



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS DE BOTUCATU

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

**RELAÇÃO ENTRE O PERFIL METABÓLICO DA SEMENTE DE
Eugenia pyriformis E SUA CAPACIDADE DE REGENERAR NOVAS
PLÂNTULAS**

CARMEN CINIRA TEIXEIRA

**Tese de doutorado apresentada ao Instituto
de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de Doutora
em Ciências Biológicas (Botânica), AC:
Fisiologia Vegetal.**

BOTUCATU - SP

- 2014 -

Instituto de Biociências – Departamento de Botânica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6265/6053 fax 14 3815 3744 botanica@ibb.unesp.br



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**RELAÇÃO ENTRE O PERFIL METABÓLICO DA SEMENTE DE
Eugenia pyriformis E SUA CAPACIDADE DE REGENERAR NOVAS
PLÂNTULAS**

**CARMEN CINIRA TEIXEIRA
ORIENTADOR CLAUDIO JOSÉ BARBEDO
CO- ORIENTAÇÃO DANILO DA CRUZ CENTENO**

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU - SP

- 2014 -

"Uma árvore em flor fica despida no outono. A beleza transforma-se em feiura, a juventude em velhice e o erro em virtude. Nada fica sempre igual e nada existe realmente. Portanto, as aparências e o vazio existem simultaneamente."

Dalai Lama

DEDICO

A minha nova família: meu querido Ian e aos meus filhos Davi e Tomás, os quais são a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa cedida a mim e pelo auxílio financeiro;

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 do GC/MS;

Ao meu querido Orientador Claudio José Barbedo, pela orientação exemplar, amigo e profissional muito competente;

Ao Co-Orientador e amigo Danilo Centeno por me oferecer novos conhecimentos;

Aos dirigentes, diretores e coordenadores da escola Maria Theodora que gentilmente permitiram participar de disciplina em semana de aula na escola.

Ao diretor Ricardo da escola José Liberatti por me conceder alguns dias para cumprir disciplina em Botucatu e a secretária Rosângela por sempre estar disposta em ajudar com documentação e amizade.

Aos meus pais Francisco e Cleuza, pela real dedicação à minha educação, apoio financeiro, apoio em sempre me ajudar na hora de cuidar de meus filhos para eu estudar e seguir com as pesquisas, amor, confiança me dada desde o momento que iniciei a jornada;

Aos meus queridos amores (filhos) Davi e Tomás que me inspiraram e me estimularam a nunca desistir;

Ao meu amor Ian, que com muita paciência me ajudou em todo o processo de tese e me ajudou na bibliografia.

A minha sogra Margareth que por muitas vezes ficou com os meninos para eu terminar a tese.

Aos meus queridos amigos João e Poliana que tornaram minha tese possível;

Aos meus amigos de laboratório Lamarca, Cibele, Marcio e Juliana que sempre me ajudaram, nas pesquisas;

Aos amigos Ludimila, Cabral, Kely, Vanessa e Marina que me ajudaram no laboratório de fisiologia com os equipamentos.

Ao Oda pelas correções de inglês.

A Dra. Silvia Machado Rodrigues Machado que tornou minha bolsa possível e também foi uma grande amiga em momentos difíceis;

Aos professores da pós-graduação Mingo, Carmen Marcati, Carmen Boaro, Beth, Gisela e Tatiana, os quais foram de grande importância para compreensão de todo o desenvolvimento intelectual;

A Marilia do laboratório de fisiologia que foi muito gentil em permitir o uso dos equipamentos e materiais de laboratório;

As pesquisadoras Adriana, Agnes e Edenise que permitiram o uso do laboratório de anatomia.

A Gentil Débora Molizane que forneceu ilustração e sempre me ajudou;

Aos amigos que me alojaram e foram hospitaleiros em Botucatu, Juliana, Thais, Bruno, Jaqueline, Marcela e Talita;

A Soninha, babá dos meus filhos que muito me ajudou em passar do seu horário para ficar com meus filhos para eu conseguir concluir os meus dados.

Aos novos amigos Marcos, Edgar que fiz em Botucatu e que foram muito bacanas na troca de ideias sobre pesquisas;

As minhas queridas amigas Marina, Carol, Ju e Lilian que sempre me apoiaram.

Aos meus novos amigos da escola Maria Theodora, Alessandra, Agnes, Edson, Claudia e Juliana pelo apoio e incentivo.

Aos meus alunos pela torcida em especial ao aluno Anderson que me deu auxílios de informática.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	1
2. Revisão Literária.....	4
2.1. A espécie	4
2.2. Germinação	6
2.3. Regeneração de plântulas em sementes de <i>Eugenia</i>	9
2.4. Mecanismos potencialmente envolvidos na regeneração de tecidos em sementes	11
3. Regenerabilidade de sementes de <i>Eugenia pyriformis</i> em função do número de sementes por fruto	14
4. Capacidade regenerativa de sementes de <i>Eugenia pyriformis</i> e modificações no metabolismo	25
5. Considerações Finais	54
6. Referências Bibliográficas de Introdução, Revisão Literária e Considerações Finais	57

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Myrtaceae, com 131 gêneros e cerca de 4.620 espécies (Angiosperm Phylogeny Group 2010), está distribuída principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade na América tropical e Austrália e poucas espécies ocorrendo nas regiões temperadas (Barroso 1984). Suas árvores e arbustos podem ser utilizados de forma ornamental ou na produção comercial de frutos, mas o número de trabalhos científicos com esta família é ainda reduzido, entre outros fatores, em função da sua complexidade taxonômica (Kawasaki 1984).

Myrtaceae é uma família ecologicamente importante na Mata Atlântica (Mori et al. 1983) e representa o maior número de espécies na restinga do Brasil (Araújo e Henriques 1984, Lemos et al. 2001, Assis et al. 2004). As mirtáceas brasileiras compreendem diversos gêneros de árvores e arbustos que podem ser utilizados de forma ornamental ou na produção comercial de frutos. Além das popularmente conhecidas goiabeira (*Psidium guajava* L.) e jabuticabeira (*Plinia cauliflora* (DC.) Kausel), outras espécies podem ser potencialmente utilizadas na fruticultura, devido à qualidade de suas frutas e adaptação a algumas condições de clima subtropical (Donadio e Moro 2004). Dentro desta família, nas florestas tropicais e subtropicais do Brasil há espécies de grande importância tanto econômica quanto ecológica, como as do gênero *Eugenia* (Gressler et al. 2006, Romagnolo e Souza 2006). Diversas espécies desse gênero 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. Há, também, relatos de espécies de *Eugenia* com potencial medicinal (Schmeda-Hirschmann et al. 1987, Theoduloz et al. 1988). Essas espécies são importantes, ainda, na recuperação de áreas degradadas, pois produzem frutos atrativos para a fauna (Andrade e Ferreira 2000, Lorenzi 2002).

Eugenia, com cerca de 1.000 espécies, é um dos gêneros mais representativos de Myrtaceae (Merwe et al. 2005) e inclui espécies com frutos carnosos (Lughadha e Proença 1996). É bem representado nas diversas formações vegetais quanto a riqueza, abundância e frequência de suas espécies (Klein 1990, Peixoto e Gentry 1990, Leitão Filho 1993, Barroso e Perón 1994, Rodrigues e Nave 2000, Silva et al. 2003). Muitas dessas espécies são ricas em óleos essenciais e taninos, frequentemente utilizados na medicina popular (Pio Corrêa 1984, Neves e Donato 1989, Pott e Pott 1994, Lunardi et al. 2001). São também fornecedoras de frutos comestíveis, podendo-se destacar *E.*

involuta DC (cerejeira do mato), *E. pyriformis* Cambess. (uvaieira) e *E. uniflora* L. (pitangueira), que são apreciadas tanto pelo homem como pela fauna silvestre (Pott e Pott 1994, Marchiori e Sobral 1997).

As espécies do gênero *Eugenia*, porém, tal qual ocorre com a grande variedade de árvores frutíferas nativas do Brasil, são ainda pouco estudadas, apesar de seu potencial de aproveitamento e exploração. Um dos aspectos que necessitam mais estudos é a implantação de pomares comerciais. Estes, por sua vez, dependem do desenvolvimento de tecnologia que permita maximizar a utilização das sementes produzidas que, em *Eugenia*, frequentemente são em quantidades pequenas.

A produção de sementes é importante para a espécie em seu ecossistema, pela formação de bancos no solo, pela dispersão e pela sua sobrevivência. O embrião e as estruturas que o rodeiam, que constituem a unidade de dispersão (semente ou diásporo), encontram-se estrutural e fisiologicamente preparados para desempenhar seu papel, com reserva alimentar capaz de sustentar o crescimento da plântula até que esta se estabeleça como um organismo autotrófico. Contudo, o sucesso do estabelecimento deste novo indivíduo é determinado, também, por fatores fisiológicos e bioquímicos da semente (Bewley e Black 1994, Bewley 1997, Beltrati e Paoli 2003, Zamith e Scarano 2004).

Segundo Barroso (2002), o embrião no gênero *Eugenia* é globoso, sem diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones. Alguns autores consideram o embrião conferruminado, ou seja, sem distinção da linha de soldadura entre os cotilédones, mas outros afirmam que não há diferenciação entre o eixo embrionário e os cotilédones (Andrade e Ferreira 2000, Lucas et al. 2005). Contudo, Justo et al. (2007) verificaram que, embora o embrião de *Eugenia pyriformis* seja maciço, globoso e preencha todo o espaço delimitado pelo tegumento, é possível identificar o eixo embrionário, que tem menos de 1,0 mm de comprimento. Tais características demonstram, ainda, que sementes de *E. pyriformis* são monoembriônicas.

Sementes de espécies de *Eugenia* têm potencial para regenerar novas raízes e até plantas inteiras mesmo quando parte de sua massa é removida, o que raramente ocorre em sementes monoembriônicas. Tecnicamente, essa característica pode ser usada para ampliar o potencial de produção de mudas, conforme demonstrado em trabalhos de fracionamento de sementes (Silva et al. 2003, 2005). Como há pouca produção de sementes por fruto no gênero *Eugenia*, tal característica é interessante pois pode permitir a produção de um número maior de mudas a partir de um mesmo lote de sementes. Contudo, fisiologicamente há importantes lacunas no conhecimento relativo à

essa regeneração. Estudos mostram, por exemplo, que quando as sementes não são fracionadas, a germinação nunca é superior a 100%. Isso pode indicar que a regeneração de um segundo embrião em uma mesma semente só ocorra quando a mesma é fracionada (Silva et al. 2003, 2005), sugerindo existirem mecanismos de indução e/ou de inibição decorrentes do corte e da germinação. Essa hipótese é reforçada pela presença de substâncias inibidoras da germinação nas sementes de *Eugenia*, como verificado em *E. dysenterica* (Rizzini 1970) e em *E. uniflora* (Delgado e Barbedo 2011), o que poderia impedir a germinação ou, até, a diferenciação de um segundo embrião. Diante dos resultados dos trabalhos desenvolvidos até o presente, há necessidade de se compreender o metabolismo da semente fracionada e se este está relacionado com o não desenvolvimento de uma segunda plântula em uma mesma fração de semente. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar a histoquímica dos metabólitos produzidos após o fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia pyriformis* e estabelecer as possíveis relações de estímulo e inibição do desenvolvimento de uma segunda plântula a partir de uma semente fracionada. Para tanto, inicialmente analisou-se a relação entre a capacidade regenerativa das sementes e seu tamanho, incluindo-se sua procedência (quantidade de sementes por fruto), pois a presença e migração de promotores/inibidores da germinação pode depender da distância entre fonte e local de ação. Posteriormente, analisaram-se as alterações no perfil metabólico das sementes em repouso, em germinação e fracionadas, procurando-se identificar padrões que demonstrem a influência do corte, como agente estimulante, e da germinação, como inibidor, da formação de novas raízes e plântulas.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1. A espécie

Eugenia pyriformis (uvaia) é 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). Possui copa alongada formada pela folhagem serícea associada às abundantes flores brancas e frutos grandes de cor amarela ou alaranjada (figura 1), formando um conjunto muito atraente (Reitz et al. 1988). É espécie altamente valiosa pela sua madeira dura, resistência a doenças e produção de frutos comestíveis, apreciados pelo homem e pela avifauna e úteis à industrialização na produção de licor e outros produtos (Mattos 1956). 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, as sementes são menores quando mais numerosas (Justo et al. 2007). Variadas propriedades medicinais, alimentícias ou cosméticas foram comprovadas cientificamente para essa espécie (Apel et al. 2004, Oliveira et al. 2010, Stefanello et al. 2011). A uvaieira conta com considerável volume de registros, não apenas científicos, demonstrando sua ampla utilização para as mais variadas finalidades (figura 2), como a de sua madeira como fonte de energia, seu valor apícola e, principalmente, seu uso alimentar (Pegararo e Ziller 2003, Siviero et al. 2011, Lamarca et al. 2013). Nas folhas de *E. pyriformis*, há flavonóides com propriedades inibidoras da xantino-oxidase, atuando no tratamento da gota humana (Schmeda-Hirschmann et al. 1987, Theoduloz et al. 1988).

Não bastasse toda essa riqueza de informações associada à espécie, a uvaieira apresenta-se, também, como interessante modelo para estudos fisiológicos, visto que suas sementes apresentam características raramente descritas na literatura, tais como o potencial de regeneração de embriões (Silva et al. 2003, Delgado et al. 2010, Amador e Barbedo 2011, Teixeira e Barbedo 2012).

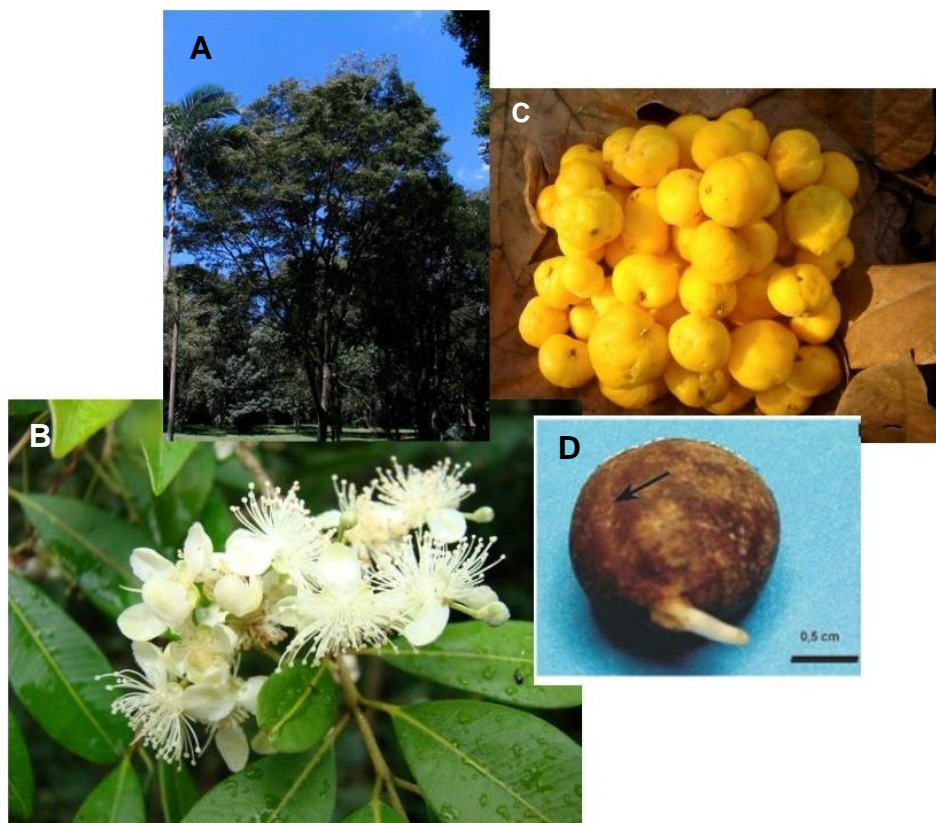


Figura 1. Características gerais de *Eugenia pyriformis*. A. Árvore; B. Flores; C. Frutos; D. Semente germinada (seta indica cicatriz rafeal).

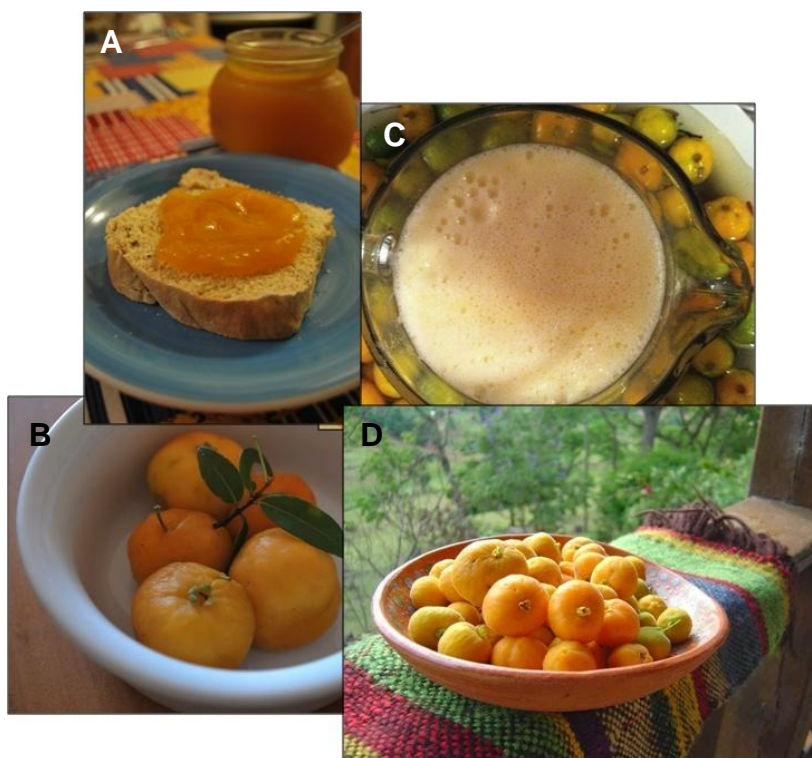


Figura 2. Diferentes formas de utilização de frutos de *Eugenia pyriformis* para consumo humano. A. geléias; B e D. in natura; C. sucos.

As sementes de *E. pyriformis* são intolerantes à dessecação. Dispersas com elevado teor de água e em intensa respiração, suportam armazenamento em câmara fria apenas por alguns meses (Delgado e Barbedo 2007). Estudos sugerem que a elevada atividade respiratória, o metabolismo desordenado e a baixa proteção às espécies reativas de oxigênio e ao ataque de radicais livres nos sistemas de membranas estão entre os principais eventos que envolvem a rápida deterioração de sementes intolerantes à dessecação, dificultando seu armazenamento (Pammenter et al. 1994, Barbedo e Marcos Filho 1998, Leprince et al. 1999, Chappell Jr. e Cohn 2011).

2.2. Germinação

O conhecimento das condições adequadas para a germinação de sementes de uma espécie é de fundamental importância, principalmente pelas respostas diferenciadas que ela pode apresentar. Diversos fatores, como dormência, condições ambientais (água, luz, temperatura e oxigênio) e ocorrência de agentes patogênicos, associados ao tipo de substrato, podem afetar a germinação (Popinigis 1985, Brasil 1992, Carvalho e Nakagawa 2000). Essas condições são, ainda, dependentes de diversas características fisiológicas das sementes, as quais podem variar entre e dentro da espécie como respostas adaptativas, tais como os limites térmicos para a germinação (Daws et al. 2004, Martins et al. 2009, Lamarca et al. 2011, Mattana et al. 2012).

O conhecimento dos principais processos envolvidos na germinação de sementes de espécies florestais nativas é de vital importância, não apenas no que se refere à preservação das comunidades vegetais, mas no que tange às pesquisas relacionadas à conservação genética e aos estudos que visam à propagação das espécies, tanto em intentos paisagísticos, como em projetos de reflorestamento (Smiderle e Souza 2003).

Além disso, os diversos métodos e procedimentos utilizados para a avaliação da qualidade de sementes se baseiam na análise dos componentes da qualidade de uma amostra representativa que retrata o perfil de determinado lote. O teste mais tradicionalmente utilizado para a avaliação da qualidade de lotes de sementes é o teste de germinação (Oliveira 2004).

