

LILIANA FERREIRA DELGADO

Fracionamento, maturação e origem da capacidade
regenerativa de sementes de algumas espécies
brasileiras de *Eugenia* (Myrtaceae)

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo
2010

LILIANA FERREIRA DELGADO

Fracionamento, maturação e origem da capacidade
regenerativa de sementes de algumas espécies
brasileiras de *Eugenia* (Myrtaceae)

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO
CO-ORIENTADORA: Prof.^a Dra. SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Delgado, Liliana Ferreira

D352f Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de *Eugenia* (Myrtaceae) / Liliana Ferreira Delgado -- São Paulo, 2010.

92 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010
Bibliografia.

1. Semente. 2. Anatomia. 3. Regeneração. I. Título

CDU: 631.53.01

Dedico este trabalho a meus pais, que com seu amor incondicional e sua dedicação me permitiram chegar até aqui e a meu marido Antonio pela nova família formada durante a realização deste curso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de crescimento e pelas pessoas colocadas em meu caminho para me ajudarem durante esta trajetória.

Agradeço ao Instituto de Botânica que me abriu suas portas, possibilitando a execução deste e de outros trabalhos em suas instalações.

À FAPESP pelo auxílio financeiro ao Projeto “Carboidratos de plantas tropicais como moduladores de processos ecofisiológicos e indicadores de respostas a estresses ambientais”, no Programa Biota (Processo 2005/04139-7).

Ao CNPq pelo apoio ao projeto “Manutenção da viabilidade de sementes de espécies arbóreas tropicais como estratégia de conservação da diversidade vegetal” (processo nº 481484/2007-8).

À Secretaria da Educação do Estado de São Paulo pela concessão da “Bolsa mestrado”.

Ao meu orientador, Claudio José Barbedo, pela sua valiosa orientação, por sua inestimável dedicação, amizade, ajuda, incentivo na realização dos estudos e principalmente por ser um exemplo de ética, coerência e seriedade profissional. Por me acolher em seu grupo de pesquisa baseado na confiança, respeito e crescimento científico de todos os integrantes.

À minha co-orientadora Dra. Simone de Pádua Teixeira, pela amizade, atenção a mim dedicada, por ter me aceitado de braços abertos em seu grupo de pesquisa sempre me apoiando e me oferecendo seu conhecimento em uma área extremamente nova para mim, por ter acreditado e confiado em meu trabalho.

Aos membros da Banca de qualificação: Dra Sandra M. Carmelo-Guerreiro, Dr Nelson Augusto dos Santos Júnior e Dra Angela Maria Ladeira pelas valiosas críticas e sugestões.

À Seção de Anatomia e Morfologia do Instituto de Botânica de São Paulo, principalmente a Dra Edenise e a sua aluna Andréa pelo auxílio e pela possibilidade de utilização do laboratório.

Aos meus amigos do laboratório, Carmem, Carolina, João Paulo, Lamarca, Márcio, Nestor, Talita e Karen, pelo apoio no decorrer deste trabalho, pela ajuda nas contagens, pelas trocas de bibliografias, pelas discussões científicas, pelas caronas, pelos cafés e conversas intermináveis e muito engraçadas que pautaram uma convivência muito rica e harmoniosa.

Aos novos amigos do laboratório de botânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, onde desenvolvi parte deste trabalho de pesquisa, Andréa, Camila, Gisele, João Paulo, Juliana, Liana, Thais, Viviane e em especial a Juliana e Marina pela atenção, apoio,

companheirismo e principalmente por estarem sempre prontas para ajudar no que fosse necessário.

Aos Técnicos do laboratório de botânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Mário Sadaiti Ogasawara e Edimárcio da Silva Campos pelo auxílio durante os experimentos, pela paciência e por estar sempre acessíveis e dispostos a ajudar.

À técnica Vani Maria Alves Corrêa, do laboratório de Histotecnologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo tratamento atencioso, valioso auxílio técnico e pela paciência em me ensinar as técnicas histológicas.

À Juliana Iura de Oliveira Mello, pela valiosa amizade, companheirismo e auxílio em todos os meus momentos no laboratório, desde a realização dos experimentos até o seu término na parte escrita.

À Debora M. Molizane, pelo auxílio na elaboração das pranchas, sem ela as imagens não estariam boas.

Ao Danilo Centeno pelo auxílio no abstract.

Aos meus pais pela herança de valores que contribuíram e contribuem para as minhas realizações.

A meu irmão pela compreensão das infinitas horas em frente ao computador e por sempre ter um programa para solucionar meus problemas.

A meu marido pela compreensão, pelo amor e pela paciência, pois sem estas características seria impossível a conciliação entre estudo, casa e trabalho.

A todas as pessoas especiais que com respeito e carinho que me motivaram e incentivaram em mais esta etapa.

A todas as instituições e pessoas que direta ou indiretamente também me auxiliaram, apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Introdução Geral	1
Objetivo Geral	6
Capítulo 1 - Regaining germinability after cutting: a new phenomenon for seeds and a common one for <i>Eugenia</i> (Myrtaceae) tropical tree species?	7
Introduction	8
Material and Methods	9
Results	11
Discussion	20
Acknowledgements	22
References	22
Capítulo 2 - Regeneração da capacidade germinativa de sementes de <i>Eugenia cerasiflora</i> (Myrtaceae) em diferentes estádios de maturação	25
Introdução	26
Objetivo	28
Material e Métodos	28
Resultados	29
Discussão	34
Referências Bibliográficas	36
Capítulo 3 - Anatomia de sementes de <i>Eugenia</i> com ênfase em seu potencial regenerativo	39
Introdução	40
Objetivo	41
Material e Métodos	41
Resultados	42
Discussão	50
Referências Bibliográficas	53
Capítulo 4 - Atividade inibidora da germinação em extratos de sementes de <i>Eugenia uniflora</i>	56
Introdução	57
Objetivo	58
Material e Métodos	58
Resultados	60
Discussão	67

Referências Bibliográficas	69
Discussão Geral	71
Resumo	75
Abstract	76
Referências Bibliográficas Citadas na Introdução e Discussão Geral	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1 - Seeds of *Eugenia species* after different cutting methods. A: whole intact (uncut) seed - WIS; B: seed cut transversally into two similar parts (*htp*: half transversal part); C: seed cut longitudinally into two similar parts (*hlp*: half longitudinal part); D: seed cut transversally into two different parts, using only 3/4 of the right side, hilum included (*tqs* = three quarters of a seed); E: seed cut into four similar parts, two of them used as treatments (*qep*: a quarter of a seed, external part; *qip*: a quarter of a seed, internal part). **11**

Figure 2 - Seeds and seedlings of *E. cerasiflora* (A, B and E to J), *Eugenia pruinosa* (C and D) and *E. umbelliflora* (K and L). A. Whole intact seed, hilum showed by arrow; B. Embryo (note that is difficult to identify different parts as cotyledons or axe; the embryo looks like a uniform mass); C. Germinating fragments of a seed which was cut into four parts, one of them (at right) developing normal seedling. Note the development of radicles from the internal part of the fragments, one of the fragment with an appearance of a second radicle; D and F. Damaged (by insects) seeds of two different species maintaining the germination ability. Note that in F more than half of a seed was removed; E. internal aspect of a non-damaged seed with the development of a radicle; G. Internal fraction of a seed (which were cut into 4 parts) with the development of a normal seedling; H. Fragment of a seed which had removed (by insects) most of its storage reserves and even so developed a normal seedling; I. Multiple radicles developed from a fragment of a seed cut transversally into two parts. This picture shows an often occurrence when aerial part had no development from cut seeds of all species; J. Internal fragment of a seed with the development of one radicle and two aerial parts; K. Normal seedling developed from a fragment of a non-damaged seed; L. Plantlets developed from fragments of seeds. Scale: 1 cm. **15**

Figure 3 - Germination of seeds of *Eugenia cerasiflora* (A), *E. umbelliflora* (B) and

E. pruinosa (C) after different cutting treatments: WIS = whole intact (uncut) seed; HTP = half transversal part; HLP = half longitudinal part; TQS = three quarters of a seed; QEP = a quarter of a seed, external part; QIP = a quarter of a seed, internal part. 16

Figure 4 - Normal seedling development of seeds of *Eugenia cerasiflora* (A), *E. umbelliflora* (B) and *E. pruinosa* (C) after different cutting treatments: WIS = whole intact (uncut) seed; HTP = half transversal part; HLP = half longitudinal part; TQS = three quarters of a seed; QEP = a quarter of a seed, external part; QIP = a quarter of a seed, internal part. 17

Figure 5 - Germination rise of seeds of *Eugenia cerasiflora* (A), *E. umbelliflora* (B) and *E. pruinosa* (C) after cutting into two or four fragments. WIS: whole intact (uncut) seeds; HLP: seeds cut longitudinally into two similar parts; HTP: seeds cut transversally into two similar parts; TQ: seeds cut transversally into two different parts, one of them with 3/4 of a seed; FP: seeds cut transversally into four parts. 18

Figure 6 - Seedling production rise (SR) of seeds of *Eugenia cerasiflora* (A), *E. umbelliflora* (B) and *E. pruinosa* (C) after cutting into two or four fragments. WIS: whole intact (uncut) seeds; HLP: seeds cut longitudinally into two similar parts; HTP: seeds cut transversally into two similar parts; TQ: seeds cut transversally into two different parts, one of them with 3/4 of a seed; FP: seeds cut transversally into four parts. 19

Figura 7 – Frutos de *Eugenia cerasiflora* em cada um dos estádios de desenvolvimento analisados (a). Visão geral do fruto do último estágio (b), da semente (c) e do embrião (d). 31

Figura 8 - Fator de incremento na germinação (FIG) para sementes de *Eugenia cerasiflora* em diferentes estádios de maturação, intactas ou submetidas a fracionamento ao meio em corte transversal. 33

Figura 9 - Fator de incremento na produção de plântulas normais (FIP) para sementes de *Eugenia cerasiflora* em diferentes estádios de maturação, intactas ou submetidas a fracionamento ao meio em corte. 33

Figura 10 - Visão geral dos frutos, semente e embrião de cereja - *Eugenia involucrata* (a, b, c), guamirim - *E. cerasiflora* (d,e,f) e pitanga - *E. uniflora* (g,h,i). 44

Figura 11 - Sementes maduras fixadas em FNT de *Eugenia cerasiflora* (A) e *E. involucrata* (C) com pequena protuberância rodeada por uma depressão circular distinguindo o eixo hipocótilo-radícula a olho nu (seta) e em *E. uniflora* (E) esta distinção do embrião não foi evidente. Seções anatômicas do eixo hipocótilo- 45

radícula em *Eugenia cerasiflora* (B), *E. involucrata* (D) e *E. uniflora* (F) apontados pela seta.

Figura 12 - Seções anatômicas de cotilédones de espécies de *Eugenia*. (A e D) epiderme unisseriada e união dos cotilédones de *Eugenia involucrata*. B e E epiderme unisseriada com cutícula (seta) e união dos cotilédones de *E. cerasiflora*. (C e F) epiderme unisseriada e união dos cotilédones de *E. uniflora*. (G) feixes vasculares em *E. cerasiflora* em vista longitudinal. (H) tecido de cicatrização, constituído por células parenquimáticas alongadas, diferentes das células cotiledonares. 46

Figura 13 - Seções anatômicas de cotilédones de espécies de *Eugenia*. (A, C e E) apontado pela seta feixe vascular do ápice do cotilédone da fração ao zero dia de germinação (controle) de *Eugenia involucrata*, *E. cerasiflora* e *E. uniflora* respectivamente (B, D e F) apontado pela seta a divisão periclinal e proliferação das células parenquimáticas perivasculares (setas), aos 9 dias de germinação após o fracionamento, de *Eugenia involucrata*, *E. cerasiflora* e *E. uniflora* respectivamente. 47

Figura 14 – (A) seção transversal do embrião fixado em FNT de *Eugenia involucrata* (cereja-do-mato) com visualização dos feixes vasculares na periferia do cotilédone (seta). (B) cavidade secretora em detalhe. (C e D) saída da radícula na fração inicial e na sua fração oposta. E nova planta formada na fração oposta. F plúmula em detalhe. 48

Figura 15 – (A) seção transversal do embrião fixado em FNT de *Eugenia cerasiflora* (guamirim) com visualização dos feixes vasculares na periferia do cotilédone (seta). (B) cavidades secretoras. (C) saída da radícula na fração oposta, submetida ao fracionamento e plúmula (seta). 49

Figura 16 – (A) seção transversal do embrião fixado em FNT de *Eugenia uniflora* (pitanga) com visualização dos feixes vasculares na periferia do cotilédone (seta). (B) cavidade secretora em detalhe. (C) eixo hipocótilo-radícula, em vista transversal, em semente madura não submetida ao fracionamento (D) saída da radícula na fração oposta, submetida ao fracionamento. 50

Figura 17 – Ilustração esquemática evidenciando os feixes vasculares em corte transversal e longitudinal em sementes de *Eugenia involucrata*. 50

Figura 18 – Germinação (G%) de sementes de *Eugenia uniflora* em relação ao tempo (dias) em água ou soluções etanólicas: semente não germinada a 0,001% (I - 1), semente não germinada a 0,01% (I - 10), semente com raiz primária retirada a 65

0,001% (R – 1), semente com raiz primária retirada a 0,01% (R – 10), semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,001% (P – 1) e semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,01% (P – 10), respectivamente.

Figura 19 – Plântulas de alface (A) após sete dias de germinação e sementes de feijão (B) após sete dias de germinação nas seguintes soluções etanólicas de *Eugenia uniflora*: controle (C), semente não germinada a 0,001% (I -1), semente não germinada a 0,01% (I – 10), semente com raiz primária retirada a 0,001% (R – 1), semente com raiz primária retirada a 0,01% (R – 10), semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,001% (P – 1) e semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,01% (P – 10), respectivamente. **66**

Figura 20 - Sementes de feijão germinadas nos seguintes extratos de sementes de *Eugenia uniflora*: água (A), semente não germinada a 0,01% (I-10) (B), semente com raiz primária retirada a 0,01% (R-10) (C), semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,01% (P-10) (D), PEG -0,2 MPa (E) e NaCl -0,2 MPa (F). **67**

ÍNDICE DE TABELAS

Table 1 - Germination increasing factor (GIF) and seedling increasing factor (SIF) for seeds of *Eugenia umbelliflora*, *E. pruinosa* and *E. cerasiflora* after different cutting treatments (WIS: whole intact (uncut) seeds; HLP: seeds cut longitudinally into two similar parts; HTP: seeds cut transversally into two similar parts; TQ: seeds cut transversally into two different parts, one of them with 3/4 of a seed; FP: seeds cut transversally into four parts. Means sharing the same letter are not significantly different into each species ($P>0.05$; Tukey's HSD). **14**

Tabela 2 - Valores obtidos para conteúdo de massa seca (MS%) e teor de água (U%) em sementes de *Eugenia cerasiflora* em diferentes estádios de maturação durante os anos de 2005 e 2007. **32**

Tabela 3 - Valores obtidos nos anos de 2005 e 2007 para germinação (G%) e plântulas normais (PN%) em sementes de *Eugenia cerasiflora*, em diferentes estádios de maturação, intactas ou submetidas a fracionamento, sendo computada apenas uma das frações. **32**

Tabela 4 - Efeito dos extratos sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Eugenia uniflora* (pitanga) intactas ou submetidas a fracionamento ao meio em corte transversal, **62**

sendo computada apenas uma das frações.

Tabela 5 - Efeito dos extratos sobre o tempo médio e a variância do tempo médio da germinação em sementes de *Eugenia uniflora* (pitanga) intactas ou submetidas a fracionamento ao meio em corte transversal, sendo computada apenas uma das frações. **62**

Tabela 6 - Efeito dos extratos sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio (Tm) em sementes de *Lactuca sativa* (alface). **63**

Tabela 7 - Efeito dos extratos sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Phaseolus vulgaris* (Feijão). **63**

Tabela 8 – Valores da água e do potencial hídrico das soluções obtidas a partir do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* (pitanga). **63**

Tabela 9 - Efeito das soluções com diferentes potenciais hídricos sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Lactuca sativa* (alface). **64**

Tabela 10 - Efeito das soluções com diferentes potenciais hídricos sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Phaseolus vulgaris* (Feijão). **64**

INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica, complexo e exuberante conjunto de ecossistemas, de grande importância por abrigar uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil, é também um dos biomas mais ameaçados do mundo devido às constantes agressões ou ameaças de destruição dos habitats nas suas variadas tipologias e ecossistemas associados (Fundação SOS Mata Atlântica/INPE 2002). Ao processo intenso e contínuo de exploração e devastação de matas nativas, que resulta no extermínio de várias espécies com potencial para múltiplos usos, soma-se a carência de informações sobre as espécies nativas tropicais, o que dificulta a adoção de práticas conservacionistas ou de recuperação de áreas degradadas (Carpi *et al.* 1996). Trabalhos que visem o aprimoramento de técnicas para melhor utilização de seus recursos de maneira sustentável e que ofereçam a possibilidade da conservação destas espécies têm papel de grande importância.

Apesar da grande representatividade da família Myrtaceae, com 131 gêneros e cerca de 4.620 espécies (Angiosperm Phylogeny Group 2010), distribuídas 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) e de suas árvores e arbustos poderem ser utilizadas de forma ornamental ou na produção comercial de frutos, o número de trabalhos científicos é ainda reduzido, entre outros fatores, em função da sua complexidade taxonômica (Kawasaki 1984). O gênero *Eugenia* figura entre os mais importantes na família Myrtaceae, com aproximadamente 1115 espécies (Angiosperm Phylogeny Group 2010) e ampla distribuição, sendo ele bem representado nas diversas formações vegetacionais do Brasil, não apenas quanto à riqueza específica, mas também quanto à abundância e frequência de suas espécies (Rodrigues & Nave 2000; Arantes & Monteiro 2002). Este gênero possui também espécies interessantes para programas de recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente, por terem frutos amplamente consumidos pela avifauna, que auxiliam na dispersão das sementes (Lorenzi 1992), também possuem características adequadas ao uso na arborização urbana (Correa 1975, Silva *et al.* 2001) e, ainda, valor comercial, nutritivo e potencial de aproveitamento na obtenção de fármacos (Donadio 1997; Silva *et al.* 2003). Espécies como a *Psidium guajava* L. (goiabeira), *E. uniflora* L. (pitangueira) e a *Myciaria cauliflora* Berg (jabuticabeira), por exemplo, são utilizadas na fruticultura, devido à qualidade de suas frutas e adaptação a algumas condições de clima subtropical (Donadio & Moro 2004).

Muitas espécies de *Eugenia* de importância ecológica e com potencial de exploração comercial apresentam baixa densidade de ocorrência. Tal fato dificulta a obtenção de

sementes em quantidade que permita a produção de mudas em larga escala, seja para aproveitamento comercial, com o plantio de pomares de produção de frutas, seja para aproveitamento em programas de repovoamento vegetal (Silva *et al.* 2005). Diversas espécies arbóreas nativas, com grande potencial de utilização na arborização urbana e reflorestamentos, têm seu uso limitado em função da carência de informações técnicas sobre o manejo de suas sementes, como é o caso de algumas espécies de *Eugenia*, tais como *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato), *E. uniflora* L. (pitangueira), *E. brasiliensis* Lam. (grumixameira), *E. pyriformis* Cambess (uvaieira), entre outras (Barbedo *et al.* 1998).

Para fornecer novas informações sobre espécies deste gênero, neste trabalho foram utilizadas algumas espécies de *Eugenia*, sendo três não domesticadas, espécies não utilizadas comercialmente, *Eugenia umbelliflora* Berg. (guapê), *E. pruinosa* Legr. (mamoneira) e *E. cerasiflora* Miq. (guamirim), e duas domesticadas, *E. involucrata* DC. (cerejeira-do-mato) e *E. uniflora* L. (pitangueira), com frutos comercialmente interessantes.

Descrição das espécies estudadas

Eugenia involucrata DC. popularmente conhecida como cerejeira, cerejeira-do-mato, cerejeira-da-terra ou cerejeira-do-rio-grande é espécie nativa do Brasil, rústica, ornamental, com boa formação de copa, também pode ser utilizada na arborização urbana. Seu tronco fornece madeira resistente, sendo utilizado como cabos para ferramentas agrícolas, lenha e carvão. Ocorre desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e floresce durante os meses de setembro a novembro, junto com o surgimento de novas folhagens. Os frutos são consumidos pelo homem, animais domésticos e avifauna silvestre além de serem também utilizados na fabricação de doces, geléias e licores. Apesar da vasta dispersão que apresenta, é rarefeita, não sendo encontrada constituindo grupos como frequentemente acontece com outras mirtáceas (Sanchotene, 1989 e Lorenzi, 1992). Na literatura, informações existentes sobre germinação e conservação das sementes dessa espécie são escassas (Barbedo *et al.*, 1998).

E. uniflora L. apresenta arbusto ou arvoreta de vasta e muito expressiva dispersão, sendo muito abundante e freqüente em todos os capões, situados em solos úmidos, bem como nas matas de galeria, onde se torna ainda mais abundante, e faz parte das espécies dominantes dos estratos inferiores (Legrand & Klein 1969). A espécie apresenta frutos que são apreciados tanto pelo homem como pela fauna silvestre, sendo esses utilizados no preparo de geléias, doces, refrescos, sorvetes, licores e em cosméticos. Seu plantio é recomendado para recomposição de áreas degradadas, uma vez que a dispersão de suas sementes ocorre por zoocoria (Budke *et al.* 2005), sendo os pássaros os visitantes mais frequentes (Pizo 2002)

além de ser de fácil propagação por sementes (Scalon *et al.* 2001). Esta espécie apresenta também potencial farmacológico como anti-inflamatórios, efeitos diuréticos, anti-hipertensivo, hipoglicêmico e anti-triglicérides (Pepato *et al.* 2001).

E. pruinosa Legr. popularmente conhecida como mamoneira, é uma árvore alta de 20 até 25 metros e 30 a 50 cm de diâmetro, glabra, tronco reto e cilíndrico, casca pouco descamante, formando copa arredondada e bastante espessa. Árvore característica e exclusiva da mata pluvial da encosta atlântica, higrófito, se desenvolve a sombra, muito rara, ocorrendo principalmente nos declives das encostas suaves, solos profundos e de drenagem lenta, onde a mata se apresenta densa e alta (Legrand & Klein 1969).

E. umbelliflora Berg. é arbusto ou arvoreta característica, exclusiva da restinga litorânea, com vasta e expressiva dispersão pelo litoral. Espécie típica das dunas fixas e dos baixios menos enxutos (restinga), bastante planos e arenosos; forma freqüentemente agrupamentos muito típicos e por vezes bastante densos (Legrand & Klein 1969). Os pigmentos extraídos dos frutos de guapê podem ser potencialmente usados como corantes naturais (Kuskoski *et al.* 1999).

E. cerasiflora Miq. é árvore característica e exclusiva da mata pluvial da encosta atlântica no sul do Brasil, bastante rara, ocorre principalmente nas matas situadas nos fundos de vales, inícios das encostas, bem como nas chapadas e encostas pouco acidentadas, onde a drenagem se processa de modo mais lento. Uma das características práticas para seu reconhecimento em campo são as margens das folhas que quase sempre apresentam um enrugamento ondulado muito característico (Legrand & Klein 1969).

O estudo da maturação destas espécies pode fornecer dados importantes para identificar o momento ideal de colheita das sementes durante o seu processo de desenvolvimento e assim, a obtenção de lotes com boa qualidade, uma vez que é identificado o momento no qual as sementes estão realmente maduras e com o seu máximo vigor. Além disso, pode-se obter material genético de boa qualidade fisiológica, que é a base para os programas de melhoramento, silvicultura, conservação genética e recuperação de áreas degradadas (Figliolia & Kageyama, 1994).

Maturação

A partir da fertilização, o óvulo fecundado sofre uma série de modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, que culminam com a formação da semente madura (Pina-Rodrigues & Aguiar 1993). O estudo de maturação é feito com o objetivo de se determinar o ponto ideal de colheita, visando a produção e a qualidade de sementes. Ele

possibilita determinar o ponto de máxima qualidade fisiológica, determinando para cada espécie como e quando ele é atingido (Carvalho & Nakagawa, 1983). O conhecimento do processo de maturação é uma importante forma de se conhecer o comportamento das espécies no tocante à sua reprodução possibilitando, assim, prever o momento e a época adequada de colheita (Figliolia & Kageyama, 1994).

Quando a semente atinge máximo acúmulo de matéria seca e não mais recebe produtos da planta mãe, “desligando-se” desta, os níveis de água ainda estão elevados, podendo ocorrer rápida deterioração ou, em alguns casos, germinação no interior do fruto, ainda não disperso (viviparidade). Para evitar estas ocorrências, a planta pode acionar vários mecanismos, que visam à redução na quantidade de água na semente (Marcos Filho, 2005). As sementes em que ocorre esta redução considerável do teor de água são consideradas ortodoxas e, as que mantêm elevado teor de água, são chamadas de recalcitrantes (Barbedo & Marcos-Filho 1998). As sementes recalcitrantes têm a característica de germinar antes ou imediatamente após a separação da planta-mãe, principalmente porque continuam hidratadas até o final da maturação (Barbedo & Marcos-Filho 1998).

Dados relativos ao comportamento das sementes de *Eugenia* indicam que estas sementes pertencem à categoria das recalcitrantes, ou sensíveis à desidratação (Gentil & Ferreira 1999, Andrade & Ferreira 2000, Andrade *et al.* 2003, Maluf *et al.* 2003, Delgado & Barbedo 2007) e, conseqüentemente, podem apresentar a característica de germinar logo após a separação da planta-mãe.

Em função da dificuldade na identificação da final do período de maturação nestas sementes e do fato das sementes de *Eugenia* demonstrarem, em estudos sobre seu fracionamento, um alto potencial regenerativo (Anjos & Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005), é de grande importância verificar se esta capacidade regenerativa é adquirida apenas ao final da maturação.

Fracionamento de sementes de *Eugenia*

Existe baixa ocorrência de matrizes produtoras de sementes, e a maioria das espécies de *Eugenia* nativas do Brasil, produz frutos com poucas sementes, freqüentemente uma ou duas. Visando maximizar a produção de mudas de *Eugenia*, sementes de algumas espécies foram fracionadas, obtendo-se mais de uma plântula normal por semente em *Eugenia pyriformis* (Silva *et al.* 2003), *E. involucrata*, *E. uniflora*, *E. brasiliensis* (Silva *et al.* 2005) e *E. stipitata* var. *sororia* (Anjos 1998). Os resultados obtidos por esses autores indicam a possibilidade de desenvolvimento de tecnologia para multiplicar o potencial de produção de

mudas de espécies de *Eugenia* a partir de um mesmo lote de sementes, mas o conhecimento científico sobre tal fenômeno ainda não está elucidado.

