

CIBELLE FERREIRA FRANÇOSO

**Reações metabólicas a tratamentos osmóticos e
térmicos em sementes de *Eugenia brasiliensis* e
E. pyriformis (Myrtaceae)**

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

SÃO PAULO

2017

CIBELLE FERREIRA FRANÇOSO

**Reações metabólicas a tratamentos osmóticos e
térmicos em sementes de *Eugenia brasiliensis* e
E. pyriformis (Myrtaceae)**

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

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

CO-ORIENTADORA: DRA. SANDRA MARIA CARMELO GUERREIRO

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

Françoso, Cibelle Ferreira

F814r Reações metabólicas a tratamentos osmóticos e térmicos em sementes de *Eugenia brasiliensis* e *E. pyriformis* (Myrtaceae) / Cibelle Ferreira Françoso. – São Paulo, 2017.
154p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2017.

Bibliografia.

1. Tratamentos físicos. 2. Fitopatologia. 3. Sementes recalcitrantes I. Título.

CDU: 631.53.01

Dedico

À minha família e amigos.

Agradecimentos

Durante a realização desta tese contei com o apoio de diferentes lugares e pessoas. Foram laboratórios que abriram suas portas de bom grado e colaboraram e muito no meu projeto e pessoas que me ajudaram enormemente, tirando dúvidas, dando orientações preciosas, apoiando nas dificuldades ou simplesmente estando presentes. Sou imensamente grata a todos e sei que jamais teria chegado tão longe sem todo esse amparo.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento através da bolsa de doutorado concedida (número processo FAPESP: 2013/03618-5) e por ser uma instituição realmente admirável, extremamente séria, eficiente e com funcionários cordiais e solícitos.

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

À Pós-Graduação do Instituto de Botânica e aos seus funcionários, que merecem total reconhecimento pelo seu trabalho.

Aos alunos e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Sementes do Instituto de Botânica, onde desenvolvi grande parte do meu projeto e onde sempre tive total apoio.

Aos alunos e funcionários do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, onde realizei a maior parte das análises metabólicas, em especial à Mary Monteiro e ao Pedro Wasinger pelo apoio técnico.

Aos alunos e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica, que me auxiliaram muito e dividiram comigo bolos e comidinhas deliciosas tantas vezes. Em especial à Dra. Rosely Ana Piccolo Grandi, pelo seu constante apoio na identificação dos fungos encontrados, e à Marcela C. Boro, pelo apoio técnico.

Aos alunos e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Anatomia, em especial à Dra. Adriana Hissae Hayashi, por me permitir utilizar a estrutura do laboratório de anatomia e pelas diversas vezes que me ajudou a resolver dilemas na longa jornada com a anatomia de minhas sementes.

À Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro, pela co-orientação, que foi imprescindível para a finalização das análises anatômicas. Agradeço aos alunos e funcionários do Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Estadual de Campinas, onde realizei a maior parte das análises anatômicas presentes nesta tese.

Ao Dr. Danilo da Cruz Centeno, pela imensa colaboração nas análises metabólicas, desde o início desta tese, no Instituto de Botânica e, então, posteriormente, na UFABC, onde trabalha.

À Dra. Christiane Ceriani Aparecido, ao Dr. Ricardo Harakava e a Ingridi Ariel, do Instituto Biológico de São Paulo, pela colaboração e identificação dos fungos.

Ao Dr. Claudio José Barbedo, pela amizade, pela orientação, desde a iniciação científica, por todas as palavras de incentivo e por estar sempre presente. Agradeço por ter feito parte desse grupo maravilhoso de orientados do Claudio.

Aos amigos que fiz nesta etapa da vida e que irei levar comigo sempre.

A minha família, por todo o apoio e incentivo.

Resumo: A necessidade de manter úmidas as sementes intolerantes à dessecação (recalcitrantes) favorece a proliferação de microrganismos, principalmente os fungos, acelerando consideravelmente a velocidade de deterioração. Entretanto, no armazenamento dessas sementes, com alto teor de água, o tratamento químico não tem apresentado eficácia para controle de fungos. Por sua vez, métodos alternativos ao tratamento químico, como os térmicos (imersão em água por diferentes temperaturas e tempos de exposição) e os osmóticos (imersão por 7 dias em soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) em diferentes potenciais hídricos), podem auxiliar na viabilização do armazenamento de sementes recalcitrantes. Apesar de recentes estudos apontarem alguma eficácia de tais tratamentos em sementes de *Eugenia* sp., pouco se sabe sobre seus efeitos no metabolismo e na estrutura dessas sementes. Além disso, também é desconhecida, ainda, a parcela do controle dos microrganismos decorrentes da ação do tratamento diretamente sobre eles e a parcela decorrente das transformações metabólicas nas sementes. O presente trabalho objetivou analisar as transformações metabólicas dos tratamentos térmicos e osmóticos sobre as sementes recalcitrantes de *Eugenia brasiliensis* e *E. pyriformis*, procurando associá-las a possíveis respostas dessas sementes ao ataque de microrganismos. Para tanto, sementes foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos e osmóticos e analisadas quanto ao teor de água, potencial hídrico, qualidade fisiológica (sementes germináveis e germinação) e sanitária (incidência e severidade) e foram submetidas a análises estruturais (anatomia e histoquímica) e bioquímicas (perfil metabólico). Além disso, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., fungos de maior resistência e persistência nas sementes após os tratamentos e os períodos de armazenamento, foram isolados e analisados *in vitro* quanto à sua resistência aos estresses térmicos e hídricos. Os resultados evidenciaram a ocorrência de alterações metabólicas nas sementes, provocadas pelos tratamentos osmóticos e térmicos, sendo que tais alterações estão em grande parte relacionadas ao resultado desses tratamentos no controle dos fungos. O tratamento térmico foi o que apresentou melhor resultado de qualidade fisiológica e sanitária

em ambas as espécies analisadas, inclusive após armazenamento. Além disso, os tratamentos físicos aplicados diretamente nos fungos obtiveram resultados diferentes no desenvolvimento dos mesmos em relação ao observado nas sementes. O tratamento térmico controlou os fungos quando aplicado diretamente, contudo o tratamento osmótico não alterou significativamente o desenvolvimento dos mesmos.

Palavra chave: tratamentos físicos, fitopatologia, sementes recalcitrantes, controle de fungos, severidade.

Abstract: The necessity to keep moist seeds intolerant to desiccation (recalcitrant) favors the proliferation of microorganisms, especially fungi, considerably accelerating the rate of deterioration. However, in the storage of these seeds, with high water content, the chemical control has not shown effectiveness for fungi control. Alternatives to chemical treatments, such as heat (immersion in water at different temperatures and exposure times) and osmotic (immersion for 7 days in solutions of polyethylene glycol (PEG 6000) in different water potentials), may help recalcitrant seed storage. Although recent studies indicate some efficacy of such treatments on *Eugenia* sp. seeds, little is known about their effects on the metabolism and structure of these seeds. Moreover, is also unknown the portion of the microorganisms control due to the direct action of the treatment on them and the portion resulting from the metabolic transformations in the seeds. The present work aimed to analyze the metabolic transformations of the heat and osmotic treatments on the recalcitrant seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis*, seeking to associate them with possible responses of these seeds to the attack of microorganisms. Seeds were submitted to different heat and osmotic treatments and analyzed for water content, water potential, physiological quality (germinable seeds and germination) and sanitary conditions (incidence and severity) and submitted to structural (anatomy and histochemistry) and biochemical (metabolic profile) analysis. In addition, *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp., fungi of higher resistance and persistence in these seeds after the treatments and storage periods, were isolated and analyzed *in vitro* for their resistance to osmotic and heat treatments. The results evidenced the occurrence of metabolic changes in the seeds caused by the osmotic and thermal treatments, and these changes are largely related to the results of these treatments in fungi control. The heat treatment showed the best result of physiological and sanitary quality in both species analyzed, even after storage. In addition, physical treatments applied directly obtained different results in fungal growth compared to that observed in seeds. The heat treatment

controlled the fungi when applied directly, however the osmotic treatment did not significantly alter their development.

Key words: Physical treatments, phytopathology, recalcitrant seeds, fungus control, severity.

SUMÁRIO

1. Introdução geral	1
1.1. Revisão de literatura	5
1.1.1. Tratamentos de Sementes	5
1.1.2. Mecanismos de Proteção em sementes	7
1.1.3. Sementes de espécies de <i>Eugenia</i> sp.	9
1.2. Referências bibliográficas	12
2. Capítulo 1 - Osmotic and heat treatments on control of fungi associated with seeds of <i>Eugenia brasiliensis</i> and <i>E. pyriformis</i> (Myrtaceae).....	16
Introduction	19
Material and Methods	20
Results and Discussion	23
Conclusions	26
Acknowledgments	26
References	27
3. Capítulo 2 - <i>Penicillium</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp. oriundos de sementes de <i>Eugenia</i> sp.: importância, identificação e influência de tratamentos físicos em seu desenvolvimento	36
3.1. Introdução	37
3.2. Material e métodos	38
3.3. Resultados.....	42
3.4. Discussão	47
3.5. Conclusão	50
3.6. Referências bibliográficas	51
4. Capítulo 3 - Reações metabólicas em sementes de <i>E. pyriformis</i> submetidas a tratamentos osmótico (osmoterapia) e térmico (termoterapia)	53
4.1. Introdução	54
4.2. Material e Métodos	55
4.3. Resultados.....	60
4.4. Discussão	73
4.5. Referências bibliográficas	80
5. Capítulo 4 - Reações metabólicas de diferentes safras de sementes de <i>E. brasiliensis</i> submetidas a tratamentos osmótico (osmoterapia) e térmico (termoterapia).....	84
5.1. Introdução	85
5.2. Material e Métodos	86
5.3. Resultados.....	92

5.4. Discussão	119
5.5. Conclusão	125
5.6. Referências bibliográficas	126
6. Considerações Finais	129
6.1. Referências bibliográficas	131
7. Anexos	132

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1. Incidence (%) of *Penicillium* sp. (a) and *Fusarium* sp. (b) in seeds of *E. pyriformis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days). Black bars: non-stored seeds; gray bars: after 30 days of storage; white bars: after 60 days of storage. The means and standard deviations are shown. 32

Figure 2. Severity (%) initially (a and b) and after storage for 30 (c and d) and 60 days (e and f) of *Penicillium* sp. (a, c and e) and *Fusarium* sp. (b,d and f) in seeds of *E. pyriformis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days). Caption: Zero - seed not infected by the analyzed fungus; Traces - small colonies, and in a very small number; Low - weak and sparse growth up to 40% of the seed; Moderate - moderate growth from 41 to 100% of the seed, with colonies with superficial and slow growth; High - intense growth from 41 to 100% of the seed, with dense and evenly distributed colony. Means are show in percentage terms. 33

Figure 3. Incidence (%) of *Penicillium* sp. (a) and *Fusarium* sp. (b) in seeds of *E. brasiliensis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days). Black bars: non-stored seeds; gray bars: after 30 days of storage; white bars: after 60 days of storage. The means and standard deviations are shown. 34

Figure 4. Severity (%) initially (a and b) and after storage for 30 (c and d) and 60 days (e and f) of *Penicillium* sp. (a, c and e) and *Fusarium* sp. (b,d and f) in seeds of *E. brasiliensis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days). Caption: Zero - seed not infected by the analyzed fungus; Traces - small colonies, and in a very small number; Low - weak and sparse growth up to 40% of the seed; Moderate - moderate growth from 41 to 100% of the seed, with colonies with superficial and slow growth; High - intense growth from 41 to 100% of the seed, with dense and evenly distributed colony. Means are show in percentage terms. 35

Figura 5. Escala visual do desenvolvimento das colônias no teste de unidade formadora de colônia (UFC), considerando desenvolvimento: a) fraco, com presença espaçada e irregular de UFC por toda a placa; b) moderado, grande quantidade de UFC por toda a placa, mas unidades de colônia sem sobreposição; e c) intenso, UFC em grande quantidade por toda a placa, crescendo muito próximas e geralmente sobrepostas. 41

Figura 6. Número de unidade formadora de colônia (UFC) da suspensão de esporos (10^5 esporos ml^{-1}) de *Penicillium aculeatum* (a) e *Fusarium verticillioides* (b) submetidas aos tratamentos térmicos de 45 °C, 55 °C e 65 °C durante 30, 90 e 150 minutos cada. A testemunha corresponde à suspensão de esporos sem tratamento térmico. São apresentadas as médias e os desvios-padrão. 43

Figura 7. Teste de crescimento radial da suspensão de esporos (10^5 esporos ml^{-1}) de *Penicillium aculeatum* (a) e *Fusarium verticillioides* submetida aos tratamentos térmicos de 45 °C, 55 °C e 65 °C durante 30, 90 e 150 minutos (min.) cada. A testemunha corresponde à suspensão de esporos sem tratamento térmico. São apresentadas as médias. 44

Figura 8. Desenvolvimento de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Penicillium aculeatum* (a) e *Fusarium verticillioides* (b) após aplicação dos tratamentos osmóticos de -3,4 MPa, -5,0 MPa, -10,0 MPa e -15,0 MPa. Foi considerado crescimento: nulo (ausência de UFC na superfície da placa); fraco (presença espaçada e irregular de UFC por toda a placa); moderado (grande quantidade de UFC por toda a placa, mas unidades de colônia sem sobreposição); ou intenso (UFC em grande quantidade por toda a placa, crescendo muito próximas e geralmente sobrepostas). São apresentadas as médias em porcentagem (%). 45

Figura 9. Teste de crescimento radial da suspensão de esporos de *Penicillium aculeatum* (a) e *Fusarium verticillioides* (b) submetida aos tratamentos osmóticos de -3,4 MPa, -5 MPa, -10 MPa e -15 MPa. A testemunha corresponde à colônia inoculada sem tratamento osmótico. São apresentadas as médias. 46

Figura 10. Teor de água (%), sementes germináveis (%), potencial hídrico (-MPa) e germinação (%), de sementes de *Eugenia pyriformis* tratadas. Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T_0/T_{0A}), 55°C/30min (T_1/T_{1A}), -3,4MPa/7dias (T_2/T_{2A}) e 55°C/30min com -3,4MPa/7dias (T_3/T_{3A}). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas: compara os tratamentos dentro de cada período de armazenamento; maiúsculas: comparação de cada tratamento sem armazenamento com o seu correspondente armazenado) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 61

Figura 11. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia pyriformis* submetidos aos tratamentos físicos e armazenadas por 30 dias. Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T_0/T_{0A}), $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ (T_1/T_{1A}), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_2/T_{2A}) e $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_3/T_{3A}). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente..... 63

Figura 12. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de *Eugenia pyriformis* submetidos aos tratamentos físicos. Tratamentos: testemunha (T_0), $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ (T_1), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_2) e $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_3). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. 65

Figura 13. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*. Tratamentos: testemunha (T_0), $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ (T_1), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_2) e $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7$ dias (T_3). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (T_0). 66

Figura 14. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de *Eugenia pyriformis* submetidos aos tratamentos físicos e armazenadas por 30 dias. Tratamentos: testemunha (T_{0A}), $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ (T_{1A}), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_{2A}) e $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_{3A}). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. 68

Figura 15. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*. Tratamentos após armazenamento de 30 dias: testemunha (T_{0A}), $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ (T_{1A}), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_{2A}) e $55^\circ\text{C}/30\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_{3A}). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (T_{0A}). 69

Figura 16. Secções longitudinais de sementes, do tratamento controle (T_0), de *E. pyriformis*. 1 e 2: coradas em Azul de Toluidina, evidenciando: tegumento (te), epiderme do embrião (seta), mesofilo (me), feixes vasculares (fv), idioblastos (*) e região de intersecção entre os cotilédones (ri). 3, 5 e 7: Teste de Cloreto de Ferro III corando compostos fenólicos. 4: teste de Vermelho de Rutênio corando as substâncias pécticas. 6 e 8: Teste com Lugol corando os grânulos de amido. 3: detalhe do tegumento com idioblastos contendo compostos fenólicos

(seta). 5: idioblastos com compostos fenólicos (*) nas primeiras camadas abaixo da epiderme do embrião. 7: idioblastos com compostos fenólicos (seta). Barras de escala: 2, 5, 6, 7 e 8: 20 μm ; 1 e 3: 100 μm ; e 4: 200 μm 71

Figura 17. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, sem armazenamento e após 30 dias de armazenamento, da Safra 2012 (S_1T_0/ S_1T_0A) e da Safra 2013 (S_2T_0/ S_2T_0A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. 93

Figura 18. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis*, sem armazenamento e após 30 dias de armazenamento, da Safra 2012 (S_1T_0/ S_1T_0A) e da Safra 2013 (S_2T_0/ S_2T_0A). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média de S_1T_0 95

Figura 19. Teor de água (%), sementes germináveis (%), germinação (%) e potencial hídrico (-MPa), da Safra 2012 (S_1) e da Safra 2013 (S_2) de sementes de *Eugenia brasiliensis* tratadas. Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T_0), $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ (T_1), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_2) e $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (T_3). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas: compara os períodos de armazenamento dentro de cada safra; maiúsculas: comparação entre as safras dentro de cada período de armazenamento) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 96

Figura 20. Incidência de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. em sementes de *E. brasiliensis* do Safra 2012 (S_1) submetidas a tratamentos físicos e armazenadas (A). Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (S_1T_0/ S_1T_0A), $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ (S_1T_1/ S_1T_1A), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_1T_2/ S_1T_2A) e $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_1T_3/ S_1T_3A). É apresentada as medias e o desvio padrão. 98

Figura 21. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, inicialmente e após 30 dias de armazenamento (A), da Safra 2012 (S_1). Tratamentos (sem armazenamento /armazenado): testemunha (S_1T_0/ S_1T_0A), $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ (S_1T_1/ S_1T_1A), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_1T_2/ S_1T_2A) e $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_1T_3/ S_1T_3A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. 100

Figura 22. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis* pertencentes a Safra 2012 (S_1). Tratamentos: testemunha (S_1T_0), $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ (S_1T_1), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_1T_2) e $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_1T_3). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras

representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (S_1T_0). 101

Figura 23. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis* pertencentes à Safra 2012 (S_1) e armazenados por 30 dias (A). Tratamentos: testemunha (S_1T_0A), 55°C/150min (S_1T_1A), -3,4MPa/7dias (S_1T_2A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S_1T_3A). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (S_1T_0A). 102

Figura 24. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, pertencentes à Safra 2012 (S_1), submetidos aos tratamentos físicos. Tratamentos: testemunha (S_1T_0), 55°C/150min (S_1T_1), -3,4MPa/7dias (S_1T_2) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S_1T_3). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. 104

Figura 25. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, pertencentes à Safra 2012 (S_1), submetidos aos tratamentos físicos e armazenados por 30 dias (A). Tratamentos: testemunha (S_1T_0A), 55°C/150min (S_1T_1A), -3,4MPa/7dias (S_1T_2A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S_1T_3A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente..... 106

Figura 26. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, inicialmente e após 30 dias de armazenamento (A), da Safra 2013 (S_2). Tratamentos (sem armazenamento /armazenado): testemunha (S_2T_0/ S_2T_0A), 55°C/150min (S_2T_1/ S_2T_1A), -3,4MPa/7dias (S_2T_2/ S_2T_2A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S_2T_3/ S_2T_3A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. 109

