

ALINE FORGATTI HELL

**Alterações metabólicas em função de
variáveis ambientais e sua contribuição para a
tolerância à perda de água em sementes de
Eugenia pyriformis Cambess.**

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

SÃO PAULO

2014

ALINE FORGATTI HELL

**Alterações metabólicas em função de
variáveis ambientais e sua contribuição para a
tolerância à perda de água em sementes de
Eugenia pyriformis Cambess.**

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

ORIENTADOR: DR. DANILO DA CRUZ CENTENO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Hell, Aline Forgatti

H476a Alterações metabólicas em função de variáveis ambientais e sua contribuição para a tolerância à perda de água em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess / Aline Forgatti Hell -- São Paulo, 2014.

97 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014

Bibliografia.

1. Sementes. 2. Secagem. 3. Perfil metabólico. I. Título

CDU: 631.53.02

Dedico

À minha família Sonia, Wagner, Andressa e Alessandra.

*“So close no matter how far
Couldn't be much more from the heart
Forever trusting who we are...
Open mind for a different view
And nothing else matters”
Metallica*

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica de São Paulo que possibilitou a realização deste trabalho;

À Pós-Graduação do Instituto de Botânica e aos seus funcionários, Márcia e Shirlei;

Ao meu orientador Dr. Danilo da Cruz Centeno, pela oportunidade concedida ao me aceitar como aluna de iniciação científica e mestrado, por todas as conversas, incentivo e confiança;

Ao Dr. Claudio José Barbedo, pelo auxílio na elaboração do projeto inicial, pela prontidão e gentileza com que sempre me recebeu;

Ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, seus pesquisadores, alunos e funcionários, em especial a Mary Monteiro e Pedro Wasinger pelo apoio técnico;

Aos pesquisadores Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro, Dra. Márcia Regina Braga, Dra. Maria Angela Machado, Dra. Marília Gaspar e Dr. Marco Aurélio Tiné, com quem pude aprender ao longo dos anos no Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Fisiologia, seja em disciplinas, conversas de corredor ou ainda pelas dúvidas sanadas;

Ao Núcleo de Pesquisa em Sementes, seus pesquisadores, alunos e funcionários, em especial a Dra. Marina Crestana Guardia, que permitiu o uso das instalações do Núcleo;

Ao Dr. Edmir Vicente Lamarca, pelas sugestões durante a elaboração do projeto e pelo auxílio nos experimentos “pilotos”;

Ao Dr. João Paulo Naldi Silva, por todo o auxílio, conversas sobre metodologias, leituras e artigos sugeridos;

Ao Dr. Gustavo Maia Souza, por nos receber em seu laboratório e compartilhar o seu conhecimento sobre as análises de rede;

Ao Pólo Regional Vale do Ribeira – Pariquera-açu/SP, à Casa da Agricultura em Jumarim/SP, à USP de Ribeirão Preto/SP, ao Instituto de Botânica de São Paulo/SP, ao Instituto Agrônomo de Campinas/SP e à Universidade Federal de Lavras/MG, e aos pesquisadores Dra. Simone de Pádua Teixeira e Dr. José Marcio Rocha Faria pela permissão e apoio nas coletas;

À Fia, Edimárcio, João Batista e Toinho, que gentilmente ajudaram na marcação de flores e coleta de frutos;

Ao Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, ao Instituto Agrônomo de Campinas e à Universidade Federal de Lavras, pelo fornecimento dos dados meteorológicos;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado;

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para o meu crescimento profissional e para a realização desse trabalho

SUMÁRIO

Introdução geral.....	1
Referências bibliográficas	2
Revisão de literatura	3
Referências bibliográficas	11
Justificativa.....	17
Objetivo e Hipóteses.....	18
Capítulo I - Sementes de <i>Eugenia pyriformis</i> Cambess. oriundas de diferentes regiões tem seu metabolismo influenciado por fatores ambientais	
Resumo	20
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados e Discussão.....	29
Conclusão	39
Referências Bibliográficas.....	42
Capítulo II - Metabolismo de sementes de <i>E. pyriformis</i> Cambess. desenvolvidas sob diferentes condições ambientais em resposta à perda de água	
Resumo	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	51
Resultados e Discussão.....	57
Conclusão	70
Referências Bibliográficas.....	81
Considerações finais	86
Referências Bibliográficas.....	86
Resumo geral	87
Summary.....	88
Anexo	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Introdução geral

Figura 1. Aspectos gerais de <i>Eugenia pyriformis</i> Cambess. (árvore, flor, fruto e sementes)	10
--	----

Capítulo I - Sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. oriundas de diferentes regiões tem seu metabolismo influenciado por fatores ambientais

Figura 1. Extrato do balanço hídrico sequencial de regiões de coleta de sementes de <i>Eugenia pyriformis</i>	31
Figura 2. Dados meteorológicos das regiões e ano de coleta de frutos de <i>Eugenia pyriformis</i>	32
Figura 3. Distribuição de frequência da amplitude térmica das regiões de coleta durante o período de formação de sementes de <i>Eugenia pyriformis</i>	34
Figura 4. Conteúdo de carboidratos solúveis e amido em embriões de <i>Eugenia pyriformis</i> recém dispersas, de origens distintas.....	35
Figura 5. Conteúdo de glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose em embriões de <i>Eugenia pyriformis</i> recém dispersas, de origens distintas (HPAEC/PAD)	36
Figura 6. Perfil metabólico de embriões de <i>Eugenia pyriformis</i> recém dispersas, de origens distintas (GC/MS).....	38
Figura 7: Análise de componentes principais (PCA) contemplando as análises bioquímicas (conteúdo de açúcar solúvel total, amido e perfil metabólico) de embriões de <i>Eugenia pyriformis</i> recém dispersas, de origens distintas.....	40
Figura 8: Análise de componentes principais (PCA) contemplando análises físicas e fisiológicas de sementes de <i>Eugenia pyriformis</i> recém dispersas e os valores de graus-dia e chuva acumulada durante período compreendido entre o florescimento e dispersão dos frutos... ..	41

Capítulo II - Metabolismo de sementes de *E. pyriformis* Cambess. desenvolvidas sob diferentes condições ambientais em resposta à perda de água

Figura 1. Taxas respiratórias de sementes de <i>Eugenia pyriformis</i> de origens distintas, submetidas à secagem.	63
Figura 2. Teor de carboidratos solúveis e amido de sementes de <i>Eugenia pyriformis</i> de origens distintas, submetidas à secagem	65
Figura 3. Conteúdo de glucose, frutose, sacarose e rafinose em embriões de <i>Eugenia pyriformis</i> de origens distintas, submetidas à secagem	66
Figura 4. Perfil metabólico de embriões de <i>Eugenia pyriformis</i> , de origens distintas submetidos à secagem (GC/MS).	71
Figura 5. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de <i>Eugenia pyriformis</i> , de origens distintas, submetidos à secagem.....	77
Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de <i>Eugenia pyriformis</i> , de origens distintas, submetidos à secagem.....	78

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I - Sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. oriundas de diferentes regiões tem seu metabolismo influenciado por fatores ambientais

Tabela 1. Origem das sementes de *Eugenia pyriformis*. Período de maturação, classificação climática das regiões (Köppen) e dados meteorológicos, compreendidos entre o florescimento e dispersão das sementes e características físicas e fisiológicas iniciais.....33

Tabela 2. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia pyriformis* recém dispersas, de origens distintas.....37

Capítulo II - Metabolismo de sementes de *E. pyriformis* Cambess. desenvolvidas sob diferentes condições ambientais em resposta à perda de água

Tabela 1: Origem das sementes de *Eugenia pyriformis*. Período de maturação, classificação climática das regiões (Köppen) e dados meteorológicos, compreendidos entre o florescimento e dispersão das sementes.59

Tabela 2. Parâmetros fisiológicos de sementes de *Eugenia pyriformis* de origens distintas, submetidas à secagem (Teor de água, massa fresca, massa seca e potencial hídrico).....60

Tabela 3. Parâmetros fisiológicos de sementes de *Eugenia pyriformis* de origens distintas, submetidas à secagem (Germinação, Plântulas normais e Índice de Velocidade de Germinação)61

INTRODUÇÃO GERAL

Quando se iniciou o cultivo de plantas, modificações e adaptações, dentre elas melhoria na produção de sementes, aumento no vigor e na germinação foram realizadas em espécies de interesse agrícola (Machado, 2014). Neste contexto, provavelmente tornou-se necessário também buscar maneiras de armazenar sementes para fins alimentares e também econômicos, tornando-se importante o conhecimento do comportamento das sementes.

Mais recente é a preocupação com o conhecimento acerca da fisiologia de sementes de espécies florestais, para fins de conservação, uma vez que as florestas constituem um reservatório da diversidade genética que exercem papel vital na manutenção da estabilidade do meio ambiente. Dessa forma, nos últimos anos, tem-se dado considerável atenção à questão de manutenção e conservação destes recursos genéticos.

Segundo Hay & Probert (2012), desde que as Estratégias Globais para a Conservação de Plantas (GSPC em inglês Global Strategy for Plant Conservation) foram aprovadas em 2002, milhares de amostras de sementes foram colocados em armazenamento a longo prazo, no Millennium Seed Bank (MSB) e em outros bancos de sementes, mantidos por jardins botânicos e instituições similares. Um dos objetivos da GSPC é que pelo menos 75% das espécies de plantas ameaçadas, a nível mundial, sejam incluídos em coleções *ex situ* e pelo menos 20% estejam disponíveis para programas de recuperação e restauração.

No entanto, a conservação de sementes através de seu armazenamento ainda é um grande desafio. Além da qualidade inicial (Bonjovani & Barbedo, 2008) e do vigor do lote (Kermode, 1990; Probert e Hay, 2000), o armazenamento e o controle da longevidade das sementes dependem de três fatores: água, oxigênio e temperatura (Roberts & Ellis, 1989; Groot *et al.*, 2012). Fatores esses que podem influenciar o metabolismo de sementes, principalmente de comportamento recalcitrante, as quais possuem elevado nível de hidratação no momento da dispersão e ocorrem em locais de temperatura elevada (Caccere *et al.*, 2013).

Para espécies de comportamento recalcitrante a sensibilidade à dessecação é um fator restritivo sobre a conservação de germoplasma a longo prazo, devido à incapacidade das sementes de sobreviverem à baixas temperaturas e teores de água (Berjak & Pammenter, 2013). Dessa forma, as premissas, custos, riscos e desafios científicos associados à conservação *ex situ* de plantas dependem da espécie, dos métodos utilizados e do tempo de armazenamento desejado (Li & Pritchard, 2009).

São, portanto, de extrema importância estudos que visem compreender o comportamento metabólico de sementes, contemplando aspectos ecológicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berjak, B & Pammenter, N.W. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontier in Plant Science*. 4: 478.

Bonjovani, M.R. & Barbedo, C.J. 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D.Penn. toleram temperatura sub-zero. *Brazilian Journal of Botany* 32: 345-356.

Caccere, R., Teixeira, S.P., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Braga, M.R., 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology* 170: 791-800.

Groot, S. P. C., Surki, A. A., Vos de, R. C. H. & Kodde, J. 2012. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analyzing seed ageing under dry conditions. *Annals of Botany* 110: 1149–1159.

Hay, F.R. & Probert, R.J. 2013. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation Physiology* 1.

Kermode, A.R., 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9: 155-195.

Li, D.Z. & Pritchard, H.W. 2009, The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in Plant Science*. Special Issue: Plant science research in botanic gardens 14 (11): 614-621

Machado, A.T. 2014. Historical construction of plant breeding: from conventional to participatory. *Revista Brasileira de Agroecologia* 9(1): 35-50.

Probert, R.J., Hay, F.R. 2000. Keeping seeds alive, in: Black, M., Bewley, J.D. (Eds.), *Seed technology and its biological basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 375-410.

Roberts, E.H. & Ellis, R.H. 1989. Water and seed survival. *Annals of Botany* 63: 39-52.

REVISÃO DE LITERATURA

Tolerância à dessecação em sementes

A tolerância à dessecação é definida como a habilidade de tecidos ou órgãos vegetais de desidratar até o equilíbrio com o ar ambiente e sobreviver à perda de água do protoplasma e à re-hidratação (Vicré *et al.*, 2004).

A tolerância à dessecação de sementes é um comportamento fisiológico que pode ser considerado como resultado do processo de seleção natural. Sementes tolerantes à dessecação possivelmente passaram por condições adversas ao desenvolvimento de plântulas, sendo selecionadas apenas aquelas que germinaram quando as condições do meio foram favoráveis, dessa forma, as espécies que produzem sementes tolerantes à dessecação supostamente necessitaram de sistemas capazes de resistir a condições inadequadas à germinação de suas sementes logo após a dispersão. Espécies cujas sementes são dispersas com elevados teores de água e são intolerantes à dessecação, por sua vez, podem ter sido selecionadas em ambientes com distribuição regular da quantidade de água e temperaturas adequadas para a germinação das sementes e para o estabelecimento de plântulas durante o ano todo. Neste caso, a redução do teor de água ao final da maturação, como ocorre nas espécies tolerantes à dessecação, acrescentaria a dependência de mais um fator externo, ou seja, a disponibilidade de água do ambiente (Barbedo & Marcos Filho, 1998).

A distinção no comportamento de sementes tem sido observada desde o início do século passado, com registros, por exemplo, de estudos com *Hevea* (Kidd, 1914), *Inga* (Castro & Krug, 1951), *Acer* (Jones, 1920) e *Theobroma* (Zink & Rochele, 1964). Na década de 70, foi proposto por Roberts (1973) uma classificação de sementes, incluindo-se também a capacidade e previsibilidade de seu armazenamento. Dessa maneira, foram chamadas de ortodoxas aquelas que apresentavam comportamento previsível, sendo todas as demais classificadas como recalcitrantes.

Dessa forma, foram denominadas sementes ortodoxas aquelas que sofrem o processo de secagem durante a maturação e são liberadas da planta mãe com baixo teor de água e resistem à secagem artificial até umidade abaixo de 10%, característica que permite armazená-las em temperaturas negativas, mantendo a viabilidade por períodos prolongados. Em outro extremo foram designadas recalcitrantes as que são dispersas ainda úmidas, não toleram secagem até cerca de 20% e, conseqüentemente, não suportam o armazenamento por longos períodos (Roberts, 1973). Nas décadas seguintes, notou-se a necessidade de criar um

terceiro grupo de sementes, denominadas de sementes intermediárias, que são dispersas com elevado teor de água, mas que suportam a desidratação até níveis próximos a 10-13% de umidade e possuem maior possibilidade de armazenamento, mas não toleram temperaturas baixas por longos períodos (Hong & Ellis, 1996).

Atualmente considera-se que haja um gradiente de tolerância à dessecação, formado pelo máximo de ortodoxia em um extremo e o máximo de recalcitrância em outro (Berjak & Pammenter, 2000). Além disso, este conceito de gradiente e/ou *continuum* engloba a grande variabilidade que ocorre não apenas entre, mas também dentro da mesma espécie, que pode ser diferente de acordo com o local de origem das sementes (Daws *et al.*, 2004; 2006).

Durante o desenvolvimento, sementes ortodoxas devem passar por três fases: embriogênese, fase de síntese e acúmulo de compostos de reserva e, por último, a fase de desidratação, após o término do acúmulo de massa seca. A transição da segunda para a terceira fase normalmente coincide com a aquisição da tolerância à dessecação (Berjak & Pammenter, 2000; Daws *et al.*, 2004). Nas sementes recalcitrantes, evidências fisiológicas sugerem que a dispersão da semente ocorra antes que as mesmas completem a segunda fase. Desta forma, o peso seco da semente aumenta até o momento da abscisão do fruto (Berjak & Pammenter, 2000; Daws *et al.*, 2004). Logo, o nível de tolerância à dessecação aumenta nas sementes recalcitrantes durante a maturação, embora não atinja o mesmo patamar encontrado nas sementes ortodoxas (Berjak & Pammenter, 2000; Daws *et al.*, 2004).

De acordo com uma abordagem mais recente o teor de água das sementes assume um papel decisivo na maturação até atingir valores próximos de 50%. Após este ponto, diferentes resultados podem ser observados, dependendo de quanto foi estendido o período de maturação, em conjunto com as condições ambientais e as características genéticas de cada espécie acumuladas durante o processo evolutivo. Dessa forma, as sementes classificadas como recalcitrantes seriam, na verdade, sementes ortodoxas que não completaram o período de maturação (Barbedo *et al.*, 2013).

Influência de fatores ambientais no desenvolvimento de sementes

Na maioria das espécies a germinação pode variar entre e dentro das populações e matrizes. Algumas dessas variações podem ser de origem genética, no entanto, parte também pode ser atribuída ao fenótipo, ou seja, causada pelas condições locais em que as sementes amadureceram. Estas condições consistem de uma combinação do microambiente experimentado pelas sementes devido à sua posição sobre a planta parental e pelo ambiente

abiótico, por exemplo, a temperatura ambiente, comprimento do dia, a disponibilidade de água, entre outros (Guterman, 2000).

Para sementes de *Euterpe edulis* foi observado o comportamento diverso no armazenamento entre os lotes de sementes estudados em função da secagem prévia, o que pode ser atribuído à sensibilidade diferenciada na tolerância à perda de água de acordo com o habitat de origem, a diversidade genética e mesmo à época de colheita. Foi verificado também que o período de déficit hídrico e a colheita na época mais fria foram desfavoráveis para a espécie (Martins *et al.*, 2009). Além disso, a temperatura e pluviometria elevadas prejudicam a formação dos frutos de *Apuleia leiocarpa* e as sementes provenientes de indivíduos de uma mesma população possuem variações expressivas quanto às características físicas e fisiológicas, que podem ser atribuídas à variações no ambiente, à fatores genéticos ou ao micro-habitat (Fellipi *et al.*, 2012).

Dussert e colaboradores (2000), ao estudarem as relações entre a sensibilidade à dessecação, o teor de água na maturidade e as características climáticas em que nove espécies de *Coffea* L. foram desenvolvidas, observaram através de simulações, uma correlação altamente significativa entre a duração do desenvolvimento da semente e a duração da estação chuvosa. Por outro lado, o teor de água das sementes na maturidade não se correlacionou com o nível de tolerância à dessecação dessas sementes.

Considerando que as condições ambientais podem afetar o período de desenvolvimento antes da dispersão das sementes, é plausível supor que sementes de uma espécie de determinada localidade podem ser dispersas mais ou menos desenvolvidas e, conseqüentemente, mais ou menos sensíveis (ou tolerantes) à dessecação. Daws *et al.* (2004) constataram que sementes de *Aesculus hippocastanum* coletadas no norte da Europa foram dispersas menos desenvolvidas do que sementes coletadas mais ao sul, como consequência de temperaturas mais baixas durante o período de desenvolvimento das mesmas. Estudos realizados com esta mesma espécie mostraram que a temperatura do ar pode afetar a dormência das sementes, sendo os níveis de dormência inversamente relacionados aos graus-dia acumulados durante o desenvolvimento (Pritchard *et al.*, 1999). Graus-dia (°C dia) é a unidade de expressão da soma térmica que representa uma maneira de avaliar o desenvolvimento vegetal (Pedro-Junior, 1977). Em outras espécies o tamanho das sementes e dos frutos está positivamente relacionado ao aumento de temperatura durante o desenvolvimento (Tompsett & Pritchard, 1993; Stanley *et al.*, 2000).

Considerando que o grau de maturidade da semente dispersa depende da condição ambiental, espécies com sementes consideradas tolerantes a dessecação, podem apresentar variações no grau de tolerância, ou até mesmo apresentar-se intolerantes, de acordo com o local em que se desenvolvem. Hong e Ellis (1995) verificaram que sementes de *Coffea arabica*, nativa de planaltos secos da Etiópia, apresentam comportamento intermediário, enquanto *Coffea liberica*, originária de regiões úmidas da África, tem comportamento recalcitrante. Outro exemplo são sementes de *Camellia sinensis* oriundas da África do Sul que têm sido classificadas como recalcitrantes (Berjak *et al.*, 1993) enquanto que lotes provenientes do Japão e China foram classificados como tolerantes à dessecação (Amma & Watanabe, 1985; Hu *et al.*, 1993). Portanto, lotes de sementes recalcitrantes coletados em diferentes localidades podem responder de maneira diferente à desidratação.

Outra interessante hipótese envolvendo os graus-dia sugere que a temperatura durante a embriogênese e a maturação das sementes regula uma "memória epigenética" na progênie, envolvendo expressão diferencial de genes que podem regular a fenologia, a aclimação ao frio e a embriogênese em *Picea abies* (Johnsen *et al.*, 2005).

Mecanismos de tolerância à dessecação

Diversos processos e mecanismos de proteção vêm sendo identificados, e juntos promovem a tolerância à dessecação das sementes, embora a maneira como operam, bem como sua interação, ainda não sejam completamente compreendidos (Berjak *et al.*, 2007).

A aquisição da tolerância à dessecação em sementes envolve diversos mecanismos, dentre eles estão: características físicas intracelulares, desdiferenciação celular, presença de sistema antioxidante enzimático e não enzimático, acúmulo de moléculas protetoras, como proteínas dos tipos LEA ("late embryogenesis abundant proteins") e HSP ("heat-shock proteins"), presença de moléculas anfipáticas e oleosinas, desligamento do metabolismo e presença de determinados açúcares (Pammenter & Berjak, 1999).

De acordo com Obendorf (1997) os carboidratos encontrados nas sementes exercem papel fisiológico fundamental durante o armazenamento e a germinação, estando envolvidos na tolerância à dessecação em espécies ortodoxas e podem ser encontrados na forma solúvel, como os açúcares em geral, ou insolúvel, como o amido, ou ainda na forma daqueles depositados nas paredes celulares espessadas de cotilédones e endospermas (galactomananos e xiloglucanos, entre outros) (Buckeridge *et al.*, 2004). Em sementes de ervilha (Rogerson & Matthews, 1977) e de feijão (Farrant *et al.*, 1997) uma diminuição dos níveis de açúcares

seguida de decréscimo nas taxas respiratórias foi observada durante a maturação das sementes. Mais recentemente, foi observada queda nos níveis de açúcares e nas taxas respiratórias em *Arabidopsis*, indicada pela diminuição dos intermediários do ciclo de Krebs (Fait *et al.*, 2006). Em sementes de pau-brasil, os níveis de açúcares, como glucose e frutose, também diminuíram durante o desenvolvimento das sementes (Borges *et al.*, 2006), além disso, alterações nos níveis de sacarose também contribuem para maior tolerância à dessecação (Hinch et al., 2006).

Açúcares tem papel fundamental na dessecação, uma vez que sua composição molecular permite a interpolação entre os grupos polares dos fosfolipídios de membrana quando ocorre a perda de água. Esta substituição garante a integridade estrutural das membranas (Steadman *et al.*, 1996; Castro & Hilhorst, 2004).

O papel da sacarose no estado seco em tecidos de sementes já foi bastante discutido (Berjak *et al.*, 2007). Esse dissacarídeo teria um papel dinâmico de impedir a aproximação das proteínas de membranas umas às outras, substituindo fisicamente a água quando esta é removida na secagem e, dessa forma, prevenindo sua proximidade lateral (Hoekstra *et al.*, 2001). Esta proximidade promoveria mudanças nos fosfolípideos e em alguns componentes da membrana que são acompanhadas pela exclusão de proteínas integrais (Bryant *et al.*, 2001; Koster & Bryant, 2005; Halperin & Koster, 2006).

Assim como a sacarose, a trealose é um dissacarídeo não redutor acumulado por organismos que suportam estresses ambientais como seca, calor ou temperaturas muito baixas (Wingler, 2002; Eastmond & Graham, 2003), uma vez que sua composição molecular permite a interpolação entre os grupos polares dos fosfolipídios de membrana quando ocorre a perda de água. Esta substituição garante a integridade estrutural das membranas (Castro *et al.*, 2004), agindo como um estabilizador de proteínas, protegendo a conformação da proteína durante a desidratação (Kaushik & Bhat, 2003). Esse dissacarídeo é encontrado em quantidades elevadas durante a dessecação de *Selaginella lepidophylla* (Adams *et al.*, 1990), e parece modular as respostas que conduzem à indução de mecanismos de defesa contra a seca no início da imposição déficit hídrico em *Barbacenia purpurea* (Suguiyama *et al.*, 2014), ambas plantas tolerantes à dessecação.

Em sementes, os oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) também atuam como a trealose e impedem que a sacarose se cristalize, permitindo a formação do estado vítreo da água, fundamental para a sobrevivência de sementes dessecadas, mantendo a integridade estrutural e funcional das macromoléculas (Steadman *et al.*, 1996). A formação do estado

vítreo da água é de grande importância na longevidade da célula no estado desidratado, e devido à alta viscosidade, reduz drasticamente a mobilidade molecular e, portanto, as taxas de reações químicas (Hoekstra, 2005). As hidroxilas dos açúcares podem ainda substituir a água em membranas, ligando-se ao grupo polar dos fosfolipídios, enzimas e proteínas, e a grupos funcionais de outras macromoléculas (Obendorf, 1997).

Embora vários trabalhos sugiram papel da sacarose na proteção dos tecidos durante o processo de dessecação, o aumento no seu conteúdo por si só não é suficiente para promover a tolerância à dessecação (Steadman *et al.*, 1996). Estudos recentes têm proposto que exista uma correlação e co-localização entre a razão sacarose:OSR e crescimento radicular. E ainda que, não a quantidade absoluta de OSR, mas sim uma conversão de sacarose em OSR durante o amadurecimento das sementes, está ligado ao vigor da semente e ao estabelecimento de plântulas em sementes de leguminosas (Vandecasteele *et al.*, 2011).

Além disso, o papel dos carboidratos também pode ser associado à ação benéfica de um sistema antioxidante bastante eficiente (Walters *et al.*, 2002). A desidratação artificial de sementes recalcitrantes, com foco no armazenamento, pode resultar em incremento na formação de radicais livres, principalmente espécies reativas de oxigênio, originadas pelo desbalanço no metabolismo respiratório, em especial na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Pukacka *et al.*, 2011). Em sementes de *Arabidopsis* foi demonstrado que não só açúcares, como a rafinose, mas também polióis, como galactinol, podem ainda contribuir para combater os efeitos deletérios de radicais livres (Nishizawa *et al.*, 2008). Além do galactinol, outros polióis, como *myo*-inositol, manitol e sorbitol também são capazes de diminuir os efeitos das espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Cumbes, 1989). De maneira geral, estes compostos poderiam também dispor de NADH necessário para a ação das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, tais como monodehidroascorbato redutase e glutatona redutase, e também estão correlacionados com o aumento dos níveis dos antioxidantes ácido ascórbico e glutatona durante o estresse oxidativo (Nishizawa *et al.*, 2008).

Além disso, os ciclitóis livres e galactosil ciclitóis também parecem contribuir na tolerância à dessecação de maneira semelhante aos OSR (Obendorf, 1997; Peterbauer & Richter, 2001), quando estes não estão evidenciados (Horbowicz *et al.*, 1998; Steadman *et al.*, 2000; Borges *et al.*, 2006). Em sementes, a presença destas moléculas resulta, portanto na proteção contra estresses abióticos durante a germinação (Ribeiro *et al.*, 2011), secagem e armazenamento das sementes (Mello *et al.*, 2011).

Além dos mecanismos citados anteriormente, sementes tolerantes à perda de água diminuem seu metabolismo durante a aquisição da tolerância à dessecação, de modo a ajustá-lo às condições de baixa disponibilidade hídrica (Pammenter & Berjak, 1999). Fait *et al.* (2006) observaram alterações no perfil metabólico e de transcritos durante o desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis*, indicando redução no metabolismo durante a fase de secagem. Em sementes de *Erythrina speciosa* (ortodoxas), espécie nativa da Mata Atlântica brasileira, a diminuição do metabolismo ocorre antes mesmo das maiores perdas no teor de água, e pode ser observada através da clara mudança no perfil metabólico (Hell *et al.*, *em preparo*).

Sementes de *Inga vera*, as quais possuem um dos maiores níveis de recalcitrância conhecidos, podem também apresentar alterações no perfil metabólico durante o seu desenvolvimento. No entanto, estas alterações não estão relacionadas ao desligamento do metabolismo e, portanto não são suficientes para a aquisição da tolerância à dessecação. Além disso, durante a maturação de sementes *I. vera* foi observado o aumento no número e tamanho de vacúolos, em cotilédones e eixos embrionários, indicando uma alta atividade metabólica (Caccere *et al.*, 2013).

Espécie estudada: *Eugenia pyriformis* Cambess.