O embrião das espécies cujas sementes foram estudadas quanto ao fracionamento é do tipo eugenióide (cotilédones carnosos e radícula inconspícua) e, como nas demais espécies brasileiras de *Eugenia*, é aparentemente indiviso. Devido à fusão parcial ou total dos cotilédones, é chamado pseudomonocotilenar (Gurgel & Soubiê Sobrinho 1951, McVaugh 1956, Landrum & Kawasaki 1997, Anjos & Ferraz 1999, Kawasaki 2000). Essa característica auxiliou, inclusive, a separação do gênero *Syzygium* de *Eugenia*, inicialmente considerados todos neste último (Schmid 1972). A família Myrtaceae contempla algumas espécies com sementes poliembriônicas (Landrum & Kawasaki 1997) e esta presença sugere a possibilidade de se aumentar o número de plântulas obtidas de cada semente.

Outra possibilidade das sementes fracionadas poderem manter a capacidade germinativa seria a ocorrência de apomixia, na qual as sementes são formadas, mas contêm embriões que são produzidos independentemente de fertilização (Raven *et al.* 2001). Neste tipo de reprodução, o embrião se desenvolve no ovário a partir de uma célula somática do óvulo, ocorrendo a formação de sementes férteis, sem necessariamente haver a união do gameta feminino com o masculino (Koltunow 1993). Segundo Asker (1979), a apomixia subdivide-se em esporofítica (embriogenia nucelar) e gametofítica, com base no sítio de origem e no subsequente modelo de desenvolvimento da célula que dará origem ao embrião. No primeiro caso, o embrião forma-se diretamente de células somáticas do óvulo (tegumentos ou nucelo), sem a intervenção do saco embrionário ou da célula-ovo. No segundo caso, há formação de sacos embrionários, na maioria dos casos não reduzidos, cujas células-ovo se desenvolvem partenogeneticamente em embriões.

Segundo Batygina & Vinogradova (2007), o estresse e as mudanças nas condições ambientais podem também servir como um fator de indução ao aparecimento da poliembria nas espécies, sendo denominada, poliembria monozigótica de clivagem.

Dessa forma, considerando a falta de informação conclusiva quanto à origem dos embriões múltiplos de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* e da capacidade regenerativa desses embriões quando submetidos a fracionamentos, no presente trabalho foram estudadas cinco espécies de *Eugenia*, sendo as sementes *Eugenia umbelliflora*, *E. pruinosa* e de *E. cerasiflora* utilizadas para o fracionamento, em razão destas espécies não serem domesticadas, podendo apresentar comportamento diferente das espécies domesticadas estudadas por outros autores. Foi utilizada como modelo *E. cerasiflora* acompanhando seu processo de maturação e investigada a influência deste processo sobre sua capacidade regenerativa. Para identificar a origem da capacidade regenerativa das sementes de *Eugenia*

foram estudadas as espécies: *E. involucrata*, *E. uniflora* e *E. cerasiflora* suas alterações morfológicas decorrentes do fracionamento, no qual foram analisados diferentes períodos após o início da germinação em sementes integras ou fracionadas. Pelo fato do não desenvolvimento de novas plantas em sementes não fracionadas foram verificados os potenciais efeitos inibidores da germinação que impediriam a formação de novos embriões espontaneamente. Para tanto foram utilizadas sementes de *E. uniflora* da qual foram feitos de extratos das sementes e testados sobre a germinação de suas próprias sementes e sobre as de feijão “Rosinha” e de aquênios de alface “Babá de Verão”.

OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Analisar os efeitos do fracionamento em sementes do gênero *Eugenia* não domesticadas;
- ✓ Analisar o potencial de germinação em função do fracionamento em sementes com diferentes estádios de maturação;
- ✓ Identificar a origem da capacidade regenerativa dessas sementes;
- ✓ Verificar efeitos potencialmente inibidores da germinação em extratos de sementes *E. uniflora*.

Capítulo 1

**Potential for regeneration and propagation from cut seeds of *Eugenia* (Myrtaceae)
tropical tree species**

Artigo enviado para publicação no periódico “Seed Science and Technology”

(A formatação do texto a seguir segue as normas para publicação do periódico)

INTRODUCTION

Eugenia is one of the most important genera of Myrtaceae family in tropical areas, mainly in both Brazilian vegetation Cerrado and Atlantic rain forest which are included in the 25 world hotspots for biodiversity conservation (Myers *et al.*, 2000). Fruits from trees and shrubs of *Eugenia* can be used for commercial and industrial purposes, for example the production of several substances with pharmacological properties. Substances such as anti-oxidant (Roesler *et al.*, 2007), anti-diarrheic (Almeida *et al.*, 1995), anti-fungal (Núñez *et al.*, 2001, Souza *et al.*, 2001) and anti-biotic (Holetz *et al.*, 2002) were found in *Eugenia* species. Substances for decreasing cholesterol and uric acid levels, as well as the control of hypertension, and the ones used in the process of losing weight (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1987) were already identified from *Eugenia* species.

Most of the *Eugenia* species have low density occurrence in natural conditions and produce low amounts of fruits, consequently leading to the low production of seeds which makes it difficult the commercial exploitation of such plants (Silva *et al.*, 2005). Furthermore, there is little information about the technology for the management of these seeds (Barbedo *et al.*, 1998) likely to cause waste of important amount of germoplasm. For example, species of *Eugenia* can show different levels of desiccation tolerance (Delgado and Barbedo, 2007), therefore demanding different procedures after harvesting and resulting in different periods of storability (Barbedo *et al.*, 1998, Maluf *et al.*, 2003, Kohama *et al.*, 2006). On the other hand, there is also little information about the best conditions for the germination of these seeds and for seedling production.

Seeds of some domesticated *Eugenia* species (*E. uniflora* L., *E. brasiliensis* Lam., *E. involucrata* DC., *E. pyriformis* Cambess. and *E. stipitata* McVaugh) can germinate even after being cut, allowing for production of an increased number of plantlets from the same seed lot (Anjos and Ferraz, 1999, Silva *et al.*, 2003, Silva *et al.*, 2005). This could be a common characteristic for several species of the genus, including non-domesticated ones. If so, this could be applied for production of plantlets on a larger scale for both commercial and conservation purposes. The latter, however, demands knowledge about the origin of these new embryos which may affect the level of diversity of future generations since these embryos can be generated from maternal or zygotic tissues.

Polyembryony, a common phenomenon in flower plants discovered early in 1719 by Leeuwenhoek and described by Strasburger in 1878 (Batygina and Vinogradova, 2007), could explain the germination of more than one embryo by seed. However, Brazilian *Eugenia* species have not been included in polyembryonic ones since just one embryo can be identified

in mature seeds (Gurgel and Soubiê Sobrinho, 1951; Silva *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; Justo *et al.*, 2007). Therefore, the germination of more than one embryo per seed in Brazilian *Eugenia* species could be an important source of variability. This ability to germinate after being cut needs to be evaluated for non-domesticated species, since the domesticated ones somehow have undergone breeding processes. In this work we analyzed both germination and seedling development from three non-domesticated *Eugenia* species (*E. cerasiflora* Miq., *E. umbelliflora* Berg. and *E. pruinosa* Legr.) after their seeds were cut.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Mature fruits of *Eugenia cerasiflora* were collected from "Jardim Botânico de São Paulo", in São Paulo (23°38'S, 46°37'W), Brazil, and those of both *E. umbelliflora* and *E. pruinosa* were collected from "Parque Estadual da Ilha do Cardoso", in Cananéia (25°04'S, 47°54-55'W), Brazil. Fruits were taken to the laboratory and their seeds were removed by washing and gently rubbing on a wire mesh followed by rubbing on blotting paper. Then the seeds were stored in plastic bags at 8 °C until the beginning of the experiments (not longer than seven days).

In these embryos, axis and cotyledons are not visually distinguishable. However, despite embryos of *Eugenia* were considered indivisible, conferruminate or undifferentiated bodies (Mc Vaugh, 1956), more recently ultrastructural studies performed by Justo *et al.* (2007) showed differentiated embryonic axis in mature seeds of *E. pyriformis*.

Some seeds of these three species were infected by insects although no external signs of these infections were visible. Therefore, infected seeds were not previously discarded and all seeds obtained were completely randomized and distributed among cutting treatments.

Cutting treatments

The control treatment was the germination of uncut (whole intact) seeds (figure 1A, 2A). Four types of cutting treatments (figure 1B - E) were applied to the seeds of each species: a) seeds cut into two similar parts by their smallest dimension (transversal cutting, figure 1B), the whole hilum remaining in one of the fragments; b) seeds cut into two similar parts by their biggest dimension (longitudinal cutting), each part maintaining half of the hilum (figure 1C); c) seeds with transversal cutting, one of the parts containing approximately 1/4 of the seed, and the other one with 3/4 of the total seed size, the latter containing the hilum (figure 1D), and d) seeds cut into four similar parts (figure 1E, 2C).

All resulting fragments of seeds of each cutting treatment were placed to germinate. However, for the treatments in which seeds were cut into two parts, the percentage of both germination and normal seedling development were based on just one fraction (specifically in transversal cutting, the fragment with the hilum). The treatment in which the cut resulted into two fragments, 3/4 and 1/4 of a seed, the first one was considered as an individual treatment. The treatment in which the seeds were cut into four parts, two of them were considered as individual treatments: the one with the hilum (internal) and the other one the adjacent external part (external - figure 1E). Therefore, the treatments were: WIS = whole intact seed; HTP = half transversal part; HLP = half longitudinal part; TQS = three quarters of a seed; QEP = a quarter of a seed, external part; QIP = a quarter of a seed, internal part. The germination of the remaining fragments of seeds were also registered and used for the calculation of germination increasing factor (GIF) and seedling increasing factor (SIF), as described below.

Seed analysis

Germination tests were carried out in plastic boxes (11x11x3.5 cm), in which seeds were sown in a 2 cm thick layer of moistened vermiculite. The tests took place in an incubator at 25°C with 24-h photoperiod provided by white fluorescent lights. Seeds were scored as germinated when the radicle had protruded through the seed coat by 5 mm (germination percentage). Normal seedling development was also scored according to Delgado and Barbedo (2007), based upon the presence of roots with no injury and when the epicotyls showed at least one visible leaf (figure 2G, H and K). Analyses were taken every 15 days during 90 days.

Germination and development of normal seedlings were also calculated based on the sum of all fractions (as described below) of the same seed, giving the germination increasing factor ($GIF = \frac{tgf}{ns}$, in which *tgf* is the overall amount of germinable fractions and *ns* is the overall amount of seeds placed to germinate), and the seedling increasing factor ($SIF = \frac{tfns}{ns}$, in which *tfns* is the overall amount of fractions that produced normal seedlings) according to Silva *et al.* (2003).

Data analysis

The results were subjected to a one-way ANOVA using the Tukey test to check for significant differences between means ($P < 0.05$). Error bars in figures represent standard deviation.

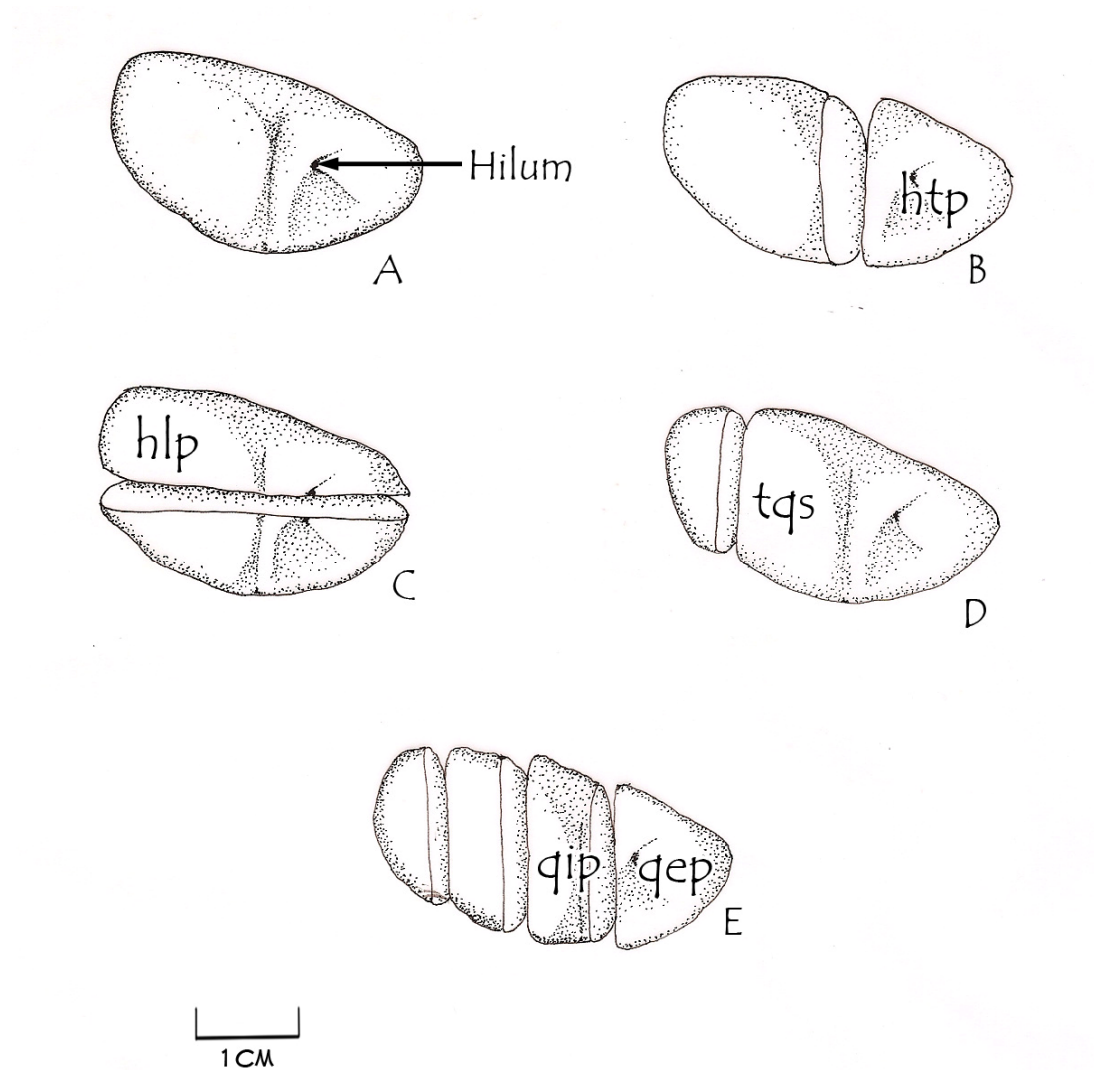


Figure 1. Seeds of *Eugenia species* after different cutting methods. A: whole intact (uncut) seed - WIS; B: seed cut transversally into two similar parts (*htp*: half transversal part); C: seed cut longitudinally into two similar parts (*hlp*: half longitudinal part); D: seed cut transversally into two different parts, using only 3/4 of the right side, hilum included (*tqs* = three quarters of a seed); E: seed cut into four similar parts, two of them used as treatments (*qep*: a quarter of a seed, external part; *qip*: a quarter of a seed, internal part).

RESULTS

Seeds of *Eugenia* showed different germinability depending on the species, *E. umbelliflora* germinated more than 90% (figure 3B, whole intact seeds - WIS), *E. cerasiflora* and *E. pruinosa* ca. 60% (figure 3A and C, respectively, WIS). The germination often resulted in the development of normal seedlings (figure 4), except *E. pruinosa* for which only 20% of the seeds were capable to produce seedlings (figure 4C). Germination was possible even for those seeds that were damaged by insects which removed more than half of a seed (figure 2F). However, these seeds not necessarily maintained the capacity to produce normal seedlings, resulting in low values as exemplified in *E. pruinosa*. For all *Eugenia* species, normal seedlings were frequently obtained even if half of a seed (or less than a half) was damaged by insects (figure 2H).

It was an important observation that whole intact seeds had the protrusion of just one radicle and the development of just one normal seedling. On the other hand, if seeds were submitted to any kind of cutting process, more than one primary root (figure 2G and I) or shoot (figure 2J) developed from the same seed fraction. Furthermore, seed fractions with more than one protruded primary root frequently did not develop shoot (figure 2I) and, consequently, there was no normal seedling development.

If seeds were cut just into two parts the germination was similar to the uncut seed values (*i.e.* control treatment) or even better than those ones, depending on the species (figure 3). *E. umbelliflora*, for example, maintained values as high as the control treatment (close to 100%) after being cut both longitudinally or transversally (figure 3B, WIS, HLP and TQS). *E. cerasiflora* and *E. pruinosa* had raised these values (ca. 60% initially in whole intact seed) to ca. 80-90% after being cut longitudinally (figure 3A and C). Even the fractions containing just 1/4 of a seed showed high germinability, the best resulting part depended on the species (the external one for *E. pruinosa*, internal one for *E. umbelliflora* and almost invariable for *E. cerasiflora*, figure 3).

The increase in germination percentage after cutting seeds was not followed by similar increasing in normal seedling development, for all species (figure 4). There was a clear increase in the values (initially low) of *E. pruinosa* seeds (from 20% to 35-50%, figure 4C), a decrease for most of the treatments of cutting *E. umbelliflora* seeds (from 90% to 0-85%, figure 4B) and variable responses for *E. cerasiflora* seeds (from 55% to 20-90%, figure 4A). However, when 3/4 of the total mass of the seed was maintained after cutting, normal seedling development values were similar to, or even better than, those ones from whole intact seeds, for all species (figure 4).

Cutting seeds of Brazilian *Eugenia* tropical tree species brings up both their ability to regain germinability and their potential to produce more than one seedling from the same seed, as described by Silva *et al.* (2003, 2005), if one takes account all fractions of the same seed. After cutting seeds, both germination and seedling development maintained or increased GIF and SIF values, for all species (table 1). This means that at least one fraction of the cut seeds germinated and produced normal seedling. Furthermore, no cutting treatment resulted in loss of seedling development percentage when compared to the control treatment (WIS).

There were no benefits in cutting seeds of *E. umbelliflora*. Even with the longitudinal cutting that resulted in germination values almost twice as high as those of WIS, the values of normal seedling development were similar between both treatments. On the other hand, all the cutting treatments in *E. pruinosa* resulted in high values for both germination and normal seedling development. Similar results were obtained in *E. cerasiflora*, considering that all the treatments resulted in germination and seedling development gains.

Table 1. Germination increasing factor (GIF) and seedling increasing factor (SIF) for seeds of *Eugenia umbelliflora*, *E. pruinosa* and *E. cerasiflora* after different cutting treatments (WIS: whole intact (uncut) seeds; HLP: seeds cut longitudinally into two similar parts; HTP: seeds cut transversally into two similar parts; TQ: seeds cut transversally into two different parts, one of them with 3/4 of a seed; FP: seeds cut transversally into four parts. Means sharing the same letter are not significantly different into each species ($P>0.05$; Tukey's HSD).

Cutting treatments	Species		
	<i>E. umbelliflora</i>	<i>E. pruinosa</i>	<i>E. cerasiflora</i>
Germination increasing factor			
WIS	0.93 c	0.49 b	0.62 c
HLP	1.65 a	1.42 a	1.72 b
HTP	1.00 bc	1.33 a	1.20 bc
TQ	1.10 bc	1.40 a	1.52 b
FP	1.43 ab	1.15 a	2.40 a
Seedling increasing factor			
WIS	0.92 a	0.20 a	0.52 b
HLP	0.90 a	0.72 a	1.15 a
HTP	0.75 a	0.45 a	0.80 ab
TQ	0.85 a	0.95 a	0.92 a
FP	0.95 a	0.50 a	1.08 a

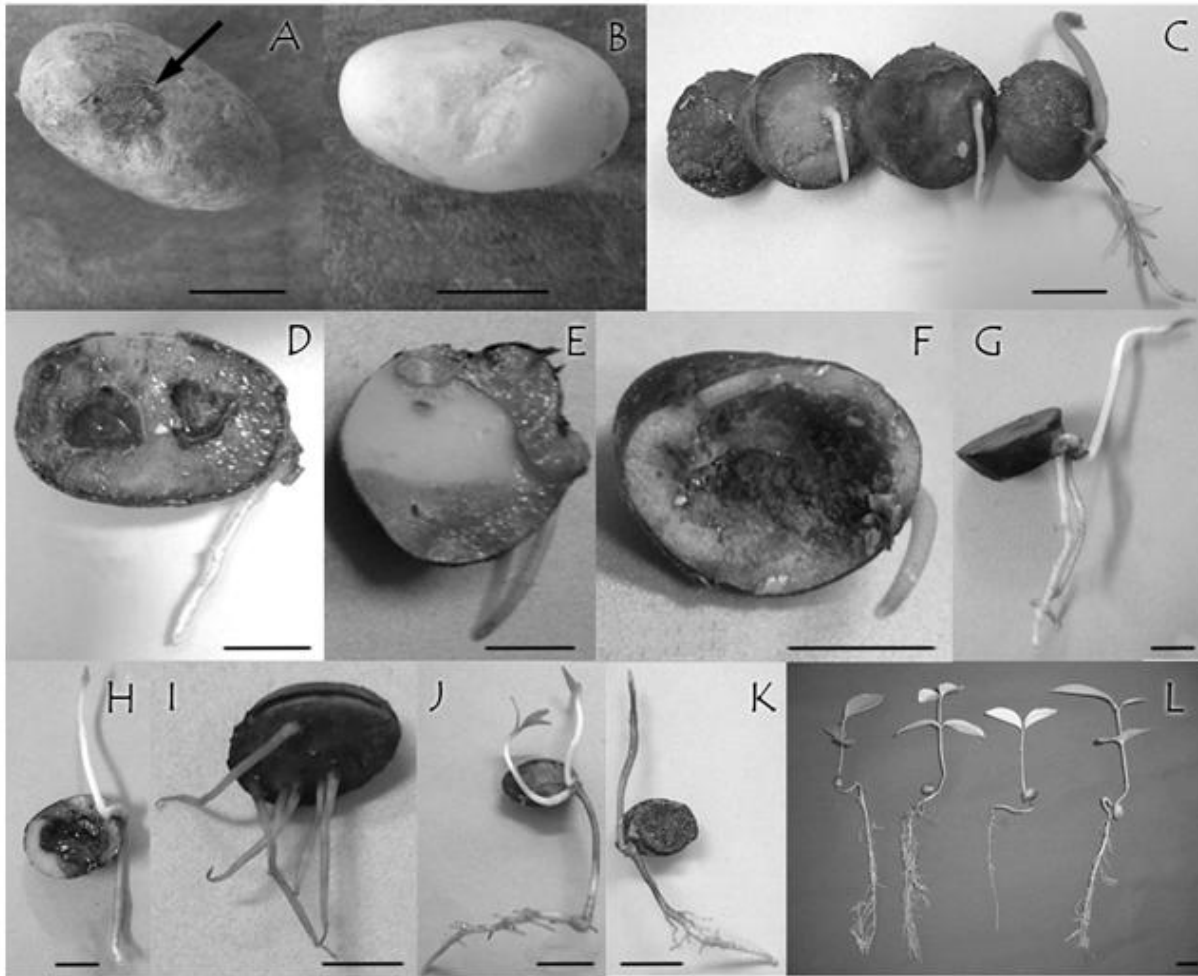


Figure 2. Seeds and seedlings of *E. cerasiflora* (A, B and E to J), *Eugenia pruinosa* (C and D) and *E. umbelliflora* (K and L). A. Whole intact seed, hillum showed by arrow; B. Embryo (note that is difficult to identify different parts as cotyledons or axe; the embryo looks like a uniform mass); C. Germinating fragments of a seed which was cut into four parts, one of them (at right) developing normal seedling. Note the development of radicles from the internal part of the fragments, one of the fragment with an appearance of a second radicle; D and F. Damaged (by insects) seeds of two different species maintaining the germination ability. Note that in F more than half of a seed was removed; E. internal aspect of a non-damaged seed with the development of a radicle; G. Internal fraction of a seed (which were cut into 4 parts) with the development of a normal seedling; H. Fragment of a seed which had removed (by insects) most of its storage reserves and even so developed a normal seedling; I. Multiple radicles developed from a fragment of a seed cut transversally into two parts. This picture shows an often occurrence when aerial part had no development from cut seeds of all species; J. Internal fragment of a seed with the development of one radicle and two aerial parts; K. Normal seedling developed from a fragment of a non-damaged seed; L. Plantlets developed from fragments of seeds. Scale: 1 cm.

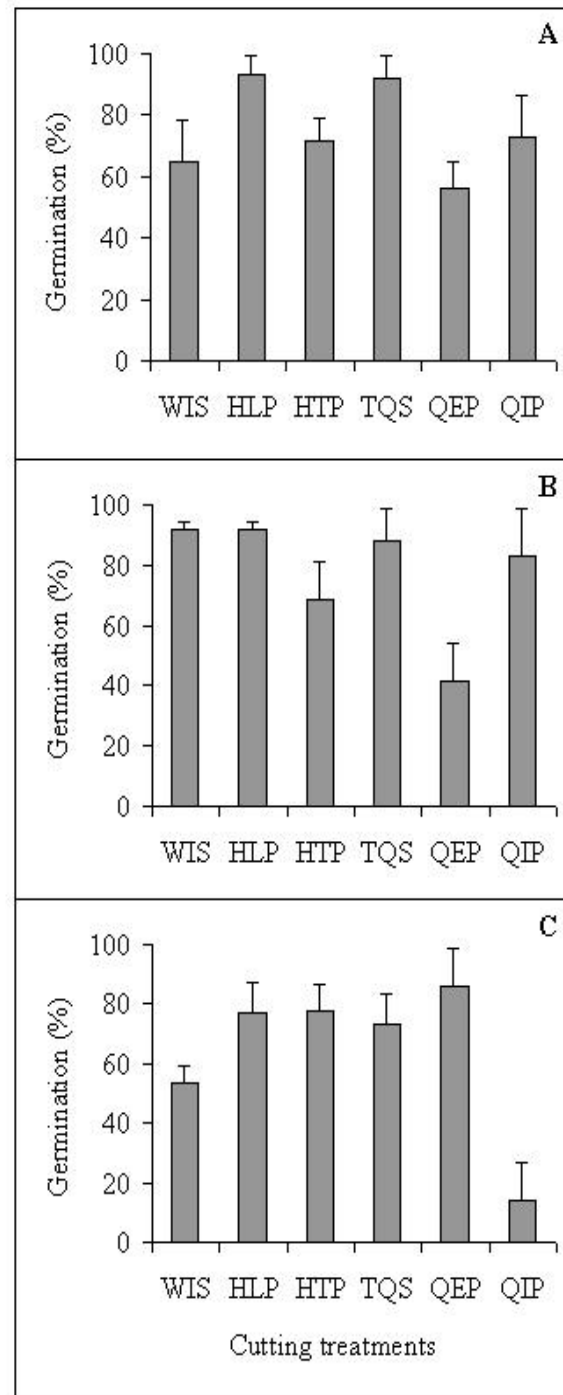


Figure 3. Germination of seeds of *Eugenia cerasiflora* (A), *E. umbelliflora* (B) and *E. pruinosa* (C) after different cutting treatments: WIS = whole intact (uncut) seed; HTP = half transversal part; HLP = half longitudinal part; TQS = three quarters of a seed; QEP = a quarter of a seed, external part; QIP = a quarter of a seed, internal part.