Figura 27. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis* pertencentes à Safra 2013 (S_2). Tratamentos: testemunha (S_2T_0), 55°C/150min (S_2T_1), -3,4MPa/7dias (S_2T_2) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S_2T_3). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (S_2T_0). 110

Figura 28. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis* pertencentes à Safra 2013 (S_2) e armazenados por 30 dias (A). Tratamentos: testemunha (S_2T_0A), 55°C/150min (S_2T_1A), -3,4MPa/7dias (S_2T_2A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S_2T_3A). Compostos foram

identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (S_2T_0A). 111

Figura 29. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, pertencentes à Safra 2013 (S_2), submetidos aos tratamentos físicos. Tratamentos: testemunha (S_2T_0), $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ (S_2T_1), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_2T_2) e $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_2T_3). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente. 113

Figura 30. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, pertencentes à Safra 2013 (S_2), submetidos aos tratamentos físicos e armazenados por 30 dias (A). Tratamentos: testemunha (S_2T_0A), $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ (S_2T_1A), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_2T_2A) e $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_2T_3A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente..... 115

Figura 31. Secções longitudinais de sementes, do tratamento controle, de *E. brasiliensis* 1 e 2: coradas em Azul de Toluidina, evidenciando: tegumento (te), epiderme (seta), mesofilo (me), cavidade secretora (cs), idioblastos (*) e região de intersecção entre os cotilédones (ri). 3 e 4: Teste de Cloreto de Ferro III corando compostos fenólicos. 4: envoltório com células colapsadas e por vezes preenchidas de compostos fenólicos (seta). 5: teste de Vermelho de Rutênio corando as substâncias pécticas presentes nas paredes. 6: Teste de Lugol corando amido. Barras de escala: 2: $50\ \mu\text{m}$; 1, 3, 4 e 6: $100\ \mu\text{m}$; 5: $200\ \mu\text{m}$ 117

ÍNDICE DE TABELAS

Table 1. Germinable seeds (%), germination (%) and abnormal seeds (%) initially and after 30 and 60 days of storage, of *Eugenia pyriformis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days)⁽¹⁾. 29

Table 2. Germinable seeds (%), germination (%) and abnormal seeds (%), initially and after 30 and 60 days of storage of *Eugenia brasiliensis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Term-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days)⁽¹⁾. 30

Table 3. Water content (%), initially and after 30 and 60 days of storage, of *E. pyriformis* and *Eugenia brasiliensis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days)⁽¹⁾. 31

Tabela 4. Teor de água (%), potencial hídrico (-MPa), sementes germináveis (%) e germinação de sementes de *Eugenia brasiliensis*, tratadas e após 30 dias de armazenamento (A), pertencentes a Safra 2012 (S₁). Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T₀/T₀A), 55°C/150min (T₁/T₁A), -3,4MPa/7dias (T₂/T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (T₃/T₃A)⁽¹⁾. 97

Tabela 5. Teor de água (%), potencial hídrico (-MPa), sementes germináveis (%) e germinação de sementes de *Eugenia brasiliensis*, tratadas e após 30 dias de armazenamento (A), pertencentes a Safra 2013 (S₂). Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T₀/T₀A), 55°C/150min (T₁/T₁A), -3,4MPa/7dias (T₂/T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (T₃/T₃A)⁽¹⁾. 107

ANEXOS

Anexo I - Figura A. <i>Eugenia brasiliensis</i> : grumixameira (a), suas flores (b) e frutos (d), mostrando um fruto maduro (*) e <i>E. pyriformis</i> : uvaieira (e), suas flores (c) e frutos (f), mostrando um fruto maduro (**). Semente com protrusão da raiz, semente germinável (I), e desenvolvimento da parte aérea (II) até formação da plântula normal, germinação (III).....	132
Anexo II - Estudos moleculares para identificação de isolados de <i>Fusarium</i> e <i>Penicillium</i>	133

1. Introdução geral

A necessidade de manter úmidas as sementes intolerantes à dessecação (recalcitrantes) favorece a proliferação de microrganismos, principalmente os fungos, acelerando consideravelmente a velocidade de deterioração (Barbedo & Marcos Filho 1998, Andréo *et al.* 2006, Parisi *et al.* 2013). A atuação dos fungos na deterioração durante o armazenamento de sementes recalcitrantes tem sido foco de alguns poucos trabalhos nos últimos anos e tem-se verificado que há diferenças em relação ao conhecimento clássico descrito para sementes tolerantes à dessecação, conhecidas como ortodoxas (Sutherland *et al.* 2002, Oliveira *et al.* 2011, Berjak *et al.* 2014, Françaoso & Barbedo 2016).

Berjak (1996), por exemplo, considerou que a deterioração das sementes recalcitrantes oferece condições para os fungos proliferarem e que a própria micota pode intensificar a taxa de deterioração das sementes, podendo ambos os fatores estar simultaneamente envolvidos. Sugeriu, ainda, que a remoção da principal fonte de inóculo poderia propiciar o aumento da longevidade das sementes intolerantes à dessecação.

Uma das formas de reduzir, ou até remover, essa fonte de inóculo é o tratamento de sementes (Mendes *et al.* 2001). O controle químico tem sido a forma mais comumente utilizada para esse tratamento (Mendes *et al.* 2001), mas requer a manutenção de registro de produtos para a espécie, o que não ocorre para muitas espécies florestais (Parisi *et al.* 2011). Os tratamentos físicos, como a termoterapia (em água quente) e o condicionamento osmótico (em soluções de potencial hídrico controlado), por sua vez, podem controlar os patógenos, mas dependem do conhecimento da sensibilidade diferencial a tais estresses (térmico ou hídrico) entre a semente e o patógeno (Oliveira *et al.* 2011).

O tratamento térmico já é amplamente conhecido e utilizado para diversas espécies e estruturas vegetais, mas o condicionamento osmótico, como método para controle de fungos, tem sido analisado apenas mais recentemente (Oliveira *et al.* 2011, Françaoso & Barbedo 2014). A técnica do armazenamento das sementes em soluções osmóticas foi utilizada para

sementes de *Inga vera*, espécie nativa que produz sementes das mais intolerantes, mas com o objetivo de reduzir o metabolismo intenso dos embriões por meio da regulação da mobilização da água (Andréo *et al.* 2006). Esse método pode auxiliar também no controle de patógenos, uma vez que o controle da atividade da água pode inibir ou mesmo cessar o crescimento dos fungos (Oliveira *et al.* 2011).

Françoso & Barbedo (2014) observaram que os tratamentos térmico e osmótico aplicados às sementes de *Eugenia brasiliensis* e *E. uniflora* apresentaram resultados promissores na manutenção da qualidade fisiológica das sementes e na redução da incidência da maioria dos fungos presentes, com exceção de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Fusarium sp. e *Penicillium* sp. são fungos de considerável importância para a redução da conservação de sementes de *Eugenia* sp., devido à sua maior resistência e persistência no armazenamento, mesmo após termoterapia e osmoterapia (Françoso & Barbedo 2014). Tais tratamentos tem apresentado alguma eficiência no controle desses fungos, contudo, são observadas divergências nos resultados dos tratamentos. Em *E. brasiliensis*, por exemplo, os autores observaram que o tratamento térmico de 55°C por 30 minutos reduziu de 71% para 17% a incidência de *Penicillium* sp., que se manteve abaixo dos 15% até os 60 dias de armazenamento. Mas ao se associar o tratamento térmico ao osmótico, apesar de controlar inicialmente, aos 60 dias de armazenamento a incidência do fungo chegou a 67%. E embora o tratamento de 55°C por 30 minutos tenha controlado a incidência de *Penicillium* sp., com o aumento do tempo de exposição (55°C por 150 minutos) o tratamento não foi eficiente no controle. Já em *E. uniflora* os tratamentos de 55 e 60 °C por 120 minutos levaram a aumento de até 90% na incidência do fungo.

De modo geral, é observado que os tratamentos vêm influenciando diferentemente na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de espécies diferentes ou na mesma espécie, mas de coletas de anos diferentes. Apesar dos recentes resultados apontarem alguma eficácia dos tratamentos térmicos e osmóticos, pouco se sabe de seus efeitos no metabolismo e estrutura

das sementes. Desse modo, objetiva-se analisar o nível de contribuição dos efeitos direto (sobre os fungos) e indireto (sobre as sementes) dos tratamentos térmicos e osmóticos em sementes de *Eugenia pyriformis* e *Eugenia brasiliensis*.

Para tanto, as sementes tratadas por osmoterapia e termoterapia foram avaliadas quanto sua estrutura (anatômica e histoquimicamente) e metabolismo (análise de perfil metabólico).

Buscando determinar o efeito da termoterapia e da osmoterapia quando aplicadas diretamente nos fungos, foram avaliados *in vitro* os binômios tempo-temperatura e o potencial hídrico da solução osmótica que apresentam ação debilitante e/ou letal para os fungos. Colônias de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. isolados de *E. brasiliensis* foram identificadas e submetidas aos tratamentos físicos, onde foi avaliado o crescimento e o desenvolvimento da colônia após aplicação desses tratamentos.

Inicialmente, a seleção dos tratamentos térmicos e osmóticos a serem aplicados nas sementes de *Eugenia* sp. se baseou apenas na manutenção da qualidade fisiológica das sementes e no controle mais eficiente da incidência de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., que foram os fungos de maior importância nas espécies de *Eugenia* estudadas (Oliveira *et al.* 2011, Françoso & Barbedo 2014). Contudo, constatou-se, na primeira safra de *E. brasiliensis* estudada neste trabalho, a necessidade de refinar a avaliação do controle sanitário. Assim sendo, além da porcentagem de sementes infectadas pelos fungos (incidência), também foi avaliado o grau de infecção na superfície das sementes (severidade) de *E. pyriformis* e da segunda safra de *E. brasiliensis*, baseando-se em estudos de severidade como o de Moraes *et al.* (2003).

Desse modo, as análises estruturais (anatomia e histoquímica) e bioquímicas (perfil metabólico) foram realizadas nos tratamentos que, além de manter a qualidade fisiológica das sementes, apresentaram os resultados mais promissores e significativos no controle da severidade de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Os resultados obtidos foram organizados em quatro capítulos:

- Capítulo 1 - Osmotic and heat treatments on control of fungi associated with seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis* (Myrtaceae)

Neste capítulo foram incluídos integralmente os resultados de qualidade fisiológica (sementes germináveis e germinação) e sanitária (incidência e severidade) de sementes de *Eugenia brasiliensis* e *E. pyriformis*, ambas safras de 2013. O capítulo corresponde ao artigo publicado em “Jornal of Seed Science” (Françoso & Barbedo 2016) e está apresentado segundo as normas para publicação no mesmo.

- Capítulo 2 - *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. oriundos de sementes de *Eugenia* sp.: importância, identificação e resistência a tratamentos físicos

Neste capítulo se analisou o desenvolvimento de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. submetidos aos tratamentos físicos (termo e osmoterapia), aplicados *in vitro*, além das etapas que envolveram o isolamento e identificação desses fungos.

- Capítulo 3 - Reações metabólicas em sementes de *E. pyriformis* submetidas a tratamentos osmóticos (osmoterapia) e térmicos (termoterapia)

Análises bioquímicas (perfil metabólico) e estruturais (anatomia e histoquímica) foram realizadas em sementes de *E. pyriformis*, safra coletado em outubro de 2013, para se verificar possíveis alterações decorrentes da aplicação dos tratamentos.

- Capítulo 4 - Reações metabólicas de diferentes safras de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamentos osmótico (osmoterapia) e térmico (termoterapia)

Neste capítulo foram incluídos os resultados das análises bioquímicas (perfil metabólico) e estruturais (anatomia e histoquímica) realizadas em duas safras de sementes de *E. brasiliensis*, coletados em dezembro de 2012 e em dezembro de 2013, para se verificar possíveis alterações decorrentes da aplicação dos tratamentos.

1.1. Revisão de literatura

1.1.1. Tratamentos de Sementes

O tratamento de sementes pode manter ou melhorar a qualidade sanitária da semente, evitando a disseminação de microrganismos patogênicos e controlando sua transmissão por sementes, sendo realizado através do controle químico, físico ou biológico. No controle químico, é feita a adição de produtos químicos sintéticos às sementes. Já no controle biológico, há incorporação de microrganismos antagonistas aos presentes nas sementes. Por fim, no controle físico, as sementes são expostas à ação do calor ou de outro agente físico controlado (Mendes *et al.* 2001, Menten 1991).

Alguns trabalhos têm sido realizados buscando o controle dos patógenos em sementes recalcitrantes. O tratamento químico apresentou um bom controle de fungos em sementes de *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. (Calistru *et al.* 2000) e *Inga vera* (Parisi *et al.* 2016). Contudo, embora o controle químico seja a forma mais comumente utilizada no controle de patógenos em sementes (Mendes *et al.* 2001), há sempre riscos ambientais. Dentre estes, pode-se citar a contaminação ambiental, a resistência de patógenos, o desequilíbrio biológico, a eliminação de organismos benéficos e o comprometimento da biodiversidade (Bettioli & Ghini 2003).

Além da falta de produto registrado para o tratamento de sementes de espécies nativas, muitos desses produtos químicos têm também o potencial de se tornarem tóxicos às sementes e plântulas emergentes (Parisi *et al.* 2011). Assim sendo, outros autores tem buscados tratamentos alternativos aos fungicidas, utilizando-se de termo e osmoterapia (Oliveira *et al.* 2011, França & Barbedo 2014, França & Barbedo 2016)

Segundo Edney & Burchill (1967), a falta de proteção residual contra a recontaminação por patógenos oportunistas e injúrias promovidas no hospedeiro representa a maior limitação ao uso de termoterapia, o que também foi apontado por Oliveira *et al.* (2011) para o tratamento osmótico.

Sabe-se que o tratamento térmico baseia-se no efeito das temperaturas elevadas sobre a atividade celular dos patógenos, sendo que o mecanismo mais provável responsável pela morte em altas temperaturas seja a desnaturação de proteínas e enzimas, importantes para o metabolismo celular. A maioria dos microrganismos fitopatogênicos apresenta ponto térmico letal a temperaturas na faixa entre 45 e 60 °C (Cochrane 1958, Deverall 1965), como foi observado por Tanaka *et al.* (2003) no tratamento térmico de água de irrigação para *Colletotrichum acutatum* Simmonds, *C. fragariae* Brooks, *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav., *Pythium* sp., *Phytophthora cactorum* (Leb & Cohn) Schroet., *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell.) Sacc. f. sp. *meridionales* Morgan-Jones, *Fusarium* spp., *F. subglutinans* Nelson *et al.* f. sp., *F. solani* (Mart.) Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. e *Verticillium dahlia* Kleb.

Já o condicionamento osmótico como método para controle de fungos, por sua vez, tem sido analisado mais recentemente. A técnica do armazenamento das sementes em soluções osmóticas foi utilizada para sementes recalcitrantes de *Inga vera* (Andréo *et al.* 2006), mas com o objetivo de reduzir o metabolismo intenso dos embriões por meio da regulação da mobilização da água. De acordo com Marcos Filho (2005), para sementes ortodoxas a hidratação controlada promove a atividade de mecanismos de reparo das membranas e de componentes da estrutura celular, com redução da liberação de exsudados durante a embebição e, conseqüentemente, menor ocorrência de microrganismos associados às sementes. Esse método poderia, portanto, auxiliar no controle de patógenos, uma vez que a atividade da água e o seu potencial hídrico podem determinar o comportamento dos diferentes fungos (Hopkins & Mcquilken 2000). Segundo Cochrane (1958), a tolerância à elevada pressão osmótica é específica, sendo que a maioria dos fungos tem seu crescimento inibido nessas condições.

1.1.2. Mecanismos de Proteção a patógenos em sementes

A penetração e a colonização dos tecidos das sementes pelos patógenos podem ocorrer desde a formação das sementes, conforme foi observado em sementes de pau-brasil, até os primeiros estádios do desenvolvimento das plântulas (Menten & Bueno 1987, Lisboa-Padulla *et al.* 2010).

Os microrganismos associados às sementes podem ser benéficos, neutros ou patogênicos às sementes e/ou plântulas delas originadas. Quando patogênicos os fungos podem depreciar a qualidade das sementes ocasionando, por exemplo, descoloração, apodrecimento e alterações de seus compostos, o que pode prejudicar tanto a viabilidade como o valor comercial e nutritivo das sementes e, por fim, levar a perda do poder germinativo. Também podem ser provocados danos à plântula, como podridão radicular, tombamento, manchas necróticas em folhas, caules e frutos, deformações com hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos e infecções latentes (Neergaard 1979, Menten & Bueno 1987, Menten 1991).

Os patógenos são capazes de se associar externamente e internamente à semente, mas podem também acompanhá-la aderidos a detritos vegetais e partículas de solo. No caso de associação interna os fungos estão presentes no endosperma, no embrião ou sob o tegumento, podendo causar a destruição dos cotilédones. A disseminação e a manutenção da viabilidade dos fungos são favorecidas pela associação destes às sementes, onde tais patógenos apresentam maiores chances de sobrevivência por ficarem protegidos contra a maioria dos tratamentos que controlam, com eficiência, os patógenos de sementes transmitidos externamente (Dhingra *et al.* 1980, Machado 1988, Santos *et al.* 2000).

Sabe-se que a interação e a competição entre os fungos podem figurar entre os maiores e mais significativos fatores na sucessão dos fungos no armazenamento (Berjak 1987), contudo também se deve levar em conta a interação e competição entre patógeno e hospedeiro, no caso a semente. Esta, por sua vez, possui seus mecanismos de defesa que, embora extensamente estudados em tecidos vegetais, poucos estudos têm como foco as sementes.

A exposição das plantas a fatores do ambiente (variações na temperatura, umidade e radiação) e a agentes biológicos (fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos e herbívoros) faz com que necessitem reagir contra esses estresses. As plantas respondem ao ataque inicial dos patógenos por ativação de mecanismos de defesa, razão pela qual a infecção pelo patógeno resulta em danos reduzidos na planta, pois interferem na severidade da doença causada pelo patógeno. Em células vegetais são encontradas tanto defesas pré-formadas quanto induzidas (Hammond-Kosack & Jones 2000).

A defesa pré-formada é o principal mecanismo no caso de resistência não específica, em que as plantas sintetizam peptídeos, proteínas e metabólitos secundários, formando barreiras estruturais e compostos tóxicos, como alguns compostos fenólicos, que restringem a infecção por patógenos (Heath 2000).

Os mecanismos de defesa induzida envolvem reações da planta ligadas à ativação de genes de defesa para reação de hipersensibilidade (RH), resistência sistêmica adquirida e produção de lignina, enzimas hidrolíticas e fitoalexinas (Dangl *et al.* 2000). As plantas comumente respondem ao patógeno, com manifestação oxidativa gerando formas reativas de oxigênio (FROs), ou ao elicitador. Os elicitores são moléculas capazes de induzir qualquer resposta de defesa, como a síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese, e podem ser bióticos, como proteínas, carboidratos e glicoproteínas, por exemplo, de origem microbiana ou da própria planta, e abióticos (Pascholati & Leite 1995), como estresses térmicos e hídricos, que são os provocados pelos tratamentos térmicos e osmóticos.

