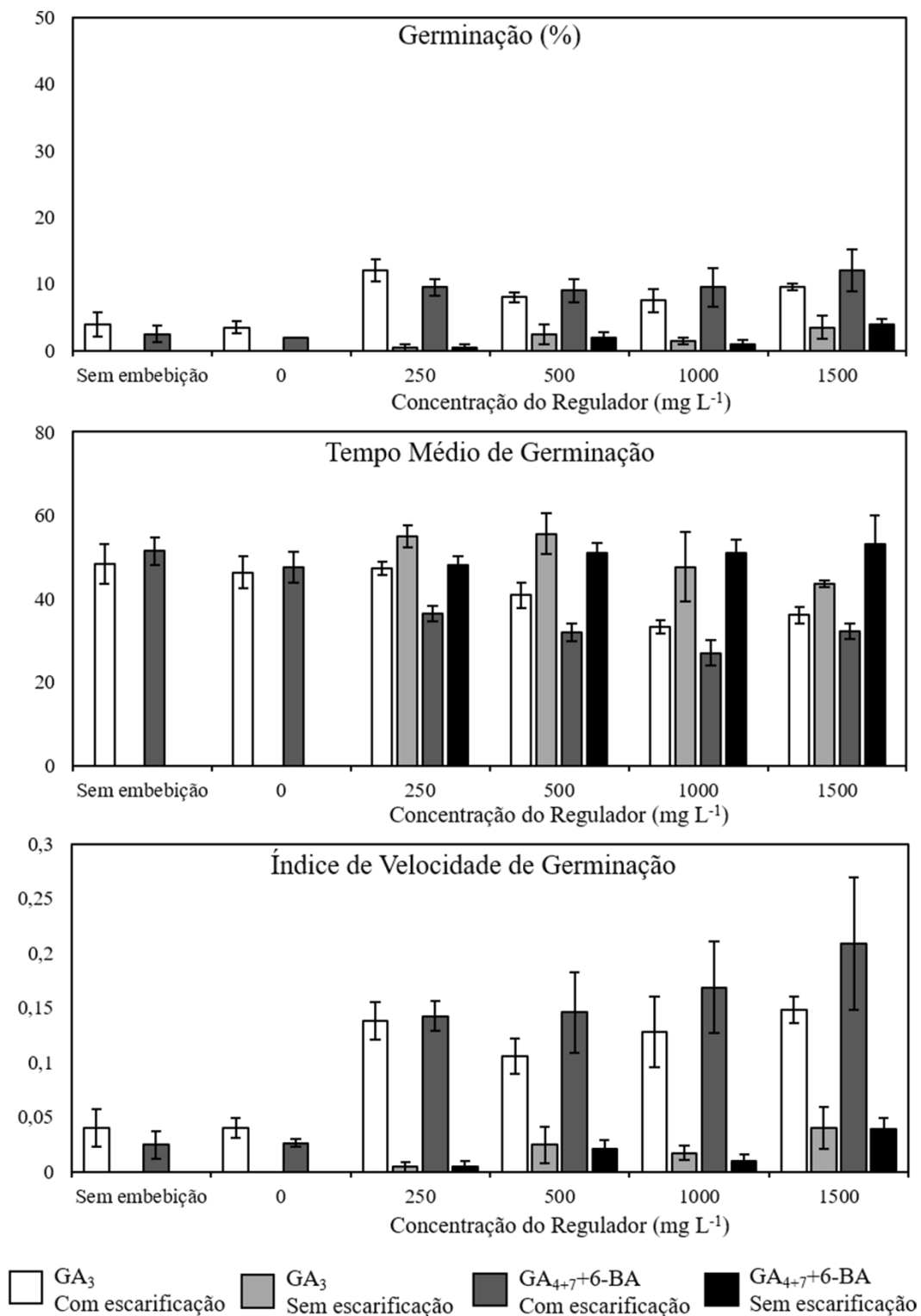


Figura 3. Germinação (%), tempo médio de germinação e índice de velocidade de germinação em sementes de *Annona cacans* escarificadas ou não, sem embebição e embebidas em 0, 250, 500, 1000 e 1500 mg L⁻¹ de GA₃ ou GA_{4+7+6-BA}. Barras representam erro padrão.

Nas sementes escarificadas, a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações de reguladores 250, 500, 1000 e 1500, porém todas essas apresentaram maiores resultados que as sementes sem embebição prévia ou embebidas em água deionizada. Os menores tempos médios de germinação foram observados quando as sementes foram escarificadas e embebidas nas concentrações de 500, 1000 e 1500 mg L⁻¹, independente do regulador utilizado (Figura 3).

Mesmo não sendo observada diferença significativa na porcentagem, no tempo médio e no índice de velocidade de germinação entre os dois reguladores utilizados, constata-se pela frequência que a germinação das sementes se concentrou em um período menor de tempo nas sementes embebidas em 500 mg L⁻¹ GA₄₊₇+6-Benziladenina (Figura 4-F). Devido a isso, definiu-se este tratamento como método de superação de dormência nos experimentos subsequentes.

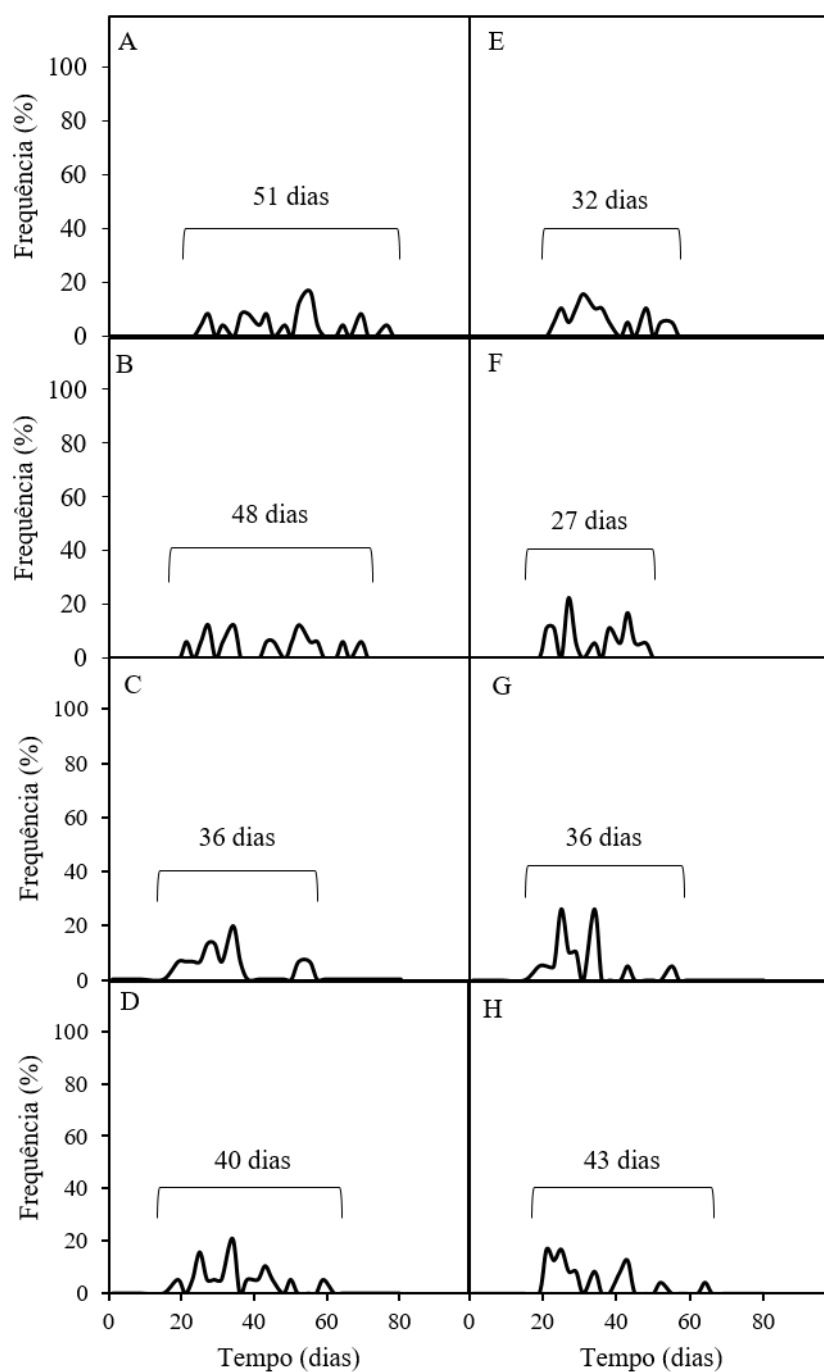


Figura 4. Frequência germinativa em sementes de *Annona cacans* escarificadas e embebidas em 250 (A, E), 500 (B, F), 1000 (C, G) e 1500 (D, H) mg L⁻¹ de GA₃ (A-D) ou GA₄₊₇₊₆-Benziladenina (E-H).

Efeito do repouso após a coleta dos frutos na germinação e dormência

Quando os frutos foram submetidos ao repouso após a coleta, as variáveis estudadas foram significativas ao nível de 1% de probabilidade de erro (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância para as variáveis porcentagem de germinação (%G), tempo médio de germinação (T₅₀), índice de velocidade de germinação (IVG), sincronização (U), porcentagem de sementes dormentes (%D), porcentagem de sementes mortas (%M) e teor de fenóis totais (%FT) em sementes de *Annona cacans* provenientes de frutos submetidos ao repouso após a coleta.

	Quadrados médios	Coefficiente de variação (%)
%G	2507,0**	11,6
T ₅₀	106,0**	8,5
IVG	2,01**	13,5
U	1,35**	8,7
%D	34,3**	35,2
%M	1172,5**	17,7
%FT	0,006**	3,74

** significativo ao nível 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

Observou-se diminuição na porcentagem e na velocidade de germinação das sementes quando ficaram seis dias ou mais nos frutos após a coleta, enquanto que o tempo de germinação e o número de sementes mortas aumentaram. Para as sementes dormentes, observou-se um pico aos quatro dias de repouso após a coleta dos frutos, coincidindo com o teor de fenóis totais nas sementes nessa mesma época (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de germinação (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de sementes dormentes (%D), porcentagem de sementes mortas (%M) e teor de fenóis totais (%FT) em sementes de *Annona cacans* provenientes de frutos armazenados por zero, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a coleta. Antes da semeadura as sementes foram escarificadas e embebidas em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇+BA.

	%G	TMG	IVG	%D	%M	%FT
Tempo Zero	85,5 a	20,9 c	2,2 a	0,5 c	14,0 c	0,62 b
2 dias	88,5 a	26,0 bc	1,9 a	5,5 ab	6,0 c	0,64 b
4 dias	82,0 a	24,0 c	1,9 a	9,0 a	9,0 c	0,70 a
6 dias	56,0 b	30,0 ab	1,1 b	6,5 ab	37,5 b	0,60 b
8 dias	54,5 b	32,0 a	1,0 b	4,5 b	41,0 b	0,60 b
10 dias	24,0 c	34,5 a	0,4 c	3,0 bc	73,0 a	0,63 b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p<0.05).

As sementes que foram beneficiadas imediatamente após a coleta dos frutos (tempo zero) apresentaram maior sincronização da germinação, na qual observou-se valores significativamente menores aos demais tratamentos (Figura 5), lembrando que quanto menores os valores, maior é a sincronização. A frequência de germinação destas sementes se concentrou aos 16 dias, apresentando uma curva unimodal, ou seja, com uma germinação mais uniforme, ao contrário dos demais tempo de repouso dos frutos, nos quais observaram-se curvas polimodais, com vários picos, o que caracteriza uma desuniformidade na germinação (Figura 5).

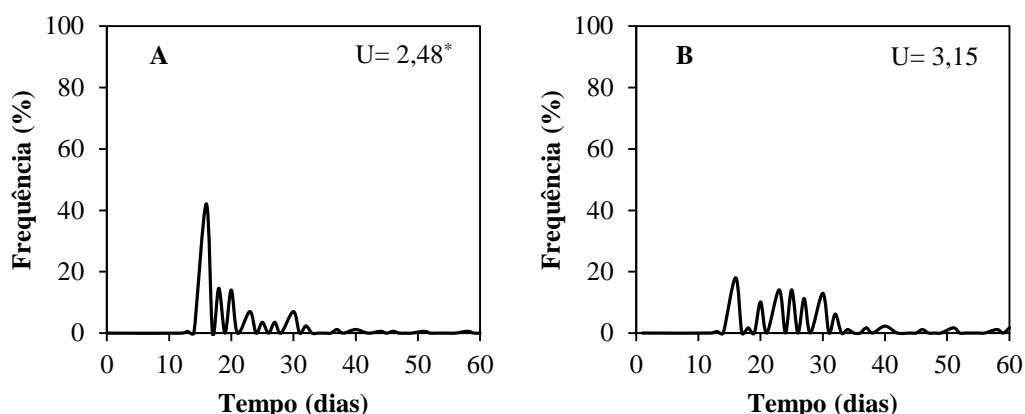


Figura 5. Frequência germinativa e sincronização (U) em sementes de *Annona cacans* provenientes de frutos recém colhidos (A) e armazenados por 2 dias (B). *Significativo pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

Características químicas dos frutos submetidos ao repouso após a coleta

Para as características químicas dos frutos todas as variáveis estudadas foram significativas ao nível de 1% de probabilidade de erro (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância para as variáveis pH, teor de sólidos solúveis (TSS), acidez e atividade respiratória (AR) de frutos de *Annona cacans* submetidos ao repouso após a coleta.

	Quadrados médios	Coefficiente de variação (%)
pH	0,85**	2,7
TSS	57,9**	11,1
Acidez	53,2**	2,3
AR	0,007**	25,5

** significativo ao nível 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

Observou-se um pico na liberação de CO₂ após quatro dias de armazenamento dos frutos. Nesta mesma época também se verificou aumento na acidez e diminuição do pH e do teor de sólidos solúveis (Figura 6).

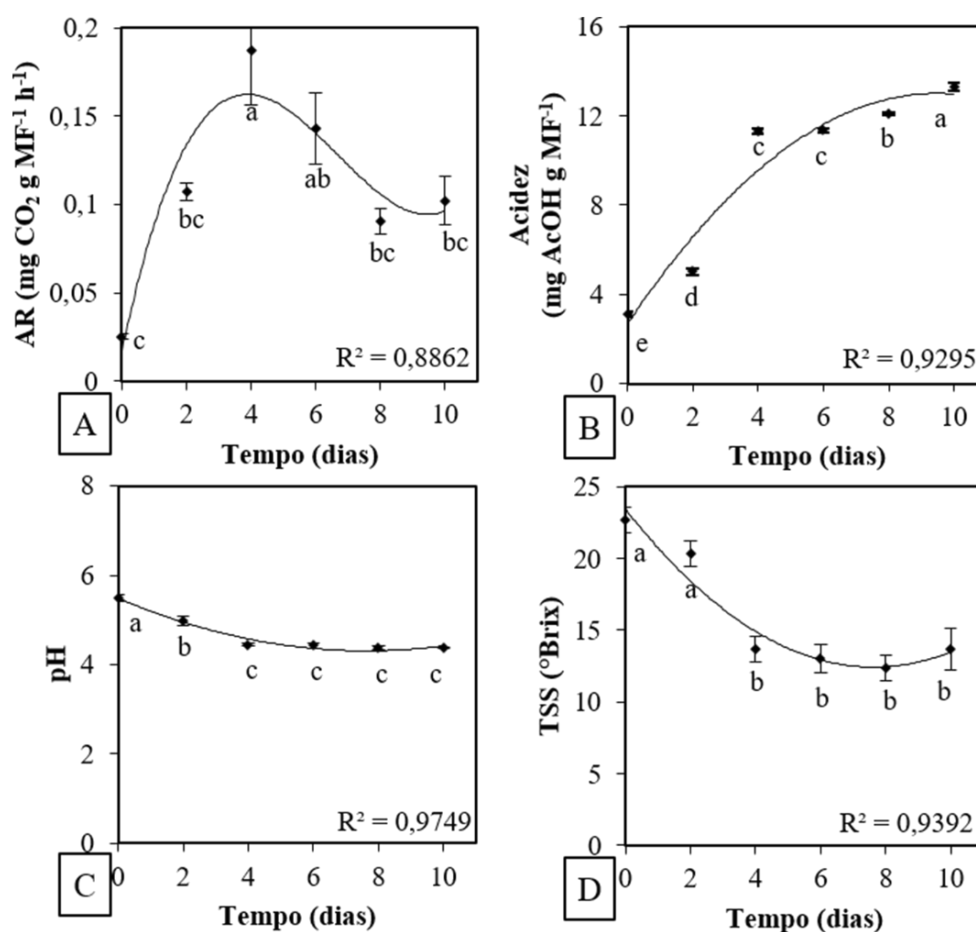


Figura 6. Atividade respiratória (AR) (A), acidez (B), pH (C) e teor de sólidos solúveis (TSS) (D) em frutos de *Annona cacans* recém colhidos ou submetidos ao repouso após a coleta por 2, 4, 6, 8 e 10 dias. Letras iguais não diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Barras representam erro padrão. Ajuste de equação: AR polinomial cúbica; Acidez, pH e TSS polinomial quadrática.

Discussão

A escarificação associada com a embebição em GA₄₊₇+6-BA apresentou efeito significativo no aumento da germinação das sementes de *Annona cacans* e estes resultados são apoiados pela observação da germinação de outras espécies da família Annonaceae. O efeito estimulante de giberelinas na superação da dormência foi constatado em *Annona cherimola* (Smet et al., 1999), *Annona crassiflora* (Silva et al., 2007), atemoia (híbrido *Annona squamosa* X *Annona cherimola*) (Braga et al., 2010), *Xylopia aromatica* (Socolowski; Cicero, 2011), *Annona emarginata* (Corsato et al., 2012), *Annona squamosa* (Chagas et al., 2013), *Annona coriacea* (Dresch et al., 2014), *Annona macrophyllata* e *Annona purpurea* (Ferreira et al., 2016). A escarificação foi relatada como um bom método de superação de dormência para as

espécies *Annona cherimola* (Smet et al., 1999), *Annona muricata*, *Annona senegalensis* (Sagna et al., 2012) e *Annona squamosa* (Sagna et al., 2012; Chagas et al., 2013).

Apesar de apresentar efeito significativo no aumento da germinação das sementes, a escarificação e a embebição em regulador promoveram a germinação de apenas 10% das sementes, desta forma, pode-se verificar que sementes de *Annona cacans* também tem sua germinação reduzida em função do repouso dos frutos após a coleta. Devido às características da curva de liberação de CO₂ dos frutos e de degradação de sólidos solúveis (Figura 6), pode-se inferir que os mesmos estariam em processo fermentativo, o qual é caracterizado por um processo de respiração anaeróbica que libera CO₂ e produz etanol (Fukao; Bailey-Serres, 2004). Além disso, este etanol também poderia ser oxidado a ácido acético (Mamlouk; Gullo, 2013), o que poderia contribuir com o aumento da acidez nos frutos observado neste estudo.