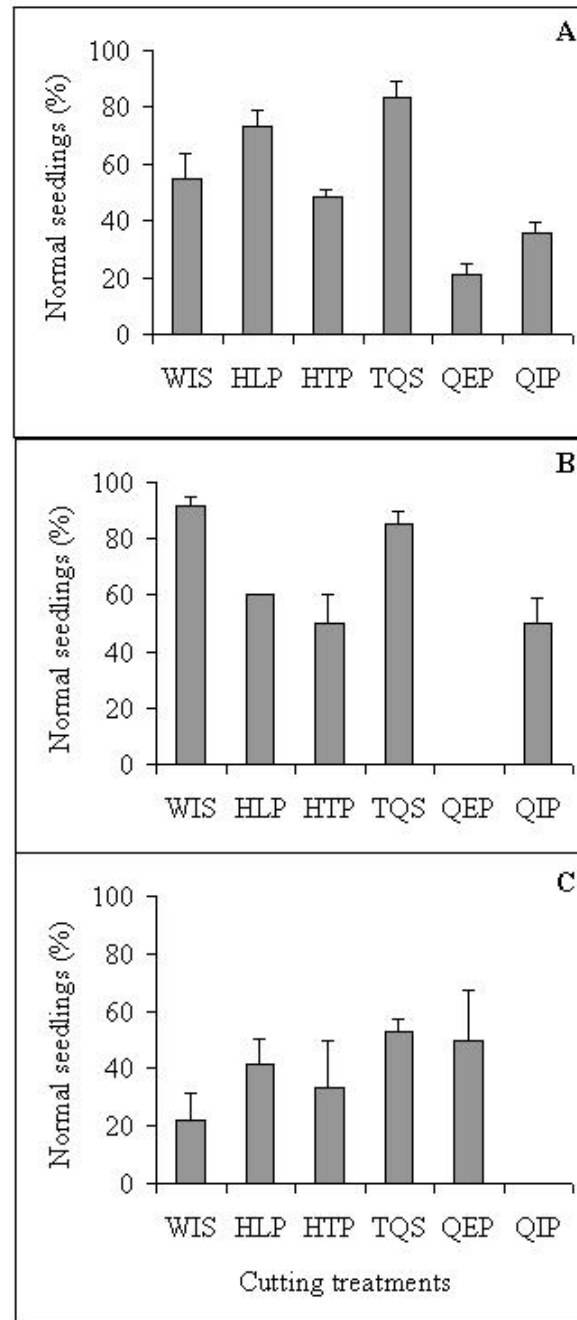


Figure 4. Normal seedling development of seeds of *Eugenia cerasiflora* (A), *E. umbelliflora* (B) and *E. pruinosa* (C) after different cutting treatments: WIS = whole intact (uncut) seed; HTP = half transversal part; HLP = half longitudinal part; TQS = three quarters of a seed; QEP = a quarter of a seed, external part; QIP = a quarter of a seed, internal part.

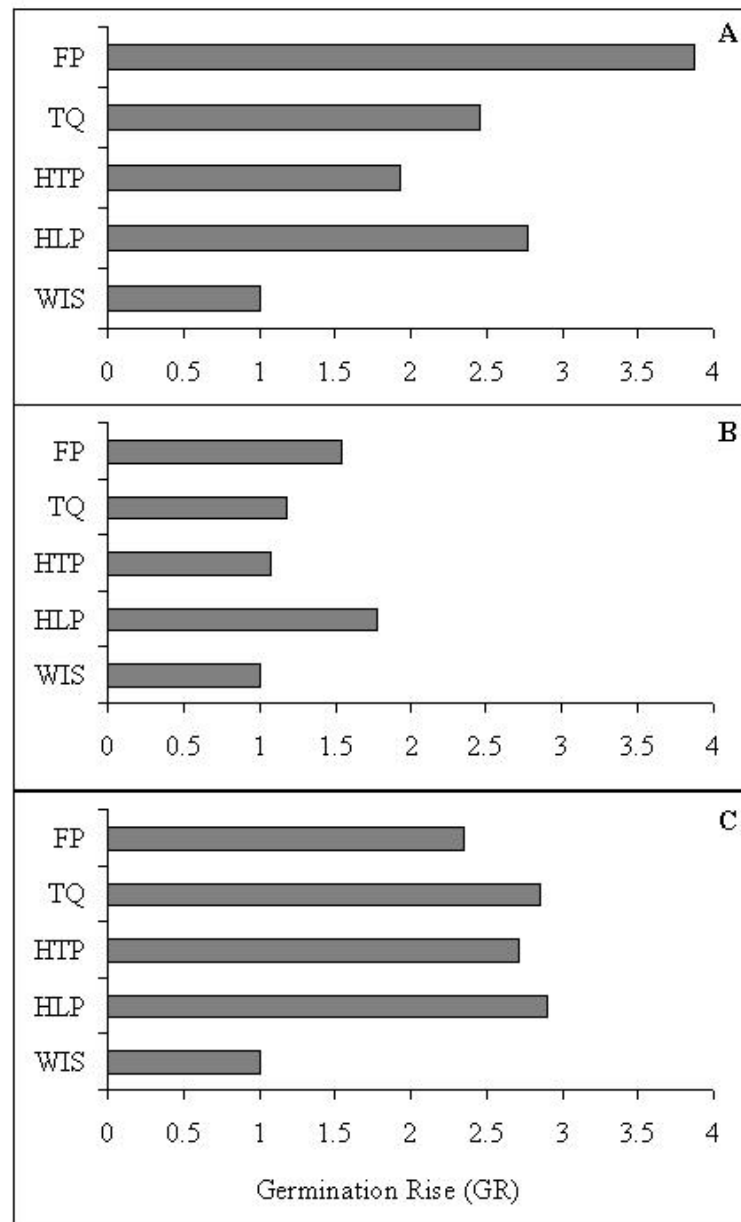


Figure 5 Germination rise of seeds of *Eugenia cerasiflora* (A), *E. umbelliflora* (B) and *E. pruinosa* (C) after cutting into two or four fragments. WIS: whole intact (uncut) seeds; HLP: seeds cut longitudinally into two similar parts; HTP: seeds cut transversally into two similar parts; TQ: seeds cut transversally into two different parts, one of them with 3/4 of a seed; FP: seeds cut transversally into four parts.

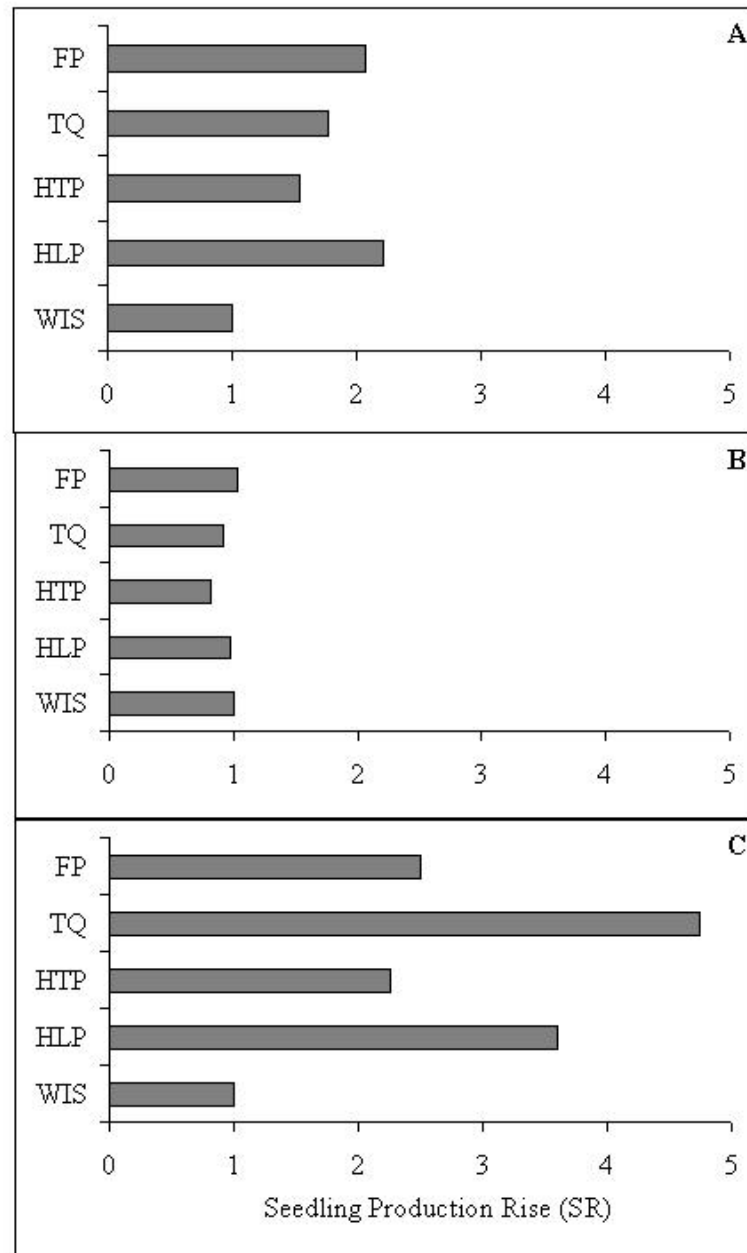


Figure 6. Seedling production rise (SR) of seeds of *Eugenia cerasiflora* (A), *E. umbelliflora* (B) and *E. pruinosa* (C) after cutting into two or four fragments. WIS: whole intact (uncut) seeds; HLP: seeds cut longitudinally into two similar parts; HTP: seeds cut transversally into two similar parts; TQ: seeds cut transversally into two different parts, one of them with 3/4 of a seed; FP: seeds cut transversally into four parts.

DISCUSSION

The high regeneration capacity of the Brazilian *Eugenia* species seeds were described for *E. stipitata* ssp. *sororia* (Anjos and Ferraz, 1999), *E. pyriformis* (Silva *et al.*, 2003), *E. uniflora*, *E. brasiliensis* and *E. involucrata* (Silva *et al.*, 2005). According to Silva *et al.* (2003, 2005), multiple germination and the development of more than one shoot from a uncut single seed could indicate some kind of polyembryony, however this fact has never been observed. Furthermore, polyembryony in Myrtaceae is usual in *Syzygium* and those ones described for *Eugenia* included species that were later reduced to *Syzygium* by various workers (Schmid, 1972, Gurgel & Soubiê Sobrinho, 1951, Nic Lughadha & Proença, 1996).

One might also considered that the presence of non-differentiated meristematic tissue could generate new embryos since *Eugenia* embryo is indivisible (Mc Vaugh, 1956). However, Justo *et al.* (2007) observed differentiated embryonic axis in mature seeds of *E. pyriformis*, non visible on the seed surface, by the fact of it be partially covered, and have less than 1.0 mm. Thus, the origin of new embryos after cutting remains unknown.

The small size of the embryonic axis, and the success obtained from all types of cuttings, make it less likely the hypothesis that all the cuttings always coincide over the axis. On the other hand, it is possible that each part or tissue of the embryo has its own regeneration capacity. This situation is very similar to the one observed by Tiwary, in 1926, with “plumula” bifurcation of *Eugenia* species (as reported by Nic Lughadha and Proença, 1996). In the present work, this fact might have occurred in some cut seeds that originated two aerial parts from the same fraction (figure 2J), which was also observed by Silva *et al.* (2003) in *E. pyriformis*. However, this would not explain the germination in different parts of the same seed after cutting as shown in figure 2C. The results obtained from this work clearly show that the second germination will only take place if the seed is cut and also that after cutting there is a kind of stimulation for the differentiation of a new embryo.

Similar regeneration and germination of new embryos was described in *Garcinia* seeds (Malik *et al.*, 2005a). Seeds of *G. indica*, *G. cambogia*, *G. xanthochymus* and *G. kola* could be described as kernels because of the undifferentiated tissues in cotyledons and axis (Malik *et al.*, 2005a,b, Agyili *et al.*, 2007). For *Eugenia* species, Andrade *et al.* (2003) described embryos of *E. dysenterica* as a single hard, undifferentiated cream coloured body where the cotyledons and the embryonic axis are fused. Furthermore, the embryo might be rudimentary or linear, consisting in a strand of embryonic tissue (Agyili *et al.*, 2007), so that most fragments containing a bit of the strand would germinate and grow into a normal seedling. Fragments without the relevant bits of strand would not germinate or would partially do so

through radical protrusion only. This could explain both the protrusion of several radicles without development of normal seedlings (figure 2I) and the low germination values observed in figures 3B, 3C, 4B and 4C. This could also be involved in the higher success obtained in longitudinal cutting than in transversal ones by Silva *et al.* (2003, 2005).

The biodiversity conservation involves not only preservation and multiplication, but also the maintenance of its wide genetic basis. Multiplying one individual by cloning process, as shown for *Eucalyptus* (Mo *et al.*, 2009), in spite of existing some possible variation, is not enough for the species preservation; therefore, it is very important to identify the origin of *Eugenia* multiple embryos. If new embryos are originated from maternal tissues, like in *Garcinia* species (Malik *et al.*, 2005a), their multiplication by cutting will represent very little in terms of conservation, but it could be important for the agricultural purposes. However, if their origin is gametic, even if two of them are twins, most of the embryos from the same lot may have great genetic variability. In this case, the cutting of seeds will contribute a lot to the diversity conservation. The last hypothesis seems to be more likely in *Eugenia* seeds since there is no information about apomixis in Brazilian *Eugenia* species, and they are frequently classified as monoembryonic (Gurgel and Soubiê Sobrinho, 1951; Anjos and Ferraz, 1999, Justo *et al.*, 2007).

The present work showed the ability of those seeds to germinate after insect attacks. Even when the seed was reduced to 1/4 of its total mass, the remaining fraction was able to develop normal plantlets (figure 2L). It is very interesting that such seeds do not waste their reserves in simultaneous germinations, keeping the germination sources for sequential germinations. This characteristic might have contributed for *Eugenia* species to be so representative in Brazilian forests.

Another interesting aspect of repeated germinations is the relation to the strategy developed by the species to survive under unfavorable periods for both germination and plantlets development. Most of the annual and bi-annual species evolved to the production of seeds that are desiccation tolerant, frequently dormant, the so-called orthodox seeds (Roberts, 1973). These seeds can remain in the soil for long periods until favorable conditions occur. On the other hand, there are the so-called recalcitrant seeds, that are intolerant to desiccation, frequently without any kind of dormancy and with short lifespan (few months), showing fast germination and quickly colonizing new areas (Barbedo and Bilia, 1998). Because of this trait, recalcitrant seeds can not form seed banks in the soil, due to their high water contents, and as a consequence they start either germinating or deteriorating (Barbedo and Bilia, 1998; Barbedo and Cicero, 2000; Seršen *et al.*, 2008).

Eugenia seeds are recalcitrant as they are intolerant to desiccation, not surviving to water content below *ca.* 15-30% (Delgado and Barbedo, 2007). They also are hard to gain or lose water when compared to seeds of other species (data not shown). These characteristics, along with their regeneration capacity (which was demonstrated in this work), could be associated to a strategy of the species to amplify the viability of these seeds in the soil. Therefore, the seed keeps a suitable hydration level to maintain viability. If germination starts and ends with the loss of the primary root, the seed starts a new germination process, with enough internal reserves for the development of a new plantlet. The protrusion of a second root after the loss of the first primary root was observed in the present work (non published data). Finally, the possibility of multiplication by using multiple regeneration techniques brings up an interesting perspective to amplify the plantlet production.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Debora M. Molizane for technical assistance with pictures and figures and Odair Vieira for reviewing manuscript. Financial support for this work from the CNPq (Proc. 481484/2007-8, 308045/2007-6 and 477640/2009-5) and FAPESP (Proc. 2002/12215-7 and 2005/04139-7) is gratefully acknowledged. Thanks are also due to "Secretaria da Educação do Estado de São Paulo" for scholarship to the first author, CNPq for scholarship to the second author and to "Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente" IBt/SMA, for the post graduation course. C.J. Barbedo is associated researcher of CNPq.

REFERENCES

- Agyili, J., Sacande, M., Koffi, E. and Peprah, T. (2007). Improving the collection and germination of West African *Garcinia kola* Heckel seeds. *New Forests*, **34**, 269-279.
- Almeida, C.E., Karnikowski, M.G., Foletto, R. and Baldisserotto, B. (1995). Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista de Saúde Pública*, **29**, 428-433.
- Andrade, A.C.S., Cunha, R., Souza, A.F., Reis, R.B. and Almeida, K.J. (2003). Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. *Seed Science and Technology*, **31**, 125-137.
- Anjos, A.M.G. and Ferraz, I.D.K. (1999). Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). [Morphology, germination and water

content of seeds of "araçá-boi" (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*)]. *Acta Amazonica*, **29**, 337-348.

Barbedo, C.J. and Bilia, D.A.C. (1998). Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola*, **55**, **special**, 121-125.

Barbedo, C.J. and Cicero, S.M. (2000). Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. *Seed Science and Technology*, **28**, 793-808.

Barbedo, C.J., Kohama, S., Maluf, A.M. and Bilia, D.A.C. (1998). Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. [Germination and storage of *Eugenia involucrata* DC. diaspores (Myrtaceae) as a function of water content]. *Revista Brasileira de Sementes*, **20**, 184-188.

Batygina, T.B. and Vinogradova, G. Yu. (2007). Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology*, **38**, 126-151.

Delgado, L.F. and Barbedo, C.J. (2007). Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. [Desiccation tolerance of seeds of species of *Eugenia*]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **42**, 265-272.

Gurgel, J.T.A. and Soubihe Sobrinho, J. (1951). Poliembrinia em mirtáceas frutíferas. [Polyembryony in fruit species of Myrtaceae.]. *Bragantia*, **11**, 141-163.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V. and Dias Filho, B.P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 1027-1031.

Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães, R.M. and Strassburg, R.S. (2007). Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. [The effect of drying, storage and germination on the ultra-structure of *Eugenia pyriformis* Camb. seeds]. *Acta Botanica Brasilica*, **21**, 539-551.

Kohama, S., Maluf, A.M., Bilia, D.A.C. and Barbedo, C.J. (2006). Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* (grumixameira). [Drying and storage of *Eugenia brasiliensis* Lam. ("grumixameira") seeds]. *Revista Brasileira de Sementes*, **28**, 72-78.

Malik, S.K., Chaudhury, R. and Abraham, Z. (2005a). Seed morphology and germination characteristics in three *Garcinia* species. *Seed Science and Technology*, **33**, 595-604.

Malik, S.K., Chaudhury, R. and Kalia, R.K. (2005b). Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. *Scientia Horticulturae*, **106**, 539-553.

Maluf, A.M., Bilia, D.A.C. and Barbedo, C.J. (2003). Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. *Scientia Agricola*, **60**, 471-475.

- McVaugh, R. (1956). Tropical American Myrtaceae. *Fieldiana Botany*, **29**, 145-228.
- Mo, X.Y., Long, T., Liu, Z., Lin, H., Liu, X.Z., Yang, Y.M. and Zhang, H.Y. (2009). AFLP analysis of somaclonal variations in *Eucalyptus globulus*. *Biologia Plantarum*, **53**, 741-744.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. and Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858.
- Nic Lughadha, E.N. and Proença, C. (1996). A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **83**, 480-503.
- Núñez, L., D'Aquino, M. and Chirife, J. (2001). Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**, 123-126.
- Roberts, E.H. (1973). Predicting the storage life of seed. *Seed Science and Technology*, **1**, 499-514.
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S. and Pastore, G.M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. [Antioxidant activity of cerrado fruits]. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **27**, 53-60.
- Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E.B. and Arias, A.R. (1987). Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **21**, 183-186.
- Schmid, R. (1972). A resolution of the *Eugenia-Syzygium* controversy (Myrtaceae). *American Journal of Botany*, **59**, 423-436.
- Sershen, Pammenter, N.W. and Berjak, P. (2008). Post-harvest behaviour and short- to medium-term storage of recalcitrant seeds and encapsulated embryonic axes of selected amaryllid species. *Seed Science and Technology*, **36**, 133-147.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M. and Barbedo, C.J. (2003). Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). [Seed germination of "uvaia" (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae) after cutting]. *Revista Brasileira de Botânica*, **26**, 213-221.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C. and Barbedo, C.J. (2005). Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. [Germination of *Eugenia* species seeds after cutting]. *Revista Brasileira de Sementes*, **27**, 86-92.
- Souza, L.K.H., Oliveira, C.A., Ferri, P.H., Santos, S.C., Oliveira Júnior, J.G., Miranda, A.T.B., Lião, L.M. and Silva, M.R.R. (2001). Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**, 123-126.

Capítulo 2

Indução da capacidade germinativa de sementes de *Eugenia cerasiflora* (Myrtaceae) em diferentes estádios de maturação

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da maioria das sementes pode ser dividido em três fases, sendo a primeira caracterizada pelo crescimento inicial, aumento rápido no peso fresco e no conteúdo de água; em um segundo momento a semente aumenta de tamanho devido a expansão das células e a deposição de reservas e finalmente, para as sementes ortodoxas, o desenvolvimento termina com uma fase pré-programada de secagem ou dessecação (Castro *et al.* 2004). Porém, em algumas espécies, conhecidas por recalcitrantes, o teor de água mantém-se elevado ao final da maturação (Barbedo & Marcos-Filho 1998).

Dados relativos ao comportamento das sementes de *Eugenia* indicam que elas pertençam à categoria das recalcitrantes, ou sensíveis à desidratação e, conseqüentemente, com baixa longevidade (Delgado & Barbedo 2007). Quando dispersas, essas sementes têm teor de água em torno de 35-70%, conforme o observado por diversos autores para *E. involucrata* DC., *E. stipitata* ssp. *Sororia* McVaugh, *E. brasiliensis* Lam., *E. pyriformis* Cambess., *E. dysenterica* DC., *E. cerasiflora* Miq., *E. umbelliflora* Berg, *E. pleurantha* O.Berg e *E. rostrifolia* D.Legrand.

Para que uma semente germine é necessário que esta esteja em um elevado grau de hidratação ou que o meio forneça água suficiente, permitindo a ativação das reações químicas e, com isto, a retomada do processo de desenvolvimento do embrião (Mayer & Poljakoff-Mayber 1982). Quando a semente não está suficientemente hidratada, a germinação começa com a embebição. 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 & Black 1994). No entanto, segundo Barbedo & Marcos Filho (1998), para as espécies com sementes recalcitrantes, pode ocorrer passagem direta da fase de desenvolvimento para a germinativa, sem a dessecação, podendo germinar quando ainda está ligada a planta-mãe. Esta característica gera certa dificuldade na identificação da transição entre a fase de formação/maturação e a de germinação destas sementes.

O conhecimento de como se processa a maturação das sementes e dos principais fatores envolvidos é de fundamental importância para a orientação dos produtores de sementes, auxiliando no controle de qualidade, principalmente no que se refere ao planejamento e a definição da época ideal de colheita, visando qualidade e produtividade. (Dias 2001). A determinação da maturidade fisiológica das sementes, ou seja, o momento no qual as sementes atingem o máximo acúmulo de matéria seca, bem como maior potencial de

germinação e vigor, torna-se fundamental para a obtenção de sementes de elevada qualidade (Piña-Rodrigues e Aguiar 1993).

Durante a evolução das espécies tropicais, algumas adquiriram a característica de sincronizar a maturidade fisiológica de suas sementes com mudanças nas cores dos frutos, sugerindo uma ligação com a síndrome de dispersão, uma vez que poderia atrair potenciais animais dispersores (Piña-Rodrigues & Aguiar 1993). Para frutos carnosos, o problema maior seria o conhecimento da época em que ocorre a maturação fisiológica das sementes já que nem sempre há necessidade de esperar a completa maturação “visual” do fruto (Alvarenga *et al.* 1991). Este fato foi observado por Pratavia (2005), que constatou que o parâmetro de mudança de cor do fruto não é eficiente para a avaliação da maturidade fisiológica de sementes de *Eugenia pyriformis* e de *E. involucrata*, pois estas mudanças não foram acompanhadas por modificações fisiológicas relevantes nas sementes, não sendo indicativo de maturidade para sementes dessas espécies. Tal fato sugere um descompasso entre a maturação dos frutos e a das sementes sendo necessário, portanto, um acompanhamento em intervalos de tempo mais curtos que visem avaliar outras características além da coloração do fruto.

Diversos estudos sobre fracionamento de sementes de *Eugenia* demonstraram também em um alto potencial regenerativo. Alguns dos exemplos são os de sementes de *E. stipitata* (Anjos & Ferraz 1999), *E. pyriformis* (Silva *et al.* 2003), *E. uniflora*, *E. brasiliensis* e *E. involucrata* (Silva *et al.* 2005) onde a germinação superou 100%, variando de 109% a 184%, o que sugere que este é um comportamento que pode ser estendido para todo o gênero. Essa característica, além de possivelmente conferir vantagem seletiva para essas espécies, poderia ser aproveitada no planejamento da produção de mudas, maximizando o potencial produtivo de lotes de sementes e auxiliando nos processos conservação das espécies, principalmente para as que se encontram em risco de extinção (Teixeira 2009).

Apesar dos estudos já realizados sobre a capacidade regenerativa das sementes de *Eugenia* o conhecimento sobre a origem desta regeneração ainda apresenta lacunas. A origem e localização desses novos embriões e o momento, durante a formação da semente, a partir do qual surge essa capacidade regenerativa são desconhecidos. Pode-se inferir que o fracionamento induz a diferenciação de tecidos voltados à formação de novos embriões ou, como o sugerido por Batygina & Vinogradova (2007), que o estresse e as mudanças nas condições ambientais podem também atuar como um fator de indução ao aparecimento da poliembrião nas espécies deste gênero. Além disso, a capacidade regenerativa deve ser analisada não apenas em uma das fases do processo de maturação, uma vez que não ocorre um momento evidente de maturidade fisiológica, pois nessas sementes, parece haver um *continuum* entre a formação da semente e sua germinação. Dessa maneira, torna-se

importante, também, uma análise comparativa entre os processos naturais de formação dos embriões e os induzidos pelo fracionamento, tanto fases iniciais quanto finais da formação das sementes. Portanto o desenvolvimento e a maturação destas sementes em relação à capacidade de regeneração são aspectos importantes a serem considerados.

OBJETIVOS

Investigar o comportamento de sementes de *Eugenia cerasiflora* em diferentes estádios de maturação e a influência deste processo sobre a capacidade regenerativa das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *Eugenia cerasiflora* Miq. (guamirim) foram coletados nos anos de 2005 e 2007 no Jardim Botânico de São Paulo, em São Paulo-SP (23°38'S, 46°37'W). A partir do florescimento das árvores, as flores foram etiquetadas para controle do desenvolvimento da maturação dos frutos e das sementes. Os frutos foram coletados a partir de 85 dias após a antese (DAA) e em intervalos de uma semana cada, totalizando seis coletas.