A família Myrtaceae, a qual pertence a espécie *E. pyriformis*, é uma das mais marcantes dentro do bioma Mata Atlântica (Leitão Filho, 1987), e assume grande importância ecológica nas florestas ombrófilas da costa atlântica do Brasil, sendo encontrada com grande riqueza de espécies e abundância (Peixoto & Gentry, 1990). Contido nesta família, o gênero *Eugenia* compreende mais de uma centena de espécies, dentre elas algumas nativas do Brasil de grande importância econômica por apresentarem frutos de valor nutritivo (Silva *et al.*, 2003), como *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixama), *Eugenia involucrata* DC., (cereja-do-rio-grande), *Eugenia pyriformis* Camb. (uvaia) e *Eugenia uniflora* L. (pitanga). Tais espécies frutíferas também são atrativos para a fauna e apresentam potencial para recomposição ambiental (Maluf *et al.* 2003; Resolução SMA 32/2014). Espécies deste gênero apresentam, normalmente, baixos teores de lipídios (Luzia *et al.* 2010; Mello *et al.*, 2010) e possuem amido como principal reserva de carbono (Mello *et al.*, 2010).



Figura 1. Aspectos gerais de *Eugenia pyriformis* Cambess (uvaia). A – indivíduo adulto; B – flor; C – fruto maduro; D – sementes.

Eugenia pyriformis, popularmente conhecida como uvaieira é uma espécie arbórea nativa da região Sul e Sudeste do Brasil de florestas semidecíduas (Donadio *et al.*, 2002). Sua trajetória provavelmente se iniciou na região compreendida, hoje, entre o norte do Paraná e o Paraguai e de lá foi dispersa pelas diferentes regiões do Brasil (Lamarca *et al.*, 2012).

É uma árvore de seis a treze metros de altura, dotada de copa arredondada, tronco geralmente ereto, com 30 a 50 centímetros de diâmetro. Possui flores solitárias, de cor branca e floresce no mês de agosto a setembro, com início de maturação dos frutos em setembro, prolongando-se até dezembro (Lorenzi, 1998; Andrade & Ferreira, 2000).

O fruto maduro é uma baga de cor amarela, com mesocarpo carnoso, cujo nome uvaia significa “fruta azeda” (Montoya, 1639 *apud* Lamarca *et al.*, 2012). A dispersão de suas sementes, na maioria das vezes, ocorre por aves e mamíferos (Gressler *et al.*, 2006). O número de sementes por fruto é variável, geralmente não excedendo a quatro. No entanto, as sementes são menores quando mais numerosas (Justo *et al.*, 2007).

A semente de *Eugenia* é exalbuminosa e seu embrião ocupa toda cavidade delimitada pelo envoltório da semente (Romagnolo & Souza, 2006). O embrião é loboso, sem diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones (Barroso, 2002). O eixo embrionário não é visto a olho nu, no entanto em sementes de *Eugenia pyriformis* é possível identificar o pólo embrionário em uma das extremidades da cicatriz rafeal na superfície dos cotilédones, com auxílio de lupa (Justo *et al.*, 2007).

Em estudo realizado por Delgado & Barbedo (2007), com objetivo de verificar o grau de tolerância à dessecação de sementes de seis espécies de *Eugenia* (*E. brasiliensis*, *E. cerasiflora*, *E. involucrata*, *E. umbelliflora*, *E. uniflora* e *E. pyriformis*), as sementes de *E. pyriformis* apresentaram maior sensibilidade à dessecação, perdendo a viabilidade ao atingir teor de água de 15%. Além disso, Andrade & Ferreira (2000) observaram diminuição da capacidade germinativa destas sementes durante o armazenamento, apresentando assim, comportamento recalcitrante. Lamarca e colaboradores (2011) observaram ainda que em sementes desta espécie a variação na soma térmica durante o desenvolvimento altera o índice de velocidade de germinação, assim como o teor de água com que as sementes são dispersas, mostrando que fatores ambientais podem influenciar o comportamento de sementes de *E. pyriformis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P., Kendall, E. & Karthar, K.K.** 1990. Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology* 18: 107-110.
- Amma, S. & Watanabe, A.** 1985. Long-term storage of germplasm of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Japan Agricultural Research Quarterly* 19: 196–201.
- 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.
- Barbedo, C.J. & Marcos-Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12:145-164.
- Barbedo, J.C., Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? Review Paper. *Hoehnea* 40(4): 583-593
- Barroso, G.M.** 2002. Sistemática de angiospermas do Brasil. 2. ed. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.
- Berjak, P., Farrant, J.M. & Pammenter, N.W.** 2007. Seed desiccation tolerance mechanisms. In: Jenks M, ed., *Plant desiccation tolerance*. Ames, IO: Blackwell Publishing.
- Berjak, P. & Pammenter, N. W.** 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (Edição especial): 22-55.
- Berjak, P., Vertucci, C.W. & Pammenter, N.W.** 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Science Research* 3: 155–166.

Bryant, G., Koster, K.L. & Wolfe, J. 2001. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research* 11, 17-25

Borges, I.F., Barbedo, C.J., Richter, A.A. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2006. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 475-482.

Buckeridge, M.S., Aidar, M.P.M., Santos, F.P. & Tiné, M.A.S. 2004. Acúmulo de reservas. In: *Germinação: do básico ao aplicado*, Ferreira, A.G. & Borghetti, F., Artmed Editora S.A., Porto Alegre 31-50.

Caccere, R., Teixeira, S.P., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Braga, M.R., 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology* 170: 791-800.

Castro, R.D. & Hilhorst, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: *Germinação: do básico ao aplicado*, Ferreira, A.G. & Borghetti, F., Artmed Editora S.A., Porto Alegre 51-67.

Castro, Y.G.P. & Krug, H.P., 1951. Experiências sobre germinação e conservação de sementes de *Inga edulis*, espécie usada em sombreamento em cafeeiros. *Ciência e Cultura* 3: 263-264.

Daws, M.I., Cleland, H., Chmielarz, P., Gorian, F., Leprince, O. & Mullins, C.E., 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology* 33: 59-66.

Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C. A. & Pritchard, H. W. 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157–166.

Delgado, L.F. & Barbedo, C.J. 2007. Tolerância a dessecação de sementes de espécies de Eugenia. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42 (2): 265-272.

Donadio, L. C.; Môro, F. V.; Servidone, A. A. 2002. *Frutas brasileiras*. Jaboticabal: Ed. Novos Talentos 288p.

Dussert, S., Chabrillange, N., Engelmann, F., Anthony, F., Louarn, J. & Hamon, S. 2000. Relationship between seed desiccation sensitivity, seed water content at maturity and climatic characteristics of native environments of nine *Coffea* L. species. *Seed Science Research* 10: 293-300.

Eastmond, P.J. & Graham, I.A. 2003. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Current Opinion in Plant Biology* 6: 231-235.

Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A.R. & Galili, G. 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* 142: 839-854.

- Farrant, J.M., Pammenter, N.W., Berjak, P., & Walters, C.** 1997. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7:135-144.
- Felippi, M., Maffra, C. R. B., Cantarelli, E. B., Araújo, M. M., Longhi, S. J.** 2012. Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. *Ciência Florestal* 22(3): 477-491.
- Gressler, E., Pizo, M.A. & Morellato, P.C.** 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 509-30.
- Guterman, Y.** 2000. Maternal Effects on Seeds During Development. In: *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, 2nd edition (ed. M. Fenner).
- Halperin, S.J. & Koster, K.L.** 2006. Sugar effects on membrane damage during desiccation of pea embryo protoplasts. *Journal of Experimental Botany* 57: 2303-2311.
- Hincha, D.K., Popova, A.V., & Cacula, A.** 2006. Effects of sugars on the stability of lipid membranes during drying. In: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Leitmannova L., Elsevier, Amsterdam 189-217.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.
- Hong, T.D. & Ellis, R.H.** 1995. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. *Seed Science and Technology* 23: 165–181.
- Hong, T.D. & Ellis, R.H.** 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome, IPGRI. (Technical Bulletin, 1) 62.
- Horbowicz, M., Brenac, P. & Obendorf, R.L.** 1998. Fagopyritol B1, O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* 205: 1-11.
- Hu J., Guo C.G. & Shi S.X.** 1993. Partial drying and post-thaw preconditioning improve the survival and germination of cryopreserved seeds of tea (*Camellia sinensis*). *Plant Genetic Resources Newsletter* 93: 1–4.
- Johnsen, Ø., Fossdal, C. G., Nagy, N., Møllmann, J., Dæhlen, O. G. & Skråppa, T.** 2005. Climatic adaptation in *Picea abies* progenies is affected by the temperature during zygotic embryogenesis and seed maturation. *Plant, Cell and Environment* 28: 1090–1102
- Jones, A. H.** 1920. Physiological study of maple seeds. *Botanical Gazette* 69 (2): 127-152.
- 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 Brasílica* 21: 539-551.
- Kaushik, J.K. & Bhat, R.** 2003. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 26458-26465.

- Kidd, F.** 1914. The controlling influence of carbon dioxide in the maturation, dormancy and germination of seeds. *Proceedings of the Royal Society B* 87: 408-421.
- Koster, K.L. & Bryant, G.** 2005. Dehydration in model membranes and protoplasts: contrasting effects at low, intermediate and high hydrations. In: Chen THH, Uemura M, Fujikawa S eds. *Cold hardiness in plants: molecular genetics, cell biology and physiology*. Wallingford, UK: CAB International 219–234.
- Lamarca, E.V., Silva, C.V. & Barbedo, C.J.** 2011. Limites térmicos para a germinação em função da origem de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) nativas do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 25 (2):293-300.
- Lamarca, E.V., Lamarca, E.T., Navarro, E.A., Barbedo, C.J.** 2012. De Ybaaã a Uvaia, a trajetória histórica de uma de nossas mais importantes espécies arbóreas tropicais. *Língua e Literatura (USP)*30: 321-330.
- Leitão Filho, H.F.** 1987. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. *Revista Scientia Florestalis (Instituto de Pesquisas florestais)* 35: 41-46.
- Lorenzi, H.** 1998. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum. 352 p.
- Luzia, D.M.M., Bertanha, B.J., Jorge, N.** 2010. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 69 (2): 175-80.
- Maluf, A.M.; Bília, D.A.; Barbedo, C.J.** 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. *Scientia Agricola* 60 (3): 471-475.
- Martins, C.C., Bovi, M.L.A., Nakagawa, J., Machado, C.G.** 2009. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. *Revista Árvore* 33: 635-642.
- Mello, J.I.O., Barbedo, C.J., Salatino, A. & Figueiredo-Ribeiro, C.R.L.** 2010. Reserve carbohydrates and lipids from seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(4): 889-899.
- Mello, J.I.O., Centeno, D.C., Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. *Seed Science & Technology* 39: 465-480.
- Montoya, A.R.** 1639. *Tesoro de la lengua guarani*. Madrid, Iuan Sanchez.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. & Shigeoka, S.** 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147: 1251-1263.
- Obendorf, R.L.** 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.
- Pammenter, N.W. & Berjak, P.** 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.

Pedro Junior, M.J., Brunini, O., Alfonsi, R.R. & Angelocci, L.R. 1977. Estimativa de graus-dia em função de altitude e latitude para o estado de São Paulo. *Bragantia*, 36: 89-92.

Peixoto, A.L. & Gentry, A. 1990. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 13 (1) 19-25.

Peterbauer, T. & Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose Family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197.

Pritchard, H.W., Steadman, K.J., Nash, J.V. & Jones, C. 1999. Kinetics of dormancy release and the high temperature germination response in *Aesculus hippocastanum* seeds. *Journal of Experimental Botany* 50: 1507 – 1514.

Pukacka, S., Malec, M. & Ratajczak, E. 2011. ROS production and antioxidative system activity in embryonic axes of *Quercus robur* seeds under different desiccation rate conditions. *Acta Physiol Plant* 33: 2219–2227.

Resolução 32/2014. Resolução SMA Nº 32, de 03 de abril de 2014. Estabelece as orientações, diretrizes e critérios sobre restauração ecológica no Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente.

Ribeiro, E.S., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J., Amancio Oliveira, A.E.A. 2011. Free Cyclitol, Soluble Carbohydrate and Protein Contents in *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* Bean Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 4273–4278.

Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.

Rogerson, N.E. & Matthews, S. 1977. Respiratory and carbohydrate changes in developing pea (*Pisum sativum* L.) seeds in relation to their ability to withstand desiccation. *Journal of Experimental Botany* 28: 304-313.

Romagnolo, M.B. & Souza, M.C. 2006. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20:529-48.

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.

Smirnoff, N. & Cumbes, Q.J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible Solutes. *Phytochemistry* 28(4): 1057 -1060.

Stanley, C.J., Tustin, D.S., Lupton, G.B., McCartney, S., Cashmore, W.M., De Silva, H.N. 2000. Towards understanding the role of temperature in apple fruit growth responses in three geographical regions within New Zealand. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75: 413–422.

Steadman, K.J., Pritchard, H.W., Dey, P.M. 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany* 77: 667-674.

Suguiyama, V. F., Silva, E. A., Meirelles, S. T., Centeno, D. C. & Braga, M. R. 2014. Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering 5(96): 1-13.

Tompsett, P.B. & Pritchard, H.W. 1993. Water status changes during development in relation to the germination and desiccation tolerance of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. *Annals of Botany* 71: 107–116.

Vandecasteele, C., Teulat-Merah, B., Morère-Le Paven, M.C., Leprince, O., Ly Vu, B., Viau, L., Ledroit, L., Pelletier, S., Payet, N., Satour, P., Lebras, C., Gallardo, K., Huguet, T., Limami, A.M. Prosperi, J.M. & Buitink, J. 2011. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell and Environment* 34:1473–1487.

Vicré, M., Farrant, J. M. & Driouich, A. 2004. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant Cell and Environment* 27: 1329-1340.

Walters, C., Farrant, J.M., Pammenter, N.W., Berjak, P. 2002. Desiccation and Damage. In: Black M, Pritchard H.W. (eds.). *Desiccation and Survival in Plants. Drying Without Dying*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 263-291.

Wingler, A. 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry* 60: 437-440.

Zink, E. & Rochelle, L.A. 1964. Estudos sobre a conservação de sementes. XI - Cacao. *Bragantia* 23: 111-116.

JUSTIFICATIVA

Sementes recalcitrantes representam, um grande desafio àqueles que necessitam armazená-las com o propósito de conservação do germoplasma. Portanto entender os mecanismos envolvidos na sensibilidade de sementes à dessecação é essencial para aumentar futuramente sua longevidade. Devido ao fato de sementes de *Eugenia pyriformis* apresentarem comportamento tipicamente recalcitrante e ampla distribuição latitudinal o estudo destas sementes coletadas em diferentes localidades poderá contribuir para o entendimento do comportamento biológico de sementes e a relevância das alterações metabólicas na tolerância à dessecação.

Embora alguns estudos já tenham sido realizados com sementes desta espécie, são raros aqueles que comparam o comportamento bioquímico das sementes de *E. pyriformis* de origens distintas, portanto sob diferentes condições ambientais.

OBJETIVO

Avaliar a contribuição das alterações bioquímicas e fisiológicas para a tolerância a perda de água em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess e suas relações com variáveis ambientais.

HIPÓTESES

Sementes de *E. pyriformis* expostas ao maior acúmulo de graus-dia apresentam o metabolismo próximo ao de sementes ortodoxas;

Alterações no metabolismo podem influenciar na tolerância à dessecação das sementes de *E. pyriformis*.

CAPÍTULO I

Sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. oriundas de diferentes regiões tem seu metabolismo influenciado por fatores ambientais

RESUMO

Sementes podem apresentar comportamento ortodoxo (tolerantes à dessecação) ou recalcitrante (intolerantes à dessecação) existindo ainda um gradiente entre os dois extremos. No entanto assume-se também que a tolerância à dessecação possa ocorrer de maneira intraespecífica, em decorrência do local de origem. *Eugenia pyriformis* Cambess., espécie arbórea nativa do Brasil, apresenta sementes difíceis de serem armazenadas, devido à sensibilidade à dessecação e às baixas temperaturas. Assim, torna-se de extrema importância o conhecimento de aspectos biológicos, que possibilitem maior compreensão sobre a tolerância à dessecação dessa espécie. Neste estudo avaliaram-se as alterações no metabolismo de sementes recém-dispersas de *E. pyriformis* oriundas de diferentes regiões, bem como a influência das condições hídricas e térmicas, para este processo. Para isso foram coletadas sementes de *E. pyriformis* nos municípios de Ribeirão Preto (SP), Lavras (MG), Campinas (SP), São Paulo (SP), Pariquera-açu (SP) e Jumirim (SP). Os resultados sugerem que sementes de *E. pyriformis* oriundas de diferentes regiões, apresentam o metabolismo distinto e corroboram com a hipótese de que variações ambientais contribuem para diferenças fenotípicas, sendo o somatório de graus-dia, temperatura máxima e a chuva acumulada, dentre as variáveis analisadas, importantes fatores de contribuição para o desenvolvimento de sementes de *E. pyriformis*. Entretanto, estas variações não afetaram, em geral, as taxas de germinação e produção de plântulas normais, tampouco o vigor de *E. pyriformis* recém dispersas.

Palavras-chave: Myrtaceae, sementes, graus-dia, perfil metabólico

ABSTRACT

Seeds can show orthodox behavior (desiccation tolerant) or recalcitrant behavior (intolerant), existing a continuum between these two extremes. However, have been assumed that the desiccation tolerance may occur interspecifically, due to the place of origin. *Eugenia pyriformis* Cambess., native tree specie from Brazil, presents difficult seeds to be stored due to sensitivity to desiccation and low temperatures. Thus, it becomes extremely important the knowledge of biological aspects, to enable better understanding of the desiccation tolerance of this species. In this study, were analyzed the changes in metabolism of *E. pyriformis* recently dispersed seeds from different regions and the influence of thermal and hydro conditions for this process. Seeds of *E. pyriformis* were collected in the cities of Ribeirão Preto (SP), Lavras (MG), Campinas (SP), São Paulo (SP), Pariquera-açu (SP) and Jumirim (SP). The results suggest that seeds of *E. pyriformis* from different regions, showed distinct metabolism and corroborate the hypothesis that environmental variation contribute to phenotypic differences, being the number of degree-days, maximum temperature and cumulative rainfall, among the variables analyzed, important contributing factors to the development of *E. pyriformis* seeds. However, these variations did not affect, in general, the rates of germination and production of normal seedlings nor the vigor of *E. pyriformis* recently dispersed seeds.

Keywords: Myrtaceae, seeds, degree-day, metabolic profile

INTRODUÇÃO

A temperatura do ar, durante a embriogênese zigótica e a maturação das sementes, regula a expressão de genes envolvidos em processos fisiológicos, como a fenologia, o desenvolvimento e a aclimação de plantas, estando os graus-dia fortemente associados com o amadurecimento de sementes (Johnsen *et al.*, 2005).

Daws *et al.* (2004) constataram que sementes de *Aesculus hippocastanum* coletadas no norte da Europa foram dispersas menos desenvolvidas do que sementes coletadas mais ao sul, como consequência de temperaturas mais baixas durante o período de desenvolvimento das mesmas. Estudos realizados com esta mesma espécie mostraram que a temperatura do ar pode afetar a dormência das sementes, sendo os níveis de dormência inversamente relacionados aos graus-dia acumulados durante o desenvolvimento (Pritchard *et al.*, 1999). Em outras espécies o tamanho das sementes e dos frutos está positivamente relacionado ao aumento de temperatura durante o desenvolvimento (Tompsett & Pritchard, 1993; Stanley *et al.*, 2000).

A família Myrtaceae, a qual pertence a espécie *E. pyriformis*, é uma das mais marcantes dentro do bioma Mata Atlântica (Leitão Filho, 1987), e assume grande importância ecológica na costa atlântica do Brasil, sendo encontrada com grande riqueza de espécies e abundância (Peixoto & Gentry, 1990). Contida nesta família o gênero *Eugenia* apresenta muitas espécies de valor econômico por apresentarem frutos de valor nutritivo (Silva *et al.*, 2003). Tais espécies frutíferas também são atrativos para a fauna e apresentam potencial para recomposição ambiental (Maluf *et al.* 2003). Espécies deste gênero apresentam, normalmente, baixos teores de lipídios (Luzia *et al.* 2010; Mello *et al.*, 2010) e possuem amido como principal reserva de carbono (Mello *et al.*, 2010).

Dentre essas espécies desse gênero encontra-se a *Eugenia pyriformis*, popularmente conhecida como uvaieira (Lorenzi, 1998; Andrade & Ferreira, 2000). Lamarca *et al.* (2011) observaram que em sementes desta espécie a variação na soma térmica durante o desenvolvimento altera o índice de velocidade de germinação, assim como o teor de água com que as sementes são dispersas, mostrando que fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento de sementes de *E. pyriformis*. Os graus-dia parecem influenciar a aquisição da tolerância à dessecação de sementes de *E. pyriformis*, mas mostram-se associados à duração do período de maturação, condicionado pela disponibilidade hídrica ou pela temperatura do ar.

Devido ao fato de sementes de *E. pyriformis* apresentarem comportamento tipicamente recalcitrante (Andrade & Ferreira, 2000; Delgado & Barbedo, 2007) e grande distribuição latitudinal, o estudo destas sementes coletadas em diferentes localidades poderá contribuir para o entendimento do comportamento biológico dessa espécie. Desta maneira, este estudo tem como objetivo analisar as alterações no metabolismo de sementes recém-dispersas de *E. pyriformis* oriundas de diferentes regiões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Material vegetal

Frutos de *E. pyriformis* Cambess. foram coletados nas regiões de Ribeirão Preto – SP (21° 12'S, 47° 48'O , 571 m), Lavras – MG (21°13'S, 44°59'O, 981 m), Campinas – SP (22°52'S, 47°04'O , 698 m), São Paulo – SP (23°39'S, 46°37'O, 792 m), Pariquera-Açu (24° 42' S, 47° 53' O, 28 m) – SP e Jumirim – SP (22° 05'S e 47° 47' O, 540 m) durante os meses de setembro e novembro de 2012 – (Mapa, Anexo 1). Os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica. As sementes foram extraídas manualmente e armazenadas em câmara fria a 7°C até o início dos experimentos, não excedendo sete dias (Barbedo *et al.*, 1998; Andrade & Ferreira, 2000).

Análises físicas e fisiológicas

Análise do teor de água e conteúdo de massa seca

O teor de água e o conteúdo de massa seca das sementes foram determinados gravimetricamente, pelo método de estufa com circulação interna de ar, por 17 horas a 103 °C (ISTA, 2004), utilizando-se quatro repetições de cinco sementes cada.

Análise do potencial hídrico

O potencial hídrico das sementes foi medido utilizando-se quatro repetições de cinco sementes cada, cortadas ao meio e com tegumento. A aferição foi realizada em equipamento Decagon WP4 (USA) com base na temperatura do ponto de orvalho (Decagon Devices, 2001) (Delgado, 2006).

Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado em rolos de papel Germitest (Brasil, 2009), com quatro repetições de 15 sementes cada. Os testes de germinação foram realizados em sala de germinação, com temperatura controlada a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, com luz contínua e umidade relativa próxima a 100% (Delgado, 2006). As avaliações foram realizadas a cada cinco dias, durante 80 dias registrando-se o número de sementes que emitiram raiz primária (maior que 5 mm) e de plântulas com desenvolvimento normal da parte aérea e radicular (Lamarca *et al.*, 2011). Foi calculado o índice de velocidade de germinação através da fórmula de Maguire (1962).

Análise da atividade respiratória

O consumo de oxigênio (O_2) e a produção de dióxido de carbono (CO_2) foram determinados em analisador modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, EUA), utilizando-se quatro repetições de dez sementes cada, seguindo metodologia descrita por Lamarca e Barbedo (2012).

As taxas respiratórias das sementes foram estimadas em frascos de vidro (600 ml) hermeticamente fechados, com tampas perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha, por este septo foram inseridos os eletrodos do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem.

O fechamento das embalagens foi determinado como sendo o início do experimento, o tempo zero correspondendo a atmosfera normal (21% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). O consumo de O_2 e a produção de CO_2 pelas sementes embaladas foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens eram abertas por alguns minutos para re-equilíbrio com a atmosfera normal sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando e a pressão atmosférica local como 0,90 atm os valores obtidos em porcentagem de O_2 ou de CO_2 foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P = v_1\%/V\%$ (Feltre, 1985), onde:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (=0,90 atm);

$v_1\%$ = volume do gás, em porcentagem;

$V\%$ = volume total (=100%).

A seguir, baseando-se no volume das embalagens e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para μmol de O_2 e de CO_2 , pela equação de Clapeyron, $pV=nRT$, onde:

V = volume total de ar do frasco (em L)

n = número de moles do gás

R = constante universal dos gases perfeitos ($0,082 \text{ atm L mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatura (em Kelvin)

Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra de sementes e pelo número de dias em que as sementes permaneceram nas embalagens, obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ($\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{ d}^{-1}$). O quociente respiratório (QR), foi calculado dividindo-se o valor obtido para produção de CO_2 pelo obtido para consumo de O_2 ($\text{QR}=\text{CO}_2/\text{O}_2^{-1}$), ambos em $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{ d}^{-1}$, segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Análises bioquímicas

Extração de açúcares solúveis

A extração de açúcares solúveis foi realizada com três repetições de dez sementes cada, utilizando-se 100 mg de material. A este material foi acrescentado 1 mL de etanol 80%, em seguida as amostras foram incubadas à 80°C por 15 min. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1000 g. O sobrenadante foi recolhido e reservado e 3 novas extrações foram realizadas em etanol 80% com o resíduo, seguindo o procedimento recém descrito. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de açúcares solúveis totais (Dubois *et al.*, 1956) e os resíduos das amostras foram lavados com água, congelados, liofilizados e armazenados para posterior dosagem de amido.

Dosagem de açúcares solúveis

Após extração de açúcares solúveis, os sobrenadantes das amostras tiveram seu volume igualado e foram, então, utilizados para a quantificação dos açúcares através do método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), sendo utilizada uma solução de glucose ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 490 nm, em triplicatas para cada amostra. Após a quantificação dos açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico, separaram-se 1 mL das amostras e estas foram então deionizadas em colunas

contendo resinas de troca catiônica e aniônica Dowex, sendo eluídas com 10 volumes de água deionizada. O material eluído teve seu pH neutralizado com hidróxido de amônio. Os eluatos foram concentrados até secagem completa e retomados em 1 mL de água deionizada, sendo novamente quantificados e um volume contendo 300 µg de açúcar, de cada repetição, foi analisado em sistema HPAEC/PAD (Dionex ICS-3000, EUA) composto por coluna CarboPac PA-1 (2 x 250 mm - Dionex, EUA) utilizando-se um gradiente de 150 mM de hidróxido de sódio (eluente B) e água (eluente A), de acordo com a seguinte programação: 0-25 min, 66,7% eluente B; 25-30 min, 100% eluente B; 30-35 min, 66,7% eluente B, com taxa de fluxo de 0,25 mL min⁻¹. Os açúcares foram identificados através de comparação com padrões autênticos (Sigma-Aldrich Co., EUA).

Dosagem de amido

A dosagem de amido foi realizada através de digestão enzimática, utilizando alíquotas de 10 mg de cada resíduo liofilizado após extração com etanol 80%, seguindo protocolo descrito por Amaral *et al.* (2007). Ao material liofilizado foi adicionada solução contendo 120 unidades mL de α -amilase (Megazyme) diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. As amostras foram incubadas a 75 °C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez. As amostras foram resfriadas até 50 °C e foi adicionado 0,5 mL de solução contendo 30 unidades mL de amiloglucosidase (Megazyme) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. As amostras foram incubadas a 50 °C por 30 min, sendo o procedimento novamente repetido. Após as incubações, foram acrescentados 100 µL de ácido perclórico 0,8 M para o término da reação e precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas e os extratos foram dosados através de quantificação da glicose liberada no processo de hidrólise. Para tal foram retiradas alíquotas de extrato, às quais foi adicionado o Reagente Glicose PAP Liquiform (Labtest), contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase além dos reagentes 4-aminoantipirina e fenol. Após incubação por 15 min a 37°C, o teor de glicose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA em comprimento de onda de 490 nm. A curva padrão foi construída a partir de quantidades crescentes de glicose na concentração de 1mg mL⁻¹.

