



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

**PROCESSOS DE INDUÇÃO E DE INIBIÇÃO DA REGENERAÇÃO DE  
PLÂNTULAS DE SEMENTES DE *EUGENIA PYRIFORMIS* CAMBESS**

**TALITA SILVEIRA AMADOR**

**Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biociências, Câmpus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas  
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

**BOTUCATU - SP**

**- 2011 -**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

**PROCESSOS DE INDUÇÃO E DE INIBIÇÃO DA REGENERAÇÃO DE  
PLÂNTULAS DE SEMENTES DE *EUGENIA PYRIFORMIS* CAMBESS**

**TALITA SILVEIRA AMADOR**

**PROFº DRº CLAUDIO JOSÉ BARBEDO**

**ORIENTADOR**

**PROFª DRª ELAINE MONTEIRO CARDOSO LOPES**

**Coorientadora**

**Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biociências, Câmpus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas  
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

**BOTUCATU - SP**

**- 2011 -**

“*Ler* é pensar com a cabeça de outrem em vez da própria.

*Pensar* por si é esforçar-se para desenvolver um todo coerente...”

Arthur Schopenhauer

DEDICO

Aos meus pais Amélia D. G. Silveira Amador e Clineu Amador  
À minha irmã Tânia M. Silveira Amador  
À minha tia Laura Silveira

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom me dado, bondade e misericórdia, sempre me proporcionando força e perseverança para a execução e conclusão deste trabalho;

Ao CNPq pela bolsa cedida a mim e pelo auxílio financeiro (Proc. 477640/2009-5);

À Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc. 2005/04139-7),

À Universidade Estadual Paulista - UNESP, pela oportunidade de aprimorar minha formação acadêmica;

Ao Instituto de Botânica que possibilitou a execução deste trabalho em suas instalações;

Aos núcleos de Sementes e Melhoramento Vegetal, Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, pela permissão do uso da infra-estrutura;

Ao Dr. Claudio José Barbedo, pela orientação exemplar e segura, em especial na reta final desse trabalho, mostrando-se amigo e profissional muito competente;

À Dra. Elaine M. C. Lopes, pela coorientação e por me oferecer novos conhecimentos;

Ao meu pai, Clineu, pela real dedicação à minha educação, apoio financeiro, amor, confiança me dada desde o momento que iniciei a jornada pelos meus sonhos, pelos valores me passado que para sempre me acompanharão;

À minha mãe, Amélia, pela luta desde o início da nossa união, por acreditar em mim e na minha competência e acima de tudo pelo amor incondicional,

À minha amada irmã, Tânia, pelo amor, motivação e compreensão pelas horas que estive ausente;

À minha avó Zela, por todos os carinhos que sempre aqueceram meu coração;

À minha tia Laura Silveira e meus primos, pelo lar me dado enquanto estive em São Paulo, carinho e ensinamentos;

À Marisa Sakai, por guiar a busca pelo meu equilíbrio e autocontrole, essencial para a conclusão de mais uma meta da minha vida;

Às minhas “flores” Ana Paula Cheirubim, Angélica L. Rodrigues, Egláia de Carvalho e Maiara Destro, pela amizade incomensurável, amor, dedicação, conselhos, palavras de carinho e conforto desde a graduação em Bandeirantes-PR;

Aos amigos de longa data Bruna M. Delmondes, Fernanda M. Galvani, Murilo Q. Shigematsu, Renato Spinosa, Sabrine F. Kinoshita, pelo apoio, afeto, amizade e companheirismo desde a minha infância em Dracena-SP;

Aos novos irmãos que fiz: Ana Lívia Negrão, Fernanda Tresmondi, Guilherme Scotta, Levi Machado e Priscilla Denise Almeida... quem tem amigos nunca ficará sozinho!

Aos muitos amigos do alojamento Adilma, Aluisio Jr, Camila Carvalho, Camila Malone, César Donato, Daiane, Gisele, Helisvânia, Jadson, Kleber Renan, Luanda, Majoi, Maurício, Simone Wengrat, Simone Silva, Talisson, Thiara, Watson Gama, e mais tantos outros!

Aos amigos que muito me ajudaram na fase inicial do mestrado, Daniella Vinha e Ewerton Manarin, pelas horas de lazer, conversas despreziosas e incrivelmente significativas;

Aos amigos do Núcleo de Sementes Carmen, Carolina, Cibele, Débora, João, Juliana, Lamarca, Márcio (melhor amigo mesário), Nestor, pela amizade, companhia valiosa e discussões científicas;

Às amigas, Renata Bueno, Lígia e Letícia pela hospedagem cedida em tantas idas a Botucatu, em especial durante o primeiro ano;

Ao Rodrigo Cabral, pela paciência em me ajudar com o ASE.

## Sumário

1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introdução geral.....	3
4. Revisão de literatura.....	6
5. Capítulo 1 – Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de uvaieira.....	19
6. Capítulo 2 – Extratos etanólicos e aquosos de sementes de <i>Eugenia pyriformis</i> Cambess potencialmente inibidores da germinação obtidos de sementes fracionadas e germinantes .....	41
7. Considerações finais.....	72
8. Conclusões.....	73
9. Referências.....	74

AMADOR, T. S. **PROCESSOS DE INDUÇÃO E DE INIBIÇÃO DA REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS DE SEMENTES DE *EUGENIA PYRIFORMIS* CAMBESS.** 2011. 82P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**1. RESUMO** – Sementes de *Eugenia* spp. tem demonstrado excepcional capacidade regenerativa mesmo sendo monoembriônicas, podendo apresentar formação de mais de uma plântula a partir de uma mesma semente, mas somente quando submetidas a fracionamento. Isso significa que processos de indução e de inibição podem estar atuando e que o balanço na concentração de promotores e inibidores, nestas sementes, pode definir o potencial de regeneração de novas raízes e plântulas. Neste trabalho, sementes de *Eugenia pyriformis* foram submetidas a incisões totais ou parciais e avaliadas quanto à germinação e à produção de plântulas. Além disso foram feitos extratos aquosos e etanólicos de *E. pyriformis* em diferentes fases de germinação e esses aplicados na própria espécie e em aquênios de alface com intuito de analisar o potencial inibidor desses extratos. Os resultados confirmaram a capacidade regenerativa dessas sementes, a qual é reprimida quando a germinação se inicia, sendo que o corte de sementes germinantes de *E. pyriformis* poderia provocar tanto a indução do desenvolvimento de raízes e plântulas, decorrente da lesão, quanto o bloqueio de processos potencialmente inibidores, devido ao isolamento da fração germinante. Extrato de sementes germinantes mostraram efeito inibidor maior, tanto para germinação quanto para produção de plântulas normais, para a própria espécie e para alface, confirmando a produção contínua desses compostos durante as primeiras fases da germinação.

**Palavras-chave:** *Eugenia pyriformis*, regenerabilidade, fracionamento, alelopatia.



AMADOR, T.S. PROCESS FOR INDUCTION AND INHIBITION OF REGENERATION OF SEEDLING SEED *EUGENIA PYRIFORMIS* CAMBESS. 2011. 82P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**2. ABSTRACT** - Seeds of *Eugenia* spp. has demonstrated exceptional regenerative capacity even though monoembryonic, may present more than one seedling from a single seed, but only when submitted to fractionation. This means that processes of induction and inhibition may be operating and that the balance in the concentration of promoters and inhibitors, these seeds can define the potential for regeneration of new roots and seedlings. In this work, seeds of *Eugenia pyriformis* were submitted to total or partial incisions and evaluated for germination and seedling production. Furthermore were made water and ethanol extracts of *E. pyriformis* in different phases of germination and those applied in their own species and in lettuce seeds in order to analyze the inhibitory potential of these extracts. The results confirmed the regenerative capacity of the seed, which is repressed when germination starts, and the court of germinating seeds of *E. pyriformis* could induce the induction of the development of roots and seedlings, resulting from injury, and blocking procedures potential inhibitors, due to the isolation of the fraction germinating. Extract of germinating seeds showed higher inhibitory effect, both germination and production of normal seedlings, for their own species and lettuce, confirming the continuous production of these compounds during the early stages of germination.

**Index terms:** *Eugenia pyriformis*, regenerability, cutting, inhibitors, allelopathy.

### 3. Introdução Geral

Diversas espécies de *Eugenia* apresentam grande interesse econômico, pelos seus saborosos frutos, muitos dos quais já explorados comercialmente como *E. uniflora* (pitanga), pelas propriedades farmacológicas (Holetz *et al.* 2002, Roesler *et al.* 2007, Pott & Pott 1994, Lunardi *et al.* 2001) e fungicidas (Núñez *et al.* 2001, Christian & Goggi 2008) cientificamente comprovadas em compostos secundários de suas partes vegetais ou, ainda, pelas características ornamentais bastante úteis no paisagismo urbano (Lorenzi 1998; Pott & Pott 1994; Marchiori & Sobral 1997). Além disso, são espécies de grande importância ecológica, sendo bem representadas nas diversas formações vegetacionais do Brasil (Leitão Filho 1993; Barroso & Peron 1994; Chagas & Silva *et al.* 1995; Rodrigues & Nave 2000; Arantes & Monteiro 2002). Suas sementes recalcitrantes não toleram a perda de água e sofrem danos em diferentes níveis durante a secagem e o armazenamento (Pammenter *et al.* 1984), estando sujeitas a danos ultraestruturais (Berjak & Pammenter 2000).

As mirtáceas brasileiras compreendem diversos gêneros de árvores e arbustos que podem ser utilizados de forma ornamental ou na produção comercial de frutos. Além da goiaba (*Psidium guajava*), pitanga (*E. uniflora* L), uvaia (*E. pyriformis* Cambess.) e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), outras espécies podem ser potencialmente utilizadas na fruticultura, devido à qualidade de suas frutas e adaptação a algumas condições de clima subtropical (Donadio & Moro 2004, Pott & Pott 1994, Marchiori & Sobral 1997, Lorenzi 1998). As espécies do gênero *Eugenia* são interessantes para serem utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente, por terem frutos amplamente consumidos pela avifauna que auxiliam na dispersão das sementes (Lorenzi 1992).

*Eugenia*, com cerca de 1.000 espécies, é um dos maiores gêneros da família, com distribuição principalmente nas Américas Central e do Sul (Merwe *et al.* 2004) e está inserida na subfamília Myrtoideae, o qual inclui todos os gêneros de Myrtaceae que apresentam frutos carnosos (Lughadha & Proença 1996).

O mecanismo reprodutivo de cada espécie é importante para assegurar a perpetuação de seus descendentes e para uma possível colonização de novos habitats, além de constituir a base para o desenvolvimento dos processos evolutivos naturais

(Darwin 1859, Stebbins 1950, Grant 1971). Do ponto de vista econômico, a propagação é um dos principais pilares para se manter uma cultura economicamente viável, seja ela através da produção de frutos e de sementes ou pela propagação vegetativa.

As sementes de *Eugenia* sp. são reportadas como de curta longevidade (Gentil & Ferreira 1999), por serem recalcitrantes não toleram a perda de água e sofrem danos em diferentes níveis durante a secagem e o armazenamento (Pammenter *et al.* 1984), estando sujeitas a danos ultraestruturais (Berjak & Pammenter 2000).

Apesar de sua curta longevidade estudos recentes têm demonstrado que sementes de *Eugenia* apresentam excepcional capacidade regenerativa e, mesmo sendo monoembriônicas, podem apresentar formação de mais de uma plântula a partir de uma mesma semente (Anjos e Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005, Justo 2007, Teixeira 2009). Esta alta capacidade regenerativa deve ocorrer em função do embrião, de maneira geral, ser um organismo constituído por células meristemáticas toti ou pluripotentes, dispondo de todas as informações necessárias para crescer e dar origem a uma planta adulta (Marcos Filho 2005; Batygina & Vinogradova 2007), também pode estar envolvida num processo de evolução adaptativa, uma vez que insetos, aves e mamíferos são atraídos pelos frutos dessa espécie, muitas vezes causando injúrias às sementes (Teixeira 2009).

Em estudo feito por Silva *et al.* (2003), sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis*) foram cortadas longitudinalmente ou transversalmente em duas partes e essas mantiveram elevada porcentagem de germinação e de produção de plântulas normais, mesmo quando a fração resultante do corte tinha apenas 1/4 da semente. Em um segundo experimento, as sementes foram cortadas em até oito partes e pelo menos uma das frações de cada semente continuou apresentando germinação. Em trabalho de Silva *et al.* (2005) foram estudados o comportamento germinativo de sementes de três espécies de *Eugenia*, *E. involucrata* DC. (cereja), *E. uniflora* L. (pitanga) e *E. brasiliensis* Lam. (grumixama), submetidas ao fracionamento. As sementes das três espécies foram submetidas a fracionamentos, mantendo-se metade do seu tamanho original. Dessa forma, além do controle (sem fracionamento), obtiveram-se frações com o hilo íntegro, sem o hilo ou com metade do hilo. Nas três espécies, sementes fracionadas ao meio, contendo pelo menos a metade do hilo, mantiveram elevada capacidade de iniciar o processo germinativo e de produzir plântulas normais. Os resultados desses trabalhos indicam que, por meio do fracionamento, é possível obter mais de uma plântula normal a partir de cada semente.

A germinação nunca superior a 100% de sementes não fracionadas pode indicar que a regeneração de um segundo embrião em uma mesma semente só ocorre quando a mesma é fracionada (Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005), podendo existir mecanismos de indução e de autoinibição a partir do momento em que a semente inicia a germinação. Tal hipótese é reforçada pela presença de substâncias inibidoras da germinação nas sementes de *Eugenia*, como verificado em *E. dysenterica* (Rizzini 1970), impedindo a germinação ou, até, a diferenciação de um segundo embrião.

Os resultados obtidos em trabalhos anteriores (Delgado *et al.* 2010, Teixeira 2009) sugerem a presença de substâncias químicas inibidoras nos extratos, revelando potencial inibidor para *Eugenia uniflora* ao desenvolvimento de um novo eixo hipocótilo-radícula ou de uma nova plântula em sementes de *Eugenia cerasiflora*, *E. pyriformis*, *E. involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Analisar a regenerabilidade de plântulas de *Eugenia pyriformis* em sementes submetidas a lesões, como resultante de processos de indução e de inibição;
2. Identificar a presença de substâncias potencialmente inibidoras da germinação e do crescimento de plântulas em extratos de sementes germinantes de *E. pyriformis*.

## 4. Revisão de Literatura

### *Família e Gênero*

Myrtaceae é uma das maiores famílias botânicas com milhares de espécies reunidas em aproximadamente 140 gêneros (Johnson & Briggs 1984; Landroum & Kawasaki 1997; Wilson *et al.* 2001).

No Brasil a família Myrtaceae encontra-se representada por cerca de 23 gêneros e mil espécies (Landrum & Kawasaki 1997). Aproximadamente um terço dessas espécies pertence ao gênero *Eugenia*, que apresenta ampla distribuição, ocorrendo desde o México até a Argentina (McVaugh 1968; Johnson & Briggs 1984).

Em todos os ecossistemas brasileiros, as mirtáceas se destacam como uma das famílias mais importantes e diversificadas (Mori *et al.* 1983, Fabris & Cesar 1996). O gênero *Eugenia* também encontram-se bem representado nas diversas formações vegetacionais brasileiras, não apenas quanto à riqueza específica, mas também quanto à abundância e frequência de suas espécies (Klein 1984; Peixoto & Gentry 1990; Leitão Filho 1993; Barroso & Peron 1994; Chagas e Silva *et al.* 1995; Rodrigues & Nave 2000; Arantes & Monteiro 2002).

Diversas espécies do gênero *Eugenia* produzem frutos saborosos, os quais podem ser consumidos *in natura* ou na forma de geléias e doces, tendo elevado potencial para a industrialização de sucos. Essas espécies podem também ser utilizadas na recuperação de áreas degradadas, como atrativo para a fauna (Andrade & Ferreira 2000; Lorenzi 2002). Existem ainda relatos do potencial medicinal contra doenças (Schmeda-Hirschmann *et al.* 1987; Theodoluz *et al.* 1988).

### *Espécie estudada*

#### *Eugenia pyriformis* Cambess.

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) é uma espécie arbórea de porte mediano, ocorrendo naturalmente desde São Paulo até o Rio Grande do Sul e, provavelmente, estendendo-se até o Paraguai e a Argentina (Donadio *et al.* 2002; Lorenzi 2002). Seus frutos têm aroma agradável e sabor adocicado.

O crescimento da árvore é relativamente rápido e sua frutificação é precoce (Andrade & Ferreira 2000). É conhecida popularmente como uvaia, ubaia e

uvalha, derivando da denominação indígena *iwa'ya*, cujo significado é fruto ácido (Lorenzi 2002; Franzon *et al.* 2004). A espécie é resistente a doenças e sua madeira dura tem sido empregada regionalmente para mourões, estacas, postes, lenha e carvão. Os frutos são amplamente consumidos por várias espécies de pássaros, o que torna a espécie recomendável para o reflorestamento de áreas degradadas (Lorenzi 2002).

O fruto maduro é uma baga de cor amarela, com mesocarpo carnoso. O número de sementes por fruto é variável, geralmente não excedendo a quatro, no entanto, elas são menores quando mais numerosas (Justo *et al.* 2007).

A semente é exalbuminosa, de formato elíptico irregular, variando de globoso a semigloboso. O embrião é maciço, globoso, de cor esbranquiçada e preenche todo o espaço delimitado pelo tegumento. Os cotilédones são carnosos, retos e rugosos.

Em *E. pyriformis*, o tegumento das sementes é delgado, de cor marrom variegada e de textura cartácea. A rafe destaca-se pela cor ligeiramente mais pálida do que o restante do tegumento, estendendo-se sobre a face convexa da superfície da semente. A protrusão da raiz pode ser observada na extremidade da rafe (Justo *et al.* 2007).

#### *Comportamento de sementes durante o armazenamento*

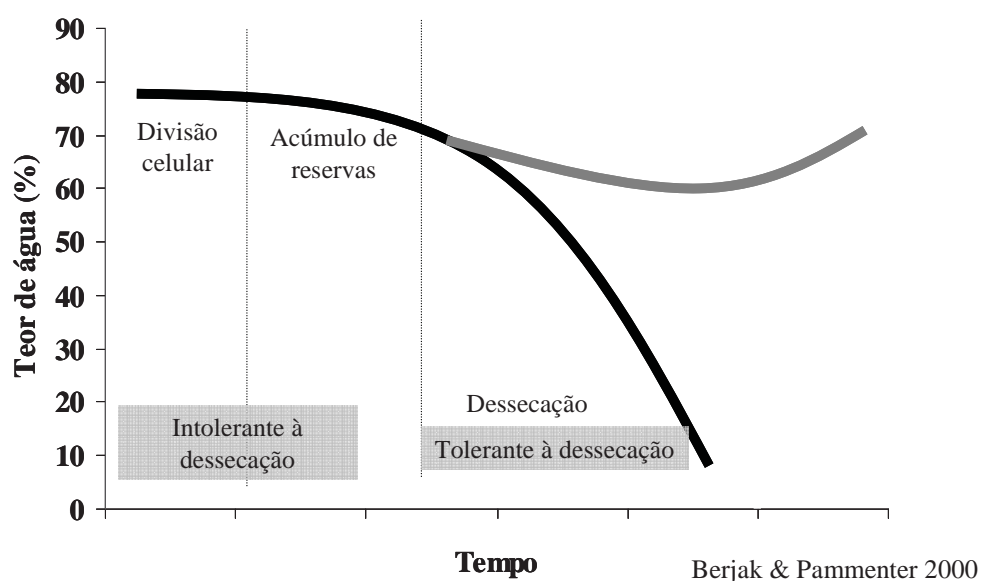
A água assume importante papel no período de formação e maturação das sementes e, ao final da maturação, dois tipos de comportamento são observados: nas sementes ortodoxas há redução considerável do teor de água e, nas recalcitrantes, mantém-se o elevado teor de água (Barbedo & Marcos Filho 1998).

Na maioria das sementes, o desenvolvimento pode ser dividido convencionalmente em três fases confluentes. A primeira fase é caracterizada pelo crescimento inicial devido à divisão celular e a um aumento rápido no peso fresco da semente inteira e conteúdo de água. Depois disso há uma fase intermediária de maturação, na qual a semente aumenta de tamanho devido, principalmente, à expansão celular e à deposição de reservas. Finalmente, o desenvolvimento da maioria das sementes termina com uma fase pré-programada da secagem de maturação ou dessecação.

Caracteristicamente, essas sementes são chamadas ortodoxas porque se submetem a algum grau de dessecação (Bewley & Black 1994, Castro *et al.* 2004). Isso resulta numa redução gradual no metabolismo da semente e o embrião passa para um

estado quiescente ou metabolicamente inativo. As sementes ortodoxas são exclusivas quanto à tolerância à dessecação cerca de 90 a 95% da água é removida durante o desenvolvimento e a dessecação (Black & Pritchard 2002).

No entanto, para as espécies com sementes recalcitrantes, pode ocorrer passagem direta da fase de desenvolvimento para a germinativa, sem a dessecação, podendo germinar quando ainda está ligada a planta-mãe (Barbedo & Marcos Filho 1998). Portanto, não apresentam período de transição entre a maturação e a germinação e raramente apresentam dormência (Marcos Filho 2005). Estas tem, em geral, períodos de vida muito limitados, morrendo devido à secagem (Castro *et al.* 2004).



Em relação ao comportamento no armazenamento, as sementes podem ser classificadas, como recalcitrantes, intermediárias e ortodoxas, podendo ser conservadas, respectivamente, por curto, médio e longo prazo (Roberts 1973, Eira 1996).

A tolerância fisiológica das sementes à dessecação, no período pós-colheita, é variável, sendo que as sementes classificadas como ortodoxas toleram graus de dessecação próximos de 2% a 5%, ou ainda níveis menores. As sementes intermediárias toleram graus de dessecação em torno de 10% a 13%, sendo sua viabilidade reduzida em níveis inferiores de umidade, já as recalcitrantes não toleram dessecação a graus de umidade entre 15% a 20% (Roberts 1973, Hong & Ellis 1996).

Contudo, existe uma larga escala de comportamentos de tolerância à dessecação e de armazenamento entre as espécies classificadas como recalcitrantes (Kermode & Finch-Savage 2002). Considerando essa variação, entre outras características, Farrant *et*

al. (1988) propuseram a separação das sementes recalcitrantes em “altamente”, “moderadamente” e “minimamente” recalcitrantes.

A comparação entre as propriedades da água em embriões maduros de sementes ortodoxas e recalcitrantes não mostra diferenças acentuadas, levando à conclusão de que a tolerância à dessecação não resulta apenas da quantidade de água estruturada, mas envolve a habilidade de perder uma quantidade considerável de água (Marcos Filho 2005).