Os frutos foram beneficiados em água corrente com auxílio de peneira, para a separação das sementes da polpa, sendo imediatamente retirado o excesso de umidade. Para os frutos do primeiro estágio, em razão de apresentarem uma polpa mais dura, o despulpamento foi manual com auxílio de bisturi.

Logo após o beneficiamento de todo lote, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água, conteúdo de matéria seca e germinação, para caracterização inicial do lote. O teor de água e o conteúdo de matéria seca das sementes foram quantificados pelo método gravimétrico com utilização de estufa a 103 ± 3 °C, durante 17 horas (ISTA 1985 e BRASIL 2009), utilizando-se quatro repetições de cinco sementes cada.

O teste de germinação foi realizado em germinadores Marconi tipo MA400, com umidade relativa do ar de 100%, mantida por circulação interna de água, regulados para a temperatura constante de 25 °C e luz contínua. As sementes foram acondicionadas em gerbox, contendo papel tipo germitest, com duas folhas para a base e uma para cobertura (Brasil 2009), pré-umedecidas, utilizando-se 4 repetições de 10 sementes. Neste teste, as avaliações foram realizadas a cada sete dias, sendo computadas as sementes germinadas (protrusão de raiz primária com pelo menos 5mm) e as plântulas normais (plântulas com sistema radicular e eófilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes), conforme Delgado (2006).

Os estudos da capacidade regenerativa da germinação durante a maturação foram realizados apenas no ano de 2007. Foram feitas seções transversais ao meio nas sementes nos diferentes estádios de desenvolvimento. As avaliações de germinação foram realizadas a cada sete dias, sendo computadas as frações de sementes germinadas independente de serem provenientes ou não de mesma semente.

Foram calculados, ainda, o índice de velocidade de germinação (IVG), baseado na fórmula de Maguire (1962) e o fator de incremento na germinação (FIG) e na produção de plântulas normais (FIP) conforme descrito em Silva *et al.* (2003). Para a determinação dos valores de germinação das frações de cada semente foi utilizado o cálculo do fator de incremento na germinação (FIG), ou seja, o número médio de frações que germinaram a partir do fracionamento de uma semente ($FIG = nfg.ns^{-1}$, onde *nfg* é o número total de frações germinadas por repetição e *ns* é o número de sementes colocadas para germinar em cada repetição). Da mesma forma, a soma de valores de plântulas normais obtidas de todas as frações de cada semente foi utilizada para o cálculo do fator de incremento na produção de plântulas normais obtidas a partir do fracionamento de uma semente ($FIP = npn.ns^{-1}$, onde *npn* é o número total de plântulas normais por repetições e *ns* é o número de sementes colocadas para germinar em cada repetição).

Todos os experimentos tiveram delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Os frutos coletados nos seis estádios de maturação de *Eugenia cerasiflora*, apresentaram diferenças na coloração em cada estágio analisado (Fig. 7), sendo que os frutos do último estágio analisado apresentaram coloração vermelha intensa, casca brilhante e firme e marca de predação na maioria dos frutos.

Pôde-se observar que os teores de água das sementes apresentaram variações significativas nos diferentes estádios analisados, nos dois anos de análise (tabela 2). Durante todo o período de coleta ocorreu queda gradual no teor de água. As sementes do primeiro estágio, mais imaturas, apresentaram teores de água superiores a 80%, reduzindo até o último estágio, quando ficaram próximos a 60%. No ano de 2007, porém, o penúltimo estágio apresentou teor de água inferior ao último, o que pode ter ocorrido em função de variações ambientais.

O conteúdo de matéria seca também apresentou diferenças significativas entre os estádios nos dois anos de análise. Ao final da maturação (6º estágio) ocorreu um acréscimo

significativo nos valores de matéria seca, demonstrando ser um dos indicativos da maturidade destas sementes. Nos dois anos estudados, porém, pode-se notar uma diferença no máximo de acúmulo de matéria seca das sementes, sendo que em 2005 o peso final foi de 0,362 g e em 2007 ocorreu um aumento de 0,167 g totalizando 0,529 g de massa seca final. Este aumento ocorreu provavelmente devido a fatores climáticos locais.

Os dados obtidos para germinação apresentaram maiores valores apenas nos estádios finais de maturação nos dois anos analisados, tanto para sementes intactas quanto para as fracionadas (tabela 3), demonstrando um aumento gradual da germinação durante todo o processo de maturação.

Os resultados de desenvolvimento de plântulas normais das sementes imaturas e maduras, submetidas ou não a fracionamento, demonstraram que este fator foi diretamente influenciado pelo estágio de maturação (tabela 3). O estágio considerado como maduro foi o que apresentou maior valor e os estádios imaturos, os menores.

Em 2007 também foi observada diferença entre o máximo de germinação, que ocorreu antes do final da maturação, e o máximo de plântulas normais, que somente foi observado nas duas últimas coletas. Para o ano de 2005 não ocorreu esta diferença sendo máximo de germinação e o máximo de formação de plântulas normais obtido somente no final do processo de maturação.

A análise de FIG e de FIP para sementes inteiras não apresentou valores maiores que 1,0 para nenhum dos estádios analisados (Figuras 8 e 9). Os valores de FIG para sementes fracionadas dependeram do estágio de maturação, sendo superiores ao de sementes intactas somente a partir da terceira coleta e apresentando valores superiores a 1,0 apenas nos últimos estádios de maturação do ano de 2007.

As sementes maduras (6ºestádio) fracionadas apresentaram, de maneira geral, maior FIG que as sementes imaturas, demonstrando maior potencial de regeneração quando analisadas todas as frações em conjunto. Portanto, o grau de maturação interferiu diretamente na capacidade regenerativa.

Os valores de FIP de sementes fracionadas não apresentaram diferenças significativas em relação ao de sementes intactas, sendo superior para sementes fracionadas apenas na última coleta, o que evidencia que a diferenciação de tecidos pode ser influenciada pelo estágio de maturação.

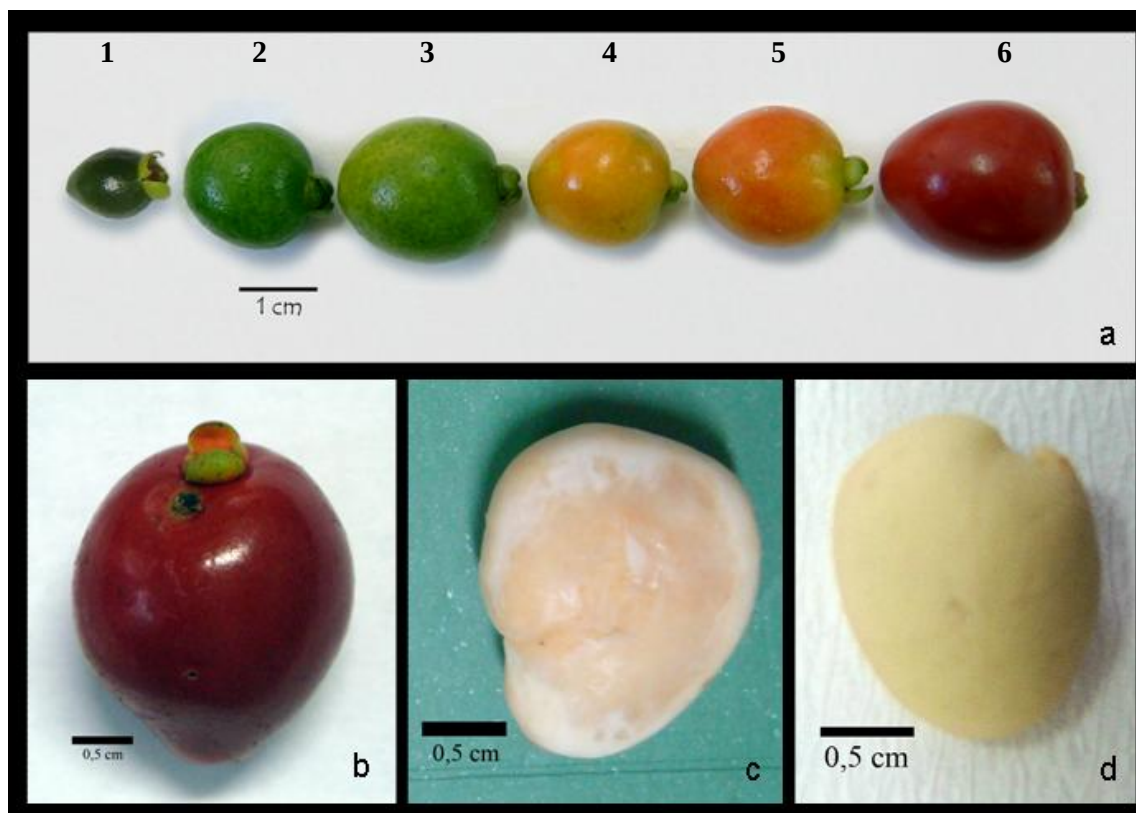


Figura 7 – Frutos de *Eugenia cerasiflora* em cada um dos estádios de desenvolvimento analisados (a). Visão geral do fruto do último estágio (b), da semente (c) e do embrião (d) da safra de 2007.

Tabela 2 - Valores obtidos para massa seca (MS) e teor de água (U%) de sementes de *Eugenia cerasiflora* em diferentes estádios de maturação durante os anos de 2005 e 2007.

	2005		2007	
	U%	MS	U%	MS
1º estágio	82,3 a	0,051 c	85,6 a	0,022 d
2º estágio	78,5 ab	0,058 c	83,9 a	0,162 c
3º estágio	74,8 bc	0,113 b	80,6 b	0,137 c
4º estágio	71,9 cd	0,138 b	76,9 c	0,194 c
5º estágio	69,4 d	0,154 b	60,6 e	0,441 b
6º estágio	61,0 e	0,362 a	64,2 d	0,529 a

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

Tabela 3 - Valores obtidos nos anos de 2005 e 2007 para germinação (G%) e plântulas normais (PN%) em sementes de *Eugenia cerasiflora*, em diferentes estádios de maturação, intactas ou submetidas a fracionamento, sendo computada apenas uma das frações.

	2005		2007			
	Intactas		Intactas		Fracionadas	
	G%	PN%	G%	PN%	G%	PN%
1º estágio	08 c	0 d	0 c	0 c	0 c	0 d
2º estágio	35 b	5 cd	45 b	5 c	15 c	1 d
3º estágio	60 ab	40 ab	63 ab	20 c	43 b	16 c
4º estágio	53 b	33 bc	93 a	53 b	54 ab	20 bc
5º estágio	48 b	28 bcd	98 a	83 a	61 a	33 ab
6º estágio	85 a	63 a	93 a	83 a	68 a	44 a

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

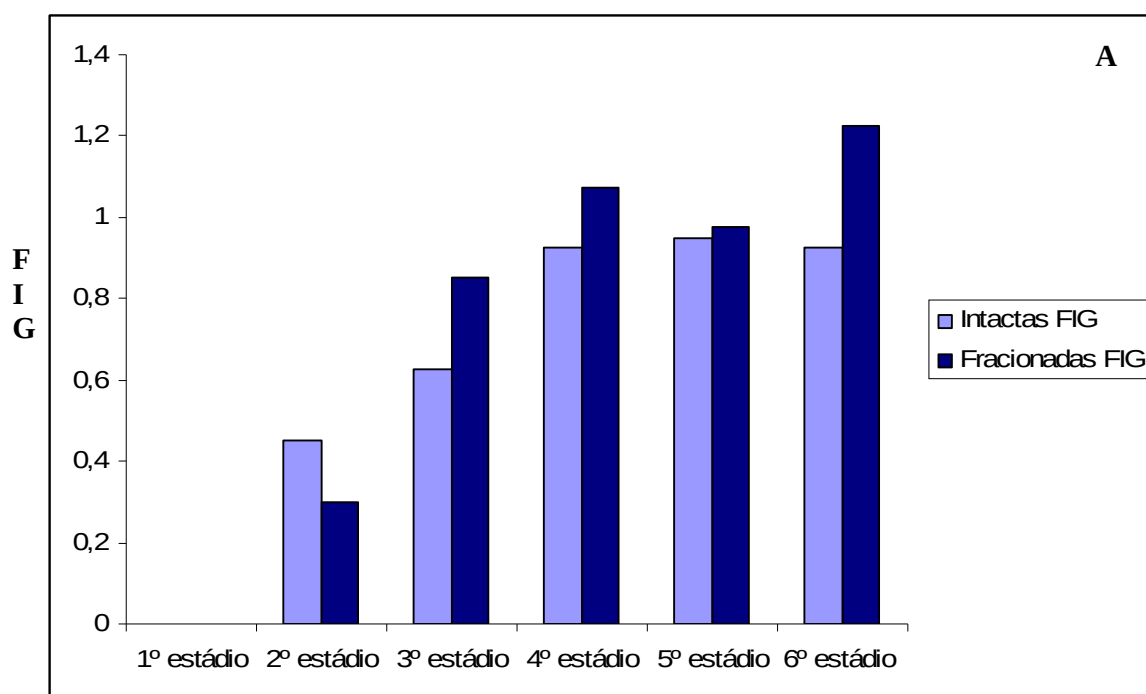


Figura 8 - Fator de incremento na germinação (FIG) para sementes de *Eugenia cerasiflora* em diferentes estádios de maturação, intactas ou submetidas a fracionamento ao meio em sentido transversal, após dois meses de cultivo.

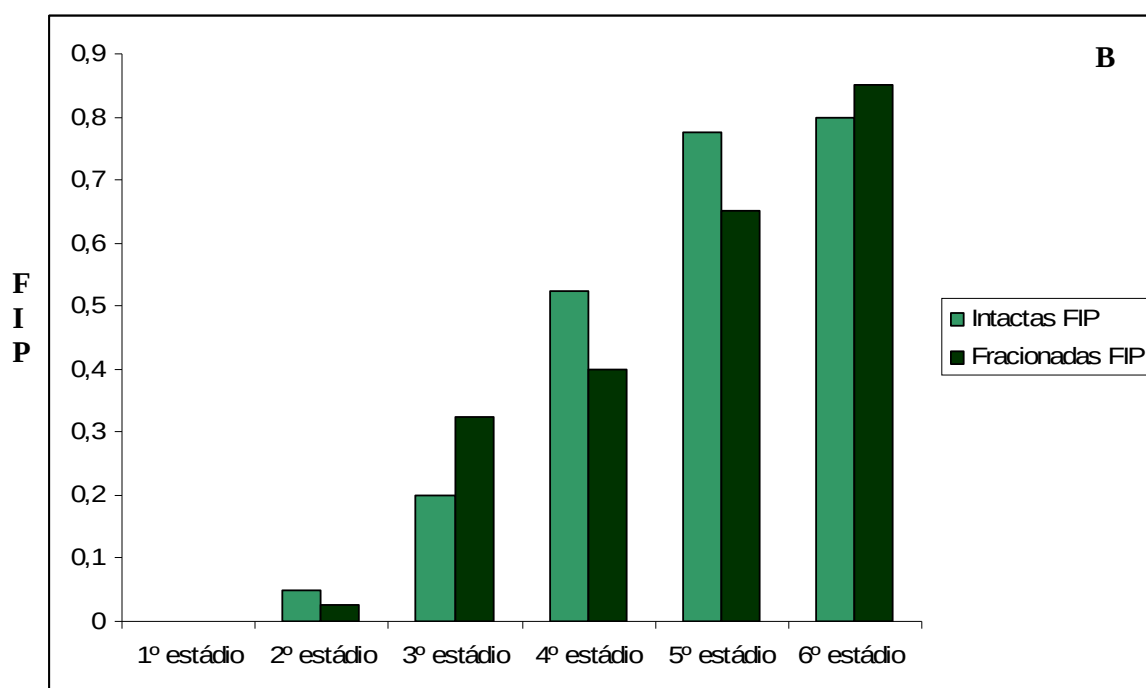


Figura 9 - Fator de incremento na produção de plântulas normais (FIP) para sementes de *Eugenia cerasiflora* em diferentes estádios de maturação, intactas ou submetidas a fracionamento ao meio em sentido transversal, após dois meses de cultivo.

DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se observar que houve sincronismo entre o desenvolvimento do fruto e da semente. As sementes provenientes de frutos verdes apresentaram elevado teor de água, baixo conteúdo de matéria seca, baixa germinação e formação de plântulas normais. Em contrapartida as sementes provenientes de frutos vermelhos apresentaram comportamento inverso, com decréscimo de cerca de 20% no teor de água, maior conteúdo de matéria seca, alta germinação e formação de plântulas normais. Ávila *et al.* (2009), em estudo de sementes de *Eugenia uniflora*, concluíram que a coloração dos frutos é um parâmetro eficaz para a identificação do ponto de maturidade fisiológica desta espécie. Esta característica de sincronizar a maturidade fisiológica da semente, com mudanças nas cores dos fruto, sugere uma ligação com a síndrome de dispersão, uma vez que poderia atrair potenciais animais dispersores (Piña-Rodrigues & Aguiar 1993). No entanto, Prata (2005) obteve resultados diferentes para *E. uniflora* e *E. involucrata*., sugerindo que a forma de identificar o ponto de maturidade fisiológica não deve levar em consideração apenas a coloração dos frutos, tornando assim a faixa de estudo muito restrita, pois a variação de comportamento pode ser grande em anos diferentes de análise.

Segundo Marcos Filho (2005) o máximo acúmulo de massa seca, o baixo teor de água e a elevada capacidade germinativa, frequentemente e eficientemente utilizados para identificar a maturidade de sementes ortodoxas, não apresentam mesma eficiência para sementes recalcitrantes, uma vez que não há um ponto definido para o término da fase de maturação e correspondente início da germinação.

A redução no teor de água foi progressivamente acompanhada de acúmulo de matéria seca até o último estágio avaliado, sendo que neste último o acúmulo foi significativamente maior do que em outros momentos durante a maturação. Este lento acúmulo inicial da matéria e aceleração somente ao final da maturação dos frutos foi observado por Danner *et al.* (2010) para *Eugenia uniflora*, *E. involucrata* e *E. pyriformis*. Muitos estudos feitos com maturação de sementes de diversas espécies apontam o ponto de máximo de matéria seca como o melhor e mais seguro indicativo de que as sementes atingiram a maturidade fisiológica (Araújo *et al.* 2006).

A análise de apenas matéria seca e teor de água, porém, não se mostrou suficiente para definir o estágio de maturação de *Eugenia cerasiflora* devido à diferença observada entre os dois anos de análise. No segundo ano de coleta as sementes do último estágio foram mais vigorosas, as quais apresentaram maior conteúdo de matéria seca (0,529 g/semte), germinação de 93% e 83% deformação de plântulas normais, enquanto para o primeiro ano

estes valores ficaram próximos de 0,362 g, 85% e 63%, respectivamente. Esta diferença pode ser devida a variações nas condições climáticas nos dois anos de análise, pois a chuva acumulada no período de floração a de dispersão dos frutos, compreendida de maio a setembro, apresentou uma grande variação, sendo em 2005 inferior a 2007 no mês de julho.

É interessante observar que sementes intactas e fracionadas do segundo estágio coletadas aos 92 DAA, apesar de seu elevado teor de água e baixo conteúdo de matéria seca, já apresentam alguma capacidade germinativa. Dessa forma, nota-se que a capacidade germinativa é adquirida no início do desenvolvimento das sementes de *Eugenia cerasiflora*, mas sem oferecer condições de continuar o desenvolvimento das plântulas, assim como o já observado por Borges *et al.* (2005) para *Caesalpinia echinata*. Os maiores índices germinativos ocorreram apenas nos estágios finais de maturação, demonstrando um incremento da germinação durante todo o processo de maturação. Isto pode ser explicado porque as sementes, da maioria das espécies, têm capacidade de germinar muito antes de atingir a maturidade fisiológica, mas os valores máximos ocorrem geralmente em época próxima ou coincidem com a de máximo acúmulo de matéria seca (Marcos Filho 2005). Para as sementes fracionadas nos diferentes estágios, observou-se um comportamento similar ao de sementes intactas.

Os estágios considerados maduros foram também os que apresentaram maiores valores de formação de plântulas normais, nos dois anos analisados, o que demonstra que este foi um fator diretamente influenciado pelo estágio de maturação.

Comparando-se os resultados de FIG e FIP para sementes fracionadas pode-se perceber que os valores de FIG são sempre bem mais altos que os de FIP, ou seja, o potencial de regeneração da germinação não garante o desenvolvimento de plântulas. Segundo Teixeira (2009), isso pode se dever ao fato da semente fracionada perder reservas importantes, como os carboidratos. De forma geral, as sementes maduras mostraram maior capacidade regenerativa que as imaturas, demonstrando que o estágio de maturação pode afetar esta característica.

A partir destes resultados pode-se observar que sementes de *Eugenia cerasiflora* possuem alta capacidade de germinar e produzir plântulas normais independente da possibilidade de parte da semente estar danificada. Essas características podem ser indícios de adaptações à dispersão ou à predação, tanto dos frutos como das sementes. Se houver ação de fatores ambientais e acontecer a queda dos frutos mesmo eles estando verdes, há grandes chances da semente germinar e se tornar uma plântula e depois um indivíduo, não havendo perda na produção. Também deve ser levado em conta o fato de que muitos animais se alimentam desses frutos, entre eles os dispersores, principalmente pássaros, que ao comerem o

fruto podem danificar a semente, mas mesmo assim ela tem grande poder regenerativo e as chances de perpetuar a espécie são grandes (Prata-viera 2005).

Esta capacidade regenerativa em sementes maduras de *Eugenia* já havia sido observada por outros autores (Anjos & Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003 e Silva *et al.* 2005), porém este comportamento durante sua maturação pode indicar que células totipotentes, que promovem a formação de embriões somáticos a partir do embrião zigótico, já estão presentes mesmo em sementes imaturas.

A análise dos resultados aponta para a possibilidade de que a coloração do fruto, o teor de água, conteúdo de matéria seca, germinação e formação de plântulas normais possam ser utilizados em conjunto como parâmetros para identificar o ponto de maturidade fisiológica das sementes de *Eugenia cerasiflora*, assim como o descrito por Ávila *et al.* (2009) para sementes de *E. uniflora*. A capacidade regenerativa após fracionamentos poderia ser utilizada como uma ferramenta adicional na identificação do ponto de maturidade fisiológica, quando apresentasse seu valor máximo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alvarenga, E.M., Silva, R.F., Araújo, E.F., Leiro, L.S.** 1991. Maturação fisiológica de sementes de abóbora italiana. *Revista Brasileira de Sementes*. Brasília, 13(2): 147-150.
- Anjos, A.M.G. & Ferraz, I.D.K.** 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). *Acta Amazônica*, Manaus, 29(3): 337-348.
- Araújo, E.F., Araújo, R.F., Sofiatti, V. & Silva, R.F.** 2006. Maturação de sementes de milho-doce – grupo super-doce. *Revista Brasileira de Sementes*, 28(2): 69-76.
- Ávila, A.L., Argenta, M.S., Muniz, M.F.B., Poletto, I. & Blumes, E.** 2009. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (pitanga). *Ciência Florestal*, 19(1): 61-68.
- Barbedo, C.J. & Marcos-Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, 12(2): 145-164.
- Batygina, T.B. & Vinogradova, G.Y.** 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology*, 38(3): 126–151.
- Bewley, J.D. & Black, M.** 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2.ed. New York: Plenum Press, 445p.
- Borges, I.F., Giudice-Neto, J., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2005. Maturation of Seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an Endangered Leguminous Tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6): 851-861.
- Brasil.** 2009. Regras para análise de sementes /Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p.
- Castro, R.D.; Bradford, K.J. & Hilhorst, H.W.M.** 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In *Germinação: do básico ao aplicado* (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Porto Alegre, Artmed, 149-162.
- Danner, M.A., Citadin, I., Sasso, S.A.Z., Sachet, M.R. & Ambrósio, R.** 2010. Fenologia da floração e frutificação de mirtáceas nativas da floresta com araucária. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-294520100050000008&lng=en&nrm=iso>. Acess in 08 Apr. 2010.
- Delgado, L.F.** 2006. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Botânica da Secretaria do Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 106p.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 42(2): 265-272.

- Dias, D.C. F.** 2001. Maturação de sementes. Revista Seed News - novembro/dezembro 5: 6
- ISTA.** 1985. International rules for seed testing. Seed Science and Technology. Zurich, 13: 356-513
- Maguire, J.D.** 1962. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. Crop Science, 2: 176-177.
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 495p.
- Mayer, A. C. & Poljakoff-Mayber, T.** 1982. The germination of seeds. New York, Pergamon Press, 263p.
- Piña-Rodrigues, F.C.M. & Aguiar, I.B.** 1993. Maturação e Dispersão de Sementes. In: Sementes florestais tropicais (Aguiar, I.B., Piña-Rodrigues, F.C.M. & Figliolia, M.B., Coord.). Brasília: Abrates, 215-174.
- Prataviera, J.S.** 2005. Modificações na coloração de frutos como indicativas da maturidade fisiológica de sementes de *Eugenia*. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Metodista de São Paulo, Curso de Ciências Biológicas. São Bernardo do Campo. 39p.
- Silva, C.V.; Bilia, A.C., Maluf, A.M. & Barbedo, C.J.** 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.- Myrtaceae). Revista Brasileira de Botânica, 26: 213-221.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2005. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. Revista brasileira de sementes, 27(1): 86-92.
- Teixeira, C.C.** 2009. Regeneração de embriões em sementes fracionadas de espécies brasileiras de *Eugenia*: influencia do estágio de maturação, do armazenamento e fase de germinação. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita-Filho". 63p.

Capítulo 3

Anatomia de sementes de *Eugenia* com ênfase em seu potencial regenerativo

INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae compreende cerca de 3.500 espécies, subordinadas a cerca de 100 gêneros, que apresentam dois centros principais de desenvolvimento: a América tropical e a Austrália (Barroso *et al.* 1984). Os representantes neotropicais de Myrtaceae estão inseridos na subfamília Myrtoideae que, na América, distribui-se em toda a faixa tropical e subtropical, sendo composta de apenas uma tribo, Myrteae (McVaugh 1968, Landrum & Kawasaki 1997). Atualmente, aceita-se a divisão de Myrteae em três subtribos, com base na morfologia dos embriões: Eugeniinae, Myrciinae e Myrtriinae (Nic Lughadha & Proença 1996). A morfologia do embrião, por ser muito distinta em diferentes grupos de plantas, tem sido bastante utilizada com finalidades taxonômicas na família (Schmid 1972, Barroso *et al.* 1984, Van Wyk & Botha 1984).