A disponibilidade de água, a temperatura e o oxigênio são considerados essenciais e exercem influência direta sobre a germinação (Marcos Filho 2005). A luz é necessária para a germinação de sementes de algumas espécies, logo a classificação das

sementes quanto à sensibilidade à luz torna-se então evidente para a condução dos testes de germinação (Brasil 1992).

As sementes apresentam comportamento variável quanto à temperatura de germinação, não havendo uma temperatura ótima e uniforme para todas as espécies. É considerada ótima a temperatura na qual a semente expressa seu potencial máximo de germinação; as temperaturas máxima e mínima são os pontos críticos nos quais, respectivamente, acima e abaixo, não ocorre germinação (Mayer e Poljakoff-Mayber 1980, Popinigis 1985). Um grande número de espécies apresenta uma reação germinativa favorável a uma alternância de temperatura, à semelhança do que acontece no ambiente natural, no qual as temperaturas diurnas são mais altas que as noturnas (Medeiros 2001).

Bewley e Black (1994) sugeriram três etapas principais durante a germinação: embebição, ativação do metabolismo e indução do crescimento com protrusão da raiz primária. Com a embebição de água pelos tecidos da semente, seguida da retomada das atividades metabólicas, há síntese de novas enzimas e do aumento de atividades das hidrolases pré-existentes, visando à mobilização dos compostos de reserva para a retomada de crescimento do eixo embrionário (Sales 2002). No início da embebição, a entrada de água na semente é regulada pela diferença entre o potencial hídrico desta e o meio. Com a entrada de água nas células, há aumento na pressão hidrostática que conduz à expansão celular, fundamental para a germinação. Esta, para a maioria das sementes ortodoxas, ocorre segundo um padrão trifásico (Bewley e Black 1994). A primeira fase (Fase I) é rápida, durando de uma a duas horas, e é caracterizada pela absorção de água, que ocorre ainda que a semente esteja dormente (excluindo-se a impermeabilidade do tegumento à água) ou inviável. Na fase II, relativamente mais extensa que a anterior, o potencial hídrico da solução é próximo ao do embrião, permitindo que as sementes ativem inúmeros eventos do processo germinativo, sem que ocorra a protrusão da raiz primária. Para completar a germinação é requerida absorção de água adicional para iniciar a fase III (Bewley e Black 1994, Daws et al. 2004).

A hidratação dos tecidos durante a embebição promove, dentre outro eventos, reorganização de organelas e membranas, aumento na atividade respiratória, síntese e consumo de ATP, síntese de proteínas e de mRNAs, síntese e ativação de várias enzimas, resultando na mobilização de reservas (Castro et al. 2004). Porém, a mobilização intensa das reservas e o crescimento e desenvolvimento do embrião e da nova plântula começam somente quando a germinação termina, durante o processo

chamado de pós-germinação (Bewley e Black 1994).

A respiração, a ativação de enzimas e de organelas celulares e a síntese de proteínas são importantes para processo de germinação. A protrusão da raiz primária, que indica a complementação do processo de germinação, pode resultar tanto na divisão como no alongamento celular (Marcos Filho 2005). Uma vez que ocorra o desenvolvimento de uma plântula, esta pode ser afetada por alguns fatores como quantidade e qualidade das reservas das sementes, morfologia funcional dos cotilédones, fatores abióticos e interações com outras espécies (Melo et al. 2004).

A sacarose é o açúcar de reserva mais abundante e universal das plantas, devido à sua estabilidade estrutural e solubilidade em água, que o fazem ser o principal carboidrato translocável nas plantas (Dietrich et al. 1988). Nos órgão de reserva das plantas normalmente se encontram oligossacarídeos, rafinose e estaquiase. Estes açúcares, assim como a sacarose, atuam como compostos de reserva de rápida disponibilidade para a planta, como pode ser observado no processo de germinação, no qual a rafinose é um dos primeiros compostos metabolizados (Bewley e Black 1985).

Sementes viáveis podem não germinar não apenas por não receberem condições adequadas mas, também, por poderem se encontrar em estágio de dormência. Os processos de ativação da germinação e/ou da dormência são regulados, entre outros fatores, por hormônios e reguladores vegetais.

Há reguladores vegetais envolvidos no processo da germinação, como as citocininas que têm a capacidade de promover a germinação em algumas espécies (Metivier 1986) e estimulam a divisão celular (Taiz e Zeiger 2006), apresentando ação contrária à dos inibidores. São substâncias essenciais para complementar a ação das giberelinas na indução da germinação e de processos enzimáticos, quando estes são bloqueados por inibidores (Fraga 1982). De acordo com Bewley e Black (1986), a presença de hormônios na semente está relacionada com o crescimento do embrião. Dentre os hormônios presentes nas sementes, os de mais amplo espectro de atuação são os do grupo das giberelinas. As giberelinas possuem efeito estimulatório no processo germinativo quando aplicadas em sementes com dormência e também em não dormentes. As sementes podem necessitar giberelinas para uma série de eventos: ativação do crescimento vegetativo do embrião, mobilização das reservas do endosperma e no enfraquecimento da camada de endosperma que circunda o embrião, favorecendo assim a protrusão da radícula (Taiz e Zeiger 1991). A ação das giberelinas (GAs) ou dos ácidos giberélicos no processo germinativo é bem conhecido (Metivier

1979), atuando no controle da hidrólise do tecido de reserva para o fornecimento de energia ao embrião, promovendo, de acordo com Salisbury e Ross (1992) o alongamento celular, fazendo a radícula se desenvolver através do endosperma ou tegumento.

Weaver (1987) relata que a dormência pode ser resultado do balanço hormonal entre promotores e inibidores de crescimento. Da mesma forma, Bryant (1989) e Kigel e Galili (1995) concordam que a quebra de dormência pode ser realizada pela mudança no balanço hormonal e que o ácido giberélico atua na promoção da germinação. Em sementes de cereais, as giberelinas ativam a síntese de enzimas que irão hidrolisar as reservas da semente, liberando energia para o crescimento do embrião (Taiz e Zeiger 1991). Além disso, aumentam o alongamento celular, fazendo com que a radícula e a parte aérea possam se desenvolver (Salisbury e Ross 1992).

O ácido abscísico é um fitormônio presente em praticamente todas as plantas vasculares, também sendo encontrado em algumas briófitas, algumas algas verdes e fungos, mas não em bactérias. Seu efeito está na indução da abscisão de frutos de algodoeiro, inibição do crescimento e na abertura dos estômatos, principalmente quando a planta está em condições de estresse hídrico. Contudo, atua também regulando a maturação e dormência em sementes (Taiz e Zeiger 2006). Sabe-se que o ABA previne a degradação das proteínas de reserva em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Garcarrubio et al. 1997). A presença do ABA retarda a degradação de proteínas de armazenamento no endosperma, diminui a atividade da α -galactosidase durante a degradação do galactomanano, sugerindo que o ABA pode inibir a ação enzimática e modular interações bioquímicas e fisiológicas entre o endosperma e o embrião durante e após a germinação de sementes (Bewley e Black 1994, Buckeridge et al. 2000a, Potomati e Buckeridge 2002, Tonini et al. 2010).

2.3. Regeneração de plântulas em sementes de *Eugenia*

Algumas espécies de Myrtaceae apresentam sementes poliembriônicas. Assim, os primeiros resultados com regeneração de plântulas a partir de sementes fracionadas de *Eugenia* poderiam estar relacionados com a presença de mais de um embrião em cada semente (Silva et al. 2003). Contudo, Gurgel et al. (1951) verificaram, pela contagem dos embriões por processo direto, que sementes de diversas espécies de *Eugenia*, como pitanga, uvaia e cereja do Rio Grande, são monoembriônicas. Posteriormente, Justo (2007) identificou o eixo embrionário de *E. pyriformis*, que não é

visto a olho nu, mas com auxílio de uma lupa de pequeno aumento é possível identificar o pólo embrionário em uma das extremidades da cicatriz rafeal na superfície dos cotilédones.

A identificação de sementes por meio de características morfológicas e anatômicas é importante na sistemática e taxonomia (Esau 1965), no entendimento da fisiologia, em paleobotânica, arqueologia, fitopatologia, em análises na agricultura e horticultura, bem como no estudo de comunidades vegetais (Silva e Paoli 2000). Esta grande diversidade de características morfológicas e anatômicas tem atraído a atenção de muitos pesquisadores (Nikolaeva 2004). Contudo ainda são necessárias análises que tratam de anatomia de sementes. Além disso, a maioria dos estudos sobre a composição química das sementes é realizada em espécies cultivadas, pois elas são utilizadas para nossa alimentação e também como matéria-prima em indústrias (Bewley e Black 1994), sendo raros em espécies florestais.

Os estudos morfológicos auxiliam a identificação botânica da espécie, a interpretação dos testes de laboratório e o reconhecimento da espécie em bancos de sementes do solo e em fase de plântulas em formações florestais. Estas análises contribuem para o estudo dos mecanismos de dispersão, sucessão e regeneração natural da espécie (Melo et al. 2004).

Características das sementes do gênero *Eugenia* sugerem a presença de tecidos meristemáticos capazes de novas diferenciações, inclusive em novos embriões (Delgado et al. 2010). De fato, sementes de *Eugenia stipitata*, quando fracionadas em corte transversal, mostraram potencial regenerativo, ou seja, nas metades que permaneceram com a zona meristemática obteve-se 89% de germinação e, ainda, 20% nas metades opostas à zona meristemática, o que totalizaria 109% de germinação (Anjos e Ferraz 1999). A 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 e Vinogradova 2007). Em sementes de *Eugenia pyriformis* fracionadas, longitudinal e transversalmente em duas e quatro partes, verificou-se elevada porcentagem de germinação e desenvolvimento de plântulas (Silva et al. 2003). Também em sementes de cereja, pitanga e grumixama cortadas ao meio, verificou-se que sementes contendo pelo menos a metade do hilo mantêm a capacidade regenerativa e podem produzir plântulas normais (Silva et al. 2005). Alguns trabalhos foram desenvolvidos analisando-se essa capacidade regenerativa das sementes de

diversas espécies de *Eugenia* (Anjos e Ferraz 1999, Silva et al. 2003, 2005, Delgado et al. 2010, Amador e Barbedo 2011, Teixeira e Barbedo 2012), demonstrando: 1) que tal capacidade pode ser comum ao gênero; 2) que pode ser uma adaptação ecologicamente importante como mecanismo de garantir sucessivas germinações ao longo do tempo ou a resistir ao ataque de insetos; 3) que está presente durante um longo período, desde sementes ainda imaturas até sementes que iniciaram a germinação e 4) que está sob influência de algum sistema envolvendo estímulo ou inibição, ou ambos. Os fracionamentos aplicados às sementes de *Eugenia*, nesses trabalhos, podem ser considerados como desencadeadores de processos de estresse, o que poderia contribuir para a produção de substâncias estimuladoras da regeneração. Por outro lado, a própria germinação poderia desencadear processos metabólicos inibidores de novas germinações. 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). Contudo, no caso da capacidade de regeneração de embriões em *Eugenia*, embora a literatura contemple uma razoável quantidade de resultados, os mecanismos envolvidos no controle da regeneração ainda não estão elucidados.

2.4. Mecanismos potencialmente envolvidos na regeneração de tecidos em sementes

Várias pesquisas constataram que estresses bióticos ou abióticos levam a alterações no padrão de expressão de proteínas das plantas, podendo ocorrer tanto a inibição quanto a indução da biossíntese de determinados constituintes proteicos. Green e Ryan (1972), por exemplo, verificaram que há indução de inibidores de proteinases em tomate como um mecanismo possível de defesa contra insetos. Há algumas reações e alguns compostos químicos reconhecidos como potenciais indutores ou inibidores de processos fisiológicos em tecidos vivos, alguns dos quais poderiam estar relacionados com os processos de inibição ou indução da regeneração de raízes e plântulas em sementes de espécies de *Eugenia*.

O O_2 é pouco reativo, mas tem a capacidade de originar estados excitados reativos como radicais livres e derivados (Scandalios 1993). Com dois átomos de oxigênio, o O_2 é completamente reduzido por quatro elétrons transportados ao longo da cadeia respiratória, gerando duas moléculas de água. No entanto, uma pequena parcela dos elétrons escapa da cadeia respiratória, resultando em uma redução parcial do

oxigênio molecular, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na forma de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e ânion superóxido (O_2^-) (Mittler 2002, Barreiros et al. 2006).

Sob condições adequadas de desenvolvimento, a produção de ERO na célula é baixa, enquanto muitos estresses que alteram a homeostase celular acentuam a sua produção. Algumas ERO são classificadas como radicais livres por apresentarem elétrons desemparelhados na sua estrutura, fazendo com que reajam avidamente com moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídeos, podendo alterar suas funções. O efeito final gerado depende não só do compartimento que está sendo afetado, mas do tipo de ERO que está reagindo (Droge 2002).

Os radicais livres podem reagir com peróxidos de hidrogênio, produzindo oxigênio singleto e radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), tóxicos às células (Hendry 1993) e capazes de danificar constituintes celulares, tais como, proteínas, DNAs e membranas (Hoekstra et al. 1996). O óxido nítrico (NO) e as ERO são moléculas que atuam nas respostas das plantas aos vários estresses ambientais, tais como hídrico, temperatura, ultravioleta, e ozônio (Zago et al. 2006) e estresse biótico (Delledonne et al. 2001), mas também estão envolvidos em processos de desenvolvimento como a germinação de sementes (Neill et al. 2008).

Antioxidantes são considerados como compostos que são capazes de adiar, retardar ou impedir processos de oxidação. Eles podem interferir com a oxidação por reação com radicais livres, quelantes de metais e também atuando como sequestrador de oxigênio (Torres et al. 2002). As enzimas superóxido-dismutase, peroxidases e catalases estão envolvidas na remoção de radicais livres durante o processo de deterioração das sementes (Menezes 2005). As enzimas antioxidantes contribuem na resposta de plantas ao estresse. Enzimas como a esterase e a glicose-6-fosfato desidrogenase estão envolvidas no processo respiratório das sementes, podendo ser utilizadas como marcadores da qualidade fisiológica dessas. Também as enzimas superóxido-dismutase, peroxidases e catalases estão envolvidas na remoção de radicais livres durante o processo de deterioração das sementes (Menezes 2005).

Há duas rotas metabólicas que sintetizam compostos fenólicos, a rota do ácido chiquimico e a rota do ácido malônico. A planta produz uma variedade de produtos secundários que contêm um grupo fenol, um grupo hidroxila em um anel aromático, formando os compostos fenólicos (Taiz 2004). A classe mais abundante de composto fenólico secundário em plantas é a fenilalanina: elimina-se uma molécula e forma-se o

ácido cinâmico, e tal reação é catalisada pela enzima PAL - fenilalanina amonialiase (Taiz 2004). As injúrias causadas à planta, seja por efeito mecânico ou estresse, aumentam a atividade da enzima PAL, enzima chave do metabolismo de fenólicos, levando, portanto, à elevação da concentração desses compostos na planta, aumentando a produção de etileno, por elevação da atividade da ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) sintetase (Rodrigues e Ono 2001). Maciel et al. (1992) mostraram, em seu trabalho com sementes florestais, que a inibição promovida pelos fenóis é variável de acordo com sua localização na semente. Henderson e Nitsch (1962) concluíram que estes constituintes podem atuar como ativadores ou como inibidores do sistema enzimático, favorecendo ou não a atividade de auxina, influenciando, conseqüentemente, o crescimento da plântula. Nessa mesma linha, Zenk e Muller (1963) analisaram a ação de vários compostos fenólicos sobre o sistema enzimático AIA-oxidase e constataram efeitos sinérgicos com os ácidos clorogênico, caféico, diidrocaféico e sinápico, os quais atuaram para a manutenção do nível endógeno de auxina. Assim, os efeitos dos ácidos fenólicos podem ser observados nos processos biológicos das sementes, como demonstrado por Lodhi (1982) que, testando uma mistura equimolar destes compostos, encontrou supressão na germinação de sementes de *Kochia scoparia*. Também Einhellig et al. (1982) demonstraram efeitos sinérgicos de fenóis no alongamento da radícula, crescimento de plântulas e germinação de sementes.

Etileno é um fitohormônio que atua na forma gasosa (C₂H₄), é um potente regulador de crescimento, afetando vários processos do desenvolvimento das plantas, como crescimento, diferenciação e senescência (Kader 1985, Smalle e Van Der Straeten 1997). O etileno é produzido em qualquer parte dos vegetais superiores, dependendo do tipo de tecido e estágio de desenvolvimento. O aminoácido metionina é precursor do etileno e o ACC converte a metionina em etileno (Taiz 2004). A produção de etileno pelas sementes começa imediatamente após o início da embebição de água e aumenta com o tempo; entretanto o padrão da produção de etileno pelas sementes durante a germinação varia entre as espécies. Por exemplo, Takayanagi e Harrington (1971) encontraram somente um pico de produção de etileno durante a germinação de sementes de canola, coincidindo com a emergência e a alongação da radícula, a expansão do cotilédone e a ruptura da testa. Em sementes de aveia, a produção de etileno se inicia antes da emissão da radícula e gradualmente aumenta a medida que o embrião retoma o crescimento (Meheriuck e Spencer 1964).

3. ARTIGO CIENTÍFICO I

REGENERABILIDADE DE SEMENTES DE *Eugenia pyriformis* EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE SEMENTES POR FRUTO

Carmen Cinira Teixeira, Juliana Sakagawa Prativiera, Claudio José Barbedo

3. TEIXEIRA C.C. – REGENERABILIDADE DE SEMENTES DE *Eugenia pyriformis* EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE SEMENTES POR FRUTO 2014. 78p. TESE (DOUTORADO) - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO – O sucesso reprodutivo de uma espécie é diretamente ligado à sua dinâmica de populações, uma vez que a estabilidade da espécie em um determinado ambiente depende principalmente da quantidade e da qualidade da sua descendência. Sementes de *Eugenia pyriformis* foram avaliadas quanto a sua capacidade regenerativa através do número de sementes por frutos e tamanho da semente. Os resultados de germinação mostraram que o tamanho da semente tem maior efeito sobre a capacidade regenerativa comparada com a quantidade de sementes por fruto. Além disso, verificou-se também que, na fragmentação das sementes pequenas, há maior limitação no crescimento das plântulas. Possivelmente a fragmentação das sementes reduz a quantidade de reservas, que pode ser insuficiente para o crescimento da plântula, outra possibilidade é que em sementes maiores há maior distância entre a região de início da primeira germinação e a região de fragmentação.

Palavras-chave: *Eugenia*, tamanho da semente, número de semente, germinação, capacidade regenerativa.

TEIXEIRA C. C. REGENERATING SEEDS of *Eugenia pyriformis* DEPENDING ON THE NUMBER OF SEEDS PER FRUIT. 2014. 78p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

ABSTRACT- The reproductive success of a species is directly linked to its population dynamics since the stability of the species in a given environment depends mainly on the amount and quality of their offspring. Seeds of *Eugenia pyriformis* were assessed as for their regenerative capacity based on the number of seeds per fruit and seed size. Germination results showed that the seed size has a greater effect on the regenerative capacity compared to the amount of seeds per fruit. Furthermore, it was also found that when fragmenting small seeds, there are higher limitations in terms of seedling growth. Possibly the fragmentation of seeds reduces the amount of reserves which can be insufficient for the seedling growth. Another possibility is that in larger seeds the distance between the very beginning of the first germination region is more distant from the fragmentation region.

Keywords: *Eugenia*, seed size, seeds per fruit, germination, and regenerative capacity.

Introdução

As sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (Myrtaceae) apresentam uma interessante característica, aparentemente comum ao gênero *Eugenia*, porém rara na natureza para sementes monoembriônicas: o potencial para regenerar novas raízes e até plantas inteiras mesmo quando grande parte de sua massa é removida (Anjos e Ferraz 1999, Silva et al. 2003, 2005, Delgado et al. 2010). Tecnicamente, portanto, é possível ampliar o potencial de produção de mudas a partir de um mesmo lote de sementes. Cientificamente o interesse é ainda maior, uma vez que tal comportamento revela uma característica pouco descrita para sementes, pois são sementes monoembriônicas com células regenerativas totipotentes (Delgado 2010). Em sementes de espécies de *Eugenia*, tal característica foi descrita há mais de dez anos e vem sendo estudada em algumas espécies desde então (Silva et al. 2005, Amador e Barbedo 2011, Teixeira e Barbedo 2012). Diversos aspectos foram elucidados, mas muitos necessitam ainda ser esclarecidos, tal como o controle do número de raízes ou partes aéreas que se regeneram.