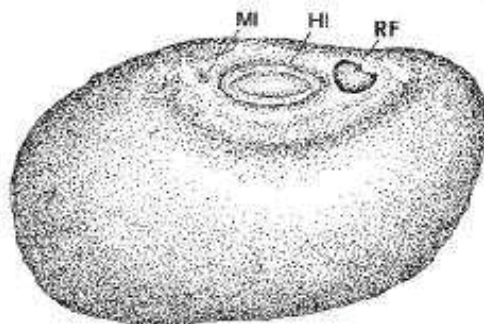
As sementes ortodoxas podem tolerar desidratação quase completa, o que não ocorre com as sementes recalcitrantes. Após a histodiferenciação, as células de sementes ortodoxas completam os vacúolos com proteínas, acumulam açúcares, alteram a composição da membrana, produzem proteínas LEA (“late-embryogenesis-abundant”) e entram no estado vítreo. Essas modificações hipoteticamente seriam responsáveis por conferir tolerância à desidratação. No entanto, estes mesmos processos podem ocorrer nos mesmos graus em sementes recalcitrantes, dificultando a demonstração de que atuariam como protetores (Walters 2000).

Espécies do gênero *Eugenia*, tais como *E. pyriformis* Cambess., *E. uniflora* L., *E. brasiliensis* Lam., são recalcitrantes e geralmente as sementes são grandes com tegumento delgado e perdem rapidamente a viabilidade quando submetidas à dessecação (Maluf *et al.* 2003; Delgado 2006), dificultando, dessa maneira, a produção de mudas pelo curto período de disponibilidade das sementes (Lorenzi 2002; Silva *et al.* 2003). Por esta razão, recomenda-se a semeadura imediatamente após a retirada dos frutos (Silva *et al.* 2001; Lorenzi 2002).

#### *Anatomia e morfologia de sementes*

A semente origina-se do óvulo ou do rudimento seminal e permanece encerrada no pericarpo do fruto. Em razão de sua origem ovular, a semente madura pode apresentar cicatrizes em sua superfície, como a micrópila, oriunda da micrópila do óvulo, que permanece como uma pequena depressão ou poro; o hilo, que é uma cicatriz deixada pelo rompimento do funículo ou pedúnculo da semente que a ligava ao pericarpo; e a rafe, cicatriz ou pequena elevação que ocorre em sementes originadas de óculo curvos, resultante da fusão do funículo com o tegumento (Souza, 2003).





**Figura 1:** Semente de *Phaseolus vulgaris* (feijão), onde: MI: micrópila; HI: hilo; RF: rafe (Souza, 2003).

Uma característica comum aos representantes da ordem Myrtales (Tobe & Raven 1983) e do gênero *Eugenia* (Flores & Rivera 1989) é de ter sementes exalbuminosa.

Landrum & Stevenson (1986), estudaram a estrutura do embrião na subtribo Myrtinae, na qual predominam sementes pequenas com eixo embrionário volumoso e rico em reservas. Segundo Barroso (2002), o embrião no gênero *Eugenia* é globoso, sem diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones; além disso, considera-se o embrião conferruminado, ou seja, sem distinção da linha de soldadura entre os cotilédones. Outros autores afirmam que não há diferenciação entre o eixo embrionário e os cotilédones (Andrade & Ferreira 2000; Lucas *et al.* 2005).

A anatomia das sementes de Myrtaceae tem sido investigada com alguma ênfase para espécies de importância econômica. Barroso (2002) afirma que o embrião nas sementes do gênero *Eugenia* é globoso, crasso, conferruminado e sem diferenciação aparente entre o eixo radícula-hipocótilo e os cotilédones.

Justo *et al.* (2007) contradiz as afirmações de Andrade & Ferreira (2000) e Lucas *et al.* (2005), uma vez que o eixo embrionário encontrou-se diferenciado na semente madura, porém não visível na superfície da semente devido ao fato de estar parcialmente encoberto por tecido, o qual foi interpretado como a região de conexão entre o eixo e os cotilédones.

## *Apomixia e Poliembrionia*

A produção de sementes não é necessariamente dependente da fecundação. Quando a fecundação cruzada ocorre, esse fenômeno intitula-se anfimixia.

A anfimixia nas angiospermas é promovida pela dioicia, condição na qual flores carpeladas e estaminadas ocorrem em indivíduos diferentes, e também pela monoicia, onde flores carpeladas e estaminadas ocorrem separadamente na mesma planta. A anfimixia é também promovida pela dicogamia, onde os estames e os carpelos de uma flor maturam em diferentes momentos, ou simplesmente pela separação física dessas estruturas reprodutivas dentro da flor. A auto-incompatibilidade genética, que ocorre amplamente nas angiospermas, torna a autopolinização impossível mesmo que os estames e os estigmas madurem num mesmo momento e entrem em contato entre si. Desta forma, as angiospermas desenvolveram um conjunto de características que atraem uma grande variedade de animais polinizadores — principalmente insetos — que asseguram um alto grau de polinizações cruzadas e desenvolvimento evolutivo (Raven *et al.* 2001).

Algumas espécies de plantas produzem sementes sem que haja fecundação, por um processo assexual. Esse fenômeno denomina-se apomixia. As sementes formadas, que são chamadas apomíticas, dão origem a plântulas com as mesmas características, em termos de constituição genética, da planta mãe, exceto a possíveis diferenças nas variações somáticas (Carvalho & Nakagawa, 2000).

Goldenberg & Shepherd (1998) confirmam que as espécies apomíticas possuem maior habilidade em colonizar ambientes inóspitos, apresentando uma distribuição mais ampla que as não apomíticas. Estudos que possibilitem a implantação da apomixia em plantas agrícolas já são amplamente discutidos, prometendo grandes benefícios econômicos e sociais (Grossniklaus *et al.* 1998, Van Baarlen *et al.* 1999).

A apomixia, é descrita em cerca de 15% das famílias das angiospermas. Aproximadamente 75% das espécies apomíticas estão nas famílias Gramineae (Poaceae), Asteraceae e Rosaceae.

Segundo Asker & Jerling (1992), há dois tipos principais de apomixia: apomixia gametofítica e a esporofítica. A apomixia gametofítica é a mais amplamente distribuída, tendo a formação de um saco embrionário não reduzido (diplóide), por dois caminhos diferentes: diplosporia ou aposporia. Nestes sacos embrionários não reduzidos, haverá desenvolvimento do embrião a partir da oosfera (partenogênese) ou, mais raramente, a

partir das sinérgidas ou antípodas (apogametia). O endosperma pode desenvolver-se também autonomamente, ou seja somente a partir dos núcleos polares, ou pela união de um núcleo masculino com os núcleos polares (pseudogamia). Em apomíticos pseudogâmicos há, portanto, necessidade de polinização, mas apenas para a formação do endosperma. Na outra forma de apomixia, a apomixia esporofítica também chamada de embrionia adventícia, não há formação de sacos embrionários, mas os embriões diplóides desenvolvem-se diretamente a partir de células dos envoltórios do óvulo.

A apomixia esporofítica mostra-se facultativa na maioria dos casos (Richards 1997), podendo ocorrer concomitante à reprodução sexuada. Tanto ações gênicas recessivas como dominantes tem sido relatadas para a mesma espécie como para espécies distintas. A presença de apomixia obrigatória e facultativa na mesma espécie, assim como variações no grau de expressão da apomixia facultativa na espécie, indicam que a apomixia pode ser afetada por genes modificadores e também pela constituição genética das populações (Hanna, 1995).

Ambos processos, anfimixia e apomixia, ocorrendo em plantas que tenham atingido a fase reprodutiva de seu desenvolvimento, baseado em suas estruturas reprodutivas: masculinas, estes são anteras, grão de pólen e gametas masculinos; enquanto as estruturas femininas são os óvulos e o saco embrionário, contendo os gametas femininos. Esse processo termina na formação da semente. Anfimixia e apomixia são equivalentes em função entre as angiospermas. A reprodução sexual, anfimixia, ocupa posição dominante (Naumova 2007).

A apomixia é geralmente acompanhada pela formação de mais de um embrião em um mesmo óvulo (Fahn 1990) fenômeno chamado de poliembrionia. Caracteriza-se pela presença de dois ou mais embriões em uma mesma semente, verificando-se, na maioria das vezes, a existência de um único embrião obtido por via sexuada, sendo os demais de origem assexuada, geneticamente idênticos à planta mãe, comumente denominados nucelares em razão de serem formados a partir de células do nucelo, tecido nutritivo temporário localizado na superfície do saco embrionário, estrutura essa que se desenvolverá na futura semente.

Segundo vários autores, a poliembrionia é dominante sobre a monoembrionia (Russo & Starrantino 1975).

Um dos primeiros estudos sobre poliembrionia em Myrtaceae foi feito por Gurgel e Soubiê Sobrinho (1951), que estudaram as seguintes espécies: goiaba (*Psidium guajava* L.), araçá (*Psidium araçá* Raddi), pitanga (*Eugenia uniflora* L.),

uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.), cabeludinha (*Eugenia tomentosa* Camb.), cereja do Rio Grande (*Myrcianthes edulia* Berg), guabiroba (*Myrtus mucronata* Camb.), grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam.), pitomba (*Phyllocalix luschnathianus* Berg) e jabuticaba branca (*Gomidesia reticulata* Berg) e revelaram ter somente um único embrião.

Delgado *et al.* (2010) afirma que *E. cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora* são monoembriônicas.

### *Metabolismo Secundário*

Uma das principais características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica, sendo de maneira geral, o metabolismo definido como um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. Nas plantas o metabolismo é dividido em dois tipos: o metabolismo primário e o secundário (Taiz & Zeiger, 2009).

Os metabólitos primários como os lipídios, as proteínas e carboidratos são de ocorrência universal em todos os seres vivos e estão envolvidos na respiração, assimilação de nutrientes, crescimento e desenvolvimento, sendo por isso, considerados essenciais (Kliebenstein, 2004). Já os metabólitos secundários são compostos de distribuição restrita e que nas plantas perfazem apenas 1% ou menos, do total de carbono, porém, sua diversidade estrutural entre as espécies vegetais é considerável (Pilchersky & Gang, 2000).

Ao contrário dos animais, as plantas são imóveis e por isso não são capazes de se locomover como resposta ao ataque de insetos e, muito menos, utilizam o sistema imunológico quando infectadas por fungos, bactérias ou vírus. Como alternativa às plantas, só restou o convívio com micro-organismos e herbívoros e dessa interação surgiram estratégias de sobrevivência que incluíram a produção de defesa química (Funasaki, 2006). Dessa forma, pode-se dizer que os metabólitos secundários têm papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, contribuindo assim, com o aumento da probabilidade de sobrevivência (Fumagali *et al.*, 2008).

De acordo com Taiz & Zeiger (2009), os metabólitos secundários são geralmente classificados com base em suas vias biossintéticas e os principais grupos são: compostos nitrogenados, terpenos e compostos fenólicos.

Os terpenos são substâncias sintetizadas a partir de diferentes rotas biossintéticas, entre elas a rota do ácido mevalônico ocorre no citoplasma das células

secretoras dos tricomas peltados. São formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos, sendo assim classificados pelo número de unidades pentacarbonadas que possuem, por exemplo, os de 10 carbonos com duas unidades de 5C e assim por diante (Taiz & Zeiger 2009).

Para as plantas, a principal importância dos terpenos é a defesa contra a herbivoria e, também, propriedades repelentes e inseticidas. Os óleos essenciais encontrados em muitos vegetais são formados por monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, conferindo aromas característicos a certas espécies. Outros terpenos participam do desenvolvimento vegetal, como é o caso das citocininas, giberelinas e ácido abscísico, sendo estes, importantes hormônios vegetais. Os esteróis também são terpenos (triterpenos) essenciais na composição de membranas celulares, as quais são estabilizadas pela interação destes com os fosfolipídios. Os carotenóides de cor vermelha, amarela e laranja são tetraterpenos que agem como pigmentos acessórios na fotossíntese e protegem os tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação (Taiz & Zeiger 2009).

Os compostos nitrogenados, como o nome sugere, possuem nitrogênio em sua estrutura e incluem-se nesta categoria, alguns compostos conhecidos como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos. Muitos compostos nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos comuns (Taiz & Zeiger 2009). Entretanto, os alcalóides não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros e espécies vegetais. Esta distribuição restrita dos compostos secundários constitui a base da quimiotaxonomia e ecologia química (Harborne 1988). O papel dos alcalóides nas plantas ainda é uma questão difícil de ser respondida, mas de acordo com Croteau *et al.* (2000), algumas respostas estão surgindo amparadas nas funções ecoquímicas destes compostos. O papel dos alcalóides nas defesas químicas das plantas é sustentado pela grande variedade de efeitos fisiológicos que estes exercem sobre os animais e, também, por suas atividades antimicrobianas. Vários alcalóides são tóxicos aos insetos e atuam como repelentes para herbívoros (Taiz & Zeiger 2009).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal (Kosar *et al.* 2004), sendo caracterizados por apresentarem um grupo fenol (grupo hidroxila funcional e um anel aromático), o que possibilita atuarem como agentes redutores, exercendo proteção ao organismo contra o estresse oxidativo (Scalbert & Williamson 2000).

Na indústria alimentícia e farmacêutica, os compostos fenólicos vêm atraindo a atenção dos pesquisadores devido ao seu uso potencial como antioxidantes naturais.

Estas moléculas atuam como sequestradoras de radicais livres, prevenindo a peroxidação de lipídios (Sokmen *et al.* 2005), agindo na prevenção de doenças que envolvam a ação de radicais livres e a oxidação de lipoproteínas, como em problemas cardiovasculares, arteriosclerose e trombose (Wang & Zhang 2005), além de agirem modulando respostas fisiológicas em animais, como a vasodilatação e a inflamação (Rice-Evans & Packer 2003).

Nas plantas, as principais propriedades dos compostos fenólicos são: defesa contra a herbivoria, inibição da germinação de sementes, crescimento de fungos alelopatia, fenômeno onde algumas espécies de planta utilizam os compostos fenólicos para inibir o desenvolvimento de outras plantas nas proximidades. Harborne (1988) também enfatiza a importância dos fenilpropanóides como supressores do apetite de insetos. Além disso, contribuem no sabor, odor e coloração de diversos vegetais sendo muito usados como flavorizantes (aldeído cinâmico e vanilina), corantes na indústria alimentícia e cosmética (Proença Da Cunha *et al.* 2003).

Enfatizam-se também, a atividade antioxidante dos derivados fenólicos de *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Camellia sinensis* (chá verde) dentre outros e a atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica dos ésteres do ácido cafeico (Simões *et al.*, 1999).

Os compostos fenólicos estão agrupados em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas (Shahidi 2004).

Os flavonóides constituem uma das maiores classes de compostos fenólicos. O esqueleto básico dos flavonóides contém 15 carbonos em um arranjo com dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de 3 carbonos aberta ou fechada. Esta estrutura é resultante de duas rotas biossintéticas separadas: a rota do ácido chiquímico, através da fenilalanina e a rota do ácido malônico. Os flavonóides são classificados em diferentes grupos, primeiramente, pelo grau de oxidação da cadeia de três carbonos. Os diferentes flavonóides desempenham funções diversas nos vegetais, incluindo pigmentação, proteção contra radiação ultravioleta (fotoprotetora) e defesa contra herbívoros e patógenos (Taiz & Zeiger 2009).

O interesse pelos flavonóides tem aumentado nos últimos anos e tal fato se deve a crescente preocupação da população pela qualidade de vida, aliada a alimentação saudável. Fato é que estudos comprovaram os benefícios dos flavonóides, bem como

outros compostos fenólicos, para a saúde humana. A principal forma de obtenção destes compostos é através de alimentos considerados nutracêuticos, os quais se baseiam na ideia da cura pela alimentação. No entanto, formulações de produtos naturais também já podem ser adquiridas na forma de cápsulas. Outra forma de utilização desses compostos bioativos e através de formulações cosméticas, onde as empresas estão investindo cada vez mais em pesquisas por novos produtos retirados da própria natureza, fortalecendo a necessidade do desenvolvimento sustentável.

O gênero *Eugenia* é rico em metabólitos secundários. Em *E. uniflora* são encontrados altos teores de antocianinas e flavonóis, pigmentos antociânicos, que são considerados compostos fenólicos, carotenóides totais (Lima *et al.*, 2000, Draetta *et al.*, 1985). *E. jambolana* são ricas em flavonóides glicosilados, taninos elágicos e ácidos fenólicos, ácido gálico, taninos e antocianinas (Mahmoud *et al.* 2001).

### *Alelopatia*

Os aleloquímicos podem apresentar ação direta ou indireta sobre a planta alvo. Alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e também nas populações e/ou atividade de organismos que habitam o solo são consideradas como efeitos indiretos. Os efeitos diretos, por sua vez, são mais estudados e compreendem alterações celulares e metabólicas, incluindo modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintetizante e respiratória, entre outras (Rice 1984; Rizvi *et al.* 1992; Reigosa *et al.* 1999). As saponinas, os taninos e os flavonóides hidrolizados estão entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos, podendo ser liberados em condições naturais, já que são hidrossolúveis (Rice 1984; Ferreira & Aqüila 2000). Em função dessas alterações, a alelopatia é reconhecida como um processo ecológico importante em ecossistemas naturais e manejados, influenciando na sucessão vegetal primária e secundária, na estrutura, composição e dinâmica de comunidades vegetais nativas ou cultivadas (Chou 1986; Rizvi *et al.* 1992; Reigosa *et al.* 1999; Scrivanti *et al.* 2003). Neste último caso, os aleloquímicos são vistos como alternativas a agroquímicos sintéticos, objetivando o manejo sustentável e ecológico na produção agrícola.

Muitas substâncias alelopáticas apresentam grande potencial para uso no controle biológico de ervas daninhas (Putnam & Duke 1974; Macharia & Peffley 1995;

Anaya 1999; Chou 1999; Chung *et al.* 2001), sendo parcial ou totalmente solúveis em água e ativas em baixas concentrações (Vyvyan 2002). Em contrapartida ao poder fitotóxico, os efeitos de promoção da germinação e do crescimento vegetal causados por aleloquímicos também são de interesse para o manejo agrícola (Vyvyan 2002). A autoxicidade é uma forma específica de alelopatia na qual a planta produz compostos químicos que prejudicam a germinação e/ou o desenvolvimento da própria espécie (Chon 2004).

De acordo com Pires *et al.* (2001), o efeito alelopático pode ser classificado em dois tipos. Autotoxicidade é um mecanismo intraespecífico de alelopatia que ocorre quando uma espécie de planta libera determinada substância química que inibe ou retarda a germinação e o crescimento de plantas da própria espécie, e heterotoxicidade, que ocorre quando uma substância com efeito fitotóxico é liberada por determinada planta afetando a germinação e o crescimento de plantas de outra espécie .

A decomposição de resíduos vegetais destaca-se como a fonte de aleloquímicos mais importante; entretanto, esse processo de liberação não é uniforme, variando conforme o ecossistema (Reigosa *et al.* 1999), sazonalidade, fenologia e clima.

As investigações dos efeitos de sazonalidade em espécies de Myrtaceae parecem demonstrar que estes não são fatores de variabilidade preponderantes para o óleo da família. Mesmo para a espécie brasileira *Myrcia myrtifolia*, a composição química do óleo foi praticamente constante ao longo de uma avaliação feita mensalmente por um ano e sete meses por Cerqueira *et al.* (2007). A sazonalidade é um fator fundamental a ser considerado quando se trata da variabilidade química de óleos voláteis. Alterações na composição do óleo obtido em diferentes épocas do ano foram demonstradas para muitas espécies. A fenologia, associada à sazonalidade para a maioria das espécies, também é um dos fatores relacionados às alterações na composição química de óleos essenciais e outros metabólitos secundários (Perry *et al.* 1999, Juteau *et al.* 2002).

A sazonalidade pode modificar o rendimento de óleos voláteis e, em geral, valores mais elevados estão associados aos meses de verão e/ou a períodos que antecedem a fase reprodutiva (Bylaité *et al.* 2000, Angelopoulou *et al.* 2002, Flamini *et al.* 2007).

A interferência alelopática dificilmente é provocada por um único fator isolado, mas há união e ação sinérgica conjunta de várias destas substâncias somadas às condições ambientais. Torna-se difícil identificar qual composto químico específico produz o efeito alelopático, visto que um mesmo organismo produz diversos



aleloquímicos e desencadeiam diversas interações. Um exemplo dessa complexidade é o da *Vinca rosea*, na qual foram identificados mais de 100 compostos alelopáticos (Almeida, 1988). Atualmente, são conhecidos cerca de dez mil produtos secundários, porém pode existir um número maior desses compostos. Entretanto até agora foram somente estudados e identificados os componentes principais de algumas espécies. Os metabólitos secundários podem ser separados em grupos químicos que variam de acordo com o pesquisador. Whittaker e Feeny (1971) agrupam em cinco: ácidos fenólicos, flavonóides, terpenóides, esteróides e alcalóides. Enquanto, Rice (1974) separa em quinze categorias agrupadas em conformidade com as similaridades químicas. E finalmente para Putnam (1985), os compostos são: gases tóxicos, ácidos orgânicos e aldeídos, ácidos aromáticos, lactonas simples insaturadas, terpenóides, esteróis, quinonas, flavonóides, taninos, alcalóides, coumarinas e diversos, sendo as principais rotas biossintéticas desses compostos são a via do acetato e ou do ácido chiquímico (Souza Filho *et al.*, 2002).

Ainda são poucas as informações sobre como as substâncias alelopáticas atuam nas plantas e a grande dificuldade é que essas substâncias podem afetar mais de uma função e provocar efeitos colaterais difíceis de distinguir dos principais.

Entretanto, os processos biológicos mais prejudicados são divisão celular, síntese orgânica, interação com hormônios, efeito sobre enzimas, metabolismo respiratório, abertura estomáca, fotossíntese, absorção de nutrientes, mudanças no metabolismo lipídico (Rezende *et al.* 2003), além de afetar o crescimento, respiração, síntese de proteínas e permeabilidade da membrana celular e/ou atividade enzimática (Almeida, 1988).

Estudos mostram o potencial alelopático do gênero *Eugenia*. *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae), possui efeito alelopático (Borghetti *et al.*, 2005; Aires, 2007; Giotto *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007). Borghetti *et al.* (2005) estudaram os efeitos dos extratos aquosos de folhas adultas *E. dysenterica*, sobre sementes e plântulas de gergelim. Constataram que os extratos de cagaita a 1% resultaram na redução do crescimento radicular das plântulas tratadas em cerca de 80%. Aires (2007) mostrou que extratos foliares de *E. dysenterica* foram alelopaticamente mais ativos, verificou também considerável redução na porcentagem de plântulas de *Zea mays* e *Bidens pilosa*, com presença de pêlos radiculares, sob efeito dos extratos cagaita.