As sementes da subtribo Eugeniinae, e nela está inserido o gênero *Eugenia*, têm embrião eugenióide, no qual os cotilédones são grossos, separados, plano-convexos e o hipocótilo tem pequena protrusão, ou os cotilédones são parcialmente fundidos formando uma massa única, com hipocótilo não distinguível (Landrum & Kawasaki 1997). No gênero *Eugenia* o embrião consome todo o endosperma no decorrer do seu desenvolvimento, ou seja, a semente é exalbuminosa (Flores & Rivera 1989). O material de reserva pode ser representado pelo amido, grão de aleurona, óleo e outros, que pode se acumular nos cotilédones ou no eixo hipocótilo-radicular. Nessas sementes o embrião ocupa toda a cavidade delimitada pelo envoltório da semente (Souza 2006).

A família Myrtaceae também inclui algumas espécies com sementes poliembriônicas (Landrum & Kawasaki 1997), inclusive dentro do gênero *Eugenia* (Johnson 1936, Gurgel & Soubihe Sobrinho 1951, Litz 1984). Porém, controvérsias taxonômicas a respeito da delimitação de espécies em *Eugenia* tornam esta afirmativa incerta, pois acredita-se que tais espécies de *Eugenia* com sementes poliembriônicas deveriam ser incluídas em *Syzygium* (Van Wyk e Botha 1984, Nic Lughadha & Proença 1996). Além disto, estudos mais recentes encontraram apenas um embrião em *Eugenia dysenterica*, *E. pyriformis* e *E. punicifolia* (Salomão & Allem 2001, Justo *et al.* 2007, Coneglian 2007), enquanto outros autores citam a ausência de distinção entre o eixo hipocótilo-radícula e os cotilédones (Andrade & Ferreira 2000, Lucas *et al.* 2005).

Diversos estudos sobre fracionamento em sementes de *Eugenia* já foram realizados (Anjos & Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005). O fracionamento em corte transversal de *Eugenia stipitata* demonstrou bom potencial regenerativo, ou seja, nas metades que permaneceram com o eixo hipocótilo-radícula obteve-se 89% de germinação e, ainda,

20% nas suas metades opostas o que totalizaria 109% de germinação (Anjos & Ferraz 1999). Outros exemplos são das sementes de *E. pyriformis* (Silva *et al.* 2003) com uma germinação de até 184% e *E. uniflora*, *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, com germinação também superando os 100%, variando de 114% a 166% (Silva *et al.* 2005). Tais dados sugerem que este é um comportamento que pode ser estendido para todo o gênero.

Relatos de poliembrionia em outros gêneros de Myrtaceae, de um embrião aparentemente indiviso e da possibilidade de ampliação da germinação e do número de plântulas obtidas de cada semente de *Eugenia* sugerem a possibilidade de que espécies deste gênero sejam poliembriônicas. Por outro lado, o fato de sementes não fracionadas resultarem em apenas uma plântula gera dúvida quanto à origem destas novas plantas. Portanto, estudos anatômicos são de fundamental importância para que se conheça a origem das várias plantas provenientes de semente fracionada.

OBJETIVO

Avaliar as modificações morfológicas decorrentes da maturação e da germinação em sementes intactas ou fracionadas de espécies brasileiras de *Eugenia*, visando a identificar a origem da capacidade regenerativa dessas sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros de três espécies de *Eugenia* (*E. cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora*) foram coletados em dois locais distintos: em propriedade privada na Zona Norte de São Paulo (23°27' S e 46°36' W) (*E. uniflora*) e no Jardim Botânico de São Paulo, em São Paulo-SP (23°38' S, 46°37' W) (*E. cerasiflora* e *E. involucrata*). Os frutos foram beneficiados por lavagem manual com auxílio de peneira, em água corrente, para a separação das sementes, sendo imediatamente retirado o excesso de umidade (Delgado & Barbedo 2007).

Para observação de mudanças nos tecidos do embrião durante a germinação após o fracionamento, sementes maduras foram fracionadas ao meio, tomando-se o cuidado de separá-las pela marca da cicatriz placentária, e colocadas para germinar, sendo retiradas amostras para análise anatômica diariamente de 1 a 15 dias de cultivo, além do controle (zero dias). Durante todo o desenvolvimento após os fracionamentos em todos os tempos analisados, amostras de sementes foram preparadas para observação anatômica, visando a

identificar, nos embriões das sementes intactas ou fracionadas, quando e quais células/tecidos apresentam capacidade de originar novos indivíduos.

Para tal, amostras foram fixadas em FNT (Formalina Neutra Tamponada) (Lillie 1954) por 48h e colocadas no vácuo por pelo menos 2h, para manter a integridade do tecido após a morte sem alteração da estrutura celular. Posteriormente, foram transferidas para etanol 10%, 30% e 50% por 12 h em cada tratamento e, então, estocadas em etanol 70% (Johansen 1940), até o início da confecção do laminário.

As sementes foram levadas ao laboratório de Botânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, onde passaram por desidratação gradativa das amostras em série etanólica, amolecimento em óleo Terpeniol por cinco dias e inclusão em parafina (Johansen 1940). O seccionamento foi realizado em série, transversalmente (8 µm de espessura) e longitudinalmente (10 µm de espessura); as seções obtidas foram coradas com azul de toluidina 0,05% (O'Brien *et al.* 1964), e safranina 0,1% e azul de astra 1% (Bukatsh, 1972) e montadas em resina sintética (Gerlach 1969). Fotomicrografias com as devidas escalas foram obtidas nas mesmas condições ópticas, em um fotomicroscópio Leica DM 4500 acoplado à câmera digital Leica DFC 320 e a um estereomicroscópio Leica MZ 75 e em um fotomicroscópio equipado com câmera digital Olympus modelo BX41-BF-III, *software* de análise de imagens Image-Pro Express versão 4.0.1, da Media Cybernetics.

RESULTADOS

As sementes maduras de *Eugenia cerasiflora*, *E. uniflora* e *E. involucrata* são exalbuminosas, exibem tegumento delgado, de cor marrom, textura membranácea (Fig.10b;e;h), e embrião semigloboso a reniforme, maciço, de cor esbranquiçada para *E. involucrata* e *E. cerasiflora* (Fig.10c;f) e esverdeada em *E. uniflora* (Fig. 10i), preenchendo completamente a cavidade seminal. O embrião apresenta plúmula rudimentar (Figs. 14e, 15c, 16c), o eixo hipocótilo-radícula curto (Figs. 11b;c;e) , e os dois cotilédones carnosos e parcialmente unidos (Fig.11d;e;f). O eixo hipocótilo-radícula se distingue no embrião a olho nu em *E. cerasiflora* e *E. involucrata* (Fig.11a;c), no qual o ápice da radícula é formado por uma pequena protuberância, sendo rodeada por uma depressão circular; em *E. uniflora* esta distinção do embrião não foi evidente (Fig. 11e).

Os cotilédones são revestidos por epiderme unisseriada, cujas células contêm compostos fenólicos na região de concrecimento; estômatos não foram observados (Figs.12a;b;c); somente *Eugenia cerasiflora* apresenta cutícula fina (Fig. 12e), o que não foi

observado para as outras duas espécies, que não apresentaram cutícula (Fig.12d;f). Os cotilédones são preenchidos por células parenquimáticas, contendo grande quantidade de grãos de amido, e vascularizados por feixes que partem de um mesmo ponto do eixo hipocótilo-radícula e se unem na região apical dos cotilédones (Fig. 17). Os feixes vasculares são colaterais e delimitados por células parenquimáticas que constituem uma bainha (Fig.13a;c;e). Células adjacentes à epiderme e próximas aos feixes vasculares apresentam conteúdo fenólico.

Por volta do décimo quarto dia de germinação após o fracionamento, em todas as três espécies estudadas, uma raiz adventícia foi formada em algumas das porções (Fig. 14e, 15c, 16d). Estas raízes geralmente se formaram no ponto de condescimento dos cotilédones, onde não ocorreu lesão pelo fracionamento das sementes. Células parenquimáticas perivasculares se dividem periclinalmente e proliferam (Fig.13b;d;f), originando o meristema radicular. Eventualmente, várias raízes adventícias se originam na região onde ocorreu o fracionamento. Nestes casos, não há formação de plântulas normais, provavelmente devido ao trauma causado no feixe vascular.

Nas regiões traumatizadas dos cotilédones, seja pelo fracionamento ou pelo ataque de coleópteros, células parenquimáticas subepidérmicas se desdiferenciam e formam uma faixa meristemática que apresenta forma retangular e arranjo compacto, sem espaços entre si, as paredes são suberificadas, o citoplasma pouco denso, podendo conter compostos fenólicos (Fig. 12h). Esta faixa origina um tecido de cicatrização, que apresenta forma de uma protuberância arredondada, constituída por células parenquimáticas alongadas, diferentes das células cotiledonares.

O embrião apresenta um grande número de cavidades secretoras, tanto no eixo hipocótilo-radícula, quanto nos cotilédones. Tais cavidades são subepidérmicas, constituídas de epitélio multisseriado que delimita um lume (Figs. 14b e 15b). Cavidades secretoras de tamanho maior e em maior número ocorrem em *Eugenia uniflora* (Fig.16b).

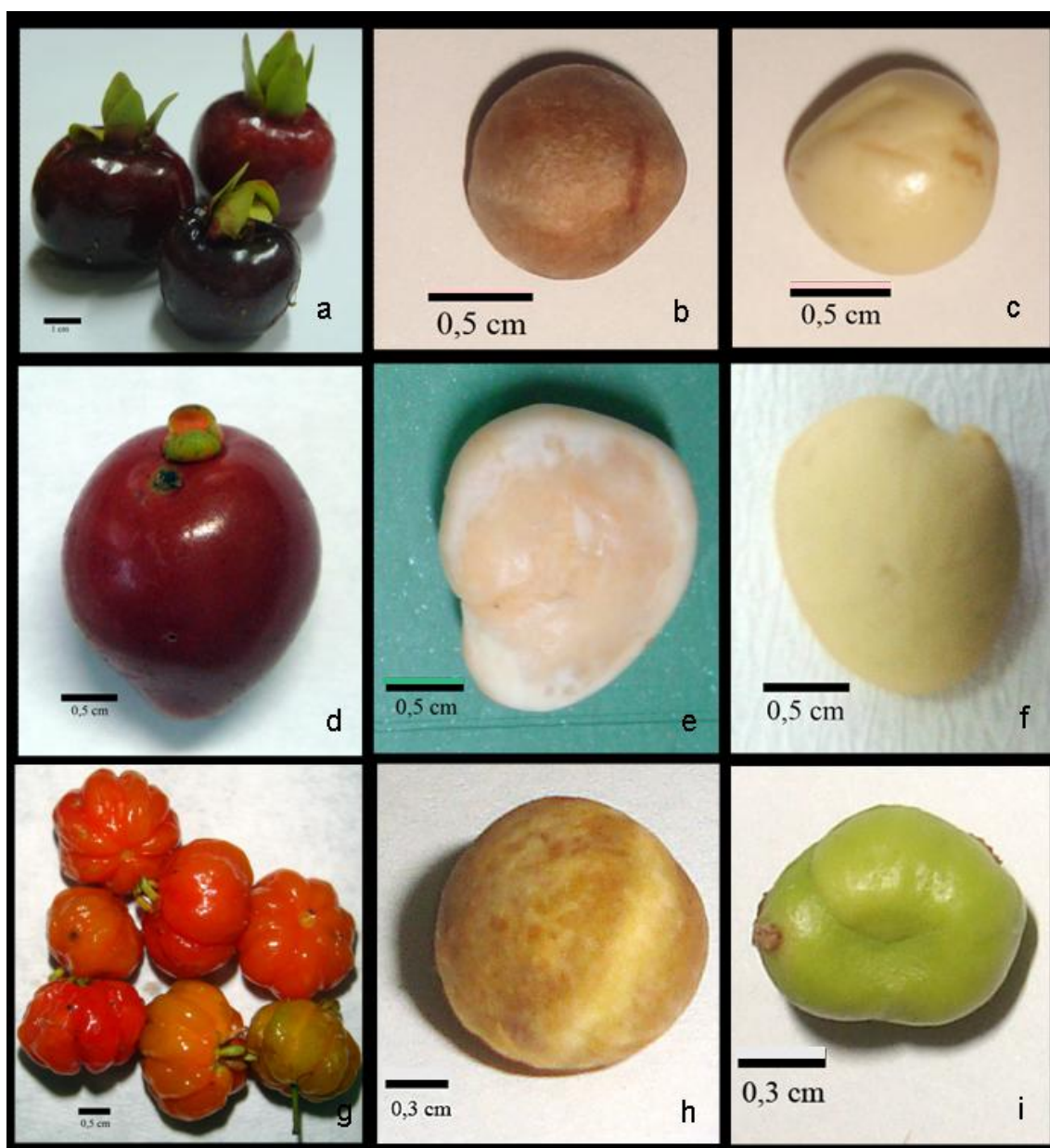


Figura 10 - Visão geral dos frutos, semente e embrião de cereja - *Eugenia involucrata* (a, b, c), guamirim - *E. cerasiflora* (d,e,f) e pitanga - *E. uniflora* (g,h,i).

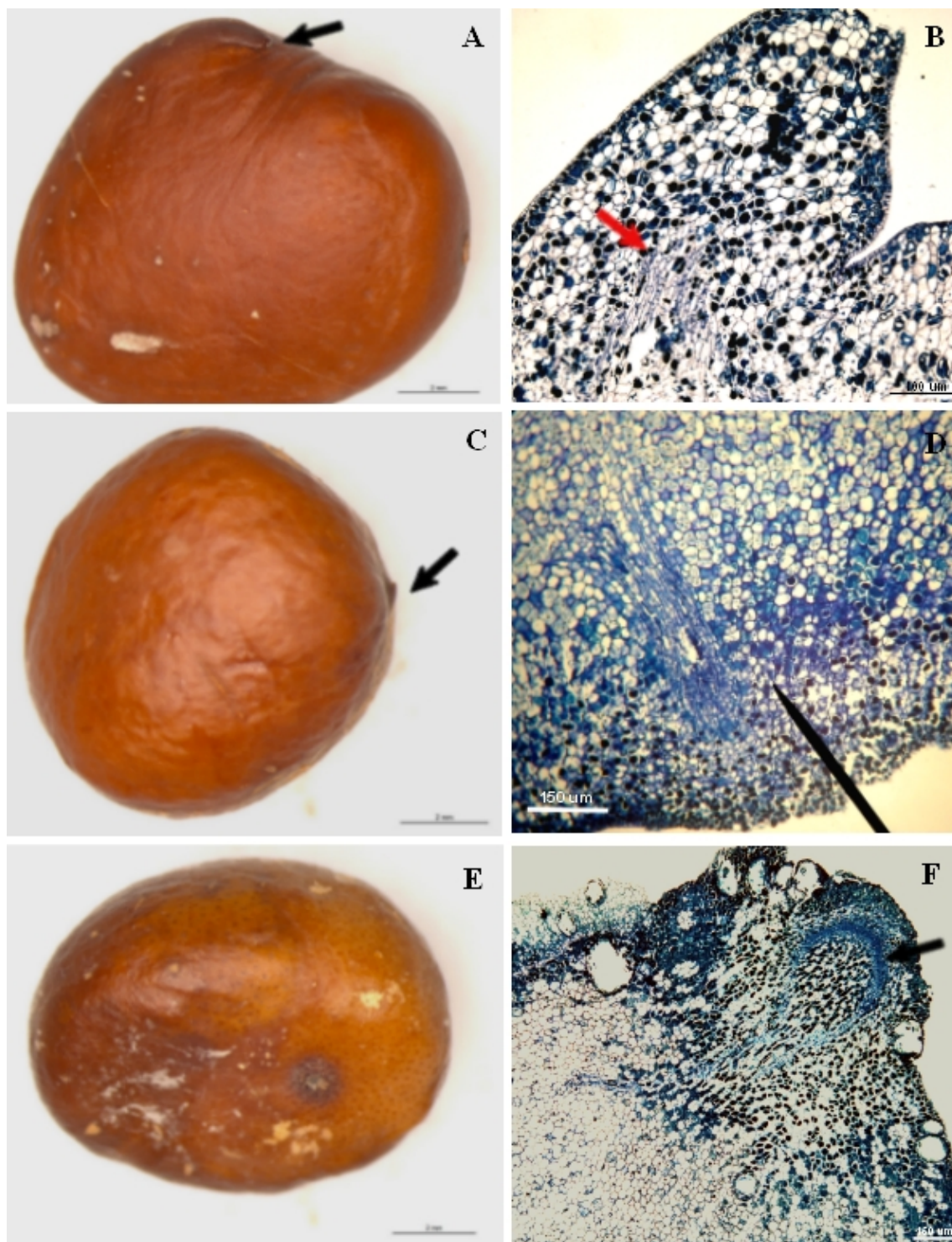


Figura 11 - Sementes maduras fixadas em FNT de *Eugenia cerasiflora* (A) e *E. involucrata* (C) com pequena protuberância rodeada por uma depressão circular distinguindo o eixo hipocótilo-radícula a olho nu (seta) e em *E. uniflora* (E) esta distinção do embrião não foi evidente. Seções anatômicas do eixo hipocótilo-radícula em *Eugenia cerasiflora* (B), *E. involucrata* (D) e *E. uniflora* (F) apontados pela seta.

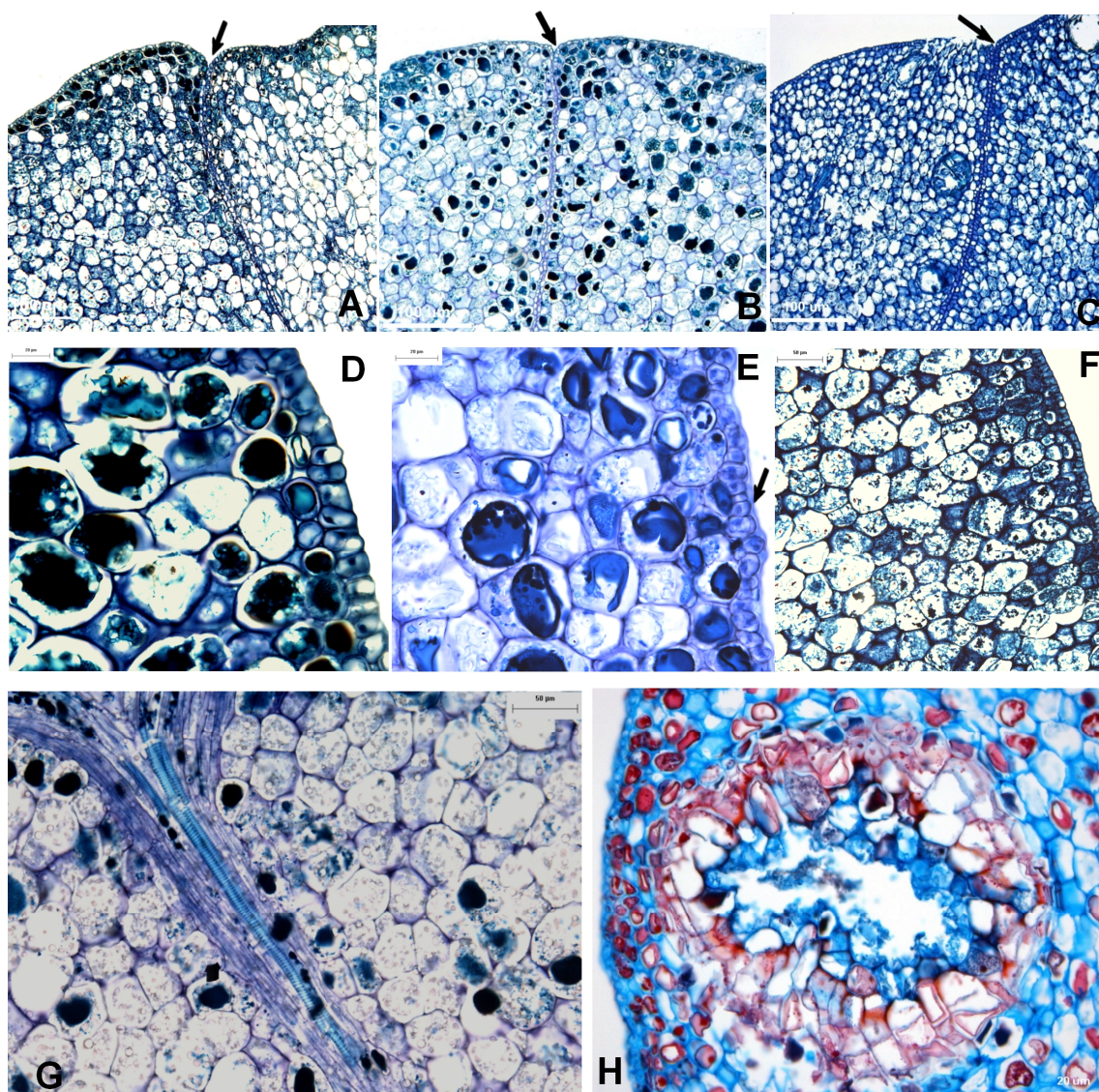


Figura 12 – Seções anatômicas de cotilédones de espécies de *Eugenia*. A e D epiderme unisseriada e união dos cotilédones de *Eugenia involucrata*. B e E epiderme unisseriada com cutícula (seta) e união dos cotilédones de *E. cerasiflora*. C e F epiderme unisseriada e união dos cotilédones de *E. uniflora*. G feixes vasculares em *E. cerasiflora* em vista longitudinal. H tecido de cicatrização, constituído por células parenquimáticas alongadas, diferentes das células cotiledonares.

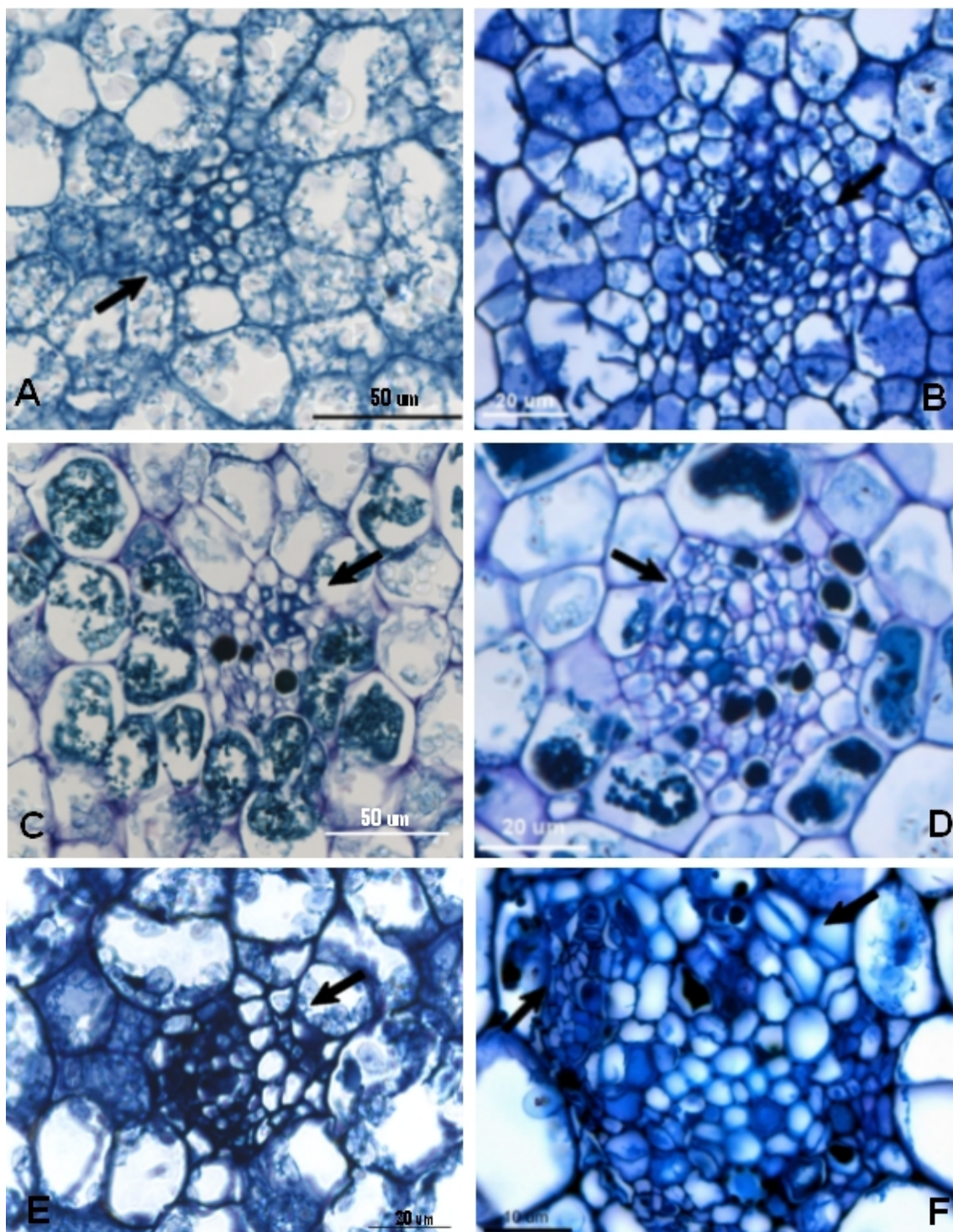


Figura 13 - Seções anatômicas de cotilédones de espécies de *Eugenia*. A, C e E apontado pela seta feixe vascular do ápice do cotilédone da fração ao zero dia de germinação (controle) de *Eugenia involucrata*, *E. cerasiflora* e *E. uniflora* respectivamente B, D e F apontado pela seta a divisão periclinal e proliferação das células parenquimáticas perivasculares (setas), aos 9 dias de germinação após o fracionamento, de *Eugenia involucrata*, *E. cerasiflora* e *E. uniflora* respectivamente.