1.1.3. Sementes de espécies de *Eugenia* sp.

A família Myrtaceae assume grande importância ecológica nas florestas ombrófilas da costa atlântica do Brasil e em regiões da África, sendo encontrada com grande riqueza de espécies e abundância (Peixoto & Gentry 1990). O gênero *Eugenia*, ao qual pertencem as espécies *Eugenia brasiliensis*, grumixameira, e *E. pyriformis*, uvaieira (Anexo I; Figura A), figura entre os mais importantes na família Myrtaceae, com aproximadamente 1115 espécies (Angiosperm Phylogeny Group 2016) e compreende algumas nativas do Brasil de importância econômica por apresentarem frutos de valor nutritivo (Silva *et al.* 2003). Tais espécies frutíferas também são atrativas para a fauna e apresentam potencial para restauração ecológica (Maluf *et al.* 2003, Resolução SMA 32/2014).

No gênero *Eugenia* o embrião consome todo o endosperma no decorrer do seu desenvolvimento, ou seja, a semente de *Eugenia* é exalbuminosa e seu embrião ocupa toda cavidade delimitada pelo envoltório da semente (Flores & Rivera 1989, Romagnolo & Souza 2006). O embrião é globoso, sem diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones (Barroso *et al.* 2002). Contudo, embora não visto a olho nu, em sementes de *Eugenia pyriformis* é possível identificar o polo embrionário em uma das extremidades da cicatriz rafeal na superfície dos cotilédones, com auxílio de lupa (Justo *et al.* 2007).

Quando as sementes desencadeiam o processo de germinação o desenvolvimento ocorre graças às suas próprias reservas nutritivas, armazenadas principalmente na forma de carboidratos, lipídios e proteínas. Tais reservas são consumidas na germinação e no desenvolvimento do embrião até que ocorra a formação de uma plântula autotrófica. Os carboidratos e os lipídios são utilizados como as principais fontes de energia e carbono, enquanto as proteínas são fonte de nitrogênio e enxofre, indispensáveis para a síntese de novas proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e compostos do metabolismo secundário para o desenvolvimento das plântulas (Buckeridge *et al.* 2004).

O material de reserva em sementes pode ser representado pelo amido, grão de aleurona, óleo e outros, que pode se acumular nos cotilédones ou no eixo hipocótilo-radicular. Espécies do gênero *Eugenia* apresentam, normalmente, baixos teores de lipídios e possuem grânulos de amido como principal reserva de carbono (Luzia *et al.* 2010, Mello *et al.* 2010). Em *Eugenia uniflora*, por exemplo, o amido representou aproximadamente 64% da massa seca da semente (Mello *et al.* 2010).

O amido é um polissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4), originando uma cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α (1 \rightarrow 4) e α (1 \rightarrow 6), formando uma estrutura ramificada. A amilose e amilopectina podem estar organizadas em grãos relativamente densos (de 0,1 a mais de 50 μ m de diâmetro) com uma estrutura interna lamelar, resultando em camadas alternadas semicristalina e amorfa (Taiz & Zeiger 2009), como é o caso observado nos cotilédones das *Eugenias* sp. estudadas.

Os principais açúcares solúveis detectados em *Eugenia uniflora* e *E. pyriformis* são sacarose, frutose, glicose, rafinose e ciclitóis, além de traços de estaquiase (Mello *et al.* 2010, Hell 2014).

A sacarose, um dissacarídeo formado por glicose e frutose, é o açúcar mais abundante e universal das plantas, devido à sua estabilidade estrutural e solubilidade em água, o que a faz o principal carboidrato translocável nas plantas (Dietrich *et al.* 1988). Os carboidratos mais eficientes na diminuição do potencial osmótico são as hexoses e a sacarose. A partir da hidrólise de frutanos, por exemplo, grandes quantidades de frutose e sacarose são disponibilizadas rapidamente, podendo assim atuar como reguladores osmóticos e garantir a sobrevivência e até mesmo o crescimento da planta sob deficiência hídrica (Spollen & Nelson 1994).

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. Dionne *et al.* (2001), estudando diferentes ecotipos de *Poa annua* (Poaceae), também encontraram aumento de monossacarídeos após exposição das plantas ao congelamento.

Outros açúcares também têm sido relacionados à proteção contra estresses ambientais, como os oligossacarídeos da série da rafinose (OSR), evitando a cristalização da sacarose e auxiliando na formação de um estado vítreo, importante processo na tolerância à dessecação em plantas (Caffrey *et al.* 1988). Os ciclítóis galactosilados, açúcares álcoois acumulados em algumas sementes, também foram relacionados à estabilidade de estruturas celulares, de membranas e na formação do estado vítreo (Peterbauer & Richter 2001).

1.2.Referências bibliográficas

- Andréo, Y., Nakagawa, J. & Barbedo, C.J.** 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. affinis (DC.) T.D. Pennington). *Revista Brasileira de Botânica* 29(2): 309-318.
- Stevens, P.S.** 2017. Angiosperm Phylogeny Group, version 13. Disponível em <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html> (acesso em 22-04-2017).
- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botânica Brasilica* 12(2): 145-164.
- Barroso, G.M., Peixoto, A.L., Ichaso, C.L.F., Guimarães, E.F. & Costa, C.G.** 2002. Sistemática de angiospermas do Brasil. 2ª ed. Viçosa: UFV, v.1, 309p.
- Berjak, P.** 1987. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. Proceedings, An advanced International Course on Seed Pathology, Passo Fundo, RS. Embrapa/Abrates, pp. 93-112.
- Berjak, P.** 1996. The role of micro-organisms in deterioration during storage of recalcitrant and intermediate seeds. *In: Quedraogo, A.S.; Poulsen, N.K.; Stubsgaard, F. (eds.). Workshop on Improved Methods for Handling and Storage of Intermediate/ Recalcitrant Tropical Forest Tree Seeds.* IPGRI, Rome. pp. 121-126.
- Berjak, P., Cherian, J., Makhathini, A.P., Sershen & Pammenter, N.W.** 2014. Embryonic axes of a tropical recalcitrant-seeded species: successful elimination of micro-organisms and potential for zygotic synthetic seed (synseed) production. *Seed Science & Technology* 42(2): 150-160.
- Bettiol, W. & Ghini, R.** 2003. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. *In: Campanhola, C.; Bettiol, W. (eds.) Métodos alternativos de controle fitossanitário,* Jaguariúna; Embrapa Meio Ambiente p.79-96.
- Buckeridge, M.D., Aidar, M.P.M., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S.** 2004. Acúmulo de reservas. *In: Ferreira, A. G. & Borghetti, F. (eds.). Germinação: do básico ao aplicado.* Porto Alegre, Artmed, pp. 31-50.
- Caffrey, M., Fonseca, V. & Leopold, A.C.** 1988. Lipid-sugar interactions. *Plant Physiology*, v. 86, p. 754-758.
- Calistru, C., Mclean, M., Pammenter, N.M. & Berjak, P.** 2000. The effects of Mycofloral infection of the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk) Vierh. *Seed Science Research*, v. 10, pp. 341-353.
- Cochrane, V.W.** 1958. *The Fisiology of Fungi.* New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.

- Dangl, J.L., Dietrich, R.A. & Thomas, H.** 2000. Senescence and programmed cell death. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. Biochemistry e molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, pp.1044-1100.
- Deverall, B.J.** 1965. The physical environment for fungal growth. *In:* Ainsworth, G.C. & Sussman, A.S. (Ed.). The fungi: An advanced treatise. New York: Academic Press, v. 1, pp. 543-560.
- Dietrich, S.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Chu, E.P. & Buckeridge, M.S.** 1988. O açúcar das plantas. *Ciência Hoje* 7(39): 42-48.
- Dionne, J., Castonguay, Y., Nadeau, P. & Desjardins, Y.** 2001. Freezing tolerance and carbohydrate changes during cold acclimation of green-type annual bluegrass (*Poa annua* L.) ecotypes. *Crop Science*, v.41, pp.443-451.
- Dhingra, O.D., Muchovej, J.J. & Cruz Filho, J.** 1980. Tratamento de sementes (controle de patógenos). Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária. 121 p.
- Edney, K.L. & Burchill, R.T.** 1967. The use of heat to control the rotting of Cox's orange apples by *Gloeosporium*. *Annual Applied Biology*, v. 59, pp. 389-400.
- Flores, E.M. & Rivera, D.I.** 1989. Criptocotilia em algumas dicotiledôneas tropicales. *Branesia*, v.32, pp.19-26.
- Françoso, C.F. & Barbedo, C.J.** 2014. Tratamentos osmóticos e térmicos para controle de fungos em sementes de grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Hoehnea* 41(4): 541-552.
- Françoso, C.F. & Barbedo, C.J.** 2016. Osmotic and heat treatments on control of fungi associated with seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis* (Myrtaceae). *Journal of Seed Science* 38(3): 195-203.
- Hammond-Kosack, K. & Jones, J.D.G.** 2000. Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. Biochemistry e molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, pp.1102-1156.
- Heath, M.C.** 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3(4): 315-319.
- Hell, A.F.** 2014. Alterações Metabólicas em função de variáveis ambientais e sua contribuição para a tolerância à perda de água em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. Dissertação, Instituto de Botânica, São Paulo. 89p.
- Hopkins, K.L. & Mcquilken, M.P.** 2000. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. *European Journal of Plant Pathology*, v. 106, pp. 77- 85.

- 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, v.21, pp.539-551.
- 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, v.36, p.32-36.
- Lisbôa-Padulla, T., Moraes, M.H.D., Barbedo, C.J., Borges, I.F., Menten, J.O.M. & Pascholati, S.F.** 2010. Detecção de fungos em sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) coletadas durante sua formação e dispersão. Revista Brasileira de Sementes 32(2): 154-159.
- 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.
- Machado, J.C.** 1988. Tratamento de sementes: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC-ESAL-FAEPE, 106p.
- Maluf, A.M., Bília, D.A. & Barbedo, C.J.** 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. Scientia Agricola 60(3): 471-475.
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 495p.
- 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.
- Mendes, M.A.S.; Lima, P.M.M.P.; Fonseca, J.N.L.; Santos, M.F.** 2001. Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. Fitopatologia Brasileira 26(2): 148-152.
- Menten, J.O.M. & Bueno, J.T.** 1987. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: Soave, J. & Wetzel, M.V.S. Patologia de sementes. Campinas: Fundação Cargill. 480 p.
- Menten, J.O.M.** 1991. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo SP. CibaAgro. 321p.
- Moraes, M.H.D.; Menten, J.O.M.; Gravena, J.C.; Alves, C.A.** 2003. Controle químico de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho: metodologia de avaliação e efeitos sobre a qualidade fisiológica. Fitopatologia Brasileira 28(6): 626-632.
- Neergaard, P.** 1979. Seed Pathology. London. The MacMillan Press. v. 1, 839p.
- Oliveira, C.F.; Oliveira, D.C.; Parisi, J.J.D.; Barbedo, C.J.** 2011. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. Revista Brasileira de Sementes 33(3): 520-532.

- Parisi, J.J.D., Santos, A.F. & Menten, J.O.M.** 2011. Tratamento de sementes florestais. In: Santos, A.F.; Parisi, J.J.D.; Menten, J.O.M. (eds). Patologia de sementes florestais. Colombo, Embrapa Florestas, pp. 105-114.
- Parisi, J.J.D., Biagi, J.D., Barbedo, C.J. & Medina, P.F.** 2013. Viability of *Inga vera* Willd. subsp. affinis (DC.) T. D. Penn. embryos according to the maturation stage, fungal incidence, chemical treatment and storage. *Revista Brasileira de Sementes* 35(1): 70-76.
- Parisi, J.J.D., Biagi, J.D., Medina, P.F. & Barbedo, C.J.** 2016. Fungicide and drying effects on the viability of recalcitrant seeds of *Inga vera* subsp. Affinis. *Tropical plant pathology*, v. 41, pp. 177-182.
- Pascholati, S.F. & Leite, B.** 1995. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L. Manual de fitopatologia. São Paulo: Ceres, pp.417-453.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose Family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*, v.11, pp.185-197.
- 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.
- Secretaria de Estado do Meio Ambiente.** 2014. 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.
- 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*, v.20, pp.529-548.
- Santos A.F., Grigoletti Júnior, A. & Auer, C.G.** 2000. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. *Floresta* 30(1/2): 119-128.
- 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.
- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology*, v.106, pp.329-336.
- Sutherland, J.R., Dikmann, M. & Berjak, P.** (Eds.). 2002. Forests tree seed health for germplasm conservation. Rome: IPGRI, 85p. (Technical Bulletin, n 6).
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2009. Fisiologia Vegetal. 4. ed. Porto Alegre, Artmed. 848 p.
- Tanaka, M.A.S., Ito, M.F., Braga, C.A.S. & Armond, G.** 2003. Tratamento térmico solar da água para controle de fitopatógenos. *Fitopatologia brasileira* 28(Ago): 386-393.

2. Capítulo 1

Osmotic and heat treatments on control of fungi associated with seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis* (Myrtaceae)

Artigo publicado: FRANCO SO, C.F.; BARBEDO, C.J. 2016. Osmotic and heat treatments on control of fungi associated with seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis* (Myrtaceae). *Journal of Seed Science*, Londrina , v. 38, n. 3, p. 195-203.

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

Osmotic and heat treatments on control of fungi associated with seeds of
Eugenia brasiliensis and *E. pyriformis* (Myrtaceae)

Cibelle Ferreira França^{2*}, Claudio José Barbedo²

ABSTRACT - Desiccation sensitive seeds, such as those of *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixama) and *E. pyriformis* Cambess. (uvaia), also known as recalcitrant, need to be stored with high water content and temperatures above 0 °C. Such conditions keep these seeds with high metabolism, thus reducing their longevity, and allowing the development of microorganisms, especially fungi, accelerating their deterioration speed. Heat and osmotic treatments have shown some success for the control of some fungi associated with these seeds. However, to better measure the effectiveness of these treatments, the evaluation criteria needs to be refined, taking into account not only their incidence but also their intensity. Thus, in the present study, the percentage of seeds infected by the fungi (incidence) as well as the degree of infection on the seed surface (severity) of *E. brasiliensis* and *E. pyriformis* were evaluated after applying heat and osmotic treatments which controlled most fungi found in these seeds, except for *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. The evaluation of the severity showed that the effect of the treatments is not only quantitative, reducing the number of infected seeds; there was also a change in the development of the fungi, often reducing the severity of the infection, thus enabling the detection of differences between treatments that were not easily recognized when only using the incidence evaluation.

Index terms: osmotherapy, thermotherapy, severity

¹Submitted on 02/04/2016. Accepted for publication on 07/27/2016.

²Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Sementes, Caixa Postal, 68041, 04301012 – São Paulo, SP, Brasil. Corresponding author < cibelle_ff@hotmail.com >

Fungal severity in seeds of *Eugenia*Tratamentos osmóticos e térmicos no controle de fungos associados a sementes de *Eugenia brasiliensis* e *E. pyriformis* (Myrtaceae)

RESUMO - Sementes intolerantes à desidratação e às baixas temperaturas, como as sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira) e *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaieira), denominadas recalcitrantes, precisam ser armazenadas com alto teor de água e temperaturas acima de 0 °C. Tais condições mantêm as sementes com metabolismo elevado, reduzindo sua longevidade, e propiciam o desenvolvimento de microrganismos, principalmente os fungos, acelerando sua velocidade de deterioração. Resultados recentes apontam algum sucesso dos tratamentos térmicos e osmóticos no controle de alguns fungos associados a essas sementes. Contudo, para melhor aferição da eficácia desses tratamentos há necessidade de refinar os critérios de avaliação, considerando-se não apenas a incidência, mas, também, sua intensidade. Assim, no presente trabalho avaliou-se, além da porcentagem de sementes infectadas pelos fungos (incidência), o grau de infecção na superfície da semente (severidade) de *E. brasiliensis* e *E. pyriformis* após a aplicação de tratamentos térmicos e osmóticos. Os tratamentos osmóticos e térmicos controlam a maioria dos fungos presentes em sementes de *E. brasiliensis* e *E. pyriformis*, mas apresentam baixa eficiência para o controle da incidência de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. A avaliação da severidade permitiu observar que o efeito dos tratamentos não é apenas quantitativo, reduzindo o número de sementes infectadas, ocorrendo também alteração no desenvolvimento dos fungos, por vezes reduzindo a severidade da infecção, permitindo, assim, detectar diferenças entre tratamentos não identificáveis na avaliação da incidência.

Termos para indexação: osmoterapia, termoterapia, severidade

Introduction

Seeds of *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixama) and *E. pyriformis* Cambess. (uvaia), susceptible to dehydration, maintain high metabolism during storage and provide a favorable environment for the development of microorganisms, increasing considerably the speed of deterioration (Delgado and Barbedo, 2012; Parisi et al., 2013; Françaço and Barbedo, 2014). The removal of the main source of inoculum by chemical (fungicides) or physical (heat and osmotic) treatments of seeds can reduce the speed of this deterioration (Oliveira et al., 2011; Françaço and Barbedo, 2014).

The control of fungal development by seed treatment can also be assessed quantitatively, i.e., by evaluating not only the incidence, but also the severity of fungal development. Moraes et al. (2003), for example, found a high correlation between incidence and severity in the seed health tests in corn seeds subjected to chemical control of *Fusarium moniliforme*. However, in recalcitrant seeds, seed health analyses are usually only qualitative (incidence), hindering a more detailed efficiency assessment of treatments for control of associated fungi. This is due, in part, to the lack of an appropriate methodology for quantitative evaluation of seed health tests. Thus, it is difficult to refine the fungi control treatments so that they can be recommended for seeds of *Eugenia*.

In order to obtain a method for refining the evaluation of the treatments effect on fungal development, as well as check the efficiency of heat and osmotic treatments to control fungi associated with seeds of *Eugenia pyriformis* Cambess. and *E. brasiliensis* Lam. (Myrtaceae), in the present study we analyzed the incidence (percentage of infected seeds) and severity (degree of infection on the surface of the seed) of fungi in seeds subjected to such treatments.

Material and Methods

Fruits of *Eugenia pyriformis* and *E. brasiliensis* were collected from mother plants planted in the Jardim Botânico de São Paulo (Botanical Garden), São Paulo state, Brazil (23°38S and 46°37'W), respectively in October and December 2013. The seeds were extracted manually with the help of a sieve under running water; the seeds damaged by insects and immature seeds were eliminated. Then, they were placed in polyethylene bags and stored in a cold chamber at 7°C (Kohama et al., 2006), until experimental setup, not exceeding 15 days.

The experimental design for all experiments, into each species, was completely randomized with a 7x3 factorial arrangement (treatments x storage periods) and four replications. Each species has been subjected to two heat treatments (55 °C for 30 min, called Heat-1; 55 °C for 150 min, called Heat-2) and two osmotic treatments (-3.4 MPa applied only initially, called Osm-1; -3.4 MPa applied initially and reapplied at 30 days of storage, called Osm-2). Seeds that did not receive heat treatment were called Heat-0 and those which received no osmotic treatment were called Osm-0. The association of both types of treatments was also analyzed. In this way, there were seven levels of treatments: Heat-0 Osm-0 (control), Heat-1 Osm-0, Heat-2 Osm-0, Heat-0 Osm-1, Heat-0 Osm-2, Heat-1 Osm-1 and Heat-2 Osm-1. Part of the seeds of each treatment was stored for 30 and 60 days, in polyethylene bags, in a cold chamber at 7°C (Kohama et al., 2006).