## **5 . Capítulo 1**

### **Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de uvaieira**

Talita Silveira Amador<sup>(1)</sup> e Claudio José Barbedo<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. E-mail:

talitamador@hotmail.com <sup>(2)</sup>Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Sementes. E-mail: claudio.barbedo@pesquisador.cnpq.br

(capítulo formatado segundo normas do periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Resumo - Sementes monoembriônicas de "uvaieira" (*Eugenia pyriformis* Cambess.) tem demonstrado a capacidade de regenerar mais de uma plântula, mas somente quando submetidas a fracionamento. Isso significa que processos de indução e de inibição podem estar atuando e que o balanço na concentração de promotores e inibidores, nestas sementes, pode definir o potencial de regeneração de novas raízes e plântulas. Neste trabalho, sementes de uvaieira foram submetidas a incisões totais ou parciais e avaliadas quanto à germinação e à produção de plântulas. Os resultados confirmaram a capacidade regenerativa dessas sementes, a qual é reprimida quando a germinação se inicia. Portanto, o corte de sementes germinantes de uvaieira poderia provocar tanto a indução do desenvolvimento de raízes e plântulas, decorrente da lesão, quanto o bloqueio de processos potencialmente inibidores, devido ao isolamento da fração germinante. Isto pode explicar porque as sementes de uvaieira regeneram novas mudas apenas quando cortadas.

Termos de indexação: *Eugenia pyriformis*, fracionamento, inibidores, produção de mudas, regenerabilidade.

### **Potential for inhibition of root and seedling regeneration by germinating "uvaieira" seeds**

Abstract - Monoembryonic seeds of "uvaieira" (*Eugenia pyriformis* Cambess.) have shown the ability to regenerate more than one seedling but only after cutting. This means that both induction and inhibition process should be involved and the net result of the promoters and inhibitors concentrations into these seeds would define the potential for regeneration of new radicle or seedlings. In this work, seeds of uvaieira were submitted to partial or complete cutting and evaluated as for germination and

seedling production. Results confirmed the regenerability capacity of these seeds which is repressed when germination starts. Therefore, cutting germinating seeds of uvaieira could trigger both the induction of radicle and seedling development, because of the injury, and the blocking of potential inhibitory process, because of the isolation of the germinating fraction. This could explain why uvaieira seeds can regenerate new seedlings just when cut.

Index terms: *Eugenia pyriformis*, cutting, inhibitors, plantlet production, regenerability.

## Introdução

A uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess.) é frutífera nativa do Brasil que produz frutos de grande interesse comercial, industrial e farmacológico. Os frutos apresentam tamanho, forma, cor de casca e sabor atrativos ao consumo *in natura* e a composição físico-química de sua polpa oferece alta qualidade organoléptica e nutricional (Scalon et al., 2004a, b; Delgado & Barbedo, 2007; Oliveira et al., 2010). Diversas espécies do gênero *Eugenia* tem demonstrado grande interesse para a exploração industrial. A pitangueira (*E. uniflora*), por exemplo, mostrou-se com grande potencial para a produção de fármacos (Pepato et al., 2001) e, na uvaieira, os frutos contém óleos com propriedades bacteriostáticas, principalmente para *Enterococcus faecalis*, bactéria associada com a redução do tempo de prateleira de produtos alimentícios (Stieven et al., 2009).

Sementes de espécies de *Eugenia*, da família Myrtaceae, também tem sido objeto de pelo fato de apresentarem potencial para regenerar novas raízes e até plantas inteiras a partir de sementes que tiveram parte de sua massa removida. Além dessa característica poder ser empregada tecnologicamente para ampliar o potencial de

produção de mudas, cientificamente revela uma característica de rara ocorrência para sementes. As características anatômicas do embrião de *Eugenia* e a origem de novas plântulas a partir desse embrião, quando fracionado, vem sendo estudadas (Justo et al., 2007; Delgado, 2010). Contudo, tem-se verificado que a regeneração de novas raízes e plântulas ocorre somente após o fracionamento da semente (Silva et al., 2003, 2005).

A família Myrtaceae contempla algumas espécies com sementes poliembriônicas (Landrum & Kawasaki, 1997), mas os embriões de *Eugenia* tem sido descritos como monoembriônicos e apresentam-se como estruturas globosas, sendo a diferenciação entre cotilédone e eixo hipocótilo-radícula visível apenas microscopicamente (Gurgel & Soubihe Sobrinho, 1951; Salomão & Allen, 2001; Justo et al., 2007; Delgado et al., 2010). Portanto, o surgimento de raízes e plântulas nessas sementes, após fracionadas, deve decorrer da formação de novos tecidos e não do desenvolvimento de embriões diferenciados já existentes. Contudo, a dependência do fracionamento para que esses tecidos se desenvolvam sugere algum processo de indução, a partir de uma lesão, ou de autoinibição, a partir do início de uma germinação.

Rizzini (1970) verificou que sementes de *E. dysenterica* têm substâncias inibidoras da germinação e que esse potencial inibidor aumenta quando o embrião começa a germinar. O estudo de substâncias inibidoras da germinação em sementes de uvaieira poderia contribuir, portanto, para elucidar a hipótese da autoinibição, como verificado em sementes de cafeeiro (Pereira et al., 2002). Por outro lado, em estudos de organogênese, a taxa de formação e o desenvolvimento de embriões, somáticos ou zigóticos, são fortemente influenciados pela composição química do meio. O balanço entre açúcares, aminoácidos e reguladores de crescimento, por exemplo, tem demonstrado efeitos ora indutores, ora inibidores da formação de novos embriões (Deo et al., 2010; Karami & Saidi, 2010; Swamy et al., 2010; Kanwar et al., 2011). Assim,

em sementes de *Eugenia* o início da germinação de um embrião poderia modificar o balanço daqueles compostos, tornando o meio desfavorável à diferenciação de novas plântulas.

Sementes de *Eugenia stipitata* ssp. *sororia*, que também apresentaram capacidade de regenerar embriões após fracionamento, tiveram desenvolvimento de plântulas a partir da região oposta à injuriada na qual, aparentemente, estava a zona meristemática (Anjos & Ferraz, 1999). Contudo, na fração complementar houve formação de plântulas na superfície do corte, sugerindo alguma polaridade na mobilização de hormônios. Tal fato também poderia explicar a dependência da separação das metades da semente para que uma segunda plântula possa ser regenerada. Uma vez iniciada a germinação, a semente poderia produzir substâncias que inibissem a diferenciação de novos tecidos embrionários, migrando-as da região germinante para as demais. Dessa forma, uma fração de semente somente poderia iniciar o desenvolvimento de novas raízes e plântulas após separada dos tecidos restantes. No presente trabalho, verificou-se o potencial de inibição da formação de novas plântulas em sementes germinantes de uvaieira por meio de fracionamentos e fissuras em sementes.

### **Material e Métodos**

Frutos maduros de uvaieira, *Eugenia pyriformis* Cambess. (Myrtaceae), foram coletados na Universidade Federal de Lavras (21°13'40"S e 44°57'50"W) e levados ao Laboratório do Núcleo de Pesquisa de Sementes, do Instituto de Botânica (23°38'S, 46°37'W). As sementes foram extraídas manualmente, em peneiras com água corrente, retirando-se resíduos de polpa dos frutos por decantação. Após a lavagem, as sementes

permaneceram em repouso sobre papel de germinação para remoção da água superficial residual, por período não superior a uma hora. Em seguida, foram classificadas por tamanho, segundo seu maior e menor diâmetro, em pequenas ( $17,8\pm 1,2 \times 14,3\pm 2,1$  mm e, em média, 2,1 g) e grandes ( $22,0\pm 2,3 \times 17,6\pm 1,7$  mm e, em média, 2,9 g) e avaliadas quanto a teor de água, conteúdo de massa seca e germinação.

O teor de água (expresso em porcentagem, com base na massa úmida) e o conteúdo de massa seca das sementes ( $\text{mg.semente}^{-1}$ ) foram determinados pelo método de estufa a  $103^\circ\text{C}$ , por 17 horas (ISTA, 1996), utilizando-se três repetições de 5 sementes cada. Os testes de germinação foram conduzidos em câmara de germinação a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e  $85\pm 5\%$  UR, com as sementes colocadas em rolo de papel para germinação (Germitest), umedecidos previamente com água de torneira (Brasil, 2009), em oito repetições de 15 sementes cada. Registraram-se o número de raízes e de plântulas produzidas a cada 5 dias, até que não houvesse mais emissão de novas raízes ou epicótilos por 30 dias consecutivos.

As sementes de cada grupo de tamanho foram divididas em dois subgrupos, um dos quais, denominado sementes germinantes, foi colocado para germinar em bandejas de plástico tendo como substrato vermiculita de granulação fina (Fosfértil), irrigada diariamente com água. As sementes foram retiradas do substrato à medida que suas raízes atingiam 1 cm de comprimento e, assim como as sementes não colocadas nas bandejas, denominadas não-germinantes, foram armazenadas em câmaras a  $7^\circ\text{C}\pm 1$ , dentro de sacos de polietileno perfurados, até o início dos experimentos. (Kohama et al., 2006; Barbedo et al. 1998)

Num primeiro experimento, além do controle (sementes inteiras, sem lesões), as sementes de cada subgrupo foram submetidas a dois tipos de incisão (completa ou parcial), com bisturi, passando pelo centro do hilo, permanecendo metade do hilo em

cada um dos lados da incisão. Em sementes germinantes, a incisão foi realizada de modo que um dos lados permaneceu com toda a raiz protrusa. Na incisão completa, denominada fracionamento, duas frações foram obtidas e foram colocadas para germinar lado a lado, conforme descrito anteriormente. Em sementes germinantes, a fração que continha a raiz foi denominada fração *R* e sua oposta, fração *S*. Nas não-germinantes essa denominação foi arbitrária. Na incisão parcial, denominada fissura, a incisão nas sementes foi realizada até cerca de dois terços do seu maior diâmetro, mantendo-se ligadas as metades.

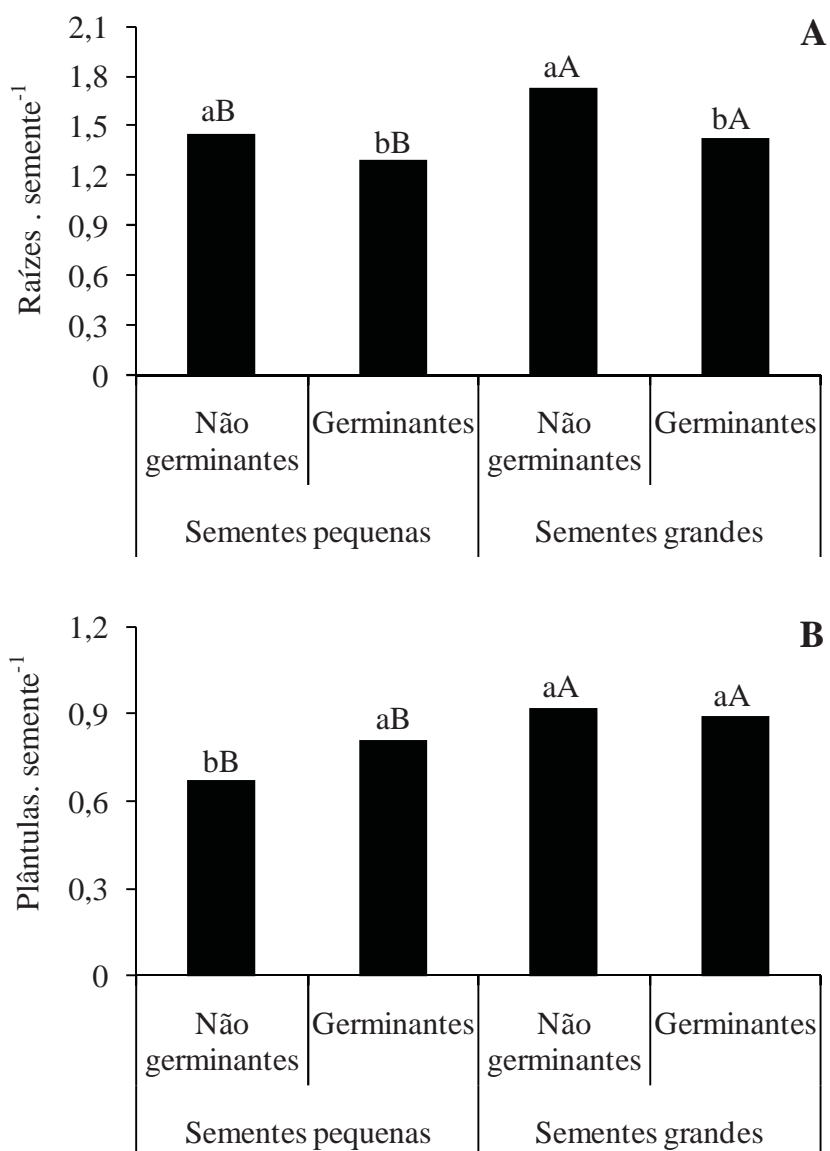
Num segundo experimento, foram selecionadas as sementes fissuradas que apresentavam, ao final dos testes de germinação, apenas uma plântula desenvolvida, sem qualquer sinal de desenvolvimento de novas raízes. Nessas sementes, completou-se a incisão até que as metades fossem separadas. A metade que continha a raiz foi descartada e sua complementar foi colocada para germinar, mantendo-se o controle de sua origem e avaliando-se, novamente, a produção de raízes e plântulas nas frações isoladas das germinadas.

O delineamento, para todos os experimentos, foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (tamanho das sementes x germinação visível) ou 2x4 (tamanho das sementes x tipo de incisão). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2008).



## **Resultados e Discussão**

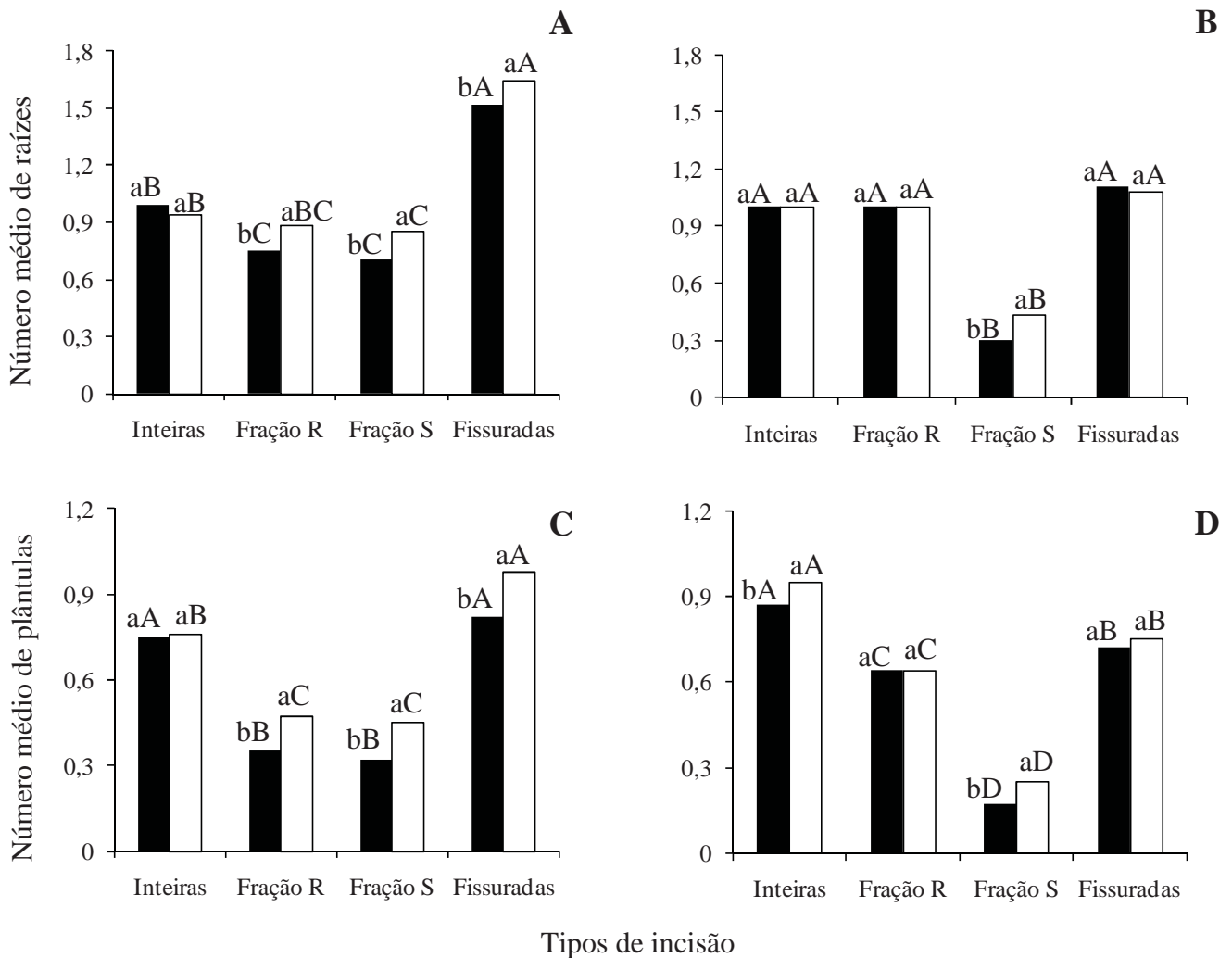
O teor de água das sementes de uvaieira (59,4% e 57,8%, respectivamente para grandes e pequenas) foi compatível com o de sementes maduras e o tamanho inicial não influenciou os valores de germinação (98% para ambas) e de desenvolvimento de plântulas normais (também 98% para ambas), demonstrando a elevada qualidade fisiológica do lote. Contudo, quando as sementes foram submetidas a fracionamentos, a resposta das sementes grandes e pequenas foi diferenciada, estas sempre apresentando menores valores de produção de raízes e de plântulas do que aquelas (Figura 1). Sementes fracionadas, de ambos os tamanhos, produziram, em média, sempre mais de uma raiz (Figura 1 A) e, nas sementes grandes, chegaram a médias superiores a 1,7 raízes por semente, confirmando o potencial de regeneração de raízes descrito por Silva et al. (2003). Contudo, poucas plântulas foram desenvolvidas a partir da segunda raiz (Figura 1 B), independentemente do tamanho da semente.



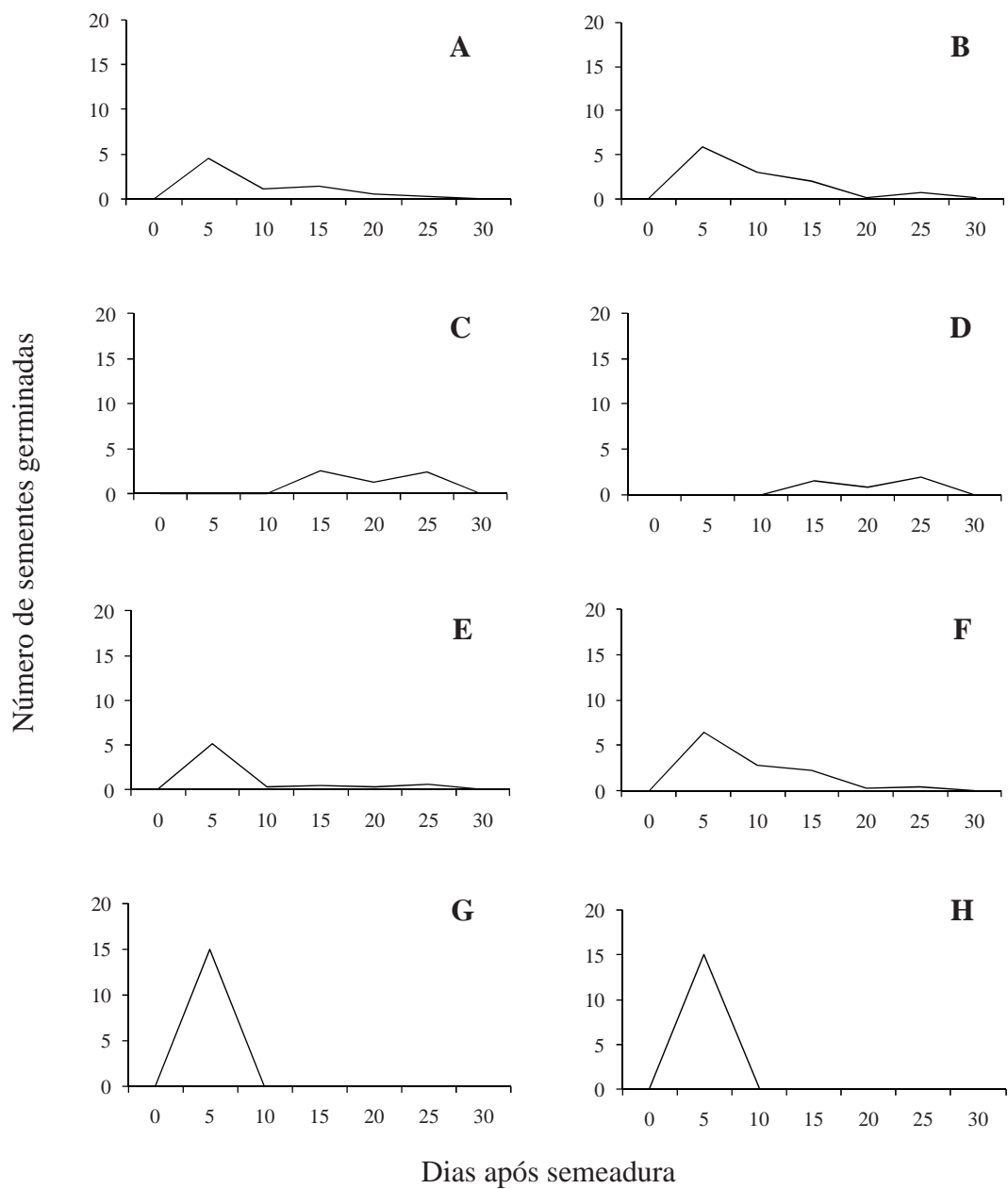
**Figura 1.** Média do número de raízes (A) e plântulas (B) por semente de uvaieira, de sementes de dois tamanhos distintos (grandes e pequenas), que não haviam iniciado germinação visível (não germinantes) ou após a protrusão de ao menos 1 cm de raíz (germinante), submetidas a fracionamento ao meio na região do hilo. Valores representam a soma das duas frações de uma mesma semente. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas comparando germinantes e não-germinantes, maiúsculas comparando tamanho das sementes) indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação às sementes germinantes, a produção de raízes foi inferior à das não-germinantes (Figura 1 A). Portanto, considerando-se que já havia o desenvolvimento inicial de uma raiz em uma das frações e que não foi constatada qualquer morte de raízes durante o experimento, as frações opostas às que possuíam raiz tiveram muito baixa eficiência para regenerar uma nova raiz, reforçando a idéia de algum processo de autoinibição nessas sementes quando se inicia a germinação (Silva et al., 2005). Tal fato ficou evidente, também, quando se analisam os resultados das frações individualizadas (Figura 2) uma vez que nas frações que não permaneceram com a raiz, nas sementes germinantes (Figura 2 B, fração *S*), a formação de novas raízes foi cerca de 50% (0,3 a 0,6 raízes.fração<sup>-1</sup>) dos valores obtidos para as frações não germinantes (0,7 a 0,9 raízes.fração<sup>-1</sup>, Figura 2 A, frações *R* ou *S*). Essa diferença foi mantida, também, para o desenvolvimento de plântulas (Figura 2 C, D).