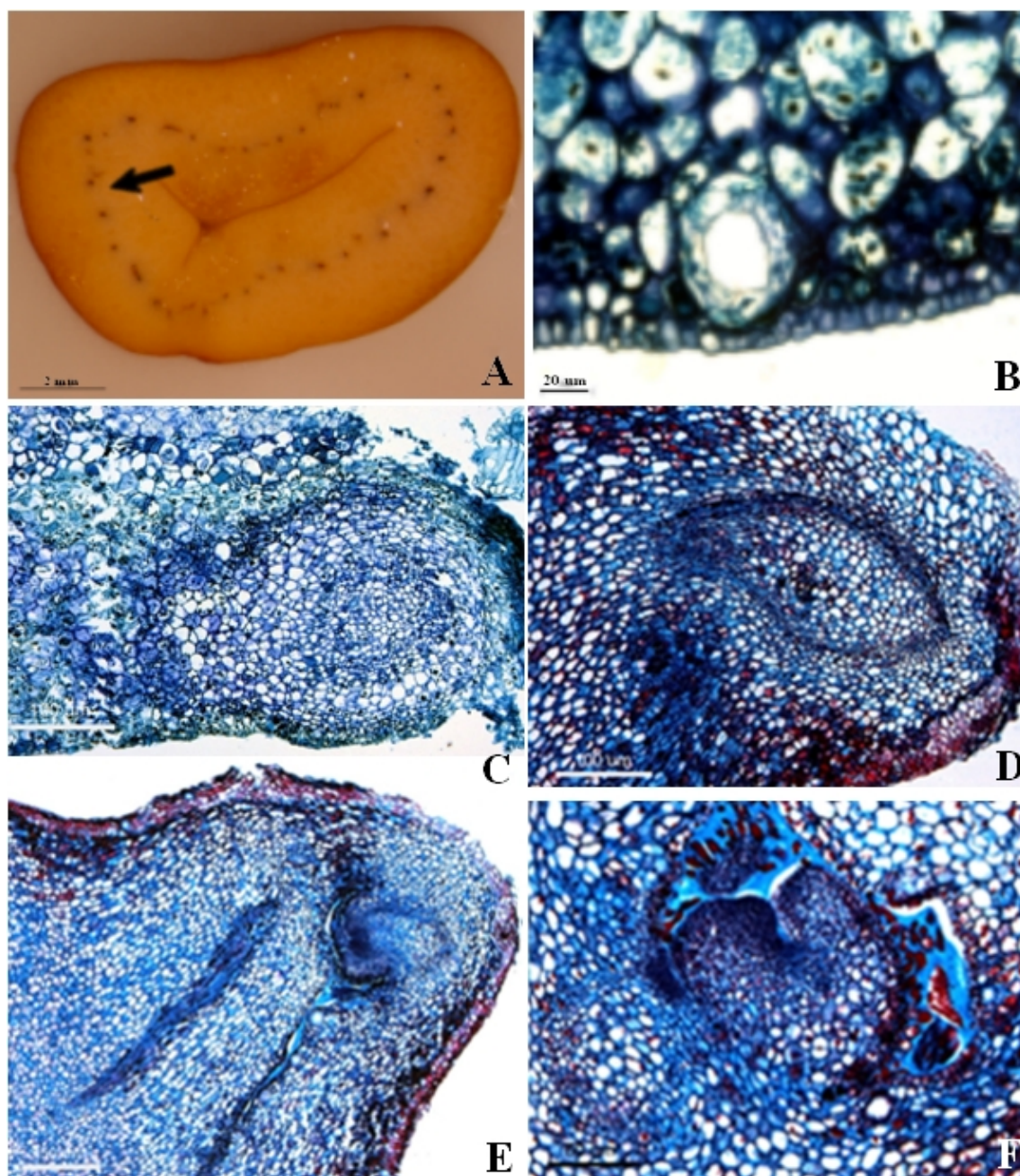


Figura 14 - A seção transversal do embrião fixado em FNT de *Eugenia involucrata* (cereja-do-mato) com visualização dos feixes vasculares na periferia do cotilédone (seta). B cavidade secretora em detalhe. C e D saída da radícula na fração inicial e na sua fração oposta. E nova planta formada na fração oposta. F plúmula em detalhe.

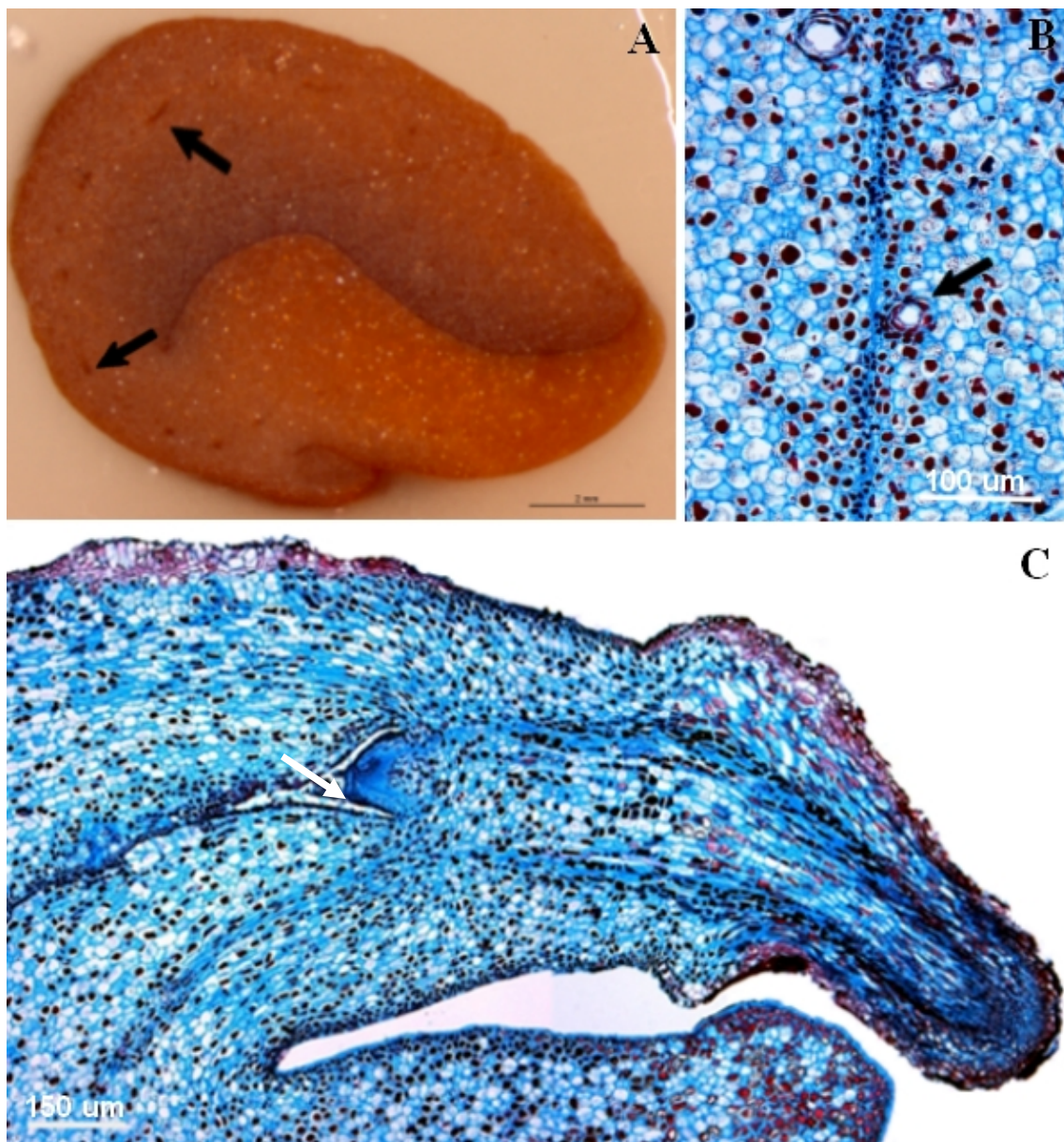


Figura 15 - A seção transversal do embrião fixado em FNT de *Eugenia cerasiflora* (guamirim) com visualização dos feixes vasculares na periferia do cotilédone (seta). B cavidades secretoras. C saída da radícula na fração oposta, submetida ao fracionamento e plúmula (seta).

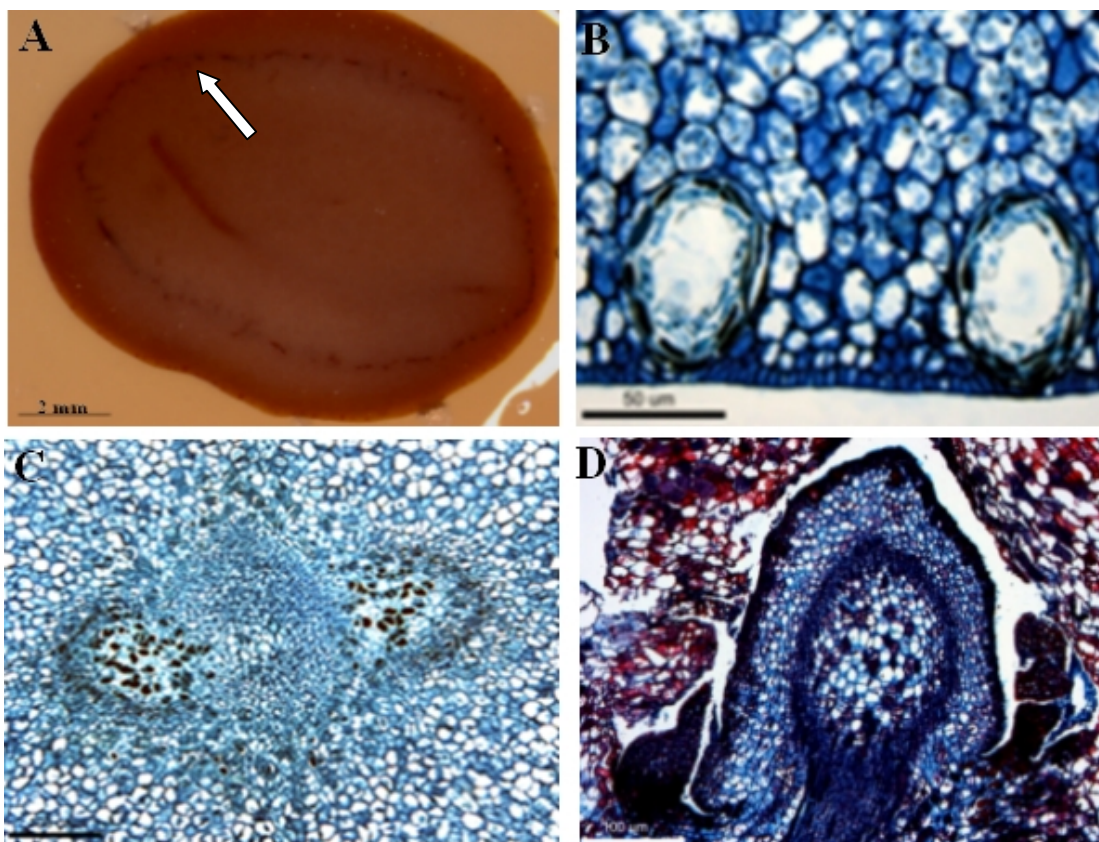


Figura 16 – A seção transversal do embrião fixado em FNT de *Eugenia uniflora* (pitanga) com visualização dos feixes vasculares na periferia do cotilédono (seta). B cavidade secretora em detalhe. C eixo hipocótilo-radícula, em vista transversal, em semente madura não submetida ao fracionamento D saída da radícula na fração oposta, submetida ao fracionamento.

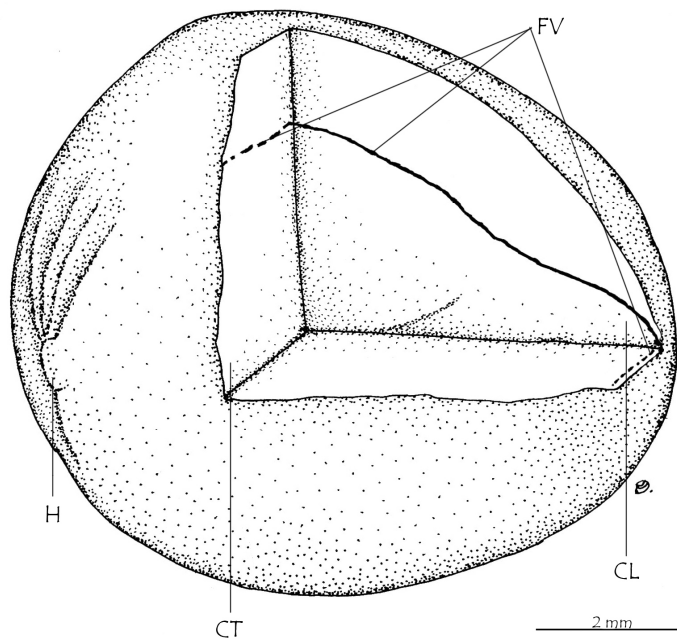


Figura 17 – Ilustração esquemática evidenciando os feixes vasculares em corte transversal e longitudinal em sementes de *Eugenia involucrata*. (FV = feixe vascular; H = hilo; CL = corte longitudinal; CT = corte transversal)

DISCUSSÃO

As sementes de *Eugenia cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora*, quando fracionadas, apresentam alta capacidade regenerativa, produzindo novos indivíduos. Tal fato deve ocorrer em função do embrião, de maneira geral, ser um organismo constituído por células meristemáticas e por células em diferenciação sendo, portanto, totipotente, dispondo de todas as informações necessárias para crescer e dar origem a uma planta adulta (Marcos Filho 2005).

Eugenia cerasiflora, *E. involucrata* e *E. uniflora* apresentaram embrião com eixo hipocótilo-radícula distinto e dois cotilédones parcialmente unidos que permitem sua distinção da linha de soldadura, tanto na semente madura como em sementes verdes, assim como observado para *E. pyriformis* (Justo *et al.* 2007) e *E. puniceifolia* (Coneglian 2007). Estes dados corroboram com Justo *et al.* (2007) e Coneglian (2007) e mostram que estas sementes são monoembriônicas, porém contradizem algumas descrições para o gênero na literatura, como as de McVaugh (1956), Schmid (1972), Barroso *et al.* (1984), Andrade & Ferreira (2000) e Lucas *et al.* (2005). Segundo Barroso *et al.* (1984), o embrião de *Eugenia* é globoso a ovóide, crasso, conferruminado, sem diferenciação aparente entre o eixo hipocótilo-radícula e cotilédones, sendo que a fusão dos cotilédones é tal que não permite a distinção da linha de soldadura. McVaugh (1956) e Schmid (1972) descreveram o embrião de *Eugenia* como indiviso e pseudomonocotiledonar, sugerindo a presença de tecido meristemático não diferenciado na região cotiledonar. A dificuldade de distinção do embrião pode ter levado à conclusão, por alguns autores como Andrade & Ferreira (2000) e Lucas *et al.* (2005), da ausência de distinção entre o eixo hipocótilo-radícula e os cotilédones.

As sementes de *Eugenia cerasiflora*, *E. uniflora* e *E. involucrata* são exalbuminosas, característica comum aos representantes da ordem Myrtales (Tobe & Raven 1983) e do gênero *Eugenia* (Flores e Rivera 1989). Segundo Landrum & Stevenson (1986), o consumo completo do endosperma no decorrer da embriogênese teria como consequência a transferência da função de armazenamento de energia do endosperma para diferentes partes do embrião, tais como os cotilédones. Dados obtidos neste trabalho corroboraram tais observações, visto que grãos de amido, principal reserva das três espécies, foram observados nos cotilédones. Este tipo de reserva já havia sido relatado por Coneglian (2007) para *E. puniceifolia* e por Bordignon (2000) e Mello (2008) para *E. uniflora*, sendo que, para esta última foi realizada sua quantificação e verificado que o amido representava cerca de 64% da matéria seca das sementes.

Interessante ressaltar a ocorrência de estruturas secretoras, como as cavidades secretoras e os idioblastos fenólicos, no embrião de *Eugenia cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora*. Cavidades secretoras já haviam sido observadas em *E. punicifolia* (Coneglian 2007), e são consideradas uma das características marcantes de Myrtaceae (Barroso *et al.* 1984, Nic Lughadha & Proença 1996) apresentando, inclusive, valor taxonômico. A presença de compostos fenólicos em embriões foi descrita anteriormente por Castro e Machado (2006) e Coneglian (2007). Estes mesmos autores relacionaram a presença destes compostos à função de proteção aos tecidos e a mecanismos de interação de plantas e animais, agindo como dissuasivo alimentar e reduzindo a herbivoria. É interessante observar que para *E. uniflora*, na qual a densidade de cavidades secretoras é maior, foi notada uma quantidade inferior de ataque de herbívoros.

Os dados obtidos no presente trabalho mostram que as sementes de *Eugenia cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora* não são poliembriônicas. A produção de novas plantas ocorreu a partir da desdiferenciação de células de tecidos perivasculares localizados na região apical dos cotilédones. Tal fato mostra que as novas plantas produzidas apresentam genoma diferente da planta-mãe, e idêntico ao do embrião resultado da fertilização, o que deve lhes conferir maior valor adaptativo. Este resultado é diferente do obtido para outras espécies de Myrtaceae que também apresentaram capacidade de regenerar novos embriões como *Syzygium jambos* (jambo), *S. cuminii* (jambolão), *Myrciaria trunciflora* (jabuticaba), *M. cauliflora* (sabará), espécies em que as novas plantas foram produzidas a partir de embriões adventícios nucelares (Gurgel & Soubihe 1951) e em *Garcinia indica*, *G. xanthochymus* e *G. cambogia* (Malik *et al.* 2005), por apresentarem agamospermia facultativa.

Não foi utilizada a ação de reguladores de crescimento exógenos para obtenção dos novos embriões em *Eugenia cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora*, mostrando que apenas a ação mecânica do fracionamento pôde estimular a desdiferenciação. O fracionamento possivelmente pôde promover uma resposta de reprogramação genômica da atividade transcricional necessária para células somáticas se tornarem células embriogênicas (Verdeil *et al.* 2007). Em estudos de propagação *in vitro* que conseguiram produzir embriões somáticos mediante desdiferenciação celular em Myrtaceae, a partir de órgãos como folhas, caules, raízes e até mesmo cotilédones, estes reguladores de crescimento exógenos sempre foram utilizados não ocorrendo formação dos embriões espontaneamente (Litz 1984, Azmi *et al.* 1997, Canhoto *et al.* 1999, Alves *et al.* 2004, Pinto *et al.* 2008, Motoike *et al.* 2007).

Resposta semelhante às obtidas para as espécies de *Eugenia* estudadas, de formação de novos indivíduos a partir de células parenquimáticas perivasculares, ocorreu durante a formação de calos em propagação *in vitro* de folhas de *Eucalyptus globulus*, na qual se

observou a diferenciação de gemas e primórdios foliares, seguindo o padrão típico de organogênese em regiões associadas aos feixes vasculares, apresentando a continuidade vascular com o tecido original (Alves *et al.* 2004).

A produção de novos indivíduos de *Eugenia cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora* somente ocorreu quando houve o fracionamento da semente, não ocorrendo de maneira espontânea em sementes intactas, o que sugere que o próprio embrião produz substâncias, como fitorreguladores, que inibam o desenvolvimento destes novos indivíduos. Desta maneira permite que as reservas se concentrem apenas no eixo hipocótilo-radícula. Se afetadas por agentes externos (herbivoria ou ação antrópica), porém, as sementes poderiam produzir novos eixos embrionários.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alves, E.C.S.C., Xavier, A. & Otoni, W.C.** 2004. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39(5): 421-430.
- Andrade, R.N.B. & Ferreira, A.G.** 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes, 22(2): 118-125
- Anjos, A.M.G. & Ferraz, I.D.K.** 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Acta Amazônica, 29(3): 337-348
- Azmi, A., Noin, M., Landré, P., Prouteau, M., Boudet, A.M. & Chriqui, D.** 1997. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: Ontogenesis and ploidy level of the regenerants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51: 9–16.
- Barroso, G.M., Peixoto, A.L., Costa, C.G., Ichaso, C.L. & Lima, H.C.** 1984. Sistemática de angiospermas do Brasil. Minas Gerais; Ed. Universidade Federal de Viçosa, 377p
- Bordignon, M. V.** 2000. Análise morfofisiológica de sementes de *Eugenia uniflora* L. e *Campomanesia xanthocarpa* Berg. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.
- Bukatsch, F.** 1972. Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos 61: 255.
- Canhoto, J.M. Lopes, M.L. & Cruz, G.S.** 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 57: 13–21
- Castro, M.M.; Machado, S.R.** 2006. Células e tecidos secretores. Anatomia Vegetal. Appezzato-da-Gloria, B. & Carmello-Guerreiro, S. (editoras). – 2ª edição. Viçosa: Ed. UFV

- Coneglian, I.R.M.** 2007. Morfologia e ontogênese do pericarpo e semente de *Eugenia punicifolia* (H. B. & K.) DC., *Myrcia bella* Camb. e *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg (Myrtaceae). Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 107p.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 42(2): 265-272.
- Flores, E.M.; Rivera, D.I.** 1989. Criptocotilia em algumas dicotiledôneas tropicais. Branesia, 32: 19-26.
- Gerlach, D.** 1969. Botanische mikrotechnik. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart, 298p.
- Gurgel, J. T. A.; Soubihe Sobrinho, J.** 1951. Poliembrionia em Mirtáceas. Bragantia 11 (46): 141- 163.
- Johansen, D. A.** 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company Inc, New York, 523p.
- Johnson, A.M.** 1936. Polyembryony in *Eugenia hookeri*. American Journal of Botany, 23: 83- 88.
- Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães, R.M. & Strassburg, R.S.** (2007). Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. Acta Botanica Brasilica, 21: 539-551.
- Landrum, L.R.; Kawasaki, M.L.** 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. Brittonia, 49: 508-536.
- Landrum, L. R. & Stevenson, D.** 1986. Variability of embryos in subtribe Myrtinae (Myrtaceae). Systematic Botany 11: 155-162.
- Lillie R.D.** 1954. Histopathologic technic and practical histochemistry. McGraw-Hill Book Co, New York.
- Litz, R.E.** 1984. *In vitro* responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. HortScience, 19: 720–722 .
- Lucas, E.J.; Belsham, S.R.; Nic Lughadha, E.M.; Orlovich, D.A.; Sakuragui, C.M.; Chase, M.W. & Wilson, P.G.** 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae - preliminary molecular evidence. Plant Systematics and Evolution, 251: 35-51.
- Malik, S.K., Chaudhury, R. and Abraham, Z.** (2005). Seed morphology and germination characteristics in three *Garcinia* species. Seed Science and Technology, 33: 595-604.
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq. 495p.
- McVaugh, R.** 1968. The genera of american Myrtaceae – an interim report. Taxon, 17: 354-418

- Mello, J.I.O.** 2008. Compostos de Reserva de Sementes e suas Relações com Diferentes Níveis de Sensibilidade à Dessecação e ao Congelamento. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. 117p.
- Motoike, S.Y., Saraiva, E.S., Ventrella, M.C., Silva, C.V. & Salomão, L.C.C.** 2007. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 89: 75–81
- Nic Lughadha, E. N. & Proença, C.** 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden, 83: 480-503
- O'Brien T. P.; Feder, N. & McCully, M. E.** 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. Protoplasma 59: 368-373.
- Pinto, G., Silva S., Yill-Sung P., Neves, L., Araújo, C., Santos, C.** 2008. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95: 79–88
- Salomão, A.N. & Allem, A.C.** 2001. Polyembryony in Angiospermous trees of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. Acta Botanica Brasilica, 15: 369-378.
- Schmid, R.** 1972. A Resolution of the *Eugenia-Syzygium* Controversy (Myrtaceae). American Journal of Botany, 59(4): 423-436
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M. & Barbedo, C.J.** 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). Revista brasileira de Botânica, 26(2): 213-221.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2005. Fracionamento e germinação de sementes de Eugenia. Revista brasileira de sementes, 27(1): 86-92.
- Souza, L. A.** 2006. Anatomia do fruto e da semente. Ponta Grossa - PR: UEPG, 129p.
- Tobe, H.; Raven, P.H.** 1983. An embryological analysis of Myrtales: its definition and characteristics. Annals of Missouri Botanical Garden, 70: 71-94.
- Van Wyk, A.E. & Botha, R.** 1984. The genus *Eugenia* (Myrtaceae) in southern Africa: ontogeny and taxonomic value of the seed. South African Journal of Botany, 3: 63-80.
- Verdeil, J.L., Alemanno, L., Niemenak, N. & Tranbarger, T.J.** 2007. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? TRENDS in Plant Science, 12(6): 245-252.

Capítulo 4

Atividade inibidora da germinação em extratos de sementes de *Eugenia uniflora* L.

INTRODUÇÃO

Estudos recentes de sementes de *Eugenia* têm demonstrado a capacidade de formação de novos embriões, mesmo sendo consideradas monoembriônicas (Salomão & Allem 2001, Justo *et al.* 2007, Coneglian 2007). Estas sementes, quando fracionadas, apresentam formação de mais de uma planta a partir de uma mesma semente, muitos dos quais mantêm a capacidade de desenvolver plântulas normais (Anjos & Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005, Teixeira 2009). A germinação, nestes estudos, nunca foi superior a 100% em sementes não fracionadas, sugerindo possa existir mecanismo de autorregulação por meio da produção de substâncias inibidoras a partir do momento em que a semente inicia a germinação. Em *Eugenia* estas substâncias podem estar presentes de maneira a inibir a germinação ou mesmo impedir a formação de novos embriões em sementes íntegras.

Na família Myrtaceae, substâncias com propriedades inibidoras foram identificadas em *Eucalyptus citriodora* Hook. (Ferreira *et al.* 2007), *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Mazzafera 2003), *Myrcia guianensis* Aubl. (Souza Filho *et al.* 2006), *Myrciaria cuspidata* Berg. (Rodrigues 2002) e *Eugenia dysenterica* DC. (Rizzini 1970, Giotto *et al.* 2007). Além disso, uma característica marcante dessa família é a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (Cronquist 1981, Barroso *et al.* 1984). O seu conteúdo de óleo essencial é típico para cada espécie, sendo formado por substâncias lipídicas voláteis. Seus componentes químicos apresentam particularidades importantes para a farmacologia e para a produção de essências, utilizadas na indústria de alimentos, perfumaria e cosméticos (Donato & Morretes 2007). Os óleos essenciais são considerados como potentes inibidores da germinação de sementes e do crescimento de diversas plantas, tanto na forma original quanto em mistura (Duke *et al.* 2002).

Os aleloquímicos podem ter origem no metabolismo primário, mas em sua maioria são provenientes do metabolismo secundário, destacando-se as saponinas, os taninos e os flavonóides, que apresentam solubilidade em água (Ferreira & Aquila 2000, Rodrigues 2002). A presença dessas substâncias pode estar associada à sobrevivência da espécie, uma vez que aparecem com frequência sob certas condições ambientais críticas (Borges e Rena 1993).

Apesar das evidências que sugerem um potencial inibidor em sementes de *Eugenia*, poucos estudos têm sido realizados com estas espécies. Por esse motivo, trabalhos que enfoquem o efeito que sementes desta família exercem sobre a germinação e o crescimento de plântulas torna-se relevante.

OBJETIVO

Avaliar o efeito do extrato de sementes de *Eugenia uniflora* sobre a germinação de suas próprias sementes e sobre as de feijão “Rosinha” e de aquênios de alface “Babá de Verão”.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo do material botânico

Coletas de frutos maduros de *Eugenia uniflora* L. foram realizadas em propriedade privada na Zona Norte de São Paulo (23°27' S e 46°36' W). Os frutos foram beneficiados em água corrente com auxílio de peneira, para a separação das sementes, sendo imediatamente retirado o excesso de umidade. As sementes de *E. uniflora* foram então acondicionadas em sacos de polietileno semipermeável com cerca de 25 perfurações pequenas (0,05 cm) para a livre entrada de ar e, então, armazenadas em geladeira a 8°C até o início dos experimentos, que ocorreu uma semana após a coleta (Delgado & Barbedo 2007).