For the application of the heat treatment, the seeds were immersed in distilled water, in the ratio of 1:5 (seed : water, in mass), in glass Beckers placed in an air circulation oven, at temperatures and periods described above. The Beckers were periodically shaken and, at the end of the period of exposure, the seeds were cooled with distilled water at room temperature for two hours and placed on filter paper to remove excess surface water (Oliveira et al., 2011; Françoso and Barbedo, 2014).

The osmotic treatment consisted of incubation of seeds in a solution of polyethylene glycol 6000 (PEG) for seven days in germination boxes at 7 °C. After the osmotic treatments, the seeds were washed (five consecutive times) in distilled water to remove the residual PEG solution (Oliveira et al., 2011). The osmotic solutions were prepared by adjusting the concentration of PEG as a function of incubation temperature (Michel and Kauffmann, 1973), and water potential was checked in the gas analyzer WP4 (Decagon, Pullman, USA).

The association of treatments was performed with the heat treatment first and, after the cooling described earlier, the seeds were incubated in the osmotic treatment, following the same procedure of the treatments alone.

The seeds were initially (after extraction) analyzed for water content and for their physiological quality (germinable seeds and germination) and health (health test), as well as after the application of the heat and osmotic treatments and after storage periods of 30 and 60 days.

Water content was determined gravimetrically in an air circulation oven at 103°C for 17 h (ISTA, 2016), using four replicates of five seeds. The results were expressed in percentage terms, on a wet basis.

The germination test was conducted in Germitest paper rolls, previously moistened (Brasil, 2009), kept in germination chambers regulated for 25±1 °C, with continuous light and 100% relative humidity (Delgado and Barbedo, 2007). The evaluations were performed every four days until 70 days (Kohama et al., 2006), recording the percentage of seeds with primary root emission (germinable seeds), normal developed seedlings (germination) and germinable seeds that have not developed seedlings (here referred to as abnormal). For these tests, four replications of 20 and 25 seeds were used respectively for *E. pyriformis* and *E. brasiliensis*.

The health quality of seeds was assessed analyzing the percentage of seeds infected by each fungus (incidence) and the area of the seed covered by the colony (severity).

The seed health test was performed by Blotter Test (Brasil, 2009). The seeds were evenly distributed in Petri dishes (90x15 mm), containing three sheets of filter paper moistened with distilled water and incubated for seven days at $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ and photoperiod of 12 hours of light/dark, using four replications of 20 seeds for *E. pyriformis* and 25 seeds for *E. brasiliensis*, with five seeds per plate. The fungi were identified and counted by examining the fungal colonies developed in the seeds with the aid of a stereoscopic microscope. To calculate the incidence of fungi in seeds, in percentage terms, each fungus was analyzed individually. Each analysis considered the number of seeds with the presence of the analyzed fungus compared with the total number of incubated seeds. In some cases, the identification of the fungus was complemented by the visualization of morphological characteristics in an optical microscope (Barnet and Hunter, 1999).

For the calculation of severity, the development of each fungus on the surface of the seeds was analyzed individually, and quantified by a visual scale, adapted by Moraes et al. (2003) and Tanaka et al. (2003), considering the main physiognomic features, as described below: Zero - seed not infected by the analyzed fungus; Traces - growth up to 10% of the seed, with small colonies, and in a very small number; Low - growth up to 40% of the seed; Moderate - growth from 41 to 100% of the seed, with colonies with superficial and slow growth; High - growth from 41 to 100% of the seed, with a dense and evenly distributed colony. The final evaluation also took into account the percentage of seeds with total absence of fungi (non-infected). The final results were presented in percentage terms.

The assessment of the development of *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp., through incidence and severity, was used as the main benchmark for the analysis of treatments efficiency in controlling fungal development. This was needed because these fungi were recurrent and persistent in *Eugenia* spp. seeds which were stored, both in the present work and in previous studies (Oliveira et al., 2011; Françoso and Barbedo, 2014).

The evaluations of physiological quality were based on the comparison of factorial analysis (F_{test} , $p < 0.05$), without transformation of data, separately for each species. The means for physiological variables were compared by Tukey's test (Santana and Ranal, 2004) and the means of the variables for seed health were measured with their respective standard deviations.

Results and Discussion

Penicillium sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp. and *Cladosporium* sp. were present in seeds of the two species, but *Colletotrichum* sp. and *Botrytis* sp. occurred only in *E. pyriformis*. However, with the exception of *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp., the fungi showed reduction in the incidence after storage or after the treatment (data not shown), often reduced to zero, following the trend observed in previous studies (Françoso and Barbedo, 2014). Fungi of the genus *Fusarium* and *Penicillium* have shown a high incidence and persistence in studies with recalcitrant seeded species (Andréo et al., 2006; Oliveira et al., 2011; Françoso and Barbedo, 2014; Parisi et al., 2016); thus, they will be used as a reference in health tests to evaluate the efficiency of treatments in fungal control.

In *E. pyriformis*, the analysis of the incidence indicates low contamination by *Penicillium* sp. (Figure 1); however, *Fusarium* sp. showed high incidence: 100% in most treatments (Figure 1B); thus, it is not possible to observe the effect of treatments on fungal control.

Thus, when analyzing only the incidence of the fungi, there was not any significant difference between the control and the treated seeds. However, the analysis of severity shows a reduction in the high and moderate development of *Fusarium* sp., in Heat-1 Osm-0 (Figure 2B), especially throughout storage (Figures 2 D and F); at 60 days of storage, at 5%, the seeds showed a lower rate of high growth. Thus, especially in the long term, the application of the treatment Heat-1 Osm-0 reduced the intensity of infestation by *Fusarium* sp.

With the implementation of the treatments in seeds of *E. pyriformis*, there was a significant reduction, initially, of germinable seeds and germination. However, in Heat-1 Osm-0, after storage, the values were similar to or higher than those found in Heat-0 Osm-0 (Table 1).

As for *E. brasiliensis*, Heat-2 Osm-0 was the treatment that best controlled the incidence of *Fusarium* sp. and unlike Heat-2 Osm-1, the effect was maintained until 60 days of storage (Figure 3 B). Although there was an increase in the incidence of *Penicillium* sp. in both treatments (Figure 3), its development was low and in the form of traces, mainly at 60 days of storage in Heat-2 Osm-0 (Figure 4E). In this way, Heat-2 Osm-0 was the treatment that had better health control in the long term in the seeds of *E. brasiliensis*.

Initially, Heat-0 Osm-0 of *E. brasiliensis* showed 82% of germinable seeds, but only 31% of germination (Table 2). Nevertheless, these seeds showed a low incidence and severity of fungi (Figure 3 and 4), indicating that there was no relationship with seed health. With the implementation of Heat-2, alone or in combination, there was a significant increase in germination, reaching 72% in Heat-2 and 81% in Heat-2 Osm-1 (Table 2). This suggests that the treatment had some action on the *E. brasiliensis* seed metabolism.

After storage, it was found that, unlike the initial result, Heat-0 Osm-0 of *E. brasiliensis* showed 81% of germination (Table 2); however such seeds showed an increase in the incidence (Figure 3 B) and severity of *Fusarium* sp., with up to 20% of moderate to high development of the fungus (Figures 4 D and F). In this way, it can be seen that the increase in the formation of normal seedlings is not positively related to the physiological quality and health quality of these seeds, which suggests a progression of seed deterioration during storage and an increase in the severity of the infection.

In *E. brasiliensis*, the seeds subjected to heat treatments, alone or combined, showed a higher incidence of *Penicillium* sp. (Figure 3), mainly at 60 days of storage. However, the severity of their development tends to be reduced, especially in the heat treatment applied

alone. The heat treatment itself, given its application in a wet medium, may facilitate the dissemination of fungus spores, and a reduction in the severity of *Fusarium* sp. may leave the niche free for the development of *Penicillium* sp., which develops in an opportunistic manner, without high severity.

The seeds of *E. pyriformis* and *E. brasiliensis* showed sensitivity to Osm-1 and Osm-2, with significant reduction of germinable seeds and germination. Along the storage period, such seeds continued to show lesser vigor (Table 1 and 2), with increased severity of *Fusarium* sp., mainly at 60 days of storage (Figures 2F and 4F). However, unlike *E. pyriformis*, in *E. brasiliensis*, the association of Osm-1 with the heat treatment did not reduce this negative effect and also led to a significant increase in the severity of *Penicillium* sp. (Figures 2 and 4).

Although the osmotic treatment subjects seeds to water stress, there is no significant reduction in the water content of these seeds (Table 3); it remained above the value deemed critical to the species (Delgado and Barbedo, 2007). Thus, although the above-mentioned stress has influenced the development of the fungi, it caused no desiccation, acting differently in the metabolism of these seeds.

Therefore, the seeds may have been intolerant to water stress caused by the osmotic treatment, which was not observed by Françoso and Barbedo (2014) and Oliveira et al. (2011) for seeds of *E. brasiliensis* subjected to osmotic treatments of -3.4 MPa/ 7 days and -4.0 MPa/ 7 days (germination of 90% for both of them) and by Oliveira et al. (2011), who found germination above 80% for seeds of *E. pyriformis* submitted to treatment of -2.5 MPa/ 7 days. It is known that environmental conditions can affect the development period prior to seed dispersal, and seeds can be dispersed when somewhat developed. Consequently, they are less tolerant to stresses such as desiccation, as evidenced by Lamarca et al. (2013) in seeds of *E. pyriformis*.

In general, osmotic and heat treatments control the majority of fungi present in the analyzed seeds, but they also have effects on the metabolism of these seeds. Further studies are needed in order to clarify what changes can occur and how they act in order to better understand the behavior of these seeds and make their storage feasible.

Furthermore, differences between the two species of *Eugenia* in the effect of the same treatment for control of *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. suggest that the indirect effects of the application of treatments, i.e., on the seeds, play an important role in fungal control, and should be considered together with the direct effect, on the fungi themselves.

Moraes et al. (2003) found that severity is a more sensitive test compared with incidence, but they emphasize that this would not be an easy-to-apply evaluation method not only because it is subjective but also more time-consuming for evaluation purposes. The authors used a 0-10 scale, and considered increases of 10% in the area of the seed covered by the fungus from one level of the scale to another. We do believe that simplifying the previous scale, based on ten levels, to this one, based on five levels, allowed an easier and faster evaluation, however not reducing the quality of the results, which had satisfactorily shown the distribution and trends of development of the fungi in the different analyzed cases.

Conclusions

The use of severity in the health assessment of the seeds of *E. pyriformis* and *E. brasiliensis* can detect differences between treatments not identified by incidence evaluation, as shown in the osmotic and heat treatments which controlled most of the fungi present in these seeds, but not the incidence of *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp.

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their financial support to the project and the research scholarship

granted to the second author; the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), for the doctoral scholarship granted to the first author; the Graduate Program in Plant Biodiversity and Environment, Institute of Botany, for the opportunity of completing the doctoral course; the Institute of Botany, for permission to collect the fruits.

References

- ANDRÉO, Y.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, C.J. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. affinis (DC.) T.D. Pennington). *Revista Brasileira de Botânica*, 2006, v.29, n.2, p.309-318.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3ed. Minnesota, Burgess Publishing Company, 1999. 241p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.
- DECAGON. WP4 *Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual*. Pullman: Decagon Devices, Inc. 2001. 78p.
- DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.2, p.265-272, 2007.
- DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.55, n.4, p.583-590, 2012.
- FRANÇOSO, C.F.; BARBEDO, C.J. Tratamentos osmóticos e térmicos para controle de fungos em sementes de grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Hoehnea*, v.41, n.4, p.541-552, 2014.
- ISTA. *International rules for seed testing*. The International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland. 2016. 284p.
- KOHAMA, S.; MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes*, v.28, n.1, p.72-78, 2006.
- LAMARCA, E.V.; PRATAVIERA, J.S.; BORGES, I.F.; DELGADO, L.F.; TEIXEIRA, C.C.; CAMARGO, M.B.P.; FARIA, J.M.R.; BARBEDO, C.J. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.85, n.1, p.223-233, 2013.
- MACHADO, A.Q.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.D.G.G.C.; CASSETARI NETO, D.; SOUZA, M.V. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de

algodoeiro. *Fitopatologia brasileira*, v.32, n.5, p.408-414, 2007.

MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, v.51, n.5, p.914-916, 1973.

MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M.; GRAVENA, J.C.; ALVES, C.A. Controle químico de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho: metodologia de avaliação e efeitos sobre a qualidade fisiológica. *Fitopatologia Brasileira*, v.28, n.6, p.626-632, 2003.

OLIVEIRA, C.F.; OLIVEIRA, D.C.; PARISI, J.J.D.; BARBEDO, C.J. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, n.3, p.520-532, 2011.

PARISI, J.J.D.; BIAGI, J.D.; BARBEDO, C.J.; MEDINA, P.F. Viability of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. embryos according to the maturation stage, fungal incidence, chemical treatment and storage. *Journal of Seed Science*, v.35, n.1, p.70-76, 2013.

PARISI, J.J.D.; BIAGI, J.D.; MEDINA, P.F.; BARBEDO, C.J. Fungicide and drying effects on the viability of recalcitrant seeds of *Inga vera* subsp. *affinis*. *Tropical Plant Pathology*, v.41, p.177-182, 2016.

SANTANA, D.G.; RANAL, M. *Análise da germinação: um enfoque estatístico*. Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 2004. 248p.

TANAKA, M.A.S.; ITO, M.F.; BRAGA, C.A.S.; ARMOND, G. Tratamento térmico solar da água para controle de fitopatógenos. *Fitopatologia Brasileira*, v.28, n.4, p.386-393, 2003.

Table 1. Germinable seeds (%), germination (%) and abnormal seeds (%) initially and after 30 and 60 days of storage, of *Eugenia pyriformis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days)⁽¹⁾.

Seed treatments	Storage		
	Initial	30 days	60 days
	<i>Germinable Seeds</i>		
Heat-0 Osm-0	100 aA	73 abB	85 aB
Heat-1 Osm-0	83 bA	90 aA	94 aA
Heat-2 Osm-0	73 bcB	81 abAB	95 aA
Heat-0 Osm-1	58 cdA	51 dA	44 bA
Heat-0 Osm-2	58 cdA	56 cdA	39 bB
Heat-1 Osm-1	59 cdB	75 abA	81 aA
Heat-2 Osm-1	50 dB	80 abA	91 aA
CV	11.25%		
	<i>Germination</i>		
Heat-0 Osm-0	97 aA	58 bcB	64 aB
Heat-1 Osm-0	69 bA	75 aA	69 aA
Heat-2 Osm-0	24 dC	40 dB	60 aA
Heat-0 Osm-1	42 cA	41 dcA	28 bB
Heat-0 Osm-2	42 cA	49 bcdA	21 bB
Heat-1 Osm-1	28 cdB	61 abA	61 aA
Heat-2 Osm-1	12 dB	55 bcdA	60 aA
CV	15.96%		
	<i>Abnormal</i>		
Heat-0 Osm-0	3 cB	15 bAB	21 abA
Heat-1 Osm-0	14 aA	15 bA	25 abA
Heat-2 Osm-0	49 bcA	41 aA	35 aA
Heat-0 Osm-1	15 bcA	10 bA	16 bA
Heat-0 Osm-2	15 bcA	8 bA	18 abA
Heat-1 Osm-1	31 abA	14 bB	20 abAB
Heat-2 Osm-1	38 aA	25 abA	31 abA
CV	38.97%		

⁽¹⁾Means followed by the same letter (lower case: comparison within the columns; capital letters: comparison within the rows) do not differ by Tukey's test at 5% probability.

Table 2. Germinable seeds (%), germination (%) and abnormal seeds (%), initially and after 30 and 60 days of storage of *Eugenia brasiliensis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Term-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days)⁽¹⁾.

Seed treatments	Storage		
	Initial	30 days	60 days
	<i>Germinable Seeds</i>		
Heat-0 Osm-0	82 aA	91 aA	86 abA
Heat-1 Osm-0	84 aA	94 aA	87 abA
Heat-2 Osm-0	90 aA	95 aA	99 aA
Heat-0 Osm-1	25 cB	68 bA	65 cA
Heat-0 Osm-2	25 cC	56 bB	75 bcA
Heat-1 Osm-1	59 bB	88 aA	80 bA
Heat-2 Osm-1	94 aA	93 aA	97 aA
CV	8.72%		
	<i>Germination</i>		
Heat-0 Osm-0	31 bcB	81 aA	75 abcdA
Heat-1 Osm-0	26 bcB	89 aA	81 abcA
Heat-2 Osm-0	72 aB	87 aA	92 aA
Heat-0 Osm-1	14 cB	52 bA	60 dA
Heat-0 Osm-2	14 cC	41 bB	68 cdA
Heat-1 Osm-1	38 bB	74 aA	73 bcdA
Heat-2 Osm-1	81 aA	77 aA	88 abA
CV	13.73%		
	<i>Abnormal</i>		
Heat-0 Osm-0	51 aA	10 aB	11 aB
Heat-1 Osm-0	58 aA	4 aB	6 aB
Heat-2 Osm-0	18 bA	8 aA	7 aA
Heat-0 Osm-1	11 bA	10 aA	5 aA
Heat-0 Osm-2	11 bA	15 aA	7 aA
Heat-1 Osm-1	21 bA	14 aAB	7 Ab
Heat-2 Osm-1	13 bA	16 aA	9 aA
CV	46.63%		

⁽¹⁾Means followed by the same letter (lower case: comparison within the columns; capital letters: comparison within the rows) do not differ by Tukey's test at 5% probability.

Table 3. Water content (%), initially and after 30 and 60 days of storage, of *E. pyriformis* and *Eugenia brasiliensis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days)⁽¹⁾.

Seed treatments	Storage			Means
	Initial	30 days	60 days	
<i>E. pyriformis</i>				
Heat-0 Osm-0	59.9 bB	66.4 aA	66.3 abA	
Heat-1 Osm-0	65.8 aA	66.2 aA	65.2 abA	
Heat-2 Osm-0	65.8 aA	65.5 aA	66.7 aA	
Heat-0 Osm-1	60.5 bB	65.2 aA	65.5 abA	
Heat-0 Osm-2	60.5 bA	60.2 bA	64.7 abB	
Heat-1 Osm-1	59.9 bB	63.9 abA	63.0 abAB	
Heat-2 Osm-1	58.9 Bb	62.5 abA	62.5 bA	
CV	3.06			
<i>E. brasiliensis</i>				
Heat-0 Osm-0	49.8	52.1	49.8	50,6 ab
Heat-1 Osm-0	50.0	52.1	51.2	51.1 a
Heat-2 Osm-0	49.9	53.8	50.7	51.5 a
Heat-0 Osm-1	48.6	48.2	46.9	47.9 c
Heat-0 Osm-2	48.6	48.1	46.6	47,8 c
Heat-1 Osm-1	48.8	48.8	48.3	48,7 c
Heat-2 Osm-1	48.2	49.2	48.9	48,8 bc
Means	49.1 B	50.3 A	48.9 B	
CV	3.02			

⁽¹⁾Means followed by the same letter (lower case: comparison within the columns; capital letters: comparison within the rows) do not differ by Tukey's test at 5% probability.