Considerando-se, ainda, a fração oposta à germinante (*S*), além dos valores finais de regeneração de raízes terem sido inferiores às demais frações, verificou-se também atraso no início de emissão de novas raízes (Figura 3 C, D), que ocorreu do 15<sup>o</sup> ao 25<sup>o</sup> dia, enquanto nas demais frações as emissões concentraram-se no 5<sup>o</sup> dia e finalizaram até o 15<sup>o</sup> dia (Figura 3 A, B, E, F, G, H). O atraso na germinação das sementes de uma espécie promovido pela liberação de substâncias inibidoras de outra tem sido demonstrado em estudos de alelopatia (Gatti et al., 2010), indicando que, em processos de inibição, a redução da porcentagem final de germinação nem sempre é evidente. No presente trabalho, contudo, o início da germinação das sementes proporcionou ambos os efeitos sobre a regeneração de novas raízes: inibição e atraso.



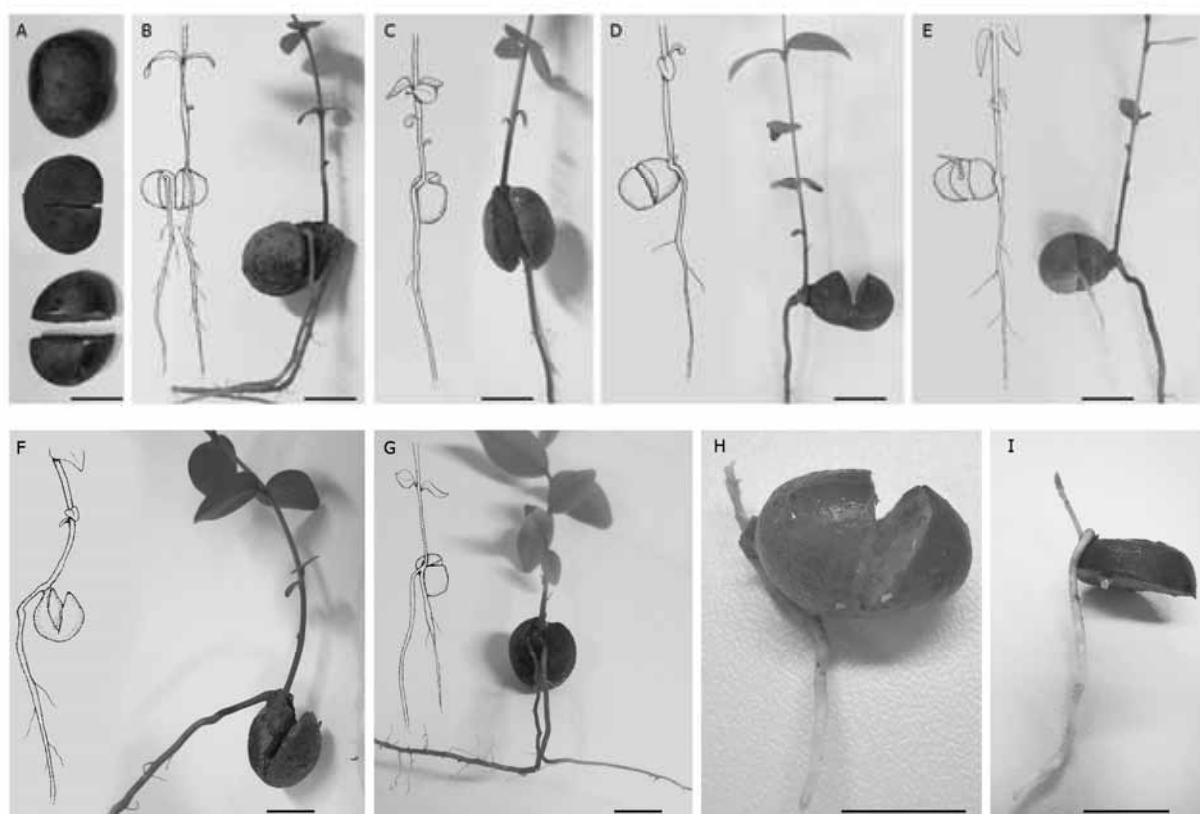
**Figura 2.** Média do número de raízes (A e B) e plântulas (C e D) por semente ou fração de semente de uvaieira, de sementes pequenas (colunas pretas) e grandes (colunas brancas), que não haviam iniciado germinação visível (A e C) ou após a protrusão de ao menos 1 cm de raiz (B e D), submetidas a fracionamento (separação total da semente em duas metades, gerando as frações R e S) ou fissura (incisão ao meio até 2/3 do diâmetro da semente, sem separação completa). Valores seguidos pela mesma letra (maiúsculas comparando tipos de incisão dentro de cada tamanho, minúsculas comparando tamanho das sementes) indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 3.** Distribuição temporal de frequência da germinação das frações *S* (A, B, C e D) e *R* (E, F, G e H), de sementes de uvaieira grandes (A, C, E e G) e pequenas (B, D, F e H), não-germinantes (A, B, E e F) e germinantes (C, D, G e H).

Quando as sementes foram apenas fissuradas (Figura 4 A), sem separação em metades, as realizadas nas sementes não-germinantes promoveram valores de formação de raízes superiores a 1,0 (Figura 2). Tal fato poderia representar algum tipo de estímulo à formação de novas raízes dado pela incisão realizada nas sementes. Contudo, o mesmo não ocorreu quando a incisão foi realizada nas sementes que já haviam iniciado a germinação (Figura 2 B). Portanto, um potencial efeito indutor da formação de raízes promovido pela fissura pode ter sido anulado por processos inibidores decorrentes da germinação que já havia se iniciado. Esses processos inibidores, nas sementes não germinantes, teriam sido bloqueados pela própria fissura.

Sementes de uvaieira maduras não contém endosperma e apresentam eixo embrionário visível apenas microscopicamente (Justo et al., 2007). Portanto, a regeneração de novas raízes tem origem cotiledonar e, segundo Delgado (2010), das regiões vasculares, assemelhando-se a processos de embriogênese somática (ES). Em *Medicago truncatula* verificou-se que o sucesso na obtenção de embriões por ES depende da desdiferenciação de células, principalmente do mesófilo, que por sua vez depende de um balanço favorável entre citocininas e auxinas (Wang et al., 2011). Estas últimas demonstraram padrões estabelecidos para a polaridade de transporte, influenciando decisivamente a formação dos novos embriões. Assim, as fissuras nas sementes de uvaieira podem ter alterado o transporte de reguladores, como a auxina, condicionando maior ou menor eficiência na regeneração de novas raízes e plântulas nessas sementes.



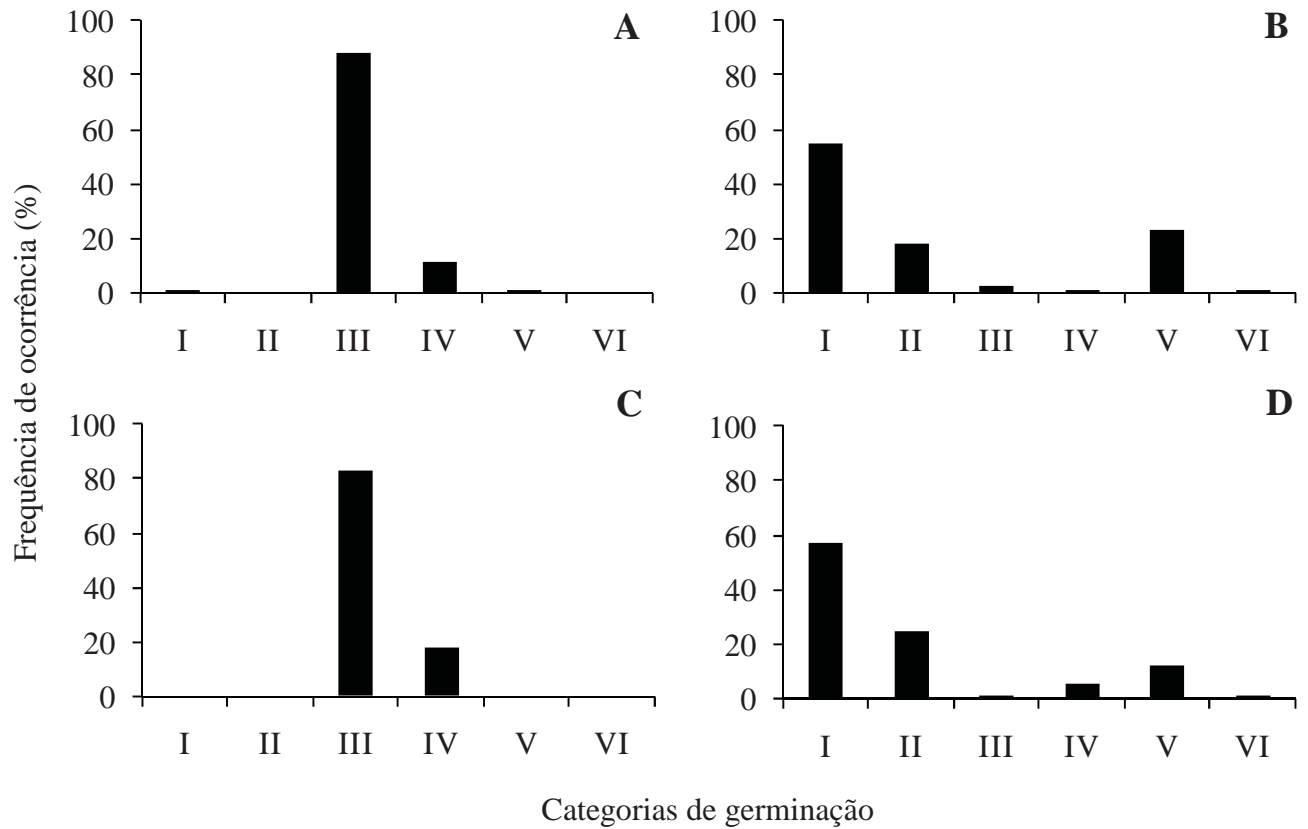
**Figura 4.** Modelos de incisões feitas em sementes de uvaieira e categorias de germinação. A, de cima para baixo, semente inteira, semente fissurada (incisão no hilo, até 2/3 do diâmetro da semente, sem separação completa) e semente fracionada (incisão completa, no hilo, com separação em duas metades); B a G, categorias de crescimento de raiz e parte aérea verificadas em sementes de uvaieira submetidas a fissura e colocadas para germinar. B, categoria I: formação de uma plântula normal em uma das metades da semente, que foram separadas pela fissura, iniciando na região adjacente à fissura e formação de uma outra raiz na outra metade; C, categoria II: formação apenas de uma plântula normal na região diametralmente oposta à fissura, iniciando na região adjacente à fissura; D, categoria III: formação de apenas uma plântula normal em uma das metades, iniciando em região distante da fissura; E, categoria IV: formação de uma plântula normal em uma das metades, iniciando em região distante da fissura e formação de uma raiz na outra metade, iniciando na superfície fissurada; F, categoria V: formação de uma plântula normal em uma das metades, iniciando na região adjacente à fissura; G, categoria VI: formação de uma plântula normal e de uma raiz na região diametralmente oposta à fissura, ambas iniciando na região adjacente à fissura; H, semente fissurada que, após a formação de uma plântula, teve a incisão completada até a separação de duas frações. A que continha a plântula foi descartada e sua complementar iniciou o desenvolvimento de nova plântula (I). Escala: 1,5 cm. Ilustração: Débora M. Molizane.

Sementes fissuradas colocadas para germinar produziram raízes e plântulas que permitiram agrupá-las em seis categorias, descritas na Figura 4. Nas sementes germinantes, ou seja, que já apresentavam o início da formação de uma raiz quando a fissura foi realizada, essa raiz completou o desenvolvimento, formando uma plântula normal em 100% das sementes. Quando as sementes eram pequenas, em apenas 10% das fissuradas houve o início de formação de uma nova raiz (Figura 5 A), que ocorreu na face fissurada oposta à que continha a plântula, ou seja, na categoria IV (Figura 4 E); nas grandes, esse valor foi maior (20%, Figura 5 C). Contudo, prevaleceu, para ambos os tamanhos, a categoria III (Figura 4 D), ou seja, sem desenvolvimento de uma segunda raiz. Por outro lado, as sementes não-germinantes fissuradas, colocadas para germinar, produziram raízes e plântulas (Figura 5 B, D) principalmente nas categorias I (Figura 4 B), II (Figura 4 C) e V (Figura 4 F). Ressalta-se, contudo, que mais da metade desses valores situaram-se na categoria I, ou seja, com formação de uma plântula normal em um dos lados da fissura e uma raiz no outro (Figura 4 B), sugerindo, novamente, que a fissura promoveu algum bloqueio à possível inibição do desenvolvimento de uma segunda raiz pela protrusão da primeira.

O comportamento das sementes não-germinantes fissuradas sugere que o processo de inibição pode não ter ocorrido em todo o tecido da semente, uma vez que a fissura foi realizada antes do início da germinação, diferentemente do que ocorreu nas germinantes fissuradas. A mobilização e o transporte de muitos reguladores vegetais foram amplamente estudados em diversos tecidos, inclusive nas sementes, mas concentram-se nos promotores de divisão crescimento celular (Jeong et al., 2011 e referências contidas). Infelizmente, porém, pouca atenção tem sido voltada aos inibidores. Processos envolvendo o ácido abscísico, por exemplo, reconhecidamente um dos inibidores mais importantes em diversos processos vegetais, ainda necessitam ser



elucidados, tais como o transporte dentro e entre tecidos da semente (Kermode, 2005)



**Figura 5.** Distribuição de frequência da germinação de uvaieira em seis categorias de crescimento de raiz e parte aérea (I a VI), de sementes pequenas (A e B) e grandes (C e D), que não haviam iniciado germinação visível (B e D) ou após a protrusão de ao menos 1 cm de raiz (A e C), submetidas a fissura (incisão ao meio até 2/3 do diâmetro da semente, sem separação completa).

É interessante observar que cerca de 20% das sementes não-germinantes tiveram formação de uma plântula normal na região central, em posição diametralmente oposta à incisão (categoria II, Figura 4 C), sem formação de uma segunda raiz. Isso leva a crer que a germinação iniciada na região central, próxima à incisão, permitiu distribuição uniforme de potenciais inibidores por toda a semente.

Após o final dos testes de germinação das sementes fissuradas (Figura 4 I), as categorias III, para sementes germinantes, e II e V, para as não-germinantes, apresentaram os maiores valores de produção de plântulas dentre as que não tiveram regeneração de uma segunda raiz (Figura 5). Estas sementes foram selecionadas para o segundo experimento, no qual se completou o fracionamento da semente, isolando-se duas frações e colocando-se para germinar apenas a fração oposta à germinante. Quando essas frações eram provenientes de sementes germinantes, em 33% das sementes grandes e 28% das pequenas houve formação de nova raiz e, em alguns casos, até de uma nova parte aérea (Figura 4 H). Quando eram de não-germinantes, a germinação das frações opostas às germinantes foram 53% e 50%, nas grandes, respectivamente das categorias II e V e, nas pequenas, 52% e 60%. Esses resultados evidenciam claramente que havia processos de inibição do desenvolvimento de novas raízes, promovidos pelo desenvolvimento de uma raiz ou plântula na mesma semente. Além disso, os resultados sugerem que a produção de compostos inibidores deve ser contínua, cumulativa e oriunda da região na qual há crescimento de plântula, visto que em sementes germinantes, nas quais a plântula estava a mais tempo ligada ao cotilédone, a porcentagem de germinação foi menor do que nas não germinantes. Contudo, não deve ser descartada a possibilidade, também, de que as sementes germinantes tenham consumido maior quantidade de reservas do que as não germinantes e que a diferença na porcentagem final de germinação seja decorrente de diferença na disponibilidade de

reservas para a formação de novas raízes. De fato, Silva et al. (2003) demonstraram que o aumento no número de fracionamentos dessas sementes progressivamente reduz a capacidade de regeneração de plântulas, principalmente devido à redução na disponibilidade de reservas para cada plântula formada. Os maiores valores de desenvolvimento de plântulas de sementes grandes em relação aos das pequenas, obtidos no presente trabalho (Figura 1 B), também sugerem tal interferência.

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram que o desenvolvimento de uma segunda raiz em uma mesma semente de uvaieira é dependente do bloqueio de substâncias ou processos de inibição que se iniciam quando a primeira germinação ocorre, o que foi confirmado nas sementes fissuradas. Contudo, a germinação e a dormência de sementes são, provavelmente, resultado de um balanço entre diversos fatores promotores e inibidores, dentre os quais figuram GA e ABA (Leubner-Metzger, 2003). Portanto, não se pode eliminar a possibilidade de que as sementes fracionadas estejam sob influência dos dois processos, indução e inibição, com balanço ora favorável ao desenvolvimento de novas raízes e plântulas, ora desfavorável. Assim, nas sementes inteiras a formação de uma única raiz pode ser decorrente da falta de estímulo à regeneração ou de um balanço favorável à inibição; por outro lado, contudo, nas sementes fracionadas ficou evidenciado que o estímulo à regeneração ocorre e que, quando a germinação se inicia, também se iniciam processos de inibição da regeneração de novas raízes e plântulas.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Mestrado concedida ao primeiro autor, de Produtividade em Pesquisa concedida ao segundo autor e pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc. 477640/2009-5);

à Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc. 2005/04139-7); a E.V. Lamarca pelo auxílio na obtenção do material vegetal e a D.M. Molizane, pela confecção das ilustrações.

### Conclusões

1. Sementes de uvaieira apresentam potencial para regeneração de raízes e plântulas, podendo produzir mais de uma muda a partir de uma mesma semente.
2. A germinação de sementes de uvaieira inicia processos de inibição da regeneração de novas raízes e plântulas nessa mesma semente.
3. A incisão dos cotilédones pode bloquear a ação desses processos inibidores.

### Referências bibliográficas

- ANJOS, A.M.G.; FERRAZ, I.D.K. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). **Acta Amazonica**, v.29, n.3, p.337-348, 1999.
- BARBEDO, C.J., KOHAMA, S., MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C. Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. **Revista Brasileira de Sementes**. 20, p.184-188. 1998.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, 2009. 399p.
- DELGADO, L.F. **Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de *Eugenia* (Myrtaceae)**. 2010. 92p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica, São Paulo.

DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.2, p.265-272, 2007.

DELGADO, L.F.; MELLO, J.I.O.; BARBEDO, C.J. Potential for regeneration and propagation from cut seeds of *Eugenia* (Myrtaceae) tropical tree species. **Seed Science and Technology**, v.38, p.624-634, 2010.

DEO, P.C.; TYAGI, A.P.; TAYLOR, M.; HARDING, R.; BECKER, D. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, v.28, p.27-40, 2010.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v.6, n.2 p.36-41, 2008.

GATTI, A.B.; FERREIRA, A.G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S.C.G.A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artistolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.2, p.454-461, 2010.

GURGEL, J.T.A.; SOUBIHE SOBRINHO, J. Poliembrionia em mirtáceas frutíferas. **Bragantia**, v.11, p.141-163, 1951.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for testing seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich. v.16, n.1, p.113-115. 1996.

JEONG, S.; BAYER, M.; LUKOWITZ, W. Taking the very first steps: from polarity to axial domains in the early *Arabidopsis* embryo. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.5, p.1687-1697, 2011.

JUSTO, C.F.; ALVARENGA, A.A.; ALVES, E.; GUIMARÃES, R.M.; STRASSBURG, R.C. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.3, p.539-551, 2007.

KARAMI, O.; SAIDI, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, v.37, n.5, p.2493-2507, 2010.

KANWAR, K.; JOSEPH, J.; DEEPIKA, R. Comparison of in vitro regeneration pathways in *Punica granatum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, n.2, p.199-207, 2011.

KERMODE, A.R. Role of abscisic acid in seed dormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.24, p.319-344, 2005.

KOHAMA, S.; MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* (grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**. 28, p.72-78. 2006.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, p.508-536, 1997.

LEUBNER-METZGER, G. Hormonal and molecular events during seed dormancy release and germination. In: NICOLÁS, G.; BRADFORD, K.J.; CÔME, D.; PRITCHARD, H.W. **The biology of seeds: recent research advances**. Wallingford/Cambridge: CABI Publishing, 2003. p.101-112.

OLIVEIRA, E.N.A.; SANTOS, D.G.; SOUSA, F.C.; MARTINS, J.N.; OLIVEIRA, S.P.A. Obtenção de ubaia desidratada pelo processo de liofilização. **Revista Brasileira de Tecnologia Industrial**, v.4, n.2, p.235-242, 2010.

PEPATO, M.T.; FOLGADO, V.B.B.; KETTELHUT, I.C.; BRUNETTI, I.L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.389-395, 2001.

PEREIRA, C.E.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, D.F.; KIKUTI, A.L.P. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p.306-311, 2002.

RIZZINI, C.T. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.30, p.381-402, 1970.

SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. Polyembryony in Angiospermous trees of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica**, v.15, p.369-378, 2001.

SCALON, S.P.Q.; DELL'OLIO, P.; FORNASIERI, J.L. Temperatura e embalagens na conservação pós-colheita de *Eugenia uvalha* Cambess - Mirtaceae. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1965-1968, 2004a.

SCALON, S.P.Q.; SCALON FILHO, H.; RIGONI, M.R. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.6, p.1228-1234, 2004b.

SILVA, C.V., BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.86-92, 2005.

SILVA, C.V.; BILIA, D.A.C.; MALUF, A.M.; BARBEDO, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.213-221, 2003.

STIEVEN, A.C.; MOREIRA, J.J.S.; SILVA, C.F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v.34, n.3, p.7-13, 2009.

SWAMY, M.K.; SUDIPTA, K.M.; BALASUBRAMANYA, S.; ANURADHA, M. Effect of different carbon sources on *in vitro* morphogenetic response of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.). **Journal of Phytology**, v.2, n.8, p.11-17, 2010.

WANG, X.; NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; SHEAHAN, M.B.; ROSE, R.J. Ontogeny of embryonic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. **Annals of Botany**, v.107, doi 10.1093/aob/mcq269, 2011.