Uma semente não fracionada de *Eugenia* produz, via de regra, uma única raiz e uma única plântula. Quando fracionada em duas partes, tais sementes produzem dois sistemas radiculares independentes (um em cada fração resultante), cada qual gerando uma nova plântula. Isso permitiria supor que há potencial efeito estimulante gerado pelo corte mas, curiosamente, dificilmente há formação de dois sistemas radiculares na mesma fração, sugerindo algum processo de inibição de uma segunda germinação após o início da primeira (Amador e Barbedo 2011).

Dentre as diversas características já estudadas sobre a capacidade regenerativa das sementes de *E. pyriformis*, o tamanho parece influenciar o número máximo de fracionamentos tolerados pelas sementes para manter seu potencial de regeneração de raízes e plântulas, sendo este maior quanto maior a semente (Silva et al. 2003). A massa resultante após os fracionamentos parece, portanto, condicionar o sucesso da regeneração das sementes. Contudo, frutos dessa espécie produzem sementes em número que varia de um único a mais de quatro. Também se observa, empiricamente, que o tamanho das sementes depende desse número. Curiosamente, porém, tal característica ainda não foi investigada quanto à regenerabilidade.

Neste experimento, frutos de *E. pyriformis* foram separados segundo o número de sementes e estas foram submetidas a fracionamentos objetivando-se analisar o grau

de influência do número de semente por frutos sobre a capacidade regenerativa dessas sementes.

Material e Métodos

Frutos maduros de quatro matrizes de uvaieira, *Eugenia pyriformis* Cambess. (Myrtaceae), foram coletados no Instituto de Botânica (23°38'S, 46°37'W) e 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.

No momento da extração das sementes, identificaram-se as oriundas de frutos que continham uma única semente, de frutos que continham duas sementes e de frutos que continham três ou mais sementes, formando assim três grupos de sementes segundo sua origem. Amostras de sementes de cada grupo foram avaliadas quanto às suas dimensões, sendo tomadas três medidas em eixos ortogonais, denominados diâmetros, um dos quais passando pelo hilo (diâmetro 1).

Num primeiro experimento, sementes de cada grupo foram divididas em três subgrupos, cada qual recebendo diferentes tratamentos de fracionamento: a) sementes inteiras (sem fracionamento), b) sementes cortadas ao meio e c) sementes cortadas em quatro partes. Dessa forma, obteve-se um experimento fatorial 3 x 3 (número de sementes por fruto x tipo de fracionamento), com delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições de 16 sementes em cada teste.

Num segundo experimento, as sementes oriundas de frutos com uma ou duas sementes foram separadas segundo seu tamanho, em pequenas e grandes, mantendo-se o controle de sua origem (número de sementes por fruto). Assim, obtiveram-se quatro grupos de sementes, segundo sua origem e tamanho: sementes grandes de frutos com uma semente (F1SG), sementes grandes de frutos com duas sementes (F2SG), sementes pequenas de frutos com uma semente (F1SP) e sementes pequenas de frutos com duas sementes (F2SP). As sementes foram também cortadas conforme descrito no experimento anterior, obtendo-se um fatorial 4 x 3 (origem das sementes x tipo de fracionamento).

Sementes e frações de sementes foram colocadas em caixas de plástico transparentes e incolor (Gerbox) preenchidas com vermiculita expandida de granulometria média,

saturada com 70 ml de água de torneira e colocados em câmara de germinação à 25 °C com luz constante e 100% de umidade relativa. Registraram-se o número de sementes ou frações de sementes que produziram raiz primária de, no mínimo, 2 cm, a cada 5 dias, até que não houvesse mais emissão de novas raízes por 30 dias consecutivos. No segundo experimento registraram-se, também, o número de plântulas normais produzidas pelas sementes e/ou suas frações.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Ferreira 2008).

Resultados e Discussão

O teor de água e a massa seca do lote de sementes de *Eugenia pyriformis* foram, respectivamente, 66,7% e 0,23 g semente⁻¹, semelhantes aos resultados obtidos em outros trabalhos (Delgado 2010). As dimensões das sementes, segundo sua origem (número de sementes por fruto), estão apresentadas na Tabela 1. Ficou evidente, por esses resultados, que quanto maior o número de sementes por fruto, menor o tamanho final de cada semente, confirmando observações prévias (não publicadas) quanto a essa tendência. Também é possível notar que há grande variação no tamanho das sementes dentro de cada origem, especialmente para o diâmetro 3 e para frutos com uma semente. Como as sementes apresentaram praticamente o mesmo valor para teor de água, pode-se assumir que a massa seca das sementes é tanto maior quanto menor o número de sementes por fruto.

Tabela 1. Dimensões (diâmetros) de sementes de *Eugenia pyriformis* em função do número de sementes por fruto. F1: sementes oriundas de frutos com uma semente; F2: sementes oriundas de frutos com duas sementes; F3+: sementes oriundas de frutos com três ou mais sementes. Valores correspondem a média e correspondente desvio-padrão.

Origem das sementes	Diâmetro 1	Diâmetro 2	Diâmetro 3
F1	10,83 ± 1,53	11,25 ± 2,00	7,78 ± 1,35
F2	9,20 ± 1,58	11,15 ± 2,04	6,50 ± 1,35
F3+	8,15 ± 1,62	10,14 ± 1,83	6,19 ± 1,34

Os resultados de germinação confirmaram o elevado potencial regenerativo das sementes de *E. pyriformis*, chegando a valores superiores a 200% quando fracionadas em quatro partes (Figuras 1 e 2). Contudo, verificou-se que o número de sementes contidas no fruto está relacionado com a capacidade regenerativa dessas sementes, principalmente quando há três ou mais sementes por fruto e, ainda, quando mais de um fracionamento é realizado.



Figura 1. Germinação e desenvolvimento de plântulas em sementes de *Eugenia pyriformis* inteiras (A) ou fracionadas em duas (B) e quatro partes (C).

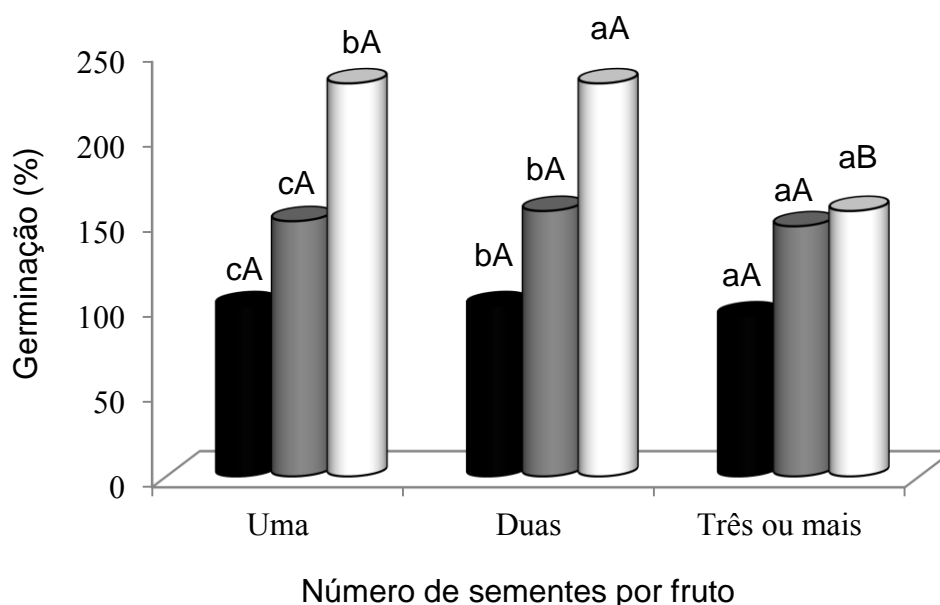


Figura 2. Germinação de sementes e frações de sementes de *E. pyriformis* em função do número de sementes por fruto e do tipo de fracionamento realizado. Coluna preta: sementes inteiras; coluna cinza: sementes cortadas ao meio; coluna branca: sementes cortadas em quatro partes. Médias seguidas por letras iguais (minúsculas para comparação entre tipo de fracionamento, maiúsculas para comparação entre número de sementes por fruto) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Conforme descrito por Silva et al. (2003), a massa da semente está diretamente relacionada com a quantidade de fracionamentos capazes de garantir a regenerabilidade de novas plântulas em sementes de *E. pyriformis*. Portanto, seria esperado que, quanto maior o número de sementes por fruto, menor a capacidade regenerativa dessas sementes. Tal fato foi observado para sementes oriundas de frutos com três ou mais sementes, mas não para as das duas outras origens (uma ou duas sementes por fruto), conforme observado na Figura 2. A massa das sementes foi tanto menor quanto maior o número de sementes por fruto. Porém, quando se comparam sementes oriundas de frutos com uma ou duas sementes verifica-se que alterações na capacidade regenerativa não foram evidenciadas. Contudo, conforme apontado anteriormente, verificou-se grande variação no tamanho das sementes dentro de cada uma dessas duas categorias (Tabela 1). Por essa razão, realizou-se um segundo experimento no qual as sementes desses dois grupos foram divididas entre sementes grandes e sementes pequenas. Essa separação, inicialmente visual, produziu efetivamente subgrupos de sementes de tamanhos diferentes dentro da mesma categoria (Tabela 2).

Tabela 2. Dimensões (diâmetros) de sementes de *Eugenia pyriformis* em função da origem, separadas por categoria (pequenas e grandes) e por número de sementes por fruto (uma ou duas). F1: sementes oriundas de frutos com uma semente; F2: sementes oriundas de frutos com duas sementes. SG: sementes grandes; SP: sementes pequenas. Valores apresentados em média (Med) e seu respectivo desvio padrão (DP).

Origem das sementes	Diâmetro 1		Diâmetro 2		Diâmetro 3	
	Med	DP	Med	DP	Med	DP
F1SG	11,17	1,27	12,51	1,21	8,39	1,12
F1SP	8,91	0,73	9,33	1,12	6,44	0,71
F2SG	10,48	0,68	12,58	1,24	7,51	1,21
F2SP	7,98	1,18	9,54	1,47	5,91	0,95

Os resultados de germinação evidenciaram que o tamanho da semente tem maior efeito sobre a capacidade regenerativa do que propriamente a quantidade de sementes por fruto, pois dentro da mesma categoria as sementes grandes regeneraram mais que as pequenas (Figura 3). Além disso, verificou-se também que, na fragmentação das sementes pequenas, há maior limitação no crescimento das plântulas que na germinação propriamente dita.

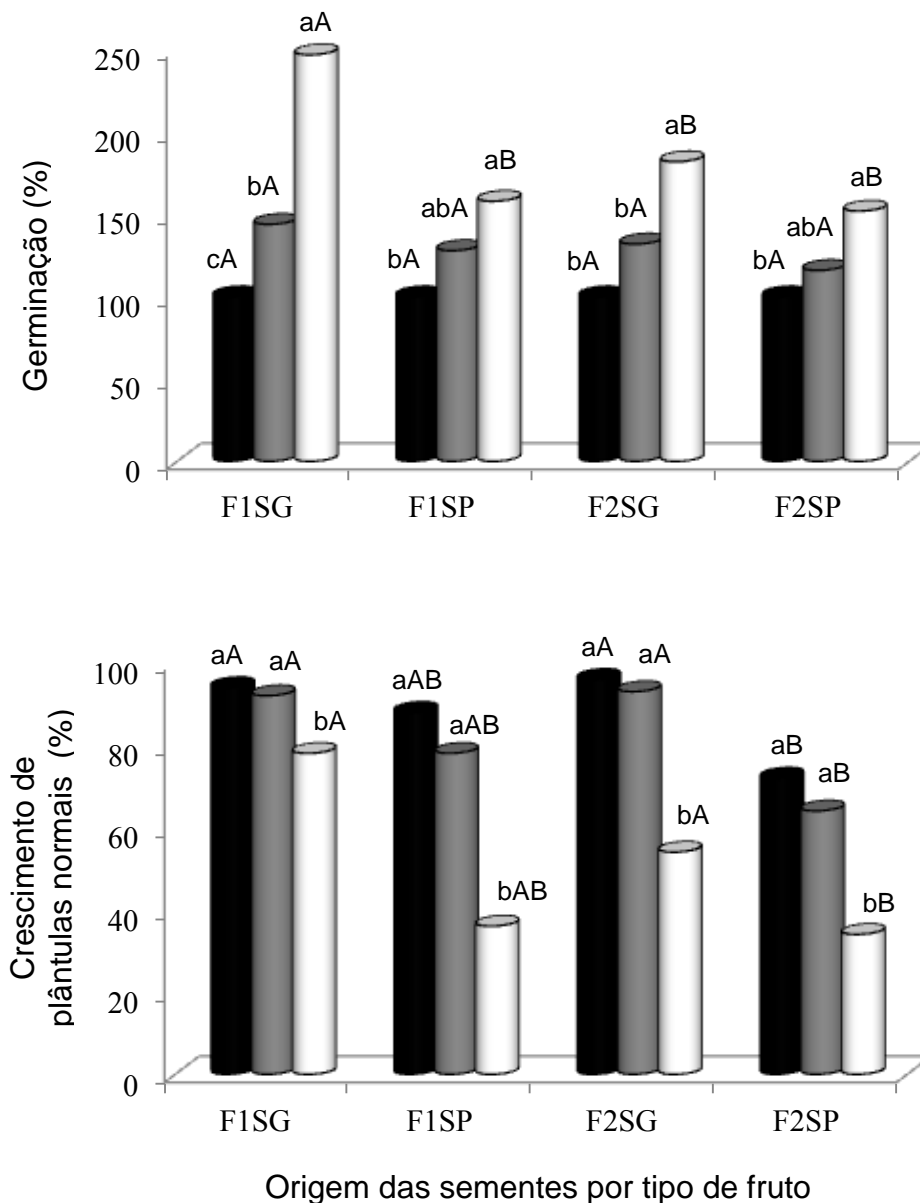


Figura 3. Germinação de sementes e frações e crescimento de plântulas normais de sementes de *E. pyriformis* em função da origem (número de sementes por fruto e tamanho das sementes) e do tipo de fracionamento realizado. F1SG: sementes grandes oriundas de frutos com uma semente; F1SP: sementes pequenas oriundas de frutos com uma semente; F2SG: sementes grandes oriundas de frutos com duas sementes; F2SP: sementes pequenas oriundas de frutos com duas sementes. Coluna preta: sementes inteiras; coluna cinza: sementes cortadas ao meio; coluna branca: sementes cortadas em quatro partes. Médias seguidas por letras iguais (minúsculas para comparação entre tipo de fracionamento, maiúsculas para comparação entre origens das sementes) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Duas possibilidades podem ser consideradas para justificar essas diferenças: 1) a fragmentação das sementes reduz a quantidade de reservas que, nas pequenas, pode se tornar insuficiente para o crescimento da plântula, semelhante ao descrito por Silva et al. (2003), que fracionaram sementes em até oito partes; 2) a distância entre a extremidade da região de germinação e sua oposta é maior nas sementes grandes do que nas pequenas. Neste caso, um possível efeito inibidor causado pelo início da primeira germinação, impedindo a diferenciação de células totipotentes (Delgado 2010) na região oposta, demoraria mais para ser sentido em sementes maiores; com a interrupção da ligação entre essas regiões pela fragmentação haveria possibilidade de nova germinação na região oposta. Contudo, tal fato necessita ainda ser investigado.

Referências bibliográficas

- Amador, T.S., Barbedo, C.J. Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de *Eugenia pyriformis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46:814-821, 2011.
- 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 29:337-348, 1999.
- Delgado, L.F. Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de *Eugenia* (Myrtaceae). Tese (Doutorado), Instituto de Botânica, São Paulo, 2010.
- 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 38:624-634, 2010.
- Ferreira, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Científica Symposium 6:36-41, 2008.

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* 26:213-221, 2003.

Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Barbedo, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. *Revista Brasileira de Sementes* 27:86-92, 2005.

Teixeira, C.C., Barbedo, C.J. The development of seedlings from fragments of monoembryonic seeds as an important survival strategy for *Eugenia* (Myrtaceae) tree species. *Trees, Structure and Function* 26:1069-1077, 2012.

4. ARTIGO CIENTÍFICO II

CAPACIDADE REGENERATIVA DE SEMENTES DE *Eugenia pyriformis* E MODIFICAÇÕES NO METABOLISMO

Carmen Cinira Teixeira, Claudio José Barbedo e Danilo da Cruz Centeno

4. TEIXEIRA C. C. - CAPACIDADE REGENERATIVA DE SEMENTES DE *Eugenia pyriformis* E MODIFICAÇÕES NO METABOLISMO
2014. 78p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO - Os trabalhos com fracionamento de sementes de *Eugenia pyriformis* evidenciaram que, a partir de uma semente, pode-se obter mais de uma plântula. No entanto tal semente deve ser fracionada para que possa regenerar. Essa regeneração parece sofrer influência de inibidores que agem sobre o desenvolvimento da plântula. Sendo assim, há necessidade de trabalhos para entender melhor os processos de inibição dessa regeneração. O trabalho presente teve como objetivo avaliar a mudança no perfil metabólico promovida pela germinação das sementes de *Eugenia pyriformis*, inteiras ou fracionadas, que permita avaliar processos de inibição de uma segunda germinação. As sementes foram colocadas para germinar, antes ou após fracionamentos, até atingirem diferentes comprimentos de raiz primária. Após cada fase de germinação, as frações foram analisadas, por CG/MS, quanto à sua composição química e submetidas a PCA. Os resultados mostraram que sementes não germinadas têm perfil metabólico diferente das sementes germinadas. Sementes fracionadas após germinação apresentaram-se com padrões metabólicos distintos das sementes fracionadas antes da germinação. Concluiu-se que os metabólitos produzidos na germinação da semente de *Eugenia pyriformis* influenciam a capacidade regenerativa da semente, inibindo a formação de um segundo embrião. Análises anatômicas confirmaram tal hipótese.

Palavras-chave: *Eugenia*, perfil metabólico, germinação, semente germinada e capacidade regenerativa.

TEIXEIRA C. C. – THE HABILITY OF *Eugenia pyriformis* SEEDS TO REGENERATE AND CHANGES IN THEIR METABOLISM
2014. 78p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

ABSTRACT- Recent researches show that cutting seeds of *Eugenia pyriformis* allow to obtain several seedlings from the same seed. However such seed should be fractionated so that it can regenerate new germination. This regeneration appears to be influenced by inhibitors that act on the seedling development. Thus, it is necessary to understand the processes which are involved in this inhibition. This study was aimed at evaluating the change in the metabolic profile promoted by the germination of *Eugenia pyriformis* seeds, whole or after cutting them, to analyze the possibility of the inhibition processes for the development of a second germination. The seeds had germinated before or after cutting until they reached different lengths of primary root. After each stage of germination seed fractions were analyzed by GC/MS as for its chemical composition and subjected to PCA. The results showed that non-germinated seeds and germinated seeds have a different metabolic profile. Seed germination after cutting presented distinct metabolic patterns from the seeds that were cut before germination. We concluded that the metabolites produced in the seed germination of *Eugenia pyriformis* influence the regenerative capacity of the seed, inhibiting the formation of a second embryo. Anatomical analyzes confirmed this hypothesis.

Keywords: *Eugenia*, metabolic profile, germination, seed germination and regenerative capacity.

INTRODUÇÃO

A semente de *Eugenia* é exalbuminosa e seu embrião ocupa toda a cavidade delimitada pelo envoltório da semente (Romagnolo e Souza 2006). Esse embrião foi descrito como sendo globoso e sem diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones, sendo considerado conferruminado, ou seja, sem distinção da linha de soldadura entre os cotilédones (Barroso 2002). Contudo, Justo et al. (2007) verificaram que o eixo embrionário de *Eugenia pyriformis*, embora não visto a olho nu, pode ser identificado com auxílio de uma lupa de pequeno aumento, inclusive seu pólo embrionário em uma das extremidades da cicatriz rafeal na superfície dos cotilédones.