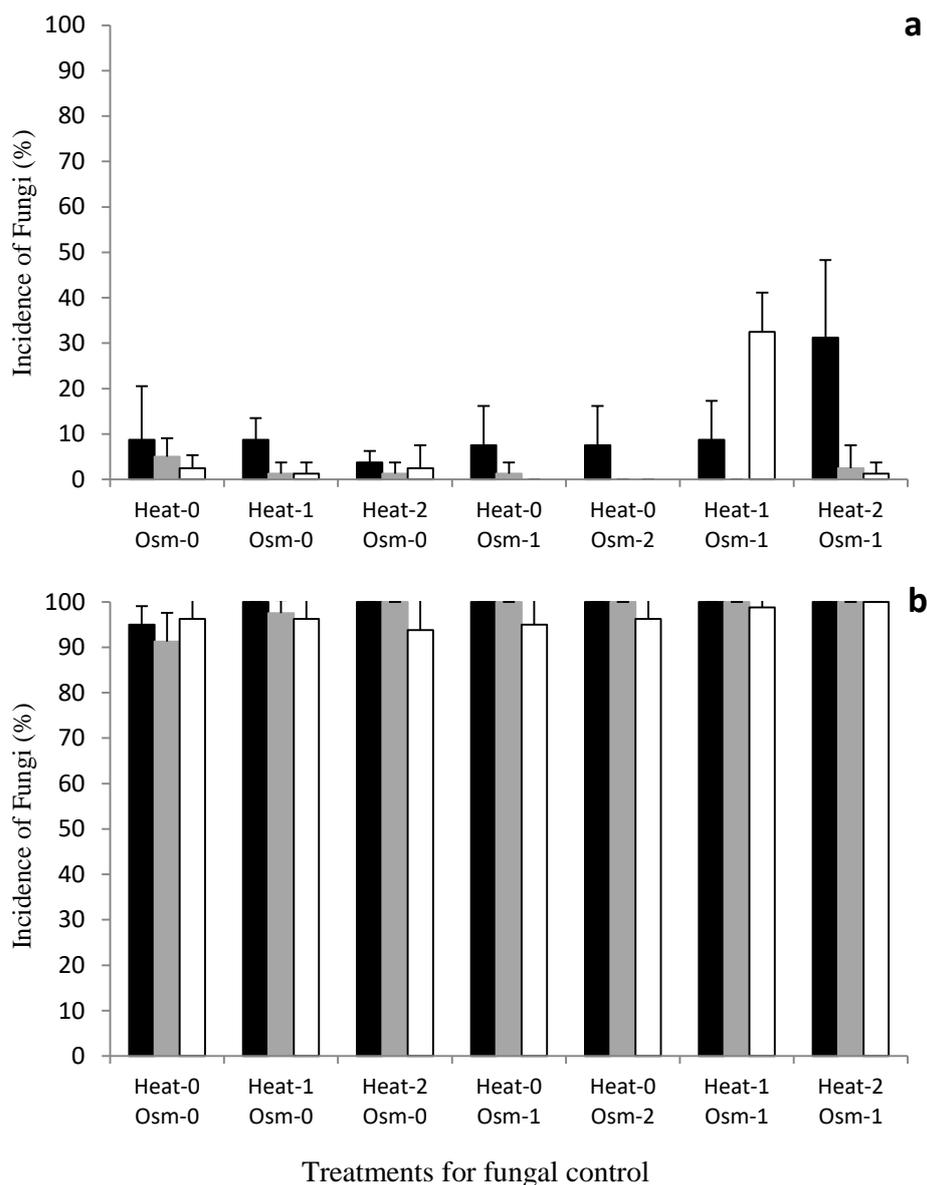


Figure 1. Incidence (%) of *Penicillium* sp. (a) and *Fusarium* sp. (b) in seeds of *E. pyriformis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days). Black bars: non-stored seeds; gray bars: after 30 days of storage; white bars: after 60 days of storage. The means and standard deviations are shown.

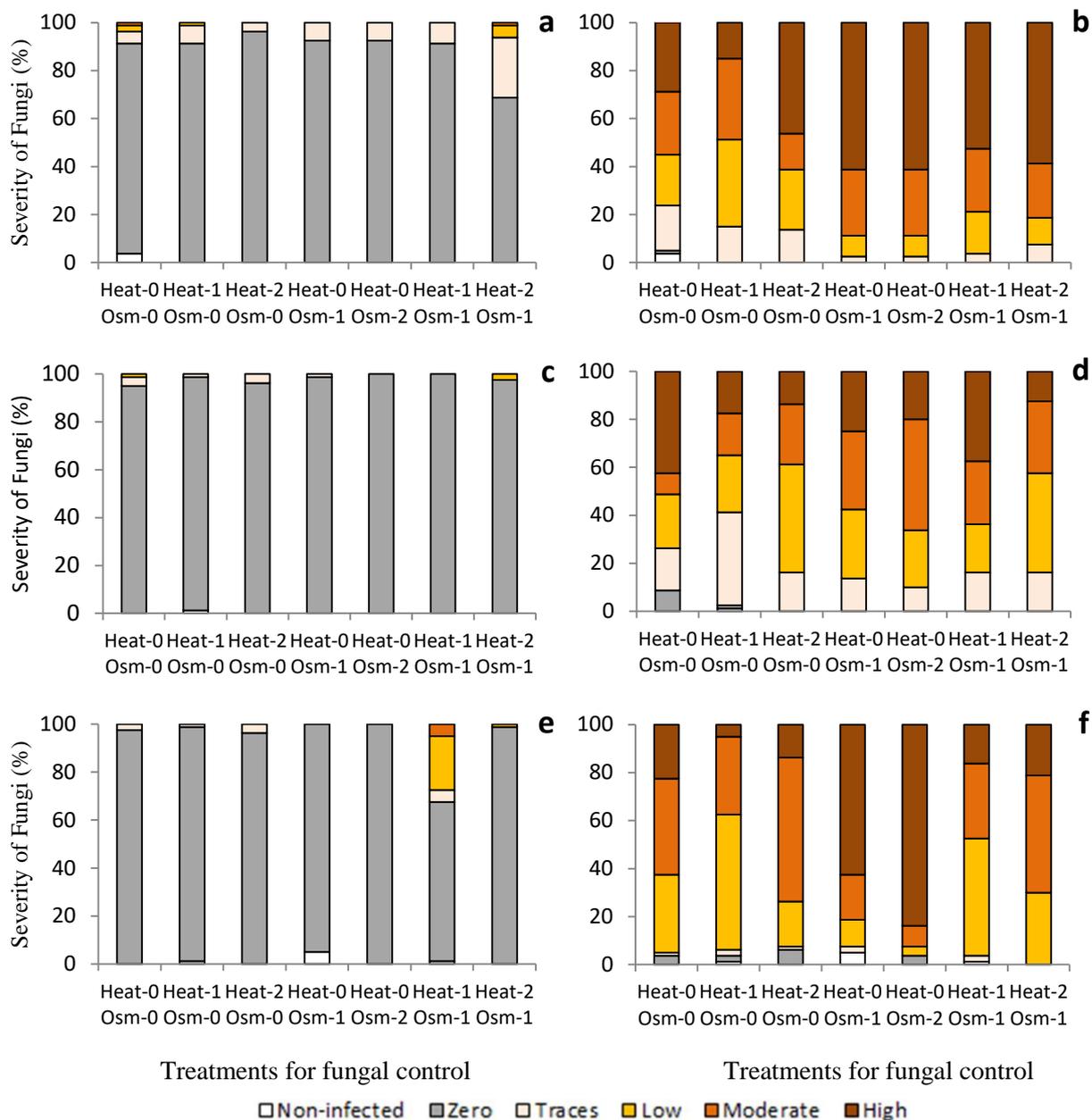


Figure 2. Severity (%) initially (a and b) and after storage for 30 (c and d) and 60 days (e and f) of *Penicillium* sp. (a, c and e) and *Fusarium* sp. (b,d and f) in seeds of *E. pyriformis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days). Caption: Zero - seed not infected by the analyzed fungus; Traces - small colonies, and in a very small number; Low - weak and sparse growth up to 40% of the seed; Moderate - moderate growth from 41 to 100% of the seed, with colonies with superficial and slow growth; High - intense growth from 41 to 100% of the seed, with dense and evenly distributed colony. Means are show in percentage terms.

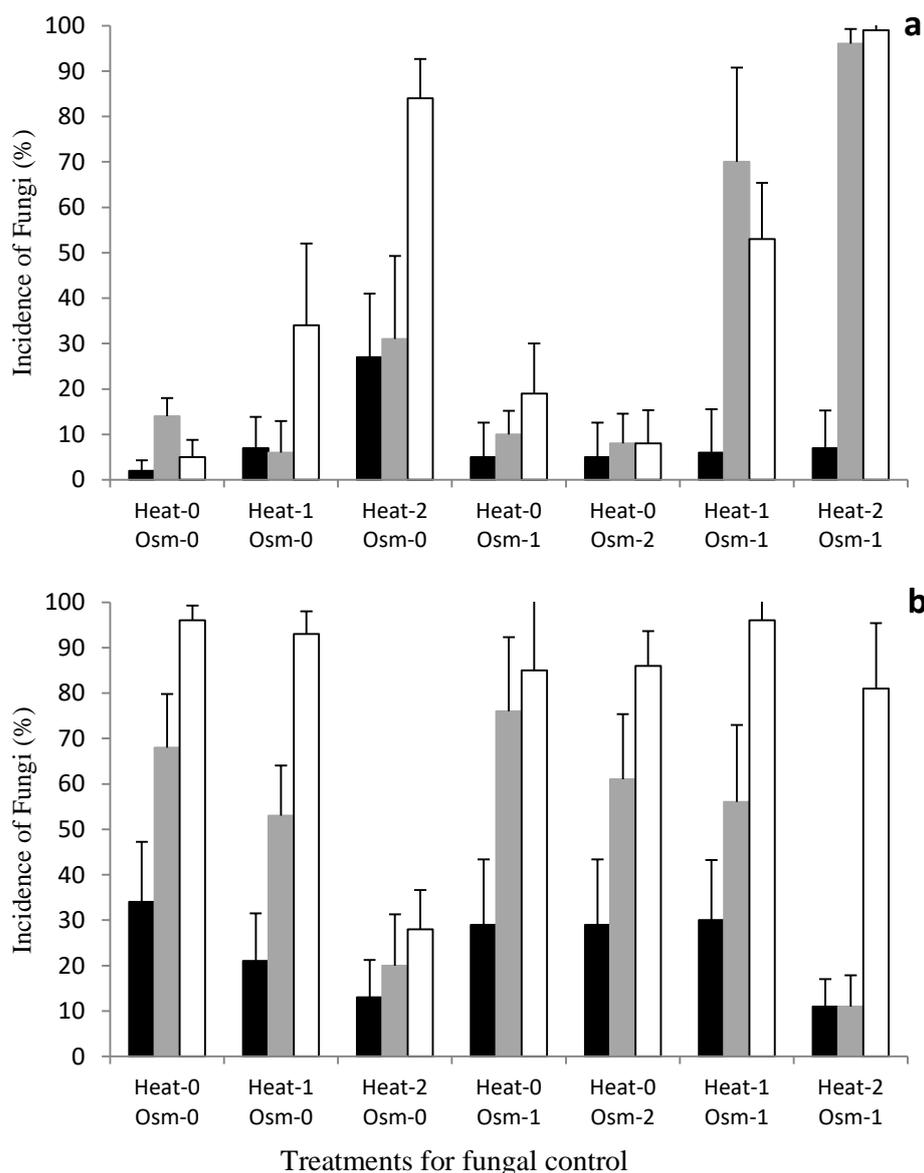


Figure 3. Incidence (%) of *Penicillium* sp. (a) and *Fusarium* sp. (b) in seeds of *E. brasiliensis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days). Black bars: non-stored seeds; gray bars: after 30 days of storage; white bars: after 60 days of storage. The means and standard deviations are shown.

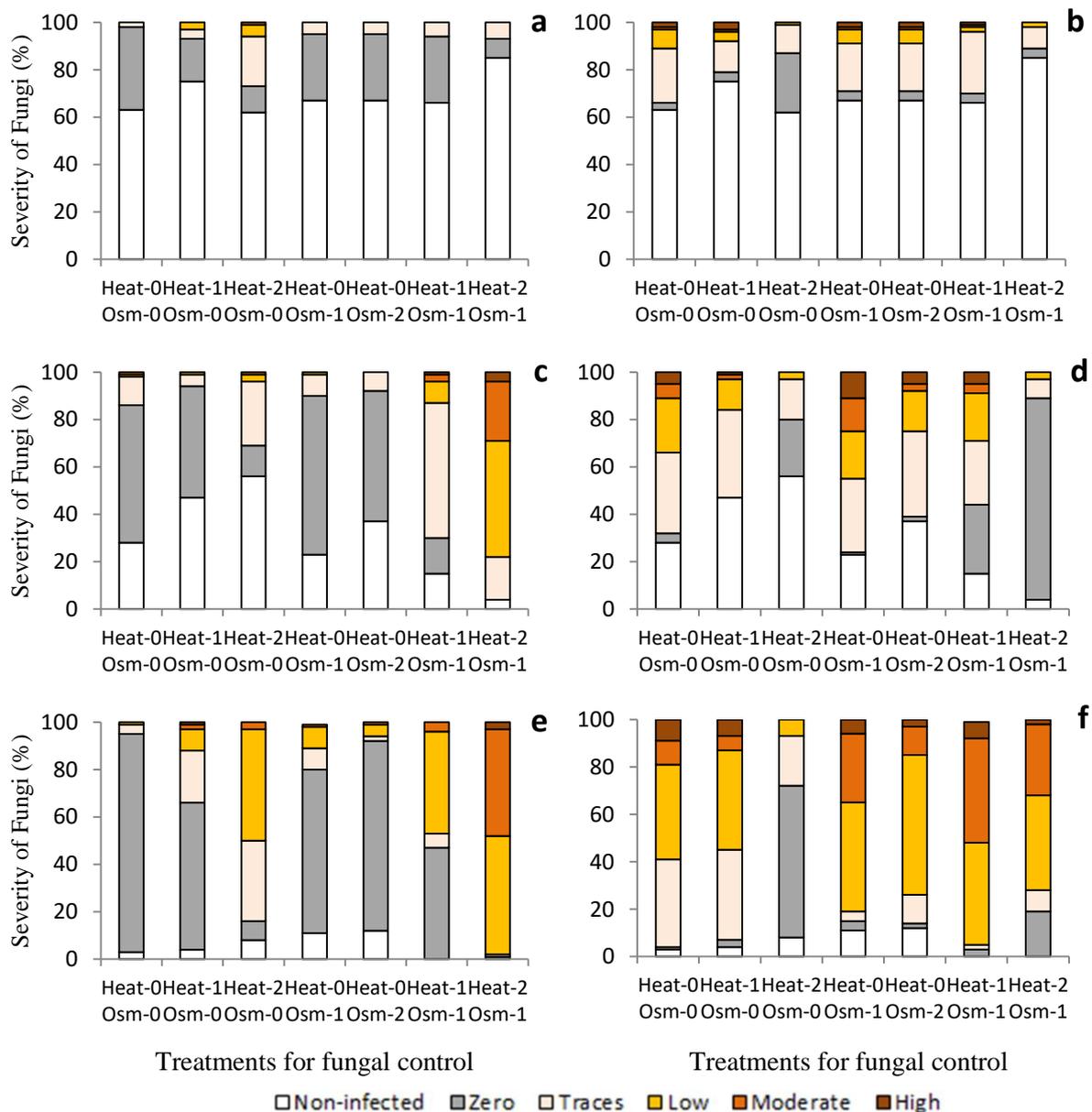


Figure 4. Severity (%) initially (a and b) and after storage for 30 (c and d) and 60 days (e and f) of *Penicillium* sp. (a, c and e) and *Fusarium* sp. (b,d and f) in seeds of *E. brasiliensis* subjected to heat treatments (Heat-0: no heat treatment; Heat-1: 55 °C/30min; Heat-2: 55 °C/150 min) and osmotic treatments (Osm-0: no osmotic treatment; Osm-1: -3.4MPa/7days; Osm-2: -3.4MPa/7days reapplied at 30 days). Caption: Zero - seed not infected by the analyzed fungus; Traces - small colonies, and in a very small number; Low - weak and sparse growth up to 40% of the seed; Moderate - moderate growth from 41 to 100% of the seed, with colonies with superficial and slow growth; High - intense growth from 41 to 100% of the seed, with dense and evenly distributed colony. Means are show in percentage terms.

3. Capítulo 2

Penicillium sp. e *Fusarium* sp. oriundos de sementes de *Eugenia* sp.:
importância, identificação e influência de tratamentos físicos em seu
desenvolvimento

3.1.Introdução

Sementes intolerantes à dessecação, ou recalcitrantes, são dispersas com elevado teor de água, típico de sementes imaturas, e necessitam ser mantidas em valores superiores a 20-35% de água (Barbedo *et al.* 2013). Nesse nível de hidratação há considerável quantidade de água congelável (Vertucci & Farrant 1995) e, portanto, tais sementes são também consideradas sensíveis a temperaturas abaixo de 0 °C. Dessa forma, o armazenamento úmido e em temperaturas relativamente elevadas, necessário às sementes de *Eugenia* sp., favorece o desenvolvimento e a manutenção da viabilidade de fungos tradicionalmente classificados como fungos de campo, como, por exemplo, *Fusarium* sp. Em sementes armazenadas secas, geralmente com teor de água abaixo de 13%, estes fungos perdem sua viabilidade ao longo do armazenamento, enquanto os classificados como fungos de armazenamento, como *Aspergillus* sp., podem aumentar sua incidência (Christensen 1972, Calistru *et al.* 2000, Marcos Filho 2005). Particularmente nas sementes recalcitrantes a sobrevivência e a proliferação dos fungos são favorecidas devido à elevada temperatura e umidade e, em geral, a população fúngica nessas sementes é constituída por espécies de fungos muito comuns em sementes como saprófitos externos (Carvalho & Muchovej 1991, Sutherland *et al.* 2002).

Fusarium sp. e *Penicillium* sp. são fungos de considerável importância nos estudos de conservação de sementes de *Eugenia* sp., devido à sua maior resistência e persistência no armazenamento, mesmo após aplicação de tratamentos térmicos e osmóticos (Capítulo 1). Tais tratamentos tem apresentado alguma eficiência no controle, contudo, é observado que um mesmo tratamento apresenta resultados divergentes no controle desses fungos, seja entre sementes de espécies diferentes ou na mesma espécie, mas de safras diferentes (Oliveira *et al.* 2011, Françoso & Barbedo 2014, Capítulo 1). Nas sementes de *E. brasiliensis*, por exemplo, o tratamento térmico de 55°C por 30 minutos reduziu de 71% para 17% a incidência de *Penicillium* sp., que se manteve abaixo dos 15% até os 60 dias de armazenamento. Mas ao se associar o tratamento térmico ao osmótico, apesar de controlar inicialmente, aos 60 dias de

armazenamento a incidência do fungo chegou a 67%. Já em *E. uniflora* os tratamentos de 55 e 60 °C por 120 minutos levaram a aumento de até 90% na incidência do fungo (Françoso & Barbedo 2014). Em *E. pyriformis*, os tratamentos físicos não reduzem a incidência de *Fusarium* sp., mas a análise de severidade revelou que o tratamento térmico de 55°C por 30 minutos reduziu a severidade de *Fusarium* sp. Contudo, no tratamento de 55°C por 150 minutos a severidade é maior, tendo aumento do desenvolvimento intenso do fungo (Capítulo 1).