## **6. Capítulo 2**

**EXTRATOS ETANÓLICOS E AQUOSOS DE SEMENTES DE *Eugenia pyriformis* Cambess POTENCIALMENTE INIBIDORES DA GERMINAÇÃO, OBTIDOS DE SEMENTES FRACIONADAS E GERMINANTES.**



## Introdução

Estudos recentes têm demonstrado que sementes de *Eugenia* apresentam excepcional capacidade regenerativa e, mesmo sendo monoembriônicas, podem apresentar formação de mais de uma plântula a partir de uma mesma semente (Anjos e Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005, Justo 2007, Teixeira 2009). A provável origem dos novos embriões é gamética, não caracterizando clones da planta-mãe, como aconteceria caso fossem somáticos. Estudos anatômicos de sementes de *Eugenia cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora* mostraram que a produção de novas plântulas ocorreu a partir da desdiferenciação de células de tecidos perivasculares localizados na região apical dos cotilédones (Delgado 2010). Tal fato mostra que as novas plantas produzidas, podem apresentar genoma diferente da planta-mãe e idêntico ao do embrião gamético, o que deve lhes conferir maior valor adaptativo. Além disso, os estudos com fracionamento dessas sementes sugerem a possibilidade de que as frações de sementes assumem comportamento semelhante ao de estacas, com possibilidade de enraizamento e desenvolvimento de nova parte aérea, a partir da migração de hormônios vegetais.

Esta alta capacidade regenerativa deve ocorrer em função do embrião, de maneira geral, ser um organismo constituído por células meristemáticas toti ou pluripotentes, dispoendo de todas as informações necessárias para crescer e dar origem a uma planta adulta (Marcos Filho 2005; Batygina & Vinogradova 2007). Também pode envolver processo de evolução adaptativa, uma vez que insetos, aves e mamíferos são atraídos pelos frutos dessa espécie, muitas vezes causando injúrias às sementes (Teixeira 2009). E, ainda, pode estar relacionada com a ocorrência de condições ambientais adversas, imediatamente após a germinação das sementes; havendo reserva nutritiva e capacidade regenerativa suficientes para germinação e desenvolvimento de algumas novas plântulas a partir da mesma semente, assim, sucessivas germinações poderiam ampliar a capacidade de estabelecimento da plântula no meio (Delgado *et al.* 2010).

Há, contudo, uma característica não compreendida nessa regenerabilidade, ou seja, a germinação nunca superior a 100% de sementes não fracionadas podem indicar que a regeneração de um segundo embrião em uma mesma semente só ocorre quando a mesma é fracionada (Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005). Conforme abordado no capítulo anterior, podem co-existir mecanismos de indução e de autoinibição a partir do momento em que a semente inicia a germinação. Tal hipótese é reforçada pela presença

de substâncias inibidoras da germinação nas sementes de *Eugenia*, como verificado em *E. dysenterica* (Rizzini 1970), impedindo a germinação ou, até, a diferenciação de um segundo embrião.

Os vegetais liberam no ambiente, diversos metabólitos primários e secundários que podem influenciar no desenvolvimento da vegetação adjacente, sendo este fenômeno de interferência denominado alelopatia, conforme discutido por Rice (1984). A liberação destas substâncias químicas para o meio ambiente, denominadas aleloquímicos, pode ocorrer de várias maneiras. Entre as rotas de liberação incluem-se a volatilização pelas partes aéreas da planta; a lixiviação através da chuva, orvalho e neblina; a exsudação pelas raízes; a decomposição de resíduos vegetais e a lixívia de serapilheira (Whittaker & Feeny 1971; Chou 1986; Anaya 1999).

Dentre os parâmetros analisados nos estudos de alelopatia, a germinação é menos sensível aos aleloquímicos em comparação com o crescimento da plântula. Segundo Castro *et al.* (2004), as substâncias alelopáticas podem ter uma interferência positiva ou negativa, direta ou indireta, e podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sinais mais comuns. A identificação das propriedades alelopáticas em espécies nativas abre perspectivas de que, entre tais efeitos, possam se encontrar os fatores determinantes da dinâmica da vegetação e da composição florística do ecossistema.

Muitas espécies de *Eugenia* são ricas em óleos essenciais e taninos, e são freqüentemente utilizadas na medicina popular (Pio Corrêa 1984; Neves & Donato 1989; Pott & Pott 1994; Lunardi *et al.* 2001). Delgado (2010) identificou a ocorrência de estruturas secretoras, como as cavidades secretoras e os idioblastos fenólicos, no embrião de *Eugenia cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora*. Cavidades secretoras já haviam sido observadas em *E. puniceifolia* (Coneglian 2007) e são consideradas características marcantes de Myrtaceae (Barroso *et al.* 1984, Nic Lughadha & Proença 1996) apresentando, inclusive, valor taxonômico. A presença de compostos fenólicos em embriões foi descrita anteriormente por Castro & Machado (2006) e Coneglian (2007). Estes mesmos autores relacionaram a presença destes compostos à função de proteção aos tecidos e a mecanismos de interação de plantas e animais, agindo como dissuasivo alimentar e reduzindo a herbivoria.

Alguns tipos de metabólitos secundários tem sido isolados em espécies da família Myrtaceae, tais como taninos (Lee, *et al.* 1997; Yang *et al.* 2000), flavonóides (Mayer 1990, Amaral, *et al.* 2001, Sarker 2001) e terpenóides (Santos *et al.* 1997,

Siddiqui *et al* 2000). Esta família possui inúmeras espécies produtoras de óleos essenciais (Menut *et al.* 2000; Giamakis *et al.* 2001), tendo essas diversas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, bactericida, fungitóxica e citotóxica. Os óleos essenciais são compostos de terpenos que possuem estruturas do tipo C-10 (monoterpenos), C-15 (sesquiterpenos), C-20 (diterpenos), C-25 (sesterpenos), C-30 (triterpenos) e C-40 (tetraterpenos), sendo que muitos sesquiterpenos, tais como o  $\beta$ -bisabolenos e bergamoteno são agentes alelopáticos, inibindo o crescimento das raízes (Magina, 2008).

Devido à dificuldade na produção de mudas e sementes de *Eugenia pyriformis* o estudo do comportamento da semente dessa espécie quando fracionada torna-se necessário, uma vez que se sugere que esse procedimento tem um efeito estimulatório na própria semente, na fração oposta a germinante e inibidor na fração germinante, como visto no capítulo anterior. Esse efeito não ocorre em sementes intactas, apenas quando fracionadas. A compreensão e a exploração da característica regenerativa das sementes dessas espécies, portanto, podem resultar em importante avanço científico e tecnológico para as mais variadas finalidades, dentre as quais enquadram-se as agrônomicas, com o intuito de industrialização e comercialização da espécie e derivados, e as ambientais, com enfoque na conservação da biodiversidade.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito inibidor de extratos preparados a partir de sementes de *Eugenia pyriformis* em três fases de desenvolvimento, sobre a germinação de sementes das próprias espécies das quais se obtiveram os extratos e de sementes de plantas-teste.

## **Material e Métodos**

Frutos de *E. pyriformis* Cambess. (uvaia) foram coletados na Universidade Federal de Lavras-MG (21°13'40"S e 44°57'50"W), em outubro de 2009. As sementes foram extraídas dos frutos manualmente, em água corrente com auxílio de peneira para a separação da polpa, sendo retirado o excesso de umidade das sementes com papel toalha. Após extraídas, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca e germinação, para caracterização inicial do lote, e o restante do material foi armazenado em sacos de polietileno perfurados, a  $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o início dos experimentos.

O teste de germinação e a análise da produção de plântulas normais foi realizada em germinadores Marconi tipo MA400 com circulação interna de água, a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas e 100% UR (Delgado 2010). As sementes foram colocadas em rolo de papel para germinação (Germitest), umedecidos previamente com água (Brasil 1992), em quatro repetições de 15 sementes cada. As leituras foram diárias, registrando-se as sementes germinadas (protrusão da raiz primária) e o desenvolvimento de plântulas normais (Barbedo *et al.* 2002). O teor de água (expresso em porcentagem, com base na massa úmida) e o conteúdo de massa seca das sementes ( $\text{mg.semente}^{-1}$ ) foram determinados pelo método de estufa a  $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 17 horas (ISTA 1996).

Para a obtenção dos extratos aquosos e etanólicos para os bioensaios foram utilizadas sementes em três condições diferentes: semente inteira, semente fracionada-porção com hilo, semente fracionada-porção oposta ao hilo. Cada uma destas tiveram extratos feitos em três fases germinativas, sendo elas: a) sem germinação; b) com o desenvolvimento de raiz primária e c) com o desenvolvimento raiz primária e de parte aérea. De cada uma delas foram feitas extrações de suas partes distintas: a) do cotilédone; b) da raiz e c) da parte aérea. Dessa forma, foram totalizados 18 extratos, como mostram a Figura 1 e a Tabela 1.

As distintas partes dos materiais foram trituradas em moinho de facas e secas em estufa com circulação de ar  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O pó obtido foi submetido à extração aquosa em extrator modelo ASE 300 (“Accelerated Solvent Extractor”, Sunnyvale, EUA; Figura 2). Nesse sistema o pó pulverizado foi colocado em cilindros e submetido ao processo de extração com água (60-80 mL), sob pressão de 1200 – 1700 psi (N<sub>2</sub>) durante 30 minutos a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Choi *et al.* 2003). Após a extração aquosa, o resíduo foi seco em estufa com circulação de ar  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  e submetido ao mesmo processo extrativo com etanol 70%. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório (R – 114 da BUCHI), à temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , liofilizados em Liofilizador Thermo Modulyo D. Ao final, foi calculado o rendimento (% dos extratos) e posteriormente armazenados em freezer até os testes.

Antes dos testes dos extratos brutos foram diluídos em água destilada, nas concentrações de  $0,5\text{ mg/ml}^{-1}$  e  $2,5\text{ mg/ml}^{-1}$ . O potencial osmótico dos extratos diluídos foi avaliado em potenciômetro WP4 (Dewpoint PotentiaMeter, Decagon), baseando-se na temperatura de espelho no ponto de orvalho da atmosfera, após equilíbrio higroscópico com a amostra (Michel e Kaufmamm 1973).

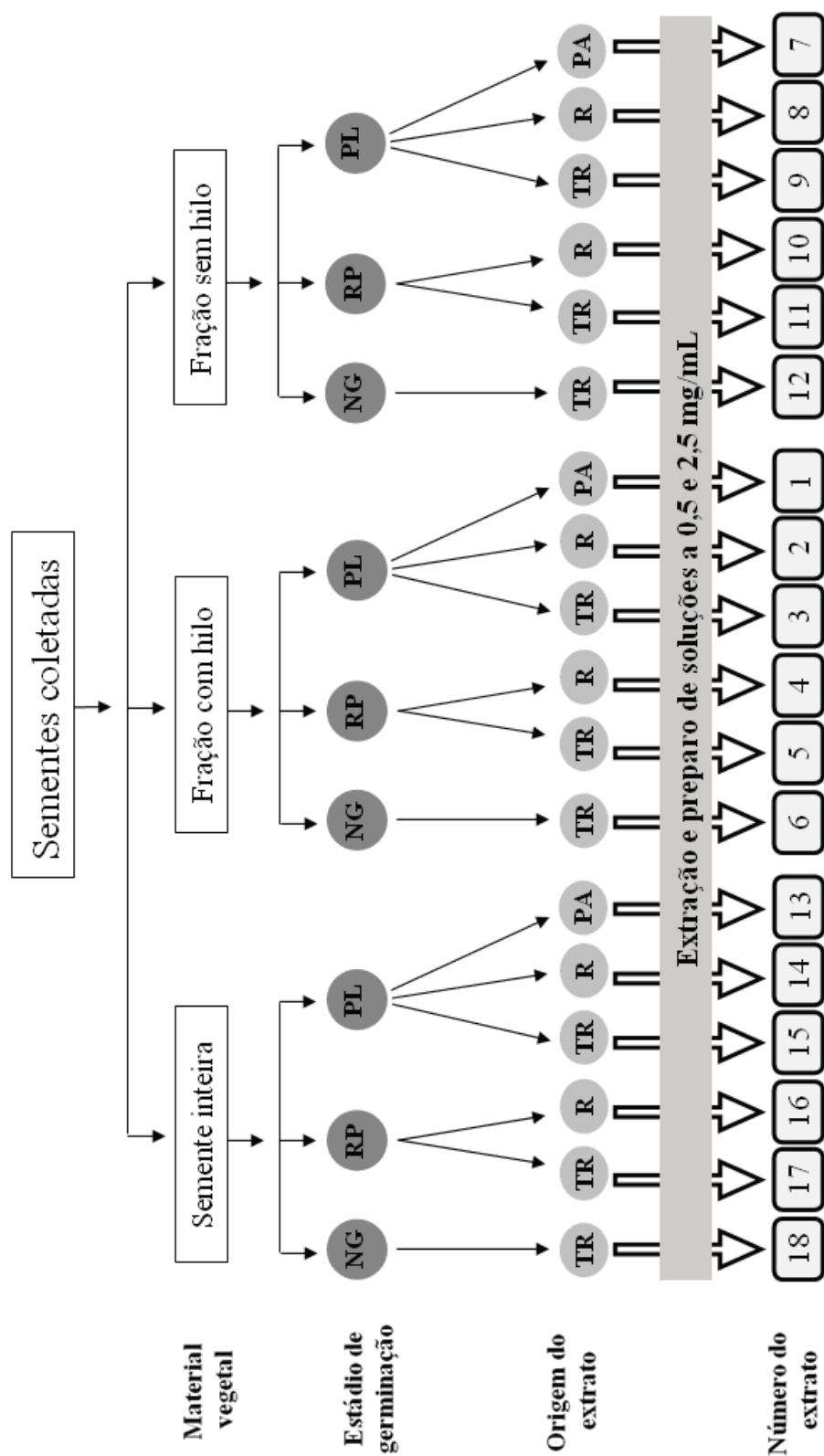


Figura 1. Ilustração esquemática da sequência de manipulação do material vegetal para obtenção dos extratos de sementes de *Eragrostis pyriformis*. NG: sementes sem qualquer sinal visível de germinação; RP: sementes com protrusão de raiz primária; PL: sementes com formação de plântula normal; TR: tecido remanescente de reserva; R: raiz; PA: parte aérea (epicotílo, caule e folhas).

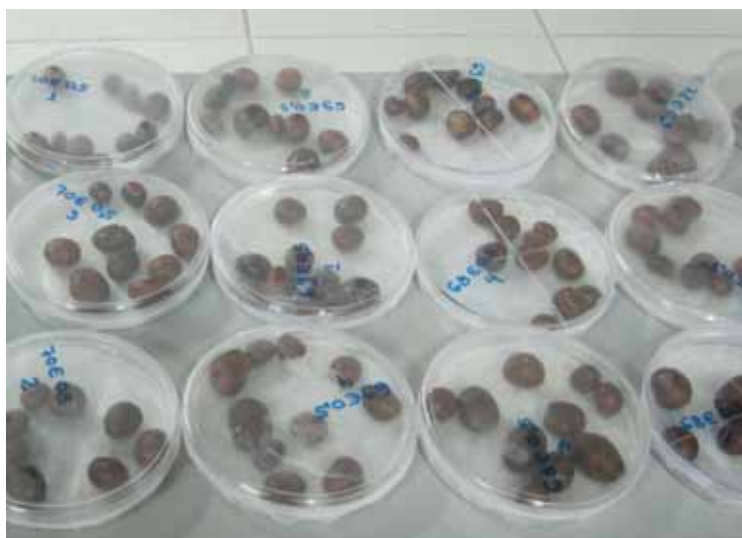
**Tabela 1: Detalhamento dos extratos obtidos para os bioensaios**

<b>Numeração dos Extratos</b>	<b>Código do Extrato</b>	<b>Extratos aquosos e etanólicos</b>
1	e.1	Extrato da parte aérea de frações com hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até plântula
2	e.2	Extrato da raiz de frações com hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até plântula
3	e.3	Extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até plântula
4	e.4	Extrato da raiz de frações com hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até raiz
5	e.5	Extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até raiz
6	e.6	Extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de Uvaia sem germinação
7	e.7	Extrato da parte aérea de frações opostas ao hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até plântula
8	e.8	Extrato da raiz de frações opostas ao hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até plântula
9	e.9	Extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até plântula
10	e.10	Extrato da raiz de frações opostas ao hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até raiz
11	e.11	Extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de Uvaia germinantes até raiz
12	e.12	Extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de Uvaia sem germinação
13	e.13	Extrato da parte aérea de sementes inteiras de Uvaia germinadas até plântula
14	e.14	Extrato da raiz de sementes inteiras de Uvaia germinadas até plântula
15	e.15	Extrato do cotilédone de sementes inteiras de Uvaia germinadas até plântula
16	e.16	Extrato da raiz de sementes inteiras de Uvaia germinadas até raiz
17	e.17	Extrato do cotilédone de sementes inteiras de Uvaia germinadas até raiz
18	e.18	Extrato sementes inteiras de Uvaia sem germinação



**Figura 2:** Extrator modelo Accelerated Solvent Extractor 300, utilizado pra a produção dos extratos aquosos e etanólicos.

Para o bioensaio de germinação com a própria espécie foram utilizadas sementes de *Eugenia pyriformis* (15 sementes.placa<sup>-1</sup>, n = 4) em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro com dupla camada de papel filtro embebido com 10 mL do extrato bruto nas concentrações 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, tanto para aquosos quanto para os etanólicos e água (controle).



**Figura 3:** Sementes de *Eugenia pyriformis* no bioensaio de germinação em placas de Petri com papel filtro embebido com 10 mL do extrato bruto nas concentrações 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

Os extratos foram aplicados até que se iniciasse a germinação, após isso a hidratação do substrato foi feita com água. O uso de placas de Petri deve-se a pequena quantidade de extrato utilizada para umedecimento do substrato. As placas montadas foram mantidas por 30 dias em câmara B.O.D. (Eletrolab Mod. 1006) à temperatura de 25 °C e luz constante. O ensaio foi avaliado pela contagem de sementes germinadas a cada 24 horas a partir do 7<sup>o</sup> dia e os resultados expressos em porcentagem (%) de sementes germinadas.

O bioensaio de germinação com espécie cultivada foi realizado com aquênios de alface (50 sementes.placa<sup>-1</sup>, n = 4) em placas de Petri de 6 cm de diâmetro com uma camada de papel filtro embebido com o extrato bruto e água (controle). Os extratos aquosos e etanólicos foram testados nas concentrações de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. As placas montadas foram mantidas por 14 dias em sala de germinação à temperatura de 25 °C ± 2 °C, com umidade relativa do ar de 85% ± 5% e luz constante. O ensaio foi avaliado pela contagem de sementes germinadas a cada 24 horas e os resultados expressos em porcentagem de sementes germinadas (Silva *et al.* 2005). Em seguida o bioensaio de crescimento foi realizado com plântulas obtidas de aquênios de alface. As plântulas tratadas com extratos foram medidas (hipocótilo e epicótilo) com paquímetro digital. Os resultados foram expressos em média do crescimento. As plântulas foram pesadas em balança analítica e posteriormente secas em estufa para cálculo de peso fresco e seco.

O delineamento, para todos os experimentos, foi inteiramente casualizado, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2008).

## **Resultados e Discussão**

O teor de água das sementes de uvaia foi de 54,5% e os valores de germinação e de desenvolvimento de plântulas normais, ambos 97,5%.