Essas características de sementes de *Eugenia* sugerem a presença de tecidos meristemáticos capazes de novas diferenciações, inclusive em novos embriões. De fato, sementes de *Eugenia stipitata*, quando fracionadas em corte transversal, mostraram potencial regenerativo, podendo-se obter 109% de germinação (Anjos e Ferraz 1999). E, em sementes de *E. pyriformis* fracionadas, foi possível produzir diversas plântulas a partir de uma mesma semente, ainda que esta seja monoembriônica (Silva et al 2003, 2005).

Contudo, curiosamente, sementes intactas dificilmente produzem mais de uma plântula e, frequentemente, sequer emitem uma segunda raiz primária. Além disso, quando sementes dessa espécie são fracionadas, cada fração produz uma nova plântula, mas, novamente, raramente se verifica a produção de uma segunda plântula na mesma fração (Silva et al. 2005). Tal fato sugere a possibilidade de que exista algum controle sobre a formação de uma segunda plântula quando a primeira se forma ou, ainda, que o corte seja responsável, e talvez necessário, pelo estímulo à formação de uma segunda germinação (Amador e Barbedo 2011). Embora alguns estudos tenham sido conduzidos sobre esse assunto, ainda não estão compreendidos os processos metabólicos envolvidos. Uma forma de se compreender tal fenômeno é a análise das modificações no perfil metabólico, supondo-se que o germinativo se apresente diferente do verificado em sementes em repouso e, ainda, que o corte da semente possa modificar esse perfil.

Aliado ao estudo do perfil metabólico, a análise histoquímica da semente de *Eugenia pyriformis* pode contribuir para a compreensão dos processos envolvidos na regeneração e desenvolvimento de plântulas após fracionamentos. Além do interesse biológico dos fenômenos envolvidos, pode-se associar tal conhecimento a vantagens no processo de seleção das espécies, bem como no aproveitamento da capacidade

regenerativa das sementes dessa espécie, e de outras do gênero *Eugenia*, no planejamento da produção de mudas, maximizando o potencial produtivo de lotes de sementes e auxiliando nos processos de conservação das espécies, principalmente das que se encontram em risco de extinção. Compreender o perfil metabólico das sementes inteira e fracionada pode, ainda, auxiliar nos estudo de desenvolvimento de plântulas dessa espécie. No presente trabalho, investigaram-se mudanças no perfil metabólico e na histoquímica das sementes germinadas e não germinadas de *E. pyriformis*, antes e após fracionamentos, buscando-se compreender os mecanismos envolvidos no estímulo e/ou inibição da formação de novas plântulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

Frutos maduros de *Eugenia pyriformis* Cambess. (Myrtaceae), foram coletados em 2012 no Jardim Botânico de São Paulo, em São Paulo-SP (23°38'S, 46°37'W), de cinco matrizes. No momento da coleta procurou-se retirar frutos de várias partes da copa para que houvesse uma boa representatividade do lote. As sementes foram extraídas dos frutos manualmente, em água corrente com auxílio de peneira, procurando-se não escarificar a semente (figura 1), sendo imediatamente retirado o excesso de umidade.

As sementes foram selecionadas retirando-se as danificadas, com sinais de deterioração ou com presença de fungos. Posteriormente, as sementes foram armazenadas em geladeira a 8 °C (Andrade e Ferreira 2000) por um dia até o início dos experimentos. As sementes foram selecionadas, também, quanto ao tamanho, descartando-se as que se apresentavam fora do padrão ou com algum dano visível, homogeneizando-se as restantes.

As sementes foram avaliadas quanto ao teor de água e conteúdo de massa seca, pelo método gravimétrico, em estufa a 103±3 °C, durante 17 h (ISTA 1985), quanto ao seu potencial hídrico, utilizando-se potenciômetro baseado na temperatura do ponto de orvalho (Delgado e Barbedo 2012) e quanto ao seu potencial germinativo (Amador e Barbedo 2011).

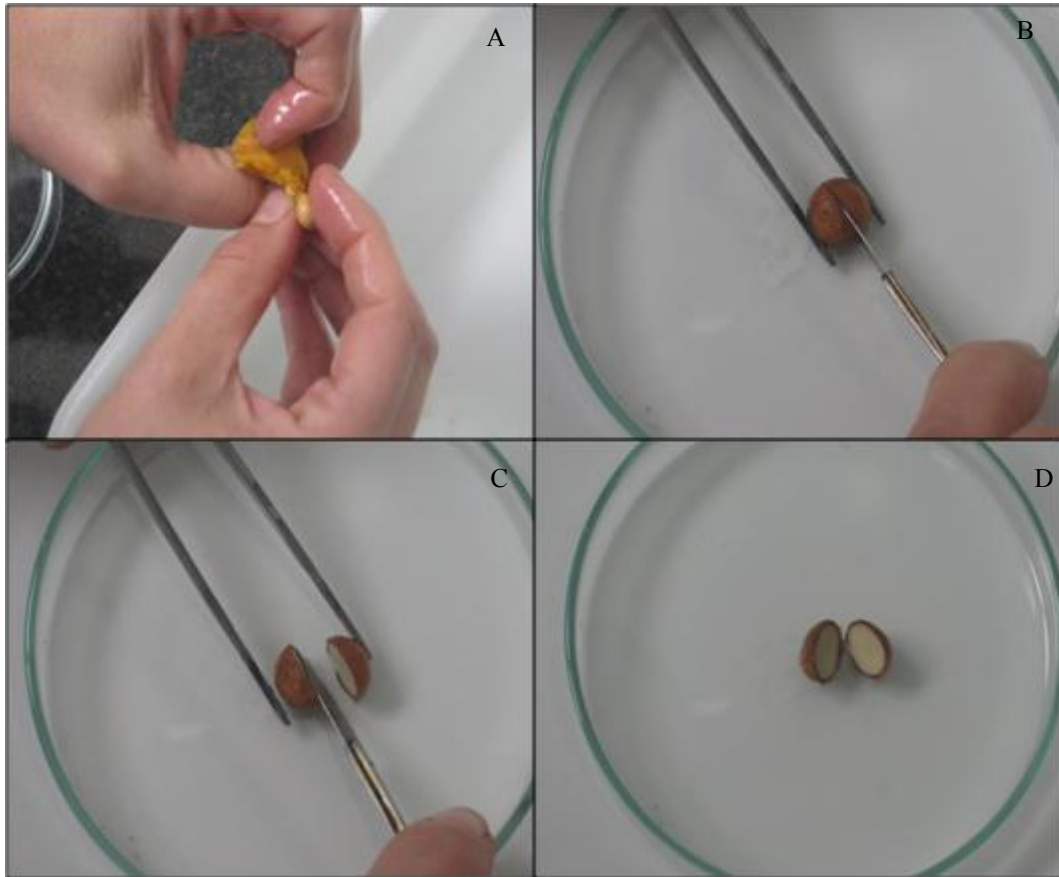


Figura 1. Detalhes do preparo do material e da montagem dos experimentos com sementes de *Eugenia pyriformis*. A. extração de sementes dos frutos; B. posição dos cortes realizados nas sementes; C. corte transversal ao meio; D. semente fracionada em duas partes.

Obtenção dos tratamentos de germinação e fracionamento

A semente controle (metabolicamente ativa) não foi colocada para germinar. As sementes foram divididas em dois grandes grupos. No primeiro, as sementes foram fracionadas ao meio e cada fração foi colocada para germinar, mantendo-se o controle de suas respectivas origens. No segundo, as sementes foram colocadas para germinar (denominadas sementes germinantes) e, a seguir, foram fracionadas. Para a germinação, foram usadas caixas de plástico transparentes e incolor (gerbox) preenchidas com vermiculita expandida de granulometria média, saturada com 70 ml de água de torneira. Sementes inteiras e fracionadas ao meio foram colocadas para germinar na sala de germinação com temperatura de 25 °C e luz constante. O fracionamento das sementes germinantes foi subdividido em quatro categorias, conforme o comprimento que a raiz primária havia atingido por ocasião do fracionamento: de 1 a 5 mm, 6 a 10 mm, 11 a 15 mm e 16 a 25 mm (figura 2).

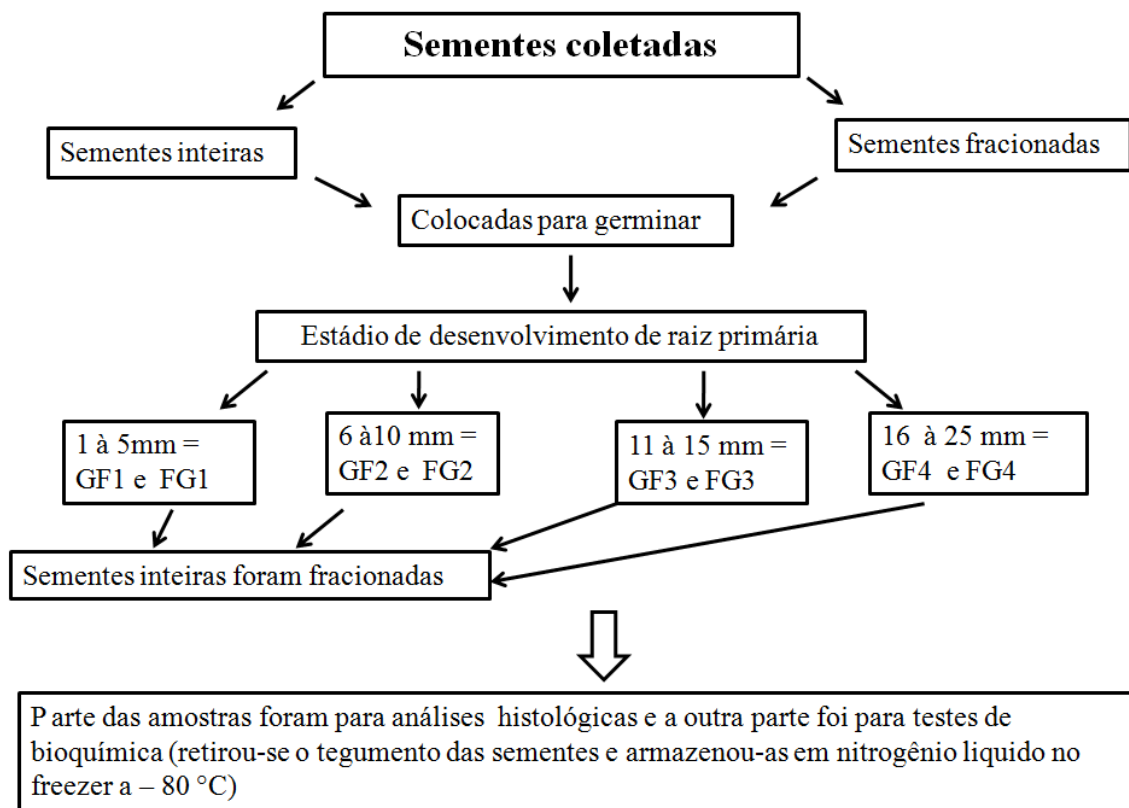


Figura 2. Representação esquemática da seqüência da montagem dos experimentos até a fixação para histoquímica e armazenamento em freezer, para posterior análise bioquímica.

Todas as frações de sementes fracionadas foram identificadas segundo a presença ou ausência do hilo (figura 3). As sementes que foram fracionadas após a germinação foram denominadas GF e as fracionadas antes da germinação FG. Foram atribuídos números crescentes a essas siglas representando os estádios de desenvolvimento da raiz, ou seja, 1 para as que haviam atingido 1 a 5 mm, 2 para 6 a 10 mm, 3 para 11 a 15 mm e 4 para 16 a 25 mm. Quanto à posição do hilo, foram marcadas com apóstrofe (') as frações que não continham o hilo (figura 3). Dessa forma foram compostos os seguintes tratamentos: FG1 e FG1', FG2 e FG2', FG3 e FG3', FG4 e FG4', para as sementes fracionadas antes da germinação; GF1 e GF1', GF2 e GF2', GF3 e GF3', GF4 e GF4', para as fracionadas após cada nível de germinação (figura 2).

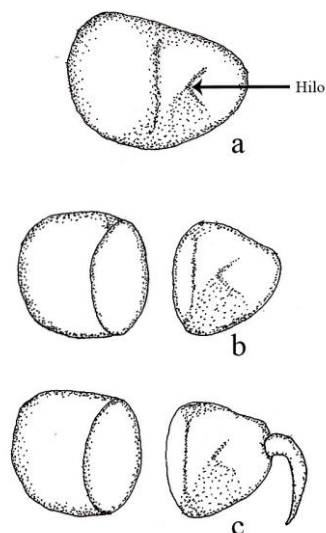


Figura 3. Representação esquemática da semente de *Eugenia pyriformis*. a. semente evidenciando o hilo; b. corte transversal, com a fração à esquerda recebendo o sinal de (') para distinguí-la da fração que continha o hilo; c. corte transversal e a fração com o hilo com raiz primária. Ilustração: Débora M. Molizane.

Análise do perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), seguindo método descrito previamente por (Roessner et al. 2001) adaptado à espécie vegetal analisada. Sementes foram homogeneizadas com a ajuda de um almofariz e pistilo em nitrogênio líquido. Aproximadamente de 100 a 50 mg de material foi colocado em tubos do tipo Eppendorf e utilizado para extração e derivatização dos metabólitos da semente. O material foi extraído em 500 μl de metanol:clorofórmio:água (MCA) na proporção de 12:5:1 e 50 μl do padrão interno adonitol (0,2 mg ml^{-1} de piridina) agitado em vórtex e aquecido a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min, sendo agitados a cada 10 min, o qual foi novamente agitado em vórtex e centrifugado a 13.000 rpm, por 2 min. A fase polar (superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 ml e a ela adicionado 350 μl de água. A mistura foi agitada e após 5 min foi centrifugada a 13.000 rpm, por 5 min. 300 μl da fase polar (fase superior) foram coletados e secos à vácuo, sendo então armazenados a -80 $^{\circ}\text{C}$ até derivatização. Para derivatização, 150 μl de piridina, 50 μl de BSTFA e 50 μl de cloridrato de metoxilamina (0,2 mg ml^{-1} piridina) foram adicionados ao material seco, submetidos à agitação e aquecidos a 75 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. As amostras foram, então, transferidas para

frascos de vidro, os quais foram lacrados, e injetados automaticamente em um sistema GC/MS (Agilent GC 6890 e MSD 5973N, Agilent Technologies, USA). A corrida no cromatógrafo foi executada em coluna HP-1701 de 30 m com 0,25 μm de espessura (Supelco, Bellfonte, CA). A temperatura de injeção foi ajustada a 230 $^{\circ}\text{C}$, a interface a 250 $^{\circ}\text{C}$, e a fonte de íons a 150 $^{\circ}\text{C}$. Hélio foi usado como gás carreador a um fluxo de 1 ml min^{-1} . A análise foi conduzida sob a seguinte programação de temperatura: 5 min de aquecimento a 70 $^{\circ}\text{C}$, seguido de uma rampa na temperatura do forno de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$ e 1 min de aquecimento a 280 $^{\circ}\text{C}$. O espectro de massas foi armazenado a uma taxa de 2 varreduras s^{-1} na faixa de 50 a 650 m/z . Os dados foram gerados e analisados através do programa Chemstation (Agilent Technologies, EUA). Os picos detectados foram comparados com padrões autênticos e com a NIST 08 Mass Spectral Library e confirmados através do cálculo do índice de Kovats.

Histologia

Sementes inteiras e fracionadas em diferentes estádios de desenvolvimento (figura 2) foram fixadas em solução modificada de Karnovsky (Kraus e Arduin 1997) por 24 h, lavado em água destilada, desidratadas e armazenadas em etanol 70%.

As sementes foram processadas de acordo com as técnicas usuais para inclusão em historesina Leica[®] (HeraeusKulzer, Hanau, Germany) e seccionado a 7-10 μm de espessura. As lamínas foram coradas com Azul de Toluidina O (Sakai 1973) e montadas em água. As secções foram observadas e fotografadas digitalmente no microscópio Olympus BX53 equipado com câmera digital Olympus Q-Color 5 e software Imagem Pro Express 6.3, e algumas amostras foram observadas em UV.

RESULTADOS

A massa seca inicial média das sementes de *E. pyriformis* foi 0,403 g, o teor de água 59,4% e o potencial hídrico -0,995 MPa, indicando que o lote de sementes estava em estágio maduro.

Perfil metabólico

Os resultados de perfil metabólico estão representados nas figuras 4 a 6, segundo a análise de perfil metabólico, e de 7 a 9, segundo normalização pela mediana.

Nos resultados obtidos por PCA, observou-se nitidamente que as sementes que não germinaram (controle), apresentaram perfil metabólico muito diferente das sementes que germinaram. Além disso, pode-se notar que os resultados das sementes fracionadas após a germinação situaram-se em regiões distantes das sementes fracionadas antes da germinação. Analisando-se a fração resultante, verificam-se importantes diferenças também entre as frações opostas às germinantes, ou seja, as que não continham o hilo, principalmente GF1' e GF4'.

Observou-se que os tratamentos GF agruparam-se, sendo GF3 e GF4' os mais próximos entre si. Na análise do gráfico com sementes fracionadas e depois germinadas observa-se que FG4 apresentou padrão mais distinto.

Através das análises do perfil metabólico pode-se observar que, de modo geral, a maioria dos metabólitos destacados foram mais representativos para sementes germinadas e depois fracionadas, em especial rafinose, galactinol, frutose e treitol, em relação às sementes fracionadas e depois germinadas.

Em sementes que não germinaram (controle), o *myo*-inositol mostrou-se bem evidente. Sementes germinadas e depois fracionadas, em especial GF4, mostraram-se bem expressivas para o ácido gálico. Também foi expressivo o ácido cítrico em sementes germinadas e depois fracionadas.

A glicose, curiosamente, ficou evidente para todas as amostras, porém nas sementes não germinadas (controle) praticamente não houve expressão.

Eritritol, ácido láctico e glicerol foram praticamente inexistentes para todas as amostras.

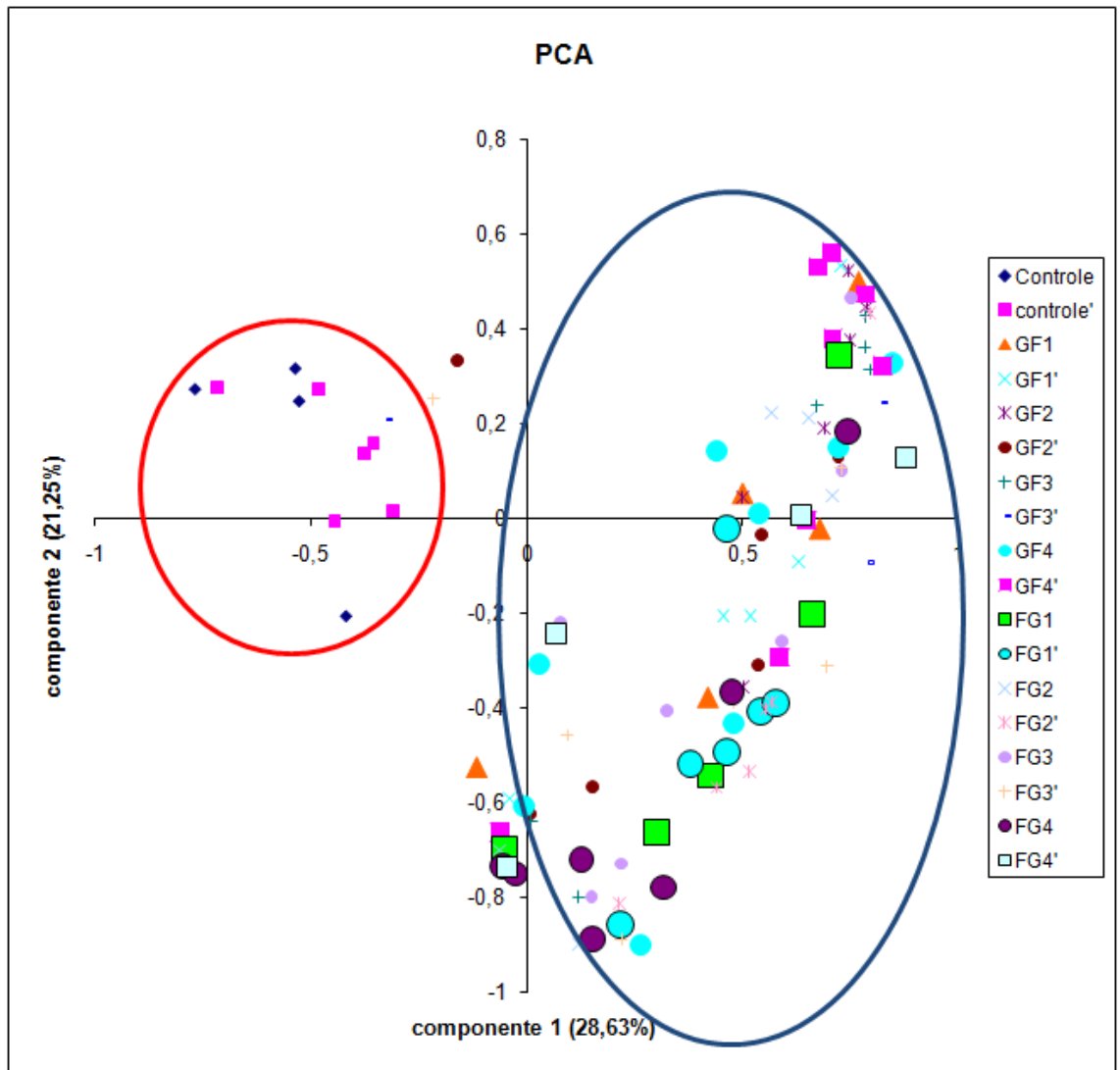


Figura 4. Análise de PCA de sementes de *Eugenia pyriformis* com todos os tratamentos de fracionamentos e todas as frações. Circulo vermelho agrupa sementes não germinadas. Circulo azul agrupa sementes germinadas.