Análise do perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS) seguindo método de Roessner *et al.* (2001), modificado, utilizando-se seis repetições de dez sementes cada. Amostras de sementes de *E. pyrifomis* coletadas em

diferentes localidades foram congeladas, pulverizadas em nitrogênio líquido e extraídas em solução metanol:clorofórmio:água, na proporção de 12:5:1, com adição de padrão interno (0,2 mg mL⁻¹ adonitol em água) para auxiliar as normalizações durante a quantificação. A mistura foi incubada a 60°C por 30 min sob agitação e centrifugada a 13.000 rpm por 5 min. A fase polar foi submetida à secagem e derivatizada com 150 µL de piridina, 50 µL de *N,O*-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de cloridrato de metoxilamina (0,2 mg mL⁻¹ piridina) sob agitação durante 1 h a 75°C. Amostras foram injetadas automaticamente em um sistema GC/MS (Agilent GC 6890 e MSD 5973N series, Agilent Technologies, EUA). Foi utilizada coluna HP-5 MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de espessura x 0,25 µm de filme - Supelco, EUA). A temperatura de injeção foi ajustada para 230°C, a interface em 250°C, e a fonte de íons ajustada em 150°C. O gás hélio foi utilizado como carreador com fluxo de 1 mL min⁻¹. As análises foram realizadas de acordo com a seguinte programação: 5 min de aquecimento isotérmico a 70°C, seguido por um aquecimento com taxa de 5°C min⁻¹ até atingir 280°C, e ao final 1 minuto de aquecimento a 280°C. Os espectros de massa foram registrados na faixa de 50-600 m/z. Os cromatogramas e os dados de espectrometria de massa foram avaliados utilizando o programa Chemstation (Agilent Technologies, EUA). Os picos foram identificados e comparados com padrões autênticos, com a NIST 08 Mass Spectral Library (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia) e com o banco de dados Golm Metabolome Database - GMD (Hummel *et al*, 2010).

Dados Meteorológicos

Obtenção dos dados

A caracterização climatológica regional (temperaturas máxima e mínima – diária e precipitação - diária) foi obtida através de dados das estações meteorológicas, do Instituto Agrônomo de Campinas (CIIAGRO), Campinas- SP, Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, São Paulo- SP, Estação Meteorológica de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto – SP e do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Lavras – MG

Soma térmica

A soma térmica foi calculada desde a antese até a dispersão natural das sementes. Inicialmente inflorescências no período de máximo florescimento da espécie foram marcadas.

Os frutos e sementes foram colhidos imediatamente após a dispersão, ao apresentarem coloração característica para a espécie (Lamarca, *et al.*, 2011).

O somatório de graus-dia (GD) foi realizado desde a antese até a coleta, segundo as seguintes equações, propostas por Villa Nova *et al.* (1972):

$$GD = (T_m - T_b) + (T_M - T_m)/2, \text{ para } T_m > T_b;$$

$$GD = (T_M - T_b)^2 / 2(T_M - T_m), \text{ para } T_m < T_b \text{ e}$$

$$GD = 0, \text{ para } T_b > T_M.$$

Em que:

GD = graus-dia (°C d);

T_M = temperatura máxima diária (°C);

T_m = temperatura mínima diária (°C) e

T_b = temperatura base (°C).

Os graus-dia acumulados foram calculados considerando-se a temperatura base de 10 °C, conforme descrito em Pedro Júnior (1977). Foram calculados ainda o balanço hídrico sequencial, segundo o modelo proposto por Thornthwaite & Mather (1955), em nível de escala decendial, com capacidade de água disponível (CAD) de 125 mm (Rolim *et al.*, 2007).

Forma de análise dos resultados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (Tukey), com nível de significância de 5%, através do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando-se o software PAST (Hammer *et al.*, 2001), sendo incluídos na análise apenas os compostos presentes em todos os tratamentos. Foi realizada análise de correlação (variável X variável) pelo teste de Pearson com nível de significância de 5%, sendo excluídas variáveis com alta correlação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as regiões o desenvolvimento das sementes de *Eugenia pyriformis* ocorreu em período de déficit hídrico (Figura 1). A floração ocorreu entre o final do inverno e começo da primavera, sendo os frutos dispersos nesta mesma estação (Figuras 1 e 2). De acordo com Staggemeier e colaboradores (2010), a floração de espécies da família Myrtaceae ocorre quando a duração do dia é superior a 12h, ocorrendo entre Outubro e Março. No entanto, neste e em outros estudos com *Eugenia pyriformis*, observa-se que a floração e dispersão de frutos ocorrem em período anterior às outras espécies da família Myrtaceae. Observou-se também que a floração ocorreu após períodos de menor temperatura e a dispersão dos frutos, exceto em Ribeirão Preto, coincidiu com o aumento da chuva no período, em acordo com os resultados de Lamarca e colaboradores (2013).

As sementes recém-dispersas de *E. pyriformis* oriundas de diferentes regiões apresentaram alta capacidade germinativa, com valores estatisticamente similares para germinação e plântulas normais (Tabela 1) como já esperado, tendo em vista a dispersão com alto teor de água conhecida para a espécie. O índice de velocidade de germinação variou apenas para as sementes provenientes de Pariquera-açu (Tabela 1), região cuja amplitude térmica concentrou-se abaixo de 12°C (Figura 3). De acordo com Lamarca e colaboradores (2011) a amplitude térmica com que sementes de *E. pyriformis* são formadas pode influenciar no acúmulo de material de reserva, ocorrendo o máximo de acúmulo quando a amplitude térmica é superior a 12°C. Estudos com outras espécies também tem indicado que a temperatura durante a maturação pode influenciar a germinação de sementes, por exemplo, sementes de *Amaranthus retroflexus* apresentaram taxas de germinação mais altas quando amadureceram nas temperaturas de 27/22°C do que em 22/17 ° C (Kigel *et al.*, 1977). Já em sementes de soja, estudadas por Keigley e Mullen (1986), foi observado que o acúmulo de dias com temperaturas elevadas 32/28°C após a floração, reduziu a germinação em comparação com a maturação da semente compreendidas entre 27/22°C.

Além disso, o somatório de graus-dia tem sido positivamente relacionado à qualidade fisiológica das sementes (Daws *et al.*, 2004, 2006), inclusive para a espécie *E. pyriformis* (Lamarca *et al.*, 2011). Porém, observa-se que sementes provenientes de Ribeirão Preto e Campinas apresentaram os maiores valores de somatório de graus-dia (GD), no entanto registraram-se os menores valores de massa seca. Já a região de Campinas apresentou baixo valor de chuva acumulada (período compreendido entre a floração e a dispersão dos frutos)

(Tabela 1). Alguns trabalhos relatam que a deficiência hídrica altera a exigência térmica encurtando o período de maturação (Pedro Júnior *et al.*, 2004; Petek *et al.*, 2009), prejudicando a formação de sementes (Martins *et al.*, 2009).

Ademais a chuva tem sido relacionada aos fenômenos de floração, formação de frutos e sementes. Por exemplo, a deficiência hídrica e a baixa temperatura são as principais variáveis ambientais durante o período de indução do florescimento de laranjeiras no Estado de São Paulo (Ribeiro *et al.*, 2006). Fellipi e colaboradores (2012) observaram que a temperatura e pluviometria elevadas prejudicam a formação dos frutos de *Apuleia leiocarpa*. Perez-Ramos e colaboradores (2010) observaram que os principais fatores abióticos que afetam a produção anual de sementes em *Quercus ilex* foram todas relacionadas com recursos hídricos, sendo produção de sementes fortemente dependente da disponibilidade de água para a planta no estágio inicial (primavera) ao passo que a etapa final do desenvolvimento da semente foi negativamente afetada pela frequência de eventos de chuva torrencial.

De maneira geral, foi observada baixa quantidade de chuva acumulada no período compreendido entre a floração e a dispersão natural dos frutos de *E. pyrifomis*, para todas as regiões. A região de São Paulo apresentou o menor valor observado, 18,2 mm. A maior precipitação ocorreu na região de Ribeirão Preto e equivaleu à 73,1 mm. Variações na precipitação entre regiões e entre anos coleta para a mesma região foram observados em trabalhos anteriores com a espécie. Por exemplo, foi observado durante a maturação de frutos provenientes da região de Lavras, uma variação de 175,4 mm de chuva acumulada no ano de 2009 para 24,2 mm em 2010 (Lamarca *et al.*, 2011; Lamarca, 2013; Lamarca *et al.*, 2013). Foi verificado por Lamarca (2013), que quando a região ou época de coleta proporciona acúmulo de GD necessário para completar o desenvolvimento e maturação, ainda que ocorra baixa disponibilidade hídrica a qualidade fisiológica das sementes não é afetada.

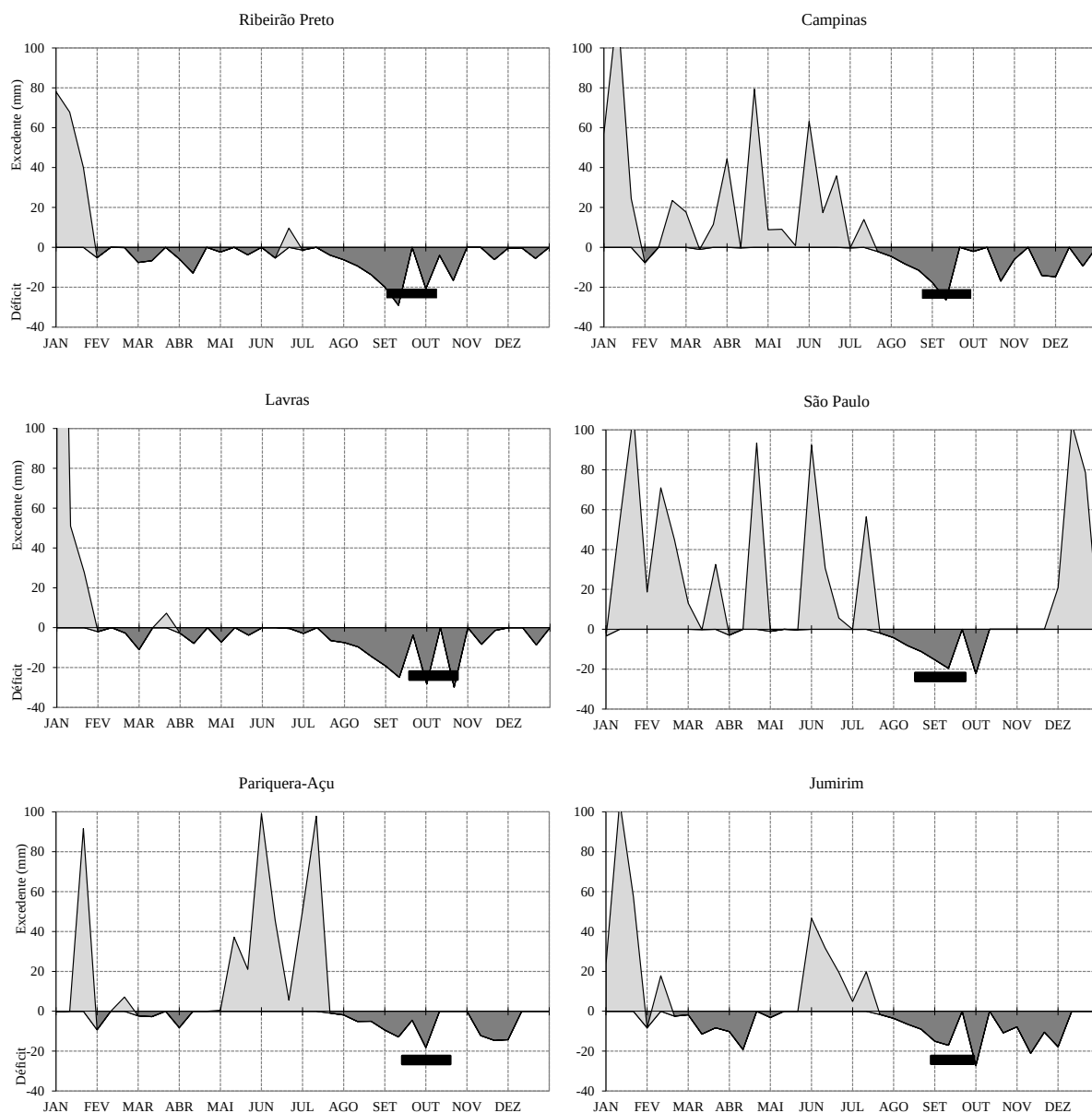


Figura 1. Extrato do balanço hídrico sequencial de regiões de coleta de sementes de *Eugenia pyriformis*. Barras pretas indicam o período compreendido entre o florescimento e dispersão dos frutos.

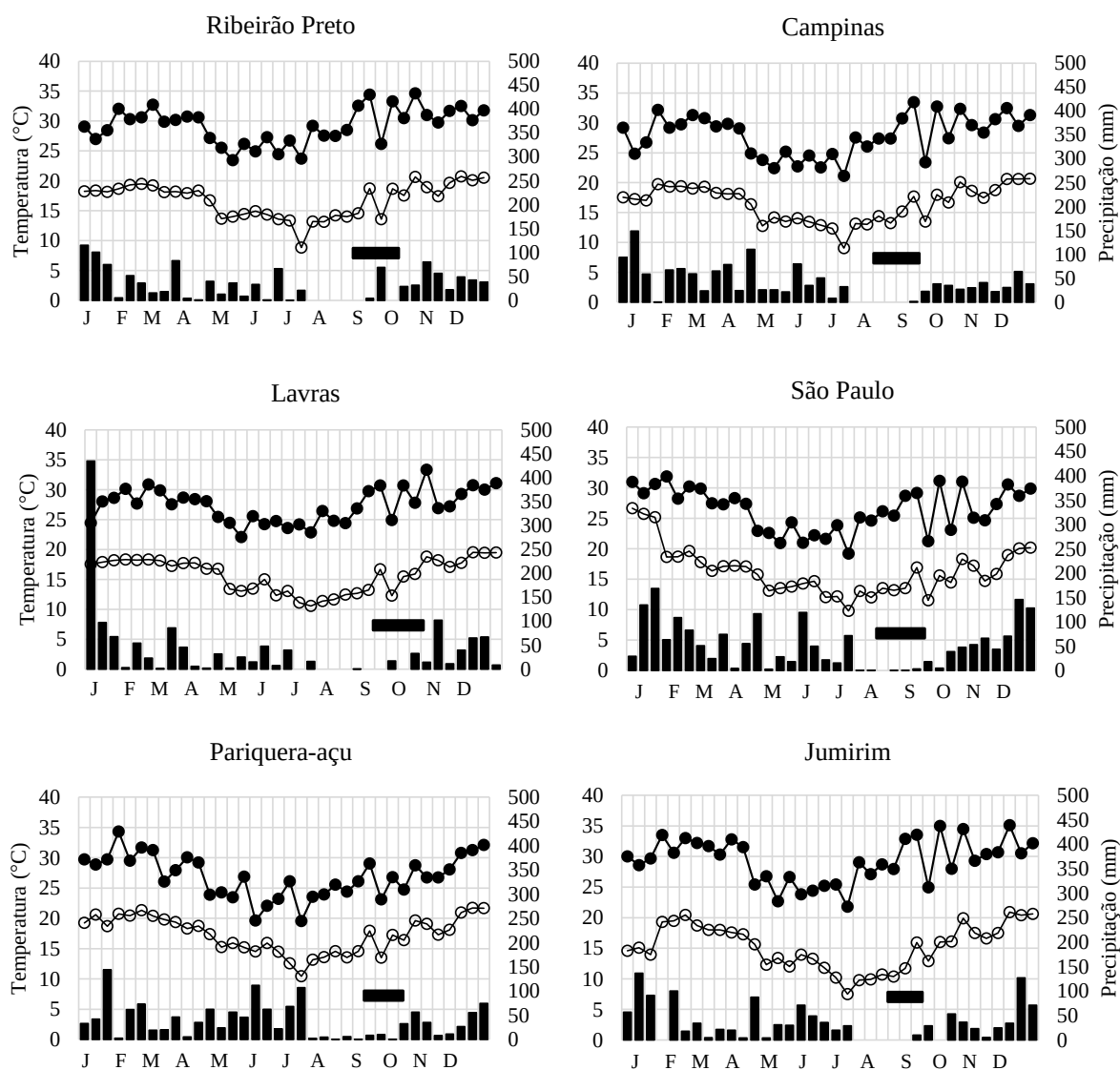


Figura 2. Dados meteorológicos das regiões e ano de coleta de frutos de *Eugenia pyriformis*. Dados apresentados em escala decencial: temperatura máxima (círculo fechado), temperatura mínima (círculo aberto), chuva (colunas pretas) e período compreendido entre a floração e a coleta dos frutos (barras pretas transversais).

Tabela 1. Origem das sementes de *Eugenia pyriformis*. Período de maturação, classificação climática das regiões (Köppen) e dados meteorológicos, compreendidos entre o florescimento e dispersão das sementes (média da temperatura mínima e máxima do ar, graus -dia e chuva acumulada). Características físicas e fisiológicas iniciais (teor de água, potencial hídrico, massa seca, germinação, plântulas normais e vigor). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%. *Valores médios acompanhados do desvio padrão.

Região e época de coleta (Período de maturação)	Min e Máx (°C)	Graus-dia (°C d)	Chuva (mm)	Teor de água* (g g ⁻¹)	Potencial hídrico (-MPa)	Massa seca (g semente ⁻¹)	Germinação (%)	Plântulas normais (%)	Vigor (IVG)
Ribeirão Preto									
21°10'S, 47°52'O e 593 m - Cwa 01/09/12 - 08/10/12 = 38	16-32	530	73,1	1,21 ± 0,04	-1,62 b	0,34 b	100 a	78 a	3,44 a
Campinas									
22°52'S, 47°04'O e 645 m - Cwa 17/08/12 - 26/09/12 = 41	15-29	502	24	1,23 ± 0,17	-1,95 a	0,38 b	100 a	87 a	3,41 a
Lavras									
21°13'S, 44°58'O e 949 m - Cwa 15/09/12 - 23/10/12 = 39	15-28	459	53,5	1,37 ± 0,12	-1,66 b	0,54 a	98 a	92 a	3,20 a
São Paulo									
23°38'S, 46°37'O e 785 m - Cwb 14/08/12 - 25/09/12 = 43	14-27	455	18,2	1,79 ± 0,05	-1,85 a	0,57 a	98 a	97 a	3,51 a
Pariquera-açu									
24°37'S, 47°53'O e 28 m - Af 10/09/12 - 17/10/12 = 38	16-26	420	51	1,52 ± 0,12	-2,02 a	0,52 a	97 a	87 a	2,06 b
Jumirim									
22°05'S, 47°47'O e 540 m - Cwa 25/08/12 - 26/09/12 = 33	13-31	395	39	1,32 ± 0,09	-1,67 a	0,44 ab	96 a	93 a	3,18 a

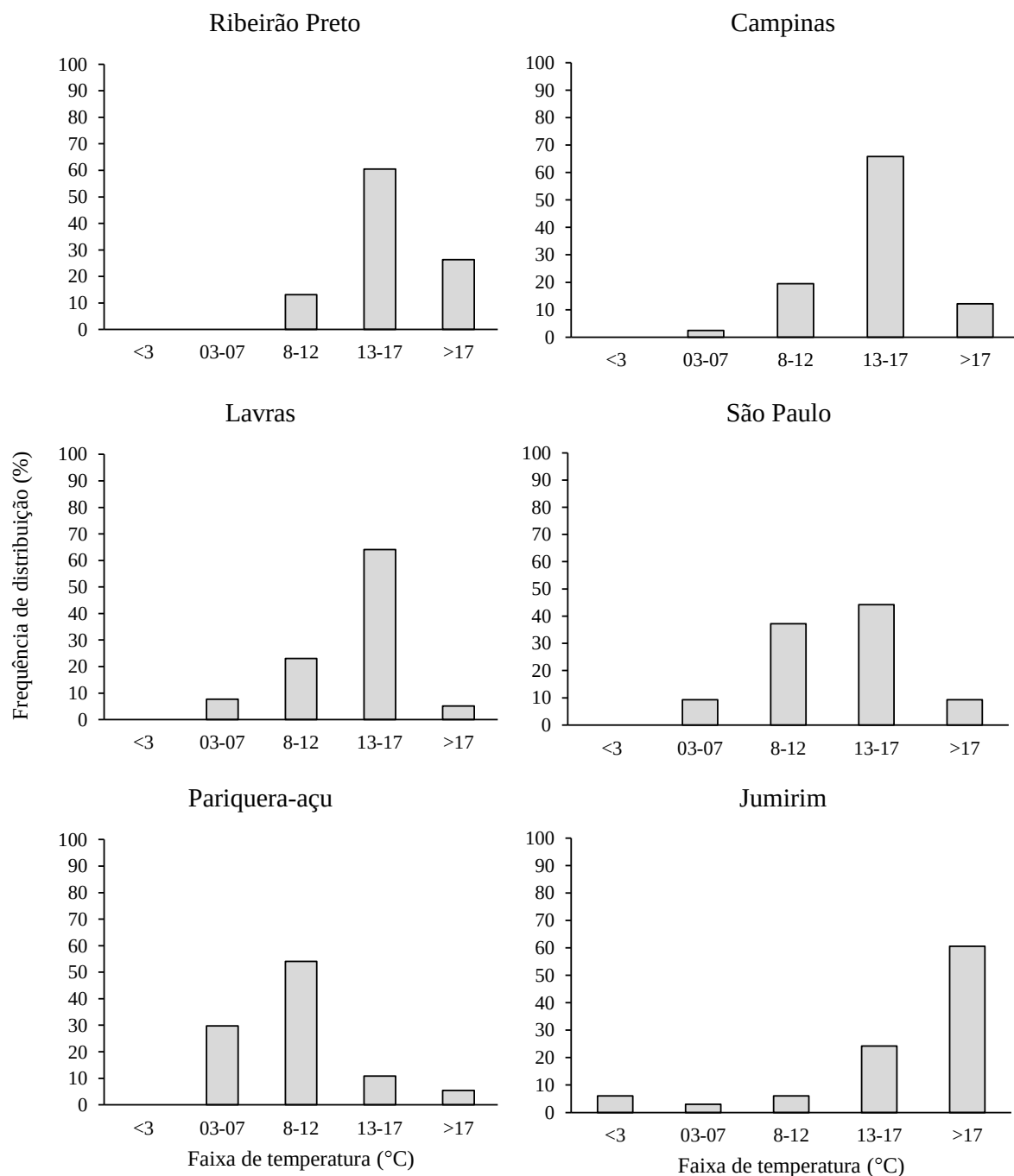


Figura 3. Distribuição de frequência da amplitude térmica das regiões de coleta durante o período de formação de sementes de *Eugenia pyriformis*.

A análise de açúcares solúveis (Figura 4A) e amido (Figura 4B) demonstrou haver diferença significativa na quantidade de açúcar solúvel total. Sementes provenientes de Campinas e Lavras apresentaram os maiores valores de açúcares solúveis (115 e 108 mg⁻¹g MS respectivamente). As sementes oriundas de Pariqueira-açu apresentaram a menor concentração de açúcar solúvel total, 85 mg⁻¹g MS e sacarose 10,88 mg⁻¹g MS (Figura 4). Nesta região foi detectada a menor amplitude térmica, como já citado anteriormente, o que

pode ter contribuído para a menor velocidade de germinação. Com a embebição, e consequente início da germinação, os tecidos embrionários necessitam de energia de rápida mobilização, o que poderia explicar a menor velocidade de germinação das sementes provenientes de Pariquera-açu, uma vez que, o acúmulo de açúcares mais facilmente metabolizáveis, como mono ou dissacarídeos são mais eficientes para o desenvolvimento inicial das plântulas.

Em média, as sementes apresentaram 100 mg⁻¹g MS de açúcar solúvel total e 543,5 mg⁻¹g MS de amido (Figura 4), configurando que sua principal reserva energética seja acumulada através de grânulos de amido, ou seja, na forma insolúvel. Estes resultados são compatíveis com os dados descritos para sementes do mesmo gênero, como *Eugenia uniflora*, cujo amido representou aproximadamente 64% da massa seca da semente (Mello *et al.*, 2010).

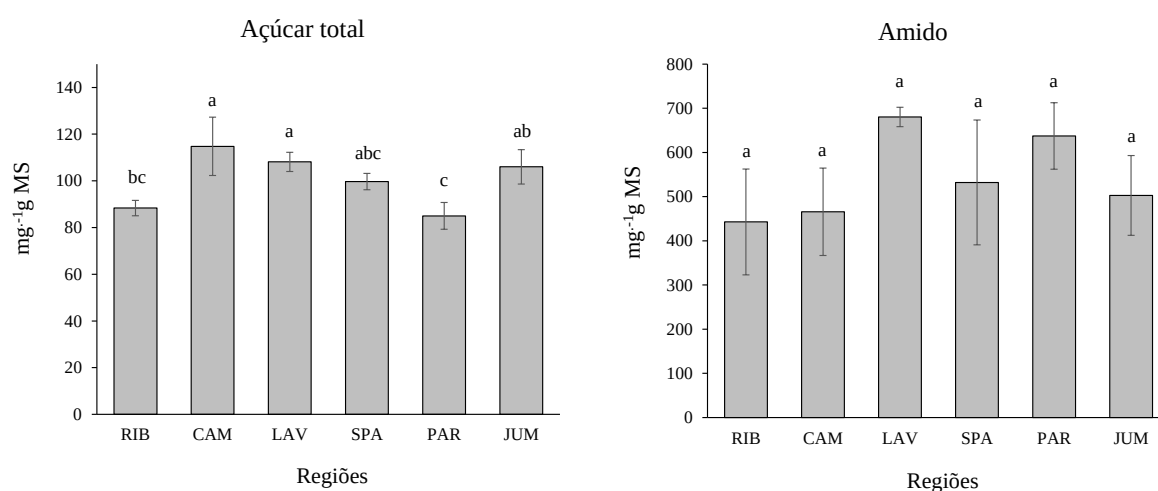


Figura 4. Conteúdo de carboidratos solúveis (A) e amido (B) mg⁻¹ g MS em embriões de *Eugenia pyriformis* recém dispersas, de origens distintas. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

A fração de açúcares solúveis analisada por HPAEC/PAD (Figura 5), também demonstrou resultados similares aos de *E. uniflora* (Mello *et al.*, 2010). De maneira geral, as sementes apresentaram sacarose em maiores proporções e quantidades menos expressivas de glucose, frutose e rafinose, além de traços de estaquiase. Sementes provenientes da região de Lavras apresentaram acúmulo de sacarose e de seus precursores, glucose e frutose.

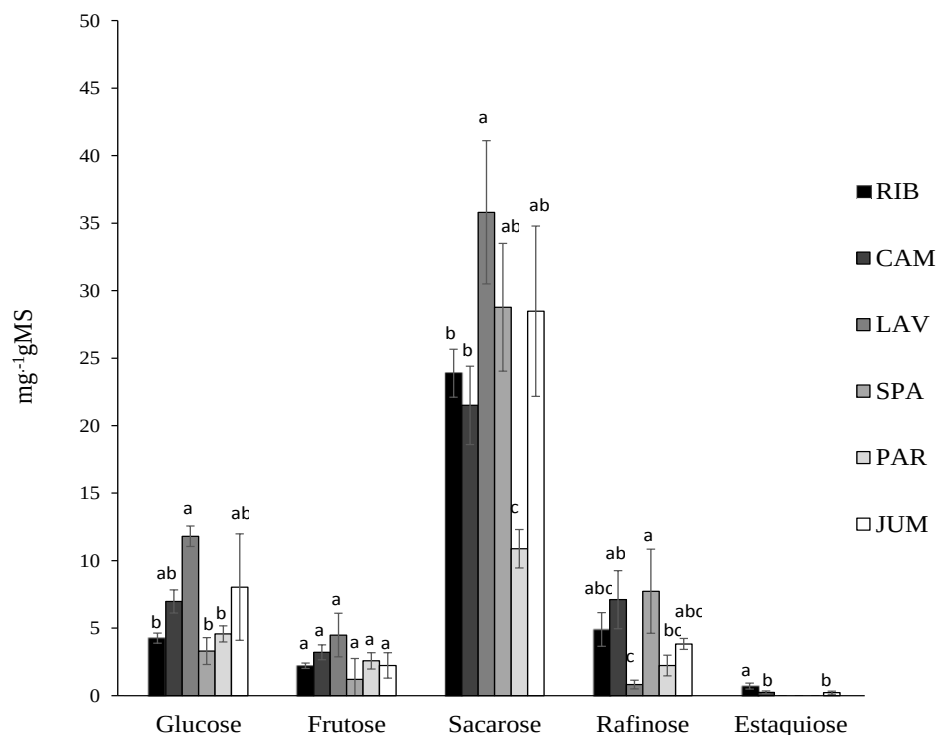


Figura 5. Conteúdo de glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose ($\text{mg}^{-1} \text{g MS}$) em embriões de *Eugenia pyriformis* recém dispersas, de origens distintas. Compostos foram quantificados por HPAEC/PAD. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

As taxas respiratórias de sementes de *E. pyriformis*, logo após a dispersão natural, demonstraram a existência de variações no metabolismo das sementes conforme sua origem (Tabela 2). De acordo com os valores do consumo de O_2 ou da produção de CO_2 , as origens dos materiais, podem ser divididas em três categorias de intensidade respiratória: I - menor que $0,5 \mu\text{mol O}_2$ ou $\text{CO}_2 \text{ g MS}^{-1} \text{ d}^{-1} (\times 100)$; II – entre $0,5$ e $1,0 \mu\text{mol O}_2$ ou $\text{CO}_2 \text{ g MS}^{-1} \text{ d}^{-1} (\times 100)$ e III – acima de $1,0 \mu\text{mol O}_2$ ou $\text{CO}_2 \text{ g MS}^{-1} \text{ d}^{-1} (\times 100)$ (Lamarca, 2013). Enquadrando-se portanto na categoria I as sementes provenientes de Campinas e Lavras, na categoria II as sementes oriundas de Pariqueira-açu, Jumirim, Ribeirão Preto e São Paulo.