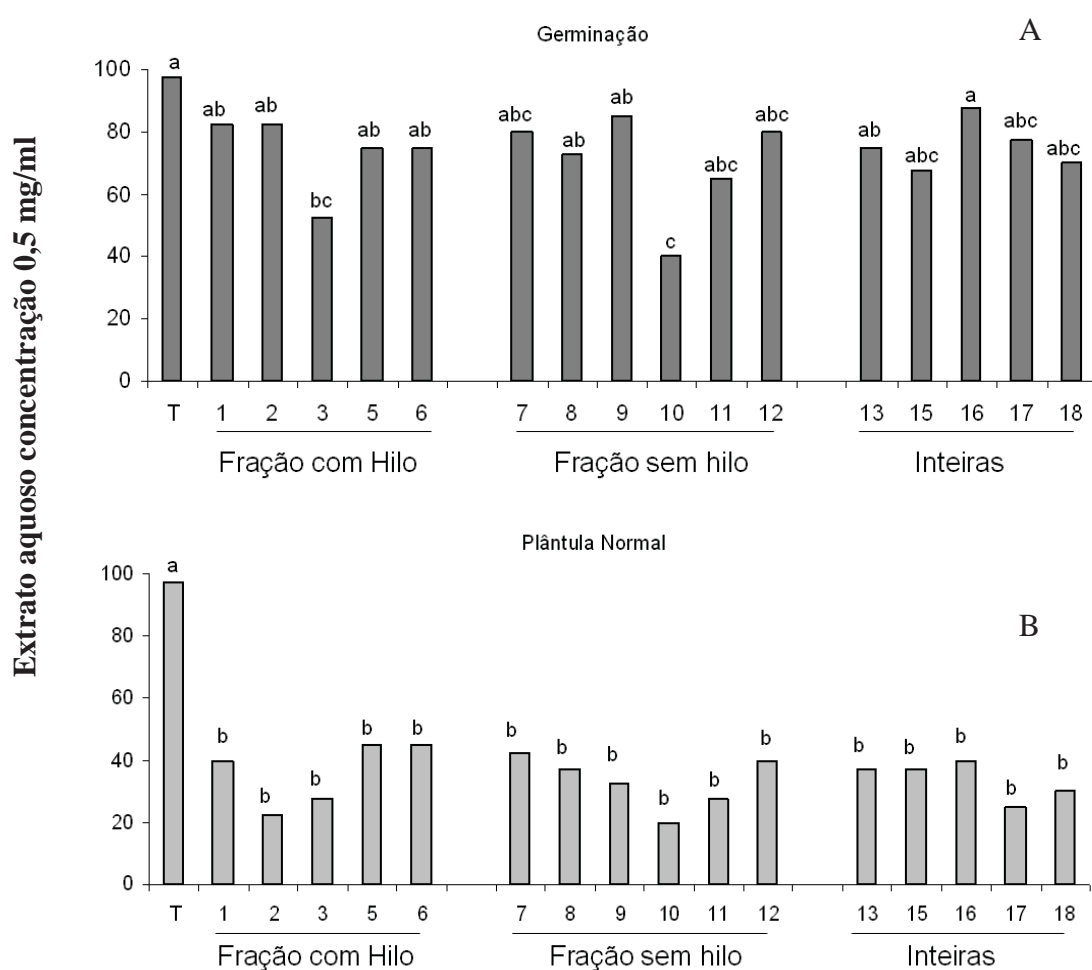
O rendimento dos extratos aquosos foi em média de 14,4% e dos extratos etanólicos foi de 8,7%, mostrando a alta eficácia do processo de extração feito pelo equipamento ASE (Richter *et al.* 1996). Porém nem todos os tratamentos tiveram todos



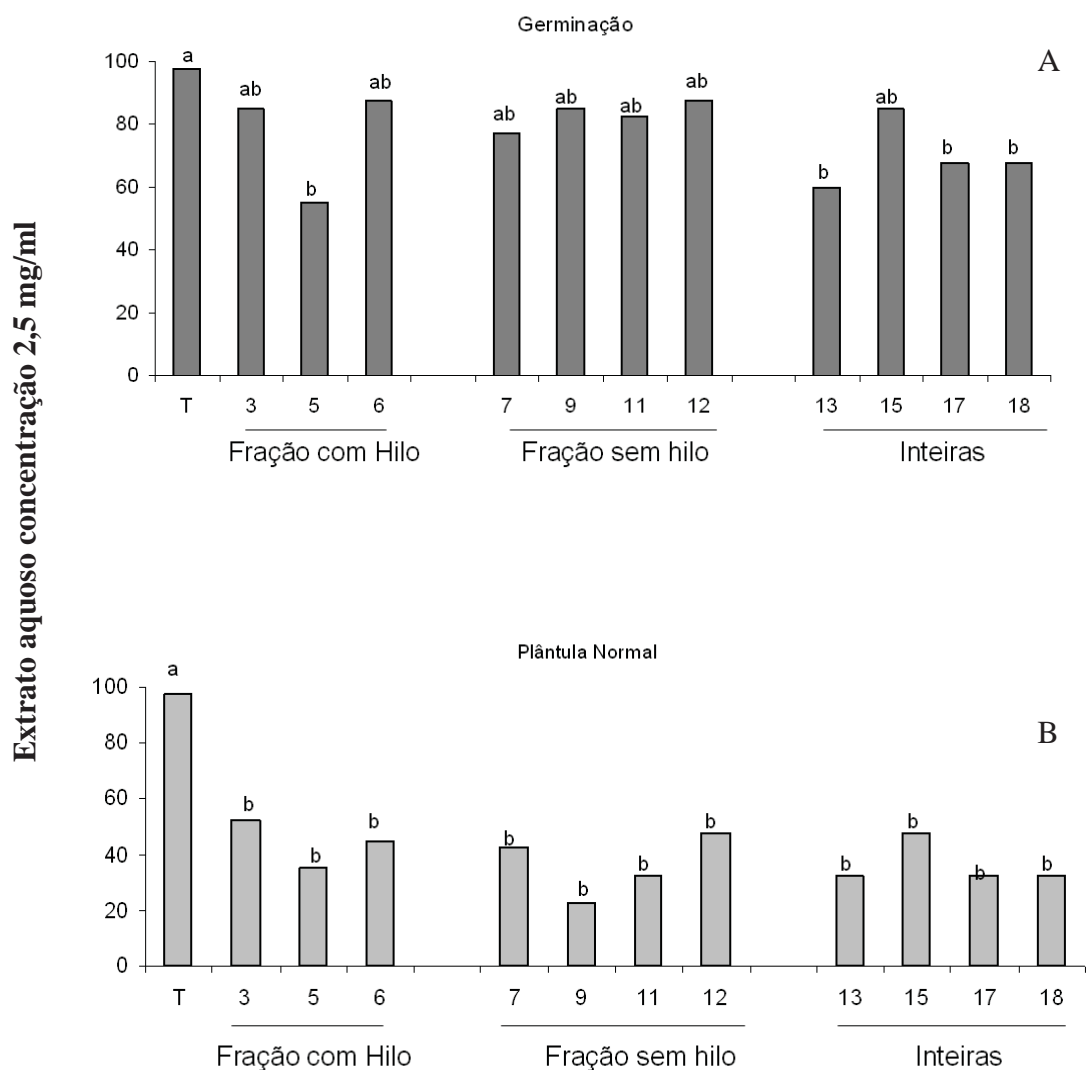
os 18 extratos, posto que alguns extratos, após serem liofilizados, não produziram material suficiente para preparar as soluções.

O potencial osmótico dos extratos aquosos na concentração de 0,5 mg/ml<sup>-1</sup> aquoso variou de -0,19/-0,33 MPa; etanólicos na mesma concentração, -0,23/-0,39 MPa; aquosos na concentração de 2,5 mg/ml<sup>-1</sup> aquoso variou de -0,24/-0,41 MPa; etanólicos na mesma concentração, -0,22/-0,43 MPa.

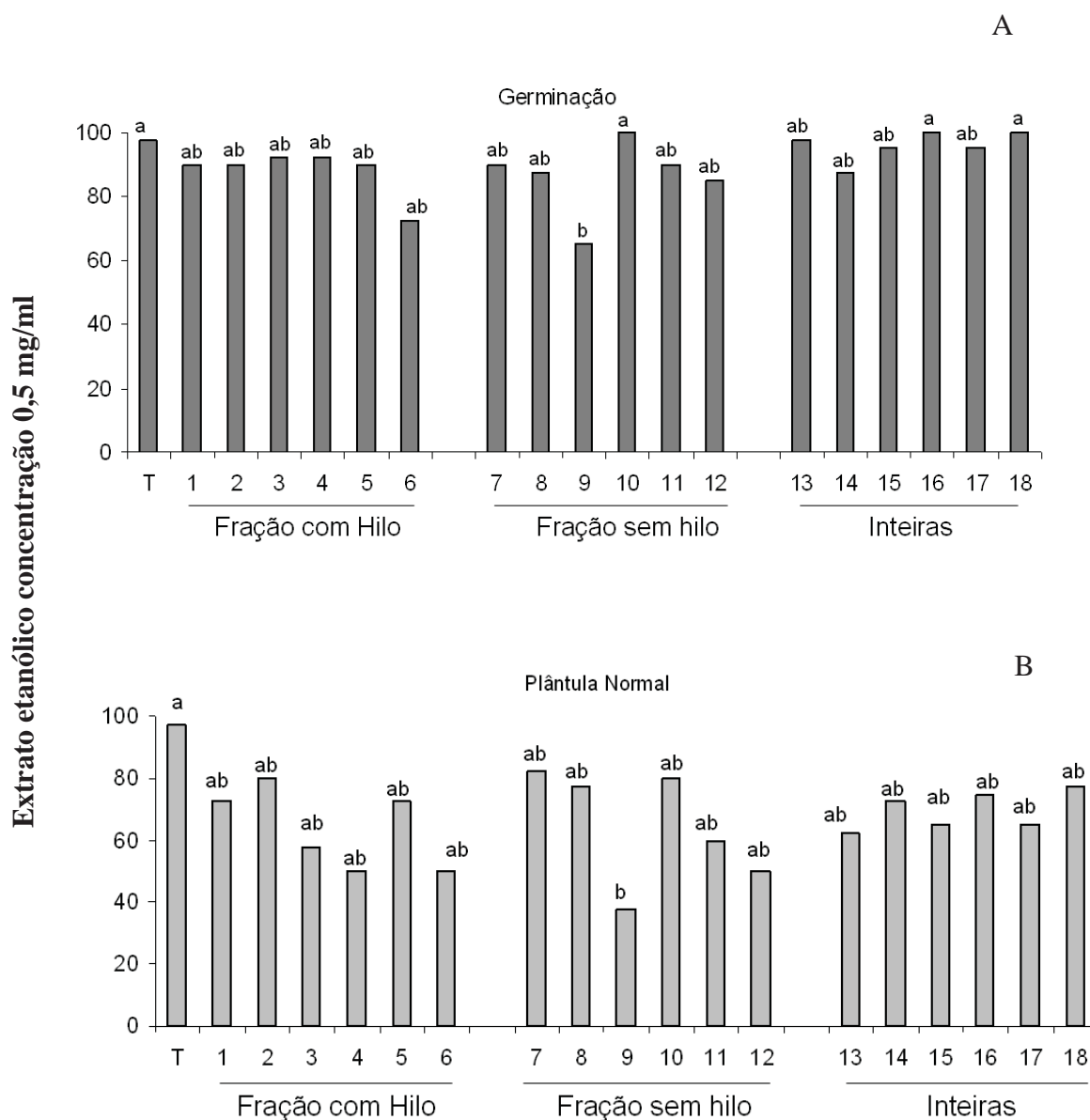
A aplicação dos extratos de diferentes estádios de germinação e de diferentes origens (TR, R, PA, Figura 1) decorreu em inibição da germinação das sementes da própria espécie (Figuras 4, 5, 6 e 7).



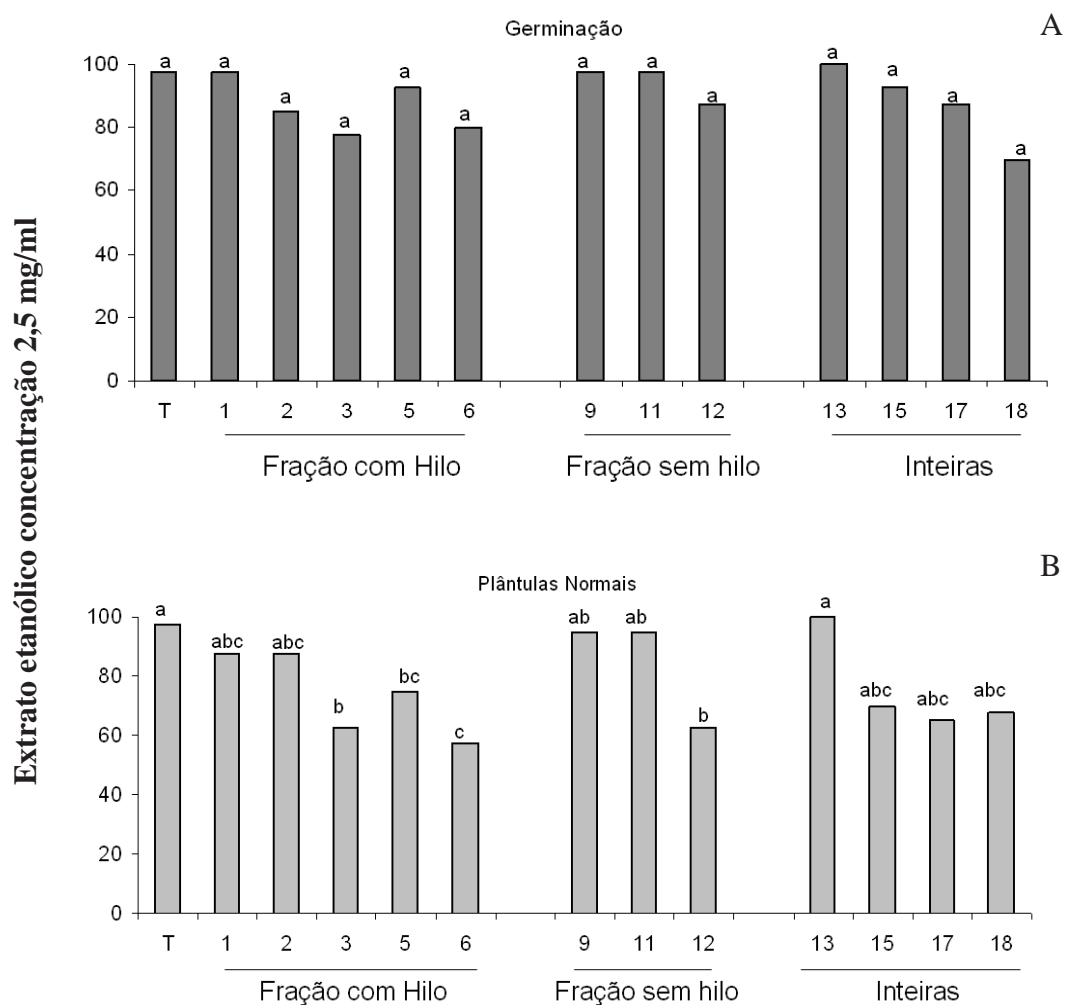
**Figura 4:** Sementes de *E. pyriformis* tratadas com diferentes extratos sendo avaliada a porcentagem de germinação e porcentagem de produção de plântulas anormais, onde A: porcentagem de germinação de sementes de *E. pyriformis* após tratamentos com extratos aquosos na concentração 0,5 mg/ml da mesma planta; B: porcentagem de plântulas normais de *E. pyriformis* de sementes submetidas ao tratamento com extratos aquosos na concentração 0,5 mg/ml. Números correspondem à origem dos extratos. Letras referem-se às médias pelo teste de Tukey a 5%, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.



**Figura 5:** Sementes de *E. pyriformis* tratadas com diferentes extratos sendo avaliada a porcentagem de germinação e porcentagem de produção de plântulas anormais, onde A: porcentagem de germinação de sementes de *E. pyriformis* após tratamentos com extratos aquosos na concentração 2,5 mg/ml da mesma planta; B: porcentagem de plântulas normais de *E. pyriformis* de sementes submetidas ao tratamento com extratos aquosos na concentração 2,5 mg/ml. Números correspondem à origem dos extratos. Letras referem-se às médias pelo teste de Tukey a 5%, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.



**Figura 6:** Sementes de *E. pyriformis* tratadas com diferentes extratos sendo avaliada a porcentagem de germinação e porcentagem de produção de plântulas anormais, onde A: porcentagem de germinação de sementes de *E. pyriformis* após tratamentos com extratos etanólicos na concentração 0,5 mg/ml da mesma planta; B: porcentagem de plântulas normais de *E. pyriformis* de sementes submetidas ao tratamento com extratos etanólicos na concentração 0,5 mg/ml. Números correspondem à origem dos extratos. Letras referem-se às médias pelo teste de Tukey a 5%, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.



**Figura 7:** Sementes de *E. pyriformis* tratadas com diferentes extratos sendo avaliada a porcentagem de germinação e porcentagem de produção de plântulas anormais, onde A: porcentagem de germinação de sementes de *E. pyriformis* após tratamentos com extratos etanólicos na concentração 2,5 mg/ml da mesma planta; B: porcentagem de plântulas normais de *E. pyriformis* de sementes submetidas ao tratamento com extratos etanólicos na concentração 2,5 mg/ml. Números correspondem à origem dos extratos. Letras referem-se às médias pelo teste de Tukey a 5%, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

Apesar de a protrusão da raiz primária ter sido afetada com a aplicação de alguns extratos, a produção de plântulas normais demonstrou efeitos mais acentuados. Tal fato também foi observado por Ferreira & Borghetti (2004), que afirmaram que algumas substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. No presente trabalho esse efeito também ocorreu, conforme ilustrado na Figura 8. Além disso, segundo Ferreira &

Áquila (2000) o efeito alelopático nem sempre se dá só sobre a germinabilidade, mas sobre a velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo como, por exemplo, a produção de plântulas normais.



**Figura 8:** Sementes de *E. pyriformis* foram tratadas com diferentes extratos e avaliou-se a produção de plântulas anormais, onde A: Plântula normal originada do tratamento com água (testemunha), B: Plântulas anormais obtidas de tratamentos com extratos aquosos e etanólicos.

Os efeitos dos extratos obtidos a partir de diferentes estruturas de sementes de *E. pyriformis* (TR, R, PA), tiveram diferenças nas respostas alelopáticas da mesma planta, fato também observado por Juan Jimenez-Osornio *et al.* (1996), Delachieve *et al.* (1999) e Wu *et al.* (2000). Friedmam (1995) afirmou que a quantidade de aleloquímicos e sua liberação pelos órgãos da planta são variações que ocorrem de espécie para espécie.

Nos extratos aquosos de ambas as concentrações trabalhadas ( $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  ou  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) os que tiveram maior efeito inibidor se tratavam de extratos de sementes germinantes, sugerindo que a produção de inibidores é intensificada com o início da germinação.

Nos processos de extração foram utilizados dois solventes, ambos polares, porém o etanol possui polaridade intermediária. Em extrações aquosas substâncias arrastadas são de alta polaridade (Oliveira 2008), que tendem a penetrar e circular na semente mais facilmente, uma vez que essa espécie tem um alto teor d'água,

provavelmente por isso notou-se que os extratos etanólicos inibiram menos que aquosos, uma vez que o etanol, de polaridade intermediária, arrastou substâncias de polaridade intermediária, que seriam mais difíceis de penetrar na semente e influenciarem na germinação.

Compostos fenólicos são bastante encontrados em espécies de *Eugenia* e a extração desses compostos pode ser realizada com água, altamente polar. Compostos fenólicos solúveis em água são conhecidos pela capacidade inibidora de germinação e crescimento inicial (Espinosa 2008). Extrações feitas com solventes com polaridade intermediária, como o etanol, apresentam baixa concentração de compostos fenólicos, sendo assim extratos obtidos a partir de extração aquosa são potencialmente mais inibidores (MAU *et al.* 2005 a, MAU *et al.* 2005 b) .

O fato dos compostos fenólicos reduzirem a atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na via oxidativa das pentoses fosfato, as quais asseguram níveis de ATP e esqueletos de carbono suficientes para a germinação das sementes (Gniazdowska & Bogatek 2005), justifica o potencial inibidor maior nos extratos aquosos. Ghayal *et al.* (2007) estudaram compostos fenólicos contidos nas folhas de *Cassia uniflora*, e observaram que em altas concentrações, estes inibiram a germinação de sementes de *Raphanus sativus* e *Brassica juncea* e quando esses compostos foram extraídos de solos cultivados por *Pinus laricio* inibiram a germinação das sementes da própria espécie (Muscolo 2001).

Grande parte dos aleloquímicos atua no estresse oxidativo, produzindo espécies reativas de oxigênio, que atuam diretamente ou como sinalizadores para os processos de degradação celular, impedindo assim a germinação e o desenvolvimento inicial, bem como para processos fisiológicos vitais às plantas (Almeida 2008).

Pôde-se, então, concluir que os extratos aquosos feitos a partir de sementes de *E. pyriformis* em diferentes estádio de germinação e diferentes origens (TR, R, PA) tem um maior potencial inibidor quando comparado com extratos etanólicos obtidos a partir dos mesmos materiais.

Extratos aquosos na concentração de 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> (e.2) da raiz de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula e (e.10) extrato da raiz de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, inibiram a germinação da própria uvaia em 50 e 60%, respectivamente. Extratos aquosos de concentração de 2,5 mg. ml<sup>-1</sup> (e.5) dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz e o (e.13) extrato da parte aérea de sementes inteiras de uvaia germinadas até

plântula inibiram a germinação da própria uvaia em 45 e 40%, respectivamente. Nenhum extrato etanólico em quaisquer concentração trabalhada inibiu a germinação de uvaia em mais de 35%.

A produção de plântulas normais foi mais afetada se comparada com a porcentagem de influência que os extratos tiveram sobre a germinação. Os extratos aquosos na concentração de  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram mais a produção de plântulas normais foram: (e.2) extrato da raiz de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula (80% de plântulas anormais), (e.3) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula (70%), (e.10) extrato da raiz de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz (80%), (e.11) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até raiz (75%). Os extratos aquosos de concentração  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram mais na produção de plântulas normais foram: (e.5) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz (65% de plântulas anormais), e.9, extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula (80%), (e.11) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz (65%), (e.13) extrato da parte aérea de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula (65%), (e.17) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até raiz (65%), (e.18) extrato sementes inteiras de uvaia sem germinação (65%).

Os extratos etanólicos na concentração de  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ , que influenciaram na produção de plântulas normais foram: (e.3) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula (40% de plântulas anormais), (e.5) extrato da raiz de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz (50%), (e.6) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia sem germinação (50%), (e.9) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula (60%), (e.11) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz (40%), (e.12) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia sem germinação (50%), (e.13) extrato da parte aérea de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula (40%), (e.15) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula (40%), (e.17) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até raiz (40%). Os extratos etanólicos de concentração  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram mais na produção de plântulas normais foram (e.3) extrato dos

cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula (40%), (e.6) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia sem germinação (45%), (e.12) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia sem germinação (40%), (e.17) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até raiz (40%).

Dos 27 tratamentos citados acima como mais inibidores a germinação e a produção de plântulas normais, apenas 18,5% são extratos de tecidos de reserva remanescente não germinantes, sugerindo que a produção de substâncias ocorrem apenas quando inicia-se a germinação do primeiro embrião. Em alguns casos, a inibição foi maior nos extratos feitos de raiz, em outros foram de extratos feitos a partir de tecido de reserva remanescente, ou de parte aérea, sugerindo que existe uma mobilização de reguladores durante processo de desenvolvimento da plântula. Vários reguladores podem estar envolvidos nesse processo, o etileno, por exemplo é um potente regulador de crescimento, afetando vários processos do desenvolvimento das plantas, como crescimento, diferenciação, senescência superação da dormência em várias espécies podendo ainda estimular a germinação (Kader, 1985; Smalle & Van Der Straeten, 1997, Esashi, 1991; Abeles *et al.*, 1992), sendo o embrião o principal local da produção de etileno (Ketring & Morgan, 1969; Esahi & Katoh, 1975). Segundo Khan (1971), as citocininas regulariam o nível de inibidores ativos presentes nas sementes, permitindo as sementes tornarem-se mais sensíveis a ação das giberelinas. Como constataram Walker *et al.* (1989) em sementes de *Acer saccharum*, as giberelinas são capazes de promover o alongamento celular além de alterações importantes durante a germinação. As citocininas poderiam ainda exercer alguma função na mobilização de reservas (Van Staden, 1983).

As sementes em início de desenvolvimento apresentam quantidades significativas de reguladores como as citocininas, auxinas, ácido abscísico e giberelinas. Os níveis máximos de cada um deles não são coincidentes, mas as variações geralmente seguem padrão preestabelecido. As citocininas estão associadas principalmente à fase inicial do desenvolvimento da semente, isto é, atuam durante a divisão celular. O teor de citocininas cresce acentuadamente logo após a fecundação e diminui à medida que as sementes acumulam matéria seca. As auxinas ocorrem principalmente na forma de ácido indolacético formado a partir do triptofano, no início do desenvolvimento das sementes, e podem ser responsáveis pela atividade de assimilação de compostas provenientes da planta-mãe. As giberelinas, em diferentes formas e quantidades, estão



diretamente associadas à expansão celular e ao direcionamento da síntese de reservas. Juntamente com as auxinas, atuam no crescimento das paredes do ovário. A principal função do ácido abscísico (ABA) está ligada à inibição da germinação durante a maturação. Em outras palavras, bloqueia a reversa do metabolismo para a germinação; portanto, em sua ausência, pode ocorrer a germinação precoce (Marcos Filho 2005).

Com o presente trabalho não foi possível a identificação do local de origem de produção dessas substâncias, sendo assim necessário maiores estudos sobre mobilização de reguladores.

Os extratos de *E. pyrifomis* também foram aplicados em alface, para as quais não houve diferenças de porcentagem de germinação nos extratos na concentração de  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ , tanto nos aquosos quanto e etanólicos em relação a testemunha (Tabela 2). própria espécie.