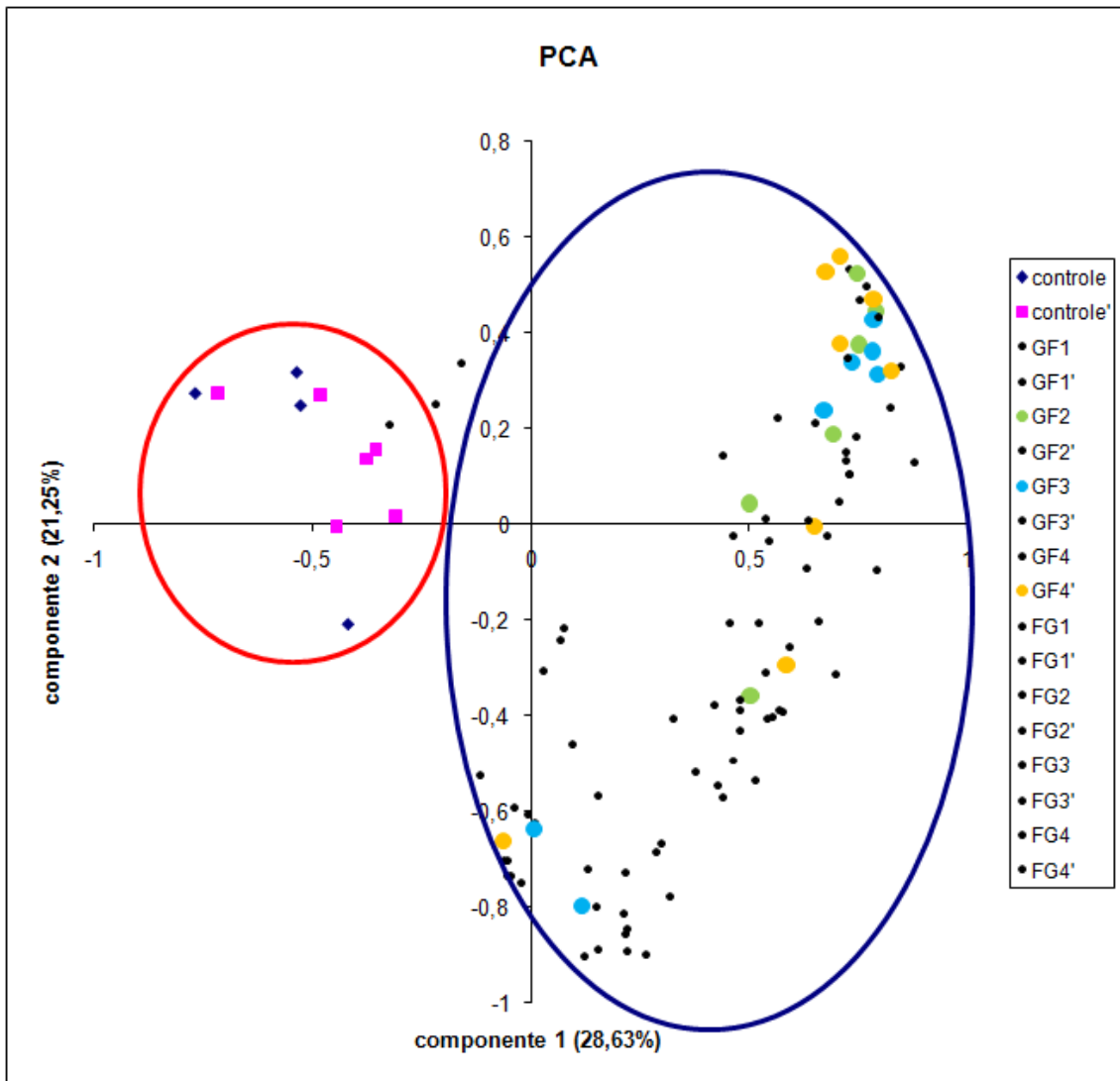


Figura 5. Análise de PCA de sementes de *Eugenia pyriformis* com realçe para os tratamentos GF2, GF3 e GF4'.

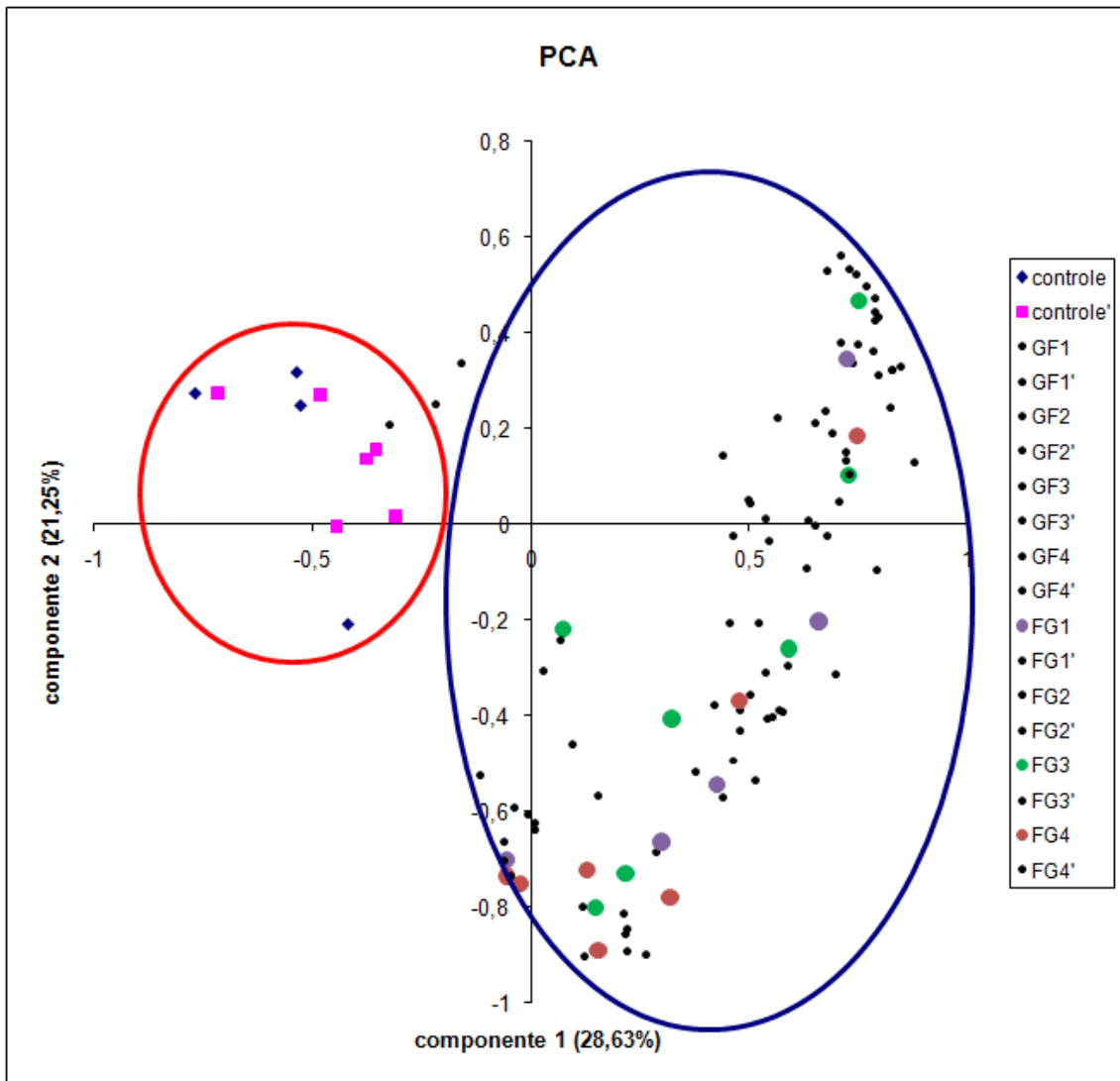


Figura 6. Análise de PCA de sementes de *Eugenia pyriformis* com ênfase para os tratamentos FG1, FG3 e FG4.

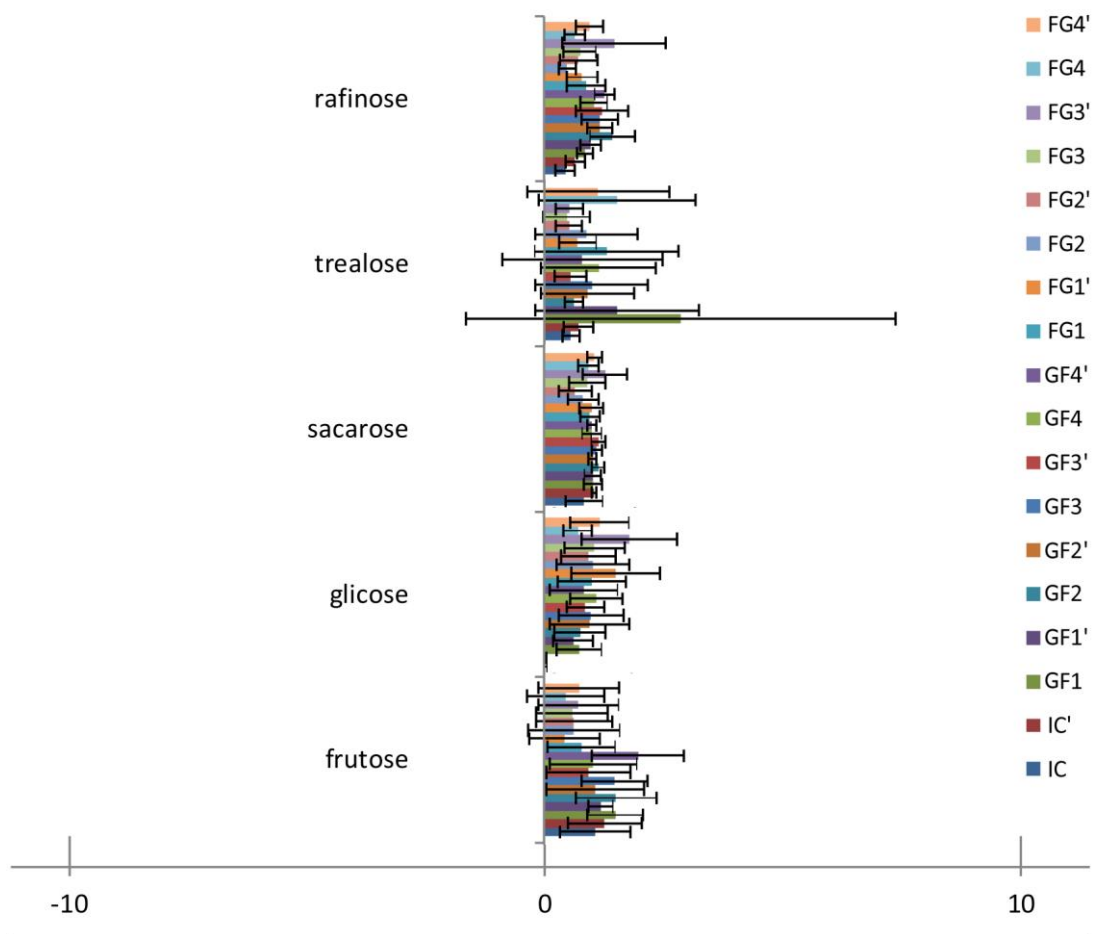


Figura 7. Análise do perfil metabólico (Carboidratos) de sementes de *Eugenia pyriformis* em repouso (controle), germinadas e depois fracionadas e fracionadas e depois germinadas. Os compostos foram detectados por GC / MS. Todos os valores foram normalizados pela mediana dos compostos.

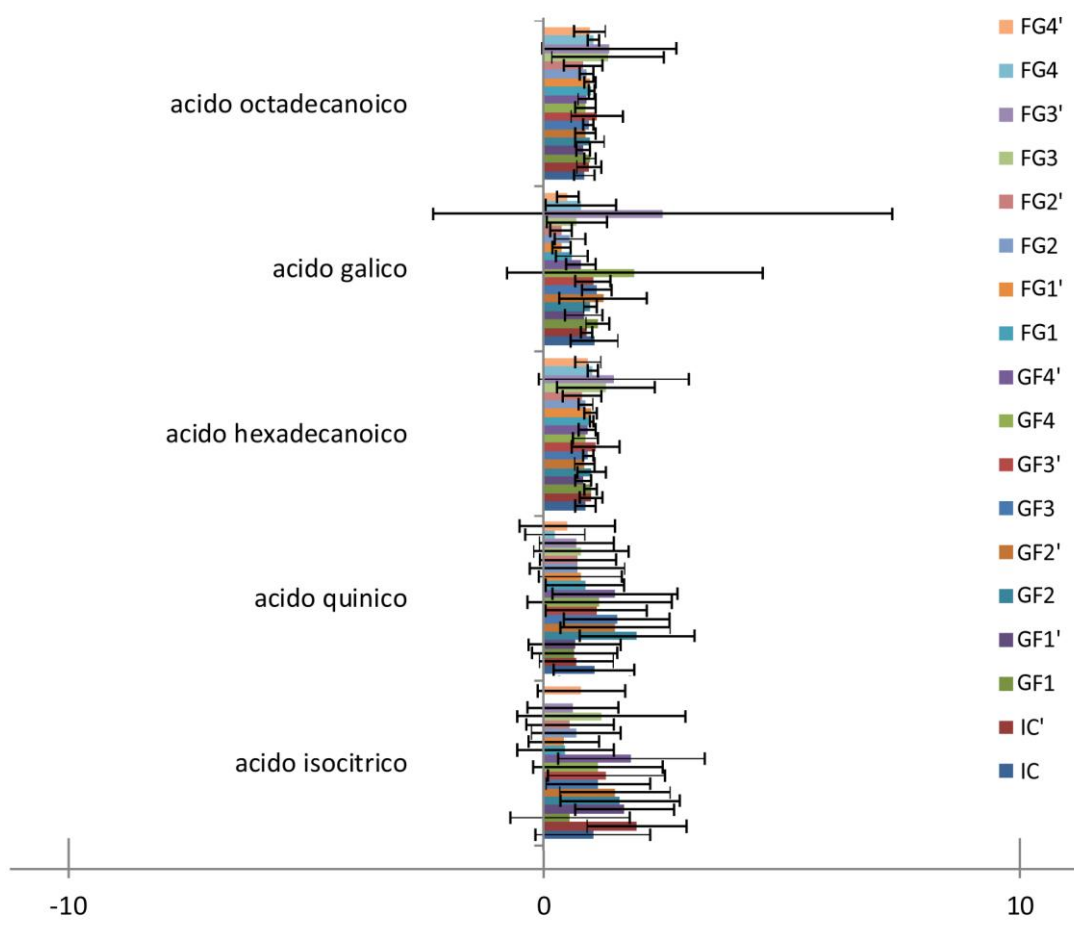


Figura 8. Análise do perfil metabólico (ácidos orgânicos) de sementes de *Eugenia pyriformis* em repouso (controle), germinadas e depois fracionadas e fracionadas e depois germinadas. Os compostos foram detectados por GC / MS. Todos os valores foram normalizados pela mediana dos compostos

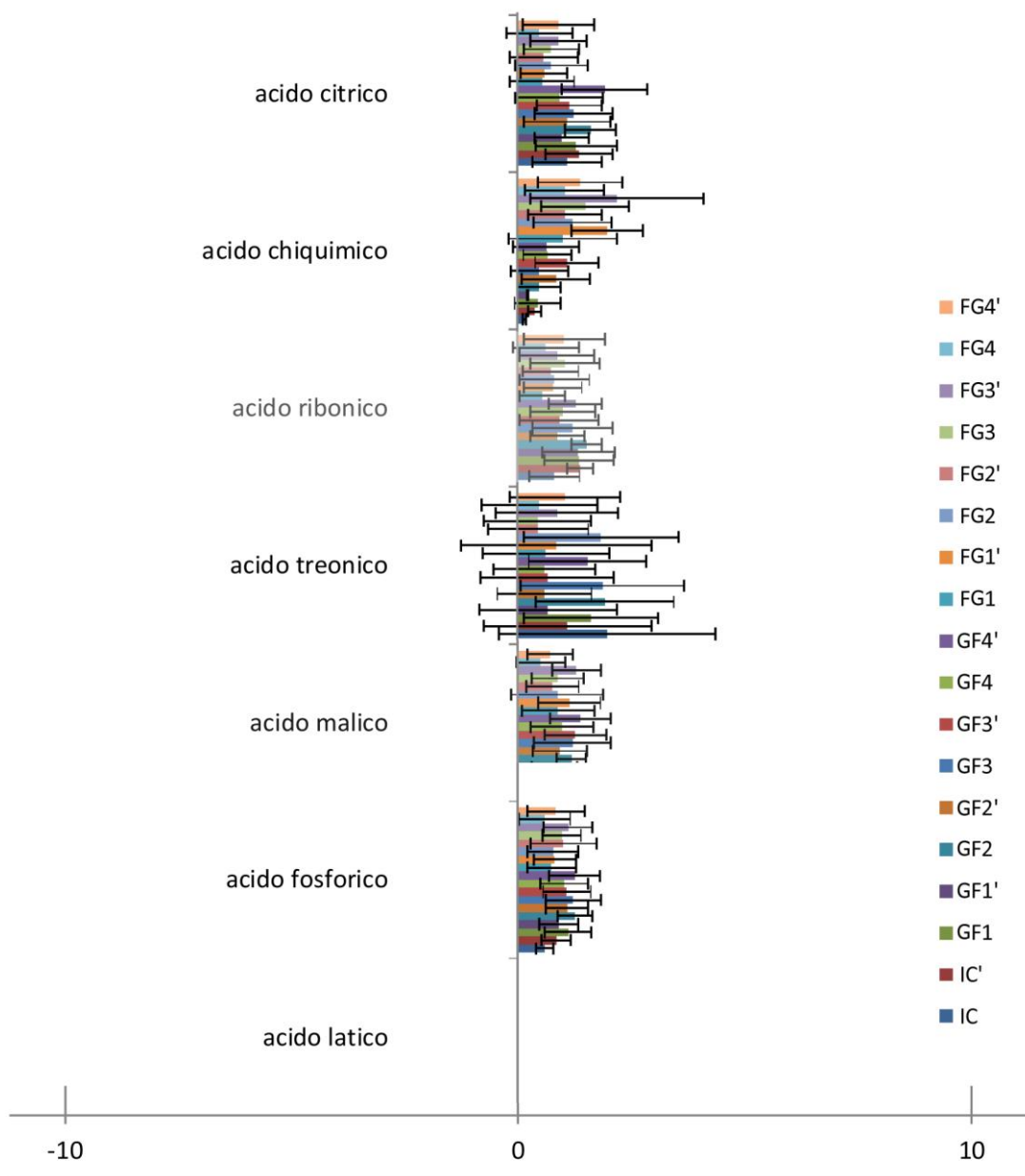


Figura 9. Análise do perfil metabólico (ácidos orgânicos) de sementes de *Eugenia pyriformis* em repouso (controle), germinadas e depois fracionadas e fracionadas e depois germinadas. Os compostos foram detectados por GC / MS. Todos os valores foram normalizados pela mediana dos compostos.