De maneira geral, a maior diferença entre os níveis dos gases, gerando quociente respiratório (QR, ou seja, relação CO_2 / O_2) inferior a 1, pode indicar a presença de reações oxidativas (além da própria respiração) ou mudanças nos substratos respiratórios, ou seja processos que consomem mais oxigênio (Labouriau, 1983). Sementes oriundas de Jumirim, São Paulo e Ribeirão Preto apresentaram as maiores diferenças entre os gases O_2 e CO_2 e os quocientes respiratórios (QR) estatisticamente menores. Sementes oriundas dessas regiões apresentaram também a menor proporção de ácido ascórbico (Figura 6), um importante

antioxidante (Paradiso, 2012), que atua no sistema antioxidante não-enzimático da célula vegetal, reagindo contra radicais livres (Gratão *et al.*, 2005).

Ainda, não foi possível relacionar o valor do QR de sementes provenientes de Ribeirão Preto, São Paulo e Jumirim ao teor de água após a dispersão, uma vez que as apresentaram valores significativamente distintos, o que sugere que outros fatores, além do teor de água influenciem a atividade respiratória dessas sementes.

De maneira geral, a análise de metabólitos primários (Figura 6), demonstrou que as sementes recém-dispersas oriundas de diferentes regiões possuem um perfil metabólico similar, diferindo na proporção entre compostos.

Diferenças expressivas no perfil metabólico foram registradas pelas sementes provenientes de Lavras que apresentaram maior proporção de carboidratos como e galactose e dos polióis, galactitol e pinitol, além de menor proporção de ácido cítrico (Figura 6), que está envolvido em processos respiratórios através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Além disso, observa-se para as sementes dessa região a menor taxa respiratória (Tabela 2), o que pode ter diminuído os processos oxidativos.

Tabela 2. Taxas respiratórias em $\mu\text{mol O}_2$ ou $\text{CO}_2 \text{ g MS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($\times 100$) de sementes de *Eugenia pyriformis* recém dispersas, de origens distintas. As colunas apresentam os valores médios acompanhados do desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%. Letras comparam origem do material.

	O ₂	CO ₂	QR
Ribeirão Preto	0,76 $\pm$ 0,15 a	0,66 $\pm$ 0,09 ab	0,88 $\pm$ 0,01 b
Campinas	0,44 $\pm$ 0,08 b	0,43 $\pm$ 0,06 cd	0,99 $\pm$ 0,06 a
Lavras	0,32 $\pm$ 0,01 b	0,34 $\pm$ 0,02 d	1,08 $\pm$ 0,23 a
São Paulo	0,66 $\pm$ 0,06 a	0,57 $\pm$ 0,07 cd	0,86 $\pm$ 0,03 b
Pariquera açu	0,70 $\pm$ 0,10 a	0,73 $\pm$ 0,11 a	1,05 $\pm$ 0,03 a
Jumirim	0,65 $\pm$ 0,11 a	0,53 $\pm$ 0,11 cd	0,81 $\pm$ 0,04 b

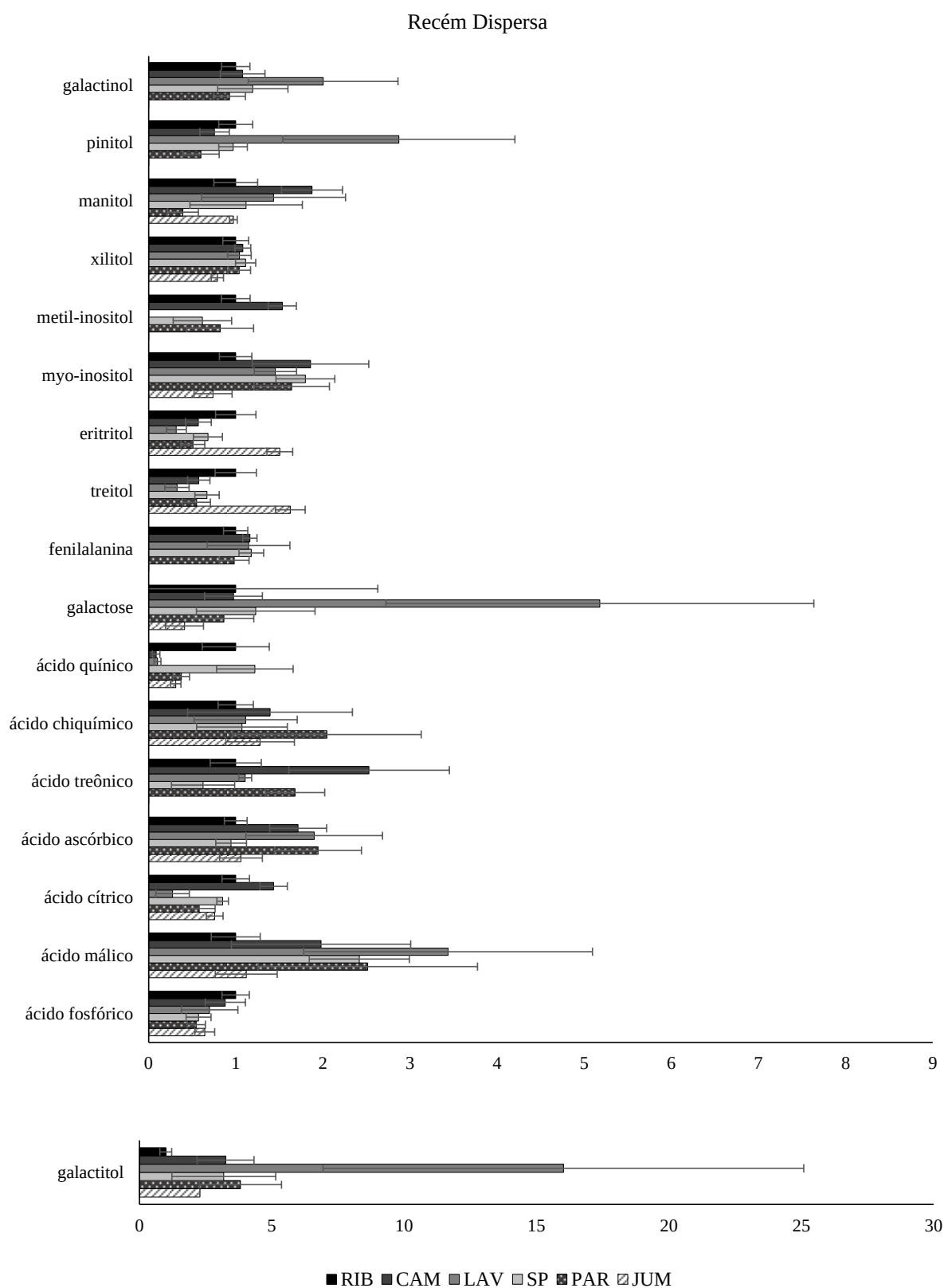


Figura 6. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis* recém dispersas, de origens distintas. Compostos foram detectados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média do tratamento Ribeirão (RIB).

Baseado nos parâmetros analisados não foi possível notar um padrão claro de variação dos demais compostos entre as localidades, desta maneira, uma análise multivariada foi realizada a fim de auxiliar a elucidar os resultados encontrados.

A análise de componentes principais (Figura 7) (Componente 1 – 24,72% e Componente 2 – 18,95%) do perfil metabólico demonstrou a separação entre as regiões, sendo Campinas e São Paulo, as regiões menos separadas entre si, além disso, para as regiões de Jumirim e Lavras foram observadas as separações mais evidentes. Alguns compostos são responsáveis pela separação das regiões no Componente 1, como por exemplo, pinitol, rafinose, estaquiose, amido, glucose, ascorbato e citrato. O Componente 2 foi influenciado principalmente pelo ácido treônico, xilitol, eritritol e fenilalanina.

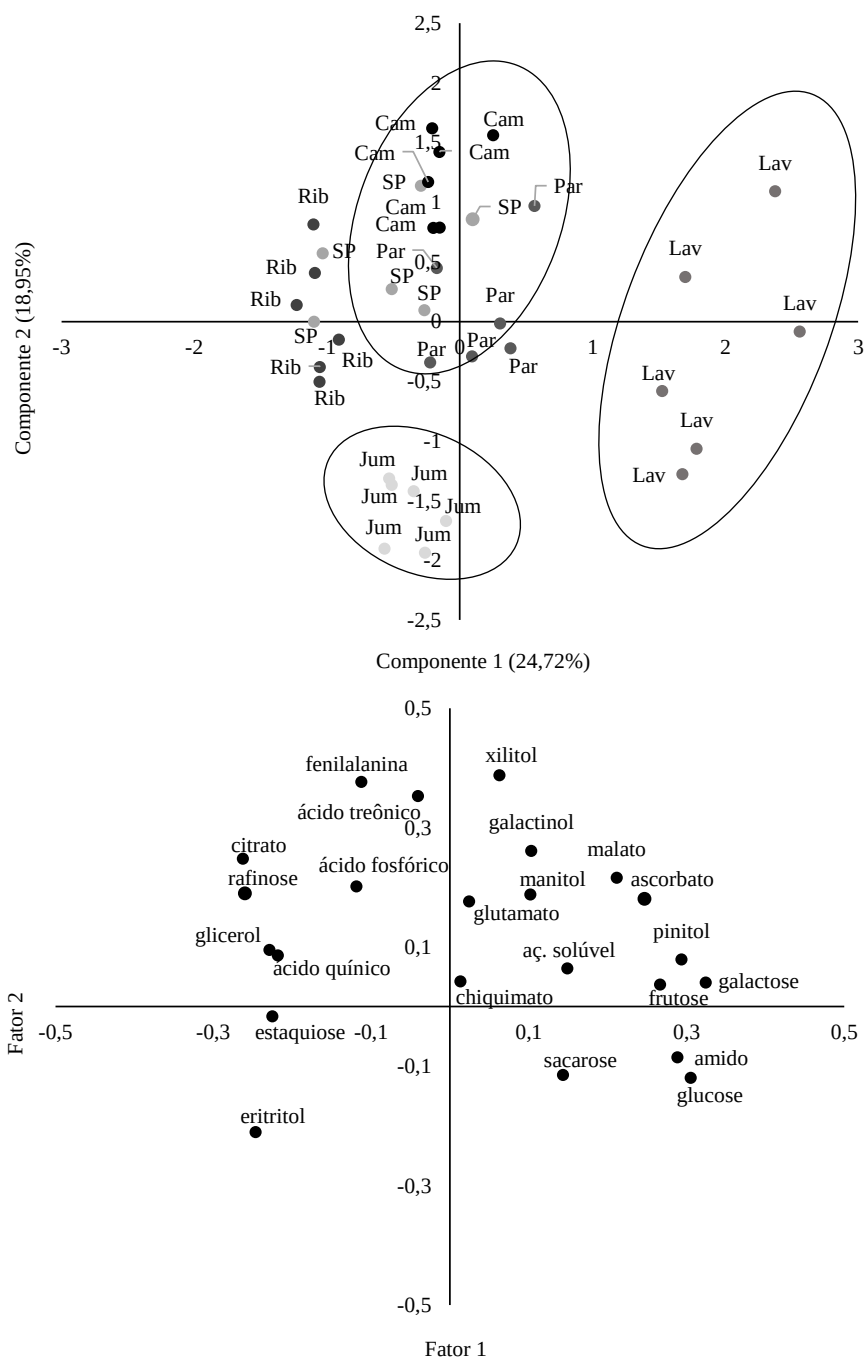
Observa-se que dentre os compostos encontram-se oligossacarídeos da série da rafinose e os ciclitóis. A presença de rafinose e estaquiose em tecido vegetais parecem contribuir para a tolerância a dessecação e ao estresse por frio e calor (Koster & Leopold, 1988; Blackman *et al.*, 1992; Horbowicz & Obendorf, 1994; Obendorf, 1997; Hoekstra *et al.*, 2001; Farrant & Moore, 2011). Em sementes que não acumulam rafinose e estaquiose, tem sido proposto que os ciclitóis desempenhem o mesmo papel que estes compostos (Horbowicz & Obendorf, 1994; Horbowicz *et al.*, 1998).

Além disso, uma segunda análise de componentes principais (Figura 8), utilizando a média das variáveis analisadas, associando-as às variáveis ambientais graus-dia e chuva acumulados e médias das temperaturas máxima e mínima, demonstra que os componentes 1 e 2 explicam aproximadamente 60% das variações encontradas entre os locais. O componente 1, que representa 40,95% das variações está relacionado com a massa seca e teor de água das sementes recém dispersas, ao somatório de graus-dia e temperatura máxima durante o período de maturação das sementes, o componente 2 representa 19,15% das variações e está relacionado à temperatura mínima durante o período de maturação das sementes e ao índice de velocidade de germinação. A chuva acumulada parece estar relacionada a ambos os componentes.

CONCLUSÃO

As variáveis ambientais não afetaram, em geral, as taxas de germinação e produção de plântulas normais, tampouco o vigor destas sementes. Entretanto a análise de perfil metabólico de sementes de *E. pyriformis* oriundas de diferentes regiões demonstrou que estas sementes apresentam o metabolismo distinto, e corroboram com a hipótese de que variações

ambientais contribuem para diferenças fenotípicas, sendo não apenas o somatório de graus-dia, mas também a temperatura máxima e a chuva acumulada, dentre as variáveis analisadas, importantes fatores de contribuição para o desenvolvimento de sementes de *Eugenia pyriformis*.



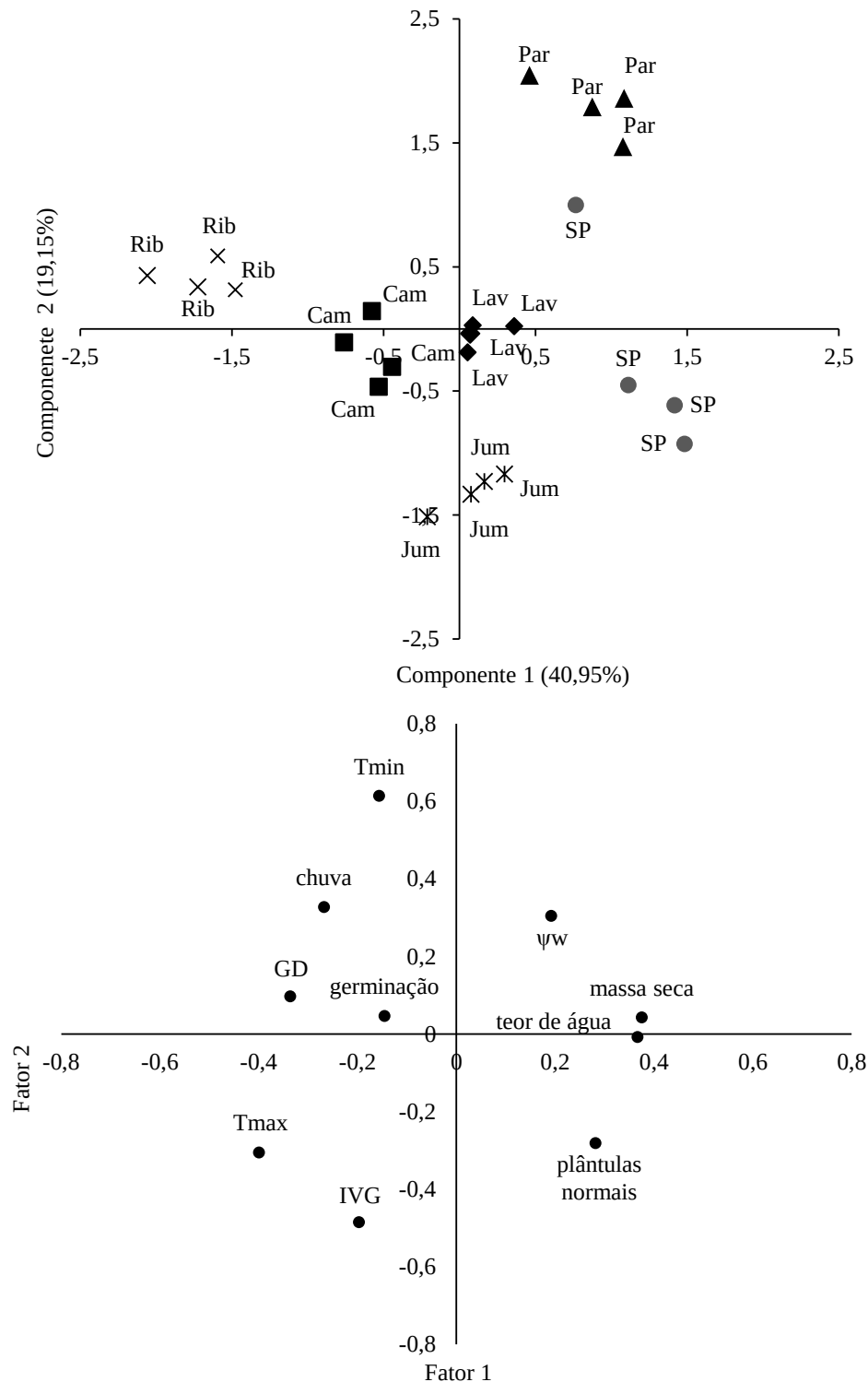


Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) contemplando análises físicas e fisiológicas (teor de água, potencial hídrico, massa fresca, massa seca, porcentagem de germinação, porcentagem de plântulas normais, índice de velocidade de germinação) de sementes de *Eugenia pyriformis* recém dispersas e os valores de graus-dia e chuva acumulada durante período compreendido entre o florescimento e dispersão dos frutos. PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, L.I.V., Costa, P.M.F., Aidar, M.P.M., Gaspar, M. & Buckeridge, M.S.** 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34: 425-431.
- Amma, S. & Watanabe, A.** 1985. Long-term storage of germplasm of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Japan Agricultural Research Quarterly*, 19: 196–201.
- Andrade, R. N. B. & Ferreira, A. G.** 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília 22 (2): 118-125.
- 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.
- Berjak, P., Vertucci, C.W. & Pammenter, N.W.** 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Science Research* 3: 155–166.
- Blackman, S.A., Obendorf, R.L. & Leopold, A.C.** 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology* 100: 225-230.
- Brasil.** 2009. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para análise de sementes. Brasília, DF 398p.
- Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C. A. & Pritchard, H. W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157–166.
- Daws, M.I., Cleland, H., Chmielarz, P., Gorian, F., Leprince, O. & Mullins, C.E.,** 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology* 33: 59-66.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância a dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42 (2): 265-272.
- Delgado, L.F.** 2006. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo (Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente).
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Farrant, J. M. & Moore, J. P.** 2011. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 340–345.

Felippi, M., Maffra, C. R. B., Cantarelli, E. B., Araújo, M. M., Longhi, S. J. 2012. Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. *Ciência Florestal* 22(3): 477-491.

Feltre, R. 1982. Química geral. 2.ed. Moderna. São Paulo 1: 364p.

Ferreira, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFPA)* 35: (6) 1039-1042.

Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J. & Azevedo, R.A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32:481-494.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1-9.

Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.

Horbowicz, M., Brenac, P. & Obendorf, R.L. 1998. Fagopyritol B1, O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* 205: 1-11.

Horbowicz, M., Obendorf, R. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols - review and survey. *Seed Science Research* 4: 385-405.

Hu, J., Guo C.G. & Shi, S.X. 1993. Partial drying and post-thaw preconditioning improve the survival and germination of cryopreserved seeds of tea (*Camellia sinensis*). *Plant Genetic Resources Newsletter* 93: 1-4.

Hummel, J., Strehmel, N., Selbig, J., Walther, D., Kopka, J. 2010. Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. *Metabolomics* 6: 322-333.

International Seed Testing Association. 2004. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13: 356-513.

Johnsen, Ø., Fossdal, C. G., Nagy, N., Mølmann, J., Dæhlen, O. G. & Skrøppa, T. 2005. Climatic adaptation in *Picea abies* progenies is affected by the temperature during zygotic embryogenesis and seed maturation. *Plant, Cell and Environment* 28: 1090-1102.

Kader, A.A. & Saltveit, M.E. 2002. Respiration and gas exchange. J.A. Bartz, J.K. Brecht. & J. Weichmann. (eds.) In: *Postharvest physiology and pathology of vegetables*, Marcel Dekker: New York, pp.7-29.

Keigley, P. J. & Mullen, R. E. 1986. Changes in Soybean Seed Quality from High Temperature During Seed Fill and Maturation. *Crop Science* 26: 1212-1216.

Kigel, J., Ofir, M. & Roller, D. 1977. Control of the Germination Responses of *Amaranthus retroflexus* L. Seeds by their Parental Photothermal Environment. *Journal of Experimental Botany* 28 (106): 1125-113.

Koster, K.L. & Leopold, A.C. 1988. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiology* 88: 829-832.

Labouriau, L.G. 1983. A germinação das sementes. OEA: Washington, 175p.

Lamarca, E.V., Silva, C.V. & Barbedo, C.J. 2011. Limites térmicos para a germinação em função da origem de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) nativas do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 25 (2):293-300.

Lamarca, E. V., Barbedo, C.J. 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. *Hoehnea* 39: 577-586.

Lamarca, E. V. 2013. Soma térmica como condicionadora quantitativa da tolerância à dessecação e da germinação, na produção de sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente 98 p.

Lamarca, E. V., Prata, J.S., Borges, I.F., Delgado, L.F., Teixeira, C.C., Camargo, M.P.B., Faria, J.M.R., Barbedo, C.J. 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(1):223-233.

Leitão Filho, H.F. 1987. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. *Revista Scientia Florestalis* (Instituto de Pesquisas florestais) 35: 41-46.

Lorenzi, H. 1998. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum. 352 p.

Luzia, D.M.M., Bertanha, B.J., Jorge, N. 2010. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 69 (2): 175-80.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. *Crop Science* 2: 176-7.

Maluf, A.M.; Bília, D.A.; Barbedo, C.J. 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. *Scientia Agricola* 60 (3): 471-475 .

Martins, C.C., Bovi, M.L.A., Nakagawa, J., Machado, C.G. 2009. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. *Revista Árvore* 33: 635-642.

Mello, J.I.O., Barbedo, C.J., Salatino, A. & Figueiredo-Ribeiro, C.R.L. 2010. Reserve carbohydrates and lipids from seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(4): 889-899.

Mello, J.I.O., Centeno, D.C., Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. *Seed Science & Technology* 39: 465-480.

Obendorf, R.L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.

Pammenter, N.W. & Berjak, P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.

Paradiso, A., Pinto, M. C. de, Locato, V. & De Gara, L. 2012. Galactone-c-lactone-dependent ascorbate biosynthesis alters wheat kernel maturation. *Plant Biology* 14: 652–658.

Pedro Júnior, J.M., Camargo, M.B.P., Moraes, A.V.C., Felício, J.C.F. & Castro, J.L. 2004. Temperatura-base, graus-dia e duração do ciclo para cultivares de triticales. *Bragantia* 63: 447-453.

Pedro Júnior, M.J., Brunini, O., Alfonsi, R.R. & Angelocci, L.R. 1977. Estimativa de graus-dia em função de altitude e latitude para o estado de São Paulo. *Bragantia*, 36: 89-92.

Peixoto, A.L & Gentry, A. 1990. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 13 (1) 19-25.

Perez-Ramos, I. M., Ourciva, J. M. L, Limousin, J.M. & Rambal, S. 2010. Mast seeding under increasing drought: results from a long-term data set and from a rainfall exclusion experiment. *Ecology*, 91(10): 3057–3068.

Petek, M. R., Sera, T., Fonseca, I. C. de B. 2009. Exigências climáticas para o desenvolvimento e maturação dos frutos de cultivares de *Coffea arabica*. *Bragantia* 68(1): 169-181.

Pritchard, H.W., Steadman, K.J., Nash, J.V. & Jones, C. 1999. Kinetics of dormancy release and the high temperature germination response in *Aesculus hippocastanum* seeds. *Journal of Experimental Botany* 50: 1507 – 1514.

Ribeiro, R.V., Machado, E.C. & Brunini O. 2006. Ocorrência de condições ambientais para a indução do florescimento de laranjeiras no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28: 247-253.

Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L. & Fernie, A.R. 2001. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 13: 11-29.

Rolim, G.S., Camargo, M.B.P., Lania, D.G. & Moraes, J.F.L. 2007. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o estado de São Paulo. *Bragantia* 66: 711-720.

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.

Staggemeier, V. G., Diniz-Filho, J. A. F. & Morellato, L. P. C. 2010. The shared influence of phylogeny and ecology on the reproductive patterns of Myrteae (Myrtaceae). *Journal of Ecology* 98: 1409–1421.

Stanley, C.J., Tustin, D.S., Lupton, G.B., McCartney, S., Cashmore, W.M., De Silva, H.N. 2000. Towards understanding the role of temperature in apple fruit growth responses in three

geographical regions within New Zealand. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75: 413–422.

Tompsett, P.B. & Pritchard, H.W. 1993. Water status changes during development in relation to the germination and desiccation tolerance of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. *Annals of Botany* 71: 107–116.

Thorntwaite, C.W. & Mather, J.R. 1955. The water balance. New Jersey: Drexel Institute of Technology (Publications in Climatology) 104p.

Villa Nova, N.A., Pedro Júnior, M.J., Pereira, A.R. & Ometto, J.C. 1972. Estimativa de graus-dia acumulados acima de qualquer temperatura base em função das temperaturas máxima e mínima. *Caderno Ciência da Terra* 30: 89-92.

CAPÍTULO II

Metabolismo de sementes de *E. pyriformis* Cambess. desenvolvidas sob diferentes condições ambientais em resposta à perda de água

RESUMO

Sementes recalcitrantes representam um grande desafio àqueles que necessitam armazená-las com o propósito de conservação do germoplasma. Desta maneira, torna-se importante entender os mecanismos envolvidos na sensibilidade de sementes à dessecação. Considerando que condições ambientais podem afetar o período de desenvolvimento antes da dispersão das sementes, é plausível supor que a variabilidade na tolerância à dessecação não ocorra apenas entre espécies, mas também de forma intra-específica, em indivíduos de diferentes localidades. *Eugenia pyriformis* Cambess., espécie arbórea nativa do Brasil, apresenta sementes difíceis de serem armazenadas, devido à sensibilidade à dessecação e às baixas temperaturas. Nesse estudo avaliou-se as mudanças metabólicas relacionadas ao comportamento recalcitrante de sementes de *E. pyriformis* coletadas a partir de diferentes regiões, bem como a influência das condições hídricas e térmicas, durante a maturação. Para isso foram coletadas sementes de *E. pyriformis* nos municípios de Ribeirão Preto (SP), Lavras (MG), Campinas (SP), São Paulo (SP), Pariqueira-açu (SP) e Jumirim (SP). Os resultados demonstram variações no grau de tolerância à perda de água entre sementes de diferentes origens. A análise de perfil metabólico demonstrou haver o aumento de sacarose e polióis ao longo da secagem, sendo as sementes mais tolerantes à perda de água aquelas que apresentaram quantidades superiores desses açúcares protetores. Acredita-se que as sementes que toleraram mais a perda de água tenham avançado mais no período de maturação.

Palavras-chave: Myrtaceae, sementes, dessecação, perfil metabólico

ABSTRACT

Recalcitrant seeds represent a major challenge to those who need to store them for the purpose of germplasm conservation. Thus, it becomes important to understand the mechanisms involved in desiccation sensitivity in seeds. Whereas environmental conditions can affect the development period before seed dispersal, it is plausible to assume that the variability in desiccation tolerance occurs not only between species but also intra-specifically, between individuals from different locations. *Eugenia pyriformis* Cambess., native tree specie from Brazil, presents difficult seeds to be stored due to sensitivity to desiccation and low temperatures. In this study were analyzed the metabolic changes related to recalcitrant behavior of *E. pyriformis* seeds, from different regions as well as the influence of the hydric and thermal conditions during maturation.. *E. pyriformis* fruits were obtained after shedding in the cities of Ribeirão Preto (SP), Lavras (MG), Campinas (SP), São Paulo (SP), Pariqueraçu (SP) and Jumirim (SP). The results showed that seeds exhibited variations in the degree of desiccation tolerance according to their origin. The metabolic profile analysis revealed that there was an increase of sucrose and polyols during drying, being more tolerant to water loss those seeds, which showed higher amounts of protective sugars like sucrose and polyols. It is believed that seeds that tolerate more water loss have advanced more in the maturation period.