Estes ácidos orgânicos causam danos nas membranas celulares (Armstrong; Armstrong, 2001), o que leva à perda da viabilidade das sementes (Ratajczak; Pukacka, 2005), devido à lixiviação de compostos essenciais para o metabolismo celular como açúcares, aminoácidos e nutrientes (Rahoui et al., 2010), provocando morte celular. Porém, estes efeitos deletérios, como perda de germinabilidade, só são observados quando há alta concentração desses ácidos (Tunes et al., 2012; Himanen et al., 2012) e isto concorda com os dados observados neste estudo, pois somente após os quatro dias de repouso, quando houve aumento considerável na acidez é que foram verificadas quedas nas variáveis germinativas e aumento da mortalidade das sementes. Além da acidez, a exposição das sementes a baixos valores de pH também prejudica a germinação das sementes, pois quando o pH chegou a cerca de 4,4 observou-se redução significativa da germinação das sementes (Tabela 3). Este comportamento é similar a outras espécies (*Paulownia tomentosa*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Trifolium repens* e *Medicago sativa* ssp. *falcata* x ssp. *sativa*), nas quais a germinação foi diminuída ou não ocorreu em meios com pH menores que 4,5 (Turner et al., 1988; Deska et al., 2011).

Apesar de não prejudicar a germinabilidade das sementes até os quatro dias, o repouso dos frutos neste período causou um aumento no número de sementes dormentes que coincidiu com um aumento no conteúdo de fenóis, demonstrando que de alguma maneira o repouso dos frutos desencadeou algum efeito que causou o aumento dos fenóis nas sementes e consequentemente aumentou sua dormência. A partir dos quatro dias de repouso dos frutos, o teor de fenóis totais voltou a cair. Isto pode ser decorrente do fato de ácidos ajudarem na degradação de fenóis nas sementes (Wada et al., 2011) e, a partir dessa época, verifica-se aumento na acidez dos frutos, como também, diminuição no pH, indicando que a concentração

de ácidos nos frutos era grande, o que pode ter degradado parte dos fenóis localizados nas sementes.

O repouso após a coleta dos frutos por até os quatro dias causa aumento na dormência das sementes, mas a partir deste momento, observa-se perda gradativa da viabilidade das sementes conforme o tempo que estas permanecem nos frutos. Desta forma, constata-se que o repouso após a coleta é prejudicial à germinação de sementes de *Annona cacans*, ao contrário do observado em outras espécies como *Solanun melongena* (Passam et al., 2010) e *Citrullus colocynthis* (Mahajan; Kumawat, 2013), demonstrando que diferentes espécies, apesar de terem frutos carnosos, podem apresentar comportamentos distintos durante o repouso após a coleta dos frutos. Os dados certificam a importância do beneficiamento dos frutos de *Annona cacans* no mesmo dia da coleta, fato que muitas vezes não ocorre, pois às vezes o local de coleta é distante do laboratório de análises, fazendo com que os frutos permaneçam em repouso por alguns dias até o efetivo despulpamento e retirada das sementes.

Além disso, existe a falsa ideia de que o repouso dos frutos não altera a germinação das sementes, porém este efeito negativo do repouso precisa ser levado em consideração, pois como observado no presente estudo, pode ser prejudicial à germinação das sementes. Isto pode acarretar em erros de interpretação em estudos de germinação, pois pode-se imaginar que as sementes apresentam dormência muito difícil de ser superada, quando na realidade a baixa germinação pode ser efeito do repouso dos frutos. Desta forma, conclui-se que sementes de *Annona cacans* não toleram o repouso após a coleta dos frutos, observando-se perda gradual primeiramente no vigor e, em seguida, na viabilidade das sementes, conforme o tempo que permanecem nos frutos.

Referências

- Armstrong, J. and Armstrong, W.** (2001) Rice and Phragmites: Effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *American Journal of Botany*, 88(8), 1359–1370.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M. and Nonogaki, H.** (2013) *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy* (3rd ed.). New York: Elsevier.
- Blainski, A., Lopes, G. C. and De Mello, J. C. P.** (2013) Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865.

- Braga, J.F., Ferreira, G., Pinho, S.Z. and Sousa, M.P.** (2010) Germination of atemoya (*Annona cherimola* Mill . X *A. Squamosa* L.) Cv . Gefner seeds subjected to treatments with plant growth regulators. *International Journal of Science and Nature* 1, 120–126.
- Brasil** (2011) *Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres* (método 10 – acidez total titulável). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Briggs, C. L., Morris, E. C. and Ashford, A. E.** (2005) Investigations into seed dormancy in *Grevillea linearifolia*, *G. buxifolia* and *G. sericea*: Anatomy and histochemistry of the seed coat. *Annals of Botany*, 96(6), 965–980.
- Chagas, P.C., Sobral, S.T.M., Oliveira, R.R. de, Chagas, E.A., Pio, R. and Santos, V.A.** (2013) Physical and chemical methods to breach seed dormancy of sugar apple. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 56, 1–6.
- Corsato, J.M., Ferreira, G. and Barbedo, C.J.** (2012) Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer and action of plant growth regulators on germination. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24, 253–260.
- Costa, P.N., Bueno, S.S.C., Ferreira, G.** (2011) Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H.Rainer em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33, 253–260.
- Dalanhol, S. J., Mombach, T. C., Toderke, M. L., Nogueira, A. V. and Bortolini, M. F.** (2013) Dormência em sementes de *Annona cacans* Warm. (Annonaceae). *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias E Ambientais*, 11(sup1), S183–S189.
- Deska, J., Jankowski, K., Bombik, A. and Jankowska, J.** (2011) Effect of growing medium pH on germination and initial development of some grassland plants. *Acta Scientiarum Polonorum Seria Agricultura* 10, 45–56.
- Dresch, D.M., Scalon, S.P., Q. and Masetto, T.E.** (2014) Effect of storage in overcoming seed dormancy of *Annona coriacea* Mart. seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86, 2077–2085.
- Ferreira, G., De-La-Cruz-Chacón, I. and González-Esquinca, A.R.** (2016) Overcoming seed dormancy in *Annona macrophyllata* and *Annona purpurea* using plant growth regulators. *Revista Brasileira de Fruticultura* 38, e-234.
- Fuerst, E. P., Anderson, J. V., Kennedy, A. C. and Gallagher, R. S.** (2011) Induction of Polyphenol Oxidase Activity in Dormant Wild Oat (*Avena fatua*) Seeds and Caryopses: A Defense Response to Seed Decay Fungi. *Weed Science*, 59(2), 137–144.
- Fukao, T. and Bailey-Serres, J.** (2004) Plant responses to hypoxia - Is survival a balancing act? *Trends in Plant Science*, 9(9), 449–456.
- Gachons, C. P. and Kennedy, J. A.** (2003) Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5877–5881.

- Jimenez, J. I., Ferreira, G. and Cavariani, C.** (2014) Tetrazolium test for assessment of seed viability of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). *Journal of Seed Science*, 36(4), 357–361.
- Grandtner, M. M. and Chevrette, J.** (2014) *Dictionary of trees: South America. Nomenclature, Taxonomy and Ecology* (2nd edition). New York: Elsevier.
- Hadas, A.** (1976) Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. *Journal of Experimental Botany* 27, 480-489.
- Himanen, M., Prochazka, P., Hänninen, K. and Oikari, A.** (2012) Phytotoxicity of low-weight carboxylic acids. *Chemosphere*, 88(4), 426–431.
- Labouriau, L. G. and Agudo, M.** (1987) On the physiology of seed germination in *S. hispanica* L. Temperature effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 59(1), 37-56.
- Lorenzi, H.** (2016) *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. V. 1, 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Maas, P. J. M., Kamer, H. M. De, Junikka, L., Mello-silva, R. De and Rainer, H.** (2001) Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, 52(80), 65-98.
- Maguire, J. D.** (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.
- Mahajan, S. S. and Kumawat, R. N.** (2013). Study of Seed Dormancy in Colocynth (*Citrullus colocynthis* L.) with After-Ripening of Fruits, Seed Extraction Procedures and Period of Seed Storage. *National Academy Science Letters*, 36(4), 373–378.
- Mamlouk, D. and Gullo, M.** (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377–384.
- Müller, L. E.** (1964) *Manual de Laboratório de Fisiologia Vegetal*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.. Turrialba, Costa Rica.
- Parmar, I. and Rupasinghe, H. P. V.** (2013) Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 130, 613–620.
- Passam, H. C., Makrogianni, D., Gregoriou, F., and Karapanos, I. C.** (2010). The Size and Germination of Eggplant Seed in Relation To Fruit Maturity At Harvest, After-Ripening and Ethylene Application. *Analele Universitatii Din Oradea - Fascicula Biologie*, 17(2), 225–229.
- Rahoui, S., Chaoui, A. and Ferjani, E. El.** (2010) Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. *Journal of Hazardous Materials*, 178, 1128–1131.

- Rainer, H.** (2001) Nomenclatural and taxonomic notes on *Annona* (Annonaceae). *Annalen Des Naturhistorischen Museums in Wien*, 103 B, 513–524.
- Ratajczak, E. and Pukacka, S.** (2005) Decrease in beech *Fagus sylvatica* seed viability caused by temperature and humidity conditions as related to membrane damage and lipid composition. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(1), 3–12.
- Sagna, M., Ba, O. and Sy, M.O.** (2012) Germination Capacity of Annonaceae Seeds (*Annona muricata* L., *A. squamosa* L. and *A. senegalensis* Pers.) Cultivated Under Axenic Conditions. *International Journal of Science and Advanced Technology* 2, 21–34.
- Silva, E.A.A., De Melo, D.L.B., Davide, A.C., De Bode, N., Abreu, G.B., Faria, J.M.R. and Hilhorst, H.W.M.** (2007) Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Annals of Botany* 99, 823–830.
- Smet, S. de, Damme, P. Van, Scheldeman, X. and Romero, J.** (1999). Seed Structure and Germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Acta Horticulturae* 497, 269–278.
- Socolowski, F. and Cicero, S.M.** (2011) Use of growth regulators to overcome seed dormancy in *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Seed Science and Technology* 39, 21–28.
- Tunes, L.M. de, Avelar, S.A.G., Barros, A.C.S.A., Pedroso, D.C., Muniz, M.F.B. and Menezes, N.L.** (2012) Critical levels of organic acids on seed germination and seedling growth of wheat. *Revista Brasileira de Sementes* 34, 366–372.
- Turner, B.Y.G.D., Lau, R.R. and Young, D.R.** (1988) Effect of acidity on germination and seedling growth of *Paulownia tomentosa*. *Journal of Applied Ecology* 25, 561–567.
- Wada, S., Kennedy, J. A. and Reed, B. M.** (2011) Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Scientia Horticulturae*, 130(4), 762–768.

CAPÍTULO 2
LIMITAÇÃO ÀS TROCAS GASOSAS NO TEGUMENTO E MANUTENÇÃO DA
DORMÊNCIA EM SEMENTES DE *Annona cacans* WARM.¹

¹Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico Annals of Botany.

Limitação às trocas gasosas no tegumento e manutenção da dormência em sementes de *Annona cacans* Warm.

• **Contexto e Objetivo** Ao contrário do observado em várias espécies da família Annonaceae, em *Annona cacans* somente a embebição em giberelinas não é capaz de superar a dormência das sementes e, mesmo sendo permeáveis à água, é sugerida a escarificação das sementes, o que se deve possivelmente aos compostos fenólicos presentes na sua composição. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar se os compostos fenólicos no tegumento são responsáveis pela dormência de sementes de *Annona cacans*.

• **Métodos** Investigou-se a relação dos compostos fenólicos com a dormência das sementes, estudando o efeito da escarificação e da embebição em regulador nas sementes ao longo do tempo. Para tanto, foram avaliados a germinabilidade, a anatomia das sementes, o teor de fenóis totais, a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), a atividade respiratória das sementes, o hormônio GA₄ e a atividade de enzimas hidrolíticas (atividade amilolítica, lipolítica e proteolítica total e atividade da α -amilase).

• **Resultados Chave** O teor de fenóis totais e a atividade da PPO no tegumento foram constantes, desta forma, quando as sementes foram escarificadas, ocorreu aumento na atividade respiratória e maior entrada de GA₄ nas sementes, aumentando na atividade de enzimas hidrolíticas e culminando na superação da dormência nessas sementes.

• **Conclusão** O tegumento intacto de sementes de *Annona cacans* promove condição natural de hipóxia ao embrião, o que contribui para a manutenção da dormência nessas sementes.

Palavras-chave: compostos fenólicos, enzimas hidrolíticas, giberelina, hipóxia, oxigênio.

INTRODUÇÃO

As sementes de espécies da família Annonaceae geralmente são sensíveis à aplicação exógena de giberelinas, que podem atuar na superação da dormência, como observado em *Annona cherimola* (Smet et al., 1999), *Annona crassiflora* (Silva et al., 2007), *Annona cherimola* x *A. squamosa* (Braga et al., 2010), *Xylopia aromatica* (Socolowski; Cicero, 2011), *Annona emarginata* (Corsato et al., 2012), *Annona squamosa* (Chagas et al., 2013), *Annona coriacea* (Dresch et al., 2014), *Annona macrophyllata* e *Annona purpurea* (Ferreira et al., 2016). No entanto, em *Annona cacans* somente a embebição em giberelinas não é capaz de

superar a dormência das sementes, sendo necessário também escarificá-las (SJ Dalanhol, UNESP, BR, unpubl. res.; Capítulo 1).

Considerando-se que sementes intactas de Annonaceae absorvem água (Ferreira et al., 2014; Gimenez et al., 2014b) e em *Annona cacans*, sementes intactas ou escarificadas possuem o mesmo padrão de absorção de água (Dalanhol et al., 2013), o efeito do tegumento na dormência das sementes pode estar relacionado à limitação do crescimento do embrião pela restrição mecânica à emergência da raiz primária, pela interferência nas trocas gasosas, pelo suprimento ou bloqueio à saída de inibidores de germinação e ainda agindo como um filtro de luz (Debeaujon et al., 2007).

Com exceção de restrição à entrada de água, os efeitos inibitórios causados pelas estruturas que circundam o embrião podem ser decorrentes da presença de compostos fenólicos nestes tecidos (Debeaujon et al., 2007). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários caracterizados por conter um ou mais radicais hidroxila ligados a um anel aromático. Estas hidroxilas podem ser oxidadas pela atividade da polifenoloxidase formando uma quinona (Mayer, 2006). Quando presentes nas camadas de revestimento das sementes podem fixar o oxigênio, reduzindo sua difusão para o embrião (Lenoir et al., 1986; Debeaujon et al., 2007; Bradford et al., 2008).

Esta hipóxia natural promovida pelas camadas que cobrem a semente ajuda na manutenção da dormência, não pela incapacidade do embrião em produzir energia, mas por aumentar sua sensibilidade ao ácido abscísico (ABA) (Benech-Arnold et al., 2006) ou impedir seu catabolismo (Nambara; Marion-Poll, 2005) e também, pode exigir elevadas concentrações de giberelinas (GAs) para promover a germinação (Bradford et al., 2008). Estes hormônios vegetais (ABA e GAs) possuem efeitos antagonistas e são os principais responsáveis pela regulação da germinação e dormência das sementes (Shu et al., 2016), sendo que as GAs promovem a germinação aumentando o potencial de crescimento do embrião e induzindo a síntese de enzimas que causam o enfraquecimento dos tecidos que envolvem a radícula (Kucera et al., 2005).

Com base no proposto, hipotetizamos que a oxidação dos compostos fenólicos diminui a atividade respiratória e a sensibilidade às giberelinas resultando na manutenção da dormência de sementes de *Annona cacans*. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar se os compostos fenólicos no tegumento são responsáveis pela dormência de sementes de *Annona cacans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Annona cacans Warm. (ariticum cagão) é uma árvore heliófita com 10 a 30 m de altura que pertence ao domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, ocorrendo no Brasil e no Paraguai. A floração ocorre em outubro e novembro e a frutificação de fevereiro a abril, suas flores são avermelhadas e seus frutos são obovoides com aréolas apenas delimitadas (Rainer, 2001; Maas et al., 2001). Assim como em outras Annonaceae, as sementes possuem endosperma ruminado e embrião pequeno (Judd et al., 2007).

Frutos de *Annona cacans* foram colhidos do chão, após queda espontânea (casca com coloração verde) em dez matrizes localizadas no município de Toledo, Paraná, Brasil (24°42'S; 53°44'W). O clima da região é classificado como Cfa (subtropical úmido com verões quentes) de acordo com o Sistema Internacional de Köppen. O despulpamento manual foi realizado imediatamente após a coleta em laboratório com peneira. Anteriormente à instalação dos experimentos, as sementes foram secas em ambiente de laboratório (25°C ± 2°C) até atingirem 12% ± 2% de umidade com a finalidade de melhorar sua resposta aos tratamentos. Foi realizado o teste de tetrazólio, com solução a 1%, durante 2 horas a 30°C (Gimenez et al., 2014a), para determinar a viabilidade inicial das sementes.

Nas sementes recém colhidas foram determinados os fenóis totais no tegumento e endosperma separadamente para verificar se eram predominantes em um dos tecidos, e para definir sua localização exata nas sementes, foi realizada a histoquímica de compostos fenólicos (Johansen, 1940) e taninos (Mace; Howell, 1974). Também foi realizada a caracterização anatômica do tegumento.

Material vegetal em época reprodutiva foi coletado, herborizado e tombado no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (n° 359684) e no herbário BOTU - Irina Delanova Gemtchujnicóv (n° 32452).

Delineamento experimental

Para a avaliação da germinação, o experimento consistiu em quatro tratamentos, provenientes de um fatorial duplo (2x2), sendo que o primeiro fator foi com e sem embebição durante 28 h (SJ Dalanhol, UNESP, BR, dados não publicados) em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇₊₆₋

Benziladenina (BA) e o segundo fator foi com e sem escarificação (desponte com navalha) na região oposta à micrópila.

Para as análises de fenóis totais, respiração, teor de água, atividade enzimática, hormônios e anatomia, a partir dos tratamentos citados acima (sem e com embebição X sem e com escarificação) foram feitas coletas em cinco épocas: tempo zero (considerado após 28 horas da embebição nas sementes com regulador), aos seis, 12 e 18 dias após a semeadura e sementes germinadas (mínimo 2 mm de raiz primária), originando um fatorial triplo (2x2x5). Nos gráficos de regressão, para a época “germinação” utilizou-se a data em que houve um pico na germinação das sementes, sendo inexistente para as sementes sem escarificação e sem regulador, 30 dias para as sementes sem escarificação e com regulador, 39 dias para as sementes com escarificação e sem regulador e 20 dias para as sementes com escarificação e com regulador.