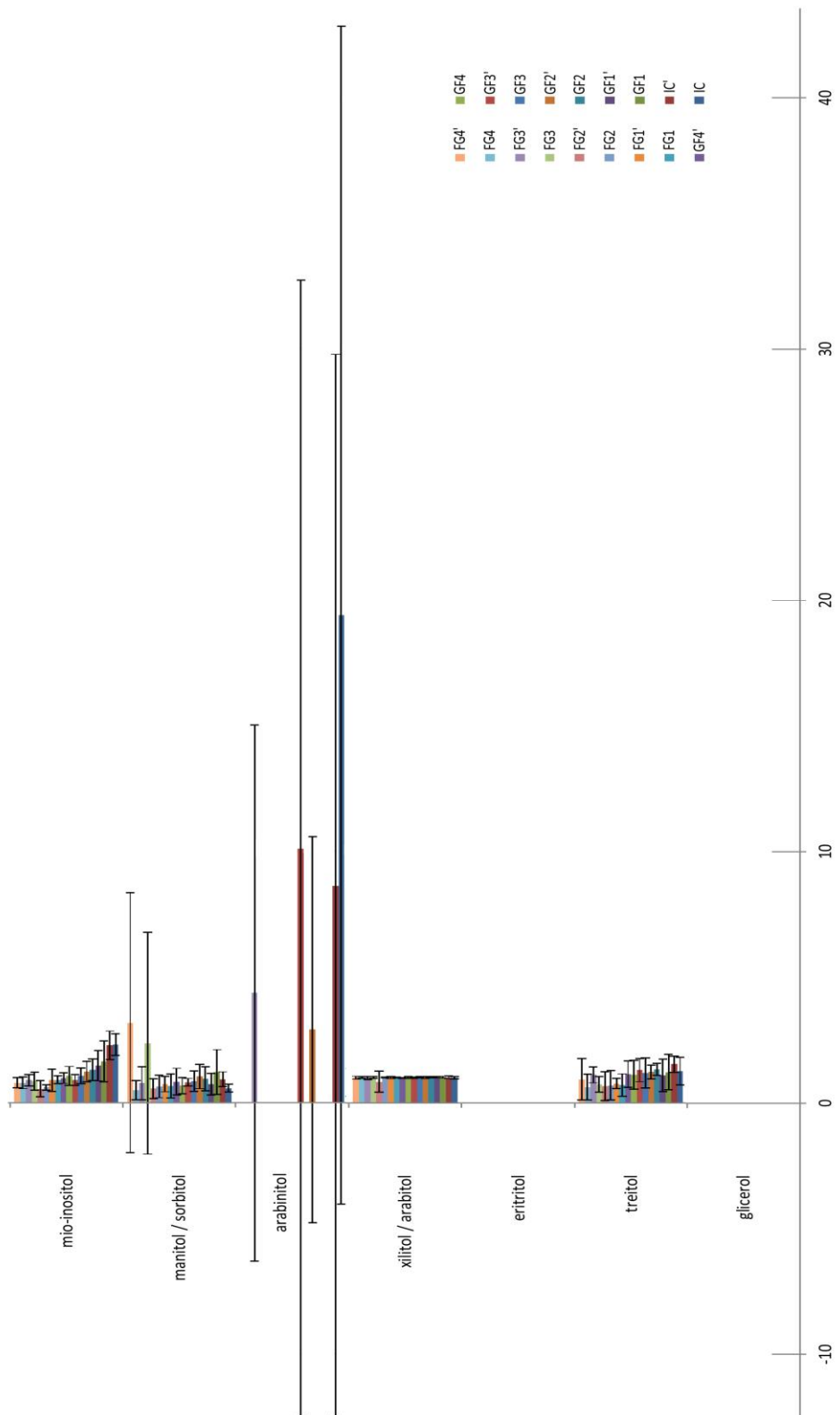


Figura 10. Análise do perfil metabólico (polióis) de sementes de *Eugenia pyriformis* em repouso (controle), germinadas e depois fracionadas e fracionadas e depois germinadas. Os compostos foram detectados por GC/MS. Todos os valores foram normalizados pela mediana dos compostos.

Análise histoquímica de semente de *Eugenia pyriformis*

As análises histoquímicas estão apresentadas nas figuras 11 a 14.

A semente madura de *Eugenia pyriformis* apresenta dois cotilédones (um muito reduzido não visualizado e outro concrecido formando quase uma espiral). O embrião e o cotilédone reduzido não foram observados nas secções analisadas. O cotilédone concrecido apresenta células parenquimáticas ricas em grãos de amido. Na região periférica observa-se, tanto nas células que constituem a epiderme quanto nas camadas de células parenquimáticas adjacentes, conteúdo fenólico evidenciado em verde pelo corante metacromático azul de Toluidina.

As análises feitas pela histologia evidenciaram o embrião e o tegumento em alguns cortes. Em todas as células parenquimáticas observam-se grãos de amido.

À exceção do controle, em todos os tratamentos observou-se a instalação do felogênio. Inicialmente, ocorre uma região em que as células começam a se desdiferenciar (estas regiões não são coradas por AT), concomitante à desdiferenciação destas células do parênquima, ocorre o acúmulo de compostos fenólicos ao redor destas células. Entre as células desdiferenciadas (ou seja, voltam a ter características meristemáticas) uma camada origina o felogênio, cujas células derivadas unidirecionalmente originarão as células do súber. Quando diferenciadas, estas células apresentam impregnações fenólicas nas suas paredes, sendo visualizadas em luz UV. Células adjacentes ao felogênio são aquelas que acumularam compostos fenólicos antes da formação deste meristema; ainda, algumas células do súber também apresentam conteúdo fenólico. Os resquícios celulares apresentam protoplasto de células que foram obliteradas devido à instalação do felogênio, de forma que o conteúdo destas células são majoritariamente grãos de amido e, em menor concentração, fenólicos. Concomitante a obliteração destas células, observa-se a formação do espaço produzido por efeito da instalação do felogênio.

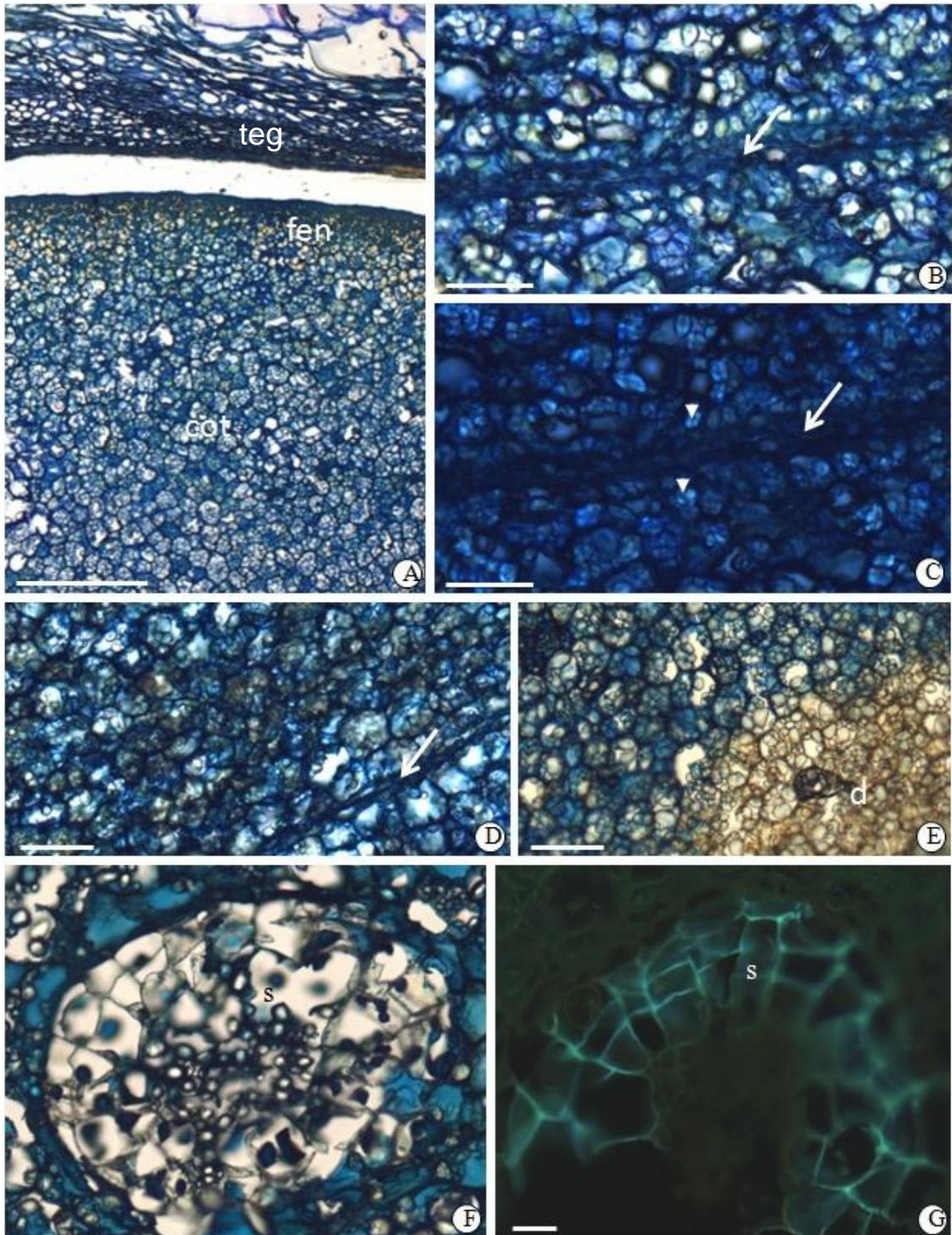


Figura 11. Aspectos gerais e instalação de felogênio no cotilédone concrescido da semente de *Eugenia pyriformis*. (A) Vista geral da semente controle: tegumento (teg) e um cotilédone concrescido (cot). Note células epidérmicas e 15-20 camadas de células parenquimáticas contendo compostos fenólicos (fen). (B-C) Região central da semente: contato entre diferentes faces da epiderme de um mesmo cotilédone concrescido (setas). Células parenquimáticas ricas em grãos de amido (cabeças de seta em C). (D-G) Instalação de felogênio no cotilédone. (D) aumento de compostos fenólicos nas células presentes na região em que o meristema será formado. (E) células do parênquima amilífero que irão compor a região de instalação do felogênio passam por desdiferenciação (d), notáveis pela ausência de coloração pelo azul de Toluidina. (F-G) Instalação do felogênio: note aspecto circular de formação do meristema. As paredes das células do súber (s) são facilmente visualizadas sob luz UV (G). Barras: 250 μm (A), 150 μm (B-E), 75 μm (F-G).

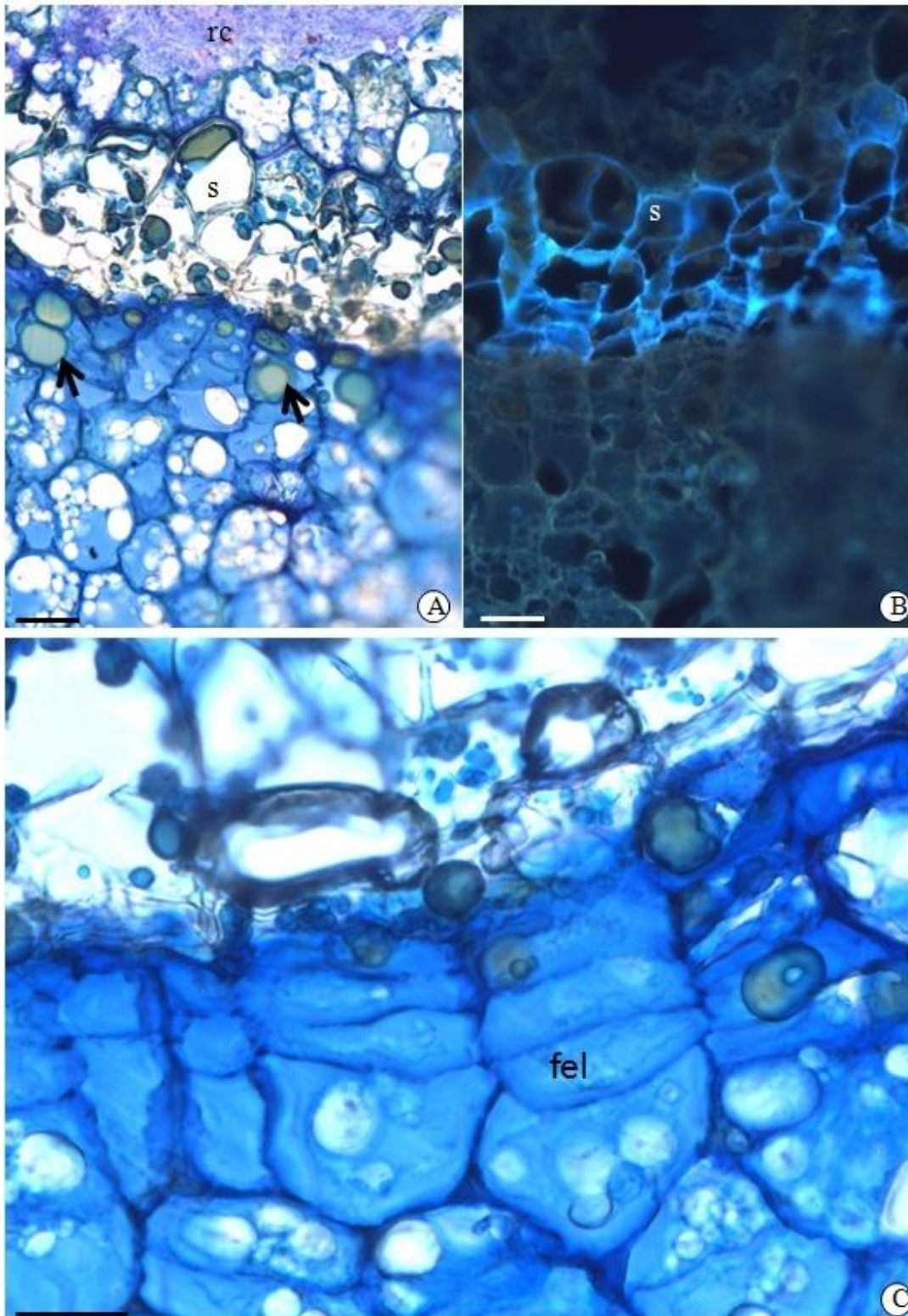


Figura 12. Detalhes da instalação do felogênio no cotilédono concrescido da semente de *Eugenia pyriformis*. (A–B) Região de instalação do felogênio. Note resquícios de células do parênquima amilífero (rc) que perderam a integridade em virtude da instalação do meristema, e a ocorrência de compostos fenólicos (setas) no interior das células subjacentes ao felogênio e no interior das células do súber (s). Note que as células do súber já diferenciadas apresentam impregnação de suberina na parede celular, facilmente visualizadas em luz UV (B). (C) Detalhe da região de instalação do felogênio e presença de células derivadas: felogênio (fel) identificado como a primeira célula retangular de cada série radial e varias camadas de células derivadas deste meristema (súber, acima do felogênio) em diferenciação. Note que o felogênio apresenta crescimento unidirecional, ou seja, não ha formação de feloderme. Barras: 75 μm (A–B), 50 μm (C).

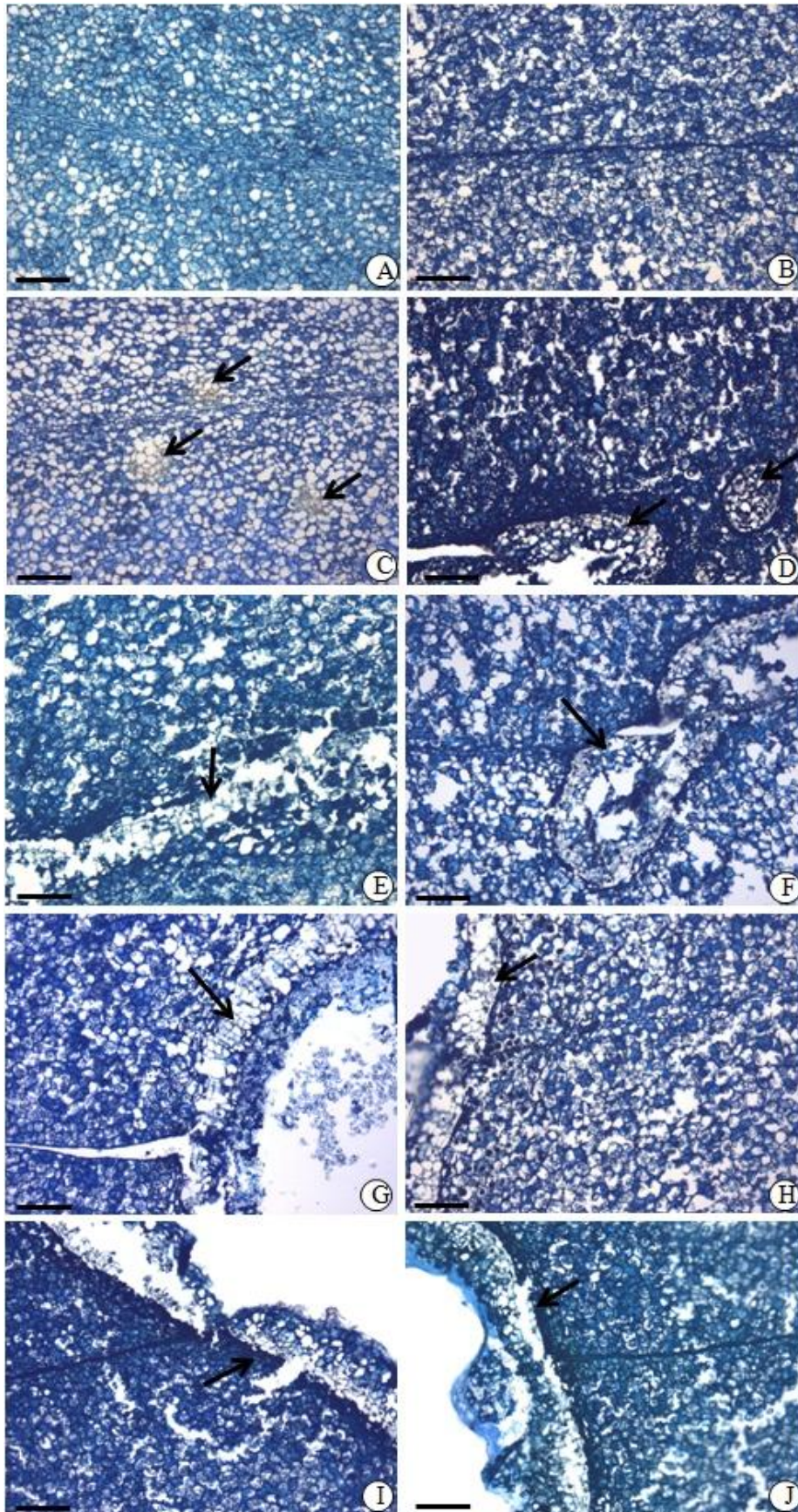


Figura 13. Formação de flogênio nos cotilédones de *Eugenia pyriformis* a partir de sementes submetidas a diferentes tratamentos. Sementes germinadas e posteriormente fracionadas. (A) controle (B) controle linha. (C) GF1 (D) GF1 linha (E) GF2 (F) GF2 linha (G) GF3 (H) GF3 linha (I) GF4 (J) GF4 linha. Setas indicam a instalação do flogênio. Barras: 150 µm.