Keywords: Myrtaceae, seeds, desiccation, metabolic profile

INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento, sementes tolerantes a perda de água, também conhecidas como ortodoxas, devem passar por três fases: embriogênese, fase de síntese e acúmulo de compostos de reserva e, por último, a fase de desidratação, após o término do acúmulo de massa seca. A transição da segunda para a terceira fase normalmente coincide com a aquisição da tolerância à dessecação (Berjak & Pammenter, 2000; Daws *et al.*, 2004). Nas sementes recalcitrantes ou intolerantes a dessecação, evidências fisiológicas sugerem que a dispersão da semente ocorra antes que as mesmas completem a segunda fase. Desta forma, o peso seco da semente aumenta até o momento da abscisão do fruto (Berjak & Pammenter, 2000; Daws *et al.*, 2004). O nível de tolerância à dessecação aumenta nas sementes recalcitrantes durante a maturação, embora não atinja o mesmo patamar encontrado nas sementes ortodoxas (Berjak & Pammenter, 2000; Daws *et al.*, 2004).

Considerando que as condições ambientais podem afetar o período de desenvolvimento antes da dispersão das sementes, é plausível supor que sementes de uma espécie de determinada localidade podem ser dispersas mais ou menos desenvolvidas e, consequentemente, mais ou menos sensíveis (ou tolerantes) à dessecação, como constatado em sementes de *Aesculus hippocastanum* (Daws *et al.*, 2004) e sementes de *Camellia sinensis*, sendo estas últimas classificadas tanto como recalcitrantes (Berjak *et al.*, 1993) quanto tolerantes a dessecação (Ammann & Watanabe, 1985; Hu *et al.*, 1993), devido à procedência dos lotes de regiões distintas.

A aquisição da tolerância à dessecação em sementes envolve diversos mecanismos, dentre eles estão: características físicas intracelulares, desdiferenciação celular, presença de sistema antioxidante enzimático e não enzimático, acúmulo de moléculas protetoras, como proteínas dos tipos LEA (“late embryogenesis abundant proteins”) e HSP (“heat-shock proteins”), presença de moléculas anfipáticas e oleosinas, desligamento do metabolismo e presença de determinados açúcares (Pammenter & Berjak, 1999). Açúcares possuem papel fundamental na dessecação, pois atuam como solutos compatíveis durante a fase inicial de perda de água, através da estabilização de macromoléculas, mantendo a conformação e funcionalidade das membranas celulares (Castro & Hilhorst, 2004; Steadman *et al.*, 1996; Hoekstra *et al.*, 2001), além de também contribuírem para a formação do estado vítreo (Hoekstra *et al.*, 2001) e serem capazes de diminuir o efeito de espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Cumbes, 1989; Nishizawa *et al.*, 2008).

Sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. apresentam comportamento tipicamente recalcitrante, com perda da viabilidade ao atingir teor de água de 15% (Delgado & Barbedo, 2007) e perda da capacidade germinativa durante o armazenamento (Andrade & Ferreira, 2000). Lamarca *et al.* (2011) observaram ainda que em sementes desta espécie a variação na soma térmica durante o desenvolvimento altera o índice de velocidade de germinação, assim como o teor de água com que as sementes são dispersas, mostrando que fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento e tolerância à perda de água.

Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi analisar a contribuição das alterações metabólicas para a tolerância à perda de água de sementes em *E. pyriformis* Cambess., oriundas de diferentes localidades, e portanto, sob diferentes condições ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Material vegetal

Frutos de *E. pyriformis* Cambess. foram coletados nas regiões de Ribeirão Preto – SP (21° 12'S, 47° 48'O , 571 m), Lavras – MG (21°13'S, 44°59'O, 981 m), Campinas – SP (22°52'S, 47°04'O , 698 m), São Paulo – SP (23°39'S, 46°37'O, 792 m), Pariquera-Açu (24° 42' S, 47° 53' O, 28 m) – SP e Jumirim – SP (22° 05'S e 47° 47' O, 540 m) durante os meses de setembro e novembro de 2012 – (Mapa, Anexo 1). Os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica. As sementes foram extraídas manualmente e armazenadas em câmara fria a 7°C até o início dos experimentos, não excedendo sete dias (Barbedo *et al.*, 1998; Andrade & Ferreira, 2000).

Secagem

Sementes maduras foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar de forma intermitente, com 10 horas a 40°C seguidas de 14h de repouso (Delgado & Barbedo, 2007), reduzindo o teor de água inicial das sementes em intervalos gradativos de 10%, sendo S₀ – sementes sem secagem; S_I – sementes com teor de água reduzido para 50% (1,00 g g⁻¹); S_{II} – sementes com teor de água reduzido para 40% (0,67 g g⁻¹); S_{III} – sementes com teor de água reduzido para 30% (0,43 g g⁻¹). Após secagem as sementes foram submetidas aos mesmos testes realizados com sementes recém dispersas.

Análise do teor de água e conteúdo de massa seca

O teor de água e o conteúdo de massa seca das sementes foram determinados gravimetricamente, pelo método de estufa com circulação interna de ar, por 17 horas a 103 °C (ISTA, 2004). Foram utilizadas quatro repetições de cinco sementes cada.

Análise do potencial hídrico

O potencial hídrico das sementes foi medido utilizando-se quatro repetições de cinco sementes cada, cortadas ao meio e com tegumento. A aferição foi realizada em equipamento Decagon WP4 (USA) com base na temperatura do ponto de orvalho (Decagon Devices, 2001) (Delgado, 2006).

Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado em rolos de papel Germitest (Brasil, 2009), com quatro repetições de 15 sementes cada. Os testes de germinação foram realizados em sala de germinação, com temperatura controlada a 25 °C $\pm$ 1, com luz contínua e umidade relativa próxima a 100% (Delgado, 2006). As avaliações foram realizadas a cada cinco dias, durante 80 dias registrando-se o número de sementes que emitiram raiz primária (maior que 5 mm) e de plântulas com desenvolvimento normal da parte aérea e radicular (Lamarca *et al.*, 2011). Foi calculado o índice de velocidade de germinação através da fórmula de Maguire (1962).

Análise da atividade respiratória

O consumo de oxigênio (O₂) e a produção de dióxido de carbono (CO₂) foram determinados em analisador modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, EUA), utilizando-se quatro repetições de dez sementes cada, seguindo metodologia descrita por Lamarca e Barbedo (2012).

As taxas respiratórias das sementes foram estimadas em frascos de vidro (600 ml) hermeticamente fechados, com tampas perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha, por este septo foram inseridos os eletrodos do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem.

O fechamento das embalagens foi determinado como sendo o início do experimento, o

tempo zero correspondendo a atmosfera normal (21% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). O consumo de O₂ e a produção de CO₂ pelas sementes embaladas foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens eram abertas por alguns minutos para re-equilíbrio com a atmosfera normal sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando e a pressão atmosférica local como 0,90 atm os valores obtidos em porcentagem de O₂ ou de CO₂ foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P = v_1\%/V\%$ (Feltre, 1985), onde:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (=0,90 atm);

$v_1\%$ = volume do gás, em porcentagem;

$V\%$ = volume total (=100%).

A seguir, baseando-se no volume das embalagens e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para μmol de O₂ e de CO₂, pela equação de Clapeyron, $p_1V = nRT$, onde:

V = volume total de ar do frasco (em L)

n = número de moles do gás

R = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm L mol⁻¹ K⁻¹)

T = temperatura (em Kelvin)

Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra de sementes e pelo número de dias em que as sementes permaneceram nas embalagens, obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ($\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{ d}^{-1}$). O quociente respiratório (QR), foi calculado dividindo-se o valor obtido para produção de CO₂ pelo obtido para consumo de O₂ ($\text{QR} = \text{CO}_2/\text{O}_2^{-1}$), ambos em $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{ d}^{-1}$, segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Análises bioquímicas

Extração de açúcares solúveis

A extração de açúcares solúveis foi realizada com três repetições de dez sementes cada, utilizando-se 100 mg de material. A este material foi acrescentado 1 mL de etanol 80%, em seguida as amostras foram incubadas à 80°C por 15 min. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1000 *g*. O sobrenadante foi recolhido e reservado e 3

novas extrações foram realizadas em etanol 80% com o resíduo, seguindo o procedimento recém descrito. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de açúcares solúveis totais (Dubois *et al.*, 1956) e os resíduos das amostras foram lavados com água, congelados, liofilizados e armazenados para posterior dosagem de amido.

Dosagem de açúcares solúveis

Após extração de açúcares solúveis, os sobrenadantes das amostras tiveram seu volume igualado e foram, então, utilizados para a quantificação dos açúcares através do método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), sendo utilizada uma solução de glucose ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 490 nm, em triplicatas para cada amostra. Após a quantificação dos açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico, separaram-se 1 mL das amostras e estas foram então deionizadas em colunas contendo resinas de troca catiônica e aniônica Dowex, sendo eluídas com 10 volumes de água deionizada. O material eluído teve seu pH neutralizado com hidróxido de amônio. Os eluatos foram concentrados até secagem completa e retomados em 1 mL de água deionizada, sendo novamente quantificados e um volume contendo $300 \mu\text{g}$ de açúcar, de cada repetição, foi analisado em sistema HPAEC/PAD (Dionex ICS-3000, EUA) composto por coluna CarboPac PA-1 (2 x 250 mm - Dionex, EUA) utilizando-se um gradiente de 150 mM de hidróxido de sódio (eluente B) e água (eluente A), de acordo com a seguinte programação: 0-25 min, 66,7% eluente B; 25-30 min, 100% eluente B; 30-35 min, 66,7% eluente B, com taxa de fluxo de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. Os açúcares foram identificados através de comparação com padrões autênticos (Sigma-Aldrich Co., EUA).

Dosagem de amido

A dosagem de amido foi realizada através de digestão enzimática, utilizando alíquotas de 10 mg de cada resíduo liofilizado após extração com etanol 80%, seguindo protocolo descrito por Amaral *et al.* (2007). Ao material liofilizado foi adicionada solução contendo 120 unidades mL de α -amilase (Megazyme) diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. As amostras foram incubadas a 75 °C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez. As amostras foram resfriadas até 50 °C e foi adicionado 0,5 mL de solução contendo 30 unidades mL de amiloglucosidase (Megazyme) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. As amostras foram incubadas a 50 °C por 30 min, sendo o procedimento novamente repetido. Após as incubações, foram acrescentados 100 μL de ácido perclórico 0,8 M para o término da

reação e precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas e os extratos foram dosados através de quantificação da glicose liberada no processo de hidrólise. Para tal foram retiradas alíquotas de extrato, às quais foi adicionado o Reagente Glicose PAP Liquiform (Labtest), contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase além dos reagentes 4-aminoantipirina e fenol. Após incubação por 15 min a 37°C, o teor de glicose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA em comprimento de onda de 490 nm. A curva padrão foi construída a partir de quantidades crescentes de glicose na concentração de 1mg mL⁻¹.

Análise do perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS) seguindo método de Roessner *et al.* (2001), modificado, utilizando-se seis repetições de dez sementes cada. Amostras de sementes de *E. pyriiformis* coletadas em diferentes localidades foram congeladas, pulverizadas em nitrogênio líquido e extraídas em solução metanol:clorofórmio:água, na proporção de 12:5:1, com adição de padrão interno (0,2 mg mL⁻¹ adonitol em água) para auxiliar as normalizações durante a quantificação. A mistura foi incubada a 60°C por 30 min sob agitação e centrifugada a 13.000 rpm por 5 min. A fase polar foi submetida à secagem e derivatizada com 150 µL de piridina, 50 µL de *N,O*-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de cloridrato de metoxilamina (0,2 mg mL⁻¹ piridina) sob agitação durante 1 h a 75°C. Amostras foram injetadas automaticamente em um sistema GC/MS (Agilent GC 6890 e MSD 5973N series, Agilent Technologies, EUA). Foi utilizada coluna HP-5 MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de espessura x 0,25 µm de filme - Supelco, EUA). A temperatura de injeção foi ajustada para 230°C, a interface em 250°C, e a fonte de íons ajustada em 150°C. O gás hélio foi utilizado como carreador com fluxo de 1 mL min⁻¹. As análises foram realizadas de acordo com a seguinte programação: 5 min de aquecimento isotérmico a 70°C, seguido por um aquecimento com taxa de 5°C min⁻¹ até atingir 280°C, e ao final 1 minuto de aquecimento a 280°C. Os espectros de massa foram registrados na faixa de 50-600 m/z. Os cromatogramas e os dados de espectrometria de massa foram avaliados utilizando o programa Chemstation (Agilent Technologies, EUA). Os picos foram identificados e comparados com padrões autênticos, com a NIST 08 Mass Spectral Library (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia) e com o banco de dados Golm Metabolome Database - GMD (Hummel *et al.*, 2010).

Obtenção dos dados

A caracterização climatológica regional (temperaturas máxima e mínima – diária e precipitação - diária) foi obtida através de dados das estações meteorológicas, do Instituto Agrônomo de Campinas (CIIAGRO), Campinas- SP, Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, São Paulo- SP, Estação Meteorológica de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto – SP e do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Lavras – MG

Soma térmica

A soma térmica foi calculada desde a antese até a dispersão natural das sementes. Inicialmente inflorescências no período de máximo florescimento da espécie foram marcadas. Os frutos e sementes foram colhidos imediatamente após a dispersão, ao apresentarem coloração característica para a espécie (Lamarca, *et al.*, 2011).

O somatório de graus-dia (GD) foi realizado desde a antese até a coleta, segundo as seguintes equações, propostas por Villa Nova *et al.* (1972):

$$GD = (T_m - T_b) + (T_M - T_m)/2, \text{ para } T_m > T_b;$$

$$GD = (T_M - T_b)^2 / 2(T_M - T_m), \text{ para } T_m < T_b \text{ e}$$

$$GD = 0, \text{ para } T_b > T_M.$$

Em que:

GD = graus-dia (°C d);

T_M = temperatura máxima diária (°C);

T_m = temperatura mínima diária (°C) e

T_b = temperatura base (°C).

Os graus-dia acumulados foram calculados considerando-se a temperatura base de 10 °C, conforme descrito em Pedro Júnior (1977). Foram calculados ainda o balanço hídrico sequencial, segundo o modelo proposto por Thornthwaite & Mather (1955), em nível de escala decendial, com capacidade de água disponível (CAD) de 125 mm (Rolim *et al.*, 2007).

Forma de análise dos resultados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias em esquema fatorial (Tukey), com nível de significância de 5%, através do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando-se o software PAST (Hammer *et al.*, 2001), sendo incluídos na análise apenas os compostos presentes em todos os tratamentos. Foi realizada análise de correlação (variável X variável) pelo teste de Pearson com nível de significância de 5%, sendo excluídas variáveis com alta correlação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A soma térmica pode influenciar na maturação de sementes, propiciando o acúmulo de matéria seca (Daws *et al.*, 2004, 2006; Lamarca *et al.*, 2011), no entanto, no presente estudo, sementes recém dispersas provenientes de Ribeirão Preto e Campinas, cuja soma térmica ao longo da maturação foi superior às demais (530 GD e 502 GD, respectivamente) (Tabela 1), apresentaram teor de água e massa seca similares entre si, porém ao contrário do esperado as sementes foram dispersas com baixa massa seca (Tabela 2).

De acordo com Lamarca e colaboradores (2011) a amplitude térmica com que sementes de *E. pyrifomis* são formadas pode influenciar no acúmulo de material de reserva, ocorrendo o máximo de acúmulo quando a amplitude térmica diária, durante o período de maturação, é superior a 12°C. Entretanto sementes oriundas de Ribeirão Preto e Campinas, cuja massa seca das sementes recém dispersas foi significativamente menor que as demais, apresentaram frequência de distribuição da amplitude térmica durante o período de formação das sementes (Figura 3, Cap. 1) similar à região de Lavras.

Inicialmente não foram observadas diferenças significativas na germinação e formação de plântulas normais em sementes de *E. pyrifomis* coletadas em diferentes locais, recém dispersas e com teor de umidade reduzido ao primeiro nível de secagem S_I (50%) (Tabela 3). No entanto, quando secas até o segundo nível de secagem S_{II} (40%) todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas para germinação, plântulas normais e IVG. Além disso, sementes de São Paulo e Campinas diferiram significativamente dos demais locais e apresentaram as maiores reduções nos valores de germinação respectivamente 69% e 56% e plântulas normais 73% e 64% (Tabela 3). O índice de velocidade de germinação destes

tratamentos também foi o mais afetado, com diminuição expressiva entre sementes recém-dispersas e com teor de água reduzido para 40% (Tabela 3).

Sementes oriundas de Lavras, submetidas ao tratamento S_{III}, apresentaram as maiores taxas de germinação (58%), plântulas normais (40%) e IVG (0,98), não diferindo estatisticamente do tratamento S_{II} (Tabela 3).

Desta forma, esses resultados sugerem que as sementes coletadas em São Paulo e Campinas, dentre os locais estudados, sejam as mais sensíveis à perda de água, ao passo que sementes provenientes de Lavras mostraram-se mais tolerantes. Em estudo desenvolvido por Lamarca *et al.*, (2011) sementes de *E. pyrifomis* coletadas em Lavras, cujas quantidades de graus-dia durante o desenvolvimento e a maturação foram maiores, apresentaram melhor desempenho germinativo, fora da faixa térmica ótima, em relação às sementes coletadas em Campinas e São Paulo.

Entretanto, observa-se, para as regiões de Campinas e São Paulo que apesar dos valores do somatório de graus-dia não serem os mais baixos registrados entre todas as regiões, e apresentarem os maiores ciclos de maturação, a chuva acumulada no período de desenvolvimento foram os menores valores observados, 24 e 18,2 mm, respectivamente (Tabela 1).

Além disso, as sementes provenientes de Ribeirão Preto, cujo somatório de GD foi superior, apresentaram comportamento similar aos demais tratamentos, quando submetida ao primeiro nível de secagem (S_I) no que se refere à germinação e plântulas normais. No entanto, o índice de velocidade de germinação foi estatisticamente maior, permanecendo superior, juntamente com as sementes coletadas em Lavras, quando submetidas ao último nível de secagem (S_{III}), sugerindo que o somatório de graus-dia influencia na qualidade das sementes. A disponibilidade hídrica parece ser também um fator condicionante na maturação de sementes de *E. pyrifomis* (Tabelas 1 e 3), tendo em vista que apesar de apresentar o maior valor de chuva acumulada, somatório de GD e amplitude térmica concentrada acima de 12°C, as sementes oriundas de Ribeirão Preto não foram as mais tolerantes a perda de água. Entretanto, dentre todas as regiões de coleta, esta foi a única cujas sementes não receberam chuva ao final do período de maturação (Figura 2, Cap. 1).

Lamarca e colaboradores (2013) observaram que em anos de maior déficit hídrico, o período de maturação das sementes de *E. pyrifomis* foi mais curto e com um menor somatório de GD. No entanto, as sementes foram dispersas aparentemente mais maduras. No presente estudo, as sementes oriundas das seis regiões tiveram sua maturação em período de

déficit hídrico, como demonstrado pelo balanço hídrico sequencial apresentado no Capítulo 1 (Figura 1, Cap. 1). No entanto observa-se que a região de Lavras sofreu um maior período de seca, com excedente apenas no início do ano e final do mês de abril, reiterando a influência do balanço hídrico na maturação de sementes de *E. pyrifomis*.

A análise de potencial hídrico (Tabela 2), que representa a energia livre da água, não demonstrou interação fatorial (local de origem das sementes X nível de secagem). As sementes foram dispersas com aproximadamente -1,79 MPa. De acordo com a classificação proposta por Vertucci & Farrant (1995), este valor corresponde à água do tipo 5, considerada água livre, cuja ocorrência é observada em potenciais hídricos acima de -2MPa.

A água do tipo 4 encontra-se entre -2MPa e -4MPa, ocupando poros e capilares e não interagindo com a superfície das proteínas, valor não observado nos tratamentos de secagem aplicados à sementes de *E. pyrifomis*, a água do tipo 3 é observada entre -4MPa e -11MPa e forma pontes com sítios hidrofóbicos de macromoléculas, valores observados para os níveis S_I e S_{II} de secagem, já o tratamento S_{III} correspondeu a água do tipo 2, entre -12 MPa e -150 MPa, que tem características do estado vítreo e interage com sítios hidrofílicos das macromoléculas. No entanto, destaca-se que espécies intolerantes à dessecação podem não apresentar carboidratos em qualidade e/ou quantidade suficiente para atingir o estado vítreo. O último tipo de água, do tipo 1, corresponde à água ligada quimicamente por grupos iônicos ocorrendo abaixo de -150 MPa, não observado nos tratamentos de secagem.

Tabela 1: Origem das sementes de *Eugenia pyrifomis*. Período de maturação, classificação climática das regiões (Köppen) e dados meteorológicos, compreendidos entre o florescimento e dispersão das sementes (média da temperatura mínima e máxima do ar, graus-dia e chuva acumulada).

Região e época de coleta	Período de maturação	Min e Máx (°C)	Graus-dia (°C d)	Chuva (mm)
Ribeirão Preto 21°10'S, 47°52'O e 593 m - Cwa	01/09/12 - 08/10/12 = 38	16-32	530	73,1
Campinas 22°52'S, 47°04'O e 645 m - Cwa	17/08/12 - 26/09/12 = 41	15-29	502	24
Lavras 21°13'S, 44°58'O e 949 m - Cwa	15/09/12 - 23/10/12 = 39	15-28	459	53,5
São Paulo 23°38'S, 46°37'O e 785 m - Cwb	14/08/12 - 25/09/12 = 43	14-27	455	18,2
Pariquera-açu 24°37'S, 47°53'O e 28 m - Af	10/09/12 - 17/10/12 = 38	16-26	420	51
Jumirim 22°05'S, 47°47'O e 540 m - Cwa	25/08/12 - 26/09/12 = 33	13-31	395	39

Tabela 2. Parâmetros fisiológicos de sementes de *Eugenia pyriformis* de origens distintas, submetidas à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Valores representam média ± desvio padrão de quatro repetições biológicas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%. Letra maiúscula compara a origem do material e minúscula compara níveis de secagem.

	S ₀			S _I			S _{II}			S _{III}			Média				
Teor de água g g⁻¹																	
Ribeirão Preto	1,21	±	0,04	Ca	1,05	±	0,06	Aa	0,73	±	0,05	Ab	0,54	±	0,11	Ac	-
Campinas	1,23	±	0,17	Ca	0,98	±	0,02	Ab	0,68	±	0,09	Ac	0,43	±	0,01	Bd	-
Lavras	1,37	±	0,12	BCa	0,98	±	0,05	Ab	0,65	±	0,04	Ac	0,41	±	0,04	Bd	-
São Paulo	1,79	±	0,05	Aa	0,99	±	0,04	Ab	0,77	±	0,03	Ac	0,35	±	0,07	Bd	-
Pariquera açú	1,52	±	0,12	ABa	0,93	±	0,06	Ab	0,74	±	0,06	Ac	0,57	±	0,07	Ad	-
Jumirim	1,32	±	0,09	BCa	0,97	±	0,05	Ab	0,68	±	0,03	Ac	0,42	±	0,05	Bd	-
Massa fresca g⁻¹																	
Ribeirão Preto	0,74	±	0,13	Da	0,86	±	0,05	BCab	0,67	±	0,06	Cb	0,67	±	0,10	ABb	-
Campinas	0,85	±	0,13	CDa	0,98	±	0,10	Ba	0,45	±	0,04	Db	0,48	±	0,08	Cb	-
Lavras	1,28	±	0,07	Ba	1,16	±	0,05	Aa	0,92	±	0,11	Bb	0,78	±	0,11	Ab	-
São Paulo	1,58	±	0,14	Aa	1,19	±	0,13	Ab	1,11	±	0,07	Ab	0,65	±	0,05	ABCc	-
Pariquera açú	1,32	±	0,08	Ba	0,85	±	0,05	BCb	0,57	±	0,04	CDc	0,52	±	0,05	BCc	-
Jumirim	1,02	±	0,12	Ca	0,71	±	0,04	Cb	0,59	±	0,04	CDbc	0,52	±	0,07	BCc	-
Massa seca g⁻¹																	
Ribeirão Preto	0,34	±	0,06	Db	0,42	±	0,023	CDab	0,39	±	0,04	Bab	0,43	±	0,04	BCb	-
Campinas	0,38	±	0,07	CDb	0,49	±	0,053	BCa	0,27	±	0,01	Cc	0,33	±	0,05	CDbc	-
Lavras	0,54	±	0,05	Aa	0,59	±	0,013	ABa	0,56	±	0,06	Aa	0,55	±	0,07	Aa	-
São Paulo	0,57	±	0,06	Aab	0,60	±	0,056	Ab	0,63	±	0,03	Aa	0,48	±	0,04	ABa	-
Pariquera açú	0,52	±	0,04	ABa	0,44	±	0,019	CDab	0,33	±	0,02	Bbc	0,33	±	0,03	Dc	-
Jumirim	0,44	±	0,06	BCa	0,36	±	0,024	Ca	0,35	±	0,02	BCa	0,36	±	0,04	CDa	-
Potencial hídrico (-MPa)																	
Ribeirão Preto	-1,62	±	0,11		-4,63	±	0,50		-7,42	±	1,09		-12,79	±	3,72		-6, 61 a
Campinas	-1,95	±	0,10		-4,61	±	0,36		-8,84	±	1,56		-14,48	±	3,73		-7, 47 ab
Lavras	-1,66	±	0,07		-5,77	±	0,46		-9,61	±	1,00		-14,50	±	1,30		-7,87 ab
São Paulo	-1,85	±	0,17		-4,37	±	0,34		-7,21	±	0,73		-16,33	±	1,21		-7, 44 ab
Pariquera açú	-2,02	±	0,16		-7,13	±	0,78		-9,63	±	1,85		-14,68	±	1,66		-8,36 b
Jumirim	-1,67	±	0,13		-5,32	±	0,31		-8,57	±	0,84		-14,67	±	2,79		-7, 55 ab
Média	-1, 79 A				-5,30 B				-8, 54 C				-14, 57 D				

Tabela 3. Parâmetros fisiológicos de sementes de *Eugenia pyriformis* de origens distintas, submetidas à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Valores representam média ± desvio padrão de quatro repetições biológicas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%. Letra maiúscula compara origem do material e minúscula compara níveis de secagem.

	S ₀		S _I		S _{II}		S _{III}		Média	
Germinação (%)										
Ribeirão Preto	100 ± 0,00	Aa	98 ± 3,33	Aab	83 ± 3,85	Ab	38 ± 10,00	BCc	-	
Campinas	100 ± 0,00	Aa	98 ± 3,85	Aa	44 ± 3,85	Bb	22 ± 15,40	BCc	-	
Lavras	98 ± 3,33	Aa	97 ± 3,85	Aa	73 ± 14,40	Ab	58 ± 18,36	Ab	-	
São Paulo	98 ± 3,33	Aa	92 ± 6,38	Aa	30 ± 12,77	Bb	10 ± 6,67	Cc	-	
Pariquera açú	97 ± 5,77	Aa	93 ± 5,77	Aab	80 ± 0,00	Ab	20 ± 28,28	Cc	-	
Jumirim	96 ± 7,70	Aa	100 ± 0,00	Aa	78 ± 15,40	Ab	18 ± 13,88	Cc	-	
Plântulas normais (%)										
Ribeirão Preto	78 ± 10,00	Aa	83 ± 12,77	Aa	53 ± 10,89	ABb	20 ± 5,44	ABc	-	
Campinas	87 ± 13,33	Aa	78 ± 13,88	Aa	22 ± 7,70	Cb	16 ± 10,18	Bb	-	
Lavras	92 ± 6,38	Aa	93 ± 5,44	Aa	38 ± 22,03	BCb	40 ± 18,05	Ab	-	
São Paulo	97 ± 3,85	Aa	88 ± 3,33	Aa	23 ± 8,61	Cb	10 ± 4,71	Bb	-	
Pariquera açú	87 ± 15,28	Aa	73 ± 11,55	Aa	47 ± 15,28	ABb	10 ± 14,14	Bc	-	
Jumirim	93 ± 6,67	Aa	91 ± 7,70	Aa	60 ± 11,55	Ab	11 ± 13,88	Bc	-	
IVG										
Ribeirão Preto	3,44 ± 0,09	Aa	2,92 ± 0,18	Ab	1,28 ± 0,23	Ac	0,58 ± 0,09	Abd	-	
Campinas	3,41 ± 0,33	Aa	2,18 ± 0,28	Bb	0,48 ± 0,05	CDc	0,27 ± 0,16	BCc	-	
Lavras	3,20 ± 0,29	Aa	1,69 ± 0,11	Cb	1,19 ± 0,27	Abc	0,98 ± 0,26	Ac	-	
São Paulo	3,51 ± 0,27	Aa	2,50 ± 0,33	Bb	0,35 ± 0,15	Dc	0,12 ± 0,07	Cc	-	
Pariquera açú	2,06 ± 0,16	Ba	1,11 ± 0,17	Db	0,80 ± 0,03	BCb	0,18 ± 0,25	Cd	-	
Jumirim	3,18 ± 0,06	Aa	2,50 ± 0,25	Bb	1,23 ± 0,39	Ac	0,25 ± 0,24	BCd	-	

Sementes ortodoxas, quando secas, apresentam diminuição das taxas respiratórias (Hell *et al.*, em preparo para publicação), no entanto *E. pyriformis* é classificada como intolerante à dessecação e, portanto, este comportamento não pode ser extrapolado para esta espécie. De maneira geral, foi observada a diminuição das taxas respiratórias entre os tratamentos S_0 e S_I , seguidos pela tendência de aumento da atividade respiratória entre os tratamentos de secagem S_I e S_{II} (Figura 1), que foi significativo para sementes provenientes de Lavras, São Paulo e Jumirim. Esta informação, somada aos demais resultados fisiológicos, sugere que o maior nível de estresse seja induzido em teores de água próximos à 40%.