Foram coletadas quatro repetições de 50 sementes para as análises de fenóis totais, atividade da enzima polifenoloxidase, atividade de enzimas hidrolíticas e GA₄, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em tubos falcon em freezer à -20°C. Para a atividade respiratória e o teor de água, utilizaram-se três repetições de 200 sementes, sendo realizada no momento da coleta das amostras. Para a anatomia, foram coletadas amostras de 20 sementes para cada tratamento.

Avaliações e análises experimentais

Germinabilidade. Quatro repetições de 50 sementes foram dispostas em rolos de papel germiteste e mantidas em germinador com fotoperíodo e temperatura alternados, sendo 16 horas à 30°C na luz e 8 horas à 20°C no escuro (Costa et al., 2011). Foram determinados a porcentagem de germinação (%G), o tempo médio de germinação (T₅₀) (Bewley et al., 2013) o índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962), a frequência germinativa (%F) e a sincronização (U) (Laboriau; Agudo, 1987), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\%G = \left(\frac{\sum N}{n^{\circ} \text{ total de sementes}} \right) * 100$$

$$\%F = \frac{N}{\sum N} * 100$$

$$IVG = \sum \left(\frac{N}{T} \right)$$

$$U = - \sum \left[\left(\frac{N}{\sum N} \right) * \log \left(\frac{N}{\sum N} \right) \right]$$

$$T_{50} = \frac{\sum (N * T)}{\sum N}$$

Onde:

N- número de sementes germinadas por dia;

T- dias após a instalação do experimento;

Teor de água. As pesagens foram realizadas em balança analítica de precisão e a massa seca foi obtida após secagem em estufa de circulação forçada a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (Brasil, 2009).

Anatomia. A fixação das sementes foi feita em FAA 50 (Johansen, 1940) e as amostras conservadas em álcool etílico a 70% (Jensen, 1962). As amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em hidroxietilmetacrilato (historesina) por três meses. O material foi seccionado com 8 a 10 μm de espessura e colorido com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien et al., 1964). Com a finalidade de identificar os tipos celulares presentes no tegumento, o material fresco foi dissociado em solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio (1:1) a 60°C por 24 horas e corado com safranina etanólica 1% (método de Franklin 1945, modificado por Kraus e Arduin 1997). Os materiais foram analisados em microscópio de luz e as imagens obtidas digitalmente em fotomicroscópio Zeiss[®]. As medições de comprimento foram obtidas pelo software ImageJ[®]. Também foi realizada a caracterização morfológica do embrião, em suas diferentes fases de desenvolvimento até a emergência da raiz primária.

Teor de fenóis totais. A análise foi feita separadamente no tegumento e endosperma (com embrião), seguindo o método proposto por Blainski et al. (2013). A amostra, seca em estufa a 40°C e triturada em moinho de facas, foi extraída com água destilada em banho-maria a 80°C . A reação consistiu do extrato acrescido de carbonato de sódio 10,75% e reagente fosfomolibdotúngstico (Folin-Ciocalteu), a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760 nm, após 30 minutos de reação. Utilizou-se pirogallol como padrão e os resultados foram expressos em porcentagem de acordo com a farmacopeia brasileira (Brasil, 2010).

Atividade da enzima polifenoloxidase. A análise foi realizada separadamente no tegumento e no endosperma (com embrião), de acordo com o método de Robinson (1987). Para a extração utilizou-se tampão fosfato 0,1 M pH 6,5, sendo as amostras centrifugadas a 6500 rpm por 20 minutos (4°C). Para a reação, o extrato acrescido de catecol 0,1M foi incubado em banho maria a 30°C por 30 minutos. A reação foi paralisada utilizando-se ácido perclórico 2 N e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 395 nm. Os resultados foram expressos em micromol de catecol transformados por minuto por grama de massa fresca ($\mu\text{mol catecol trnsf min}^{-1} \text{ g MF}$

¹). As amostras de endosperma foram centrifugadas por 1 minuto (6500 rpm) antes da leitura pois a adição de ácido perclórico induz turbidez nestas amostras.

Atividade respiratória. A liberação de CO₂ pelas sementes foi determinada pelo aparelho de Pettenkofer, segundo Müller (1964). Neste método, o ar ambiente impulsionado por um aerador foi “lavado” em dois frascos com NaOH 25%, nos quais o CO₂ do ambiente fica retido. Em um terceiro frasco foi colocada a amostra de sementes e em um último frasco o CO₂ proveniente da amostra foi fixado em uma solução de 100 mL de Ba(OH)₂ 0,1N. Após 1h, três alíquotas de 10 mL foram tituladas com HCl 0,05N. Para o branco foi feito o mesmo procedimento com o frasco da amostra vazio. A amostra foi seca em estufa a 105°C por 24 horas para determinar a massa seca. Os resultados foram expressos em miligramas de CO₂ fixados por grama de massa seca por hora (mg CO₂ g MS⁻¹ h⁻¹), utilizando-se a seguinte fórmula: $AR = [(B-V) \cdot 10] \cdot N \cdot 22 / P$, onde: AR: atividade respiratória; B: volume de HCl gasto na titulação do branco (mL); V: volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL); N: Normalidade do HCl (0,05 N); P: peso da amostra (g).

Hormônio GA₄. A extração do hormônio foi realizada empregando-se metodologia adaptada de Ma et al. (2013), com solução composta por metanol, acetonitrila, água Milli-Q e ácido acético (40:40:20:1). A separação cromatográfica foi feita em HPLC Shimadzu modelo Prominence composto por desgaseificador de fase móvel DGU-20A, sistema de bombeamento quaternário composto por bombas LC-20AD, autoamostrador modelo SIL-20ACHT, controlador CBM-20A e forno para colunas modelo CTO-20AC. Foi utilizada coluna Sinergi 2.5 Hydro RP-100A 50x4.6mm, mantida à 40°C durante as determinações. O efluente da coluna foi introduzido em Espectrômetro de Massas do tipo Triploquadropolo (MS/MS) marca AB Sciex modelo 4500 equipado com fonte de ionização tipo ESI (eletrospray) na interface. Os resultados foram expressos em nanomol por grama de massa fresca (nmol g MF⁻¹).

Atividade amilolítica total e da α-amilase. A extração e os ensaios da atividade das enzimas foram realizados de acordo com Guglielminetti et al. (1995). Para a extração, a amostra foi macerada em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, acrescido de NaCl 0,1 M e CaCl₂ 0,01 M e centrifugada a 12000 g, a 4°C por 10 minutos. Para a enzima α-amilase, o extrato foi mantido em banho-maria a 70°C por 15 minutos, com a finalidade de inativar outras amilases. A reação consistiu do extrato acrescido de tampão de reação (acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2) e substrato amido solúvel 2,5% fervido, os quais foram mantidos em banho-maria a 35°C por 15 minutos.

A quantificação dos açúcares solúveis resultantes da ação enzimática foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) e para a quantificação utilizou-se curva padrão de glicose (0 a 9 μ mol). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcares redutores por minuto por miligrama de proteína.

Atividade proteolítica total. Para a extração, as amostras foram maceradas em tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 e em seguida centrifugadas a 12000 g, a 4°C por 20 minutos (Beevers, 1968). A reação enzimática seguiu o método da azocaseína (Charney; Tomarelli, 1947; Weckenmann; Martin, 1984), sendo constituído por extrato enzimático, substrato azocaseína 0,5% e tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, que foram mantidos em banho-maria a 37°C por 60 minutos. A reação foi paralisada com ácido tricloroacético 10% e, em seguida, a amostra foi centrifugada para eliminar o precipitado formado. Ao sobrenadante foi adicionado KOH 5 M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 428 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para degradar 1% do substrato por hora por miligrama de proteína. Para se obter os valores mínimo e máximo de absorbância são necessários dois brancos, em ambos o extrato enzimático foi substituído pelo tampão e foram submetidos a todas as etapas da análise, sendo que para a obtenção do valor máximo não há a adição de ácido tricloroacético.

Atividade lipolítica total. Os ensaios foram realizados de acordo com Khor et al. (1986), Enujiugha et al. (2004) e Lopes et al. (2011). A amostra foi macerada com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0), a qual foi adicionada emulsão de azeite de oliva (azeite de oliva extra virgem : goma arábica 7% (1:4)) e incubada em banho-maria a 35°C com agitação (130 oscilações por minuto) durante uma hora. A reação foi paralisada com solução de acetona:etanol (1:1) e foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,01 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Para os cálculos, utilizou-se solução de ácido palmítico como padrão de ácido graxo. Para cada tratamento houve um branco da amostra e para o padrão foi realizado um branco somente com tampão e emulsão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nanomol de ácidos graxos por minuto por miligrama de proteína.

Proteínas totais. A concentração de proteínas totais utilizada na determinação das atividades das enzimas hidrolíticas foi realizada de acordo com Bradford (1976), utilizando-se curva padrão de caseína.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos. As que se mostraram homogêneas foram submetidas ao teste F (ANOVA) e suas médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0.05$). Os dados não homogêneos foram transformados para a realização da análise estatística, porém nas tabelas e gráficos mantiveram-se os dados originais. Com a finalidade de observar a tendência dos dados ao longo das épocas avaliadas, procedeu-se ao estudo da regressão polinomial, utilizando-se a equação que melhor se adaptou aos dados (quadrática ou cúbica).

RESULTADOS

Para a germinabilidade observou-se interação entre os fatores escarificação e embebição em regulador em todas as variáveis, com exceção do tempo médio de germinação (Tabela 1), enquanto que para as variáveis bioquímicas, verificou-se a interação tripla dos fatores para todas as variáveis, com exceção dos fenóis totais (tegumento e endosperma) e atividade da enzima polifenoxidase no tegumento (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1. Análise de variância para as variáveis porcentagem de germinação (%G), tempo médio de germinação (T_{50}), índice de velocidade de germinação (IVG) e sincronização (U) em sementes de *Annona cacans* escarificadas ou não e embebidas ou não em regulador ($500 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_{4+7+6\text{-BA}}$).

	Quadrados médios			
	%G	T_{50}	IVG	U
Escarificação (F1)	7310**	240*	4,48**	0,40 ^{ns}
Regulador (F2)	6806**	4388**	9,02**	0,10 ^{ns}
F1xF2	4970**	111 ^{ns}	0,07*	8,15**
CVexp. (%)	6,74	12,87	8,80	15,10

^{ns} não significativo, * e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F. CVexp.(%) – coeficiente de variação experimental.

Tabela 2. Análise de variância para as variáveis fenóis totais do endosperma (FT end.), fenóis totais do tegumento (FT teg.), atividade da enzima polifenoxidase no endosperma (PPO end.), atividade da enzima polifenoxidase no tegumento (PPO teg.), atividade respiratória (AR) e teor de água em sementes de *Annona cacans* com e sem escarificação (F1), com e sem embebição em regulador ($500 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_{4+7+6\text{-BA}}$) (F2) em diferentes épocas de avaliação (F3).

	Quadrados médios					
	FT end.	FT teg.	PPO end.	PPO teg.	AR	Teor de Água
Escarificação (F1)	1,32**	0,33**	0,09**	0,003 ^{ns}	0,06**	128**
Regulador (F2)	0,01**	0,37**	0,03**	0,008*	0,03**	353**
Época (F3)	0,03**	0,18**	0,02**	0,002 ^{ns}	0,04**	90,6**
F1xF2	<0,001 ^{ns}	0,13*	0,05**	0,005*	0,01**	11,6**
F1xF3	0,02**	0,01 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,001 ^{ns}	<0,001 ^{ns}	27,5**
F2xF3	<0,001 ^{ns}	0,04 ^{ns}	<0,001 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,004**	47,7**
F1xF2xF3	0,002 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,01**	0,002 ^{ns}	0,005**	55,0**
CVexp. (%)	9,13	8,32	39,78	45,26	25,69	5,44

^{ns} não significativo, * e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F. CVexp.(%) – coeficiente de variação experimental.

Tabela 3. Análise de variância para as variáveis GA_4 , atividade amilolítica total (AAT), atividade da α -amilase, atividade lipolítica total (ALT) e atividade proteolítica total (APT) em sementes de *Annona cacans* com e sem escarificação (F1), com e sem embebição em regulador ($500 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_{4+7+6\text{-BA}}$) (F2) em diferentes épocas de avaliação (F3).

	Quadrados médios				
	GA_4	AAT	α -amilase	ALT	APT
Escarificação (F1)	9,46**	0,22**	0,02**	776**	0,84**
Regulador (F2)	71,6**	0,02**	0,001 ^{ns}	135**	0,01 ^{ns}
Época (F3)	0,44**	0,11**	0,03**	80,8**	0,31**
F1xF2	8,82**	<0,001 ^{ns}	<0,001 ^{ns}	1,52 ^{ns}	0,25**
F1xF3	0,12**	0,04**	0,01**	47,0**	0,18**
F2xF3	0,34**	0,009**	0,008**	92,6**	0,10**
F1xF2xF3	0,21**	0,01**	0,01**	50,3**	0,13**
CVexp. (%)	4,11	5,59	11,61	35,72	12,85

^{ns} não significativo, * e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F. CVexp.(%) – coeficiente de variação experimental.

Caracterização das sementes

A histoquímica para taninos foi negativa no tegumento e endosperma das sementes, enquanto que a histoquímica para compostos fenólicos foi positiva no tegumento, se estendendo nas ruminações e negativa no endosperma. Pela análise de fenóis totais, observou-se maior quantidade desses compostos no tegumento das sementes, sendo que a quantidade verificada

no endosperma se deve às ruminações que permaneceram aderidas ao endosperma no momento da análise (Tabela 4).

Tabela 4. *Caracterização de sementes recém colhidas de Annona cacans: histoquímica (HQ) para taninos e compostos fenólicos, e teor de fenóis totais (FT).*

Caracterização de fenóis	Resultado
HQ taninos: tegumento e endosperma	Negativo
HQ compostos fenólicos: tegumento	Positivo (se estendendo nas ruminações)
HQ compostos fenólicos: endosperma	Negativo
FT tegumento	1,79 %
FT endosperma	0,95 % (ruminações)

As sementes de *Annona cacans* são achatadas dorsiventralmente, com formato elipsoide, são glabras, pericalazais (Figura 1-C,D), albuminosas e possuem endosperma ruminado (Figura 1-A,B) e arilo rudimentar (Figura 1-E). Na região da pericalaza pode-se observar o sistema vascular e o canal de enfraquecimento (Figura 1-C,D), o qual no momento da germinação irá formar a fenda germinativa, expondo o plugue micropilar (Figura 1-E,F) e permitindo a emergência da raiz primária.

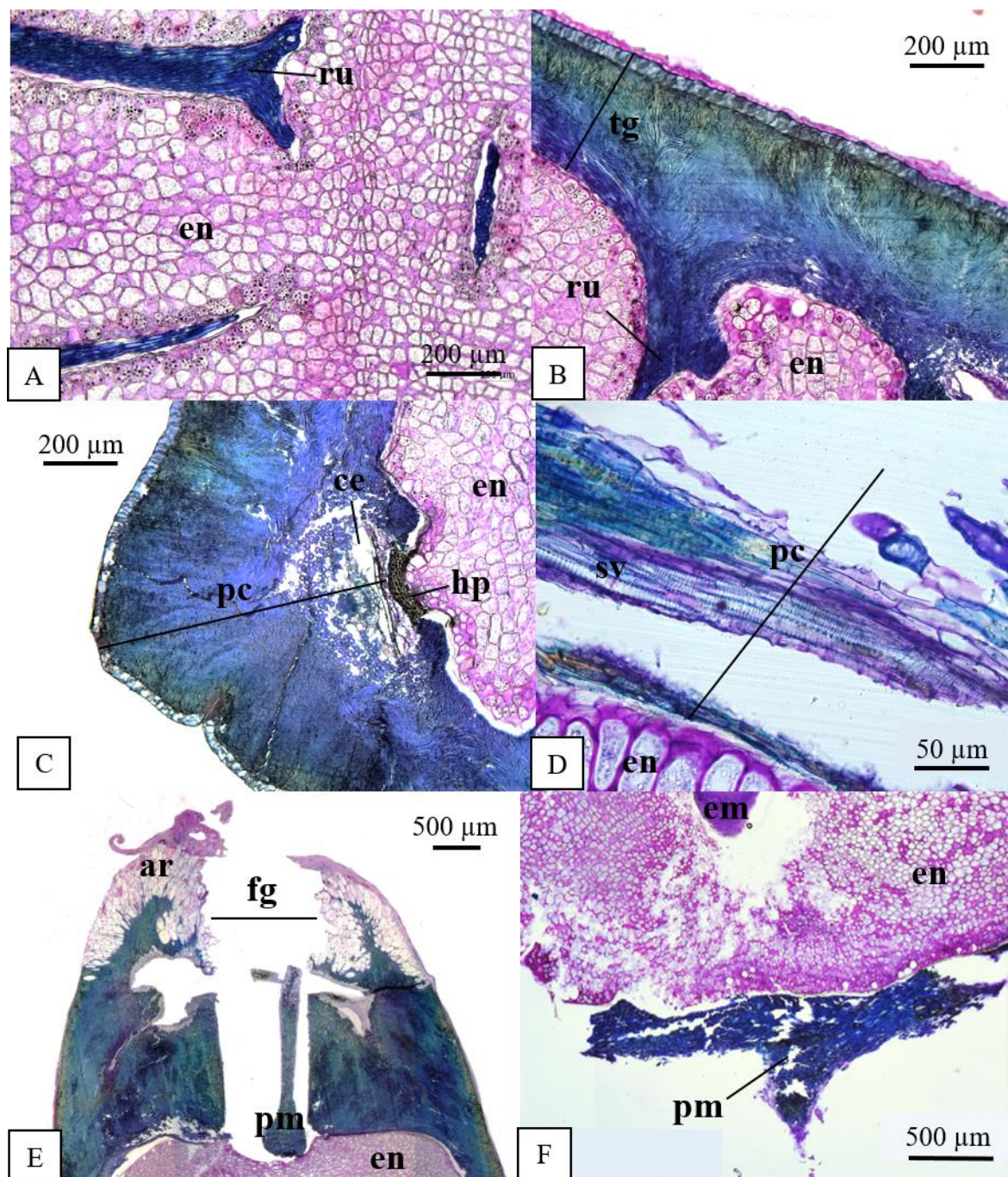


FIG. 1. Caracterização anatômica do tegumento de sementes de *Annona cacans* (ar – arilo rudimentar, ce – canal de enfraquecimento, em – embrião, en – endosperma, fg – fenda germinativa, hp – hipóstase, pc – pericalaza, pm – plugue micopilar, ru – ruminações, sv – sistema vascular, tg – tegumento).