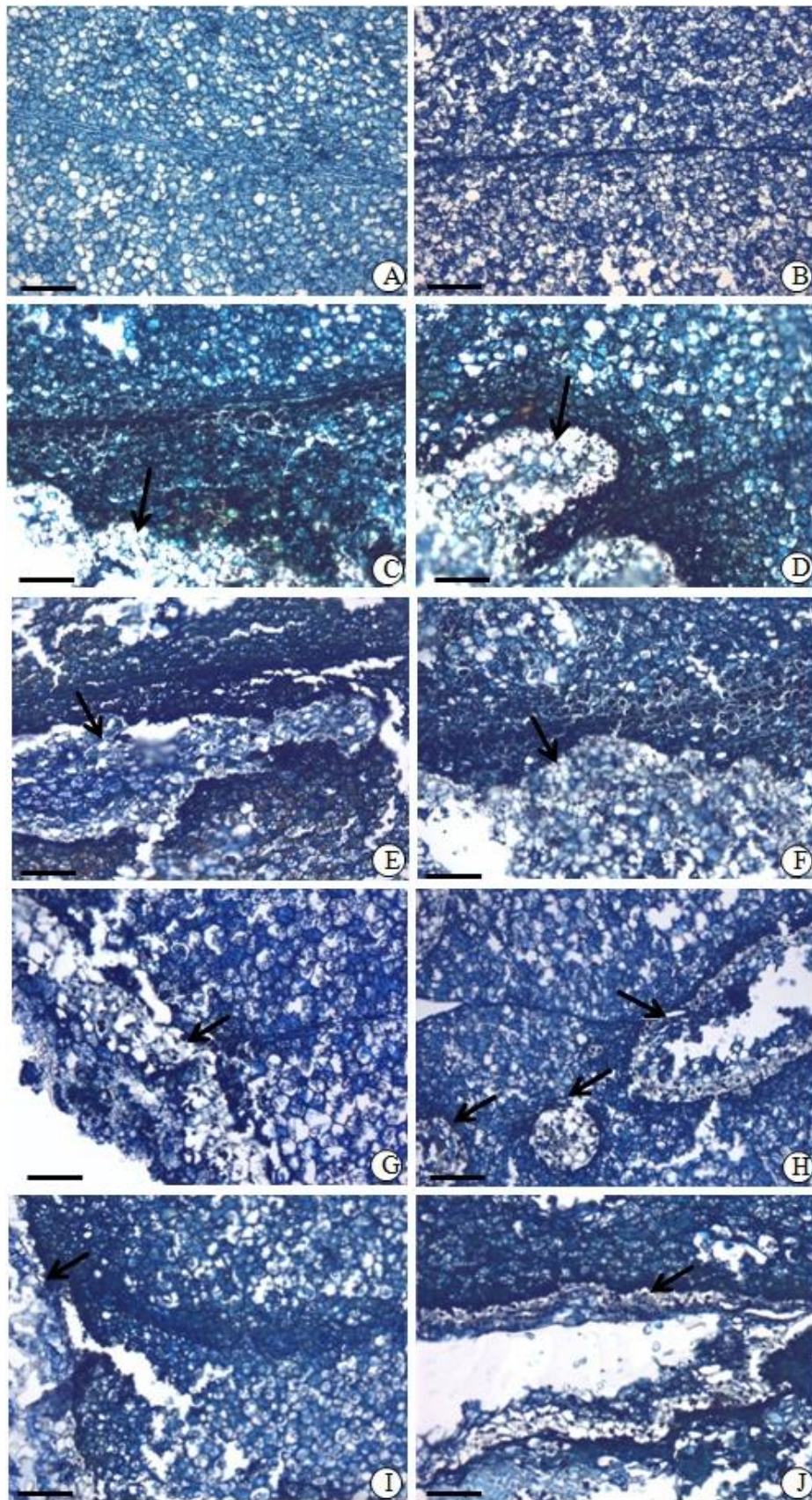


Figura 14. Formação de flogênio nos cotilédones de *Eugenia pyriformis* a partir de sementes submetidas a diferentes tratamentos. Sementes fracionadas e posteriormente germinadas. (A) controle (B) controle linha. (C) FG1 (D) FG1 linha (E) FG2 (F) FG2 linha (G) FG3 (H) FG3 linha (I) FG4 (J) FG4 linha. Setas indicam a instalação do flogênio. Barras: 150 μ m.

DISCUSSÃO

Visando a melhor compreender uma possível inibição que influencia a capacidade de desenvolvimento de plântulas em sementes de *Eugenia pyriformis*, o presente trabalho analisou o perfil metabólico das sementes durante diferentes processos de regeneração e desenvolvimento concomitantemente com a histoquímica. Verificou-se, inicialmente, metabolismos nitidamente distintos entre as sementes em repouso, não germinadas (porém suficientemente úmidas e metabolicamente ativas) e as germinantes. Foi possível identificar, também, outros dois evidentes padrões de perfil metabólico: a) o das sementes que iniciaram a germinação e, em seguida, foram fracionadas e b) o das sementes que foram fracionadas e, em seguida, iniciaram a germinação. Esses padrões ficaram evidentes quando se comparam as frações opostas às germinantes: quanto mais avançado foi o processo de germinação, mais próximo foi o perfil metabólico da fração oposta em relação à germinante. Em outras palavras, na medida em que a germinação avança, o perfil metabólico da semente vai tornando-se mais desfavorável a uma nova germinação. Quando há um fracionamento inicial, anterior ao início da germinação, a fração oposta à germinante apresenta perfil metabólico mais próximo ao favorável à germinação.

As análises de perfil metabólico evidenciaram, em especial, alguns carboidratos solúveis como rafinose, sacarose e frutose mais frequentes em sementes germinadas e depois fracionadas. Tais resultados sugerem que as sementes, por terem se mantido intactas e que foram fracionadas apenas para as análises, mantiveram a quantidade de açúcares mais elevada; esses são importantes e de rápida mobilização nos processos de germinação quando comparados com os das sementes que foram fracionadas antes de começar seu processo germinativo. Açúcares como rafinose e estaquiose, assim como a sacarose, atuam como compostos de reserva de rápida disponibilidade para a planta, como pode ser observado no processo de germinação, onde a rafinose é um dos primeiros compostos metabolizados (Bewley e Black 1985).

O *myo*-inositol foi mais expressivo em sementes não germinadas (controle). Tal metabólito está relacionado a processos biológicos como manutenção do potencial de membrana das células, entre outras funções. Esse resultado pode mostrar que antes da semente entrar em processo germinativo os processos fisiológicos como potencial de membrana devem ser ativados para começar a permeabilidade de outros compostos. O *myo*-inositol é muito utilizado em meio de cultura em experimentos com germinação

para ativar os processos fisiológicos como o potencial de membrana. Em sementes de *Erythrina caffra*, por exemplo, os altos teores de inositol e monossacarídeos foram associados à proteção da membrana plasmática dos efeitos das baixas temperaturas (Nkang 2002).

Nas sementes não germinadas não foi identificada a presença de glicose. A explicação para esse resultado pode estar relacionada ao fato da semente não ter entrado em processos germinativos, pois o amido ainda não tinha fornecido glicose para a semente. Estudo realizado por Magalhães et al. (2010) mostra que a taxa de glicose permaneceu estável no eixo embrionário de sementes de *Schizolobium parahyba* e que o amido fornece glicose para ser utilizada tanto na respiração, para gerar energia, quanto para compor estruturas físicas durante o crescimento do embrião na fase de germinação.

O ácido láctico não foi detectado em todas as amostras, e esse componente está associado a propriedades nutricionais. Pode-se sugerir que as sementes contem grande quantidade e qualidade de valor nutricional e por isso não investe em ácido láctico. Buckenhüskes (1997) mostra, em seus trabalhos, que a fermentação do ácido láctico é uma alternativa que vem sendo usada como forma de preservação de vegetais, tendo importância pela manutenção ou melhora da segurança, propriedades nutricionais e sensoriais e aumento da vida útil dos vegetais.

O ácido cítrico é considerado um componente intermediário do ciclo de Krebs, portanto importante no processo respiratório da semente. Sementes germinadas e depois fracionadas possivelmente apresentaram metabolismo mais intenso, por isso maior produção de ácido cítrico, principalmente nas etapas finais de desenvolvimento, o que sugere que tal composto estaria agindo como um antioxidante. Trabalho realizado por Birch et al. (2001) mostrou que, em alguns casos, a ação sinérgica do ácido cítrico é indispensável, tal agente antioxidante tende a estabilizar os ácidos graxos em alimentos através da reação com radicais livres.

As análises histoquímicas corroboram com as análises de perfil metabólico. A presença do felogênio em todos os cortes, com exceção das sementes não germinadas, mostra que é a germinação que modifica seu metabolismo e que tais modificações influenciam modificações nos tecidos da semente. Possivelmente as sementes, quando entram em processos de germinação, liberam compostos que podem agir como inibidores da regeneração de novas plântulas. Tais inibidores podem causar modificações nos tecidos da semente, modificações essas como a formação de felogênio que é um meristema secundário. Dore (1955) evidenciou, em seu trabalho com rabanete,

que as raízes, ao atingirem idade entre 1 a 2 meses, regeneram-se formando felogênio quando o espessamento secundário começa. O que chama atenção para esse resultado foi que novos primórdios surgiram individualmente como meristemas organizados cujas células são derivadas apenas do felogênio da raiz principal. Estudos como esse sugerem que o felogênio pode ser um tecido que sofrerá desdiferenciação para dar origem a novo embrião.

Delgado (2010) demonstrou, em seus estudos com anatomia de sementes de *Eugenia*, que a produção de novas plantas ocorreu a partir da desdiferenciação de células de tecidos perivasculares localizados na região apical dos cotilédones. Isso sugere que a semente de *Eugenia pyriformis* tem todas as condições para regenerar e que, muitas vezes, a regeneração não ocorre porque o embrião pode receber compostos inibidores durante a germinação. Tais resultados estão em acordo com as análises de perfil metabólico do presente trabalho.

Os componentes de inibição produzidos durante a germinação das sementes de *Eugenia pyriformis* podem estar relacionados a processos oxidativos, à presença de fenólicos ou até mesmo de hormônios. O fracionamento da semente sugere que há interrupção da inibição da formação de novas plântulas, como consequência da germinação; por outro lado, esse fracionamento acarreta uma injúria, a qual também pode produzir efeitos sobre a capacidade regenerativa. Ao ser fracionada a semente pode, por exemplo, passar por processos oxidativos, como os demonstrados por Mittler (2002), nos quais as espécies reativas de oxigênio (ROS) agem como sinalizadoras na ativação de respostas ao estresse e como via de defesa. Assim, as ROS podem ser consideradas, inicialmente, indicadores celulares de estresse e mensageiras secundárias envolvidas na transdução de sinal em resposta ao estresse (Mittler 2002). As ROS podem agir degradando algumas membranas celulares e causar perda de material genético das células. Prejuízos como esses podem ter causado danos irreversíveis capazes de impedir, em parte, o processo de regeneração da semente.

Como já citado anteriormente, há diferença no perfil metabólico em sementes germinadas e depois fracionadas e sementes fracionadas e depois germinadas. Esses resultados podem sugerir que as sementes germinadas e depois fracionadas podem ter produzido mais radicais livres. Tais radicais livres teriam sido produzidos porque as células estavam em maior atividade metabólica; assim que as sementes foram fracionadas, essas produziram ainda mais radicais livres, produto de um estresse causado pelo corte.

Possivelmente, as células da semente não conseguiram produzir antioxidantes necessários para permitir a integridade das células. Resultados com embriões de milho (Leprince et al. 1990) mostraram uma diminuição na atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase, durante o processo de embebição, em estágios de intolerância à dessecação. Tais resultados podem estar associados com mudança no metabolismo (embebição) associado com diminuição de antioxidantes.

Alguns estudos mostram que os radicais livres acumulam porque sistemas removedores não são efetivos em organismos desidratados (Hendry 1993). Segundo Hoekstra et al. (1996), a atividade de radicais livres pode ser atenuada por removedores e pela presença do citoplasma no estado vítreo em sementes. Já nas sementes que foram fracionadas e depois germinadas os radicais livres podem ter agido no desenvolvimento de plântula.

Sabe-se que o metabolismo da semente no processo de germinação é intenso, seguindo o modelo clássico sugerido por Bewley e Black (1994) e Bewley (1997) para sementes ortodoxas. Já nas sementes recalcitrantes, como as de *Eugenia pyriformis*, a germinação normalmente ocorre no início da fase II, pois já estão embebidas, ou seja, permanecem com alto teor de água. Na análise do metabolismo de semente de *Arabidopsis*, do período de maturação até dessecação, perceberam-se alterações nos perfis metabólicos durante a transição do período de acúmulo de reservas em relação ao de maturação. O momento de dessecação das sementes foi associado a uma grande mudança no metabolismo, houve em geral redução nos níveis da maioria dos metabólitos associado com aumento geral na maioria dos aminoácidos com queda drástica dos aminoácidos ricos em azoto (Fait et al. 2006,).

Assim como os autores citam acima mudança no metabolismo da célula quando a semente começa a germinar, ou quando sementes *Arabidopsis* alteram seu metabolismo no processo de maturação, sementes de *Eugenia pyriformis* no processo de germinação podem produzir compostos capazes de alterar o perfil metabólico da fração oposta das sementes germinadas e depois fracionadas. De acordo com as análises de PCA do atual trabalho, ficou evidente que houve uma mudança no metabolismo da metade da semente oposta de sementes germinadas e depois fracionadas. Possivelmente, a semente, em seu processo de germinação, libera compostos que irão alterar a outra metade e isso pode ser revertido quando a semente for fracionada.

As metades também mostraram diferenças entre si, pois essas, quando comparadas metades opostas em seus primeiros períodos de desenvolvimento de raiz

primária com as metades opostas com períodos finas de desenvolvimento de raiz primária, apresentam distâncias expressivas, conforme mostram as análises de PCA.

Os resultados obtidos permitiram concluir que os metabólitos produzidos pela germinação das sementes de *Eugenia pyriformis* influenciam novas regenerações de plântulas e raízes. As sementes germinadas e depois fracionadas parecem ter mais componentes não favoráveis à germinação, enquanto que nas sementes fracionadas e depois germinadas os componentes metabólicos favoreceram a germinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amador, T.S., Barbedo, C.J. Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de *Eugenia pyriformis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46:814-21, 2011.
- Andrade, R.N.B., Ferreira, A.G.. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) - Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes 22:118-25, 2000.
- 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 29:337-48, 1999.
- Barroso, G.M., Peixoto, A.L., Costa, C.G., Ichaso, C.L., Lima, H.C. Sistemática das angiospermas do Brasil. Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- Bewley, J.D., Black, M. Seeds: physiology of development and germination. 2.ed. NewYork, Plenum Press, 1994.
- Bewley, J.D. Seed germination and dormancy. Plant Cell 9:1055-66, 1997
- Bewley, J.D., Black, M. Seeds: physiology of development and germination. New York, Plenum Press, 1985.
- Birch, A.E., Fenner, G.P., Watkins, R., Boyd, L.C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. Journal of Agricultural Food Chemistry 49:4502-4507, 2001.

- Buckenhüskes, H.J. Fermented vegetables. *In*: Doyle, P.D., Beuchat, L. R., Montville, T.J. (eds.). Food Microbiology: fundamentals and frontiers. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 1997. p.595–609.
- Delgado, L.F. Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de *Eugenia* (Myrtaceae). Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica, São Paulo. 2010.
- Delgado, L.F., Barbedo, C.J. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. Brazilian Archives of Biology and Technology 55: 583-590, 2012.
- Dore, J. Studies in the regeneration of horseradish. Annals of Botany 19: 127-137, 1955.
- Fait A., Angelovici R., Less H., Ohad I., Urbanczyk-Wochniak E., Ferni A.R., Galili, G. *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. Plant Physiol 142:839-54, 2006.
- Hendry, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. Seed Science Research 3: 141-53, 1993.
- Hoekstra, F.A., Wolkers, W.F., Buitink, J., Golovina, E.A. Desiccation tolerance and long term structural stability. *In*: Internation Workshop on Seeds: basic and applied aspects of seed biology, 5. 1995. Proceedings... Reading, University of Reading, p.1-12, 1996.
- Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães, R.M.; Strassburg, R.S. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. Acta Botanica Brasílica 21:539-551, 2007.
- Kraus, J.E., Arduin, M. Manual básico de método em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, Editora Universidade Rural, 1997.

- Leprince, O., Bronchart, R., Deltour, R. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea Mays* L.). *New Phytologist* 116:573-580, 1990.
- Magalhães, S.R., Borges, E.E.L, Berger, A.A. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de semente de *Schizolobium parahyba* (Vell.) durante a germinação. *Ciência Florestal* 20: 589-595, 2010.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant in Science* 9:405-10, 2002.
- Nkang, A. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *Journal of Plant Physiology* 159: 473-483, 2002.
- Roessner U., Luedemann A., Brust D., Fiehn O., Linke T., Willmitzer L., Fernie, A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 13:11-29, 2001.
- Romagnolo, M.B., Souza, M.C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20:529-48, 2006.
- Sakai, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* 48:247-249, 1973.
- Silva, C.V., Bilia, A.C., Maluf, A.M., Barbedo, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26:213-21, 2003.
- Silva, C.V., Bilia, A.C., Barbedo, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. *Revista Brasileira de Sementes* 27:86-92, 2005.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora não se possa afirmar que existam substâncias inibidoras da germinação e/ou da formação de novas plântulas, pois não foram analisadas neste trabalho, pode-se levantar novas hipóteses como a existência e ação de alguns hormônios, como ácido abscísico ou compostos fenólicos, influenciando os processos metabólicos das sementes de *Eugenia pyriformis*. Trabalho realizado por Amador et al. (2001) mostrou que extratos preparados a partir de sementes de *Eugenia pyriformis* possuem efeito inibidor sobre a germinação de sementes da própria espécie. Esse trabalho evidenciou que, possivelmente, a semente de *Eugenia pyriformis* produza substâncias inibidoras, e essas podem estar presentes nas sementes e migrar de um pólo a outro a fim de inibir o processo de desenvolvimento de uma segunda germinação. Algumas substâncias encontradas nas sementes podem interferir no processo de germinação, como pode ter acontecido nas sementes de *Eugenia pyriformis* nos diferentes tratamentos. Esses inibidores da germinação podem estar localizados em diferentes estruturas da semente. Para Sert et al. (2009), entre essas substâncias, destacam-se o ácido abscísico e os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos presentes na sarcotesta das sementes de mamão provocam inibição da germinação e do crescimento da raiz primária de alface (Tokuhisa et al. 2007). Após o fracionamento das sementes de *E. pyriformis* verifica-se um rápido escurecimento da superfície cortada, indicando um rápido processo de oxidação, provavelmente relacionado com a presença de compostos fenólicos (Caramori et al. 2008).

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. Segundo Amador e Barbedo (2011), os resultados obtidos a partir de sementes de *Eugenia pyriformis* mostraram que há processos de inibição do desenvolvimento de novas raízes, promovidos pelo desenvolvimento de uma raiz ou plântula na mesma semente, o que sugere que o componente inibidor está localizado na região onde ocorre a protrusão da raiz primária. É prematuro inferir que as frações de sementes que apresentaram menores taxas de germinação tenham recebido hormônios inibidores. Entretanto, não só o nível de ABA decresce, como também a sensibilidade da semente às aplicações exógenas diminui (Zeevaart e Creelman 1988, Fincher 1989, apud Barbedo 1997). Em sementes de *Sesbania marginata*, aplicações exógenas de ABA, nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-3} M, retardaram e inibiram, respectivamente, a

germinação (Fincher 1989). 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).

Pode-se sugerir, também, que o ambiente mais favorável à germinação esteja relacionado a hormônios como citocinina. As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos, estimulando a divisão celular, bem como a indução e a proliferação de brotações adventícias (George e Sherrington 1984). Análises feitas por Perilli (2010), com expressão gênica, revelaram que as citocininas são produzidas em estágios de desenvolvimento específicos e em diferentes órgãos, incluindo as raízes, parte aérea e tecido vascular. Assim, sementes fracionadas e depois germinadas podem ter recebido mais componentes favoráveis a germinação, como citocininas e giberilinas. Picolotto (2007) mostrou que ação de citocinina e giberelina na germinação de sementes de pessegueiro permitiu antecipar a germinação, sendo que o uso do BA + GA₄₊₇ é mais eficiente na indução e antecipação da germinação, no aumento da porcentagem de germinação e nos índices de velocidade de germinação.