Os resultados da análise de açúcar total indicam o aumento de açúcar solúvel durante a secagem (Figura 2), como observado em folhas de *Trifolium repens* L. sob estresse hídrico, cujo acúmulo de carboidratos solúveis durante o déficit hídrico foi causado principalmente pela hidrólise de amido armazenado e não por novas sínteses (Lee *et al.*, 2008). Além disso, Kuo *et al.*, (1988) sugeriram que o aumento de açúcares totais durante o armazenamento em câmara fria é resultado da hidrólise de polissacarídeos de reserva, como o amido, devido à atividade metabólica, contribuindo para a conservação da viabilidade das sementes. Em sementes de *E. uniflora* foi observada a diminuição significativa de amido e aumento de açúcares solúveis ao longo da secagem (Mello, 2008), no entanto, no presente estudo com exceção das sementes provenientes de São Paulo, não foi observada a diminuição da concentração de amido durante a secagem de sementes de *E. pyriformis* oriundas de diferentes regiões (Figura 2).

Quando comparada a quantidade de açúcar solúvel entre as sementes de diferentes localidades, observa-se que sementes recém-dispersas de todas as regiões apresentaram quantidade similar de açúcar solúvel total (Figura 2). No entanto, ao serem submetidas ao primeiro tratamento de secagem ocorreram mudanças na quantidade de açúcar solúvel. As sementes de Jumirim apresentaram a maior quantidade de açúcar solúvel e sementes provenientes de Ribeirão Preto a menor. Quando submetidas ao segundo nível de secagem, correspondente à 40% de água (quando ocorrem as maiores diferenças nos valores de germinação, plântulas normais e IVG) observa-se que as sementes de São Paulo e Campinas, que são aquelas com maior sensibilidade à perda de água, apresentam as menores concentrações de açúcar solúvel total (Figura 2).

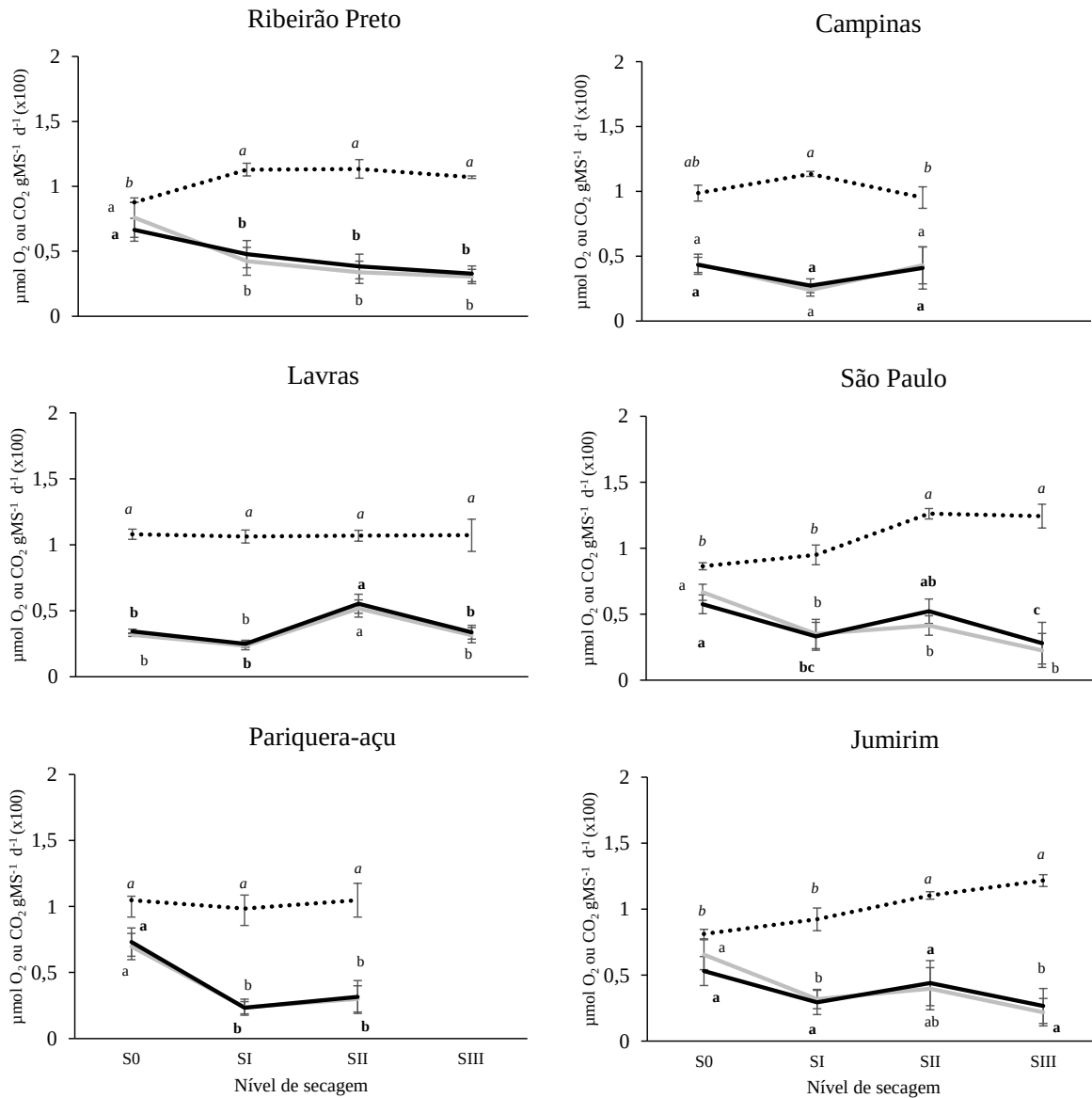


Figura 1. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia pyriformis* de origens distintas, submetidas à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} – terceiro nível de secagem. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de quatro repetições biológicas. Valores expressos em: Respiração ($\mu\text{mol O}_2$ ou $\text{CO}_2 \text{ gMS}^{-1} \text{ d}^{-1} (\times 100)$). O₂ – consumo de oxigênio – linha cinza; CO₂ – produção de gás carbônico – linha preta; QR – quociente respiratório – linha pontilhada. Letras comparam níveis de secagem dentro de cada local. Regiões de Campinas e Pariquera-açu não apresentam o último nível de secagem devido a quantidade insuficiente de sementes produzidas.

A análise da composição de açúcares por HPAEC/PAD, demonstrou que sementes provenientes de Campinas (Figura 3), apresentaram a menor quantidade de sacarose em relação às sementes das demais regiões. Além disso, não ocorreu o aumento significativo deste carboidrato ao longo da secagem, como observado nos demais tratamentos. Houve,

ainda, apenas o incremento de glucose quando realizada a secagem S_{II} (40%), sendo observada também a diminuição de rafinose ao longo da secagem. As sementes oriundas de São Paulo apresentaram o aumento de sacarose, quando submetidas aos tratamentos S_{II} (40%) e S_{III} (30%), glucose e frutose aumentaram no último nível de secagem S_{III} (30%) e foi observada diminuição de rafinose a partir do segundo nível de secagem (S_{II}).

Em contrapartida, as sementes provenientes de Lavras, que se mostraram mais tolerantes à perda de água, apresentaram aumento significativo de sacarose, glucose e frutose, até o segundo nível de secagem (S_{II}) e a concentração de rafinose ficou inalterada (Figura 3).

Além disso, sementes provenientes de Lavras apresentaram concentrações mais altas de carboidratos solúveis. Houve um incremento de sacarose de 35,81 para 102,09 mg g⁻¹ MS ao final da secagem e glucose de 11,81 a 47,86 mg g⁻¹ MS, enquanto que as sementes provenientes de Campinas apresentaram quantidade significativamente menor, com aumento de sacarose de 21,5 para 35,12 mg g⁻¹ MS ao longo da secagem, e glucose de 6,98 para 15,88 mg g⁻¹ MS (Figura 3).

A sacarose teria o papel de impedir a aproximação das proteínas de membranas umas às outras, substituindo fisicamente a água quando esta é removida na secagem e, dessa forma, prevenindo sua proximidade lateral (Hoekstra *et al.*, 2001), que promoveria mudanças nos fosfolípidos e em alguns componentes da membrana que são acompanhadas pela exclusão de proteínas integrais (Bryant *et al.*, 2001; Koster & Bryant, 2005; Halperin & Koster, 2006), desta maneira, protegendo os tecidos vegetais, o que pode ter contribuído para a maior tolerância a perda de água das sementes oriundas de Lavras.

Além da sacarose, os oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) parecem também contribuir para a tolerância a dessecação, uma vez que são acumulados durante a maturação, na fase de secagem em sementes tolerantes a dessecação (Steadman *et al.*, 1996; Obendorf, 1997; Hoekstra *et al.*, 2001; Buitink *et al.*, 2003; Leduc *et al.*, 2012). No entanto, observa-se que sementes de *E. pyrifomis*, possuem independente da origem do material, baixa quantidade de rafinose (Figura 3). Porém, as sementes mais sensíveis a dessecação, provenientes de Campinas e São Paulo, apresentam maiores proporções deste carboidrato em relação às sementes oriundas de Lavras, cuja tolerância a perda de água foi superior às demais, sugerindo que a rafinose, em sementes de *E. pyrifomis* não tenha papel crucial na proteção contra a dessecação.

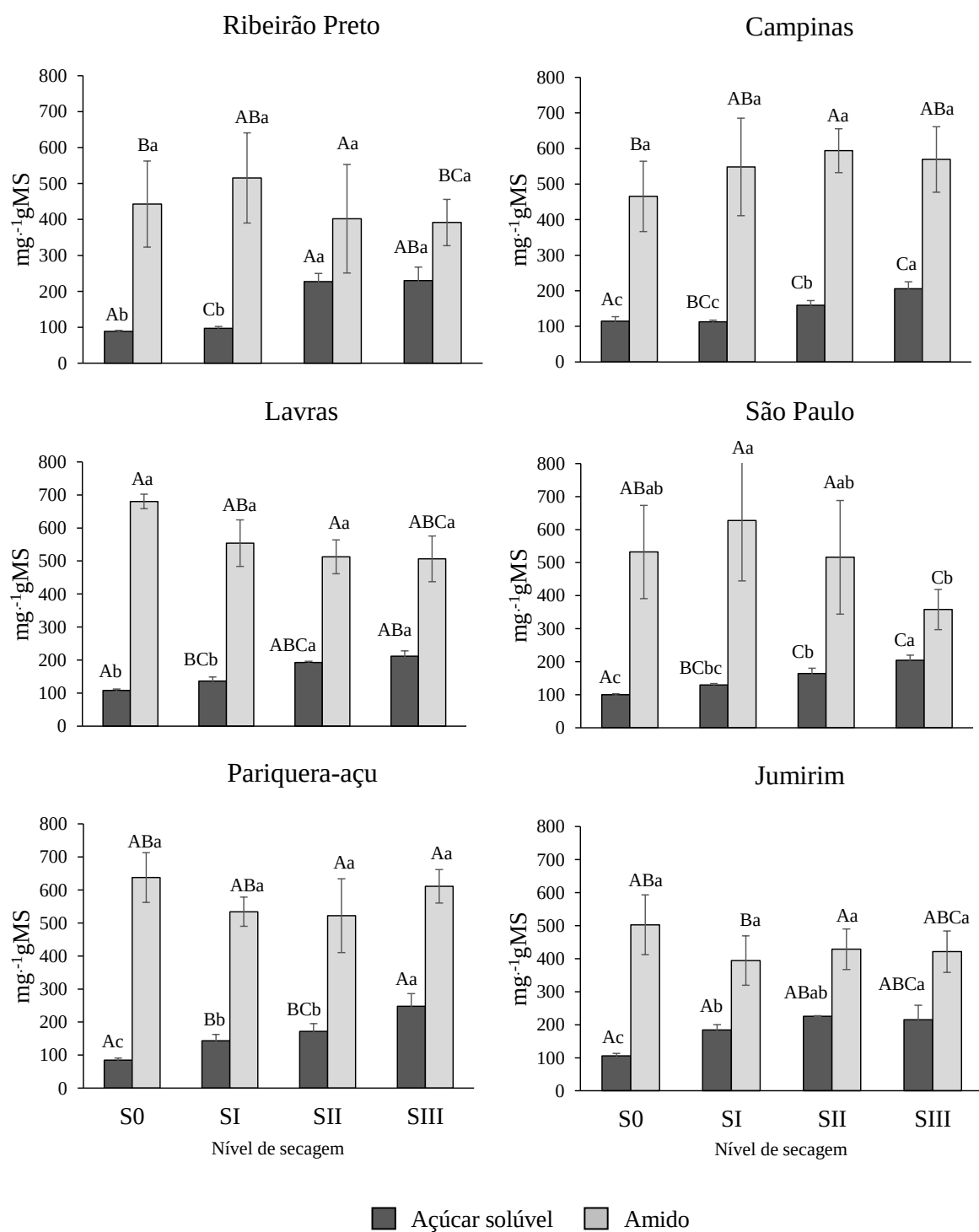


Figura 2. Teor de carboidratos solúveis e amido (mg g⁻¹ MS) de sementes de *Eugenia pyriformis* de origens distintas, submetidas à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Valores representam média ± desvio padrão de quatro repetições biológicas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%. Letra maiúscula compara origem do material e minúscula compara níveis de secagem.

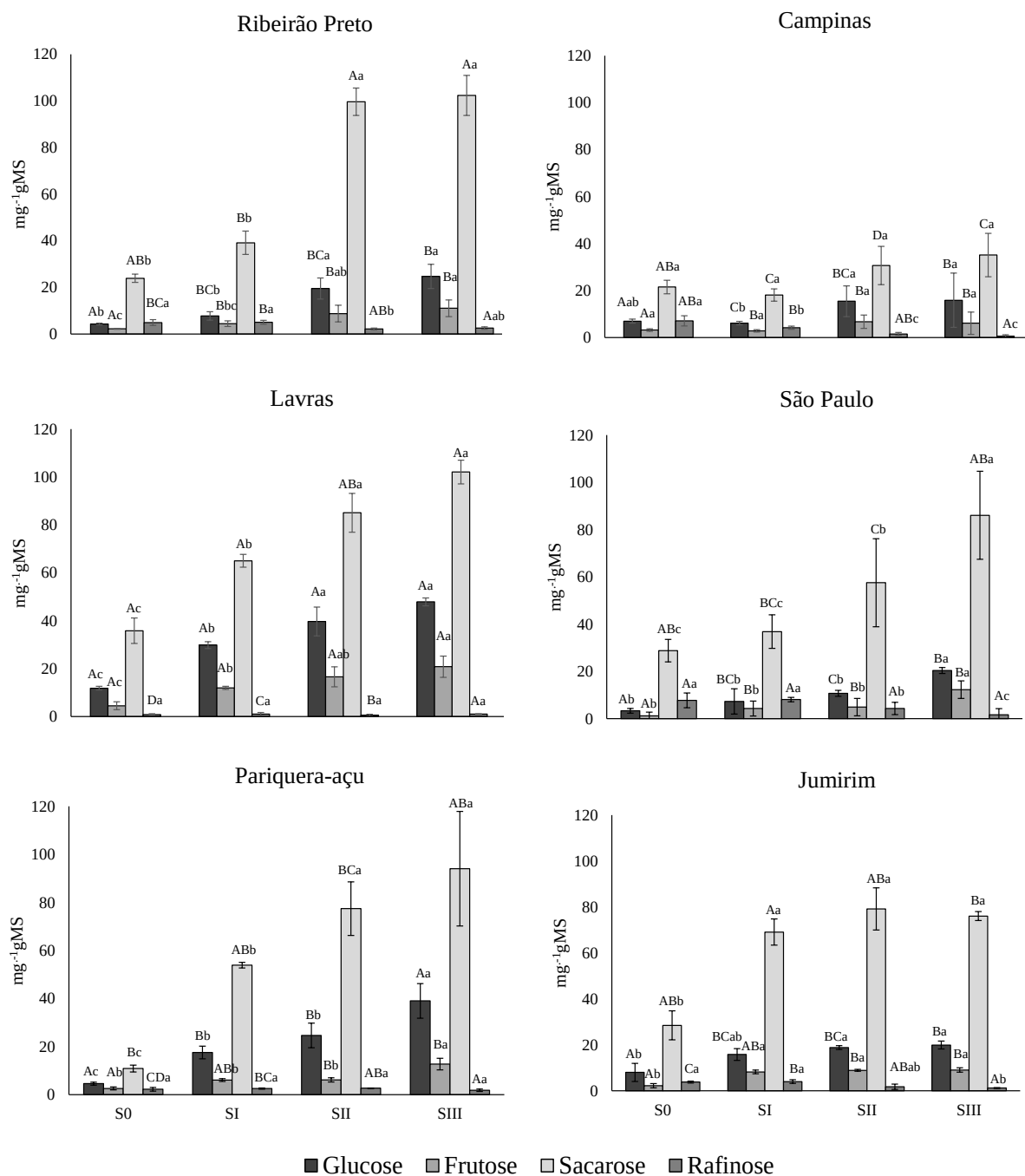


Figura 3. Conteúdo de glucose, frutose, sacarose e rafinose (mg^{-1}gMS) em embriões de *Eugenia pyrifomis* de origens distintas, submetidas à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Compostos foram quantificados por HPAEC/PAD. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%. Letra maiúscula compara origem do material e minúscula compara níveis de secagem.

Análise de perfil metabólico

A análise de perfil metabólico demonstrou o padrão de aumento em determinados compostos ao longo da secagem. Independente da região de origem das sementes observa-se a tendência de aumento de galactose, galactitol, manitol, pinitol (Figuras 4A, B, C, D, E, F). No entanto, observa-se que sementes oriundas de Lavras, Pariqueira-açu e Jumirim (4C, E e F) o aumento desses compostos se dá principalmente entre os dois primeiros tratamentos (S_0 e S_I), ao passo que em sementes provenientes de Ribeirão Preto, Campinas e São Paulo (4A, B e B) o aumento desses compostos ocorreu entre os dois primeiros níveis de secagem (S_I e S_{II}), sugerindo metabolismo diferenciado, independente do teor de água e potencial hídrico, evidenciando a importância do estágio de maturidade fisiológica com que as sementes são dispersas (Barbedo *et al.*, 2013).

Foi observada a tendência de diminuição de ácido ascórbico, em especial entre os tratamentos S_{II} e S_{III} (Figuras 4A, B, C, D, E, F). No entanto, não foi observado o aumento de ácido treônico, produto da degradação do ácido ascórbico. Sua presença pode indicar um estresse oxidativo, uma vez que o ácido L-ascórbico é oxidado a ácido L-deidroascórbico para formar um sistema redox, que pode ser oxidado irreversivelmente ao ácido 2,3-dicetogulônico com perda da atividade redutora, podendo ser então convertido em ácido oxálico e ácido L-treônico (Tavares *et al.*, 2010).

Foi observada também a presença de treitol e eritritol, mas sem padrão de comportamento aparente. Ambos são açúcares álcoois, cuja biossíntese ainda não está completamente elucidada, no entanto sua presença tem sido descrita para organismos tolerantes a dessecação, como *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.*, 2011) e a baixas temperaturas (-60 °C), como o besouro do alasca (Walter *et al.*, 2009).

Outros polióis, como manitol e xilitol, também foram observados em sementes de *E. pyrifomis*. O manitol tem um importante papel como osmólito e soluto compatível, protegendo contra o estresse salino e atuando na osmorregulação (Stoop, 1996), além disso, atua na tolerância à seca, uma vez que tem a capacidade de diminuir os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Cumbes, 1989). Dessa maneira, a tendência de aumento deste composto, juntamente com demais polióis, ao longo dos tratamentos de secagem, pode indicar uma estratégia de proteção contra o estresse oxidativo.

O xilitol, por sua vez, além de atuar como os demais polióis na proteção contra seca, como visto, por exemplo em plantas de *Selaginella lepidophylla* (Yobi *et al.*, 2011), é o precursor de hemicelulose xilana, componente da parede celular, que desempenha um papel

central durante a fase de dessecação devido à manutenção essencial entre a associação da parede celular e da membrana plasmática (Vicré *et al.*, 2004), no entanto excetuando-se sementes provenientes de Campinas, que apresentaram tendência de diminuição deste composto (Figura 4B), não foi observado um padrão de comportamento.

Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA), associando os níveis de secagem às alterações metabólicas de sementes de *E. pyrifomis* oriundas de diferentes regiões (Figura 5), demonstrou a separação das regiões em relação ao teor de água (S₀, S_I, S_{II}, S_{III}).

De maneira geral, observaram-se três separações entre as regiões, sendo Pariqueira-açu, Jumirim e Campinas menos separadas entre si, assim como Ribeirão Preto e São Paulo, sendo o metabolismo mais distinto o das sementes provenientes de Lavras. Além disso, é possível observar que o metabolismo inicial das sementes oriundas de Lavras está próximo ao de sementes originárias de Ribeirão Preto, submetidas à secagem até 30% de umidade (Figura 5).

Ademais, o Componente 1 foi responsável por aproximadamente 45,93% das variações encontradas e está relacionado principalmente aos ácidos orgânicos. Já o Componente 2, responsável pela separação das secagens, explicou 20,34% das variações. Observa-se neste caso, o acúmulo de açúcares álcoois ao longo da desidratação de sementes de *E. pyrifomis*, sugerindo que os polióis tenham um importante papel na tolerância a perda de água na espécie em estudo. Tem-se atribuído aos polióis papel similar aos oligossacarídeos da série da rafinose, quando estes não estão evidenciados (Peterbauer & Richter 2001; Borges *et al.*, 2006; Leduc *et al.*, 2012). Em sementes de *Caesalpinia echinata*, espécie tolerante a dessecação, foram encontradas quantidades elevadas de polióis, como *myo*-inositol, pinitol, ciceritol e ciclitóis galactosilados (Borges *et al.*, 2006). Estes compostos são importantes na proteção contra dessecação e outros fatores ambientais de estresse, promovendo a formação de um estado vítreo que protege macromoléculas (Leopold *et al.* 1994) ou estabilizando membranas diretamente, através da substituição de moléculas de água entre as extremidades polares dos fosfolipídeos (Crowe *et al.*, 1998).

Quando analisadas as origens do material separadamente, a PCA relacionando os níveis de secagem ao metabolismo de sementes de *E. pyrifomis*, demonstrou de maneira geral, que os tratamentos S₀ e S_I estão menos separados entre si, assim como S_{II} e S_{III},

corroborando com as análises fisiológicas, indicando que as maiores alterações no metabolismo ocorram entre os níveis S_I (50%) e S_{II} (40%) (Figuras 6A, B, C, D, E e F).

De maneira geral, a presença de ácido chiquímico, relacionado aos tratamentos S₀ e S_I (Figuras 6B, D e F) e S_{II} e S_{III} (Figuras 6A, C e E), indica a presença de um metabolismo secundário ativo. A via do ácido chiquímico é a principal rota de produção dos aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano (Herrmann & Weaver, 1999). Segundo Herrmann (1995), os aminoácidos aromáticos não são somente utilizados para a produção de proteínas em plantas, mas também como precursores de um grande número de metabólitos secundários, como pigmentos, flavonóides e taninos. Além disso, rotas intermediárias podem servir como substrato para outras vias metabólicas, incluindo a biossíntese de ácido quínico e produtos derivados, como o ácido clorogênico (Herrmann & Weaver, 1999), que são conhecidos pela sua capacidade antioxidante (Nogueira & Trugo, 2003; Niggeweg *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2005). No entanto, excetuando-se o aminoácido fenilalanina, nenhum composto da rota do ácido chiquímico foi observado pela metodologia utilizada para a espécie em estudo.

Sementes provenientes de Ribeirão Preto, Pariquera-açu e Jumirim (6A, E e F) apresentaram os compostos rafinose, ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido treônico relacionados aos tratamentos S₀ e S_I. Os polióis eritritol, xilitol, galactinol, *myo*-inositol, pinitol, assim como ácido fosfórico e a sacarose parecem estar relacionados aos níveis S_{II} e S_{III}.

A análise de componentes principais de sementes das regiões de Campinas e São Paulo (Figura 6B e D), cuja sensibilidade à perda de água foi superior às demais, demonstrou, dentre os polióis, o acúmulo apenas de galactinol ao longo da secagem, sugerindo que o pinitol e o *myo*-inositol tenham papel mais significativo na tolerância das sementes à perda de água. Além disso, observa-se que sementes oriundas de Campinas, cuja sensibilidade à perda de água foi superior, apresentaram tendência de diminuição de metil-inositol e *myo*-inositol a partir do primeiro nível de secagem (Figura 4B).

O *myo*-inositol é um precursor de outros ciclitóis, como o galactinol, digalactosil *myo*-inositol, pinitol, entre outros, que desempenham um papel importante no ajuste osmótico intracelular entre o vacúolo e citoplasma e também atuam contra os radicais livres (Ashraf & Harris, 2004). Apesar de não ter sido observado em geral diminuição de *myo*-inositol, houve um aumento de outros polióis ao longo da secagem, sugerindo que outra via biossintética possa ser utilizada em sementes de *E. pyrifomis*. A metilação do *myo*-inositol, forma o *O*-

methylinositol (D-ononitol), quando as plantas são submetidas à estresses abióticos em uma reação catalizada pela *myo*-inositol metiltransferase (IMT), o D-Ononitol tem função osmoprotetora, prevenindo a perda de água em plantas (Ahn *et al.*, 2011).

As sementes provenientes da região de Lavras, que mostraram maior tolerância à perda de água, apresentaram apenas o ácido ascórbico mais relacionado aos tratamentos S₀ e S_I (Figura 6C), além de maiores proporções de polióis (Figura 7 Cap. 1) desde a dispersão, o que sugere que essas sementes sejam fisiologicamente mais maduras que as sementes provenientes de outras regiões, corroborando com a hipótese de Barbedo e colaboradores (2013), cujo grau de tolerância a perda de água está associado ao quanto as sementes avançaram no processo de maturação. Desta maneira, acredita-se que as sementes provenientes de Lavras tenham sido dispersas mais maduras que as demais, apresentando quantidades superiores de açúcares protetores, como sacarose e polióis. Isso fica ainda mais evidenciado pelas diferenças no perfil metabólico como um todo, mostrando que o grau de tolerância à perda de água pode ocorrer de maneira intraespecífica.

CONCLUSÃO

O grau de maturidade e de tolerância à perda de água das sementes oriundas de Lavras pode, portanto, ser resultado das características do ambiente em que as sementes se desenvolveram, que propiciaram somatório de GD e chuva acumulada em quantidades adequadas durante a maturação, e que levaram ao avanço do metabolismo no sentido de se aproximar da terceira fase do desenvolvimento das sementes, ou seja, aquisição da tolerância à dessecação. Contudo, não se descarta, ainda, a influência genética das matrizes no grau de tolerância à perda de água de sementes de *E. pyrifomis*.