Germinabilidade

A escarificação associada à embebição das sementes em regulador resultou em maior germinabilidade das sementes de *Annona cacans*, apresentando maior velocidade e sincronização da germinação (Figura 3). As sementes sem escarificação e sem embebição em

regulador mostraram germinação lenta alcançando 6% de germinação ao término do experimento (Figura 2). Para o tempo médio de germinação, a escarificação e a embebição em regulador isoladamente, promoveram queda significativa nos seus valores (Figura 2). De acordo com o teste de tetrazólio realizado anteriormente à sementeira, as sementes apresentaram 79% de viabilidade.

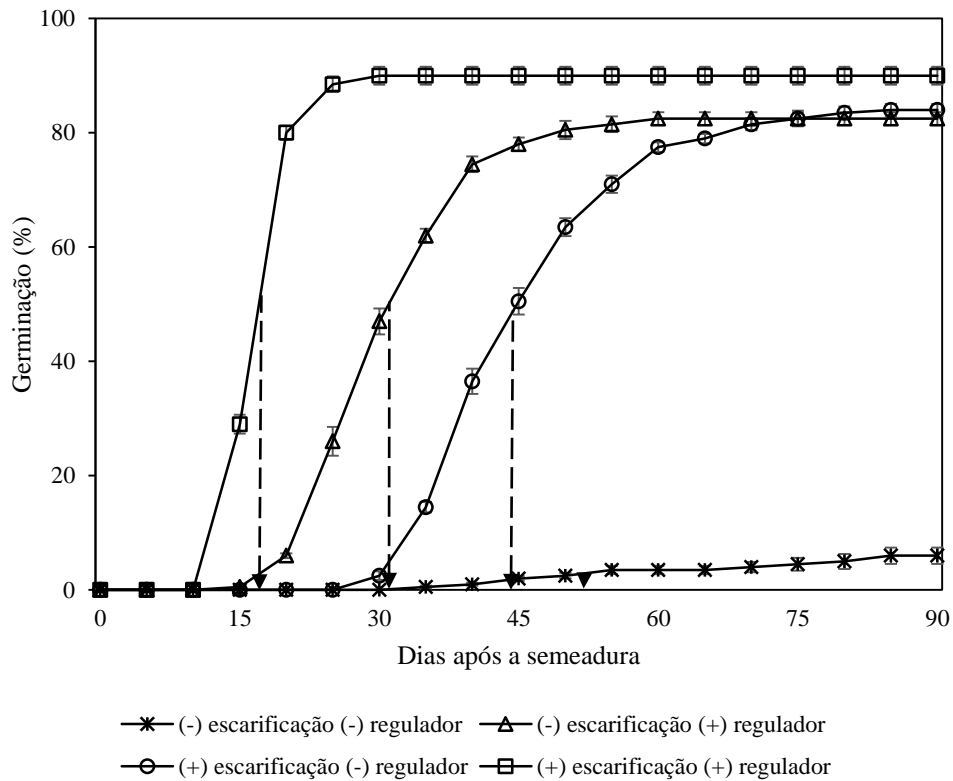


FIG. 2. Porcentagem de germinação acumulada em sementes de *Annona cacans* com e sem escarificação e com e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇₊₆-Benziladenina. Setas representam o tempo médio de germinação (T₅₀).

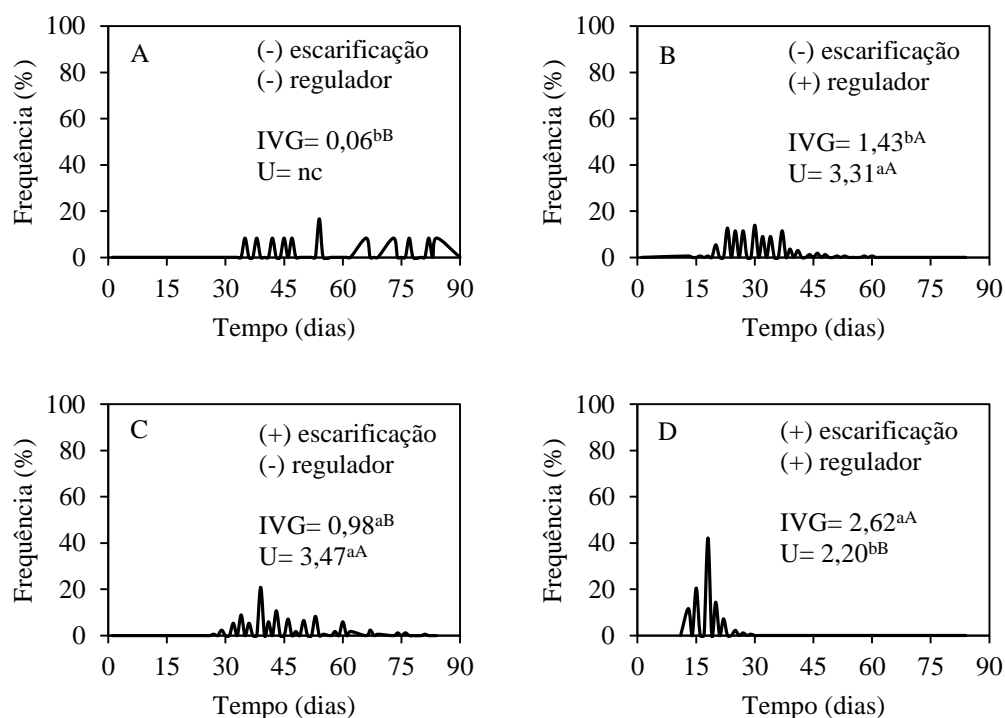


FIG. 3. Frequência germinativa, índice de velocidade de germinação (IVG) e sincronização (U) em sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em regulador (500 mg L^{-1} GA₄₊₇+6-Benziladenina) (A); sem escarificação e embebidas em regulador (B); com escarificação e sem embebição em regulador (C); com escarificação e embebidas em regulador (D). Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste Tukey ($p < 0.05$); letras minúsculas comparam tratamentos com e sem escarificação (coluna); letras maiúsculas comparam tratamentos com e sem embebição em regulador (linha). nc – valor não calculado devido à baixa germinação.

Teor de água

As sementes secas continham cerca de 14% de água e após a embebição em regulador atingiram cerca de 22% de água, independente da escarificação ou não (Figura 4). Desde os seis até os 18 dias observou-se uma estabilização no teor de água das sementes, exceto para aquelas que foram escarificadas e embebidas em regulador que aos 12 dias apresentaram um aumento significativo (Figura 4), o que coincide com o momento em que inicia a ruptura da linha de abscisão do tegumento nestas sementes (Figura 6-G). Nas sementes germinadas observa-se aumento no teor de água o que caracteriza a fase 3 da aquisição de água pelas sementes (Figura 4).

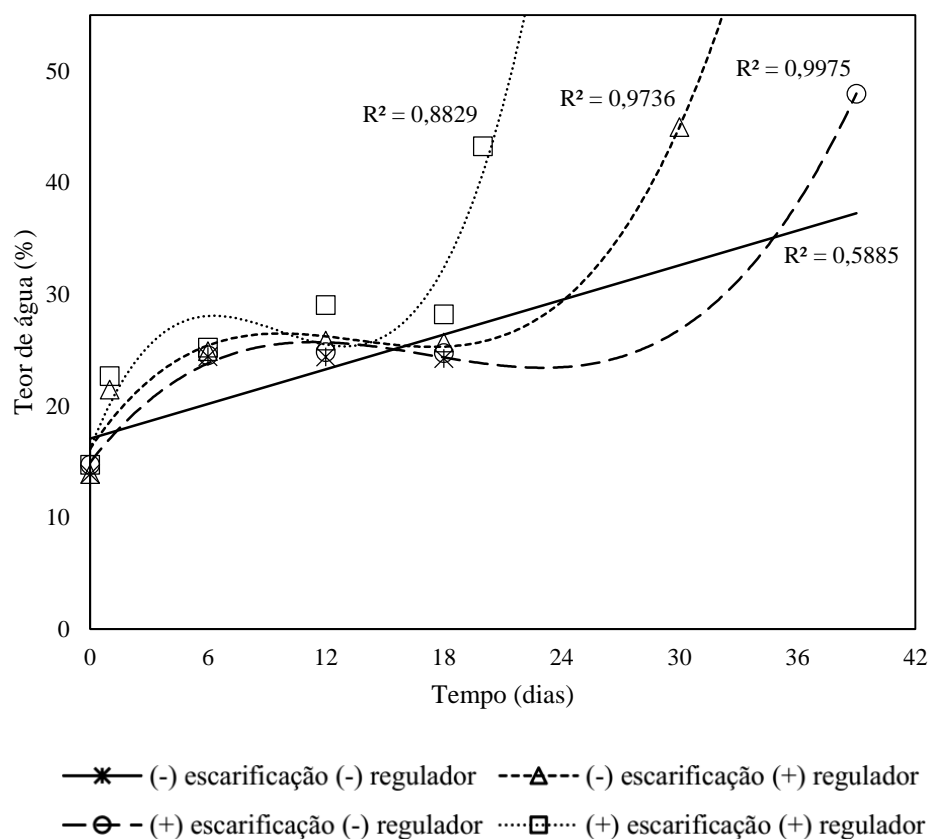


FIG. 4. Teor de água (%) em sementes de *Annona cacans* com e sem escarificação, com e sem embebição em 500 mg L^{-1} de GA₄₊₇₊₆-Benziladenina em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: sem escarificação e sem regulador: linear; demais tratamentos: polinomial cúbica.

Anatomia e morfologia

Apesar de possuir eixo embrionário e cotilédones diferenciados, o embrião de *Annona cacans* é pequeno no momento da dispersão das sementes, com uma relação embrião:semente (E:S) de 0,13 (Figura 5). O embrião apresentava cerca de 1,2 mm de comprimento na dispersão das sementes, atingindo aproximadamente 3,6 mm no momento em que ocorre a rompimento da linha de abscisão do tegumento e após a emergência da raiz primária apresentava comprimento de cerca de 8 mm (Figura 5 e 6 – A, B e C). Desta forma, verifica-se que o embrião cresce no interior da semente, sendo observadas células em divisão celular (Figura 6 – I), aumentando seu tamanho em entre 3 a 4 vezes antes de ocorrer a emergência da raiz primária (Figura 5 e 6).

O tegumento das sementes é constituído por fibras e esclereides de tamanhos e formas variadas (Figura 6 – D e E; Figura 7) e dispostos de maneira longitudinal, transversal e entrelaçados (Figura 6 – D e E). Não foi observada uma camada de células em paliçada, uma

característica do tegumento de sementes com dormência física, confirmando que estas sementes não possuem barreira à entrada de água no tegumento.

No momento em que ocorre o rompimento da linha de abscisão no tegumento das sementes, além de ser observado o crescimento embrionário (Figura 6), verifica-se alongamento das células do endosperma na região da pericalaza (Figura 6 – G). Esta pressão interna exercida pelo alongamento celular do endosperma favorece o rompimento do tegumento junto ao canal de enfraquecimento, formando a fenda germinativa (Figura 6 – G e H). Desta forma, verifica-se que as sementes possuem um mecanismo que possibilita o rompimento do tegumento pela pressão interna do embrião e endosperma, demonstrando que não há uma barreira mecânica à germinação no tegumento das sementes.

O processo germinativo se encerra com a emergência da raiz primária através das estruturas que a circundam e, em Annonaceae, este processo tem duas etapas: primeira, o rompimento do tegumento, como foi citado anteriormente e segunda, pelo rompimento do endosperma. Neste momento, observa-se a formação de uma protuberância no endosperma micropilar e, esta estrutura não se forma apenas pelo alongamento celular, como também é possível observar células em processo de divisão celular durante este processo (Figura 6 – J). No endosperma lateral, por sua vez, verifica-se que as células estão vazias, demonstrando que parte das substâncias de reserva possivelmente já foram utilizadas no processo germinativo (Figura 6 – K).

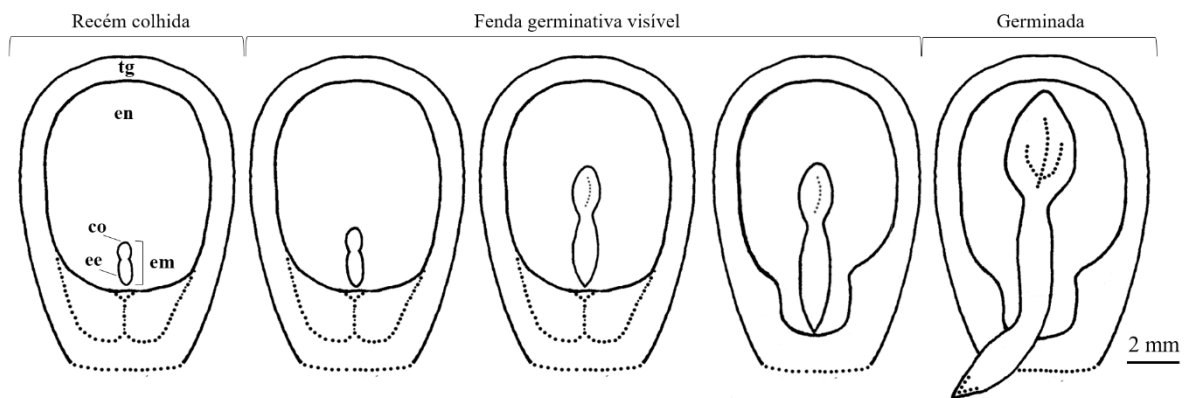


FIG. 5. Caracterização morfológica das fases de crescimento do embrião em sementes de *Annona cacans* durante a germinação (co – cotilédones, ee – eixo embrionário, em – embrião, en – endosperma, tg – tegumento).

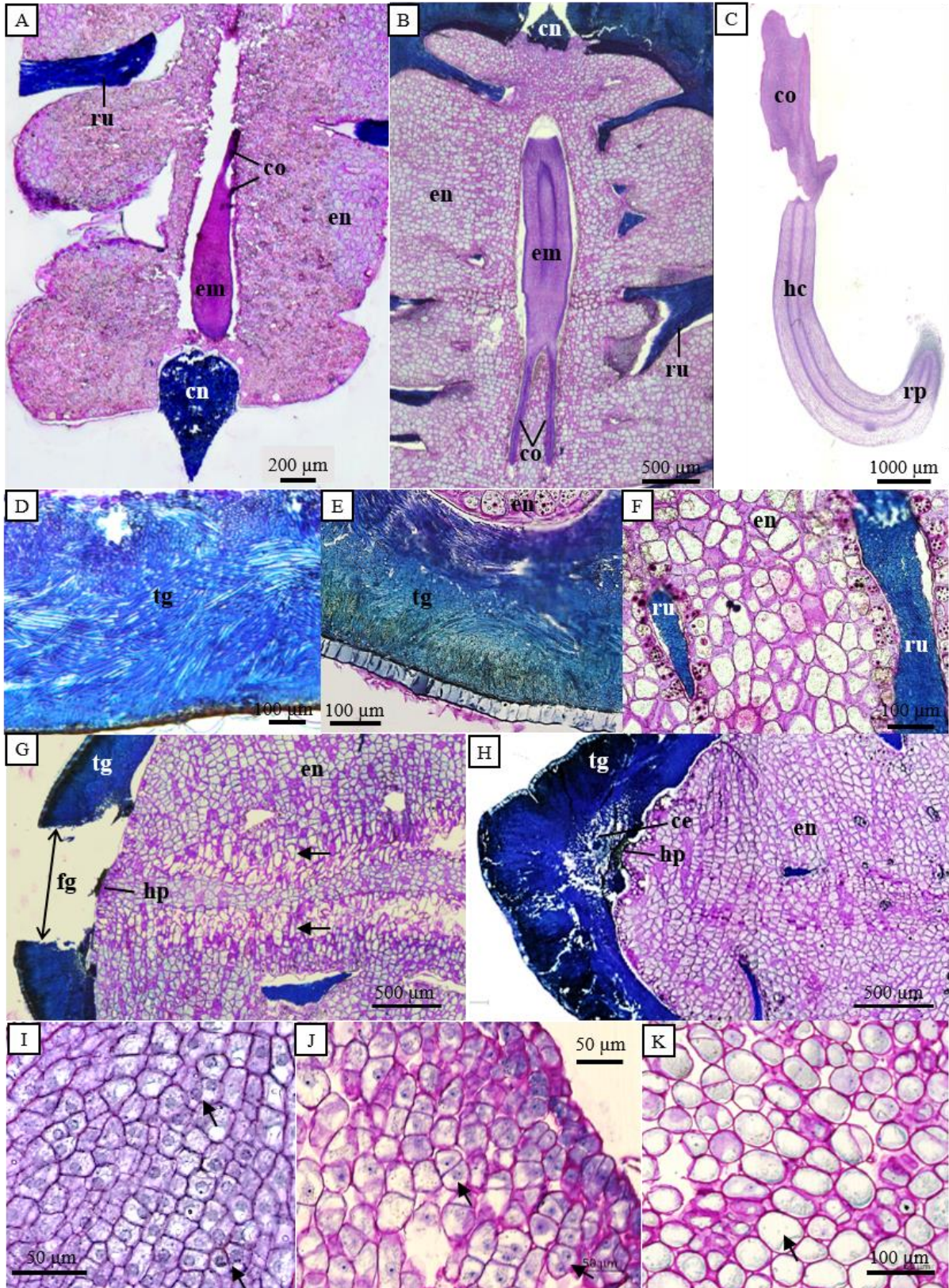


FIG. 6.