Os testes de germinação foram realizados com sementes de *Eugenia uniflora* e com aquênios de alface 'Babá de Verão' (*Lactuca sativa* L.) e feijão 'Rosinha' (*Phaseolus vulgaris* L.), pois as duas espécies são facilmente encontradas no comércio local e apresentam alta sensibilidade a vários aleloquímicos (Ferreira 2004). A germinação foi realizada segundo a metodologia abaixo descrita para cada uma das espécies.

Obtenção dos extratos para os bioensaios

Foram utilizadas sementes em três fases de germinação a partir de sementes íntegras: semente não germinada, semente com raiz primária de mais de 1 cm e semente com parte aérea e raiz primária.

As sementes foram maceradas manualmente nas proporções de 1g e 10g, sendo utilizadas apenas as sementes e retiradas, quando foi o caso, a raiz primária ou parte aérea e raiz. O macerado obtido foi submetido à extração etanólica por duas horas à frio. Ao final deste tempo os extratos foram filtrados e evaporados em evaporador rotatório BUCHI tipo R-114, obtendo-se 0,001g e 0,01g de soluto. Os solutos foram diluídos em 200 ml de água cada, obtendo-se a concentração final de 10^{-5} g/ml e 10^{-4} g/ml, para cada fase da germinação.

Foram obtidas, ao final, seis concentrações e o controle (água pura), sendo as concentrações denominadas como: semente não germinada a 0,001% (I-1), semente não germinada a 0,01% (I-10), semente com raiz primária retirada a 0,001% (R-1), semente com

raiz primária retirada a 0,01% (R-10), semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,001% (P 1) e semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,01% (P-10)

Procedimentos para o estudo do potencial inibidor

Visando a verificar o efeito de possíveis substâncias inibidoras da formação de novos embriões em sementes de *Eugenia uniflora*, foi conduzido teste de germinação com sementes íntegras e fracionadas transversalmente ao meio, em germinadores Marconi tipo MA400, com umidade relativa do ar de 100%, mantida por circulação interna de água, regulados para a temperatura constante de 25°C e luz contínua.

As sementes foram acondicionadas em gerbox, contendo papel tipo germitest, com duas folhas para a base e uma para cobertura (Brasil 2009), pré-umedecidas com água (controle) ou os extratos, utilizando-se 4 repetições de 20 sementes para cada uma das concentrações. Neste teste, as avaliações foram realizadas a cada sete dias, sendo computadas as sementes germinadas (protrusão de raiz primária com pelo menos 5mm) e as plântulas normais (plântulas com sistema radicular e eófilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes), conforme Delgado & Barbedo (2007).

O teste de germinação também foi realizado com aquênios de alface 'Babá de Verão' (*Lactuca sativa* L.) utilizando-se 4 repetições de 50 sementes, e sementes de feijão 'Rosinha' (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando-se 4 repetições de 15 sementes. As sementes foram acondicionadas em placas de Petri de 5,5cm de diâmetro com dupla camada de papel filtro embebido água (controle) ou os extratos. As placas montadas foram mantidas em câmara de germinação à temperatura de $25,1^{\circ}\text{C} \pm 0,6$ e luz constante com umidade relativa do ar próxima a $89,5\% \pm 3$. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão radicular (Brasil 2009) e os resultados expressos em porcentagem de sementes germinadas e plântulas normais.

Verificação da interferência do potencial hídrico

Para a verificação da possível interferência do potencial hídrico das soluções na germinação das sementes, os potenciais da água e dos diferentes extratos foram avaliados. A partir dos resultados foram preparadas soluções de polietileno glicol (PEG 6000) e de cloreto de sódio (NaCl) com valores próximos aos obtidos. As soluções de PEG 6000 foram calculadas segundo a fórmula de Michel & Kaufman (1973), enquanto para NaCl foram calculadas segundo tabela apresentada por Moraes *et al.* (2005), com os potenciais osmóticos de 0 (água pura, utilizada como controle), -0,05, -0,10, -0,15, -0,2, -0,25, -0,4 MPa. O

potencial hídrico das soluções foi aferido por meio de medidor WP4 Dewpoint Potentiometer (Decagon).

Os testes de germinação foram realizados com aquênios de alface (*Lactuca sativa* L.) e sementes de feijão “Rosinha” (*Phaseolus vulgaris* L.). As sementes foram acondicionadas em placas de Petri de 5,5 cm de diâmetro com dupla camada de papel filtro embebido com 6ml das soluções ou de água (controle). As placas montadas foram mantidas a $25,1^{\circ}\text{C} \pm 0,6$ e luz constante com umidade relativa do ar próxima a $89,5\% \pm 3$. Foram calculadas as porcentagens de germinação (protrusão da raiz primária) e de desenvolvimento de plântulas normais. A determinação do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes foi realizada conforme Maguire (1962), por meio de contagens diárias do número de sementes germinadas.

RESULTADOS

Os extratos de sementes de *Eugenia uniflora* em diferentes fases de germinação não alteraram a germinação ou a formação de plântulas normais das sementes dessa mesma espécie, íntegras ou submetidas a fracionamento (tabela 4). O índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes íntegras não sofreu mudanças significativas em qualquer das concentrações analisadas, porém este mesmo comportamento não foi observado em sementes fracionadas onde o menor valor foi observado para sementes do tratamento controle (1,77) e o maior para a concentração P-10 (3,18). O tempo médio variou em sementes inteiras, porém não apresentou grandes alterações nas fracionadas (tabela 5).

As maiores diferenças na germinação de *Eugenia uniflora* para os diferentes EE foram observadas as concentrações R-1 e R-10, nas quais as curvas se apresentaram de maneira muito diferentes em relação ao controle, tanto para sementes íntegras como para as fracionadas (figura 16).

A germinação e o IVG da alface apresentaram diferenças significativas principalmente para a concentração P-10, porém estas diferenças ficaram evidentes principalmente sobre a formação de plântulas normais que chegou a ser nula em na maioria das concentrações analisadas (tabela 6). As sementes germinadas apresentavam um encurtamento e escurecimento das raízes e menor quantidade de pelos absorventes (figura 19a), não sendo consideradas como plântulas normais.

A germinação das sementes de feijão não apresentou diferenças significativas, enquanto para formação de plântulas normais os tratamentos com valores mais altos foram o controle e o R-1 o restante apresentou valores nulos ou quase nulos (tabela 7), sendo também que muitas apresentaram plântulas com desenvolvimento anômalo (figura 19b).

A investigação da interferência do potencial hídrico dos diferentes extratos na germinação das sementes está apresentada na tabela 8. Através da medição do potencial hídrico das diferentes concentrações verificou-se que as mesmas não apresentaram valores abaixo de -0,20 MPa. A partir desta informação foi avaliado um gradiente com potenciais abaixo e acima destes valores obtidos, pois vários estudos na literatura mostraram que extratos de plantas podem inibir a germinação de sementes, não necessariamente devido aos seus constituintes químicos, mas sim em função do potencial osmótico do extrato (Haugland & Brandsaeter 1996).

As sementes da alface apresentaram comportamento germinativo semelhante tanto para a solução de PEG quanto para NaCl, demonstrando que as soluções não interferiram na germinação até valores próximos a -0,20 MPa. As diferenças foram realmente expressas na formação de plântulas normais, sendo afetada pelas diferentes as soluções analisadas.

Para as soluções de PEG a interferência na formação de plântulas normais ocorreu em valores próximos a -0,15 MPa e a alteração no índice de velocidade de germinação em -0,10 MPa. Este comportamento não foi observado para soluções de NaCl em que a alteração na formação de plântulas normais somente foi observada em -0,20 MPa e a alteração no índice de velocidade de germinação -0,15 MPa.

A partir dos dados da tabela 10 podemos observar que a germinação das sementes de feijão foi afetada pelas soluções de PEG a partir de valores abaixo de -0,15 MPa, fato não observado para as soluções de NaCl que não apresentaram diferenças significativas. As soluções de PEG também afetaram a formação de plântulas normais, comportamento novamente não observado para as soluções de NaCl de mesmo potencial osmótico que apresentaram valores até mais altos que o controle (figura 18).

As soluções com potenciais hídricos de -0,4 MPa apresentaram uma queda acentuada na germinação nas duas espécies estudadas, chegando na maioria dos casos a ser nula.

Tabela 4 - Efeito de extratos obtidos de sementes de *Eugenia uniflora* sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *E. uniflora* (pitanga) íntegras ou submetidas a fracionamento ao meio em corte transversal, sendo computada apenas uma das frações.

Solução do substrato	Sementes inteiras			Meias sementes		
	G%	PN%	IVG	G%	PN%	IVG
Água	99 a	93 a	1,51 a	90 a	49 a	1,77 c
I-1	100 a	90 a	2,01 a	88 a	48 a	2,88 abc
R-1	98 a	91 a	2,03 a	92 a	46 a	2,51 abc
P-1	100 a	94 a	2,08 a	97 a	47 a	2,97 ab
I-10	95 a	91 a	1,99 a	92 a	44 a	1,90 bc
R-10	99 a	91 a	1,77 a	94 a	46 a	2,89 abc
P-10	95 a	89 a	1,30 a	89 a	50 a	3,18 a

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

Tabela 5 - Efeito dos extratos obtidos de sementes de *Eugenia uniflora* sobre o tempo médio e a variância do tempo médio da germinação em sementes de *E. uniflora* (pitanga) íntegras ou submetidas a fracionamento ao meio em corte transversal, sendo computada apenas uma das frações.

Solução do substrato	Sementes inteiras		Meias sementes	
	Tm	Variância do tempo médio	Tm	Variância do tempo médio
Água	16,1	41,2	20,4	180,5
I-1	11,2	11,9	24,5	110,4
R-1	11,1	17,8	22,7	256,2
P-1	11,3	26,8	21,3	282,5
I-10	11,8	33,2	18,6	174,6
R-10	13,8	45,0	20,3	175,1
P-10	17,9	25,1	19,4	201

Tabela 6 - Efeito dos extratos obtidos de sementes de *Eugenia uniflora* sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio (Tm) de aquênios de *Lactuca sativa* (alface).

Solução do substrato	G%	PN%	IVG
Água	71 a	70 a	4,07 a
I-1	74 a	73 a	4,03 a
R-1	58 a	0 b	3,13 a
P-1	51 ab	0 b	3,01 a
I-10	63 a	0 b	3,43 a
R-10	51 ab	0 b	2,78 ab
P-10	27 b	0 b	1,41 b

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

Tabela 7 - Efeito dos extratos obtidos de sementes de *Eugenia uniflora* sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Phaseolus vulgaris* (Feijão).

Solução do substrato	G%	PN%	IVG
Água	100 a	85 a	2,5 a
I-1	50 a	29 b	1,49 a
R-1	98 a	90 a	2,45 a
P-1	58 a	23 b	1,3 a
I-10	63 a	0 b	1,44 a
R-10	78 a	0 b	1,85 a
P-10	62 a	0 b	1,44 a

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

Tabela 8 – Valores da água e do potencial hídrico das soluções obtidas a partir do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* (pitanga).

	Potencial hídrico (MPa)
Água (Controle)	-0,13 ± 0,02
Sementes Integras 0,001%	-0,10 ± 0,02
Sementes Integras 0,01%	-0,15 ± 0,04
Sementes com raiz retirada 0,001%	-0,13 ± 0,02
Sementes com raiz retirada 0,01%	-0,19 ± 0,01
Sementes com plântula retirada 0,001%	-0,09 ± 0,04
Sementes com plântula retirada 0,01%	-0,16 ± 0,01

Tabela 9 - Efeito das soluções com diferentes potenciais hídricos sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%) e índice de velocidade de germinação (IVG) em aquênios de *Lactuca sativa* (alface).

Solução	Potencial osmótico	G %	PN%	IVG
Controle	0,0 MPa	96 a	94 ab	40,7 ab
PEG 6000	-0,05 MPa	98 a	97 a	44,9 a
	-0,1 MPa	95 a	91 abc	31,9 bcd
	-0,15 MPa	90 ab	72 bc	30,9 cd
	-0,2 MPa	81 ab	45 d	17,7 fg
	-0,25 MPa	86 ab	30 de	23,2 de
	-0,4MPa	12 c	4 f	2,29 g
NaCl	-0,05 MPa	91 a	90 abc	33,8 bc
	-0,1 MPa	91 a	91 abc	34,1 bc
	-0,15 MPa	95 a	93 ab	35,9 abc
	-0,2 MPa	85 ab	82 abc	15,9 ef
	-0,25 MPa	71 b	69 c	13,7 ef

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

Tabela 10 - Efeito das soluções com diferentes potenciais hídricos sobre a germinação (G%), plântulas normais (PN%) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Phaseolus vulgaris* (Feijão).

Solução	Potencial osmótico	G %	PN%	IVG
Controle	0,0 MPa	100 a	78 ab	8,87 ab
PEG 6000	-0,05 MPa	98 ab	80 ab	8,68 b
	-0,1 MPa	100 a	72 b	8,80 ab
	-0,15 MPa	92 ab	4 c	4,45 cd
	-0,2 MPa	89 b	0 c	4,78 cd
	-0,25 MPa	78 c	0 c	4,36 cd
	-0,4MPa	23 e	0 c	0,62 e
NaCl	-0,1 MPa	98 ab	92 a	6,42 c
	-0,2 MPa	98 ab	90 a	10,81 a

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

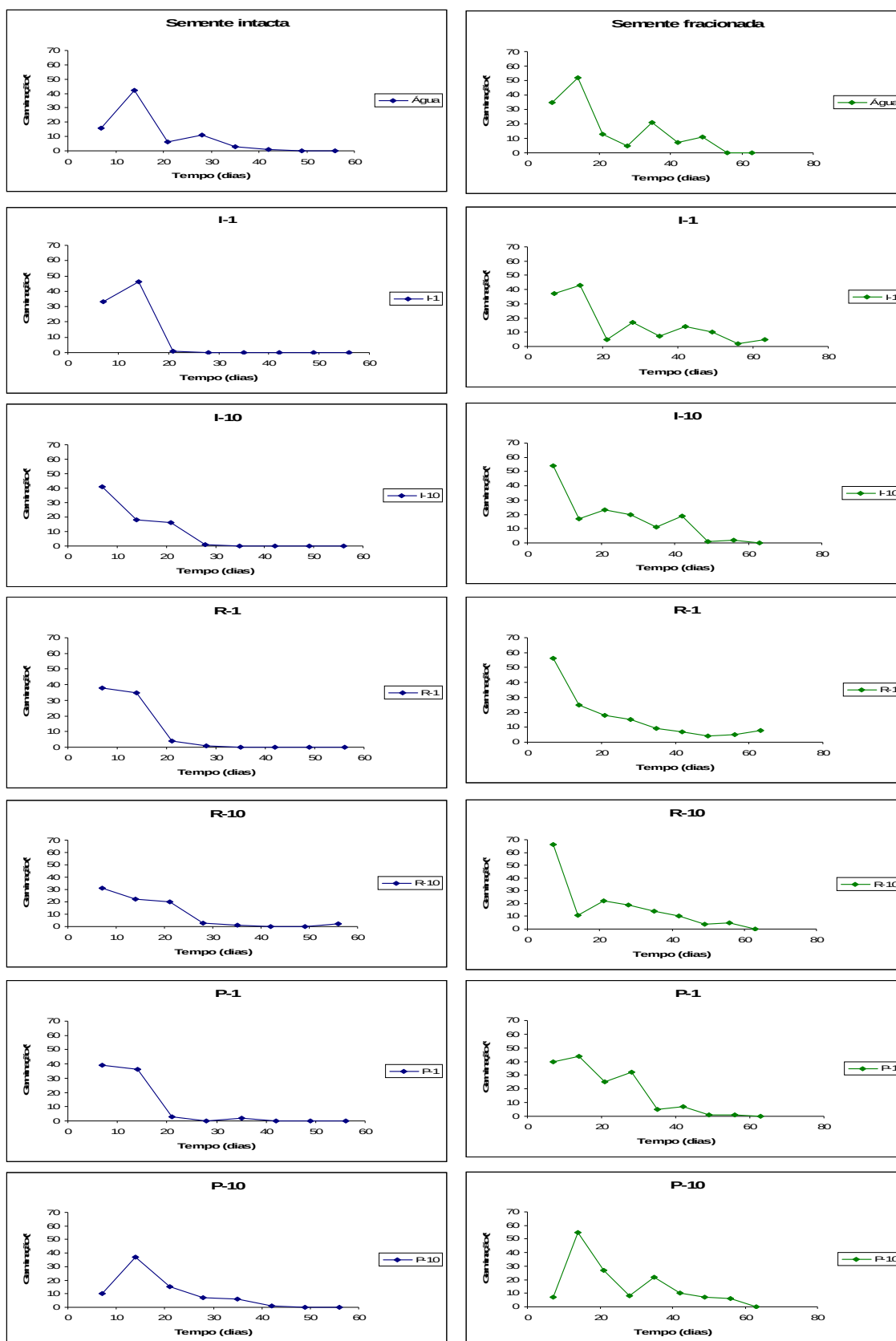


Figura 18 – Germinação (G%) de sementes de *Eugenia uniflora* em relação ao tempo (dias) em água ou soluções etanólicas: semente não germinada a 0,001% (I -1), semente não germinada a 0,01% (I - 10), semente com raiz primária retirada a 0,001% (R - 1), semente com raiz primária retirada a 0,01% (R - 10), semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,001% (P - 1) e semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,01% (P - 10), respectivamente.

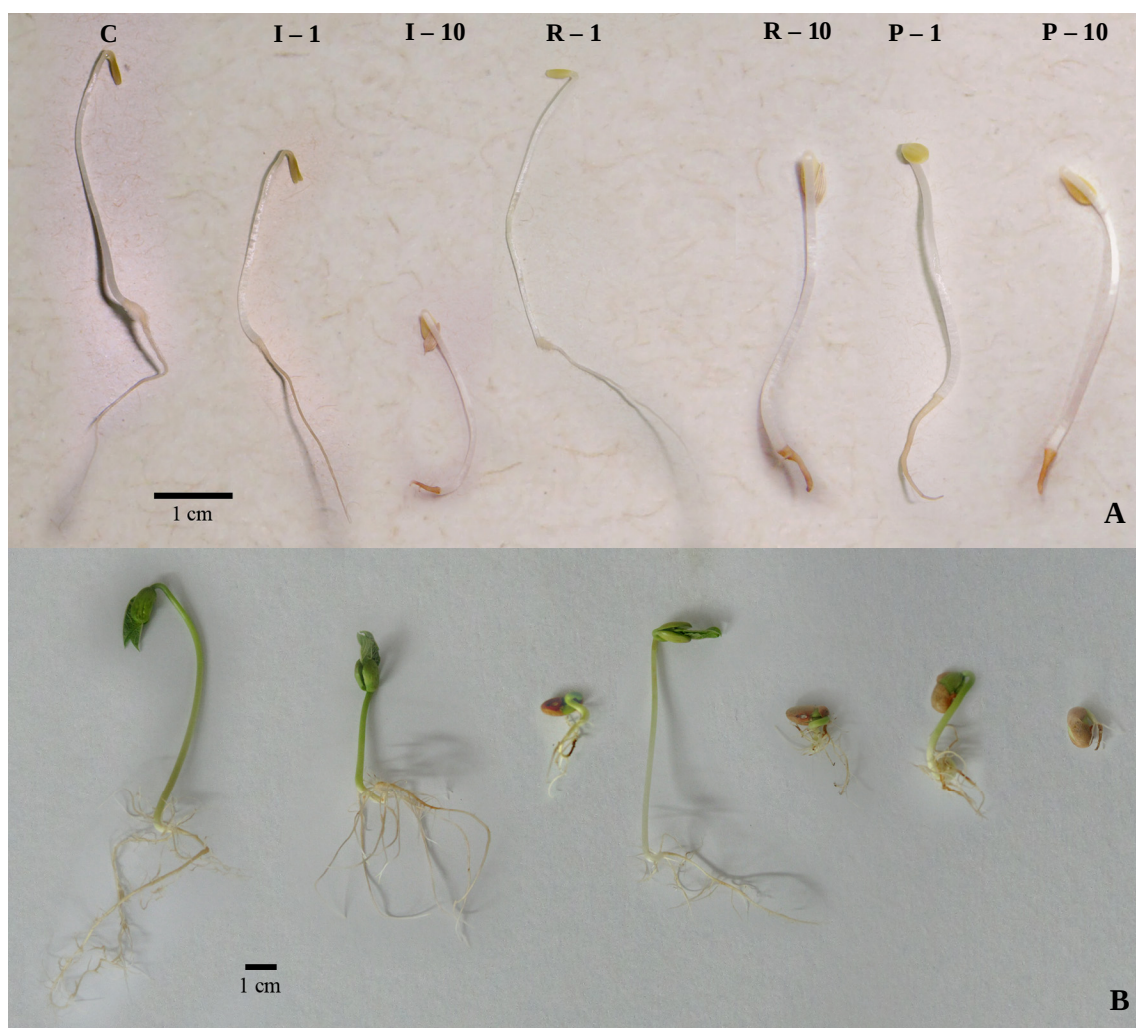


Figura 19 – Plântulas de alfaca (A) após sete dias de germinação e sementes de feijão (B) após sete dias de germinação nas seguintes soluções etanólicas de *Eugenia uniflora*: controle (C), semente não germinada a 0,001% (I -1), semente não germinada a 0,01% (I - 10), semente com raiz primária retirada a 0,001% (R - 1), semente com raiz primária retirada a 0,01% (R - 10), semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,001% (P - 1) e semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,01% (P - 10), respectivamente.

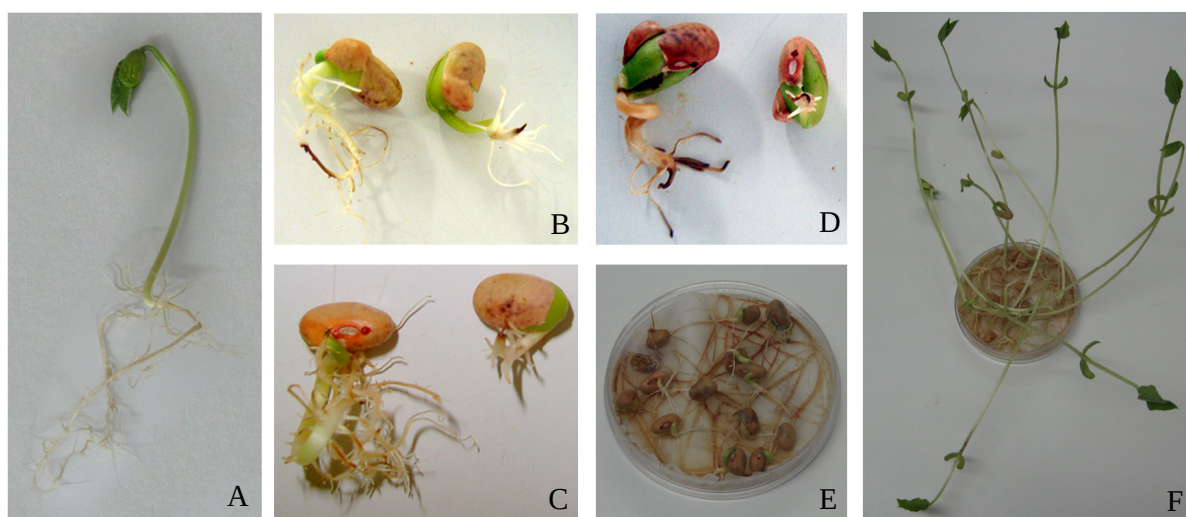


Figura 20 - Sementes de feijão germinadas nos seguintes extratos de sementes de *Eugenia uniflora*: água (A), semente não germinada a 0,01% (I-10) (B), semente com raiz primária retirada a 0,01% (R-10) (C), semente com parte aérea e raiz primária retiradas a 0,01% (P-10) (D), PEG -0,2 MPa (E) e NaCl -0,2 MPa (F).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, os extratos de sementes de *Eugenia uniflora* não demonstraram efeito autoinibidor da germinação, diferentemente do reportado por Rizzini (1970) para sementes de *Eugenia dysenterica*. Segundo este autor, extratos a 7% de sementes germinantes da própria espécie têm efeito inibidor de germinação. Tal fato pode ser decorrente de diferenças na concentração dos extratos, nos métodos de extração ou de diferenças nas sementes das diferentes espécies do gênero.

Apesar de não inibir a germinação da própria espécie, para aquênios de alface e sementes de feijão, espécies reconhecidamente sensíveis a compostos inibidores (Ferreira 2004), os extratos de sementes de pitanga apresentaram diferenças significativas, evidenciando a presença destes compostos. Giotto *et al.* (2007) e Sausen *et al.* (2009) já reportaram o potencial inibidor do extrato aquoso de folhas de *Eugenia dysenterica* e *E. involucrata*, respectivamente, em aquênios de alface, na qual ocorreram plântulas com necroses, escurecimento de radículas e menor quantidade de pelos absorventes, conforme a concentração do extrato aumentava, mesmo fato observado para o extrato etanólico de sementes *Eugenia uniflora* apresentado neste trabalho. As sementes germinadas de alface apresentaram também um encurtamento das raízes, fato que foi relatado em outros estudos nesta família (Rodrigues 2002). Segundo Ferreira (2004) várias substâncias podem induzir o

aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns.

A inibição da germinação pode se dever ao fato da presença de grande quantidade de óleo essencial em sementes em de *Eugenia uniflora*, que pode representar um maior potencial como agente inibidor da germinação de sementes de alface, como o já observado para extrato de folhas *Myrcia guianensis* em plantas daninhas (Souza-Filho *et al.* 2006).

A não interferência na germinação de alface por soluções de PEG com valores próximos a -0,20 MPa, mas o efeito significativo na redução da formação de plântulas normais e IVG a partir de -0,15 MPa, podem demonstrar que este soluto afeta diretamente os processos de desenvolvimento dessa espécie e provavelmente das outras espécies estudadas neste trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos por Bertagnolli *et al.* (2003), que concluiu que em soluções de PEG com potenciais hídricos menores ou iguais a -0,3 MPa e em temperaturas iguais ou superiores a 25°C, ocorre uma redução no IVG e na porcentagem de germinação de sementes de alface da cultivar Karla.

As soluções de NaCl não interferiram na formação de plântulas normais até -0,20 MPa e a alteração no índice de velocidade de germinação ocorreu abaixo de -0,15 MPa. Houve, portanto, comportamentos diferentes entre os solutos analisados, as soluções de PEG apresentaram diferença maior na formação de plântulas normais do que em soluções de NaCl. Esta diferença significativa de comportamento apresentada pelos diferentes solutos pode estar relacionada com o fato de que soluções de PEG apresentam alta viscosidade, comprometendo a absorção de oxigênio pelas sementes (Yoon *et al.* 1997).

Não houve diferenças significativas na germinação das sementes de feijão nos diferentes extratos, porém para formação de plântulas normais os tratamentos com valores mais altos foram o controle e o R-1, tendo o restante apresentado valores nulos ou quase nulos, com formação de plântulas anormais. Esta diferença entre a germinação e a formação de plântulas normais pode ter ocorrido em função de que, em geral, a germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento da plântula (Ferreira 2004).