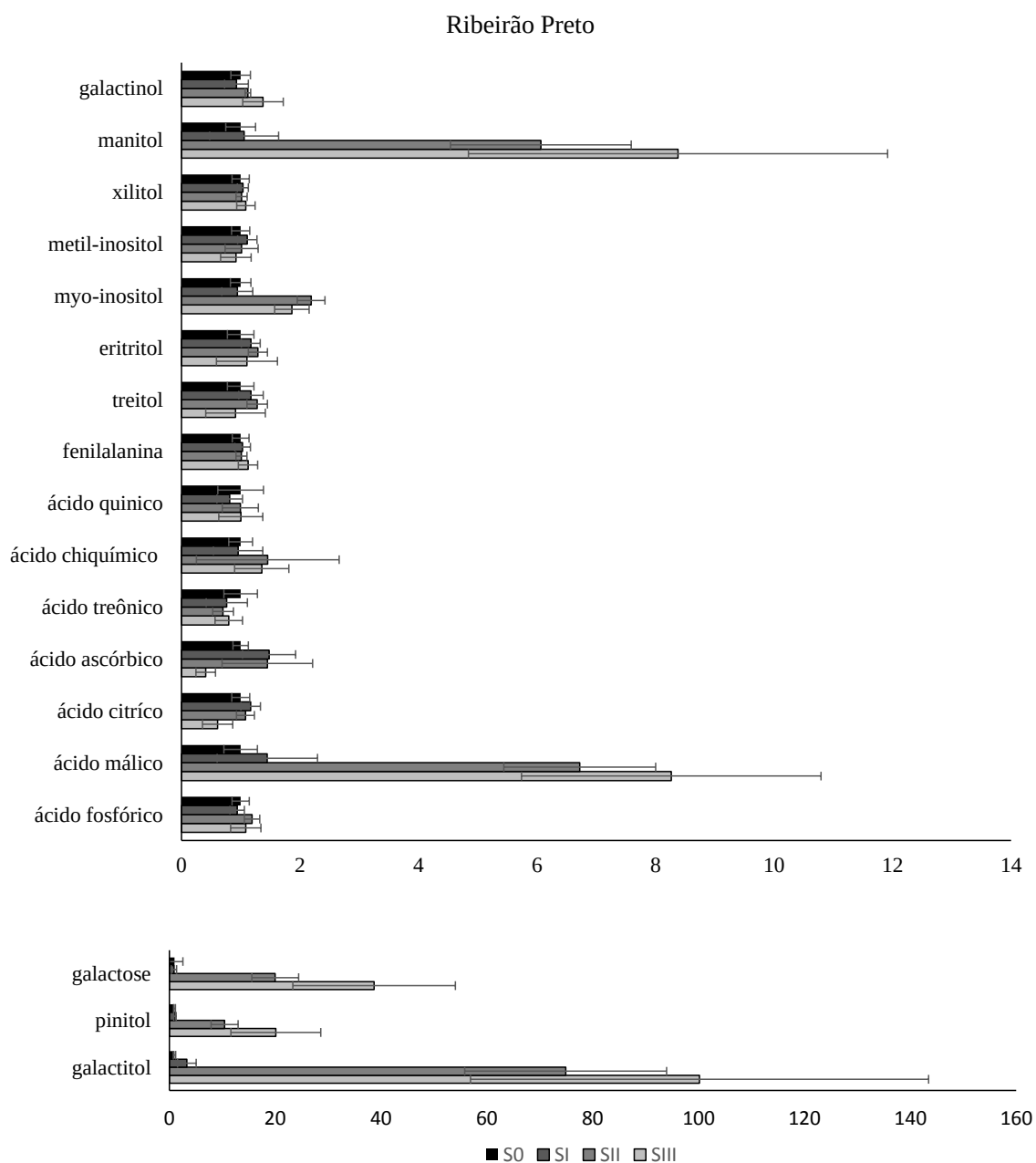


Figura 4A. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*, provenientes de Ribeirão Preto, submetidos à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Compostos foram detectados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média do tratamento S₀.

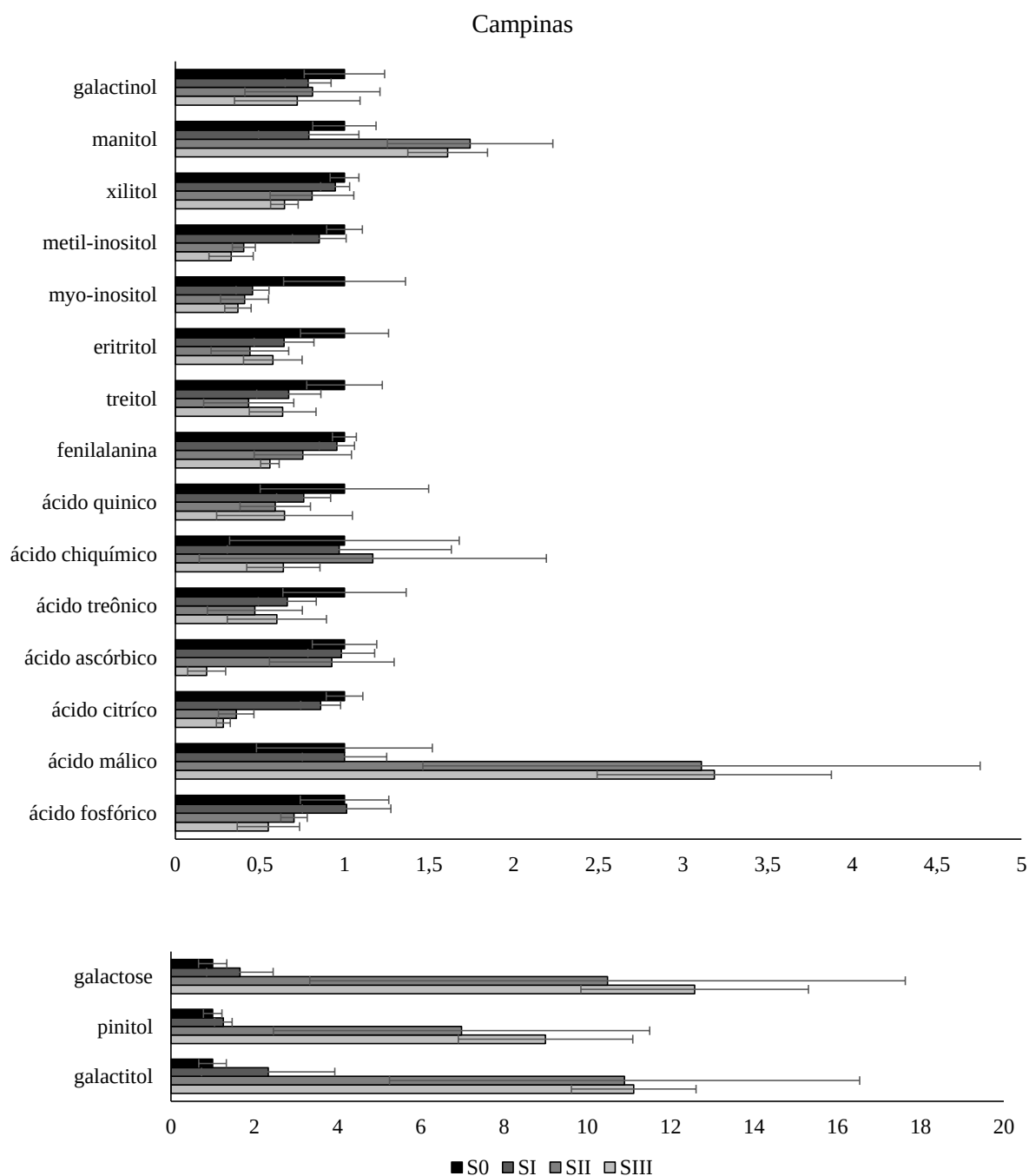


Figura 4B. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*, provenientes de Campinas, submetidos à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Compostos foram detectados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média do tratamento S₀.

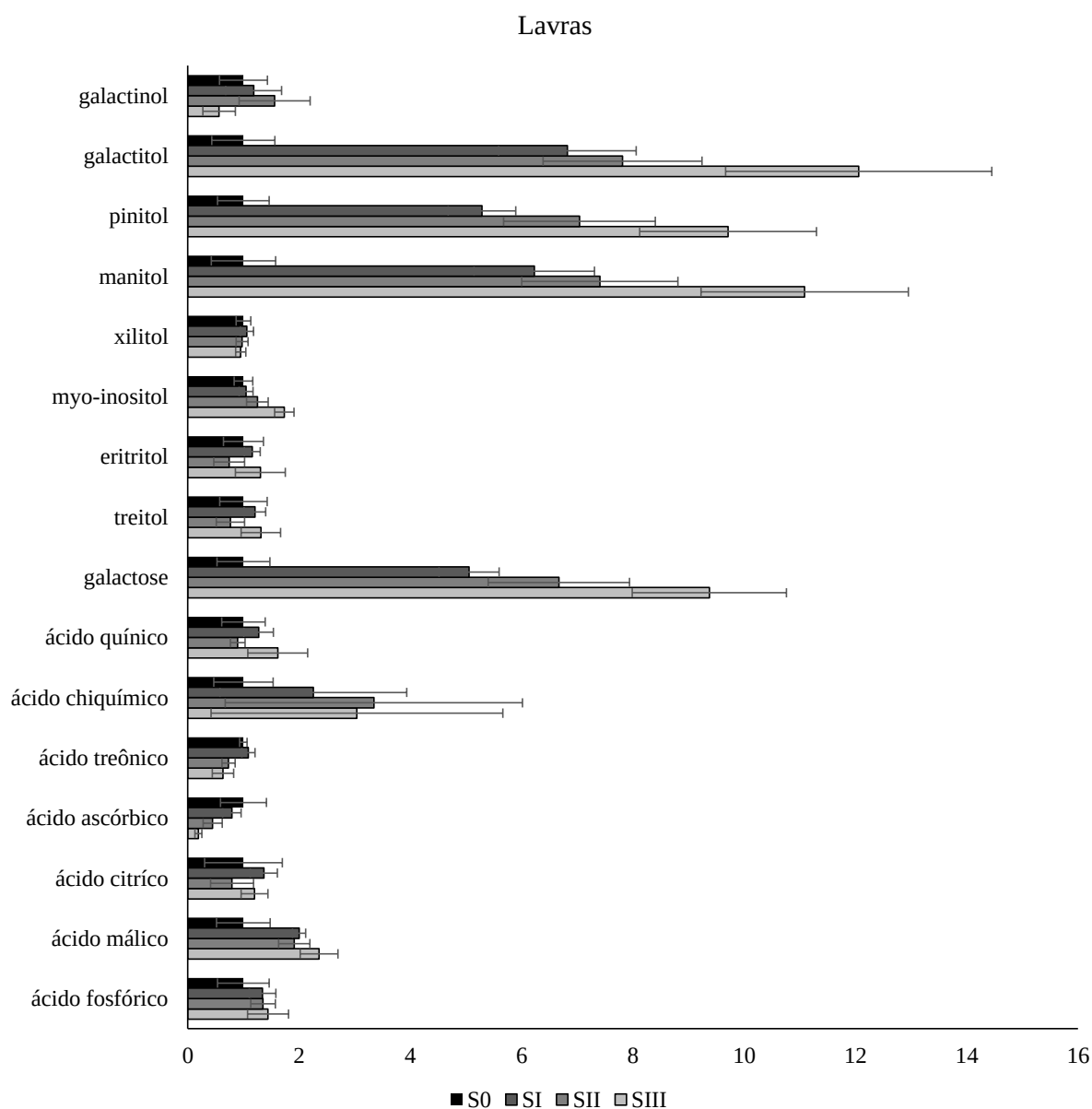


Figura 4C. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*, provenientes de Lavras, submetidos à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Compostos foram detectados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média do tratamento S₀.

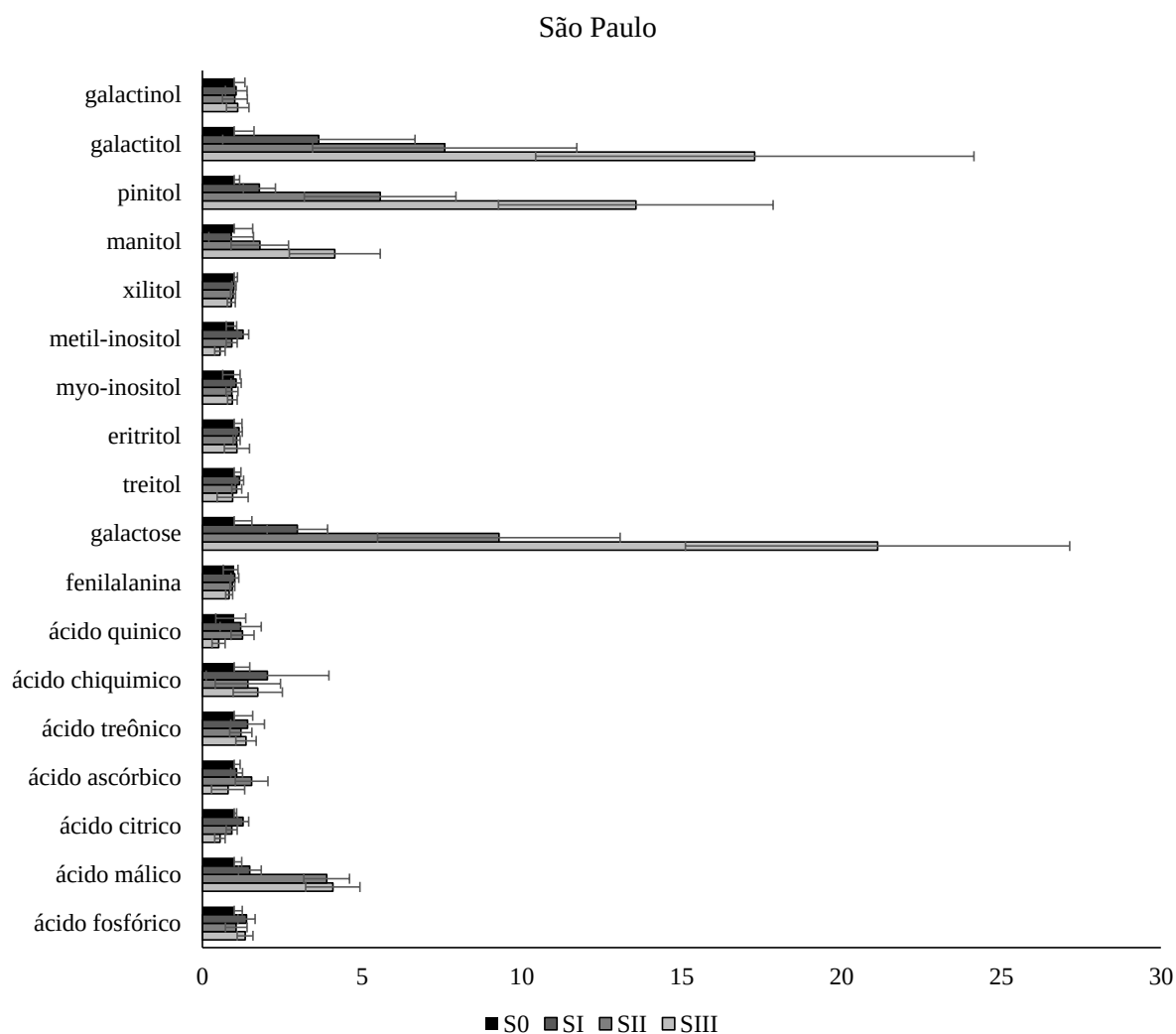


Figura 4D. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*, provenientes de São Paulo, submetidos à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Compostos foram detectados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média do tratamento S₀.

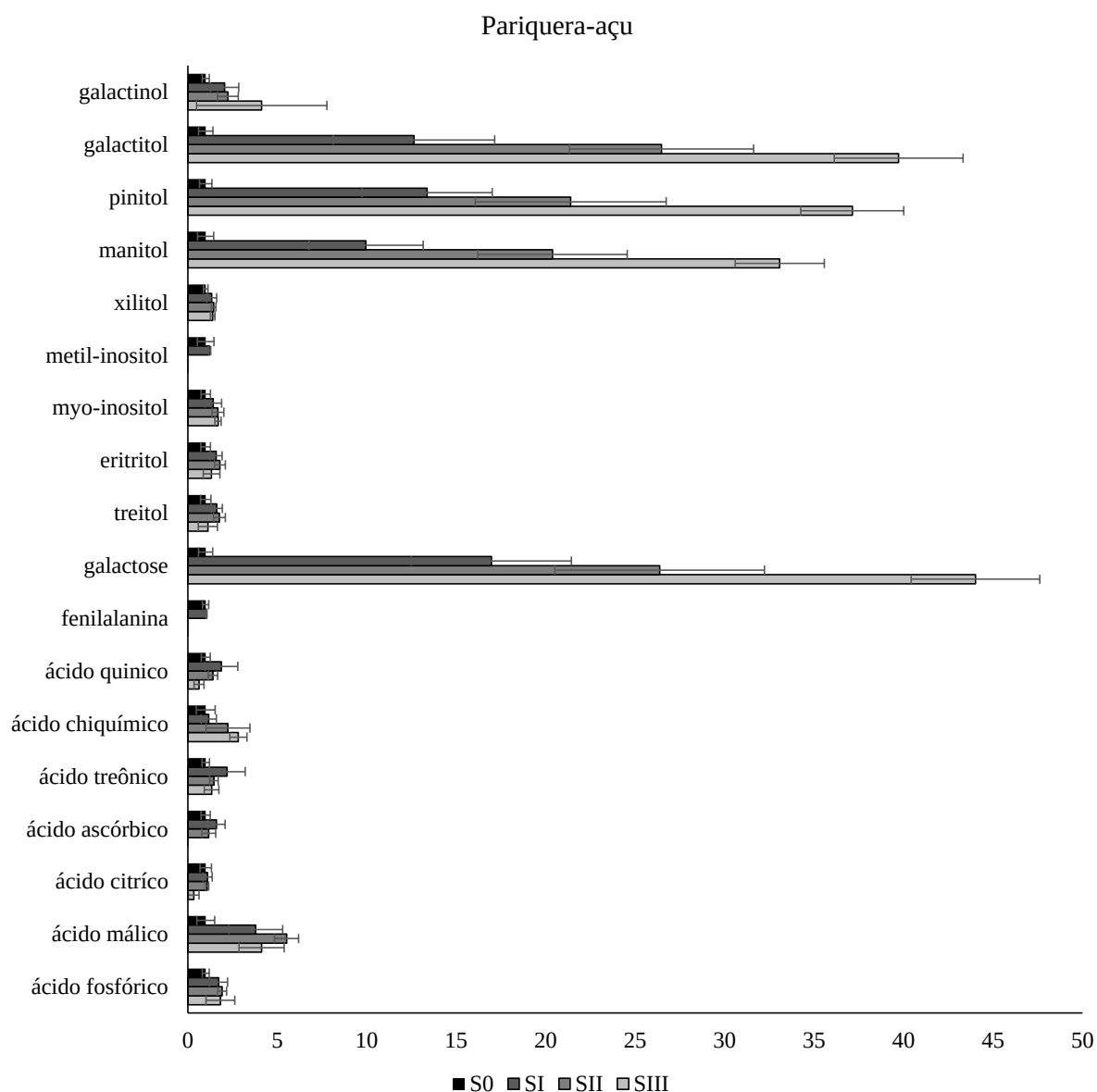


Figura 4E. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*, provenientes de Pariquera-açu, submetidos à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Compostos foram detectados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média do tratamento S₀.

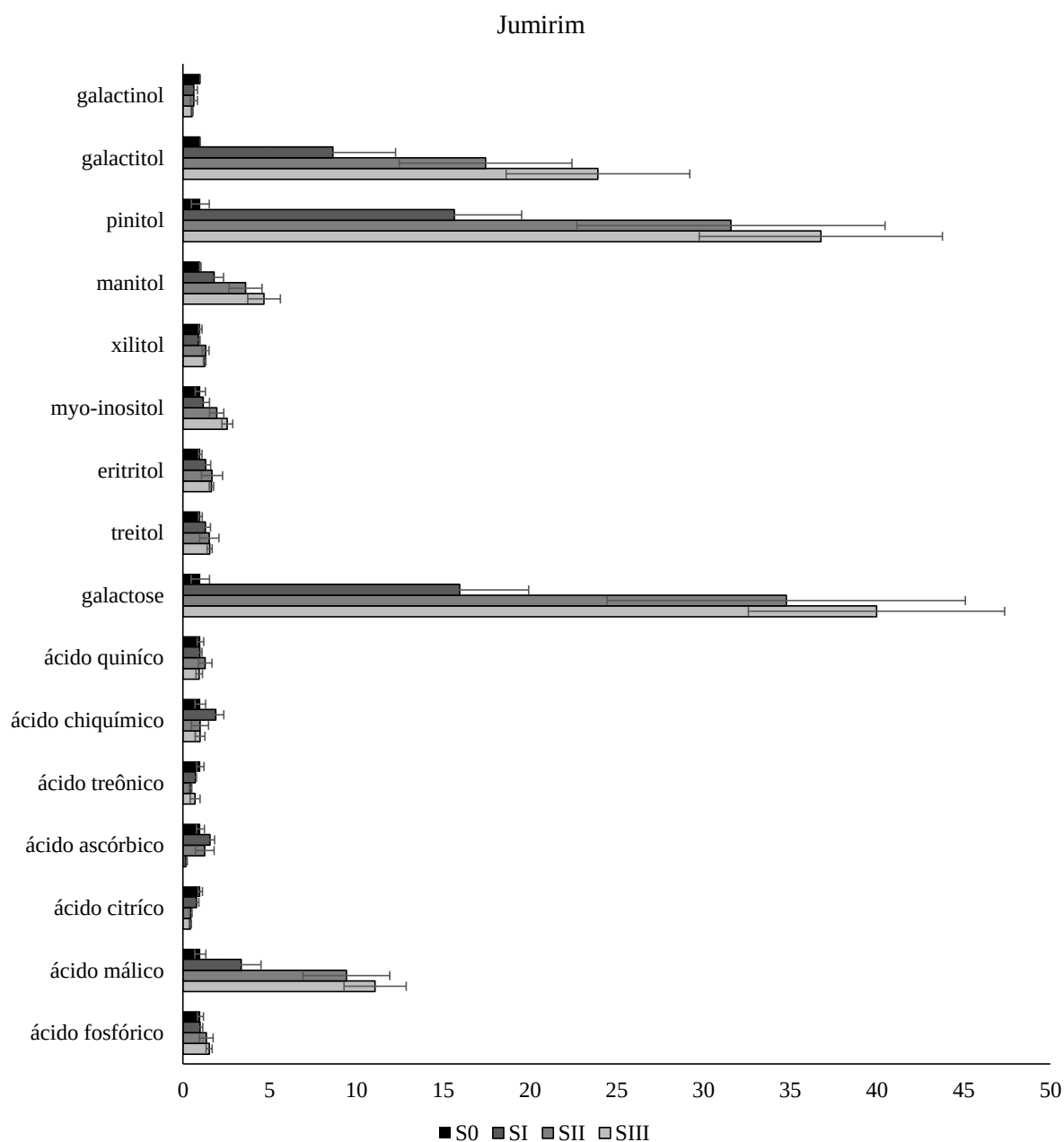


Figura 4F. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*, provenientes de Jumirim, submetidos à secagem. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem. Compostos foram detectados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média do tratamento S₀

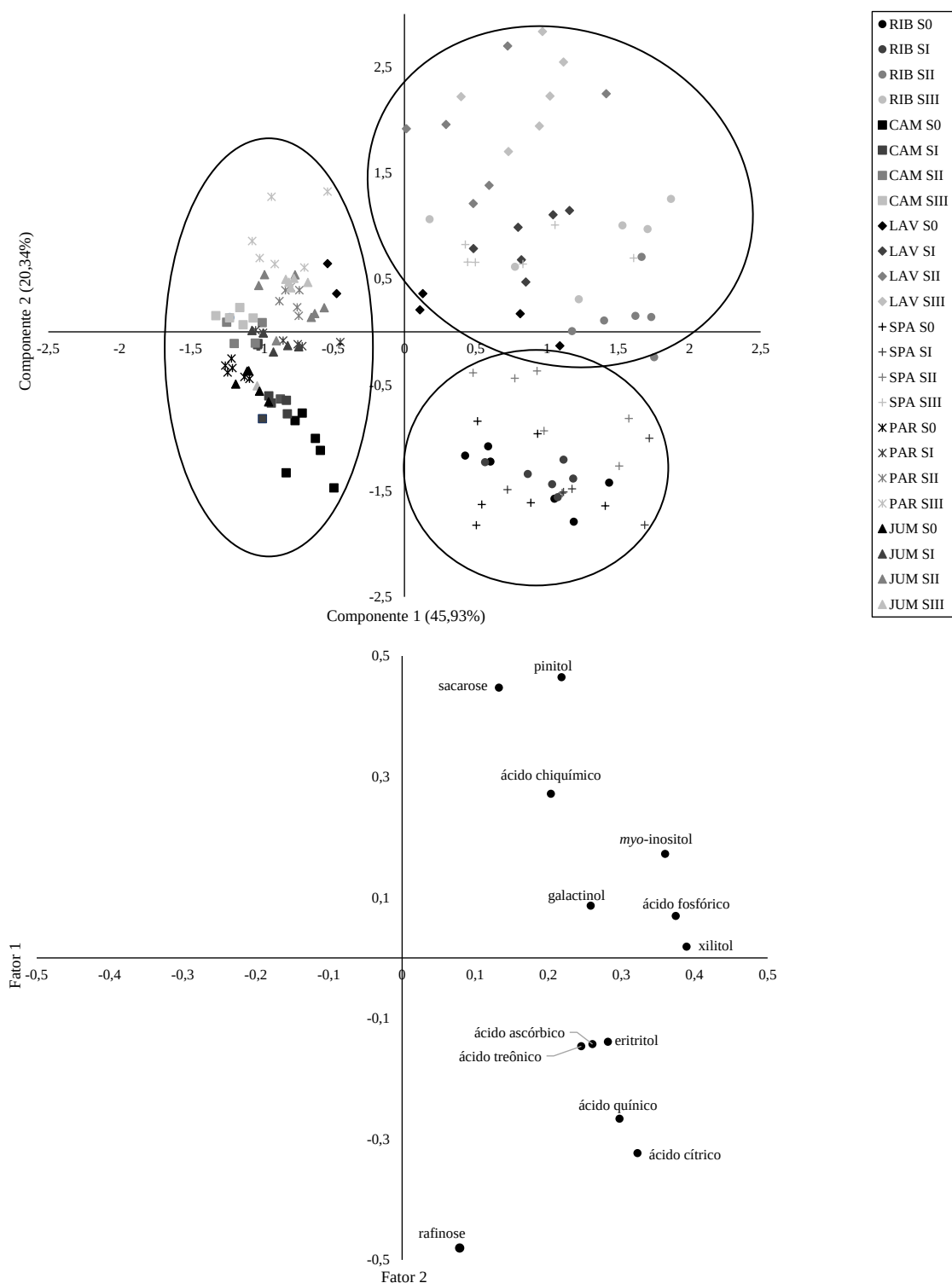
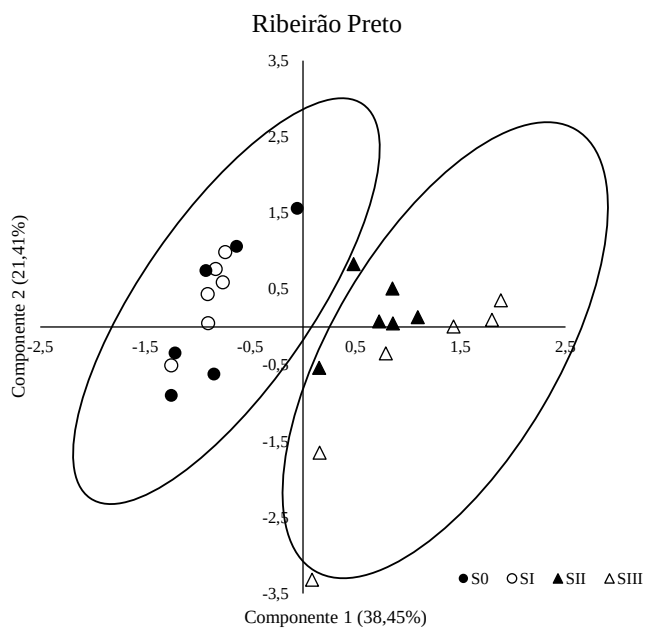


Figura 5. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de *Eugenia pyriformis*, de origens distintas, submetidos à secagem. PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. RIB – Ribeirão Preto; CAM – Campinas; LAV – Lavras; SPA – São Paulo; PAR – Pariquera-açu; JUM – Jumirim. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} – terceiro nível de secagem.