**TABELA 2: Porcentagem de germinação e formação de plântulas anormais de aquênios de alface foram tratadas com diferentes extratos de *E. pyriformis***

Tratamento	Extrato aquoso [0,5] mg/ml		Extrato aquoso [2,5] mg/ml		Extrato etanólico [0,5] mg/ml		Extrato etanólico [2,5] mg/ml	
	Germinação (%)	Plântulas Anormais (%)	Germ. (%)	Plânt. Anor. (%)	Germ. (%)	Plânt. Anor. (%)	Germ. (%)	Plânt. Anor. (%)
Testemunha	100 a	1,3 a	100 a	1,3 a	100 a	1,3 a	100 a	1,3 a *
1	100 a	94 b	90,6 b	100 b	100 a	6 a	91,3 b	91,3 b
2	99,3 a	92 b	91,3 b	100 b	100 a	6 a	92 b	92 b
3	100 a	92,66 b	91,3 b	100 b	98 a	6 a	92 b	92 b
4	98,66 a	94 b	92,6 b	100 b	99,3 a	6 a	- **	-
5	99,33 a	92 b	95,3 b	100 b	98,6 a	6 a	90,7 b	90,7 b
6	98 a	94 b	94,7 b	100 b	100 a	5,3 a	90 b	90 b
7	100 a	94 b	95,3 b	100 b	100 a	6 a	-	-
8	98,67 a	90,67 b	-	-	97,3 a	6 a	-	-
9	99,33 a	92,7 b	97,3 b	100 b	100 a	6 a	90,7 b	90,7 b
10	100 a	94 b	-	-	98,6 a	5,3 a	-	-
11	98 a	93,3 b	93,3 b	100 b	100 a	6 a	91,3 b	91,3 b
12	100 a	92,6 b	91,3 b	100 b	100 a	6 a	90 b	90 b
13	97,3 a	93,3 b	91,3 b	100 b	99 a	6 a	90,7 b	90,7 b
14	99,3 a	92 b	-	-	100 a	5,3 a	-	-
15	98,7 a	91,3 b	90,6 b	100 b	100 a	6 a	90 b	90 b
16	100 a	94 b	-	-	98 a	6 a	-	-
17	99,3 a	92,6 b	92,7 b	100 b	100 a	6 a	90,7 b	90,7 b
18	99,3 a	92 b	92 b	100 b	10 a	5,3 a	92 b	92 b

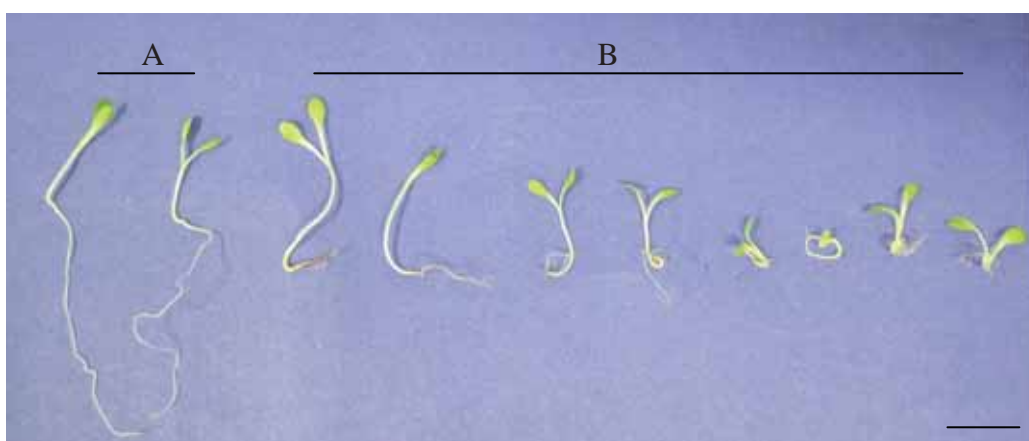
\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

\*\* Ausência de extrato

Os extratos de concentração de 2,5 mg.ml<sup>-1</sup> interferiram na germinação de alface, se diferenciando da testemunha (Tabela 2). Estes resultados assemelham-se aos de Saxena *et al.* (1996) e Gatti (2003), que observaram que o aumento da concentração dos extratos de *Pennisetum glaucum* diminuiu as taxas de germinação de sementes da própria espécie.

Segundo Rodrigues *et al.* (1992), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento, pois interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas.

O extrato aquoso na concentração  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  produziu plântulas anormais, diferentemente do extrato etanólico na mesma concentração. Os extratos aquosos e etanólicos na concentração  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  promoveram diferenças na porcentagem de germinação e formação de plântulas anormais em relação a testemunha ( Figura 8).



**Figura 8:** Aquênios de alface foram tratadas com diferentes extratos de *E. pyriformis* sendo avaliada produção de plântulas normais e anormais, onde A: plântulas normais produzidas no controle; B: plântulas anormais produzidas nos tratamentos com os extratos. Escala 1 cm.

A formação de plântulas anormais foi altamente significativa nunca sendo menor que 90%, na maioria os casos. Dados corroboram com Giotto (2007) que em estudo sobre o efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. concluiu que *E. dysenterica* apresenta alelopatia, mas não se observou efeito dos extratos na germinabilidade em nenhum tratamento, porém notou-se que a parte radicular é mais sensível, com necrose e escurecimento das radículas e menor quantidade de pêlos absorvente, conforme a concentração dos extratos aumentava.

No bioensaio de crescimento observou-se que alguns extratos apresentaram estímulo no crescimento de plântulas de alface quanto para o comprimento da raiz (Tabela 3) e aumento da matéria seca (Tabela 4) em relação à testemunha.

**TABELA 3: Aquênios de alface foram tratadas com diferentes extratos de *E. pyriformis* e suas plântulas foram medidas**

Tratamento	Extrato aquoso		Extrato aquoso [2,5]		Extrato etanólico		Extrato etanólico [2,5]	
	[0,5] mg/ml		mg/ml		[0,5] mg/ml		mg/ml	
	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea
Testemunha	42,54 a	20,96 a	42,54 ab	20,96 c	42,54 ab	20,96 a	42,54 bc	20,96 ab *
1	39,52 ab	28,68 a	30,1 ab	44,87 a	43,3 ab	25,14 a	33,93bcde	24,58 ab
2	43,78 ab	23,98 a	35,58 ab	28,75 bc	38,61 ab	25,91 a	31,73 cde	23,97 ab
3	36,63 ab	27,01 a	45,57 a	28,86 bc	44,69 ab	22,9 a	59,52 a	21,24 ab
4	34,98 ab	29,97 a	35,04 ab	27,19 bc	48,02 ab	24,11 a	-	-
5	32,75 ab	22,39 a	38,57ab	27,39 bc	37,24 ab	25,31 a	23,61 e	22,1 ab
6	45,48 ab	23,63 a	38,74 ab	27,53 bc	40,4 ab	25,59 a	44,47 b	22,37 ab
7	38,22 ab	25,29 a	45,25 a	25,66 c	50,86 ab	27,93 a	-	-
8	42,79 ab	25,98 a	-	-	45,69 ab	27,15 a	-	-
9	35,89 ab	20,62 a	31,33 ab	27,99 bc	39,38 ab	26,47 a	28,91 de	26,05 ab
10	41,2 ab	26,81 a	-	-	50,83 ab	26,55 a	-	-
11	32,81 ab	23,35 a	38,82 ab	27,81 bc	48,79 ab	23,5 a	28,58 de	31,46 a
12	37,68 ab	24,47 a	35,43 ab	27,12 bc	41,59 ab	29,76 a	42,27 bc	20,85 b
13	38,18 ab	27,18 a	36,16 ab	36,16 b	48,31 ab	23,66 a	36,72 bcd	20,19 b
14	38,6 ab	23,88 a	-	-	39,31 ab	27,89 a	-	-
15	33,69 ab	24,72 a	26,72 b	25,08 c	44,1 ab	23,85 a	25,61 de	22,19 ab
16	46,43 b	24,6 b	-	-	39,17 a	23,61 a	-	-
17	44,36 ab	26,71 a	28,84 ab	28,68 bc	40,38 ab	24,81 a	32,17bcde	23,45 ab
18	27,19 b	22,31 a	40,84 ab	30,53 bc	41,18 b	23,48 a	41,74 bc	25,13 ab

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

**TABELA 4: Massa seca (mg/plântula) de alface, dos diferentes tratamentos, e diferentes extratos aplicados**

Tratamento	Extrato	Extrato	Extrato	Extrato
	aquoso [0,5]	aquoso [2,5]	etanólico [0,5]	etanólico [2,5]
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Testemunha	50 c	50 a	50 f	50 a*
1	51 c	-	103 a	21 b
2	112 ab	-	110 abc	20 b
3	58 b	42 ab	107ab	14 b
4	109 b	23 c	101 acbd	-
5	42 c	41 ab	75 e	28 b
6	41 c	52 a	81 de	21 b
7	51 c	45 a	84 cde	-
8	38 c	30 bc	80 e	-
9	103 b	-	79 e	16 b
10	124 ab	47 a	93 abcde	-
11	148 a	-	79 e	11 b
12	123 ab	46 a	80 e	15 b
13	116 ab	-	80 e	16 b
14	58 c	27 c	85 cde	-
15	51 c	-	87 bcde	30 b
16	112 ab	-	92 abcde	-
17	44 c	-	102 abc	17 b
18	42 c	42 bc	88 bcde	23 b

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Segundo Rice (1984), alguns compostos químicos tem atividade alelopática inibitória em altas concentrações e, em menores, podem estimular o mesmo processo. Reigosa *et al.* (1999) explicou este fato afirmando que os aleloquímicos podem atuar em vários processos simultaneamente e ter uma resposta diferenciada para o mesmo ou para diferentes processos, dependendo da concentração deste composto.

Quando avaliado todos os extratos, notou-se que o crescimento da parte aérea foi mais afetado que o crescimento das raízes.

Os extratos aquosos de concentração  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que mais influenciaram no crescimento de raízes de plântulas alface foram: (e.4) extrato da raiz de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, (e.5) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, (e.11) extrato dos cotilédones de

frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, (e.15) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula, (e.18) extrato sementes inteiras de uvaia sem germinação. Os extratos aquosos de concentração  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram no crescimento de raízes de plântulas de alface foram: (e.1) extrato da parte aérea de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.9) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.15) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula. Os extratos etanólicos de concentração  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram no crescimento de raízes de plântulas alface foram (e.2) extrato da raiz de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.3) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, (e.9) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.14) extrato da raiz de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula. Os extratos etanólicos de concentração  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram no crescimento de raízes de plântulas alface foram (e.5) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, (e.7) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.11) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, (e.15) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula. De todos os extratos citados acima como mais inibidores do crescimento apenas 1 foi de sementes não germinantes.

Os extratos aquosos de concentração  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram no crescimento da parte aérea de plântulas alface foram: (e.11) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, (e.9) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.14) extrato da raiz de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula, (e.x) extrato da raiz de sementes inteiras de uvaia germinadas até raiz, (e.18) extrato sementes inteiras de uvaia sem germinação. Os extratos aquosos de concentração  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram no crescimento da parte aérea de plântulas alface foram: (e.7) extrato da parte aérea de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.13) extrato do cotilédone de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula. Os extratos etanólicos de concentração  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  que influenciaram no crescimento da parte aérea de plântulas alface foram: (e.3) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.11) extrato dos cotilédones de

frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia germinantes até raiz, (e.18) extrato sementes inteiras de uvaia sem germinação. Os extratos etanólicos de concentração 2,5 mg.ml<sup>-1</sup> que influenciaram no crescimento da parte aérea de plântulas alface foram: (e.2) extrato da raiz de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.6) extrato dos cotilédones de frações com hilo de cotilédones de uvaia germinantes até plântula, (e.9) extrato dos cotilédones de frações opostas ao hilo de cotilédones de uvaia sem germinação, (e.13) extrato da parte aérea de sementes inteiras de uvaia germinadas até plântula. Dos 13 extratos considerados os que mais interferiram no crescimento da parte aérea, apenas 3 foram de extratos de sementes não germinantes.

Periotto *et al.* (2004) observaram que sementes e plântulas de alface e de rabanete foram afetadas pelos extratos de *Andira humilis*. Do mesmo modo, Medeiros e Lucchesi (1993) demonstraram que extratos aquosos de ervilhaca (*Vicia sativa* L.) exerceram forte influência negativa sobre a germinação de sementes de alface, sendo que, nas concentrações mais elevadas, houve oxidação dos tecidos das sementes, que sofreram rápida decomposição e, por fim, morreram. O efeito alelopático foi mais evidente sobre a velocidade de germinação e sobre o comprimento das plântulas, do que na percentagem final de sementes germinadas.

Por outro lado, Carmo *et al.* (2007) verificaram que os extratos aquosos de cascas de tronco e de raízes de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*) causaram inibição do desenvolvimento do sistema radicular das plântulas de sorgo e a sua parte aérea teve o crescimento estimulado pelo extrato de cascas de raízes. Oliveira et al (2009) verificam que extratos nas menores concentrações do extrato de casca do fruto do juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) não afetaram a germinação de alface, mas a partir de 75% a germinação começou a diminuir. Resultados semelhantes foram encontrados por Miro *et al.* (2008) que constataram que a germinação e a emergência do milho não foram afetadas, nem em solo de campo, nem em laboratório com substrato papel; porém, seu crescimento e desenvolvimento foram afetados por folhas de *Ilex paraguayensis*. Altura da planta, comprimento do primeiro entre-nó, peso seco da parte aérea e da raiz, comprimento das folhas, número de raízes adventícias e comprimento da raiz primária foram afetados pela presença dos frutos ou dos seus extratos, o que mostra uma inibição do desenvolvimento, causada pelos possíveis aleloquímicos presentes. Os terpenos podem ser responsáveis pelos resultados observados no presente trabalho.

Aires *et al.* (2005) observaram que o extrato de *Solanum lycocarpum* não interferiu significativamente no crescimento da parte aérea, mas reduziu significativamente o crescimento da radícula das plântulas de gergelim.

Peres *et al.* (1998) observaram o mesmo comportamento germinativo de *Clidemia hirta* submetida a extratos de *Gleichenia pectinata* que provocaram um nítido retardo no tempo da germinação, porém aumentaram significativamente o número de sementes germinadas.

De acordo com Einhellig (1999), os efeitos alelopáticos resultam da ação de várias substâncias que atuam em conjunto, visto que, em geral, os aleloquímicos são encontrados em baixas concentrações no meio ambiente. Os extratos aquosos são misturas que podem conter substâncias de várias classes como terpenóides, fenólicos, alcalóides, aminoácidos não protéicos, dentre outras, e que apresentam efeitos complexos sobre a alface, ainda não completamente elucidados. Adicionalmente, resultados positivos para alelopatia, obtidos em laboratório, podem não se repetir em condições naturais, devido à ocorrência simultânea de diversos fatores bióticos e abióticos que podem mascarar este fenômeno.

Conclui-se que os extratos, aquosos e etanólicos feitos a partir de *E. pyriformis* possuem potencial inibidor em alface, porém sua ação está na formação de plântulas normais e não necessariamente na germinabilidade.

### **Conclusões**

Com este trabalho foi possível verificar que extratos preparados a partir de sementes de *Eugenia pyriformis* possuem efeito inibidor sobre a germinação de sementes das próprias espécies principalmente os extratos de sementes germinantes, sugerindo que a produção de substâncias inibidoras tem início com a germinação. Pode-se concluir também que os extratos inibem o desenvolvimento de alface e produzem plântulas anormais em extratos na concentração de 2,5 mg/ml.



## Referências

- Abeles, F.B.; Morgan, P.W. & Saltveit M.E. JR.** Ethylene and plant biology. 1992. 2nd ed., Academic Press, San Diego.
- Aires, S.S.; Ferreira, A.G., Borghetti, F. 2005.** Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L.(Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. *Acta Botanica Brasilica* 19: 339-344.
- Almeida, D.G., Zucoloto, M., Zetun, M.C., Coelho, I. & Sobreir, F.M. 2008.** Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 61: 4237-4247.
- Amaral, A.C.F., Kuster, R.M., Bessa. W.S., Barnes, R.A., Kaplan, M.A.C. & Wessjohann, L.A. 2001.** Flavonoids and others phenolics from leaves of two *Marlierea* species (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 653-654.
- Anaya, A.L. 1999.** Allelopathy as a Tool in the Management of Biotic Resources in Agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 697-739.
- Anjos, A.M., Ferraz. I. D. K. 1999.** Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata ssp. sororia*). *Acta Amazonica* 29: 337-348.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiro-Ribeiro, R.C.L. 2002.** Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- Batygina, T.B. & Vinogradova, G. Yu. 2007.** Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology*, 38, 126-151.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 1992.** Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, Brasília.
- Carmo, F.M.S.; Borges, E.E.L & Takaki, M. 2007.** Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) *Acta Botanica Brasilica* 21: 697-705.
- Choi, M.P.K., Chan, K.K.C., Leung, H. W, Huie, C.W. 2003.** Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solution. *Journal of Chromatography* 983: 153-162.

- Chou, C.H.** 1986. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems in Taiwan. *In:* A.L. Putnam & C.S. Tang (eds.). The science of allelopathy. John Wiley & Sons. New York, pp. 57-73.
- Coneglian, I.R.M.** 2007. Morfologia e ontogênese do pericarpo e semente de *Eugenia puniceifolia* (H.B. & K.) DC., *Myrcia bella* Camb. E *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg (Myrtaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 107p.
- Delachiave, M.E.A., Rodrigues, J.D. & Ono, E.O.** 1999. Efeitos alelopáticos de losna (*Artemisia absinthium* L.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. *Revista Brasileira de Sementes* 21: 265-269.
- Delgado, L.F., Mello, J.I.O. and Barbedo, C.J.** 2010. Potential for regeneration and propagation from cut seeds of *Eugenia* (Myrtaceae) tropical tree species. *Seed Sci. & Technol* 38, 624-634.
- Esashi, Y.** 1991. Ethylene and seed germination, p.133-157. *In:* Mattoo, A.K. & Suttle, J.C.(Eds.) The plant hormone ethylene. Boca Raton, CRC Press, p.133-157.
- Esashi, Y. & Katon, H.** 1975. Dormancy and impotency of cocklebur seeds. III. CO<sub>2</sub> – and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-dependent growth of the embryonic axis and cotyledon segments. *Plant Cell Physiology*, 16:707-718.
- Espinosa-Garcia, F.J., Martinez, H.E., Quiroz, F.A.** 2008. Allelopathic potential of *Eucalyptus* spp plantations on germination and early growth of annual crops. *Allelopathy Journal* 21: 25-37.
- Einhellig, F.A.** 1999. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. Pp. 479-494. *In:* Inderjit; K.M.M. Dakshini & C.L. Foy (eds.). **Principles and Practices in Plant Ecology.** Boca Raton, CRC Press.
- Fabris, L.C. & Cesar, O.** 1996. Estudos florísticos em uma mata litorânea no sul do estado do Espírito Santo. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 5: 15-46.
- Ferreira, A.G. & Aquila, M.E.A.** 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 175-204.
- Ferreira, D.F.** 2008. SISVAR, versão 5.3. UFLA, Lavras.
- Ferreira, A. G. & Borghetti, F.** 2004. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre.

- Friedman, J.** 1995. Allelopathy, autotoxicity, and germination. *In*: J. Kegel & G. Galili (eds.). Seed development and germination. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 629-644.
- Gatti, A.B., Perez, S.C.J. & Lima, M. I. S.** 2004. Acta bot. bras. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca ativa* L. e *Raphanus sativus* L. 18(3): 459-472.
- Ghayal, N.A., K.N. Dhumal, N.R. Deshpande, A.M. Kulkarni, A.U. Phadke & S.M. Shah.** 2007. Phytotoxic effects of Cassia uniflora leaf leachates on germination and seedling growth of radish (*Raphanus sativus*) and mustard (*Brassica juncea*). Allelopathy Journal 19: 361-372.
- Giamakis, A., Kretsi, O., Chinou, I. & Spyropoulos, C.G.** 2001. *Eucalyptus camaldulensis*: volatiles from immatures flowers and high productions of 1-8-cineole and  $\alpha$ -pinene by in vitro cultures. Phytochemistry 58: 351-355.
- Giotto, A.C., Oliveira, S.C.C & Silva, J.G.P.** 2007. Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. Ex. DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). Revista Brasileira de Biociências 5: 600-602.
- Gniazdowska, A. & R. Bogatek.** 2005. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. Acta Physiologiae Plantarum 27: 395-407.
- International Seed Testing Association.** 1996. International rules for testing seeds. Seed Science and Technology 16: 113-115.
- Juan Jiménez-Osornio, F.M.V.Z., Kumamoto, J. & Wasser, C.** 1996. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. Biochemical Systematics and Ecology 24: 195-205.
- Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães R.M. & Strassburg, R.C.** 2007. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. Acta bot. bras. 21(3): 539-551.
- Kader, A.A.** 1985. Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. HortScience, 20:54-57.
- Ketring, D.L. & Morgen, P.W.** 1969. Ethylene as a component of the emanations from germinating peanut seeds and its effect on dormant Virginia-type peanut seeds. Plant Physiology, 44:326-330.
- Khan, A.A.** 1971. Cytokinins: Permissive role in seed germination. Science, 171:853-859.

- Lee, M., Nishimoto, S., Yang, L., Yem, K., Hatano, T., Yoshida, T., Okuda, T.** 1997. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimmers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry* 44: 1343.
- Lunardi, I., Peixoto, J.L.B., Silva, C.C., Shuquel, I.T.A., Basso, E.A. & Vidotti, G.J.** Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 12(2): 180-183. 2001.
- Magina, M.D.A.** 2008. Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Mau, J. L., Tsai, S. Y., Tseng, Y. H. & Huang, S. J.** 2005a. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 93: 641-649.
- Mau, J. L., Tsai, S. Y., Tseng, Y. H. & Huang, S. J.** 2005b. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT - Food Science and Technology* 38: 589-597.
- Mayer, R.** 1990. Flavonoids from *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry* 29: 1340-1342.
- Medeiros, A.R.M., Lucchesi, A.A.** 1993. Efeitos alelopáticos da ervilhaca (*Vicia sativa* L.) sobre a alface em testes de laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 28: 9-14.
- Menut, C., Bessiere, J.M., Samate, A.D., Millogo-Rasolodimby & Nacro, M.** 1999. Apodophyllone and isotorquatone, two arenic ketones from *Eucalyptus apodophylla*. *Phytochemistry* 51: 975-978.
- Michel, B.E. & Kaufmann, M.R.** 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.
- Miro, C.P; Ferreira, A.G., Aquila, M.E.A.** 1998. Alelopatia de frutos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33: 1261-1270.
- Muscolo A., M.R. Panuccio & M. Sidari** 2001. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination. Respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. *Journal of Plant Growth Regulation* 35: 31-35.
- Neves, L.J. & Donato, A.M.** 1989. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Bradea* 5: 273-286.