Dessa forma, objetivou-se analisar *in vitro* o efeito dos binômios tempo-temperatura e do potencial hídrico da solução osmótica no desenvolvimento de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., isolados de *Eugenia* sp., buscando compreender melhor os efeitos causados diretamente, nos fungos, e indiretamente, nas sementes, pelos tratamentos térmicos e osmóticos.

3.2. Material e métodos

Para avaliar o efeito dos tratamentos térmicos e osmóticos *in vitro* foi realizado o isolamento de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. das sementes de *E. brasiliensis*. Os isolados foram identificados através de estudos moleculares (metodologia adaptada de Dellaporta *et al.* 1983, Anexo II) e morfológicos, e tiveram como objetivo obter a identificação correta dos isolados utilizados. As espécies analisadas no presente trabalho foram identificadas através da similaridade com sequências de fungos previamente identificados e sequenciados. Contudo, para *Fusarium* sp., duas espécies apresentaram alta similaridade, sendo necessário complementar a identificação pela visualização das características morfológicas em microscópio óptico (Leslie & Summerell 2006).

O isolado de *Penicillium* foi identificado como *Penicillium aculeatum*, fase assexuada, que é o teleomorfo de *Talaromyces aculeatus*, fase sexuada. Já o isolado de *Fusarium* foi identificado como *Fusarium verticillioides*, fase assexuada, cujo teleomorfo é *Gibberella fujikuroi*.

Os fungos isolados foram preservados em coleção no Instituto Biológico e, então, cultivados para posterior aplicação dos tratamentos físicos, osmoterapia e termoterapia, *in vitro*. A influência dos tratamentos físicos no desenvolvimento dos fungos foi então comparada ao observado após aplicação dos mesmos em sementes de *Eugenia* sp..

Isolamento e cultivo de fungos

Sementes de *E. brasiliensis* foram incubadas em câmara úmida por dois a quatro dias, sendo em seguida realizado o isolamento direto dos fungos (*Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.), que foram transferidos com auxílio de um estilete flambado para placas de Petri esterilizadas contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), as quais foram incubadas em incubadora a 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas, por 7 a 15 dias para obtenção das colônias. A preservação do fungo foi realizada pelo método de Castellani (Figueiredo 1967), sendo realizadas repicagens periódicas (a cada três meses), para a manutenção do isolado.

Determinação in vitro dos tratamentos letais para os fungos

Para o tratamento térmico os isolados de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., em suspensões na concentração de 10⁵ esporos ml⁻¹ (contagem em câmara de Neubauer), foram submetidas às temperaturas de 45 °C, 55 °C e 65 °C, durante 30, 90 e 150 minutos cada, visando a determinar o efeito dos binômios tempo-temperatura no desenvolvimento dos fungos. Para tanto, a suspensão de esporos foi colocada, assepticamente, em tubo de microcentrífuga esterilizado, constando 5 repetições por tratamento. Em seguida, as suspensões de cada tratamento foram avaliadas através de teste de unidade formadora de colônia (UFC) e de crescimento radial (CR), buscando avaliar alterações no desenvolvimento das colônias (Hopkins & McQuilken 2000, Tanaka *et al.* 2003).

No teste de CR uma alíquota de 20 µl da suspensão foi colocada no centro de uma placa de petri contendo meio BDA, sendo medido o crescimento micelial a partir do terceiro

dia de incubação. A medição foi realizada a cada três dias para *Penicillium* sp. e a cada 2 para *Fusarium* sp., devido a sua maior velocidade de crescimento, até cobrir o diâmetro da placa. Para o teste de UFC uma alíquota de 100 µl da suspensão foi distribuída uniformemente sobre a superfície do meio BDA com o auxílio de uma alça de Drigalski, sendo feita a contagem do número de colônias crescidas com três dias de incubação. As placas foram incubadas à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas e pelos períodos necessários para cada teste.

Já no tratamento osmótico, para se determinar o efeito da redução do potencial hídrico da solução osmótica (PEG) no desenvolvimento dos fungos analisados, discos de BDA, de 2 cm de diâmetro, contendo as colônias esporuladas desenvolvidas em uma de suas faces, foram submersos por 7 dias em soluções osmóticas de potencial hídrico de -3,4 MPa, -5 MPa, -10 MPa e -15 MPa. As soluções osmóticas de diferentes concentrações foram preparadas ajustando-se a concentração do PEG 6000 em função da temperatura de incubação ($7\text{ }^{\circ}\text{C}$), com aferição em analisador de potencial hídrico WP4, sendo que as mesmas foram autoclavadas separadamente e resfriadas novamente à temperatura de incubação (Michel & Kaufman 1973, Decagon 2001, Hopkins 2000). Após sete dias os discos foram retirados da solução de PEG, sendo que cada disco foi colocado em um frasco com água esterilizada e feita agitação por inversão três vezes, obtendo-se uma suspensão de esporos de concentração não padronizada.

Da suspensão foi realizado o teste de UFC, no qual uma alíquota de 50 µl foi distribuída uniformemente sobre a superfície do meio BDA com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, após três dias, o desenvolvimento das colônias na superfície do meio foi avaliado por escala visual considerando-se desenvolvimento: nulo (ausência de UFC na superfície da placa); fraco (presença espaçada e irregular de UFC por toda a placa; Figura 5a); moderado (grande quantidade de UFC por toda a placa, mas unidades de colônia sem

sobreposição; Figura 5b); ou intenso (UFC em grande quantidade por toda a placa, crescendo muito próximas e geralmente sobrepostas; Figura 5c).



Figura 5. Escala visual do desenvolvimento das colônias no teste de unidade formadora de colônia (UFC), considerando desenvolvimento: a) fraco, com presença espaçada e irregular de UFC por toda a placa; b) moderado, grande quantidade de UFC por toda a placa, mas unidades de colônia sem sobreposição; e c) intenso, UFC em grande quantidade por toda a placa, crescendo muito próximas e geralmente sobrepostas.

Para o teste de CR o disco foi fracionado em quatro partes iguais, sendo uma parte inoculada em meio de cultura BDA. A medição do crescimento micelial foi realizada a partir do terceiro dia, até as colônias de *Fusarium* sp. atingiram o diâmetro da placa (8 cm de diâmetro). As colônias de *Penicillium* sp., por apresentarem crescimento mais lento foram medidas até atingirem 6 cm de diâmetro. A medição foi realizada a cada 2 dias para *Fusarium* sp. e a cada 3 dias para *Penicillium* sp.

As placas foram incubadas à temperatura de $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, com fotoperíodo de 12 horas e pelos tempos necessários para cada teste. Cada teste apresentou placas de controle da suspensão não tratada e da água esterilizada utilizada para fazer a suspensão, sendo que todos os procedimentos descritos foram realizados assepticamente, a fim de evitar contaminações.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições de cada tratamento, para cada teste (UFC e CR). São apresentadas as médias de UFC e respectivos desvios-padrão. O diâmetro das colônias foi traçado ao longo do tempo para cada tratamento. Alíquotas das suspensões e da colônia de cada fungo, sem serem submetidas aos

tratamentos, foram plaqueadas em BDA como tratamento testemunha, assim como da água esterilizada utilizada para as suspensões.

3.3.Resultados

Observou-se redução do número de UFC de *Penicillium aculeatum* (Figura 6a) e *Fusarium verticillioides* (Figura 6b) em todos os tratamentos térmicos aplicados, sendo que a 65 °C não foi observado crescimento do fungo. Em 55 °C por 90 e 150 minutos ainda foi observado algum crescimento, embora tenha havido redução de 99,95% em relação ao observado na testemunha.

Não foi observado crescimento de *P. aculeatum* e *F. verticillioides* nos tratamentos de 55 °C por 90 e 150 minutos e 65 °C em todos os tempos de exposição no teste de crescimento radial (Figura 7). Para *P. aculeatum* a testemunha atingiu o máximo crescimento aos 15 dias, sendo que apesar de ocorrer crescimento nos tratamentos de 45 °C, em todos os tempos de exposição, e 55 °C por 30 minutos observa-se aumento do tempo de desenvolvimento. Em 55 °C por 30 minutos a colônia somente atingiu seu máximo crescimento aos 18 dias de incubação (Figura 7a). Já para *F. verticillioides* (Figura 7b) a testemunha atingiu seu máximo crescimento aos 11 dias de incubação, sendo que foram necessários 13 dias para os tratamentos de 45 °C, em todos os tempos de exposição, e em 55 °C por 30 minutos.

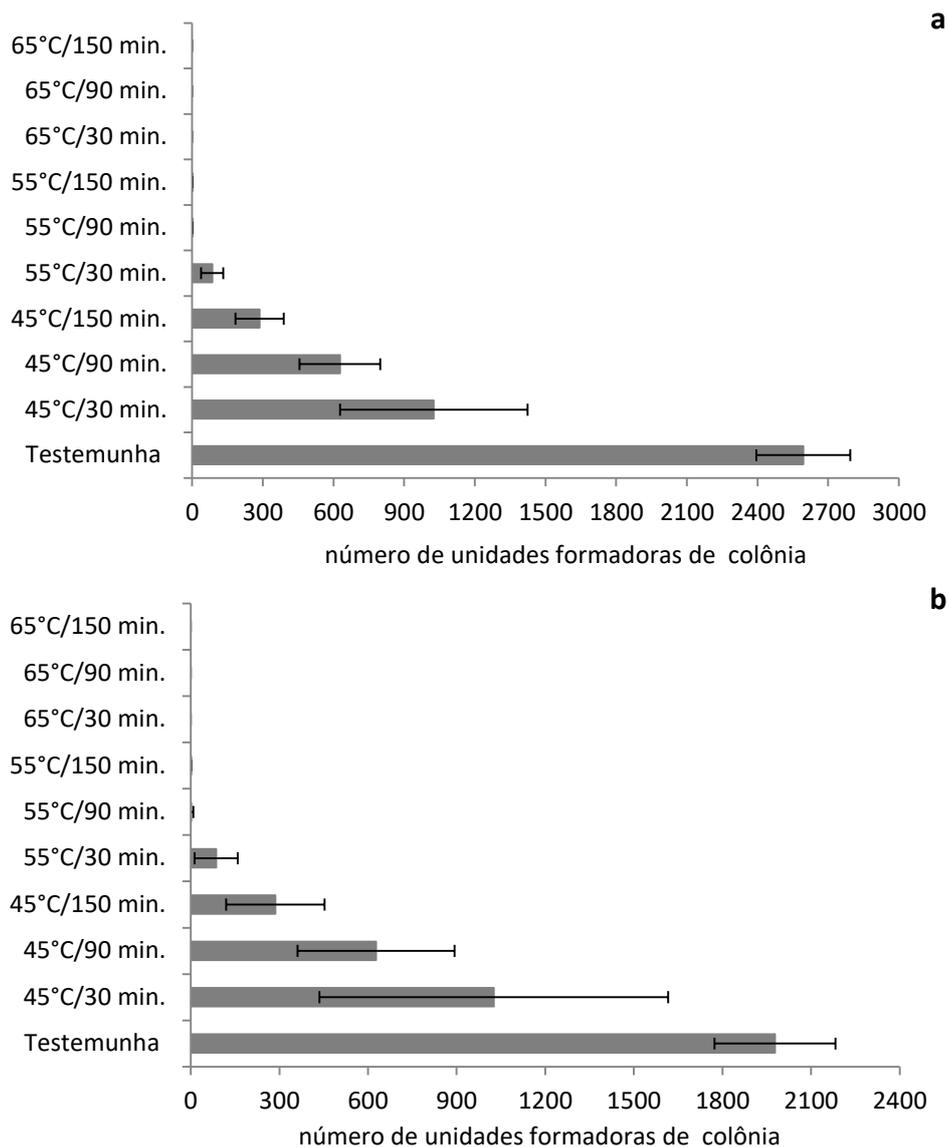


Figura 6. Número de unidade formadora de colônia (UFC) da suspensão de esporos (10^5 esporos ml^{-1}) de *Penicillium aculeatum* (a) e *Fusarium verticillioides* (b) submetidas aos tratamentos térmicos de 45 °C, 55 °C e 65 °C durante 30, 90 e 150 minutos cada. A testemunha corresponde à suspensão de esporos sem tratamento térmico. São apresentadas as médias e os desvios-padrão.

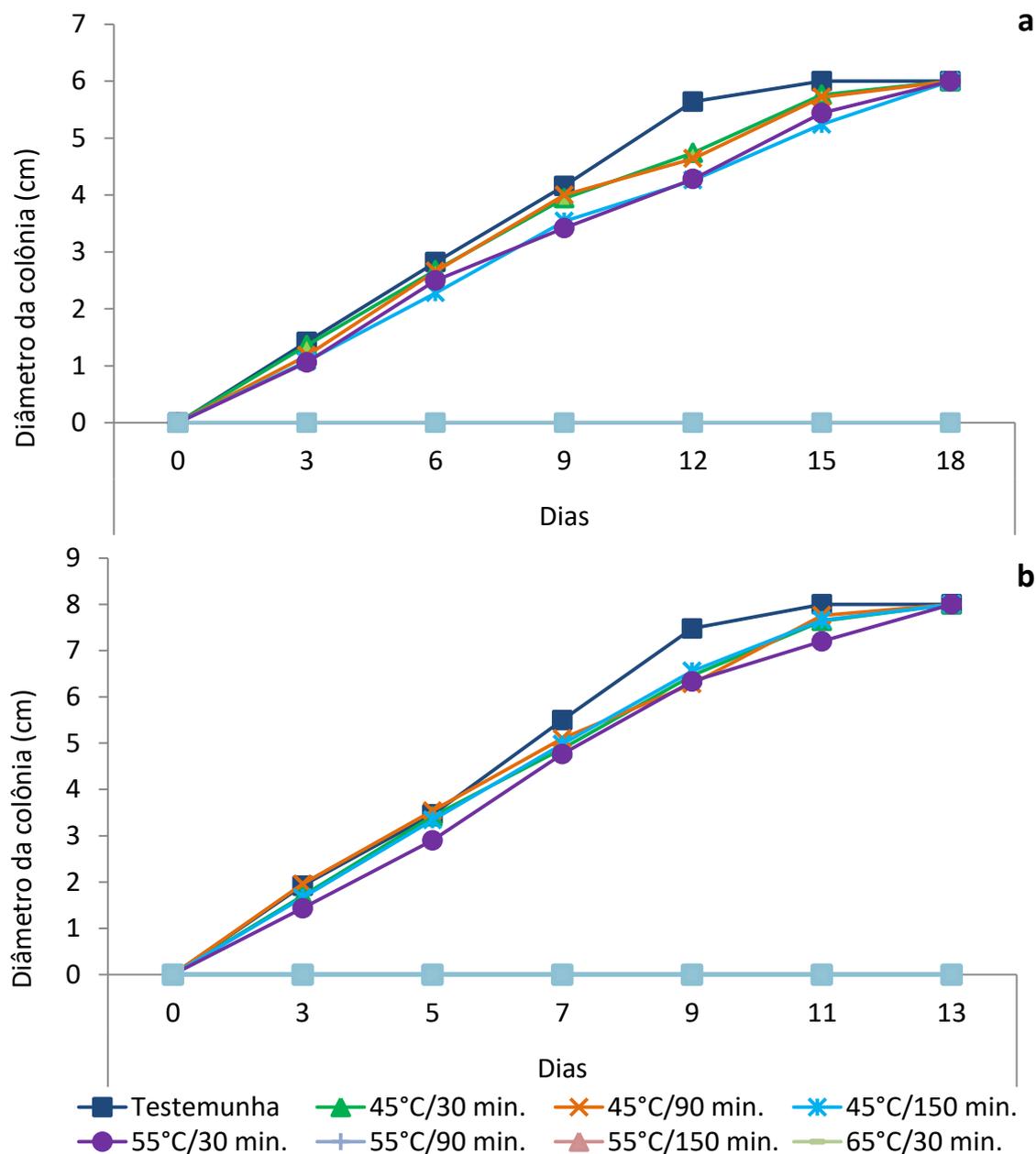


Figura 7. Teste de crescimento radial da suspensão de esporos (10^5 esporos ml^{-1}) de *Penicillium aculeatum* (a) e *Fusarium verticillioides* submetida aos tratamentos térmicos de 45 °C, 55 °C e 65 °C durante 30, 90 e 150 minutos (min.) cada. A testemunha corresponde à suspensão de esporos sem tratamento térmico. São apresentadas as médias.

Com a aplicação dos tratamentos osmóticos em *P. aculeatum* observou-se redução no desenvolvimento intenso apenas com a aplicação de potências mais negativas que -5 MPa, contudo o desenvolvimento intenso foi sempre superior a 66,7%. Para *F. verticillioides* somente ocorre menor desenvolvimento intenso com a aplicação de -15 MPa (66,7%; Figura 8).

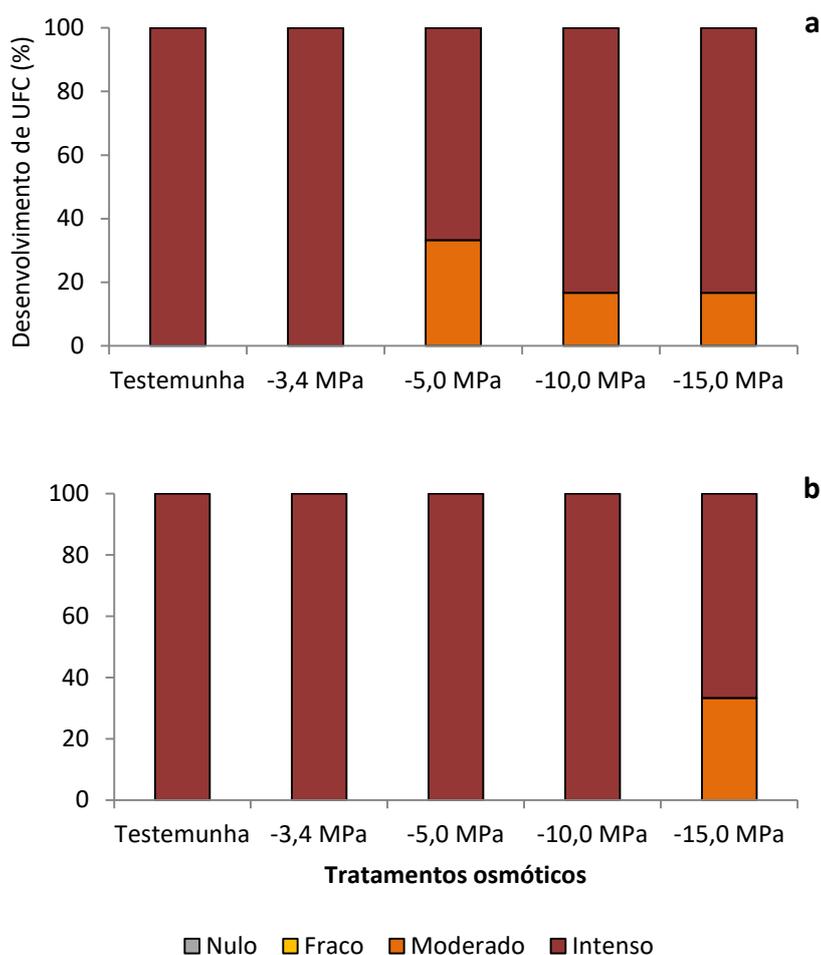


Figura 8. Desenvolvimento de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Penicillium aculeatum* (a) e *Fusarium verticillioides* (b) após aplicação dos tratamentos osmóticos de -3,4 MPa, -5,0 MPa, -10,0 MPa e -15,0 MPa. Foi considerado crescimento: nulo (ausência de UFC na superfície da placa); fraco (presença espaçada e irregular de UFC por toda a placa); moderado (grande quantidade de UFC por toda a placa, mas unidades de colônia sem sobreposição); ou intenso (UFC em grande quantidade por toda a placa, crescendo muito próximas e geralmente sobrepostas). São apresentadas as médias em porcentagem (%).