Segundo Flores (1998), em seu trabalho realizado com espinheira santa, as análises de variação para a porcentagem de regeneração em função dos tipos de explantes, teste com citocinina, mostrou diferença estatística significativa apenas para o tipo de citocinina (BAP e KIN) testada. As análises realizadas com gráfico de PCA neste trabalho mostraram que pode-se sugerir que em sementes fracionadas e depois germinadas apresentaram-se mais compostos favoráveis a germinação em relação a sementes germinadas e depois fracionada. Tal composto favorável a germinação pode estar relacionado a citocinina (Metivier 1986) que pode ter agido como um estimulador da germinação.

Nas análises de PCA do presente trabalho ficou demonstrado que as sementes que foram fracionadas e depois germinadas podem ter recebido estímulos favoráveis à germinação, o que corrobora com a hipótese dessas sementes terem perdido o efeito da ação inibidora ao serem cortadas. Sendo assim, essas podem ter recebido mais citocininas e menor ação do ácido abscísico, por exemplo, promovendo assim maior estímulo germinativo. O balanço entre estímulo e inibição à germinação é favorável a este último quando se inicia a germinação, mas diminui na fração que é removida por corte. Portanto, pode-se supor que as sementes de *Eugenia* produzam um componente

inibidor, e esse pode ser produzido em um dos pólos da semente. Sementes que iniciaram a germinação e foram então cortadas, ainda que com a zona meristemática presente, não formaram plântulas na superfície do corte, diferente do que ocorreu na zona meristemática oposta, onde houve formação de plântula na superfície do corte (Anjos e Ferraz 99). Tal fato mostra a polaridade da semente que deve se basear na migração dos hormônios auxina e citocinina observada em caules (Fosket 1994, Mohr e Schopher, 1995). Resultados como estes vem de encontro com resultados obtidos no atual trabalho, no qual se mostrou que as sementes de *Eugenia pyriformis* receberam mais estímulos a germinação quando fracionadas e depois germinadas e o contrário foi verdadeiro para sementes germinadas e depois fracionadas. Os hormônios migram e estimulam, nas sementes fracionadas e depois germinadas; já nas sementes germinadas e depois fracionadas, esses hormônios foram recebidos, mas os fatores anularam seu efeito, porque essas sementes permaneceram mais tempos intactas.

O corte na semente de uvaia também pode atuar como uma quebra do efeito ao estímulo inibidor. Tal resultado foi visto nos trabalhos de Silva et al. (2003) e Silva et al. (2005), os quais mostraram que a germinação nunca foi superior a 100% de sementes de *Eugenia* não fracionadas o que pode indicar que a regeneração de um segundo embrião em uma mesma semente só ocorre quando a mesma é fracionada. Logo, acredita-se que as sementes que receberam mais estímulos a germinação foram justamente aquelas fracionadas e depois germinadas, pois essas não tiveram tempo necessário para receber os componentes inibidores.

As sementes de *Eugenia pyriformis*, embora sendo monoembriônicas, tem capacidade de regenerar novas plântulas quando fracionadas. No entanto, essa capacidade regenerativa é fortemente inibida pela germinação. A inibição promovida por essa germinação tem efeito mais expressivo que algum estímulo provocado pelo corte das sementes. Portanto a capacidade regenerativa não está relacionada ao corte (injúria) e, sim, aos metabólitos produzidos durante o processo germinativo que agem como inibidores do desenvolvimento de uma nova planta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO, REVISÃO LITERÁRIA E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Amador, T.S., Barbedo, C.J. Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de *Eugenia pyriformis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46:814-821, 2011.
- Andrade, R.N.B., Ferreira, A.G. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) - Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes 22:118-125, 2000.
- Angiosperm Phylogeny Group. Disponível em: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html>. Acesso em 10 de junho de 2010.
- 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 29:337-348, 1999.
- Apel, M.A., Sobral, M., Schapoval, E.E.S., Henriques, A.T. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: section *dichotomae*. Journal Essential Oil Research 16:191-192, 2004.
- Araújo, D.S.D., Henriques, R.P.B. Análise florística das restingas do Estado do Rio de Janeiro. In: Lacerda, L.D., Araújo, D.S.D. Cerqueira, R., Turcq, B. (orgs.). Restingas: origem, estrutura, processos. Niterói, CEUFF, 1984, p.159-163.
- Assis, A.M., Thomaz, L.D., Pereira, O.J. Florística de um trecho de floresta de restinga no município de Guarapari, Espírito Santo, Brasil. Acta Botanica Brasilica 18:191-201, 2004.
- Barbedo, C.J., Marcos-Filho, J. Tolerância à dessecação de sementes. Acta Botanica Brasilica 12:145-164, 1998.
- Barbedo, C.J. Armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova 29:113-123, 2006.
- Barroso, G.M., Peixoto, A.L., Costa, C.G., Ichaso, C.L., Lima, H.C. Sistemática das angiospermas do Brasil. Viçosa: Editora UFV, 1984.
- Barroso, G.M., Peron, M.V. Myrtaceae. In: Lima, R.R., Guedes-Bruni, R.R. (Orgs.). Reserva ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo: aspectos florísticos das espécies vasculares. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 1994, p.261-302.

- Barroso, G.M. Sistemática de angiospermas do Brasil. 2.ed. Viçosa, Editora UFV, 2002.
- Batygina, T.B., Vinogradova, G.Y. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. Russian Journal of Developmental Biology 38:126-151, 2007.
- Beltrati, C.M., Paoli, A.A.S. Semente. *In*: Apezato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M. Anatomia vegetal. Viçosa, Editora UFV, 2003, p.399-424.
- Bewley, J.D. Seed germination and dormancy. Plant Cell 9:1055-1066, 1997.
- Bewley, J.D., Black, M. Seeds: physiology of development and germination. New York, Plenum Press, 1985.
- Bewley, J.D., Black, M. Seeds: physiology of development and germination. New York, Plenum Press, 1986.
- Bewley, J.D., Black, M. Seeds: physiology of development and germination. 2 ed. New York, Plenum Press, 1994.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília, SNDA/DNDV/CLAV, 1992.
- Bryant, J.A. Fisiologia das sementes. São Paulo, Editora Pedagógica Universitária, 1989.
- Buckeridge, M.S., Dietrich, S.M.C., Lima, D.U. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. *In*: Gupta, A.K., Kaur, N. Carbohydrate reserves in plants - synthesis and regulation. Paris, Elsevier, 2000, p.283-316.
- Caramori, S.S., Souza, A.A., Fernandes, K.F. Caracterização bioquímica de frutos de *Inga alba* (Sw.) Willd. e *Inga cylindrica* Mart. (Fabaceae). Revista Saúde e Ambiente 9:16-23, 2008.
- Carvalho, N.M., Nakagawa, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal, Funep, 2000.
- Castro, R.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In*: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Orgs.). Germinação do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, 2004, p.53-65.
- Chappell Jr, J.H., Cohn, M.A. Corrections for interferences and extraction conditions make a difference: use of the TBARS assay for lipid peroxidation of orthodox *Spartina pectinata* and recalcitrant *Spartina alterniflora* seeds during desiccation. Seed Science Research 21:153-158, 2011.
- Darwin, C.A origem das espécies. Tradução Eugênio Amado. Belo Horizonte, Editora Vila Rica, 1859.

- Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C.A., Pritchard, H.W. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162:157-166, 2004.
- Delgado, L.F., Barbedo, C.J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42:265-272, 2007.
- Delgado, L.F., Barbedo, C.J. Atividade inibidora da germinação em extratos de sementes *Eugenia uniflora* L. *Revista Brasileira de Sementes* 33: 463-471, 2011.
- 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* 38:624-34, 2010.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Science* 98:13454-13459, 2001.
- Dietrich, S.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Chu, E.P., Buckeridge, M.S. O açúcar das plantas. *Ciência Hoje* 7:42-48, 1988.
- Donadio, L.C., Moro, F.V. Potential of brazilian *Eugenia* Myrtaceae as ornamental and as a fruit crop. *Acta Horticulture* 632:65-68, 2004.
- Dore, J. Studies in the regeneration of horseradish. *Annals of Botany* 19:127-137, 1955.
- Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82:47- 85, 2002.
- Einhelling, F.A., Schon, M.K., Rasmussem, J.A. Sinergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain sorghum. *The Plant Journal* 4:251-58, 1982.
- Esau, K. *Plant anatomy*. 2 ed. Tokyo, Toppan Company Ltda. 1965.
- Fincher, G.B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:305-346, 1989.
- Flores, R., Stefanello, S., Franco, E.T.H., Mantovani, N. Regeneração in vitro de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Revista Brasileira de Agrociência* 4: 201-205, 1998.
- Fosket, D.E. *Plant growth and development: a molecular approach*. New York, Academic Press, 1994.
- Fraga, A.C. Dormência de sementes. *Informe Agropecuário* 8: 62-64, 1982.

- Garcarrubio, A., Legaria, J.P., Covarrubias, A.A. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203:182-187, 1997.
- George, E.F., Sherrington, P.D. Plant propagation by tissue culture. Eversley, Exegetics Limited, 1984.
- Grant, V. Plant Speciation. New York, Columbia University Press, 1971.
- Green, T.R., Ryan, C.A. Wound induced proteinase inhibitors from tomato leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175:776-777, 1972.
- Gressler, E., Pizo, M.A., Morellato, P.C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29:509-530, 2006.
- Gurgel, J.T.A., Soubiê S.J. Poliembrionia em mirtáceas frutíferas. *Bragantia* 11:141-163, 1951.
- Henderson, J.H.M., Nitsch, J.P. Effect of certain phenolic acids on the elongation of *Avena* first internodes in the presence of auxin and tryptophan. *Nature* 195: 780-782, 1962.
- Hendry, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research* 3: 141-153, 1993.
- Hoekstra, F.A., Wolkers, W.F., Buitink, J., Golovina, E.A. Desiccation tolerance and long term structural stability. *In: International Workshop on seeds: basic and applied aspects of seed biology*, 5. 1995, Reading. Proceedings... Reading: University of Reading, 1996, p.1-12.
- Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães, R.M., Strassburg, R.S. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. *Acta Botanica Brasílica* 21:539-551, 2007.
- Kader, A.A. Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. *HortScience* 20:54-57, 1985.
- Kawasaki, M.L. A família Myrtaceae na serra do cipó, Minas Gerais, Brasil. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.
- Kermode, A.R. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24:319-344, 2005.
- Kigel, J., Galili, G. Seed development and germination. 2ed. New York, Plenum Press, 1995.

- Klein, R.M. Importância sociológica das mirtáceas nas florestas rio-grandensis. *In*: Congresso Nacional de Botânica, 24, 1990, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil, 1990, 367-375.
- Lamarca, E.V., Silva, C.V., Barbedo, C.J. Limites térmicos para a germinação em função da origem de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) nativas do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 25:293-300, 2011.
- Lamarca, E.V., Baptista, W., Rodrigues, D.S., Oliveira Junior, C.J.F. Contribuições do conhecimento local sobre o uso de *Eugenia* spp. em sistemas de policultivos e agroflorestais. *Revista Brasileira de Agroecologia* 8:119-130, 2013.
- Leitão Filho, H.F. Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão (SP). Campinas, Editora da Universidade Estadual de Campinas, 1993.
- Lemos, M.C., Pellens, R., Lemos, L.C. Perfil e florística de dois trechos de mata litorânea no município de Maricá - RJ. *Acta Botanica Brasilica* 15:321-334, 2001.
- Leprince, O., Buitink, J., Hoekstra, F.A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *Journal of Experimental Botany* 50:1515-1524, 1999.
- Lodhi, M.A.K. Germination and decreased growth of *Kochia scoparia* in relation to its autoallelopathy. *Canadian Journal of Botany* 57:1083-1088, 1982.
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Plantarum, 1992.
- Lucas, E.J., Belsham, S.R., Nic Lughadha, E.M., Orlovich, D.A., Sakuragui, C.M., Chase, M.W., Wilson, P.G. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae: preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 251:35-51, 2005.
- Lughadha, E.N., Proença, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83:480-503, 1996.
- 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* 12:180-183, 2001.
- Maciel, A.S., Borges, E.E.L., Borges, R.C.G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. *Revista Brasileira de Sementes* 14: 1-8, 1992.
- Marchiori, J.N.C., Sobral, M. Dendrologia das angiospermas: Myrtales. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 1997.

- Marcos Filho, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba, Fealq, 2005.
- Martins, C.C., Bovi M.L.A., Nakagawa, J., Machado, C.G. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. *Revista Árvore* 33:635-642, 2009.
- Mattana, E., Daws, M.I., Fenu, G., Bacchetta, G. Adaptation to habitat in *Aquilegia* species endemic to Sardinia (Italy): seed dispersal, germination and persistence in the soil. *Plant Biosystems* 146:374-383, 2012.
- Mattos, J. R. Estudos promológicos dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, SIPA, 1956.
- Mayer, A.M., Polfakoff-Mayber, A. The germination of seeds. New York, McMillan, 1980.
- Medeiros, A.C.S. Aspectos de dormência em sementes de espécies arbóreas. Colombo, EMBRAPA Florestas, 2001.
- Meheriuk, M., Spenser, M. Ethylene production during germination of oat seeds and *Penicillium digitatum* spores. *Canadian Journal of Botany* 42:337-340, 1964.
- Melo, F.P.L., Aguiar Neto, A.V., Tabarelli, M.S. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. *In: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Orgs.). Germinação: do básico ao aplicado.* Porto Alegre, Artmed, 2004, p. 237-241.
- Menezes, M. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e de proteínas resistentes ao calor. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- Merwe, M.M., Wyk, A.E., Botha, A.M. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern Africa taxa. *Plant Systematic and Evolution* 251:21-34, 2005.
- Metivier, J.R. Citocininas e giberelinas. *In: Ferri, M.G. Fisiologia vegetal.* 2ed. São Paulo, EDUSP, 1986, p.93-162.
- Metivier, J.R. Dormência e germinação. *In: Ferri, M.G. Fisiologia vegetal.* 2ed. São Paulo, EDUSP, 1979, p.343-92.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 9:405-410, 2002.
- Mohr, H., Schopfer, P. *Plant physiology.* Berlin, Springer Verlag, 1995.
- Mori, S.A., Boom, B.M., Carvalino, A.M., Santos, T.M. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern brazilian wet forest. *Biotropica* 15:68-70, 1983.
- Neill, S., Bright, J., Desika, R., Hancock, J., Harrision, J., Wilson, I. Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany* 59:25-35, 2008.

- Neves, L.J., Donato, A.M. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae). *Bradea* 5:273-286, 2002.
- Nikolaeva, M.G. On criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Science Research* 14:315-320, 2004.
- Oliveira, E.N.A., Santos, D.C., Sousa, F.C., Martins, J.N., Oliveira, S.P.A. Obtenção de uvaia desidratada pelo processo de liofilização. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* 4:235-442, 2010.
- Oliveira, L.M. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl. Nich. e *Tabebuia impetiginosa* (Martius Ex A. P. De Candolle Standley) envelhecidas natural e artificialmente. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- Pammenter, N.W., Berjak, P., Farrant, J.M., Smith, M.T., Ross, G. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? *Seed Science Research* 4:187-191, 1994.
- Pegoraro, A., Ziller, S.R. Valor apícola das espécies vegetais de duas fases sucessionais da floresta ombrófila mista, em União da Vitória Paraná - Brasil. *Boletim de Pesquisa Florestal* 47:69-82, 2003.
- Peixoto, A.L., Gentry, A. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 13:19-25, 1990.
- Perilli S., Moubayidin L., Sabatini S. The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion on Plant Biology* 13:21-26, 2010.
- Picolotto, L., Bianchi, W.J., Fachinello, J.C. Ação de giberelinas e citocininas na germinação de sementes de pessegueiro. *Scientia Agraria* 8: 225-232, 2007.
- Pio Corrêa, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.
- Popinigis, F. Fisiologia de sementes. Brasília, AGIPLAN, 1985.
- Potomati, A., Buckeridge, M.S. Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgate* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:303-310, 2002.
- Pott, A., Pott, V.J. Plantas do Pantanal. Brasília, Embrapa, 1994.
- Reitz, P., Kein, R.M., Reis, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Secretaria da Agricultura e Abastecimento, 1988.
- Rizzini, C.T. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* D.C. *Revista Brasileira de Biologia* 30:381-402, 1970.

- Rodrigues, R.R., Nave, A.G. Heterogeneidade florística das matas ciliares. *In*: Rodrigues, R.R., Leitão Filho, H.F. (eds.). Matas ciliares: conservação e recuperação. São Paulo, Edusp/Fapesp, 2000, p.45-71.
- Romagnolo, M.B., Souza, M.C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20:529-548, 2006.
- Sales, J.F. Atividade da celulose sobre o processo germinativo de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- Salisbury, F.B., Ross, C.W. Plant physiology. Belmont, Wadsworth Publishing, 1992.
- Scandalios, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology* 101:7-12, 1993.
- Schmeda-Hirschman, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E.B., Arias, A.R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 21:183-186, 1987.
- Sert, M.A., Bonato, C.M., Souza, L.A. Germinação de sementes. *In*: Souza, L.A. (org.). Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa, Toda Palavra, 2009, p.91-118.
- Silva, L.L., Paoli, A.A.S. Caracterização morfoanatômica da semente de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. – Rutaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 22: 250-256, 2000.
- Silva, C.V., Bilia, A.C., Barbedo, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. *Revista Brasileira de Sementes* 27:86-92, 2005.
- Silva, C.V., Bilia, A.C., Maluf, A.M., Barbedo, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.- Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26:213-221, 2003.
- Siviero, A., Delunardo, T.A., Haverroth, M., Oliveira, L.C., Mendonca, A.M.S. Cultivo de espécies alimentares em quintais urbanos de Rio Branco, Acre, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 25:549-556, 2011.
- Smalle, J., Van Der Straeten, D. Ethylene and vegetative development. *Physiologia Plantarum* 100:593-605, 1997.
- Smiderle, O.J., Sousa, R.C.P. Dormência em sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth - Fabaceae- Papilionidae). *Revista Brasileira de Sementes* 25:72-75, 2003.
- Stebbins, G.L. Variation and Evolution in Plants. New York, Columbia University

- Press, 1950.
- Stefanello, M.E.A., Pascoal, A.C.R.F., Salvador, M.J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry and Biodiversity* 8:73-94, 2011.
- Taiz, L., Zeiger, E. *Plant physiology*. Washington, Cummings, 1991.
- Taiz, L., Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 3ed. Porto Alegre, Artmed, 2006.
- Takayanagi, K., Harrington, J.F. Enhancement of germination rate of aged seeds by ethylene. *Plant Physiology* 47:521-524, 1971.
- Teixeira, C.C., Barbedo, C.J. The development of seedlings from fragments of monoembryonic seeds as an important survival strategy for *Eugenia* (Myrtaceae) tree species. *Trees* 26:1069-1077, 2012.
- Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E.B., Schmeda-Hirschmann, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 24:179-183, 1988.
- Tokuhisa, D., Dias, S.D.C.F.S., Varenga, E.M., Hilst, P.C., Demunera, A.J. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 29:180-188, 2007.
- Tonini, P.P., Purgato, E., Buckeridge, M.S. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). *Annals of Botany* 106:607-616, 2010.
- Torres, D.E.G., Mancini, D.A.P., Torres, R.P., Mancini-Filho, J. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L) extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104:278–281, 2002.
- Weaver, R.J. *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. 5ed. Barcelona, Trillas, 1987.
- Zago E., Morsa S., Dat J.F., Alard P., Ferrarini A., Inzé D., Delledonne M., Breusegem F. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology* 141:404-411, 2006.
- Zamith, L.R., Scarano, F.R. Produção de mudas de espécies das restingas do município do Rio de Janeiro. *Acta Botanica Brasilica* 18:161-176, 2004.
- Zenk, M.H., Muller, G. In vivo destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid as influenced by naturally occurring phenolic acids. *Nature* 200:761-63, 1963.