FIG. 6. Anatomia de sementes de *Annona cacans*. A, B e C – crescimento embrionário; A – embrião na semente recém colhida; B – embrião no momento do rompimento da linha de abscisão do tegumento; C – embrião na semente germinada; D – tegumento em corte longitudinal; E – tegumento em corte transversal; F – aspecto do endosperma em sementes recém colhidas; G – aspecto do endosperma no momento do rompimento da linha de abscisão do tegumento, evidenciando as células em alongamento (setas) e a fenda germinativa; H – aspecto do endosperma na semente intacta, evidenciando o canal de enfraquecimento do tegumento; I – células do ápice radicular do embrião no momento do rompimento da linha de abscisão do tegumento, evidenciando células em divisão celular; J – protuberância do endosperma micropilar, evidenciando células em divisão celular; K – endosperma lateral no final do processo germinativo com células sem conteúdo (seta). (ce – canal de enfraquecimento, co – cotilédones, cn – capa nucelar, em – embrião, en – endosperma, fg – fenda germinativa, hc – hipocótilo, hp – hipóstase, rp – raiz primária, ru – rumações, tg - tegumento)

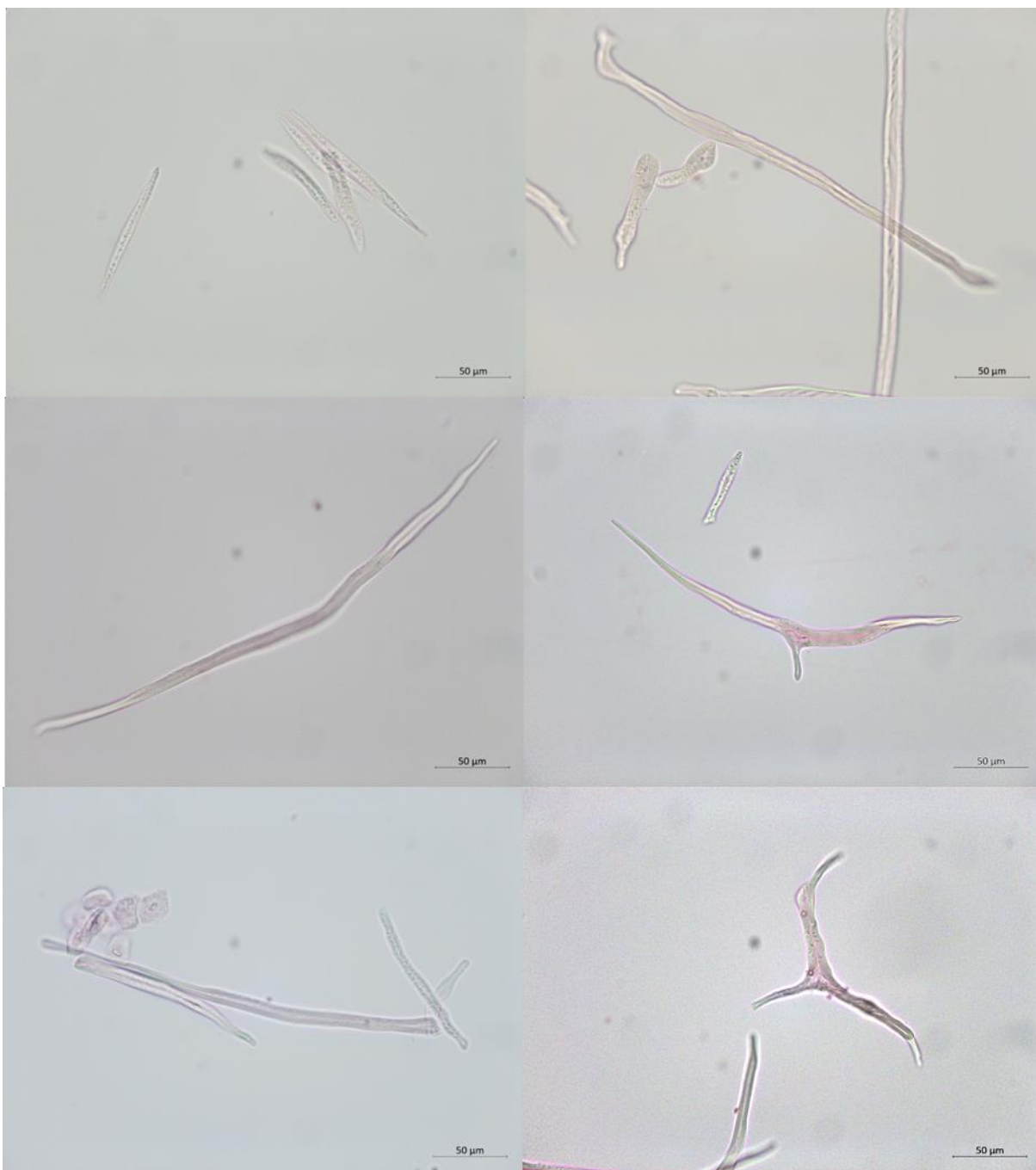


FIG. 7. Fibras e esclereides dissociados do tegumento de sementes de *Annona cacans*.

Fenóis totais

No tegumento, os teores de fenóis totais foram semelhantes entre os tratamentos estudados, com exceção das sementes sem regulador e sem escarificação que apresentaram os menores valores de fenóis totais no tempo zero e aos 18 dias após a semeadura (Tabela 5). O teor de fenóis totais no endosperma permaneceu constante ao longo das épocas, exceto para as sementes germinadas que foram previamente escarificadas que apresentaram valores maiores

(Figura 8). As sementes escarificadas independente da embebição em regulador apresentaram valores significativamente superiores às sementes não escarificadas (Tabela 5).

Tabela 5. *Teor de fenóis totais (%) no tegumento e no endosperma de sementes de Annona cacans com e sem escarificação, com e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇₊₆-Benziladenina em diferentes épocas de avaliação. Dados relativos à interação dos fatores escarificação e regulador.*

Época	Escarificação	Tegumento		Endosperma	
		Embebição em 500 mg L ⁻¹ de GA ₄₊₇₊₆ -BA			
		Sem	Com	Sem	Com
Zero	Sem	1,45 bA	1,73 aA	0,24 bA	0,28 bA
	Com	1,71 aA	1,71 aA	0,50 aA	0,50 aA
6 dias	Sem	1,63 aA	1,61 aA	0,31 bA	0,32 bA
	Com	1,68 aA	1,67 aA	0,49 aA	0,51 aA
12 dias	Sem	1,49 aA	1,64 aA	0,28 bA	0,30bA
	Com	1,62 aA	1,74 aA	0,51 aA	0,55 aA
18 dias	Sem	1,59 bB	1,95 aA	0,24 bA	0,26 bA
	Com	1,88 aA	2,09 aA	0,46 aA	0,51 aA
Germinadas	Sem	-	1,75 aA	-	0,32 bA
	Com	1,75 aA	1,69 aA	0,67 aA	0,67 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de cada época, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

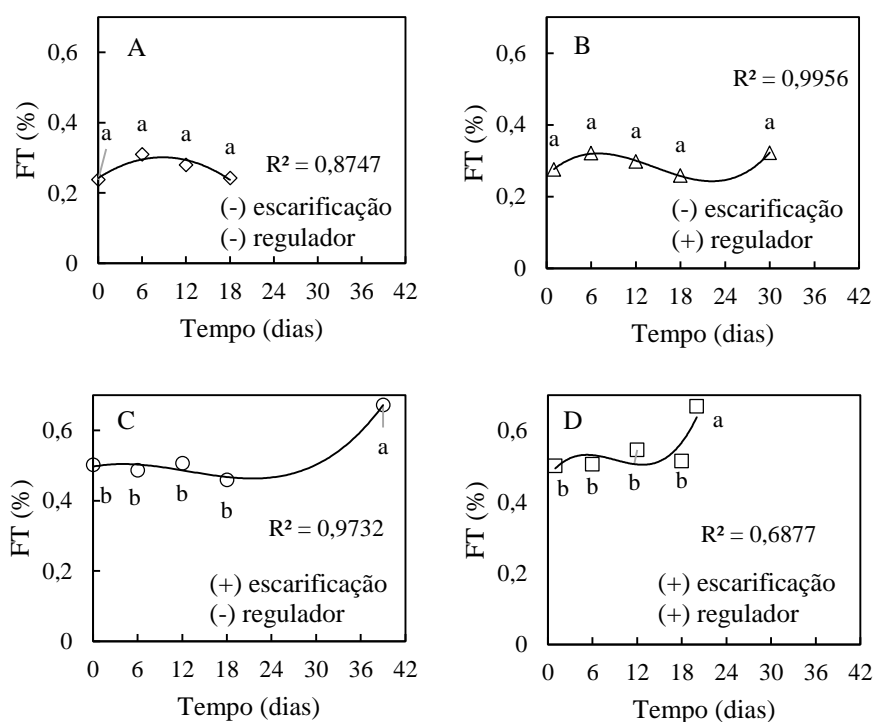


FIG. 8. Teor de fenóis totais (%) no endosperma de sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em 500 mg L^{-1} de GA_{4+7+6} -Benziladenina (A), sem escarificação e com embebição em regulador (B), com escarificação e sem embebição em regulador (C) e com escarificação e com embebição em regulador (D) em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: A: polinomial quadrática; B, C e D: polinomial cúbica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Atividade da enzima polifenoloxidase

As sementes que não foram escarificadas e nem embebidas em regulador não apresentaram atividade da enzima polifenoloxidase no endosperma, apresentando valores significativamente menores que os das sementes escarificadas em todas as épocas avaliadas (Tabela 6). Aos seis dias foi possível distinguir os tratamentos, sendo que a maior atividade da enzima foi observada nas sementes escarificadas e com regulador, quando comparada com as sementes não escarificadas, independente da presença de regulador (Tabela 6). Nas sementes que foram somente escarificadas ou somente embebidas em regulador observou-se aumento significativo na atividade da enzima quando as sementes germinaram (Figura 9).

A atividade da enzima polifenoloxidase no tegumento foi constante em todos os tratamentos, independente da época. Apenas nas sementes que não foram escarificadas nem embebidas em regulador que se observou diminuição significativa na atividade da enzima no tempo zero (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade da enzima polifenoloxidase no tegumento e endosperma de sementes de *Annona cacans* com e sem escarificação, com e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇+6-Benziladenina em diferentes épocas de avaliação. Dados relativos à interação dos fatores escarificação e regulador.

Época	Escarificação	Tegumento		Endosperma	
		Embebição em 500 mg L ⁻¹ de GA ₄₊₇ +6-BA			
		Sem	Com	Sem	Com
Zero	Sem	0,06 bA	0,10 aA	0 bA	0,03 aA
	Com	0,13 aA	0,06 aA	0,06 aA	0,07 aA
6 dias	Sem	0,03 aA	0,07 aA	0 bA	0,05 bA
	Com	0,07 aA	0,10 aA	0,10 aA	0,12 aA
12 dias	Sem	0,07 aA	0,11 aA	0 bB	0,09 aA
	Com	0,05 aA	0,09 aA	0,09 aA	0,10 aA
18 dias	Sem	0,05 aA	0,08 aA	0 bA	0,07 aA
	Com	0,06 aA	0,08 aA	0,07 aA	0,11 aA
Germinadas	Sem	-	0,07 aA	-	0,18 aA
	Com	0,07 aA	0,07 aA	0,22 aA	0,13 bB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de cada época, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

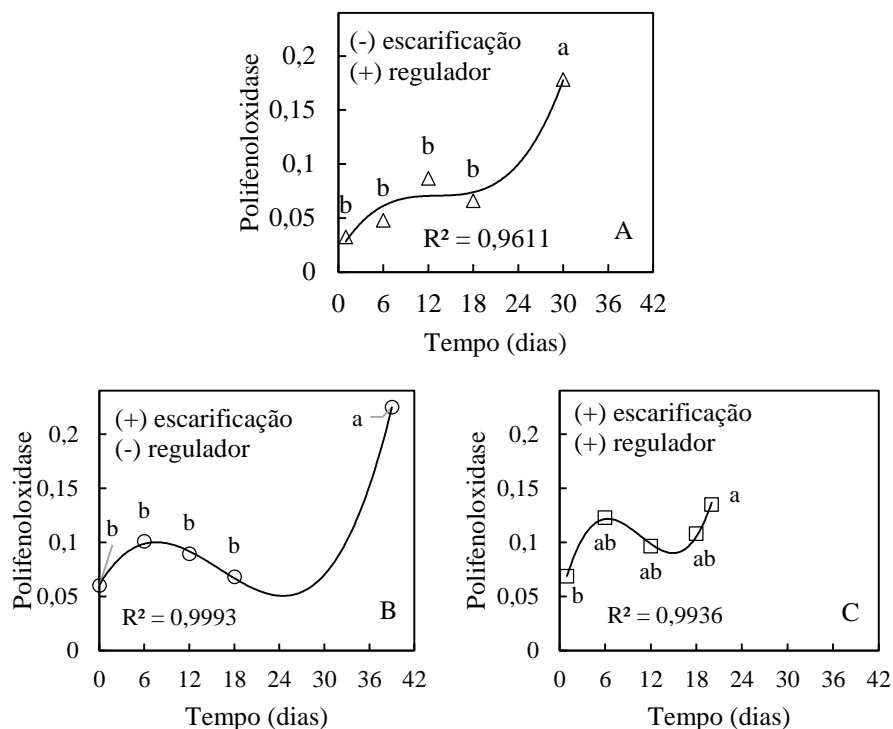


FIG. 9. Atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) ($\mu\text{mol catecol trnsf min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) no endosperma de sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇+6-Benziladenina (A), sem escarificação e com embebição em regulador (B), com escarificação e sem embebição em regulador (C) e com escarificação e com embebição em regulador (D) em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: A, B e C: polinomial cúbica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Papel do tegumento na respiração das sementes

A escarificação das sementes promoveu um aumento na atividade respiratória, o qual foi mais evidente aos seis dias (Tabela 7). Aos 12 dias as sementes escarificadas e com regulador apresentaram declínio na atividade respiratória, o que coincide com o momento em que inicia a ruptura da linha de abscisão do tegumento nestas sementes (Figura 10). Após a germinação constatou-se aumento da respiração em todos os tratamentos (Figura 10).

Tabela 7. *Atividade respiratória em sementes de Annona cacans com e sem escarificação, com e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇+6-Benziladenina em diferentes épocas de avaliação. Dados relativos à interação dos fatores escarificação e regulador.*

Época	Escarificação	Embebição em	
		500 mg L ⁻¹ de GA ₄₊₇ +6-BA	
		Sem	Com
Zero	Sem	0 aB	0,04 bA
	Com	0,05 aB	0,11 aA
6 dias	Sem	0,03 bA	0,03 bA
	Com	0,11 aB	0,17 aA
12 dias	Sem	0,08 aA	0,05 aA
	Com	0,08 aA	0,08 aA
18 dias	Sem	0,05 aA	0,06 aA
	Com	0,11 aA	0,09 aA
Germinadas	Sem	-	0,26 aA
	Com	0,21 aB	0,29 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de cada época, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

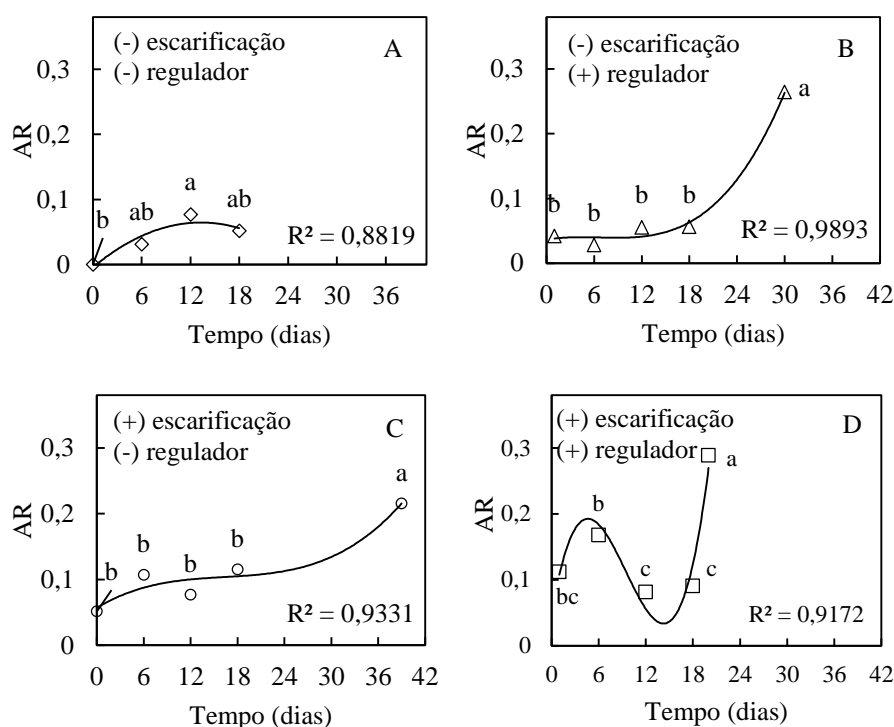


FIG. 10. Atividade respiratória (AR) (mg CO₂ g MS⁻¹ h⁻¹) em sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇₊₆-Benziladenina (A), sem escarificação e com embebição em regulador (B), com escarificação e sem embebição em regulador (C) e com escarificação e com embebição em regulador (D) em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: A: polinomial quadrática; B, C e D: polinomial cúbica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

GA₄

As sementes embebidas em regulador, evidentemente, apresentaram maior conteúdo de GA₄, porém verifica-se que nas sementes que foram também escarificadas, os valores são superiores aos das sementes somente com embebição em regulador (Tabela 8). Isto demonstra um efeito sinérgico da escarificação e da embebição em regulador sobre o conteúdo de GA₄ nas sementes.

Para a maioria dos tratamentos observa-se diminuição no conteúdo de GA₄ até os seis dias, com exceção das sementes que foram só escarificadas que apresentaram aumento de GA₄ somente após a germinação (Figura 11). Apesar de se observar diminuição gradual de GA₄ nas sementes escarificadas e embebidas em regulador ao longo das épocas, ainda assim seus valores são superiores aos observados nos demais tratamentos (Figura 11).

Tabela 8. GA_4 em sementes de *Annona cacans* com e sem escarificação, com e sem embebição em 500 mg L^{-1} de $GA_{4+7}+6\text{-Benziladenina}$ em diferentes épocas de avaliação. Dados relativos à interação dos fatores escarificação e regulador.