Foi observado crescimento de *P. aculeatum* e *F. verticillioides* nos tratamentos osmóticos em todos os potenciais utilizados (Figura 9). Em *P. aculeatum* a testemunha atingiu o máximo crescimento aos 27 dias, com crescimento em todos os tratamentos, mas com redução no tempo de desenvolvimento. Em -5,0 MPa a colônia atingiu seu máximo crescimento aos 15 dias de incubação (Figura 9a). Já para *F. verticillioides* (Figura 9b) a

testemunha atingiu seu máximo crescimento aos 15 dias de incubação, enquanto nos tratamentos osmóticos foram necessários 13 dias.

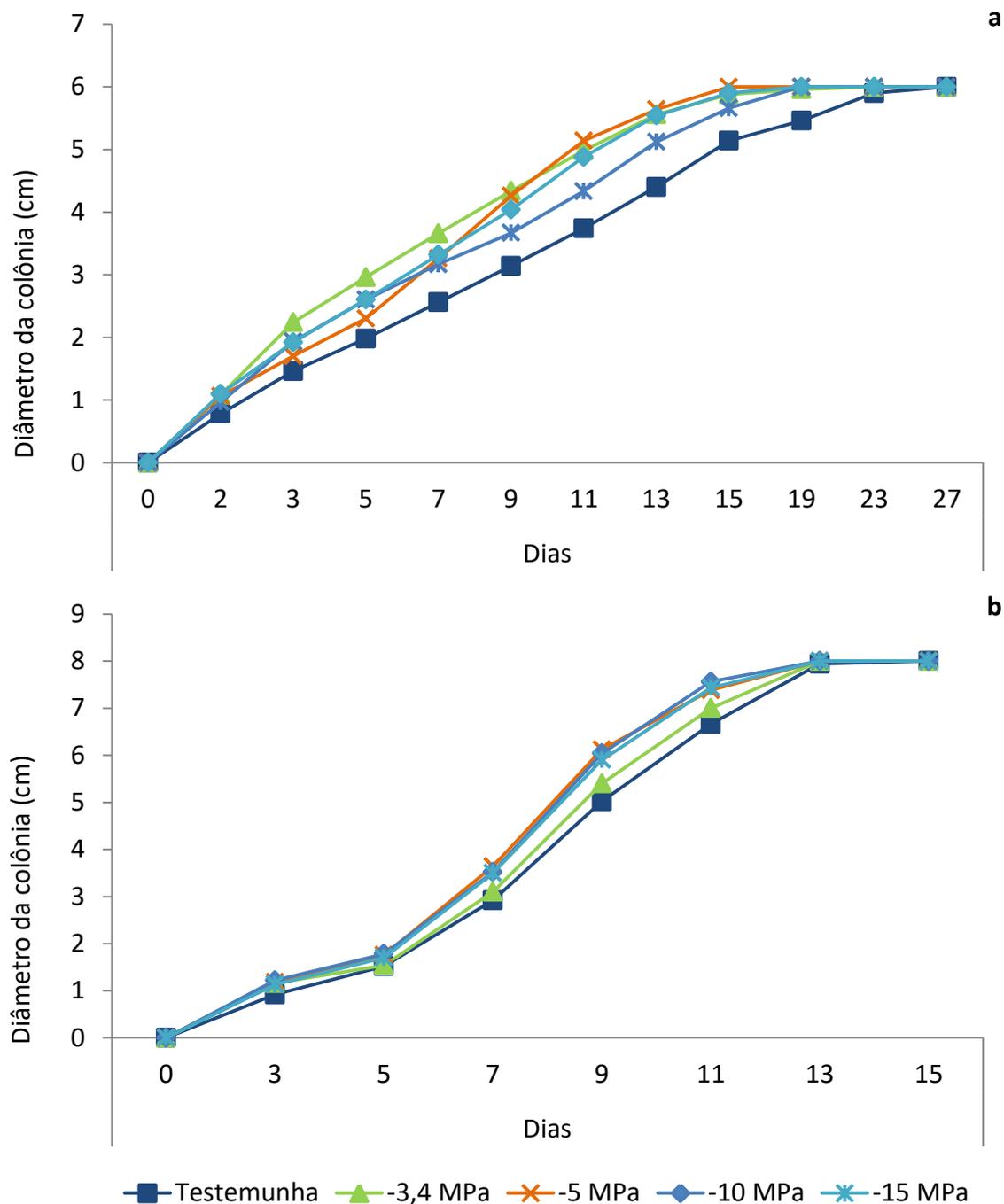


Figura 9. Teste de crescimento radial da suspensão de esporos de *Penicillium aculeatum* (a) e *Fusarium verticillioides* (b) submetida aos tratamentos osmóticos de -3,4 MPa, -5 MPa, -10 MPa e -15 MPa. A testemunha corresponde à colônia inoculada sem tratamento osmótico. São apresentadas as médias.

3.4. Discussão

Ao se aplicar o tratamento térmico diretamente no fungo, com o aumento da temperatura e do tempo de exposição é observada redução progressiva no desenvolvimento de *P. aculeatum* e *F. verticillioides*, em proporções semelhantes nos dois fungos. Ambos são eliminados completamente a 65°C, mas a partir de 55 °C por 30 minutos já se observa redução expressiva no desenvolvimento das colônias. Constatou-se, inclusive, que no tratamento de 45 °C já há controle significativo dos fungos, com 60% de redução de colônias e redução da velocidade de crescimento. Assim sendo, observa-se que a termoterapia controla o desenvolvimento de *P. aculeatum* e *F. verticillioides*, que apresentaram alta sensibilidade à exposição direta ao estresse térmico.

Contudo, tal redução do desenvolvimento de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., com o uso do estresse térmico, não é igualmente observada após o tratamento térmico de sementes. Com maior tempo de exposição ao tratamento de 55 °C, de 30 para 150 minutos, há aumento de aproximadamente 60% da incidência de *Penicillium* sp. em sementes *E. brasiliensis* (Françoso & Barbedo 2014) e maior severidade de *Fusarium* sp., com aumento do desenvolvimento intenso, em sementes de *E. pyriformis* (Capítulo 1). Embora o tratamento de 65 °C controle os fungos analisados *in vitro*, Oliveira *et al.* (2011), observaram desenvolvimento de *Penicillium* sp. em sementes de *E. brasiliensis* submetidas a 65 °C por 30 minutos, sendo que a incidência foi de 42% para 89% com a aplicação do mesmo por 150 minutos. Igualmente, em sementes de *E. uniflora* foi observado incidência de *Penicillium* sp. de 93% com a aplicação de 65 °C por 30 minutos nas sementes (Oliveira *et al.* 2011).

Assim sendo, observa-se que o fungo, quando associado à semente, se mantém viável em condições que lhe seriam adversas. Sabe-se que os patógenos podem se associar externamente e internamente à semente, sendo que no caso de associação interna apresentam maiores chances de sobrevivência por ficarem protegidos contra a maioria dos tratamentos

que controlam, com eficiência, os patógenos de sementes transmitidos externamente (Santos *et al.* 2000), razão pela qual o tratamento foi mais incisivo *in vitro* do que quando na semente.

Uma das possíveis causas do aumento da incidência dos fungos nas sementes, com o aumento do tempo de exposição e/ou da temperatura, é a redução da competição quando fungos e/ou esporos menos resistentes, de *P. aculeatum* ou de outros fungos, perdem sua viabilidade e deixam o nicho livre. Sabe-se que, além das condições de armazenamento e do teor de água das sementes, a sucessão dos fungos pode ser em muito influenciada pela interação e competição entre os próprios fungos, principalmente quando os inóculos estão presentes nos tecidos das sementes desde o início (Berjak 1987).

O tratamento de 55 °C reduz em no mínimo 96% o número de UFC, sendo que o desenvolvimento micelial, quando presente, foi mais lento que o observado nos outros tratamentos, havendo necessidade de maior tempo de incubação para desenvolver o mesmo do observado na testemunha. Assim sendo, observa-se que os esporos remanescentes dos tratamentos a 55 °C representam fonte de inóculo, contudo, apresentam desenvolvimento reduzido, consideravelmente menos agressivo. Tal resultado pode explicar a menor severidade observada nas sementes tratadas, mesmo quando é mantida alta incidência, como é observado em *Fusarium* sp., nas sementes de *E. pyriiformis* (Capítulo 1).

Desse modo, acredita-se que o efeito físico do tratamento térmico é o maior responsável pelo efeito de controle no desenvolvimento dos fungos observado nas sementes de *E. brasiliensis* e *E. pyriiformis* (Capítulo 1).

Contudo, na análise do desenvolvimento das colônias constatou-se pouca ou nenhuma influência dos tratamentos osmóticos. Ocorreu pequena redução no desenvolvimento intenso com a aplicação de potenciais mais negativos que -5 MPa em *P. aculeatum*. Já *F. verticillioides* foi menos sensível, com redução no desenvolvimento intenso, que foi de 83%, apenas no tratamento com maior estresse osmótico, de -15 MPa. Em sementes de *E. brasiliensis* observa-se que a severidade não diferiu significativamente do controle com a

aplicação do tratamento osmótico de -3,4 MPa (Capítulo 1; Figura 4 b – Heat-0 Osm-1), o que condiz com o observado *in vitro*, onde o potencial de -3,4 MPa não reduziu o desenvolvimento de colônias.

Em ambas as espécies a velocidade de desenvolvimento dos fungos foi superior à testemunha após aplicação da osmoterapia. Conforme observado por Ramirez *et al.* (2004), a incubação em soluções osmóticas influencia, mas não impede a germinação dos conídios. *F. graminearum* apresentou germinação rápida após incubação de 4-6 h em potencial hídrico de -0,7 a -5,6 MPa, sendo que em potenciais hídricos inferiores (-7,0 a -8,4 MPa) houve um atraso de até 24 h antes da germinação (Ramirez *et al.* 2004).

Espécies de *Fusarium* sobrevivem no solo e em resíduos de culturas, onde o potencial matricial é o maior componente de seu potencial hídrico, assim como no potencial hídrico gerado em soluções de PEG (Magan & Lynch 1986, Steuter *et al.* 1981). Ramirez *et al.* (2004), observaram que a diminuição do potencial hídrico dos meios causou uma grande diminuição no potencial hídrico micelial, mostrando a capacidade de adaptação desses fungos, sendo que a concentração de açúcares álcoois totais nos micélios aumentou à medida que o potencial osmótico e matricial foi reduzido para -12,0 MPa.

Assim sendo, constata-se que os fungos analisados tem alta capacidade de tolerância ao estresse hídrico, muito superior ao que seria tolerado pelas sementes. Os potenciais hídricos utilizados no tratamento de sementes até então (Oliveira *et al.* 2011, França e Barbedo 2014, Capítulo 1) estão dentro do limite tolerado pelos fungos, conforme demonstrado neste capítulo. Desse modo, os efeitos observados, de redução ou aumento na incidência e severidade, após aplicação dos tratamentos osmóticos estão relacionados à resposta das sementes a aplicação dos tratamentos.

Contudo, o aumento da velocidade de desenvolvimento de ambos os fungos analisados, principalmente em *P. aculeatum*, merece atenção. Embora o tratamento osmótico não tenha influenciado, inicialmente, na severidade em sementes de *E. brasiliensis*, em

sementes de *E. pyriformis* observou-se maior severidade de *Fusarium* sp. após a aplicação do tratamento osmótico de -3,4 MPa (Capítulo 1, Figura 2 b - Heat-0 Osm-1). É possível que o efeito observado *in vitro* tenha relação com o aumento da severidade. Contudo, é importante considerar que ocorreu redução significativa na germinação com a aplicação do tratamento osmótico, não sendo possível desconsiderar a redução da qualidade fisiológica da semente no desenvolvimento elevado do fungo.

3.5. Conclusão

O tratamento térmico controla *P. aculeatum* e *F. verticillioides* quando aplicado diretamente nos mesmos, levando a redução do seu desenvolvimento. Nos tratamentos térmicos de maior temperatura e tempo de exposição, a partir de 55°C por 90 minutos, é possível costatar a eliminação de ambos os fungos.

De modo geral, o tratamento osmótico não reduz o desenvolvimento de colônias dos fungos *in vitro*, contudo há aumento da velocidade de desenvolvimento de ambos os fungos analisados, principalmente em *P. aculeatum*.

3.6.Referências bibliográficas

- Barbedo, C.J., Centeno, D.C. & Ribeiro, R.C.L.F.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40(4): 583-593.
- Berjak, P.** 1987. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. Proceedings, An advanced International Course on Seed Pathology, Passo Fundo, RS. Embrapa/Abrates pp.93-112.
- Calistru, C., Mclean, M., Pammenter, N.M. & Berjak, P.** 2000. The effects of Mycofloral infection of the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk) Vierh. *Seed Science Research*, v. 10, pp. 341-353.
- Carvalho, W.L. & Muchovej, J.J.** 1991. Fungos associados a sementes de essências florestais. *Revista Árvore* 15(2): 173-178.
- Christensen, C.M.** 1972. Microflora and seed deterioration. In: Roberts, E.H. (ed.). *Viability of seeds*. Chapman & Hall, London, v. 3, p. 59-93.
- Decagon.** 2001. WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual. Pullman: Decagon Devices, Inc.
- Dellaporta S.L., Wood, J. & Hicks, J.B.** 1983. A plant DNA minipreparation version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.1, pp.19-21.
- Figueiredo, M.B.** 1967. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *Biológico*, São Paulo, v.33, pp.9-13.
- Françoso, C.F. & Barbedo, C.J.** 2014. Tratamentos osmóticos e térmicos para controle de fungos em sementes de grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Hoehnea* 41(4): 541-552.
- Françoso, C.F. & Barbedo, C.J.** 2016. Osmotic and heat treatments on control of fungi associated with seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis* (Myrtaceae). *Journal of Seed Science* 38(3): 195-203.
- Hopkins, K.E. & Mcquilken, M.P.** 2000. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. *European Journal of Plant Pathology*, v.106, pp.77-85.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A.** 2006. *Fusarium* laboratory manual. 1º edição, Blackwell Publishing Ltd, 388p.
- Magan, N. & Lynch, J.M.** 1986. Water potential, growth and cellulolysis of fungi involved in decomposition of cereal residues. *Journal of General Microbioly*, v.132, pp.1181-1187.
- Marcos Filho, J.** 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Abrates, Londrina 660p.
- Michel, B.E. & Kaufmann, M.R.** 1973. The osmotic potential of polyethylene glicol 6000. *Plant Physiology* 51(5): 914-916.

- Oliveira, C.F., Oliveira, D.C., Parisi, J.J.D. & Barbedo, C.J.** 2011. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. *Revista Brasileira de Sementes* 33(3): 520-532.
- Ramirez, M.L., Chulze, S.N. & Magan, N.** 2004. Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia* 96(3): 470-478.
- Santos A.F., Grigoletti Júnior, A. & Auer, C.G.** 2000. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. *Floresta* 30(1/2): 119-128.
- Steuter, A.A., Mozafar, A. & Goodin, J.R.** 1981. Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiology* 67: 64-67.
- Sutherland, J.R., Dikmann, M. & Berjak, P.** (Eds.). 2002. Forests tree seed health for germplasm conservation. Rome: IPGRI, 85p. (Technical Bulletin, n 6).
- Tanaka, M.A.S., Ito, M.F., Braga, C.A.S. & Armond, G.** 2003. Tratamento térmico solar da água para controle de fitopatógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28(4): 386-393.
- 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.

4. Capítulo 3

Reações metabólicas em sementes de *E. pyriformis* submetidas a tratamentos osmótico (osmoterapia) e térmico (termoterapia)

4.1.Introdução

Em sementes denominadas recalcitrantes a sensibilidade à dessecação é um fator restritivo, a longo prazo, sobre a conservação de germoplasma devido a incapacidade dessas sementes em sobreviver a baixas temperaturas e baixos teores de água (Berjak & Pammenter 2013). Além disso, o armazenamento hidratado, considerado até o momento a alternativa de maior viabilidade no armazenamento dessas sementes, favorece a proliferação de microrganismos, principalmente fungos, acelerando consideravelmente a velocidade de deterioração (Delgado & Barbedo 2012, Parisi *et al.* 2013).

Tratamentos físicos, como a termoterapia e a osmoterapia, aplicados às sementes de *Eugenia* sp., tem apresentado alguma eficiência na redução da incidência dos fungos e na manutenção da qualidade fisiológica das mesmas (Françoso & Barbedo 2014); contudo, pouco se sabe das consequências de tais tratamentos sob as sementes.

As plantas, de modo geral, reagem a fatores do ambiente (variações na temperatura, umidade e radiação) e a agentes biológicos (fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos e herbívoros), sendo que a tolerância a estresses, como o hídrico e o térmico, se deve a alterações bioquímicas e estruturais, processo este regulado pela expressão gênica (Hammond-Kosack & Jones 2000, Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 1997).

É observado que os tratamentos vêm influenciando diferentemente na qualidade fisiológica e sanitária das sementes tratadas. Apesar dos recentes estudos apontarem alguma eficácia dos tratamentos térmicos e osmóticos, pouco se sabe dos seus efeitos nas sementes, desconhecendo-se sua atuação no metabolismo e estrutura das sementes. Assim sendo, o presente trabalho objetivou analisar, em sementes de *E. pyriformis*, possíveis alterações bioquímicas e estruturais relacionadas aos estresses térmicos e hídricos, provocados pela aplicação de tratamentos físicos.

4.2. Material e Métodos

Sementes de *Eugenia pyriformis* foram obtidas de matrizes plantadas no Jardim Botânico, em São Paulo, SP (23°38'S e 46°37'W), sendo coletadas em outubro de 2013. O processo de extração e beneficiamento das sementes foi realizado através da extração manual da polpa e eliminação de sementes danificadas por insetos e imaturas, sendo em seguida armazenadas em sacos de polietileno, em câmara fria a 7°C (Kohama *et al.* 2006), até a instalação dos experimentos, não ultrapassando 15 dias.