- Oliveira, R.B., Nascimento, M.V.M., Valadares, M.C., Paula, J.R., Costa, E.A. & Cunha, L.C.** 2008. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44: 485-491.
- Oliveira, A. K. de, Diógenes, F. E. P., Coelho, M. F. B., Maia, S. S. S.** 2009. Alelopatia em extratos de frutos de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart. – Rhamnaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 23(4): 1186-1189. **Pio Corrêa, M.** 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.1, Rio de Janeiro.
- Peres, M.T.L.P.; Pizzolatti, M.G.; Queiroz, M.H. & Yunes, R.A.** 1998. Potencial de atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* WILLD (PR.) *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33: 131-137
- Periotto, F.; Perez, S.C.J.G.A. & Lima, M.I.S.** 2004. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica* 18: 425-430.
- Pott, A. & Pott, V.J.** 1994. Plantas do Pantanal. Embrapa, Brasília.
- Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A. & González, L.** 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 577-608.
- Rice, E.L.** 1984. Allelopathy. Academic Press, 2<sup>a</sup> ed., New York.
- Richter, B. E. Jones, B. A., Ezzell, J. L. & Porter, N. L.** 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*. 68, 1033-1039.
- Rizzini, C.T.** 1970. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 30: 381-402.
- Rodrigues, L.R.A.; Rodrigues, T.J.D. & Reis, R.A.** 1992. Alelopatia em plantas forrageiras. FCAVJ-UNESP/ FUNEP, Jaboticabal.
- Santos, G.G., Alves, J.C.N., Rodilla, J.M.L., Duarte, A.P., Lithgow, A.M. & Urones, J.G.** 1997. Terpenoids and other constituents of *Eucalyptus globules*. *Phytochemistry* 44: 1309-1312.
- Sarker, S. D., Bartholomew, Barbara, Nash, Robert J., Simmonds, M. S. J.** 2001. Sideroxylin and 8-demethylsideroxylin from *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 759-762.

- Saxena, A.; Singh, D.V. & Joshi, N.L.** 1996. Autotoxic effects of pearl millet aqueous extracts on seed germination and seedling growth. *Journal of Arid Environments* 33: 255-260.
- Siddiqui, B.S., Sultana, I. & Begum, S.** 2000. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camalculensis* var. *obtusata* leaves. *Phytochemistry* 54: 861-865.
- Silva, C. V., Bilia, D. A. C., Barbedo, C. J.** 2005. *Revista Brasileira de Sementes* 27: 86-92.
- Silva, C. V., Bilia, D. A. C., Maluf, A. M., Barbedo, C. J.** 2003. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 213-221.
- Smalle, J. & Van Der Straeten, D.** 1997. Ethylene and vegetative development. *Physiologia Plantarum*, 100:593-605.
- Teixeira, C.** 2009. Regeneração de embriões em sementes fracionadas de espécies brasileiras de *Eugenia*: influencia do estágio de maturação, do armazenamento e fase de germinação. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita-Filho", Botucatu.
- Van Staden, J.** 1983. Seeds and cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 58: 340-346.
- Walker, M.A.; Roberts, D.R.; Waite, J.L. & Dumbroff, E.B.** 1989. Relationships among cytokinins, ethylene and polyamines during the stratification-germination process in seeds of *Acer saccharum*. *Physiologia Plantarum*, 76: 326-332.
- Whittaker, R.W. & Feeny, P.P.** 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* 171: 757-769.
- Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. & AN, M.** 2000. Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2141-2154.
- Yang, L., Lee, C., Yen, K.** 2000. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Letters* 157: 65-75.

## 7. Considerações finais

O presente trabalho reforça resultados de trabalhos anteriores, que espécies do gênero *Eugenia* possuem capacidade regenerativa, a partir de sementes fracionadas e fraturadas, produzindo mais de uma plântula normal a partir de uma mesma semente.

Com o início da primeira germinação há produção de substâncias inibidoras, evitando assim que uma segunda plântula se desenvolva, tal fato só ocorre quando as sementes passam pelo fracionamento ou fissura caracterizando um processo estimulatório e inibidor regido por regulares vegetais, podendo ser diferentes, dependendo do local da semente. Os resultados obtidos no Capítulo 1 evidenciaram que o desenvolvimento de uma segunda raiz em uma mesma semente de uvaieira é dependente do bloqueio de substâncias ou processos de inibição.

Extratos de sementes já germinantes tiveram maior potencial inibidor, sugerindo que a produção de substâncias inibidoras intensificam quando inicia-se a germinação do primeiro embrião. Em alguns casos, a inibição foi maior nos extratos feitos de raiz, em outros foram de extratos feitos a partir de tecido de reserva remanescente, sugerindo que existe uma mobilização de reguladores durante processo de desenvolvimento da plântula. Com o presente trabalho não foi possível a identificação do local de origem de produção dessas substâncias, sendo assim necessários maiores estudos sobre mobilização de reguladores em plântulas como, por exemplo, em estudos fitoquímicos feitos a partir de cada porção de cada fase de desenvolvimento.

Conclui-se também que os extratos, aquosos e etanólicos feitos a partir de *E. pyriformis* possuem potencial inibidor em alface, porém sua ação é mais significativa na formação de plântulas normais do que na germinabilidade.

## 8. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

1. Sementes de *E. pyriformis* apresentam potencial para regeneração de raízes e plântulas, podendo produzir mais de uma muda a partir de uma mesma semente,
2. A germinação de sementes de *E. pyriformis* inicia processos de inibição da regeneração de novas raízes e plântulas nessa mesma semente, porém a incisão dos cotilédones pode reduzir o potencial de ação desses processos inibidores,
3. Extratos feitos a partir de sementes germinantes tem maior potencial inibidor,
4. Extratos, aquosos e etanólicos feitos a partir de *E. pyriformis* possuem potencial inibidor em alface, porém sua ação está na formação de plântulas normais e não necessariamente na germinabilidade.



## 9. Referências Bibliográficas

- Aires, S.S. 2007.** Potencial alelopático de espécies nativas do Cerrado na germinação e desenvolvimento inicial de invasoras. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Botânica – UnB,
- Andrade, R.N.B. & Ferreira, A.G. 2000.** Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) - Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes 22(2): 118-125.
- Angelopoulou, D.; Dmetzos, C.; Perdetzoglou, D. 2002.** Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. Biochemical Systematics and Ecology 30: 189-203.
- Arantes, A.A. & Monteiro, R. 2002.** A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Lundiana 3(2): 111-127.
- Almeida, F.S. 1988.** A alelopatia e as plantas. Londrina: IAPAR. Circular v.55, 62p.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992.** Apomixis in plants. Boca Raton: CRC, 298 p.
- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J. 1998.** Tolerância à dessecação em sementes. Acta Botânica Brasilica 12:145-164.
- Barroso, G.M. & Peron, M.V. 1994.** Myrtaceae. In: M.P.M. Lima & R.R. Guedes-Bruni (orgs.). Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo: RJ. Aspectos florísticos das espécies vasculares. Rio de Janeiro, Jardim Botânico. v.1. 261-302.
- Barroso, G.M. 2002.** Sistemática de angiospermas do Brasil. 2. ed. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.
- Berjak, P.; Dini, M. & Pammenter, N.W. 2000.** Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. Seed Science and Technology 12: 365-384.
- Berjak, P. & Pammenter, N.W. 2000.** What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12(número especial): 22-55.
- Bewley, J.D. & Black, M. 1994.** Seeds: physiology of development and germination. 2.ed. Plenum Press, New York.
- Black, M. & Prichard, H.W. 2002.** Desiccation and survival in plants: drying without dying. CABI Publishing, Wallingford.

- Borghetti, F.; Silva, L.C.R.; Pinheiro, J.D.; Varella, B.B.; Ferreira, A.G. 2005.** Aqueous leaf extract properties of Cerrado species in Central Brazil. In: Allelopathy: Establishing the scientific base. Fourth World Congress. Charles Sturt University – NSW Austrália.
- Bylaitė, E.; Venskutonis, R.; Roozen J.; Posthumus, M. A. 2000.** Composition of essential oil of costmary [*Balsamita major* (L.) Desf.] at different growth phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2409-2414.
- Carvalho & Nakagawa, 2000.** Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP. 588p.
- Castro, R.D., Bradford, K.J. & Hilhorst, H.W.M. 2004.** Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.
- Cerqueira, M.D.; Souza-Neta, A.L.C.; Passos, A.M.G.V.M.; Lima, B.O.; Roque N.F.; Martins, D.; Guedesc, M.L.S; Cruz, F.G. 2007.** Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 18(5): 998-1003.
- Chagas e Silva, F.; Fonseca, E.P.; Soares-Silva, L.H.; Müller, C. & Bianchini, E. 1995.** Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares da bacia do rio Tibagi-3. Fazenda Bom Sucesso, Município de Sapopema, PR. *Acta Botanica Brasílica* 9(2): 289-302.
- Darwin, C. 1859.** A origem das espécies. Tradução Eugênio Amado. Belo Horizonte, Vila Rica ed. Grandes Obras da Cultura Universal.
- Delgado, L.F. 2006.** Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. São Paulo Instituto de Botânica. (Dissertação de Mestrado). Disponível on line em: <http://www.ibot.sp.gov.br/teses/liliana2006.pdf>. (Acesso em: 10/08/2006).
- Delgado, L.F., Mello, J.I.O. and Barbedo, C.J. 2010.** Potential for regeneration and propagation from cut seeds of *Eugenia* (Myrtaceae) tropical tree species. *Seed Sci. & Technol* **38**, 624-634.
- Donadio, L.C.; Môro, F.V. & Servidone, A.A. 2002.** Frutas Brasileiras. Jaboticabal, Novos Talentos.
- Donadio, L.C. and Moro, F.V. 2004.** Potential of brazilian eugenia myrtaceae - as ornamental and as a fruit crop. *Acta Hort. (ISHS)* 632: 65-68

- Drattta, I.S.; Iaderoza, M.; Baldini, V.L.S.; Francis, F.J. 1985.** Antocianinas de ameixa (*Prunus salicina* L.) Ciência e Tecnologia de Alimentos. 5:31-38.
- Eira, M.T.S. 1996.** Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. *In: Curso Sobre Consevação De Germoplasma Vegetal*, Brasília, 1994. IICA-PROCISUR, Montevideo, p. 119-22. (IICA-PROCISUR, Diálogo, 45).
- Fahn, A. 1990.** Plant anatomy. 4th ed. Pergamon Press, New York.
- Farrant, J.M.; Pammenter, N.W.; Berjak, P. 1988.** Recalcitrance: a current assessment. *Seed Science and Technology*, Zurich,16:155-166.
- Ferreira, A. G; Aquila, M.E.A. 2000.** Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, 12: 175-204.
- Flamini, G.; Cioni, P.L. 2007.** Seasonal variation of the chemical constituents of the essential oil of *Santolina etrusca* from Italy. *Chemistry and Biodiversity*. 4:1008-1019
- Franzon, R.C.; Raseira, M.C.B. & Wagner Júnior, A. 2004.** Fenologia da floração e maturação dos frutos da uvalheira (*Eugenia pyriformis* Camb.), em Pelotas, RS. 397-402p.
- Fumagali, E.; Goncalves, R.A.C.; Machado, M. De F.P.S.; Vidoti, G.J.; Oliveira, A.B De., 2008.** Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos generos *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18 (4): 627-641.
- Funasaki, M. 2006.** Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado em Química Orgânica). São Paulo. 132p.
- Gentil, D.F.O. & Ferreira, S.A.N. 1999.** Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). *Acta Amazonica* 29: 21-31.
- Giotto, A.C.; Oliveira, S.C.C.; Silva, J.P.G. 2007.** Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. Ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). Nota Científica. *Revista Brasileira de Biociências*. Porto Alegre. 5 (2): 600-602.

- Goldenberg, R. & Shepherd, G. 1998.** Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “cerrado” vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211:13-29.
- Grant, V. 1971.** *Plant Speciation*. Ed. Columbia University Press.
- Grossniklaus, U., Koltunow, A. & Van Lookeren-Campagne, M. 1998.** A bright future for apomixis. *Trends in Plant Science* 3:415-416.
- Gurgel, J. T. A., Soubihe Sobrinho, J. 1951.** Poliembrionia em Mirtáceas. *Bragantia* 11: 141- 163.
- Hanna, W.W. 1995.** Use of apomixis in cultivar development. In: SAPRKS, D.L. *Advances in Agronomy* 56. New York: Academic Press. 333-350
- Harborne, J.B. 1988.** *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall. 288p.
- Holetz F.B., Pessini G.L., Sanches N.R., Cortez D.A., Nakamura C.V. 2002.** Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- Hong, T.D. & Ellis, R.H. 1992.** Optimum air-dry seed storage environments for arabica coffee. *Seed Science and Technology* 20: 547-560
- Hong, T.D. & Ellis, R.H. 1996.** A protocol to determine seed storage behaviour. Rome, IPGRI. (Technical Bulletin, 1). 62p.
- Johnson, L.A.S. & Briggs, B.G. 1984.** Myrtales and Myrtaceae - A phylogenetic approach. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: 700-756.
- Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães R.M. & Strassburg, R.C. 2007.** Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. *Acta bot. bras.* 21(3): 539-551.
- Juteau, F.; Masotti, V.; Bessiere, J.M.; Viano, J. 2002.** Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30: 1065–1070.
- Kermode, A.R. & Finch-Savage, B.E. 2002.** Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In* *Desiccation and survival in plants: drying without dying* (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York, 149-184 p.

- Klein, R.M. 1984.** Importância sociológica das mirtáceas nas florestas rio-grandenses..  
*In:* Anais do XXIV Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre 1990. Porto Alegre, Sociedade Botânica do Brasil. 367-375 p.
- Kliebenstein, D.J. 2004.** Secondary metabolites and plant/environment interactions: a review through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant Cell Environmental*, 27: 675-684.
- Kosar, M.; Dorman, H.J.D.; Hiltunen, 2005.** R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*,91: 525-533.
- Landrum, L.R. & Stevenson, D. 1986.** Variability of embryos in subtribe Myrtinae (Myrtaceae). *Systematic Botany* 11(1): 155-162.
- Landroum, L.R. & Kawasaki, M.L. 1997.** The genera of Myrtaceae in Brazil: na illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49(4): 508-536.
- Leitão Filho, H.F. 1993.** Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão (SP). Campinas, Editora da Universidade Estadual de Campinas.
- Lorenzi, H. 1992.** Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 352p.
- Lima, V.L.A.G de; Mélo, E. de A.; Lima, L. dos S.; Nascimento, P.P. do. 2000.** Caracterização físico-química e sensorial de pitanga roxa. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 22: 382-385.
- Lorenzi, H. 1998.** Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, v.2, Nova Odessa.
- Lorenzi, H. 2002.** Árvores brasileiras. v. 1 e 2. 4ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Lucas, E.J.; Belsham, S.R.; Nic Lughadha, E.M.; Orlovich, D.A.; Sakuragui, C.M.; Chase, M.W. & Wilson, P.G. 2005.** Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 251: 35-51.
- Lughadha, E.N. & Proença, C. 1996.** A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83: 480-503.
- Lunardi, I.; Peixoto, J.L.B.; Silva, C.C.; Shuquel, I.T.A.; Basso, E.A. & Vidotti, G.J. 2001.** Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 12(2): 180-183.

- Mahmoud, I. I.; Marzouk, M. S. A.; Moharram, F. A.; El-Gind, M. R.; Hassan, A. M. K. 2001.** Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry*. 58 (8): 1239-1244.
- Maluf, A.M.; Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J. 2003.** Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. *Scientia Agricola* 60(3): 471-475.
- Marchiori, J.N.C. & Sobral, M. 1997.** Dendrologia das Angiospermas: Myrtales. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria.
- Marcos Filho, J. 2005.** Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- Merwe, M.M.; Wyk, A.E. & Botha, A.M. 2004.** Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern Africa taxa. *Plant Systematic Evolution*. Published online: August 30, 2004.
- McVaugh, R. 1968.** The genera of American Myrtaceae, an interim report. *Taxon* 17(8): 354-418.
- Mori, S.A., Boom, B.M., Carvalino, A.M. & Santos, T.S. 1983.** Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. *Biotropica* 1: 68-70.
- Naumova, T. N. 2008.** Apomixis and Amphimixis in Flowering Plants. *Tsitologiya i Genetika*,42 (3): 53–65.
- Núñez, L., D'aquino, M., Chirife, J. 2001.** Antifungal Proprieties of Clove Oil (*Eugenia caryophyllata*) in Sugar Solution. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 123-126.
- Pammenter, N.W.; Farrant, J.M. & Berjak, P. 1984.** Recalcitrant seeds: short term storage effects in *Avicennia marina*. (Forsk.) Vierh. may be germination associated. *Annals of Botany* 54: 843-846.
- Peixoto, A.L. & Gentry, A. 1990.** Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 13: 19-25.
- Perry, N.B.; Anderson, R.E.; Brennan, N.J.; Douglas, M.H.; Heaney, McGimpsey, J.A. & Smallfiend, B.M. 1999.** Essential oils in polluted soil samples by headspace-fast gas chromatography–mass A.J.; from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among individuals, plant parts, seasons and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 2048-2054.
- Pilchersky, E, Gang, D.R. 2000.** Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Science*, 5: 439-445.

- Pires, N. M.; Oliveira, V. R. Alelopatia. In: Oliveira Jr., R. S., Pio Corrêa, M. 1984.**  
Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.
- Pott, A. & Pott, V.J. 1994.** Plantas do Pantanal. Brasília, Embrapa.
- Proenca Da Cunha, A.; Silva, A. P.; Roque, O. R. 2003.** Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Lisboa: Fundacao Calouste Gulbenkian.
- Putnam, A.R., Duke, W. D. 1974.** Biological suppression of weeds: evidence for allelopathy in accessions of cucumber. *Science Magazine*, Washington D.C., v.185, p.370-372,
- Putnam, A. R. 1985.** Weed allelopathy. In: DUKE, S. D. *Weed Physiology*. Boca Raton, CRC Press. 131-155.
- Raven, P. H.; R. F. Evert & S. E. Eichhorn. 2001.** *Biologia Vegetal*, 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 906 pp.
- Reigosa, M.J.; Sánchez-Moreiras, A. & González, L. 1999.** Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18(5): 577-608.
- Rezende, C. P.; Pinto, J. C.; Evangelista, A. R.; Santos, I. P. A. 2003.** Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. Ed. UFLA.
- Rice, E. L. 1974.** Allelopathy. New York: Academic Press, 353 p.
- Rice-Evans, C.A.; Packer, L. 2003.** Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker, Inc. New York. 468p.,
- Richards, A.J. 1997.** Plant breeding system. 2nd ed. George Allen & Unwin, London.
- Rizzini, C. T. 1970.** Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* D.C. *Revista Brasileira de Biologia*, 30 (3): 381-402.
- Rizvi, S.J.H., Haque, H., Singh, V.K. & Rizvi, V. 1992.** A discipline called allelopathy. In: S.J.H. Rizvi & V. Rizvi (eds.). *Allelopathy: basic and applied aspects*. Chapman & Hall, London, pp. 1-10.
- Roberts, E.H. 1973.** Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Rodrigues, R.R. & Nave, A.G. 2000.** Heterogeneidade florística das matas ciliares.. In: R.R. Rodrigues & H.F. Leitão Filho (eds.). *Matas ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo, Edusp/Fapesp. 45-71 p.
- Russo, F.; Starrantino, P. 1975.** Studies on the heritability of polyembryony in *Citrus*. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura*, Acireale, 5: 51-67.

- Scalbert, A.; Williamson, G. 2000.** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutritional*, 130: 2073-2085.
- Schmeda-Hirschmann, G.; Theodoluz, C.; Franco, L.; Ferro, E. & Arias, A.R. 1987.** Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora*: xantina oxidase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 21: 183-186.
- Shahidi, F.; Naczk, M. 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals.** New York: CRC Press, 365p.
- Silva, C. V., Bilia, D. A. C., Barbedo, C. J. 2005.** *Revista Brasileira de Sementes* 27: 86-92.
- Silva, C.V.; Bilia, D.A.C.; Maluf, A.M. & Barbedo, C.J. 2003.** Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambesss. - Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26(2): 231-221.
- Silva, D.B.; Silva, J.A.; Junqueira, N.T.V. & Andrade, L.R.M. 2001.** Frutas do Cerrado. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica.
- Sokmen, A.; Gulluce, M.; Akpulat, H.A.; Daferera, D.; Tepe, B.; Polissiou, M.; Sokmen, M.; Sahin, F. 2004.** The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15 (8): 627-634.
- Souza Filho, A. P. S.; Alves, S. M.; Dutra, S. 2002.** Estádio de desenvolvimento e estresse hídrico e as potencialidades alelopáticas do capim-marandu. *Planta Daninha, Viçosa*, 20(1): 25-31.
- Souza, L.A. 2003.** Morfologia e Anatomia Vegetal: células, tecidos, órgãos e plântula. Editora UEPG,
- Souza, L.M.; Canini, G.B.; Aires, S.S.; Borghetti, F. 2007.** Efeito alelopático de quatro espécies do Cerrado sobre crescimento do gergelim. *Nota Científica. Revista Brasileira de Biociências. Porto Alegre.* 5(2): 540-542.
- Stebbins, G.L. 1950.** *Variation and Evolution in Plants.* Ed. Columbia University Press.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2009.** *Fisiologia Vegetal.* 4a ed. Artmed, Porto Alegre,
- Teixeira, C. 2009.** Regeneração de embriões em sementes fracionadas de espécies brasileiras de *Eugenia*: influencia do estágio de maturação, do armazenamento e fase de germinação. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita-Filho", Botucatu



- Theodoluz, C.; Franco, L.; Ferro, E. & Schmeda-Hirschmann, G. 1988.** Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 24: 179-183.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1983.** An embryological analysis of Myrtales: its definition and characteristics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70: 71-94.
- Van Baarlen, P., Verduijn, M. & Van Dijk, P.J. 1999.** What can we learn from natural apomitics? *Trends in Plant Science* 4:43-44.
- Vyvyan, J.R. 2002.** Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58: 1631-1646.
- Wang, L.; Zhang, H. 2005.** A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin. *Bioorganic Chemistry*, 33: 108-115.
- Walters, C. 2000.** Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia* 12(especial): 7- 21.
- Wilson, G.W.; O'Brien, M.M.; Gadek, P.A. & Quinn, C.J.2001.** Myrtaceae revisited: A reassessment of intrafamilial groups. *American Journal of Botany* 88(11): 2013-2025.
- Whittaker, R. H.; Feeny, P.P. 1971.** Allelochemis: chemical interation between plants and insects. *Science, New York*, 171: 757-770.