Época	Escarificação	Embebição em 500 mg L^{-1} de $GA_{4+7}+6\text{-BA}$	
		Sem	Com
Zero	Sem	0,047 aB	2,40 bA
	Com	0,012 bB	12,28 aA
6 dias	Sem	0,002 aB	1,49 bA
	Com	0,009 aB	7,63 aA
12 dias	Sem	0,005 aB	1,95 bA
	Com	0,01 aB	5,99 aA
18 dias	Sem	0,005 aB	1,64 bA
	Com	0,004 aB	5,37 aA
Germinadas	Sem	-	1,38 bA
	Com	0,06 aB	5,49 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de cada época, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

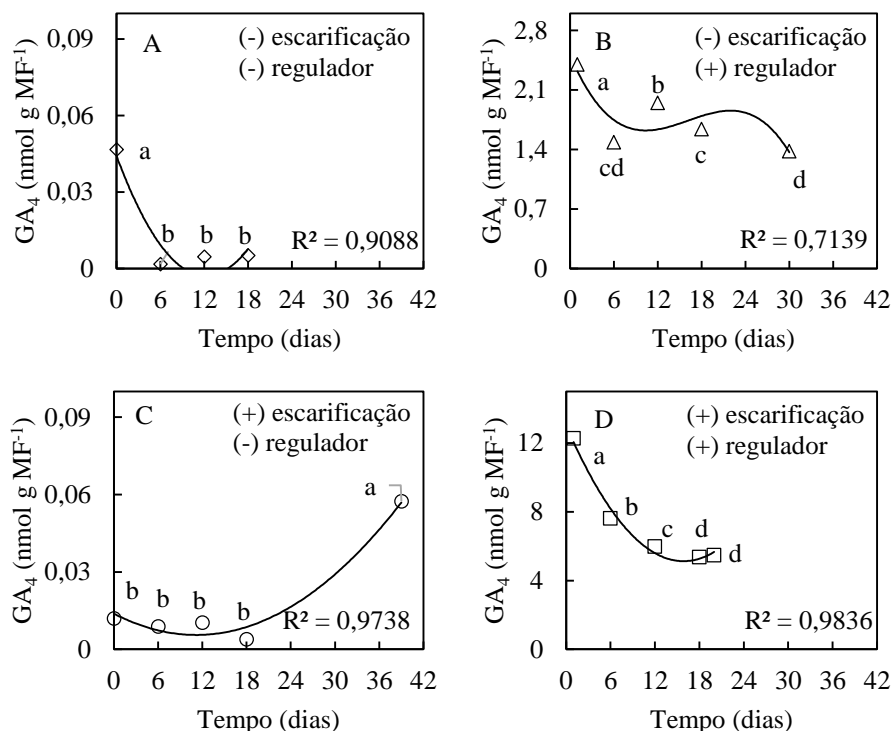


FIG. 11. GA_4 (nmol g MF^{-1}) em sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em 500 mg L^{-1} de $GA_{4+7}+6\text{-Benziladenina}$ (A), sem escarificação e com embebição em regulador (B), com escarificação e sem embebição em regulador (C) e com escarificação e com embebição em regulador (D) em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: A, C e D: polinomial quadrática; B: polinomial cúbica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Enzimas hidrolíticas

Sementes escarificadas com embebição em regulador apresentaram maior atividade amilolítica total e da α -amilase, quando comparadas aos demais tratamentos no tempo zero (Tabela 9). Neste mesmo tratamento observa-se pequena diminuição na atividade destas enzimas dos seis aos 18 dias, mas que volta a aumentar após a germinação (Figuras 12 – D e 13 – D). Nas sementes germinadas observa-se aumento na atividade das enzimas (Figuras 12 e 13).

Tabela 9. Atividade amilolítica total (AAT) e atividade da α -amilase no endosperma (com embrião) de sementes de *Annona cacans* com e sem escarificação, com e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇+6-Benziladenina em diferentes épocas de avaliação. Dados relativos à interação dos fatores escarificação e regulador.

Época	Escarificação	AAT		α -Amilase	
		Embebição em 500 mg L ⁻¹ de GA ₄₊₇ +6-BA			
		Sem	Com	Sem	Com
Zero	Sem	0,17 aA	0,19 bA	0,15 aA	0,16 bA
	Com	0,20 aB	0,41 aA	0,15 aB	0,29 aA
6 dias	Sem	0,23 aA	0,26 bA	0,20 aA	0,20 aA
	Com	0,26 aA	0,30 aA	0,19 aA	0,23 aA
12 dias	Sem	0,24 aA	0,25 aA	0,22 aA	0,21 aA
	Com	0,27 aA	0,29 aA	0,22 aA	0,19 aA
18 dias	Sem	0,22 bA	0,24 aA	0,17 aA	0,21 aA
	Com	0,30 aA	0,27 aA	0,19 aA	0,16 bA
Germinadas	Sem	-	0,34 bA	-	0,27 aA
	Com	0,74 aA	0,62 aB	0,41 aA	0,29 aB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de cada época, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

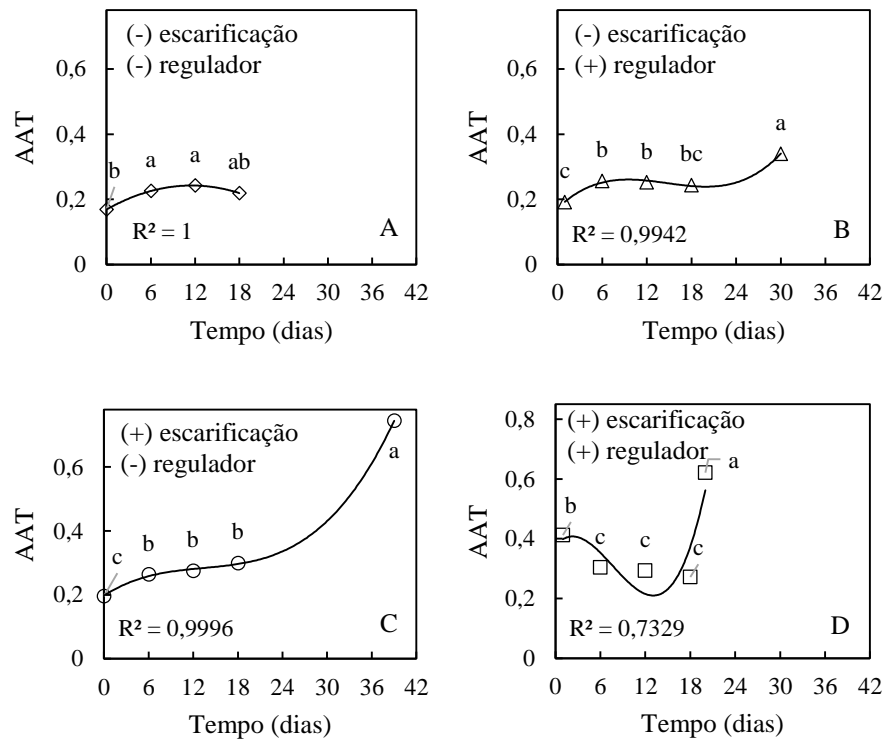


FIG. 12. Atividade amilolítica total (U mg^{-1}) (AAT) no endosperma (com embrião) de sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em 500 mg L^{-1} de GA_{4+7+6} -Benziladenina (A), sem escarificação e com embebição em regulador (B), com escarificação e sem embebição em regulador (C) e com escarificação e com embebição em regulador (D) em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: A: polinomial quadrática; B, C e D: polinomial cúbica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

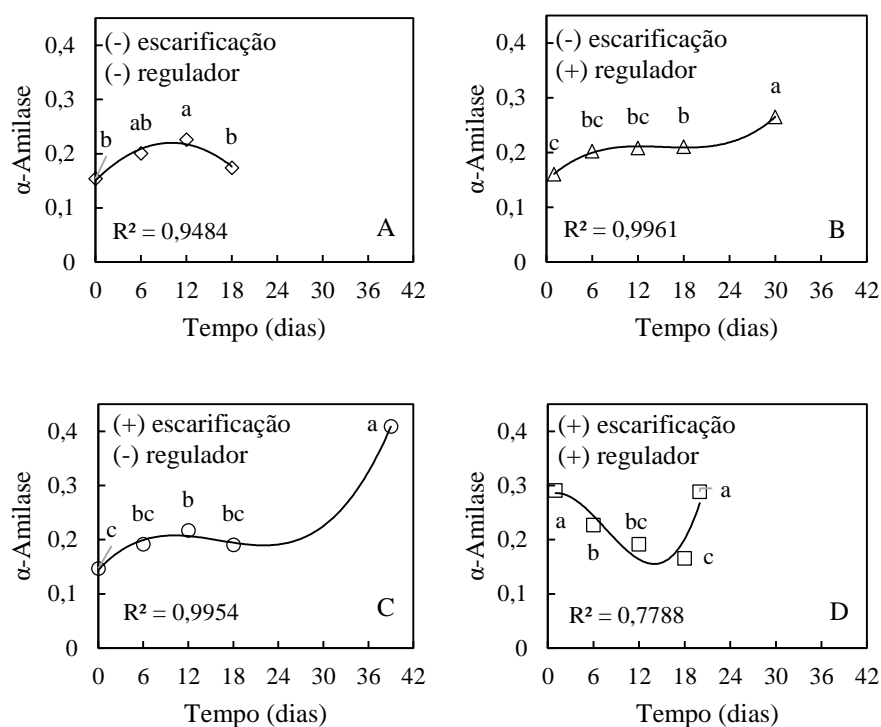


FIG. 13. Atividade da α -amilase no endosperma (com embrião) de sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em 500 mg L^{-1} de GA_{4+7+6} -Benziladenina (A), sem escarificação e com embebição em regulador (B), com escarificação e sem embebição em regulador (C) e com escarificação e com embebição em regulador (D) em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: A: polinomial quadrática; B, C e D: polinomial cúbica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

No tempo zero e aos seis dias observa-se maior atividade lipolítica total nas sementes que não foram escarificadas (Tabela 10). Neste mesmo tratamento, a atividade lipolítica total foi observada desde o tempo zero, se estabilizando nas sementes sem regulador ou aumentando nas sementes com regulador (Figura 14 – A e B). Em contrapartida, nas sementes que foram escarificadas não houve atividade enzimática até os seis dias, as quais apresentam um pico entre 12 e 18 dias (Figura 14 – C e D).

No tempo zero, para a atividade proteolítica total, verifica-se que as sementes escarificadas com embebição em regulador apresentaram maior atividade que as sementes dos demais tratamentos (Tabela 10). Aos 12 e 18 dias, observou-se maior atividade da enzima nas sementes que foram escarificadas (Tabela 10). As sementes que foram só escarificadas ou só embebidas em regulador apresentaram atividade constante ao longo das épocas, apresentando aumento somente após a germinação, enquanto que nas sementes escarificadas com embebição, a atividade proteolítica total teve um pico aos 18 dias, momento em que ocorre a ruptura da linha de abscisão no tegumento dessas sementes (Figura 15).

Tabela 10. Atividade lipolítica total (ALT) e atividade proteolítica total (APT) no endosperma (com embrião) de sementes de *Annona cacans* com e sem escarificação, com e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇₊₆-Benziladenina em diferentes épocas de avaliação. Dados relativos à interação dos fatores escarificação e regulador.

Época	Escarificação	ALT		APT	
		Embebição em 500 mg L ⁻¹ de GA ₄₊₇₊₆ -BA			
		Sem	Com	Sem	Com
Zero	Sem	11,8 aA	4,3 aB	0,28 aA	0,22 bA
	Com	0 bA	0 bA	0,19 aB	0,46 aA
6 dias	Sem	7,3 aA	7,6 aA	0,43 aA	0,26 aA
	Com	0,67 bA	0 bA	0,24 bA	0,33 aA
12 dias	Sem	6,3 aB	15,6 aA	0,37 bA	0,19 bA
	Com	5,1 aA	7,9 bA	0,54 aA	0,48 aA
18 dias	Sem	8,8 aA	7,1 aA	0,27 bA	0,18 bA
	Com	3,29 bB	10,0 aA	0,43 aB	1,69 aA
Germinadas	Sem	-	18,5 aA	-	0,54 bA
	Com	0 aB	5,48 bA	1,27 aA	0,83 aB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de cada época, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

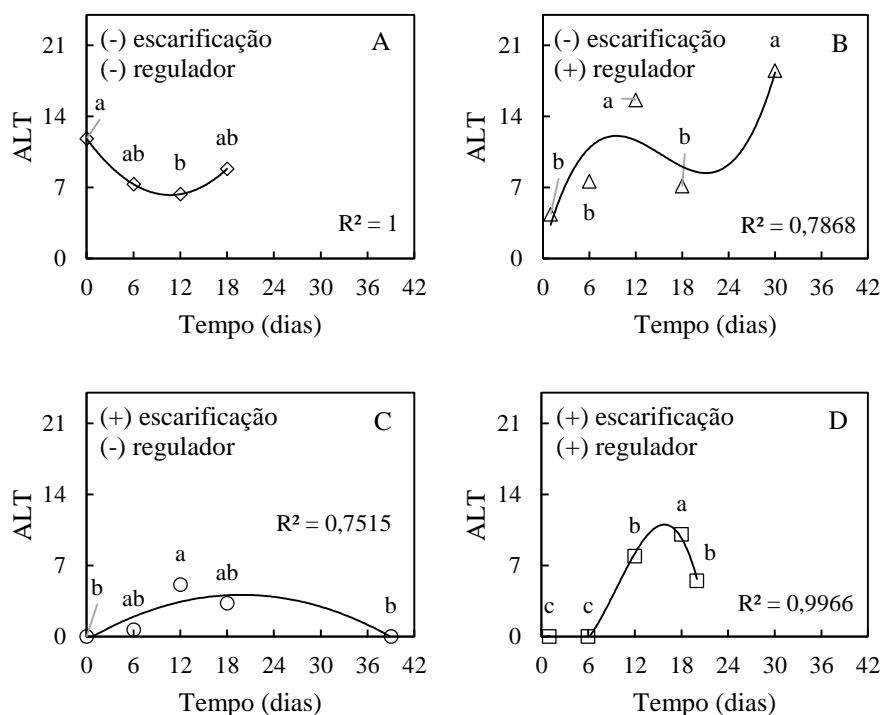


FIG. 14. Atividade lipolítica total (U mg⁻¹) (ALT) no endosperma (com embrião) de sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇₊₆-Benziladenina (A), sem escarificação e com embebição em regulador (B), com escarificação e sem embebição em regulador (C) e com escarificação e com embebição em regulador (D) em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: A e C: polinomial quadrática; B e D: polinomial cúbica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

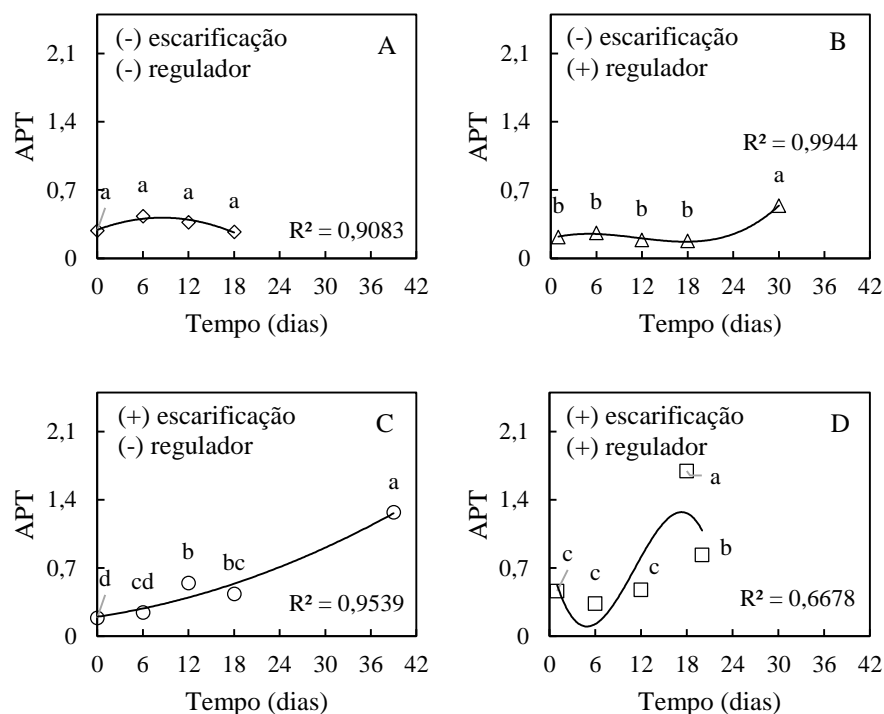


FIG. 15. Atividade proteolítica total (U mg⁻¹) (APT) no endosperma (com embrião) de sementes de *Annona cacans* sem escarificação e sem embebição em 500 mg L⁻¹ de GA₄₊₇₊₆-Benziladenina (A), sem escarificação e com embebição em regulador (B), com escarificação e sem embebição em regulador (C) e com escarificação e com embebição em regulador (D) em diferentes épocas de avaliação. Ajuste de equação: A e C: polinomial quadrática; B e D: polinomial cúbica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

DISCUSSÃO

O tegumento intacto de sementes de *Annona cacans* tem o papel de promover uma condição natural de hipóxia ao embrião devido à oxidação de fenóis pela enzima polifenoloxidase. Quando as sementes são escarificadas, a disponibilidade de oxigênio para o embrião aliada à embebição das sementes em GA₄₊₇₊₆-BA aumentam os níveis endógenos de GA₄, o que causa aumento na atividade de enzimas hidrolíticas e culmina na superação da dormência nessas sementes.

A escarificação das sementes ajudou na superação da dormência em outras espécies de Annonaceae. Em *Annona squamosa*, Chagas et al. (2013) verificaram que mesmo o tegumento sendo permeável à água, a escarificação foi importante para aumentar a velocidade de germinação das sementes. Para as espécies *Annona muricata*, *Annona squamosa* e *Annona*

senegalensis a melhor porcentagem de germinação foi observada nas sementes escarificadas (Sagna et al., 2012), mas neste caso os autores relataram que a escarificação permitiu a entrada de água e oxigênio nas sementes, mesmo sem estudos de embebição e anatomia.

Sabe-se que diversas Annonaceae possuem tegumento permeável à água, como *Annona diversifolia*, *Annona purpurea* (Ferreira et al., 2014), e *Annona emarginata* (Gimenez et al., 2014b). Para *Annona cacans* isto também foi confirmado (Dalanhol et al., 2013), visto que as sementes escarificadas ou não apresentam o mesmo padrão inicial de absorção de água (Figura 4), além de não possuírem uma camada de células em paliçada no tegumento que seria uma característica de sementes com impermeabilidade do tegumento à água (Figura 6).

Se as sementes absorvem água, por que a escarificação ajudaria na superação da dormência? A oxidação dos fenóis presentes no tegumento pela ação da enzima polifenoloxidase forma uma barreira química à entrada de oxigênio nas sementes. Esta enzima utiliza como substratos o oxigênio e os fenóis (Mayer, 2006), desta forma, quando está ativa acaba consequentemente retendo parte do oxigênio no tegumento das sementes. Este fenômeno também já foi observado em sementes de cevada (Lenoir et al., 1986), contribuindo para a manutenção da dormência nessas sementes. Porém, no caso das sementes de cevada, este bloqueio ao oxigênio não interferiu na respiração do embrião, que seguiu pela via anaeróbica (Benech-Arnold et al., 2006), mas ajudou na manutenção da dormência mantendo altos níveis de ABA (Bradford et al., 2008).