Os resultados obtidos para a influência do potencial hídrico sobre a germinação de feijão corroboram com Moraes *et al.* (2005), que mostraram que o decréscimo nos potenciais osmóticos a partir de -0,20 MPa, induzidos por NaCl e PEG 6000, reduz a germinação das sementes de feijão. Porém neste trabalho para concentrações de NaCl de até -0,20 MPa não houve redução da germinação dessa espécie.

Foi observado também que diferentemente das soluções de NaCl, as soluções de PEG a partir de -0,10 MPa afetaram a formação de plântulas normais. Isto pode ter ocorrido, pois segundo Emmerich & Hardegree (1990) é possível que a anormalidade das plântulas seja

influenciada pela alta viscosidade do PEG e pela baixa taxa de entrada de oxigênio, agravando-se com o aumento da concentração do produto.

A água utilizada como controle nem sempre esteve a 0 MPa, sendo elaborado outro ensaio de germinação com alface em água de diferentes locais uma a 0 MPa e outra a $-0,15 \pm 0,02$ MPa. Nos dois ensaios não ocorreram diferenças significativas na germinação da alface, demonstrando que outros fatores devem estar envolvidos na inibição da germinação além do potencial hídrico.

Os diferentes resultados entre os solutos analisados para as duas espécies podem indicar que o efeito observado não se deveu à inibição pelo potencial hídrico, mais sim aos compostos presentes nos extratos de *Eugenia uniflora* e que o PEG produz maiores efeitos na qualidade fisiológica das sementes do que o NaCl.

Os resultados obtidos sugerem a presença de substâncias químicas inibidoras nos extratos, revelando potencial inibidor para *Eugenia uniflora* ao desenvolvimento de um novo eixo hipocótilo-radícula ou de uma nova plântula, como o já sugerido por Teixeira (2009) em sementes de *Eugenia cerasiflora*, *E. pyriformis*, *E. involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*. Estudos futuros, contudo, devem incluir soluções e concentrações diferentes das realizadas neste experimento para que se consiga um melhor resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anjos, A.M. & Ferraz, I.D.K.** 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Acta Amazonica 29(3): 337-348.
- Barroso, G.M., Peixoto, A.L., Costa, C.G., Ichaso, C.L. & Lima, H.C.** 1984. Sistemática das angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, 114-377.
- Bertagnolli, C.M., Menezes, N.L., Storck, L., Santos, O.S. e Pasqualli, L.L.** 2003. Desempenho de sementes nuas e peletizadas de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a estresses hídrico e térmico. Revista Brasileira de Sementes, 25(1): 7-13.
- Borges, E.E.L. & Rena, A.B.** 1993. Germinação de sementes. In: Aguiar, I.B., Piña-Rodrigues, F.C.M. (Coord.) Sementes florestais tropicais. Brasília. Abrates, 83-135.
- Brasil.** 2009. Regras para análise de sementes /Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399p.
- Coneglian, I.R.M.** 2007. Morfologia e ontogênese do pericarpo e semente de *Eugenia puniceifolia* (H.B. & K.) DC., *Myrcia bella* Camb. E *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg

(Myrtaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 107p.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 13-18.

Delgado, L.F. & Barbedo, C.J. 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 42(2): 265-272.

Donato, A. M & Morretes, B.L. 2007. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. Revista Brasileira de Farmacognosia. 17(3): 426-443.

Duke, S.O., Dayan, F.E., Rimando, A.M., Schrader, K.K., Aliotta, G., Oliva, A. & Romagni, J.G. 2002. Chemicals from Nature for Weed Management. Weed Science, 50(2): 138-151.

Emmerich, W.E. & Hardegree, S.P. 1990. Polyethylene glycol solution contact effects on seed germination. Agronomy Journal, 82: 1103-1107.

Ferreira, A. G. & Aquila, M. E. A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal (Edição especial), 12: 175-204.

Ferreira, A.G. 2004. Interferência: competição e alelopatia. In Germinação: do básico ao aplicado (Ferreira, A.G. & Borghetti, F. orgs.). Porto Alegre, Artmed, 251-262.

Ferreira, M. C., Souza J. R. P. & Faria T. J. 2007. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. Ciência. Agrotécnica, 31(4): 1054-1060.

Giotto, A.C., Oliveira, S.C.C. & Silva, J.G.P. 2007. Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). Nota científica. Revista Brasileira de Biociências, 5(2): 600-602.

Haugland, E. & Brandsaeter, L. 1996. Experiments on bioassay sensitivity in the study of allelopathy. Journal of Chemical Ecology, 22: 1845-1859.

Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães, R.M. & Strassburg, R.S. (2007). Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. Acta Botanica Brasilica, 21: 539-551.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. Crop Science, 2: 176-177.

Mazzafera, P. 2003. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. Revista Brasileira de Botânica, 26(2): 231-238.

Michel, B. E. & Kaufmann, M. R. 1973. The osmotic potencial of polyethylene glicol 6000. Plant Physiology, Rockville, 51: 914-916.

- Moraes, G.A.F., Menezes, N. L. & Pasqualli, L.L.** 2005. Comportamento de sementes de feijão sob diferentes potenciais osmóticos. *Ciência Rural*, 35(4): 776-780.
- Rizzini, C.T.** 1970. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 30: 381-402.
- Rodrigues, K.C.S.R.** 2002. Verificação da atividade alelopática de *Myrciaria cuspidata* Berg. (camboim). Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS.
- Salomão, A.N. & Allem, A.C.** 2001. Polyembryony in Angiospermous trees of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. *Acta Botanica Brasilica*, 15: 369-378.
- Sausen, T.L., Löwe, T.R., Figueiredo, L.S. & Buzatto, C.R.** 2009. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *E. involucrata* e *A. sellowiana*. *Polibotânica*. 27: 45-158.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M. & Barbedo, C.J.** 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess-Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 26(2): 213-221.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2005. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. *Revista brasileira de sementes*, 27(1): 86-92.
- Souza-Filho, A.P.S., Santos, R.A., Santos, L.S., Guilhon, G.M.P., Santos, A.S., Arruda, M.S.P, Muller, A.H. & Arruda, A.C.** 2006. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta daninha*, Viçosa-MG, 24(4): 649-656.
- Teixeira, C.C.** 2009. Regeneração de embriões em sementes fracionadas de espécies brasileiras de *Eugenia*: influencia do estágio de maturação, do armazenamento e fase de germinação. Dissertação. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita-Filho". Botucatu – SP. 63p.
- Yoon, B.Y.H., Lang, H.J. & Cobb, B.G.** 1997. Priming with salt solutions improves germination of pansy seed at high temperatures. 32 (2): 248-250.

DISCUSSÃO GERAL

A alta capacidade de regeneração das sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* descrita para *E. stipitata sororia* (Anjos e Ferraz, 1999), *E. pyriformis* (Silva *et al.*, 2003), *E. uniflora*, *E. brasiliensis* e *E. involucrata* (Silva *et al.* 2005) e os resultados obtidos no presente estudo, com mais três espécies brasileiras não domesticadas (*E. cerasiflora*, *E. umbelliflora* e *E. pruinosa*) sugerem que a capacidade regenerativa deve ser comum para muitas espécies deste gênero.

Na maturação de *Eugenia cerasiflora* pôde-se observar que não houve sincronismo entre o desenvolvimento do fruto e da semente, sendo que uma característica interessante apresentada por esta espécie foi que sementes intactas e fracionadas mesmo imaturas, com elevado teor de água e baixo conteúdo de matéria seca, já apresentam alguma capacidade germinativa, porém com baixa formação de plântulas normais. Dessa forma, nota-se que a capacidade germinativa é adquirida muito cedo em sementes de *Eugenia cerasiflora*, mas sem oferecer condições de continuar o desenvolvimento das plântulas, assim como o já observado para *Caesalpinia echinata* por Borges *et al.* (2005). Para sementes fracionadas das espécies estudadas no presente trabalho observou-se que os valores de FIG são sempre bem mais altos que os de FIP, ou seja, o potencial de regeneração da germinação não garante o desenvolvimento de plântulas. Segundo Teixeira (2009), isso pode se dever ao fato da semente fracionada perder reservas importantes, como os carboidratos, pois cerca de 60% da massa seca das sementes de *E. uniflora* é representado pelo amido, seu principal composto de reserva (Mello 2008).

De forma geral, as sementes maduras demonstraram maior capacidade regenerativa que as imaturas, evidenciando que o estágio de maturação pode afetar esta característica. Este comportamento durante a maturação pode indicar que as células totipotentes, que promovem a formação de embriões adventícios, já estão presentes mesmo em sementes imaturas.

Nos estudos anatômicos de *Eugenia cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora*, as sementes apresentaram embrião com eixo hipocótilo-radícula distinto e dois cotilédones parcialmente unidos que permitem a distinção da linha de soldadura, tanto na semente madura como em sementes verdes, assim como observado para *E. pyriformis* (Justo *et al.* 2007) e *E. puniceifolia* (Coneglian 2007). Portanto as sementes de *E. cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora* são monoembriônicas e o desenvolvimento dos novos embriões ocorreu posteriormente, em virtude do estímulo mecânico aplicado.

A produção de novas plantas ocorreu a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas perivasculares localizadas na região apical dos cotilédones. Tal fato mostra

que as novas plantas produzidas apresentam genoma diferente da planta-mãe, e idêntico ao do embrião resultante da fertilização, o que deve lhes conferir maior valor adaptativo. Este resultado é diferente do obtido para outras espécies de Myrtaceae que também apresentaram esta capacidade de regenerar novos embriões como *Syzygium jambos* (jambo), *S. cuminii* (jambolão), *Myrciaria trunciflora* (jabuticaba), *M. cauliflora* (sabará), espécies em que as novas plantas foram produzidas a partir de embriões adventícios nucelares (Gurgel & Soubihe 1951) e em *Garcinia indica*, *G. xanthochymus* e *G. cambogia* (Malik *et al.* 2005), por apresentarem agamospermia facultativa.

Resposta semelhante às obtidas para as espécies de *Eugenia* estudadas neste trabalho, de formação de novos indivíduos a partir de células parenquimáticas perivasculares, foi descrita por Alves *et al.* (2004) durante a formação de calos produzidos *in vitro* a partir de folhas de *Eucaliptus globulus*, nas quais se observou a diferenciação de gemas e primórdios foliares, seguindo o padrão típico de organogênese em regiões associadas aos feixes vasculares, apresentando a continuidade vascular com o tecido original.

Outro fato interessante é que germinação da segunda fração só ocorre se a semente for fracionada, produzindo um estímulo para a diferenciação de um novo embrião, não ocorrendo de maneira espontânea em sementes intactas, o que sugere que o próprio embrião produz substâncias, como fitorreguladores, que inibem o desenvolvimento destes novos indivíduos.

Para se observar a presença destes fitorreguladores foram feitos os extratos de sementes de *Eugenia uniflora*, pois Rizzini (1970) demonstrou, para sementes de *Eugenia dysenterica*, que estas possuem potencial inibidor da germinação de semente da própria espécie.

No presente trabalho, no entanto, os extratos de sementes de *Eugenia uniflora* não mostraram efeito autoinibidor da germinação, tal fato pode ser decorrente de diferenças na concentração dos extratos ou nos métodos de extração. Apesar disso, esses extratos inibiram a germinação e principalmente o desenvolvimento de plântulas normais de alface e de feijão, espécies reconhecidamente sensíveis a compostos inibidores (Ferreira 2004) e frequentemente utilizadas para bioensaios de reguladores de crescimento.

Os resultados obtidos sugerem a presença de substâncias químicas inibidoras nos extratos de *E. uniflora*, revelando potencial inibidor nesta espécie ao desenvolvimento de um novo eixo hipocótilo-radícula ou de uma nova plântula, como já sugerido por Teixeira (2009) em sementes de *Eugenia cerasiflora*, *E. pyriformis*, *E. involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*. Estudos futuros, contudo, devem incluir soluções e concentrações diferentes das realizadas neste experimento para que se consiga resultados mais expressivos.

Para ocorrer a conservação da biodiversidade não devemos apenas nos preocupar com a preservação e multiplicação, mas também a manutenção de sua ampla base genética. Desta maneira a produção dessas novas plantas em sementes de *Eugenia* pode caracterizar uma vantagem ecológica, pois o material genético será diferente da planta mãe.

Esta capacidade de regeneração pode ter sido resultado de uma pressão de seleção natural influenciada pela predação, pois ocorre em áreas de sementes predadas ou fracionadas, nas quais células parenquimáticas subepidérmicas se desdiferenciam e formam uma faixa meristemática, demonstrando uma regeneração rápida dos tecidos fracionados e uma forma de resistência ao ataque de micro e mesofauna.

Outra possibilidade é a de que esta característica também pode ser uma estratégia alternativa à tolerância à dessecação. A germinação repetida pode representar uma estratégia desenvolvida pela espécie para sobreviver em períodos desfavoráveis para a germinação e o desenvolvimento das plântulas. A maioria das plantas evoluiu para a produção de sementes tolerantes a dessecação, chamadas ortodoxas (Roberts 1973). Estas sementes podem permanecer no solo por longos períodos até que as condições favoráveis ocorram. Por outro lado, existem as chamadas sementes recalcitrantes, caso das espécies de *Eugenia*, que são intolerantes à dessecação (Delgado & Barbedo 2007), muitas vezes sem nenhum tipo de dormência e com curta longevidade (poucos meses), mostrando pronta germinação e rapidamente colonizando novas áreas (Barbedo & Bilia 1998). Essas características, juntamente com sua capacidade de regeneração, que foi demonstrada neste trabalho, podem estar associadas a uma estratégia da espécie para ampliar a viabilidade das sementes no solo, formando um banco de sementes com base na germinação repetida. Essa estratégia poderia ser vista, também, sob o ponto de vista ecológico, como forma alternativa à secagem, permitindo que a espécie se perpetue no meio ambiente não às custas do investimento energético em tolerância à dessecação, mas de sucessivas germinações a partir da mesma semente (Teixeira 2009).

O fracionamento de sementes de *Eugenia* apresenta vantagens para a produção de mudas, ampliando a produção de um lote de sementes. Esta tecnologia traz vantagens econômicas, já que algumas espécies têm baixa taxa de ocorrência em florestas e os frutos produzem pouca quantidade de sementes. Portanto, a possibilidade de multiplicação usando várias técnicas de regeneração traz uma perspectiva interessante para ampliar a produção de mudas.

RESUMO

Estudos de germinação após o fracionamento em sementes de diversas espécies de *Eugenia* demonstraram potencial regenerativo nas espécies desse gênero. A presença de poliembrionia em diversas espécies da família Myrtaceae e, ainda, de embrião aparentemente indiviso em *Eugenia* demonstram a necessidade de estudos relativos à origem dos embriões que surgem apenas após as sementes serem fracionadas. Através deste trabalho buscou-se investigar esta origem, analisando o potencial de germinação de sementes de três espécies brasileiras não domesticadas (*Eugenia cerasiflora*, *E. umbelliflora* e *E. pruinosa*), utilizando uma delas (*E. cerasiflora*) como modelo. Nesta analisaram-se as características dessa capacidade regenerativa durante a formação das sementes, bem como realizaram-se análises anatômicas a partir do fracionamento. Os resultados demonstraram que sementes de *E. cerasiflora*, *E. pruinosa* e *E. umbelliflora* submetidas a fracionamentos longitudinais ou transversais mantiveram elevada porcentagem de germinação e de produção de plântulas normais, independente da espécie e do tratamento submetido, sendo que sempre o corte longitudinal resultou em maior incremento da germinação e da produção de plântulas. As sementes de *E. cerasiflora* apresentaram capacidade germinativa e regenerativa durante todo o seu processo de maturação. As sementes de *E. cerasiflora*, *E. involucrata* e *E. uniflora* apresentam eixo hipocótilo-radícula distinto e dois cotilédones parcialmente unidos, na semente madura e especificamente para *E. cerasiflora*, também nas sementes imaturas. A produção de novas plantas, após o fracionamento, ocorreu a partir de células parenquimáticas perivasculares localizados na região apical dos cotilédones. Tal fato sugere que as novas plantas produzidas apresentam genoma idêntico ao do embrião, o que deve lhes conferir maior valor adaptativo. A indução de formação de novas plântulas somente ocorreu quando houve o fracionamento da semente, nunca ocorrendo de maneira espontânea em sementes intactas. Isto poderia estar associado à presença de inibidores de germinação na semente germinante. Para investigar a presença de possíveis inibidores, foram feitos extratos de sementes de *Eugenia uniflora* que não demonstraram claro efeito para a própria espécie. Contudo, para aquênios de alface e sementes de feijão, espécies reconhecidamente sensíveis a compostos inibidores, os resultados apresentaram diferenças significativas, revelando potencial inibidor para sementes dessa espécie.

ABSTRACT

Studies of germination of seeds after cutting in several species of *Eugenia* demonstrated regenerative potential of the species in the genus. The presence of polyembryony in several species of Myrtaceae, and also apparently undivided embryo in *Eugenia* suggest the need for studies on the origin of the embryos that emerge only after the seeds cutting. In this work we investigated the origin of the potential germination of three not domesticated brazilian species (*Eugenia cerasiflora*, *E. umbelliflora* and *E. pruinosa*), using *E. cerasiflora* as a model. In this species, the regenerative capacity during seed formation as well as anatomical characteristics were analyzed in cut seeds. The results showed that *E. cerasiflora*, *E. pruinosa* and *E. umbelliflora* subjected to longitudinal or transverse cutting maintained high germination percentage and produced normal seedlings, independent of species and treatment. Longitudinal cutting always resulted in greater increase of germination and seedling production. The seeds of *E. cerasiflora* showed germination and regeneration of new plants throughout their maturation process. The seeds of *E. cerasiflora*, *E. involucrata* and *E. uniflora* have distinct embryonic axis and two cotyledons partially fused in the mature seed and specifically in *E. cerasiflora* also in immature seeds. The production of new plantlets after cutting occurred from the perivascular parenchymal cells, located at the apical region of the cotyledons. It suggests that the new plantlets have produced identical genome as the embryo, which should provide them greater adaptive value. The production of new plantlets only occurred when there was a cutting of the seed and never occurred spontaneously in intact seeds. This could be associated with the presence of germination inhibitors in the germinating seed. To investigate the possible presence of inhibitors, ethanolic extracts were prepared from seeds of *E. uniflora*, but had no clear effects on the species itself. However, for seeds of lettuce and bean, which are known to be sensitive to inhibitors, the results showed significant differences, revealing the presence of potential inhibitor in seeds of this species.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS NA INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO GERAL

- Alves, E.C.S.C., Xavier, A. & Otoni, W.C.** 2004. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39(5): 421-430.
- Angiosperm Phylogeny Group.** 2010 Disponível em: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html>. Acesso em 10 de junho de 2010.
- Andrade, A.C.S., Cunha, R., Souza, A.F., Reis, R.B. & Almeida, K.L** 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. Seed Science & Technology. 31, 125-137.
- Andrade. R.N.B. & Ferreira, A.G.** 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes, 22 (2), 118-125.
- Anjos, A.M.G.** 1998. Morfologia e fisiologia da germinação de sementes de araçá-boi *Eugenia stipitata* ssp. *sororia* McVauger – Myrtaceae), uma frutífera nativa da Amazônia Ocidental. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) - Universidade do Amazonas, Manaus, 78p.
- Anjos, A.M.G. & Ferraz, I.D.K.** 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Acta Amazônica 29: 337-348.
- Arantes, A.A. & Monteiro, R.** 2002. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Lundiana 3 (2), 111-127.
- Asker, S.** 1979. Progress in apomixis research. Hereditas 91: 231-240.
- Barbedo, C.J. and Bilia, D.A.C.** 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. Scientia Agricola, 55: 121-125.
- Barbedo, C.J., Kohama, S., Maluf, A.M. & Bilia, D.A.C.** 1998. Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. Revista Brasileira de Sementes 20:184-188.
- Barbedo, C.J. & Marcos-Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. Acta Botanica Brasilica, São Paulo, 12 (2), 145-164.
- Batygina, T.B. & Vinogradova, G.Y.** 2007 Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. Russian Journal of Developmental Biology, 38 (3), 126–151.
- Borges, I.F., Giudice-Neto, J., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2005. Maturation of Seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an Endangered Leguminous Tree from the Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48(6): 851-861.

- Budke, J.C., Athayde, E.A., Giehl, E.L.H., Záchia, R.Q. & Eisinger, S.M.** 2005. Composição florística e estratégias de dispersão de espécies lenhosas em uma floresta ribeirinha, arroio Passo das Tropas, Santa Maria, RS, Brasil. *Iheringia* 60 (1), 17-24.
- Carpi, S.M.F., Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1996. Condicionamento osmótico de sementes de *Cedrela fissilis* Vell. *Revista Brasileira Sementes* 18:271-275.
- Carvalho, N. M. & Nakagawa, J.** 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2.ed. Fundação Cargill, Campinas.
- Coneglian, I.R.M.** 2007. Morfologia e ontogênese do pericarpo e semente de *Eugenia puniceifolia* (H.B. & K.) DC., *Myrcia bella* Camb. E *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg (Myrtaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 107p.
- Corrêa, M.P.** 1975. Dicionário da plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(2), 265-272.
- Donadio, L.C.** 1997. Study of some Brazilian Myrtaceae in Jaboticabal - SP. *Acta Horticulturae* 452:181-183.
- Donadio, L.C. & Moro, F.V.** 2004. Potential of brazilian *Eugenia* Myrtaceae - as ornamental and as a fruit crop. *Acta Horticulturae* 632:65-68.
- Ferreira, A.G.** 2004. Interferência: competição e alelopatia. In *Germinação: do básico ao aplicado* (Ferreira, A.G. & Borghetti, F. orgs.). Porto Alegre, Artmed, 251-262.
- Figliolia, M.B. & Kageyama, P.Y.** 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook et Arn em floresta ripária do rio Moji Guaçu, município de Moji Guaçu, SP. *Revista do Instituto Florestal, São Paulo*, 6 (único), 13-52.
- Fundação SOS Mata Atlântica/INPE.** 2002. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995-2000. São Paulo. Relatório final. 43p.
- Gentil, D.F.O. & Ferreira, S.A.N.** 1999. Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Manaus, *Acta Amazonica*, 29 (1), 21-31
- Gerlach, D.** 1969. Botanische mikrotechnik. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart, 298p.
- Gerrits, P. O.** 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Netherlands: Departament of Anatomy and Embryology, State University Groningen.
- Gurgel, J.T.A. & Soubiê Sobrinho, J.** 1951. Poliembryonia em mirtáceas frutíferas. *Bragantia* 11:141-163.

- ISTA.** 1985. International rules for seed testing. Seed Science and Technology. Zurich, 13: 356-513
- Johansen, D. A.** 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company Inc, New York, 523p.
- Johnson, L.A.S. & Briggs, B.G.** 1984. Myrtales and Myrtaceae phylogenetic analysis. Annals of the Missouri Botanical Garden. 71: 700-756.
- Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães, R.M. & Strassburg, R.S.** (2007). Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. Acta Botanica Brasilica, 21: 539-551.
- Kawasaki, M.L.** 1984. A família Myrtaceae na serra do cipó, Minas Gerais, Brasil. Dissertação (Mestrado).
- Kawasaki, M.L.** 2000. Flora fanerogâmica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). 88 - Myrtaceae. Hoehnea 27:165-186.
- Koltunow, A.M.** 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. The Plant Cell 5:1425-1437.
- Kuskoski, E. M.; Fett, R. & Badotti, F.** 1999. Extração e determinação da estabilidade dos pigmentos obtidos dos frutos de baguaçu. In: VIX Seminário de Iniciação Científica UFSC, 1999, Florianópolis, SC, 1 (1), 427
- Landrum, L.R. & Kawasaki, M.L.** 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. Brittonia 49:508-536.
- Legrand, C.D. & Klein, R.M.** 1969. Flora Ilustrada Catarinense. I Parte: As Plantas. Fascículo: Mirtáceas. Planejada e editada por P. Paulino Reitz. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 216p
- Lorenzi, H.** 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Plantarum.
- Malik, S.K., Chaudhury, R. and Abraham, Z.** 2005. Seed morphology and germination characteristics in three *Garcinia* species. Seed Science and Technology, 33: 595-604.
- Maluf, A.M., Bilia, D.A.C & Barbedo, C.J.** 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. Scientia Agricola, Piracicaba, 60(3), 471-475.
- Marcos Filho, J.** Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.
- Mcvaugh, R.** 1956. Tropical American Myrtaceae. Fieldiana Botany 29:143-228
- Mello, J.I.O.** 2008. Compostos de Reserva de Sementes e suas Relações com Diferentes Níveis de Sensibilidade à Dessecação e ao Congelamento. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. 117p.

- Pepato, M.T.; Folgado, V.B.B.; Ketelhut, I.C. & Brunetti, L.L.** 2001. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34, 389-395.
- Piña-Rodrigues, F.C.M. & Aguiar, I.B.** 1993. Maturação e Dispersão de Sementes. *In*: Sementes florestais tropicais (Aguiar, I.B., Piña-Rodrigues, F.C.M. & Figliolia, M.B., Coord.). Brasília: Abrates, 215-174.
- Pizo, M.A.** 2002. The seed-dispersers and fruit syndromes of Myrtaceae in the Brazilian Atlantic forest. *In* Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation (D.J. Levey, W.R. Silva & M. Galetti, eds.). CABI Publishing, Wallingford, p.129-143.
- Raven, P.H.; Evert, R.F. & Eichhorn, S.E.** 2001. *Biologia vegetal*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Rizzini, C.T.** 1970. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 30: 381-402.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seed. *Seed Science and Technology*, 1: 499-514.
- Rodrigues, R.R. & Nave, A.G.** 2000. Heterogeneidade florística das matas ciliares. Pp. 45-71. *In*: R.R. Rodrigues & H.F. Leitão Filho (eds.). *Matas ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo, Edusp/Fapesp.
- Sanchotene, M.C.C.** 1989. Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana. FEPLAN, Porto Alegre.
- Santana, D.G. & Ranal, M.A.** 2004. *Análise da germinação: um enfoque estatístico*. Brasília, Ed Universidade de Brasília, 248p.
- Scalon, S.P.Q., Scalon Filho H., Rigoni, M.R. & Veraldo, F.** 2001. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23(3), 652-655.
- Schmid, R.** 1972. A resolution of the *Eugenia-Syzygium* controversy (Myrtaceae). *American Journal of Botany* 59:423-436.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Barbedo, C.J.** 2005. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. *Revista Brasileira de Sementes* 27:86-92.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M., Barbedo, C.J.** 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26:213-221.
- Silva, R.S.M., Chaves, L.J. & Naves, R.V.** 2001. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do Estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23:330-334.

Teixeira, C.C. 2009. Regeneração de embriões em sementes fracionadas de espécies brasileiras de *Eugenia*: influencia do estágio de maturação, do armazenamento e fase de germinação. Dissertação. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita-Filho". Botucatu – SP. 63p.