A



B

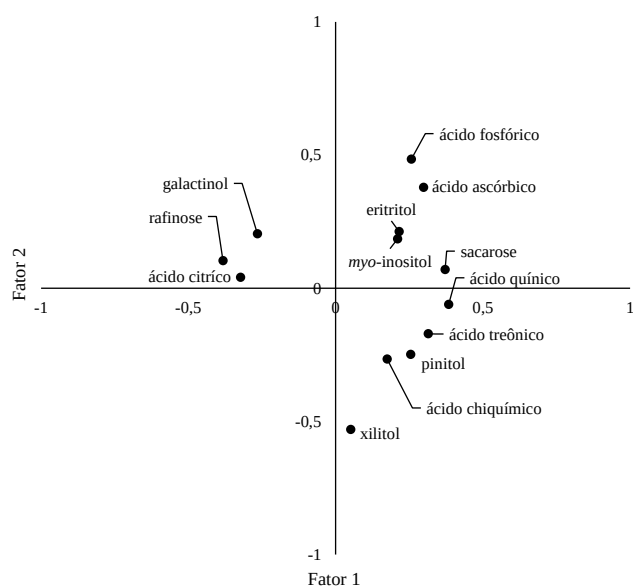
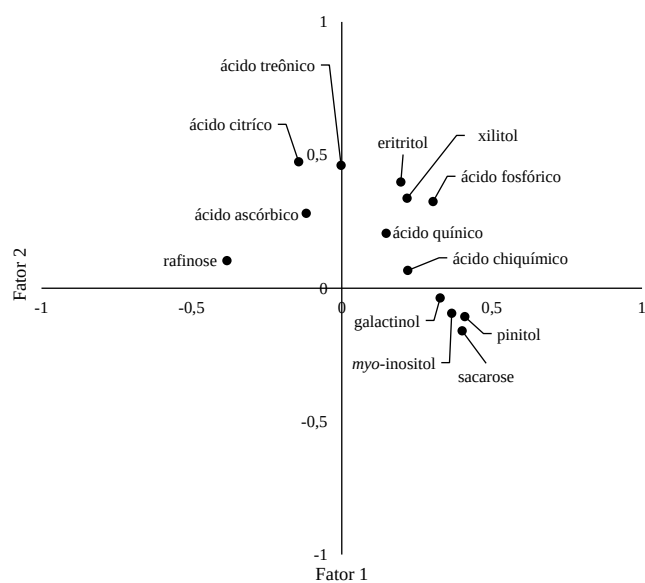
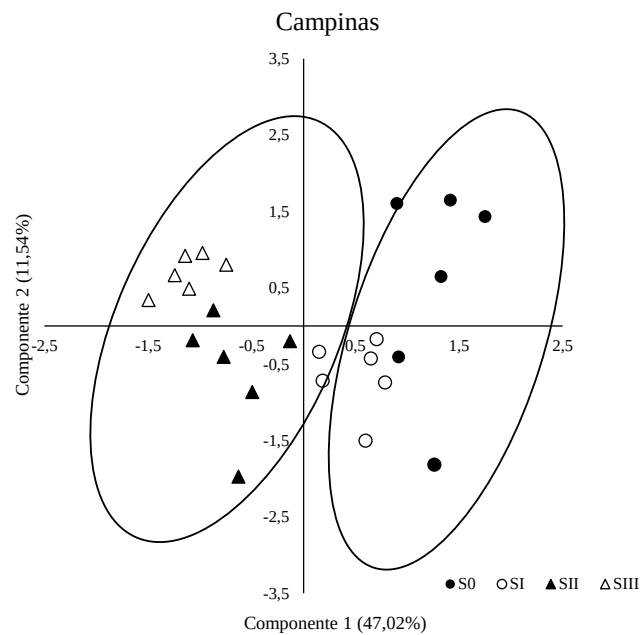
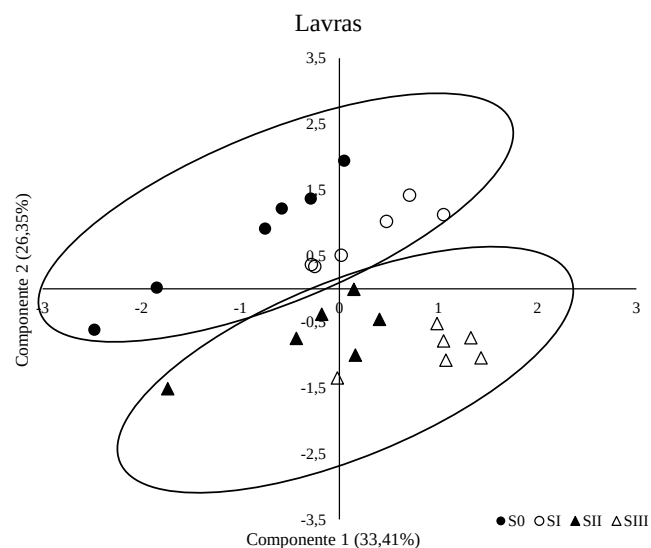


Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de *Eugenia pyrifomis*, submetidos à secagem. PCA é apresentada como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. A – Ribeirão Preto; B – Campinas. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem.

C



D

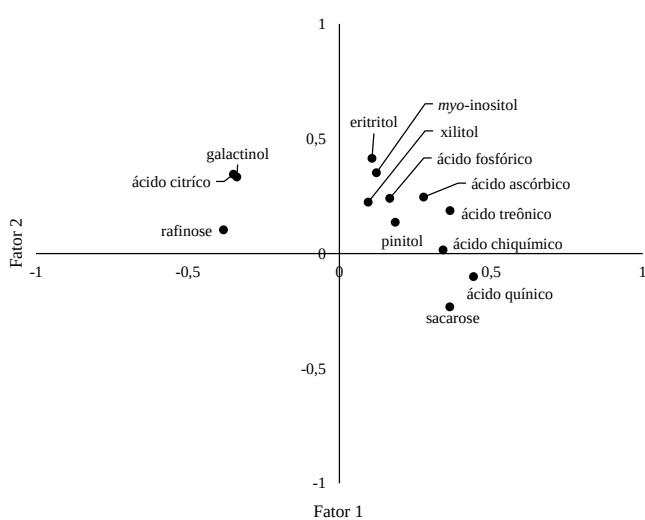
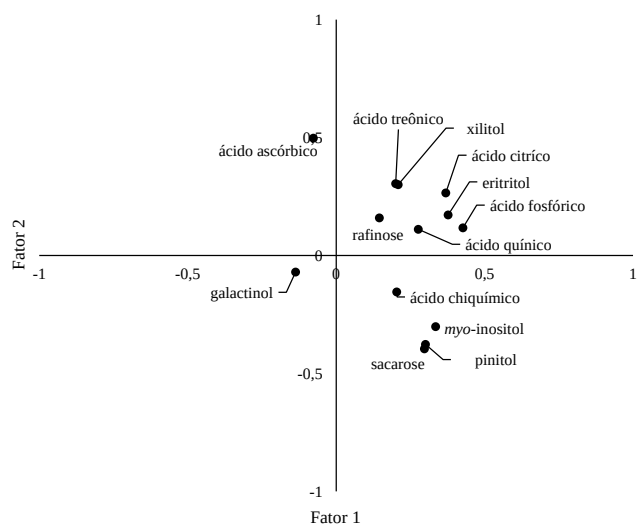
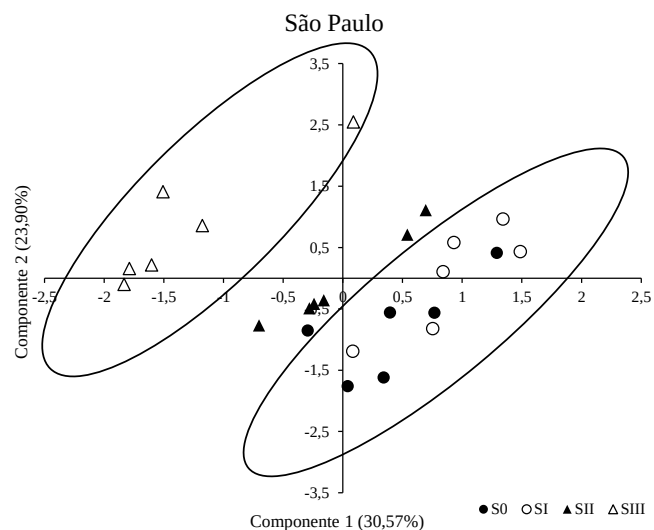
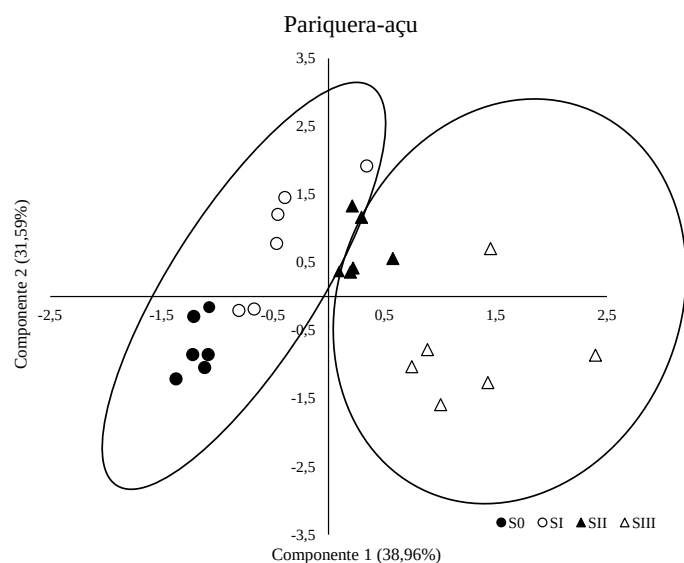


Figura 6 Continuação. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de *Eugenia pyrifomis*, submetidos à secagem. PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. C – Lavras; D – São Paulo. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem.

E



F

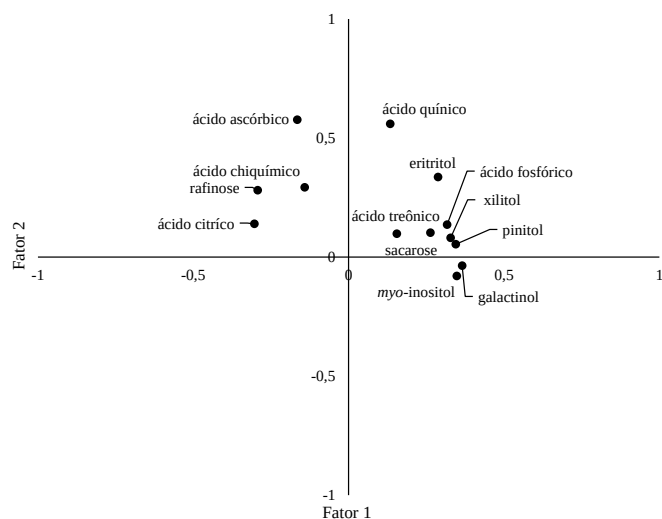
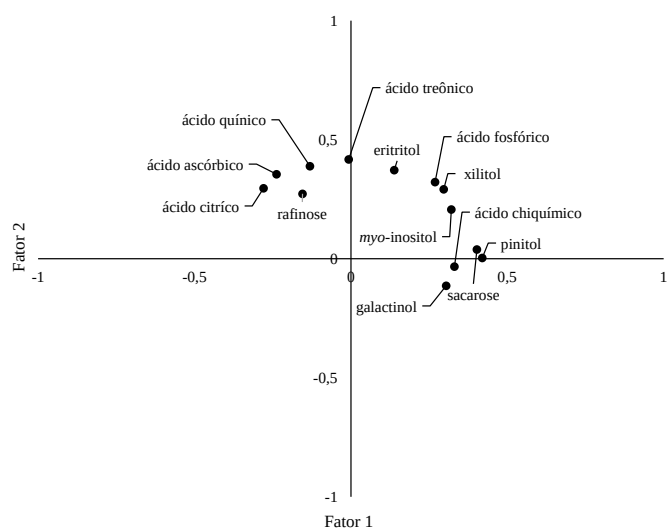
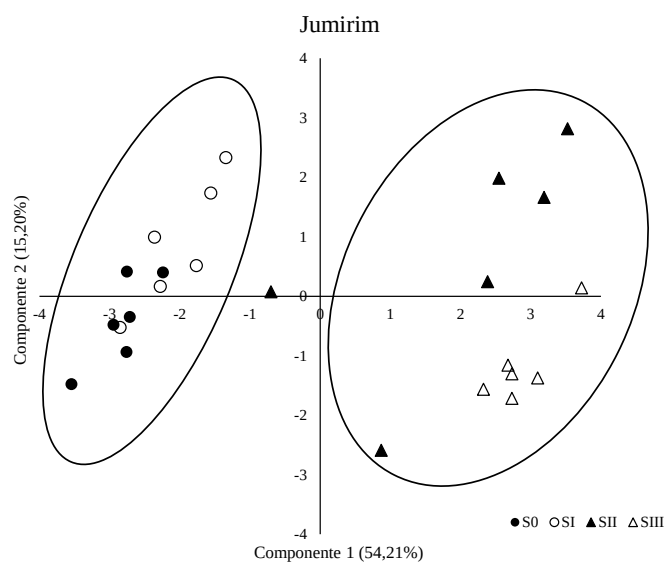


Figura 6 Continuação. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de *Eugenia pyriformis*, submetidos à secagem. PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. E – Pariquera-açu; F – Jumirim. S₀ – sementes sem secagem; S_I – primeiro nível de secagem; S_{II} – segundo nível de secagem; S_{III} - terceiro nível de secagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, C., Park, U. & Park, P. B.** 2011. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Biochemical and Biophysical Research Communications 415: 669–674.
- Amaral, L.I.V., Costa, P.M.F., Aidar, M.P.M., Gaspar, M. & Buckeridge, M.S.** 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. Hoehnea 34: 425-431.
- Amma, S. & Watanabe, A.** 1985. Long-term storage of germplasm of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Japan Agricultural Research Quarterly, 19: 196–201.
- Andrade, R. N. B. & Ferreira, A. G.** 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes, Brasília 22 (2): 118-125.
- Ashrafa, M. & Harris, P.J.C.** 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science 166; 3–16.
- 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, J.C., Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? Review Paper. Hoehnea 40(4): 583-593.
- Berjak, P. & Pammenter, N. W.** 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12 (Edição especial): 22-55.
- Berjak, P., Vertucci, C.W. & Pammenter, N.W.** 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. Seed Science Research 3: 155–166.
- Borges, I.F., Barbedo, C.J., Richter, A.A. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2006. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). Brazilian Journal of Plant Physiology 18: 475-482.
- Bryant, G., Koster, K.L. & Wolfe, J.** 2001. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. Seed Science Research 11: 17-25.
- Buitink, J., Vu, B.L., Satour, P. & Leprince, O.** 2003. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. Seed Science Research 13: 273-286.

Brasil. 2009. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para análise de sementes. Brasília, DF 398p.

Castro, R.D. & Hilhorst, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: Germinação: do básico ao aplicado, Ferreira, A.G. & Borghetti, F., Artmed Editora S.A., Porto Alegre 51-67.

Crowe, J. H., Carpenter, J. F. & Crowe, L. M. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:73–103.

Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C. A. & Pritchard, H. W. 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157–166.

Daws, M.I., Cleland, H., Chmielarz, P., Gorian, F., Leprince, O. & Mullins, C.E., 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology* 33: 59-66.

Delgado, L.F. & Barbedo, C.J. 2007. Tolerância a dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42 (2): 265-272.

Delgado, L.F. 2006. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo (Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente).

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Feltre, R. 1982. Química geral. 2.ed. Moderna. São Paulo 1: 364p.

Ferreira, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)* 35: (6) 1039-1042.

Halperin, S.J. & Koster, K.L. 2006. Sugar effects on membrane damage during desiccation of pea embryo protoplasts. *Journal of Experimental Botany* 57: 2303-2311.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1-9.

Herrmann, K. M. 1995. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.

Herrmann, K. M.; Weaver, L. M. 1999. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 473-503.

Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.

Hu, J., Guo C.G. & Shi, S.X. 1993. Partial drying and post-thaw preconditioning improve the survival and germination of cryopreserved seeds of tea (*Camellia sinensis*). Plant Genetic Resources Newsletter 93: 1–4.

Hummel, J., Strehmel, N., Selbig, J., Walther, D., Kopka, J. 2010. Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. Metabolomics 6: 322-333.

International Seed Testing Association. 2004. International rules for seed testing. Seed Science and Technology 13: 356-513.

Kader, A.A. & Saltveit, M.E. 2002. Respiration and gas exchange. J.A. Bartz, J.K. Brecht. & J. Weichmann. (eds.) In: Postharvest physiology and pathology of vegetables, Marcel Dekker: New York, pp.7-29.

Koster, K.L. & Bryant, G. 2005. Dehydration in model membranes and protoplasts: contrasting effects at low, intermediate and high hydrations. In: Chen THH, Uemura M, Fujikawa S eds. Cold hardiness in plants: molecular genetics, cell biology and physiology. Wallingford, UK: CAB International 219–234.

Kuo, T.M., Van Middlesworth, J.F. & Wolf, W.J. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 36: 32-36.

Labouriau, L.G. 1983. A germinação das sementes. OEA: Washington, 175p

Lamarca, E.V., Silva, C.V. & Barbedo, C.J. 2011. Limites térmicos para a germinação em função da origem de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) nativas do Brasil. Acta Botanica Brasilica 25 (2):293-300.

Lamarca, E. V., Barbedo, C.J. 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. Hoehnea 39: 577-586.

Lamarca, E. V., Prata, J.S., Borges, I.F., Delgado, L.F., Teixeira, C.C., Camargo, M.P.B., Faria, J.M.R., Barbedo, C.J. 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. Anais da Academia Brasileira de Ciências 85(1):223-233.

Lee, B.R., Jin, Y.L., Jung, W.J., Avice, J.C., Bertrand, A.M., Ourry, A., Park, C.W. & Kim, T. H. 2008. Water deficit accumulates sugar by starch degradation not by de novo synthesis in white clover leaves (*Trifolium repens*). Physiologia Plantarum 143: 403-411.

Leduc, S.N.M., Silva, J.P.N., Gaspar, M., Barbedo, C.J., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2012. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. Australian Journal of Botany 60: 42-48.

Leitão Filho, H.F. 1987. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. Revista Scientia Florestalis (Instituto de Pesquisas florestais) 35: 41-46.

Leopold, A.C., Sun, W.Q. & Bernal-Lugo, I. 1994. The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Science Research* 4: 267-274.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. *Crop Science* 2: 176-7.

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.

Moore, J. P., Farrant, J.M., Lindseyy, G.G. & Brandt, W.F. 2005. The South African and Namibian populations of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius* are genetically distinct and display variation in their galloylquinic acid composition. *Journal of Chemical Ecology* 31: 2823-2834.

Niggeweg R., Michael A. J & Cathie M. 2004. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22: 746 – 754.

Nishizawa, A., Yabuta, Y. & Shigeoka, S. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147: 1251-1263.

Nogueira, M., & Trugo, L. C. 2003. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Food Science and Technology* 23(2): 296-299.

Obendorf, R.L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.

Oliver, M. J., Guo, L., Alexander, D. C., Ryals, J. A., Wone, W.M.B. & Cushman J. C. 2011. A Sister Group Contrast Using Untargeted Global Metabolomic Analysis Delineates the Biochemical Regulation Underlying Desiccation Tolerance in *Sporobolus stapfianus*. *The Plant Cell* 23: 1231–1248.

Pammenter, N.W. & Berjak, P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.

Pedro Junior, M.J., Brunini, O., Alfonsi, R.R. & Angelocci, L.R. 1977. Estimativa de graus-dia em função de altitude e latitude para o estado de São Paulo. *Bragantia*, 36: 89-92.

Peterbauer, T. & Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose Family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197.

Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L. & Fernie, A.R. 2001. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 13: 11-29.

Rolim, G.S., Camargo, M.B.P., Lania, D.G. & Moraes, J.F.L. 2007. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o estado de São Paulo. *Bragantia* 66: 711-720.

- Smirnoff, N. & Cumbes, Q.J.** 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible Solutes. *Phytochemistry* 28(4): 1057 -1060.
- Steadman, K.J., Pritchard, H.W., Dey, P.M.** 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany* 77: 667-674.
- Stoop, J.M.H., Williamson, D. J. & Pharr, M. D.** 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress 1(5): 139-144.
- Suguiyama, V. F., Silva, E. A., Meirelles, S. T., Centeno, D. C. & Braga, M. R.** 2014. Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpúrea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering 5(96): 1-13.
- Tavares, J. T. de Q., Cardoso, R. L. Costa, J. A., Fadigas, F. de S., & Fonseca, A. A.** 2010. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. *Química Nova* 33(4): 805-809.1473.
- Thornthwaite, C.W. & Mather, J.R.** 1955. The water balance. New Jersey: Drexel Institute of Technology (Publications in Climatology) 104p.
- Vertucci, C.W. & Farrant, J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: G. Galili & J. Kigel (eds.). Seed development and germination. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 701-746.
- Vicré, M., Farrant, J. M. & Driouich, A.** 2004. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant Cell and Environment* 27: 1329-1340.
- Villa Nova, N.A., Pedro Júnior, M.J., Pereira, A.R. & Ometto, J.C.** 1972. Estimativa de graus-dia acumulados acima de qualquer temperatura base em função das temperaturas máxima e mínima. *Caderno Ciência da Terra* 30: 89-92.
- Walters, K.R., Pan, Q., Serianni, A.S., Duman, J.G.** 2009. Cryoprotectant biosynthesis and the selective accumulation of threitol in the freeze-tolerant Alaskan beetle, *Upis ceramboides*. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 16822-16831.
- Yobi, A., Wone, W. M. B., Xu, W., Alexander, D. C., Guo L., Ryals J. A., Oliver, M. J. & Cushman, J. C.** 2012. Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *The Plant Journal* 72: 983–999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo sugerem que sementes de *E. pyrifomis* oriundas de diferentes regiões apresentam o metabolismo distinto e corroboram com a hipótese de que variações ambientais contribuem para diferenças fenotípicas. Estas variações não afetaram, em geral, as características fisiológicas de sementes recém dispersas, entretanto observaram-se diferenças no grau de tolerância à dessecação de acordo com a origem das sementes, evidenciado pelas diferenças no perfil metabólico.

A presença de açúcares protetores, como a sacarose e os polióis, indica uma resposta fisiológica contra o estresse hídrico, através da estabilização de membranas ou pela atuação antioxidante desses compostos. Sementes que apresentaram maior tolerância à perda de água foram aquelas dispersas com maiores proporções de polióis e com aumento expressivo desses compostos ao longo da secagem. Além disso, essas sementes tiveram o aumento desses compostos já no primeiro nível de secagem, indicando um metabolismo mais avançado em relação às demais.

Recentemente, foi sugerido que os diferentes comportamentos observados ao final da maturação das sementes seriam o resultado do quanto este processo se estendeu, influenciado pelas condições ambientais em que a planta-mãe foi submetida e pelas características de cada espécie acumuladas ao longo de seu processo evolutivo (Barbedo *et al.*, 2013).

Dessa maneira, acredita-se que o maior grau de tolerância à perda de sementes de *E. pyrifomis* possa ser resultado das características do ambiente em que as sementes se desenvolveram, que propiciaram somatório de GD e chuva acumulada em quantidades adequadas durante a maturação. Entretanto, não se descarta a influência genética no grau de tolerância à perda de água de sementes de *E. pyrifomis*.

Dessa maneira, a variação na genética populacional pode ser uma hipótese a ser testada, a qual estaria relacionada às diferenças no metabolismo de sementes de *E. pyrifomis*, provenientes de diferentes localidades, e aos diferentes níveis de tolerância à perda de água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbedo, J.C., Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2013. Do recalcitrant seeds really exist? Review Paper. *Hoehnea* 40(4): 583-59.

RESUMO GERAL

Sementes recalcitrantes de espécies nativas representam um grande desafio àqueles que necessitam armazená-las com o propósito de conservação do germoplasma. Desta maneira, torna-se importante entender os mecanismos envolvidos na sensibilidade de sementes à dessecação. *Eugenia pyriformis* Cambess., espécie arbórea nativa do Brasil, apresenta sementes difíceis de serem armazenadas, devido à sensibilidade à dessecação e às baixas temperaturas. Assim, torna-se de extrema importância o conhecimento de aspectos biológicos, que possibilitem maior compreensão sobre a tolerância à perda de água dessa espécie. Neste estudo avaliaram-se as alterações no metabolismo relacionadas ao comportamento recalcitrante de sementes de *E. pyriformis*, bem como a influência das condições hídricas e térmicas, para este processo. Para isso foram coletadas sementes de *E. pyriformis* nos municípios de Ribeirão Preto (SP), Lavras (MG), Campinas (SP), São Paulo (SP), Pariqueira-açu (SP) e Jumirim (SP). Os resultados sugerem que sementes recém dispersas de *E. pyriformis* oriundas de diferentes regiões, apresentam o metabolismo distinto e corroboram com a hipótese de que variações ambientais contribuem para diferenças fenotípicas, sendo o somatório de graus-dia, temperatura máxima e a chuva acumulada, dentre as variáveis analisadas, importantes fatores de contribuição para o desenvolvimento de sementes de *E. pyriformis*. Entretanto, estas variações não afetaram, em geral, as taxas de germinação e produção de plântulas normais, tampouco o vigor de sementes de *E. pyriformis* recém dispersas. Entretanto, quando submetidas aos tratamentos de secagem os resultados demonstraram variações no grau de tolerância à perda de água entre sementes de diferentes origens. A análise de perfil metabólico demonstrou haver o aumento de sacarose e polióis ao longo da secagem, sendo as sementes mais tolerantes à perda de água aquelas que apresentaram quantidades superiores desses compostos protetores. Acredita-se que as sementes que toleraram mais a perda de água tenham avançado mais no período de maturação.

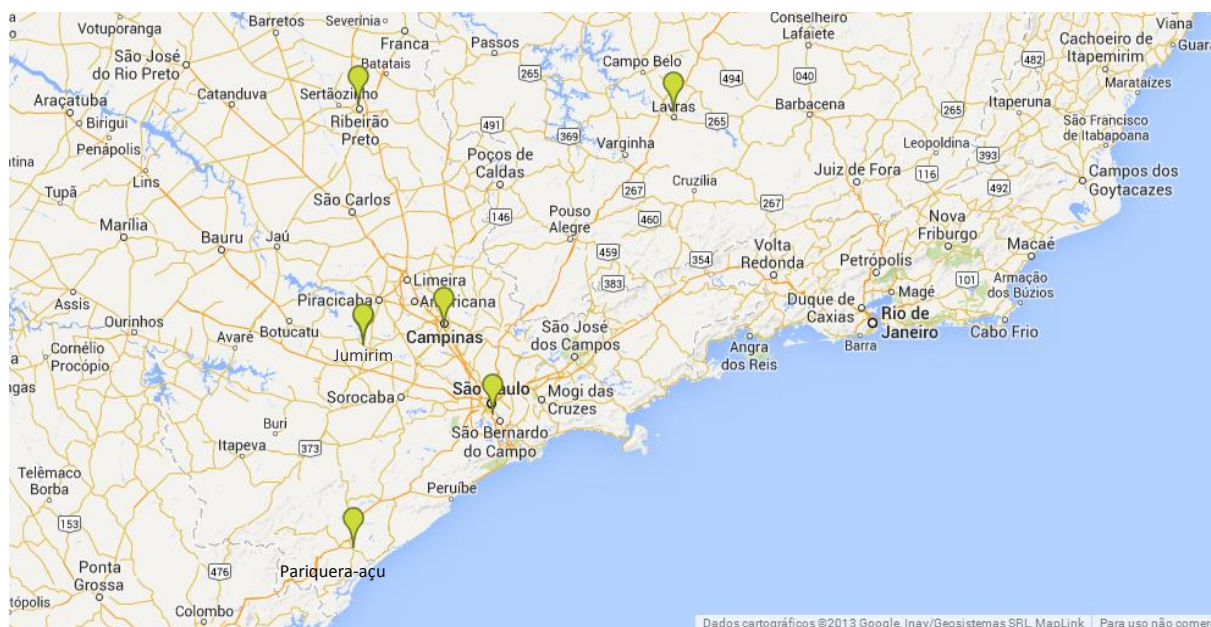
Palavras-chave: Myrtaceae, sementes, dessecação, perfil metabólico

SUMMARY

Recalcitrant seeds represent a major challenge to those who need to store them for the purpose of germplasm conservation. Thus, it becomes important to understand the mechanisms involved in desiccation sensitivity in seeds. *Eugenia pyriformis* Cambess., native tree specie from Brazil, presents difficult seeds to be stored due to sensitivity to desiccation and low temperatures. In this study were analyzed the metabolic changes related to recalcitrant behavior of *E. pyriformis* seeds, from different regions as well as the influence of the hydric and thermal for this process. Seeds of *E. pyriformis* were collected in the cities of Ribeirão Preto (SP), Lavras (MG), Campinas (SP), São Paulo (SP), Pariqueira-açu (SP) and Jumirim (SP). The results suggest that recently dispersed seeds of *E. pyriformis* from different regions, showed distinct metabolism and corroborate the hypothesis that environmental variation contribute to phenotypic differences, being the number of degree-days, maximum temperature and cumulative rainfall, among the variables analyzed, important contributing factors to the development of *E. pyriformis* seeds. However, these variations did not affect, in general, the rates of germination and production of normal seedlings nor the vigor of *E. pyriformis* recently dispersed seeds. However, when submited to drying treatments the results showed that seeds exhibited variations in the degree of desiccation tolerance according to their origin. The metabolic profile analysis revealed that there was an increase of sucrose and polyols during drying, being more tolerant to water loss those seeds, which showed higher amounts of protective sugars like sucrose and polyols. It is believed that seeds that tolerate more water loss have advanced more in the maturation period.

Keywords: Myrtaceae, seeds, desiccation, metabolic profile

ANEXO



Anexo 1. Mapa da localização das regiões de coleta dos frutos de *Eugenia pyriformis* Cambess.
Fonte: Google Maps.