De todos os tratamentos avaliados, verifica-se que apenas as sementes que foram escarificadas e embebidas em regulador superaram a dormência completamente, pois a germinação foi mais rápida e sincronizada (Figuras 2 e 3), ocorrendo em menos de 30 dias (Sautu et al., 2007). Nestas sementes, observou-se o efeito sinérgico da escarificação e do regulador, sendo que a escarificação aumentou a respiração das sementes e ao mesmo tempo, permitiu maior entrada do regulador. A elevada concentração de GA₄ após a embebição no regulador (tempo zero), comparada aos demais tratamentos, foi o que permitiu a ativação das enzimas amilolíticas e proteolíticas neste período. As giberelinas são conhecidas por estimular a germinação induzindo a síntese de enzimas hidrolíticas, as quais são responsáveis pela mobilização de reservas e estimulam a expansão do embrião (Finkelstein et al., 2008). Esta ativação de amilases já no tempo zero (Tabela 9, Figuras 12 e 13), garantiu suprimento de combustível para a respiração (Streb; Zeeman, 2012), que apresentou um pico aos seis dias, produzindo energia para o crescimento embrionário que ocorreu próximo aos 12 dias nestas sementes.

As sementes que foram só escarificadas ou só embebidas em regulador também apresentaram porcentagem de germinação elevada, porém com menor velocidade e sincronização, ou seja, sua germinação se estendeu ao longo do tempo, demonstrando que os fatores isolados diminuíram o bloqueio à germinação, mas não superaram totalmente a dormência das sementes.

Só a escarificação das sementes além de aumentar a respiração (Tabela 7, Figura 10), induziu a germinação das sementes sem precisar da embebição em regulador, pois não foi observada alterações no conteúdo de GA₄ nas sementes (Tabela 8, Figura 11), então o que promoveu a germinação foram as giberelinas que já estavam na semente, aliado a disponibilidade de oxigênio. Bradford et al. (2008) verificou que quanto maior a disponibilidade de oxigênio, menor será a concentração de giberelina necessária para promover a germinação das sementes, pois sem privação de oxigênio o embrião fica mais sensível aos efeitos das giberelinas.

Apesar de apresentar baixa respiração, só a embebição em regulador também levou à germinação das sementes. Apesar do tegumento ser uma barreira à entrada do GA₄, ainda assim a quantidade de regulador que entrou na semente foi suficiente para induzir sua germinação. Neste caso, o tegumento intacto permitiu entrada de menor quantidade de regulador, pois às vezes o tegumento pode ser permeável à água, que possui uma molécula pequena (PM=18), mas ser pouco permeável a moléculas maiores como o GA₄ (PM=332,4) (Mattana et al., 2012). Além disso, em condições de baixa concentração de oxigênio, o embrião pode precisar de mais giberelina para promover a germinação das sementes, pois nessas condições além dos níveis de ABA que se mantiveram elevados, o embrião está mais sensível aos seus efeitos (Benech-Arnold et al., 2006; Bradford et al., 2008). Ao contrário das sementes com disponibilidade de oxigênio, neste tratamento só com embebição em regulador foi observada maior atividade lipolítica ao longo das épocas avaliadas (Tabela 10, Figura 14), indicando que, possivelmente, na ausência de oxigênio a produção de energia para o embrião pode se dar pela degradação de lipídeos.

A atividade lipolítica geralmente é detectada após a emergência da raiz primária, pois o açúcar proveniente do metabolismo do glicerol e ácidos graxos é utilizado principalmente para o crescimento da plântula (Quettier; Eastmond, 2009). Porém, neste estudo, foi verificada a atividade lipolítica desde o tempo zero, principalmente nas sementes que não foram escarificadas. Isto se explica pelo fato de que em condições de hipóxia há um aumento na atividade de fosfolipases (Reggiani; Laoreti, 2000), enzimas que hidrolisam a membrana celular produzindo ácidos graxos livres (May et al., 1998; Bewley et al., 2013) que também podem ser

detectados na análise realizada. Isto somado ao fato de giberelinas atuarem na ativação de lipases de degradação de reservas (Fernandez; Staehelin, 1987), explica o fato das sementes sem escarificação, mas com embebição em regulador apresentarem os maiores valores de atividade lipolítica total.

A escarificação das sementes de *Annona cacans* pode ativar algum mecanismo de defesa da semente contra a predação, pois nestas condições verifica-se aumento nos fenóis do endosperma (Tabela 5, Figura 8). O estresse por herbivoria induz a síntese da enzima fenilalanina amônio liase - PAL (Hu et al., 2009), a qual tem papel chave na síntese de fenóis (Tsao, 2010). Estes, por sua vez, tem efeito tóxico para muitos herbívoros, pois atuam como inibidores enzimáticos, podendo atrasar ou impedir a digestão dos alimentos, fazendo-os evitarem esse tipo de fonte nutricional (Appel, 1993). Porém, este aumento dos compostos fenólicos no tegumento não resultou em aumento da dormência, demonstrando que a interferência desses compostos, em *Annona cacans*, se reflete somente em uma barreira química no tegumento.

Acredita-se que nas sementes de *Annona cacans* a presença de fenóis seja uma característica derivada adquirida para evitar a predação das sementes enquanto o animal se alimenta da polpa. Em outra espécie da família Annonaceae (*Mezzettia parviflora*) já foi verificado que o tegumento evoluiu suas propriedades mecânicas, apresentando células adensadas e grande resistência à fratura, o que confere um obstáculo à predação por insetos e herbívoros, porém mamíferos de grande porte ainda conseguem se alimentar das sementes, quebrando-as pela mastigação (Lucas et al., 2012). No caso de *Annona cacans*, isso poderia não ocorrer, pois a ingestão de fenóis pode ser tóxica para os animais, dificultando sua digestão, fazendo-os talvez, se alimentar da polpa evitando mastigar as sementes ou mesmo engolir-las.

Apesar de ser uma barreira mecânica para a predação, pode-se inferir que o tegumento não é duro o suficiente para impedir mecanicamente a germinação das sementes de Annonaceae, pois após a embebição, ocorre um aumento no volume do endosperma e no tamanho do embrião gerando pressão suficiente para romper a linha de abscisão localizada na região da pericalaza das sementes (Figuras 1 e 6; Lucas et al., 2012; Martinez-Maldonado et al., 2013). Este evento provoca uma rachadura no tegumento a partir da região micropilar e antecede a emergência da raiz primária (Silva et al., 2007). Isto evidencia que o bloqueio à germinação existente no tegumento de sementes de *Annona cacans* não é devido a uma barreira mecânica à germinação, mas sim a uma barreira química à entrada de oxigênio exercida pela oxidação dos fenóis.

A estrutura do tegumento e os mecanismos observados nas sementes podem ter uma função biológica importante, pois, levando-se em consideração as observações de *Annona cacans* no seu habitat natural, verifica-se que a dispersão das sementes ocorre no início do outono, quando as temperaturas estão ficando baixas. Este frio associado com a umidade do solo dessas regiões (Mata Atlântica) pode elevar a biossíntese de giberelinas (Kucera et al., 2005), aumentando seus níveis nas sementes. Durante esta estação fria, os compostos fenólicos do tegumento são oxidados aos poucos, mas com o tempo podem se esgotar e a eficácia desta barreira ao oxigênio pode diminuir (Bradford et al., 2008) mas, ao mesmo tempo, estes fenóis podem ajudar a manter a semente viva, impedindo sua predação (Appel, 1993). Conforme o tegumento fica permeável ao oxigênio, os níveis de ABA podem diminuir e quando as temperaturas voltarem a subir, provavelmente o balanço ABA:GA estará baixo, o que poderá promover a germinação, aliado a temperaturas entre 20 e 30°C que são observadas no verão dessas regiões.

LITERATURA CITADA

- Appel HM. 1993.** Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology* **19**: 1521–1552.
- Beevers L. 1968.** Protein degradation and proteolytic activity in the cotyledons of germinating pea seeds (*Pisum sativum*). *Phytochemistry* **7**: 1837–1844.
- Benech-Arnold RL, Gualano N, Leymarie J, Côme D, Corbineau F. 2006.** Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1423–1430.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. 2013.** *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. New York: Elsevier.
- Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP. 2013.** Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* **18**: 6852–6865.
- Bradford KJ, Benech-Arnold RL, Côme D, Corbineau F. 2008.** Quantifying the sensitivity of barley seed germination to oxygen, abscisic acid, and gibberellin using a population-based threshold model. *Journal of Experimental Botany* **59**: 335–347.
- Bradford MM. 1976.** A rapid method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **1-2**: 248–254.

- Braga JF, Ferreira G, Pinho SZ De, Sousa MP. 2010.** Germination of atemoya (*Annona cherimola* Mill . X *A. squamosa* L.) Cv . Gefner seeds subjected to treatments with plant growth regulators. *International Journal of Science and Nature* **1**: 120–126.
- Brasil. 2009.** *Regras para análise de sementes*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Brasil. 2010.** *Farmacopéia Brasileira*. V. 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Chagas PC, Sobral STM, Oliveira RR de, Chagas EA, Pio R, Santos VA dos. 2013.** Physical and chemical methods to breach seed dormancy of sugar apple. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* **56**: 1–6.
- Charney J, Tomarelli RM. 1947.** A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *The Journal of Biological Chemistry* **171**: 501–505.
- Corsato JM, Ferreira G, Barbedo CJ. 2012.** Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer and action of plant growth regulators on germination. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **24**: 253–260.
- Costa PN, Bueno SSC, Ferreira G. 2011.** Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Fruticultura* **33**: 253–260.
- Dalanhol SJ, Mombach TC, Toderke ML, Nogueira AV, Bortolini MF. 2013.** Dormência em sementes de *Annona cacans* Warm. (Annonaceae). *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais* **11**: S183–S189.
- Debeaujon I, Lepiniec L, Pourcel L, Routaboul J-M. 2007.** Seed coat development and dormancy. In: Bradford KJ, Nonogaki H, eds. *Seed development, dormancy and germination*. Oxford: Blackwell Publishing, 25–49.
- Dresch DM, Scalon SP. Q, Masetto TE. 2014.** Effect of storage in overcoming seed dormancy of *Annona coriacea* Mart. seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **86**: 2077–2085.
- Enujiugha VN, Thani FA, Sanni TM, Abigor RD. 2004.** Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). *Food Chemistry* **88**: 405–410.
- Fernandez DE, Staehelin L a. 1987.** Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells? *Plant physiology* **85**: 487–496.
- Ferreira G, González-Esquinca AR, De-La-Cruz-Chacón I. 2014.** Water uptake by *Annona diversifolia* Saff. and *A. purpurea* Moc. & sessé ex dunal seeds (Annonaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura* **36**: 288–295.

- Ferreira G, De-La-Cruz-Chacón I, González-esquinca AR. 2016.** Overcoming seed dormancy in *Annona macrophyllata* and *Annona purpurea* using plant growth regulators. *Revista Brasileira de Fruticultura* **38**: e-234.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008.** Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 387–415.
- Gimenez JI, Ferreira G, Cavariani C. 2014a.** Tetrazolium test for assessment of seed viability of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). *Journal of Seed Science* **36**: 357–361.
- Gimenez JI, Ferreira G, Corsato JM. 2014b.** Soluble sugars and germination of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seeds submitted to immersion in GA3 up to different water contents. *Revista Brasileira de Fruticultura* **36**: 281–287.
- Guglielminetti L, Yamaguchi J, Perata P, Alpi A. 1995.** Amylolytic Activities in Cereal Seeds under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Plant physiology* **109**: 1069–1076.
- Hu Z hui, Zhang W, Shen Y bai, Fu H jun, Su X hua, Zhang Z yi. 2009.** Activities of lipoxygenase and phenylalanine ammonia lyase in poplar leaves induced by insect herbivory and volatiles. *Journal of Forestry Research* **20**: 372–376.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry*. San Francisco: W. H. Freeman and Co.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Judd WS, Campbel CS, Kellongg EA, Steens PF, Donogue MJ. 2009.** *Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético*. 3ed. Porto Alegre: Artmed.
- Khor HT, Tan NH, Chua CL. 1986.** Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* **63**: 538–540.
- Kraus JE, Arduin M. 1997.** *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica: Edur.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005.** Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* **15**: 281–307.
- Labouriau LG, Agudo M. 1987.** On the physiology of seed germination in *S. hispanica* L. Temperature effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 59(1), 37-56.
- Lenoir C, Corbinean F, Come D. 1986.** Barley (*Hordeum vulgare*) seed dormancy as related to glumella characteristics. *Physiologia Plantarum* **68**: 301–307.
- Lopes DB, Fraga LP, Fleuri LF, Macedo GA. 2011.** Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **31**: 603–613.

- Lucas PW, Gaskins JT, Lowrey TK, Harrison ME, Morrogh-Bernard HC, Cheyne SM, Begley MR. 2012.** Evolutionary optimization of material properties of a tropical seed. *J R Soc Interface* **9**: 34–42.
- Ma L, Zhang H, Xu W, He X, Yang L, Luo Y, Huang K. 2013.** Simultaneous Determination of 15 Plant Growth Regulators in Bean Sprout and Tomato with Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* **6**: 941–951.
- Maas PJM, Kamer HM De, Junikka L, Mello-silva R De, Rainer H. 2001.** Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia* **52**: 65–98.
- Mace ME, Howell CR. 1974.** Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* **52**: 2423–2426.
- Maguire JD. 1962.** Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, **2**, 176-177.
- Martínez-Maldonado F, Miranda-Lasprilla D, Magnitskiy S. 2013.** Sugar apple (*Annona squamosa* L., Annonaceae) seed germination: morphological and anatomical changes. *Agronomía Colombiana* **31**: 176–183.
- Mattana E, Pritchard HW, Porceddu M, Stuppy WH, Bacchetta G. 2012.** Interchangeable effects of gibberellic acid and temperature on embryo growth, seed germination and epicotyl emergence in *Ribes multiflorum* ssp. *sandalioticum* (Grossulariaceae). *Plant Biology* **14**: 77–87.
- May C, Preisig-Müller R, Höhne M, Gnau P, Kindl H. 1998.** A phospholipase A₂ is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. *Biochimica et Biophysica Acta* **1393**: 267–276.
- Mayer AM. 2006.** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* **67**: 2318–2331.
- Müller LE. 1964.** *Manual de Laboratorio de Fisiología Vegetal*. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.
- Nambara E, Marion-Poll A. 2005.** Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 165–185.
- O'Brien TP, Feder N, Mccully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O. Protoplasma*, **59**: 368-373.
- Quettier AL, Eastmond PJ. 2009.** Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 485–490.
- Rainer H. 2001.** Nomenclatural and taxonomic notes on *Annona* (Annonaceae). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* **103 B**: 513–524.

- Reggiani R, Laoreti P. 2000.** Evidence for the involvement of phospholipase C in the anaerobic signal transduction. *Plant Cell Physiology* **41**: 1392–1396.
- Robinson DS. 1987.** *Food Biochemistry and Nutritional Value*. Logman Scientific and Technical: Essex.
- Sagna M, Ba O, Sy MO. 2012.** Germination Capacity of Annonaceae Seeds (*Annona muricata* L., *A. squamosa* L. and *A. senegalensis* Pers.) Cultivated Under Axenic Conditions. *International Journal of Science and Advanced Technology* **2**: 21–34.
- Sautu A, Jerry M. Baskin, Baskin CC, Deago J, Condit R. 2007.** Classification and ecological relationships of seed dormancy in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central America. *Seed Science Research* **17**: 127–140.
- Shu K, Liu XD, Xie Q, He ZH. 2016.** Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant* **9**: 34–45.
- Silva EAA, De Melo DLB, Davide AC, De Bode N, Abreu GB, Faria JMR, Hilhorst HWM. 2007.** Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Annals of Botany* **99**: 823–830.
- Smet S de, Damme P Van, Scheldeman X, Romero J. 1999.** Seed Structure and Germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Acta Horticulturae* **497**: 269–278.
- Streb S, Zeeman SC. 2012.** Starch metabolism in Arabidopsis In: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, 1–33.
- Socolowski F, Cicero SM. 2011.** Use of growth regulators to overcome seed dormancy in *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Seed Science and Technology* **39**: 21–28.
- Tsao R. 2010.** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231–1246.
- Weckenmann D, Martin P. 1984.** Endopeptidase activity and nitrogen mobilization in senescing leaves of *Nicotiana rustica* in light and dark. *Physiologia Plantarum* **60**: 333–340.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O repouso dos frutos, apesar de ser recomendado com a finalidade de facilitar o beneficiamento das sementes, mostrou-se prejudicial à germinação das sementes de *Annona cacans*. Observa-se perda gradual de vigor e viabilidade nas sementes conforme permanecem mais tempo nos frutos em repouso. Aos dois dias de repouso há uma diminuição na sincronização da germinação, aos quatro dias há um aumento nas sementes dormentes e, a partir dos seis até os dez dias verifica-se aumento crescente na mortalidade das sementes. Este pode ser o principal motivo pelo qual estas sementes não respondiam a tratamentos de superação de dormência em estudos anteriores, pois os frutos eram deixados em repouso sem o cuidado de que entrariam em processo fermentativo e se isso poderia causar algum dano à germinação das sementes.

Sementes de *Annona cacans* possuem tegumento fibroso, impregnado por compostos fenólicos que se estendem até as ruminações, desta forma, antes de embeber as sementes em reguladores vegetais é necessário escarificá-las, procedimento que além de aumentar a atividade respiratória do embrião, também permite maior entrada de regulador na semente, o que culmina com a superação da dormência nessas sementes. Lembrando que só a presença de compostos fenólicos em si, não é capaz de segurar o oxigênio no tegumento das sementes, devendo também apresentar atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), a qual é a responsável pela fixação do oxigênio aos compostos fenólicos. Sugere-se para estudos posteriores verificar se há um local específico no tegumento em que ocorre a atividade da enzima PPO, pois se o tegumento é fibroso, composto por células mortas com função de sustentação, onde estaria ocorrendo a atividade da enzima PPO?

Sementes intactas de *Annona cacans* apresentaram alta atividade lipolítica total quando secas (12% de água – tempo zero), sugerindo que as sementes após a secagem entrariam em um processo de degradação de lipídeos de membrana celular, o que poderia causar sua desestabilização, explicando a baixa longevidade dessas sementes em armazenamento (dados não publicados). *Annona cacans* é nativa da Mata Atlântica e, portanto, é dispersa em um ambiente úmido, onde permanece até que ocorra a germinação, ou seja, pode não estar adaptada à secagem e, quando é submetida a este procedimento em laboratório pode desencadear um processo de auto-destruição pela ação de lipases.

Em estudos posteriores que envolvam a propagação desta espécie, sugere-se que os frutos sejam beneficiados no mesmo dia da coleta e que as sementes sejam escarificadas e embebidas em giberelina, desta forma, a germinação será mais rápida e uniforme, o que diminuiria o tempo

de viveiro das mudas, além de evitar que as plântulas fiquem vulneráveis a pragas e doenças. Lembrando que a escarificação ou a embebição em regulador, isoladamente, são capazes de promover a germinação das sementes, podendo ser sugeridos somente a embebição em regulador em caso de pouca mão de obra para escarificação, ou então, somente a escarificação em caso de poucos recursos para a compra do regulador vegetal.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que o repouso após a coleta dos frutos é prejudicial à germinação de sementes de *Annona cacans* e que o tegumento intacto destas sementes promove condição natural de hipóxia ao embrião, o que contribui para a manutenção de sua dormência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 7, p. 1521–1552, 1993.

ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Rice and Phragmites: Effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 8, p. 1359–1370, 2001.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Seed dormancy in trees of climax tropical vegetation types. **Tropical Ecology**, v. 46, n. 1, p. 17–28, 2005.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998, 666p

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 2 ed. San Diego: Elsevier, 2014, 1586p.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C.; LI, X. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. **Plant Species Biology**, v. 15, p. 139–152, 2000.

BEEVERS, L. Protein degradation and proteolytic activity in the cotyledons of germinating pea seeds (*Pisum sativum*). **Phytochemistry**, v. 7, p. 1837–1844, 1968.

BENECH-ARNOLD, R. L.; GUALANO, N.; LEYMARIE, J.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 6, p. 1423–1430, 2006.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Elsevier, 2013.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852–6865, 2013.

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

BRADFORD, K. J.; BENECH-ARNOLD, R. L.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Quantifying the sensitivity of barley seed germination to oxygen, abscisic acid, and gibberellin using a population-based threshold model. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 335–347, 2008.

BRAGA, J. F.; FERREIRA, G.; PINHO, S. Z. De; SOUSA, M. P. Germination of atemoya (*Annona cherimola* Mill . X *A. Squamosa* L.) Cv . Gefner seeds subjected to treatments with plant growth regulators. **International Journal of Science and Nature**, v. 1, n. 2, p. 120–126, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres** (método 10 – acidez total titulável). Brasília: Ministério da Agricultura, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2009. 395 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.. **Farmacopéia Brasileira**. V. 2. Brasília: ANVISA, 2010.

BRIGGS, C. L.; MORRIS, E. C.; ASHFORD, A. E. Investigations into seed dormancy in *Grevillea linearifolia*, *G. buxifolia* and *G. sericea*: Anatomy and histochemistry of the seed coat. **Annals of Botany**, v. 96, n. 6, p. 965–980, 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 2 v. 1040p.

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

CHAGAS, P. C.; SOBRAL, S. T. M.; OLIVEIRA, R. R. de; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; SANTOS, V. A. dos. Physical and chemical methods to breach seed dormancy of sugar apple. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 56, p. 1–6, 2013.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501–505, 1947.

CHEN, S.-Y.; TSAI, Y.-H.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; CHIEN, C.-T. Seed dormancy and germination of the three tropical medicinal species *Gomphandra luzoniensis* (Stemonuraceae), *Nothapodytes nimmoniana* (Icacaceae) and *Goniothalamus amuyon* (Annonaceae). **Seed Science Research**, v. 25, n. 1, p. 57–63, 2015.

CORSATO, J. M.; FERREIRA, G.; BARBEDO, C. J. Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer and action of plant growth regulators on germination. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 4, p. 253–260, 2012.

COSTA, P. N.; BUENO, S. S. C.; FERREIRA, G. Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 253–260, 2011.

CROCKER, W. Mechanics of dormancy in seeds. **American Journal of Botany**, v. 3, n. 3, p.99-120, 1916.

DALANHOL, S. J.; MOMBACH, T. C.; TODERKE, M. L.; NOGUEIRA, A. V.; BORTOLINI, M. F. Dormência em sementes de *Annona cacans* Warm. (Annonaceae). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 11, n. supl1, p. S183–S189, 2013.

DEBEAUJON, I.; LEPINIEC, L.; POURCEL, L.; ROUTABOUL, J.-M. Seed coat development and dormancy. In: Bradford KJ, Nonogaki H, eds. **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p. 25-49.

DESKA, J.; JANKOWSKI, K.; BOMBIK, A.; JANKOWSKA, J. Effect of growing medium pH on germination and initial development of some grassland plants. **Acta Scientiarum Polonorum Seria Agricultura**, v. 10, n. 4, p. 45–56, 2011.

DRESCH, D. M.; SCALON, S. P. . Q.; MASETTO, T. E. Effect of storage in overcoming seed dormancy of *Annona coriacea* Mart. seeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 2077–2085, 2014.

ENUJIUGHA, V. N.; THANI, F. A.; SANNI, T. M.; ABIGOR, R. D. Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). **Food Chemistry**, v. 88, p. 405–410, 2004.

FARIAS, L. R. G.; PAULO JÚNIOR, E. P. N.; FREITAS, L. R.; LOPES, J. D.; PAULO, M. Q. Avaliação da atividade toxicológica dos extratos das sementes de *Annona cacans* (Annonaceae). In: 57ª Reunião Anual da SBPC, 2005, Fortaleza. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2005.

FERNANDEZ, D. E.; STAEHELIN, L. a. Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells? **Plant physiology**, v. 85, n. 2, p. 487–496, 1987.

FERREIRA, G.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I. Water uptake by *Annona diversifolia* Saff. and *A. purpurea* Moc. & sessé ex dunal seeds (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 288–295, 2014.

FERREIRA, G.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Overcoming seed dormancy in *Annona macrophyllata* and *Annona purpurea* using plant growth regulators. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 3, p. e-234, 2016.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v. 171, p. 501–523, 2006.

FINKELSTEIN, R.; REEVES, W.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. Molecular Aspects of Seed Dormancy. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 387–415, 2008.

FINNESETH, C. H.; LAYNE, D. R.; GENEVE, R. L. Morphological development of the North American pawpaw during germination and seedling emergence. **Hortscience**, v. 33, n. 5, p. 802-805, 1998.

FUERST, E. P.; ANDERSON, J. V.; KENNEDY, A. C.; GALLAGHER, R. S. Induction of Polyphenol Oxidase Activity in Dormant Wild Oat (*Avena fatua*) Seeds and Caryopses: A Defense Response to Seed Decay Fungi. **Weed Science**, v. 59, n. 2, p. 137–144, 2011.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia - Is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 449–456, 2004.

GACHONS, C. P.; KENNEDY, J. A. Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5877–5881, 2003.

GALASTRI, N.A. **Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de *Annona dioica* A. St.-Hil., *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. e *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae).** 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/ Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

GIMENEZ, J. I.; FERREIRA, G.; CAVARIANI, C. Tetrazolium test for assessment of seed viability of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 4, p. 357–361, 2014a.

GIMENEZ, J. I.; FERREIRA, G.; CORSATO, J. M. Soluble sugars and germination of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seeds submitted to immersion in GA₃ up to different water contents. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 281–287, 2014.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; DOMÍNGUEZ-GUTÚ, L. M. Dormancy and germination of *Annona macrophyllata* (Annonaceae): the importance of the micropylar plug and seed position in the fruits. **Botanical Sciences**, v. 93, n. 3, p. 1–7, 2015.

GRANDTNER, M. M.; CHEVRETTE, J. **Dictionary of trees: South America.** Nomenclature, Taxonomy and Ecology (2nd edition). New York: Elsevier, 2014.

GUBLER, F.; HUGHES, T.; WATERHOUSE, P.; JACOBSEN, J. Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. **Plant Physiology**, v. 147, p. 886-896, 2008.

GUGLIELMINETTI, L.; YAMAGUCHI, J.; PERATA, P.; ALPI, A. Amylolytic Activities in Cereal Seeds under Aerobic and Anaerobic Conditions. **Plant physiology**, v. 109, p. 1069–1076, 1995.

HADAS, A. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental of Botany**, v.27, p.480- 489, 1976.

HARPER, J. L. **Population Biology of Plants.** London: Academic Press, 1977. 892p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices.** 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915p.

HILHORST, H. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, v. 5, n. 2, p. 61–73, 1995.

HILHORST, H. W. M. Definitions and hypotheses of seed dormancy. In: Bradford KJ, Nonogaki H, eds. **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p. 50–71.

HIMANEN, M.; PROCHAZKA, P.; HÄNNINEN, K.; OIKARI, A. Phytotoxicity of low-weight carboxylic acids. **Chemosphere**, v. 88, n. 4, p. 426–431, 2012.

HU, Z. hui; ZHANG, W.; SHEN, Y. bai; FU, H. jun; SU, X. hua; ZHANG, Z. yi. Activities of lipoxygenase and phenylalanine ammonia lyase in poplar leaves induced by insect herbivory and volatiles. **Journal of Forestry Research**, v. 20, n. 4, p. 372–376, 2009.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: W. H. Freeman and Co. 1962.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company. 1940.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLONGG, E.A.; STEENS P.F.; DONOGUE, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KHOR, H. T.; TAN, N. H.; CHUA, C. L. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 63, n. 4, p. 538–540, 1986.

KOS, M.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Relationship of kinds of seed dormancy with habitat and life history in the Southern Kalahari flora. **Journal of Vegetation Science**, v. 23, p. 869–879, 2012.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edur, 1997.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, v. 15, n. 4, p. 281–307, 2005.

LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *S.hispanica* L. 1. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.59, n.1, p.37- 56, 1987.

LANG, G. A; EARLY, J. D.; ARROYAVE, N. J.; DARNELL, R. L.; MARTIN, C. G.; STUTTE, G. W. Dormancy: toward a reduced, universal terminology. **Hortscience**, v. 20, n. 5, p. 809-812, 1985.

LANG, G. A.; EARLY, J. D.; MARTIN, C. G.; DARNELL, R. L. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. **Hortscience**, v. 22, n. 3, p. 371-377, 1987.

LENOIR, C.; CORBINEAN, F.; COME, D. Barley (*Hordeum vulgare*) seed dormancy as related to glumella characteristics. **Physiologia Plantarum**, v. 68, p. 301–307, 1986.

LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 603–613, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. V. 1, 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2016.

LUCAS, P. W.; GASKINS, J. T.; LOWREY, T. K.; HARRISON, M. E.; MORROGH-BERNARD, H. C.; CHEYNE, S. M.; BEGLEY, M. R. Evolutionary optimization of material properties of a tropical seed. **J R Soc Interface**, v. 9, n. 66, p. 34–42, 2012.

MA, L.; ZHANG, H.; XU, W.; HE, X.; YANG, L.; LUO, Y.; HUANG, K. Simultaneous Determination of 15 Plant Growth Regulators in Bean Sprout and Tomato with Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 941–951, 2013.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M. De; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. De; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 65–98, 2001.

MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 52, p. 2423–2426, 1974.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**; n. 2, p. 176-177, 1962.

MAHAJAN, S. S.; KUMAWAT, R. N. Study of Seed Dormancy in Colocynth (*Citrullus colocynthis* L.) with After-Ripening of Fruits, Seed Extraction Procedures and Period of Seed Storage. **National Academy Science Letters**, v. 36, n. 4, p. 373–378, 2013.

MAMLOUK, D.; GULLO, M. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 377–384, 2013.

MARTIN, A. C. The comparative internal morphology of seeds. **American Midland Naturalist**, v. 36, n. 3, p. 513–660, 1946.

MARTÍNEZ-MALDONADO, F.; MIRANDA-LASPRILLA, D.; MAGNITSKIY, S. Sugar apple (*Annona squamosa* L., Annonaceae) seed germination: morphological and anatomical changes. **Agronomía Colombiana**, v. 31, n. 2, p. 176–183, 2013.

MATTANA, E.; PRITCHARD, H. W.; PORCEDDU, M.; STUPPY, W. H.; BACCHETTA, G. Interchangeable effects of gibberellic acid and temperature on embryo growth, seed germination and epicotyl emergence in *Ribes multiflorum* ssp. *sandalioticum* (Grossulariaceae). **Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 77–87, 2012.

MAY, C.; PREISIG-MÜLLER, R.; HÖHNE, M.; GNAU, P.; KINDL, H. A phospholipase A2 is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1393, n. 2–3, p. 267–276, 1998.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2318–2331, 2006.

MIKICH, S. B. A dieta frugívora de *Penélope superciliaris* (Cracidae) em remanescentes de floresta estacional semidecidual no centro-oeste do Paraná, Brasil e sua relação com *Euterpe edulis* (Arecaceae). **Ararajuba**, v. 10, n. 2, p. 207–217, 2002.

MÜLLER, L.E. **Manual de Laboratório de Fisiologia Vegetal**. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.. Turrialba, Costa Rica, 1964. 165p

MURDOCH, A. J.; ELLIS, R. H. Dormancy, Viability and Longevity. In: FENNER, M. **Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities**. 2 ed. New York: CABI, 2000, p. 183-214.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Absciscic Acid Biosynthesis and Catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 165–185, 2005.

NASCIMENTO, M. C. B. S.; MORAIS, A. A.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ FILHO, R.; PIMENTA, L. P. S. Acetogeninas de *Annona cacans* Warming. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006. Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2006.

NOELLI, F. S. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia Guarani através de informações históricas. **Diálogos**. DHI/UEM, v. 2, p. 177-199, 1998.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination – still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574–581, 2010.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. O. **Protoplasma**, v.59, p.368-373, 1964.

PARMAR, I.; RUPASINGHE, H. P. V. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 613–620, 2013.

PASSAM, H. C.; MAKROGIANNI, D.; GREGORIOU, F.; KARAPANOS, I. C. The Size and Germination of Eggplant Seed in Relation To Fruit Maturity At Harvest, After-Ripening and Ethylene Application. **Analele Universitatii din Oradea - Fascicula Biologie**, v. 17, n. 2, p. 225–229, 2010.

PISKUREWICZ, U.; JIKUMARU, Y.; KINOSHITA, N.; NAMBARA, E.; KAMIYA, Y.; LOPEZ-MOLINA, L. The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. **The Plant cell**, v. 20, n. 10, p. 2729–2745, 2008.

QUETTIER, A. L.; EASTMOND, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 485–490, 2009.

RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; FERJANI, E. El. Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, p. 1128–1131, 2010.

RAINER, H. Nomenclatural and taxonomic notes on Annona (Annonaceae). **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien**, v. 103 B, p. 513–524, 2001.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 507–533, 2012.

RATAJCZAK, E.; PUKACKA, S. Decrease in beech *Fagus sylvatica* seed viability caused by temperature and humidity conditions as related to membrane damage and lipid composition. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 1, p. 3–12, 2005.

REGGIANI, R.; LAORETI, P. Evidence for the involvement of phospholipase C in the anaerobic signal transduction. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 12, p. 1392–1396, 2000.

ROBINSON, D. S. **Food Biochemistry and Nutritional Value**. Logman Scientific and Technical: Essex, 1987.

SAGNA, M.; BA, O.; SY, M. O. Germination Capacity of Annonaceae Seeds (*Annona muricata* L., *A. squamosa* L. and *A. senegalensis* Pers.) Cultivated Under Axenic Conditions. **International Journal of Science and Advanced Technology**, v. 2, n. 6, p. 21–34, 2012.

SAITO, M. L.; OLIVEIRA, F. Variação sazonal dos componentes de *Annona cacans* Warming. **Lecta**. Bragança Paulista, v. 12, n. 2, p. 49-62, 1994.

SAUTU, A.; JERRY M. BASKIN; BASKIN, C. C.; DEAGO, J.; CONDIT, R. Classification and ecological relationships of seed dormancy in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central America. **Seed Science Research**, v. 17, n. 2, p. 127–140, 2007.

SHU, K.; LIU, X. D.; XIE, Q.; HE, Z. H. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. **Molecular Plant**, v. 9, n. 1, p. 34–45, 2016.

SILVA, E. A. A.; DE MELO, D. L. B.; DAVIDE, A. C.; DE BODE, N.; ABREU, G. B.; FARIA, J. M. R.; HILHORST, H. W. M. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, v. 99, n. 5, p. 823–830, 2007.

SMET, S. de; DAMME, P. Van; SCHELDEMAN, X.; ROMERO, J. Seed Structure and Germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Acta Horticulturae**, v. 497, p. 269–278, 1999.

SOCOLOWSKI, F.; CICERO, S. M. Use of growth regulators to overcome seed dormancy in *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 21–28, 2011.

STREB, S.; ZEEMAN, S. C. Starch metabolism in Arabidopsis. In: **The Arabidopsis Book**. [s.l.] American Society of Plant Biologists, 2012. p. 1–33.

SUGANUMA, M. S.; BARBOSA, C. E. D. A.; CAVALHEIRO, A. L.; TOREZAN, J. M. D. Enriquecimento artificial da diversidade de espécies em reflorestamentos: Análise preliminar de dois métodos, transferência de serapilheira e semeadura direta. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 151–158, 2008.

SUN, T.; GUBLER, F. Molecular Mechanism of Gibberellin Signaling in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 197–223, 2004.

SVOMA, E. Seed morphology and anatomy in some Annonaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 209, p. 177–204, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5 ed., Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TÓFOLI, C.; MEDICI, P.; VALLADARES-PÁDUA, C. Frugivoria e dispersão de sementes por **Tapirus terrestris** (Linnaeus, 1758) na paisagem fragmentada do pontal do Paranapanema, São Paulo. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu. **Anais ...**, p. 1-3.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231–1246, 2010.

TUNES, L. M. de; AVELAR, S. A. G.; BARROS, A. C. S. A.; PEDROSO, D. C.; MUNIZ, M. F. B.; MENEZES, N. L. de. Critical levels of organic acids on seed germination and seedling growth of wheat. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 366–372, 2012.

TURNER, B. Y. G. D.; LAU, R. R.; YOUNG, D. R. Effect of acidity on germination and seedling growth of *Paulownia tomentosa*. **Journal of Applied Ecology**, v. 25, n. 2, p. 561–567, 1988.

WADA, S.; KENNEDY, J. A.; REED, B. M. Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 4, p. 762–768, 2011.

WECKENMANN, D.; MARTIN, P. Endopeptidase activity and nitrogen mobilization in senescing leaves of *Nicotiana rustica* in light and dark. **Physiologia Plantarum**, v. 60, n. 3, p. 333–340, 1984.

WILLIS, C. G.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; AULD, J. R.; VENABLE, D. L.; CAVENDER-BARES, J.; DONOHUE, K.; CASAS, R. R. de. The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. **New Phytologist**, v. 203, p. 300–309, 2014.

YAMAGUSHI, S.; KAMIYA, Y.; NAMBARA, E. Regulation of ABA and GA levels during seed development and germination in *Arabidopsis*. In: Bradford KJ, Nonogaki H, eds. **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p. 224-247.

ZAIDAN, L. B. P.; BARBEDO, C. J. Quebra de dormência em sementes. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (orgs.) **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 135-146.