Para as análises bioquímicas (perfil metabólico) e estruturais (anatomia e histoquímica) foram selecionados os tratamentos térmicos e osmóticos que, além de manter a qualidade fisiológica das sementes, apresentaram os resultados mais promissores e significativos no controle da severidade de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (metodologia e resultados apresentados no Capítulo 1). Sendo assim, foram analisados os tratamentos (sem armazenamento/ com armazenamento de 30 dias): 55 °C/ 30 minutos (denominado T₁/ T_{1A}), -3,4 MPa/7 dias (denominado T₂/ T_{2A}), associado de 55 °C/30 minutos com -3,4 MPa/7 dias (denominado T₃/ T_{3A}) e a testemunha, que foi caracterizada pelas sementes que não receberam quaisquer dos tratamentos, térmico ou osmótico (denominada T₀/ T_{0A}).

Para a aplicação do tratamento térmico as sementes foram imersas em água destilada, em béqueres de vidro acondicionados em estufa com circulação de ar, nas temperaturas e períodos descritos anteriormente. Foi utilizada a proporção de 1:5 entre o peso das sementes e o peso da água do tratamento. Os béqueres foram periodicamente agitados e, ao término do período de exposição, as sementes foram resfriadas com água destilada a temperatura ambiente por duas horas e depositadas sobre papel de filtro para retirada do excesso de água superficial (Oliveira *et al.* 2011, França & Barbedo 2014).

O tratamento osmótico consistiu da incubação das sementes em solução de polietileno glicol 6000 (PEG) por sete dias, em caixas tipo gerbox, a 7 °C. Após os tratamentos osmóticos, as sementes foram lavadas por cinco vezes consecutivas em água destilada, para

remoção da solução residual de PEG (Oliveira *et al.* 2011). As soluções osmóticas foram preparadas ajustando-se a concentração do sal em função da temperatura de incubação (Michel & Kauffmann 1973), com aferição em analisador de potencial hídrico WP4 (Decagon 2001).

A associação de tratamentos foi feita realizando-se inicialmente o tratamento térmico e após o resfriamento, descrito anteriormente, as sementes foram incubadas no tratamento osmótico, seguindo-se o mesmo procedimento dos tratamentos isolados.

Após a aplicação dos tratamentos, as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno, em câmara fria a 7 °C (Kohama *et al.* 2006), durante 30 dias. Inicialmente, após a aplicação dos tratamentos e após o armazenamento, foi avaliada a qualidade fisiológica (sementes germináveis e germinação) e sanitária (teste de sanidade; Capítulo 1) e foram coletadas amostras para as análises bioquímicas (perfil metabólico) e estruturais (anatomia e histoquímica).

O teor de água foi determinado gravimetricamente, pelo método de estufa com circulação de ar a 103 °C por 17h (Ista 1985), sendo os resultados apresentados em porcentagem, em base úmida, para teor de água (Brasil 2009). O potencial hídrico foi medido, em sementes seccionadas ao meio, por meio de potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Pullman, EUA), baseando-se na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada, conforme metodologia descrita por Delgado & Barbedo (2012), sendo os resultados apresentados em MPa (Decagon 2001).

O teste de germinação foi conduzido em rolos de papel Germitest, previamente umedecidos (Brasil 2009), mantidos em câmaras de germinação reguladas para $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com luz contínua e 100% de umidade relativa do ar (Delgado & Barbedo 2007). As avaliações foram realizadas a cada quatro dias, durante 70 dias, registrando-se a porcentagem de sementes com emissão de raiz primária (sementes germináveis), de plântulas normais

desenvolvidas (germinação) e de sementes germináveis que não desenvolveram plântulas (anormais). Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes.

Análises estruturais (anatomia e histoquímica)

Amostras de sementes de cada tratamento foram fixadas em FAA (Formaldeído, Ácido Acético, etanol 50%; 1:1:18 v/v) por 24h (Johansen 1940). Em seguida as amostras foram lavadas em etanol 50% por duas horas e estocadas em etanol 70%. O material foi então seccionado longitudinal e transversalmente e submetido à desidratação em etanol 96% e 100%, por duas horas cada. Em seguida foi realizada a inclusão em resina plástica (Historesin® Leica), seguindo-se a técnica descrita por Gerrits & Smid (1983) e as recomendações do fabricante. Para tanto, foram realizadas duas pré infiltrações (etanol 100%, solução de infiltração; 1:1 seguida de 1:2 v/v), por 25 dias cada, seguida de infiltração em solução de infiltração pura, também por 25 dias. O material foi submetido à bomba de vácuo durante todas as etapas e durante toda a infiltração foi acondicionado a 7 °C. Após a inclusão, os materiais foram montados em blocos de madeira e seccionados, longitudinal e transversalmente, em micrótomo rotativo manual na espessura de 7 µm. Os cortes foram aderidos às lâminas sendo distendidos com água destilada em placa aquecedora. Todo o procedimento descrito foi realizado para três sementes por tratamento, utilizando-se, assim, três repetições, que foram coradas e analisadas conforme descrito a seguir.

Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (AT) a 0,05% em tampão acetato, pH 4,7, durante cinco minutos seguido de lavagem em água corrente por três minutos, e as lâminas foram montadas temporariamente em água (O'Brien *et al.* 1964).

Para os testes histoquímicos os cortes foram tratados com: Lugol 1%, por 30 segundos, para identificação de amido (Berlyn & Miksche 1976); Cloreto de Ferro III a 20%, durante 24 horas, para fenólicos (Johansen 1940, Ventrella *et al.* 2013); Xilidine Ponceau 0,1%, durante 15 minutos seguido de 30 minutos em ácido acético 3%, para proteínas (Mello & Vidal 1980); Vermelho Sudão IV em etanol a 70%, durante 15 minutos e a 60°C, para

lipídios (Pearse 1985); Vermelho de Rutênio de 1000 ppm, durante 25 minutos, para substâncias pécnicas (Johansen 1940). Os aspectos relevantes foram registrados através de imagens (600 dpi) obtidas em fotomicroscópio Olympus BX41.

Para poder identificar qualquer possível alteração estrutural foi realizada a caracterização inicial do material de forma detalhada, atentando para as características que eram apenas variação natural entre indivíduos e evitando, assim, falsos positivos.

Análise de Perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS) seguindo método de Roessner *et al.* (2001), modificado. Amostras de sementes submetidas a cada tratamento, seis repetições de dez, foram seccionadas ao meio, congeladas em nitrogênio líquido e tiveram seus tegumentos removidos. Foram em seguida liofilizadas e homogeneizadas com a ajuda de um almofariz e pistilo. Aproximadamente 20 mg de material seco foi utilizado para extração e derivatização. O material foi extraído em 500 µl de metanol:clorofórmio:água, na proporção de 12:5:1, com adição de 50 µl de padrão interno (0,2 mg ml⁻¹ de adonitol em água) para normalização. A mistura foi incubada a 60°C por 30 minutos sob agitação contínua e centrifugada a 13000 rpm por 2 minutos. A fase polar (superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 ml e a ela foi adicionado 350 µl de água. A mistura foi agitada e após 5 minutos foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos. Trezentos µl da fase polar (fase superior) foram coletados e secos à vácuo, sendo então armazenados a -80°C até derivatização. Para derivatização, 650 µl de piridina e 50 µl de N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) foram adicionados ao material seco, sob agitação durante 1h a 75°C. As amostras foram então transferidas para frascos de vidro, os quais foram lacrados, e injetadas automaticamente em um sistema GC/MS (Varian CP-3800 Gas Chromatograph). Foi utilizada coluna HP-5 MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de espessura x 0,25 µm de filme – Supelco, EUA). O volume de injeção foi de 1 µL, em sistema split: 20 no repouso, desligado no momento da injeção, seguido de split 100 em 0,8 min, e split 20 após 2,5 min. 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: 6 min de aquecimento isotérmico a 70°C, seguido por um aquecimento com taxa de 5°C min⁻¹ até atingir 315°C, e ao final mantido por 1 min a 315°C. A armadilha de íons foi ajustada em 20000 unidades, em uma corrente de ionização externa ajustada para 25 µAmps, e com fluxo interno de hélio de 4 mL min⁻¹. 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 OpenChrom® 1.1.0 “Diels” (OpenChrom® Community Edition). Os picos foram identificados e comparados com padrões autênticos, com a NIST 08 Mass Spectral Library e com o banco de dados Golm Metabolome Database – GMD (Hummel *et al.* 2010).

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os dados do teste de germinação 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 correlação acima de 0,95.

4.3.Resultados

A aplicação dos tratamentos controlou a maioria dos fungos nas sementes de *E. pyriformis*, com exceção de *Fusarium* sp, que apresentou alta incidência em todos os tratamentos (Capítulo 1, Figura 1b). Contudo ocorreu redução na severidade do fungo com a aplicação do tratamento térmico, T₁, identificado no Capítulo 1 como Term-1 Osm-0 (Capítulo 1, Figura 1 b e d).

T₀ apresentou teor de água de 60% nas sementes de *E. pyriformis*, com aumento de 6% em T₁, sendo que as sementes armazenadas apresentaram teor de água de 65±1% (Figura 10a). T₂, T₃ e os tratamentos armazenados apresentaram potencial hídrico semelhante, de em média -2,2 MPa, enquanto T₀ e T₁ apresentaram em média -1,6 MPa (Figura 10b).

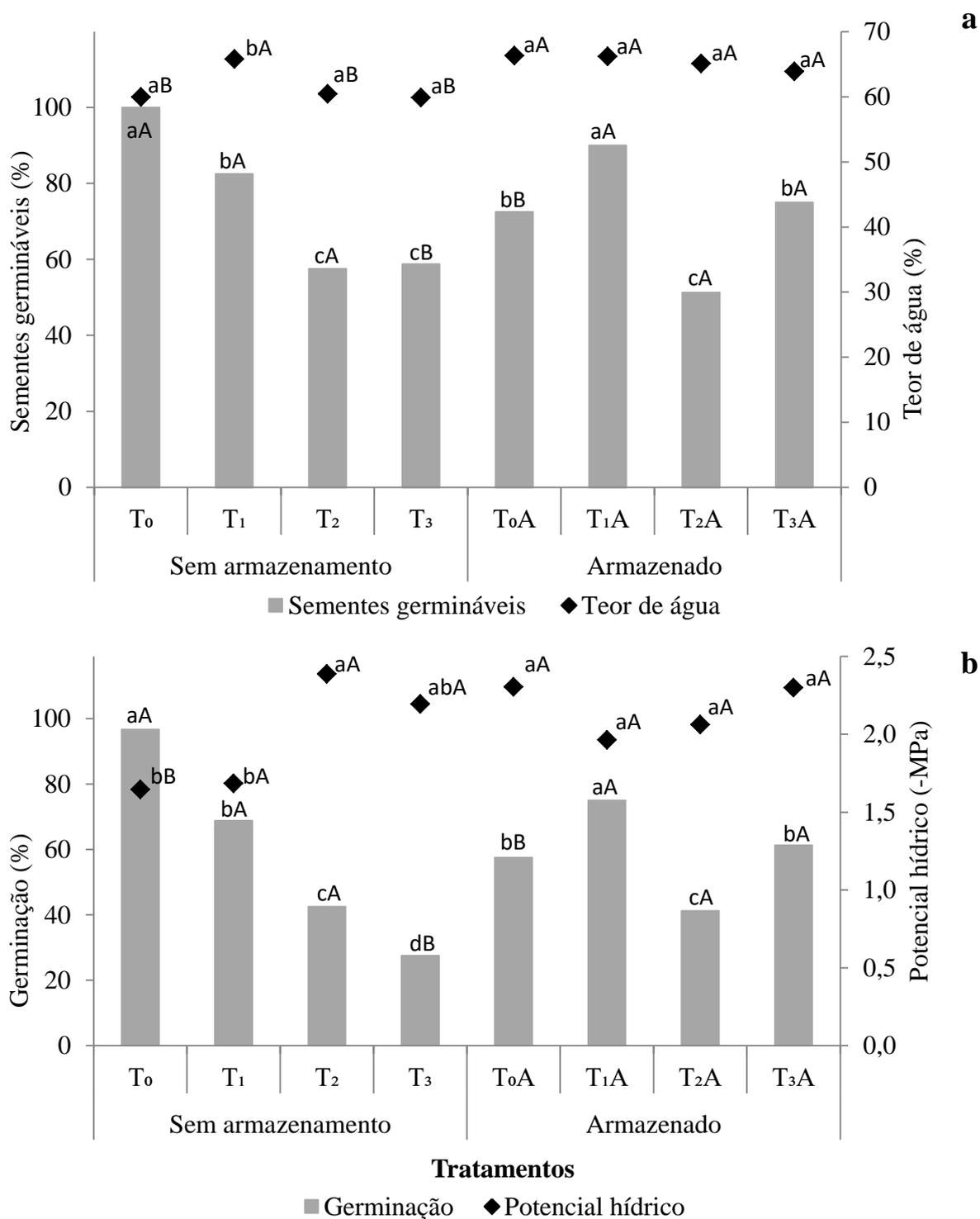


Figura 10. Teor de água (%), sementes germináveis (%), potencial hídrico (-MPa) e germinação (%), de sementes de *Eugenia pyriformis* tratadas. Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T₀/T_{0A}), 55°C/30min (T₁/T_{1A}), -3,4MPa/7dias (T₂/T_{2A}) e 55°C/30min com -3,4MPa/7dias (T₃/T_{3A}). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas: compara os tratamentos dentro de cada período de armazenamento; maiúsculas: comparação de cada tratamento sem armazenamento com o seu correspondente armazenado) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em T₁, T₂ e T₃ houve queda significativa de sementes germináveis e germinação, sendo que T₃ apresentou a menor porcentagem de germinação, com 28% (Figura 10a). Contudo, a germinação em T₃A foi de 61%, sendo semelhante à T₀A (58%), e superior ao observado em T₃. T₀A apresentou redução de 27% em sementes germináveis e 39% em germinação em relação à T₀. Já T₁A não apresentou redução, mantendo 78% de germinação.

Os compostos encontrados na análise de perfil metabólico de cada tratamento foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), visando a avaliar os efeitos dos tratamentos físicos e do armazenamento no perfil metabólico nas sementes (Figura 11). A PCA revelou separação dos tratamentos T₀A, T₁A, T₂A e T₃A no extremo negativo do CP 1 (componente principal 1) e T₀, T₁, T₂ e T₃ agrupados opostamente. 53,1% das variações entre os tratamentos são explicadas pelo CP 1 (31,4%) e pelo CP 2 (componente principal 2, 21,7%). Alguns compostos foram responsáveis pela separação dos tratamentos no CP 1 como os ácidos fosfórico, láctico e málico, além de manitol, myo-inositol e glicose.

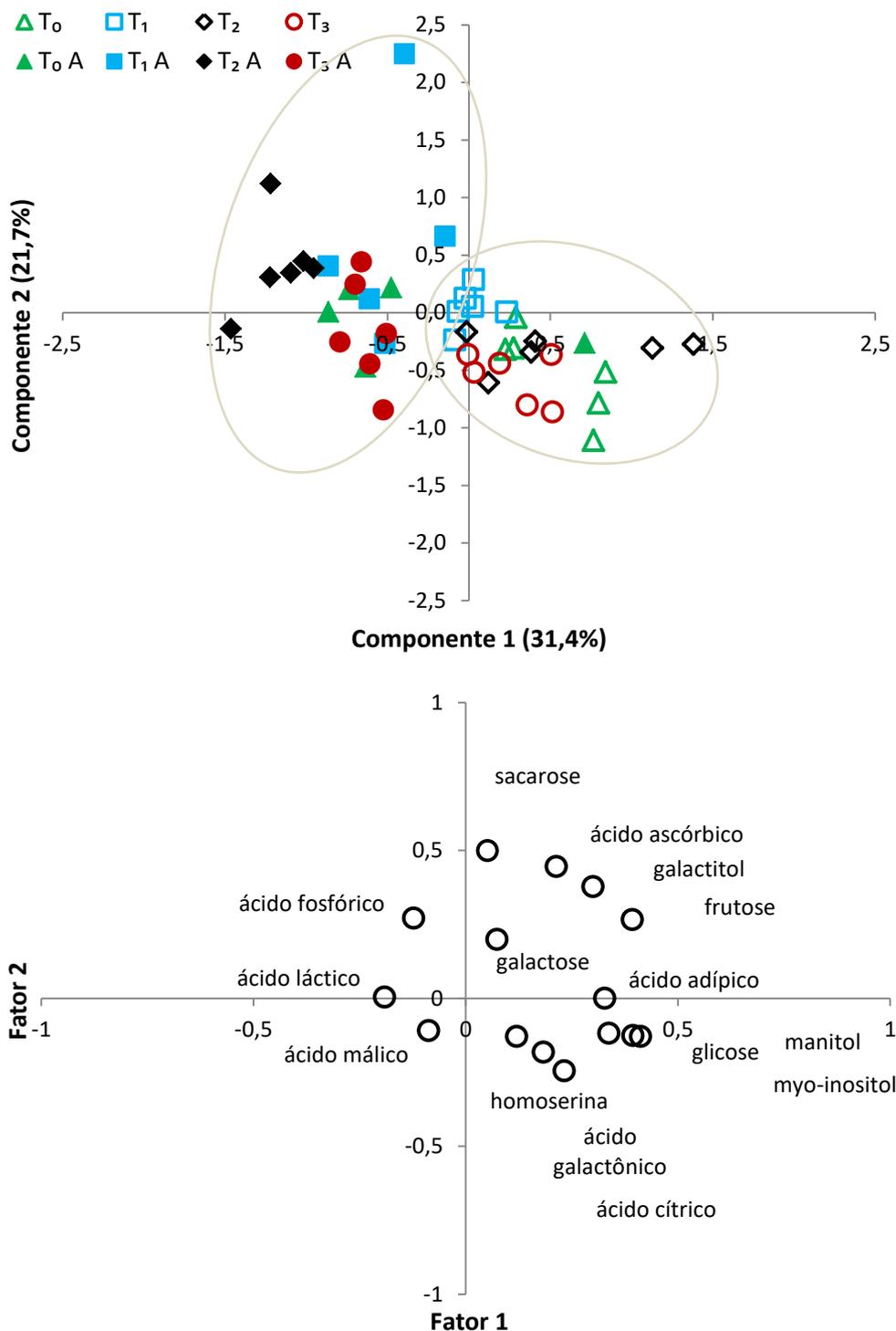


Figura 11. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia pyriformis* submetidos aos tratamentos físicos e armazenadas por 30 dias. Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T₀/T₀A), 55°C/30min (T₁/T₁A), -3,4MPa/7dias (T₂/T₂A) e 55°C/30min com -3,4MPa/7dias (T₃/T₃A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

Foi realizada PCA associando, separadamente, os tratamentos sem armazenamento e com armazenamento às alterações metabólicas de sementes, focando as análises nos efeitos dos tratamentos.

Na PCA relacionando o metabolismo das sementes em T₀, T₁, T₂ e T₃ (Figura 12), observou-se que T₃ estava agrupado no extremo negativo do CP 1, exatamente o oposto de T₀ e T₁, tendo T₂ como intermediário. T₀ e T₁ não apresentam separação entre si e os pontos referentes à T₂ estavam desagrupados de forma errática. O CP 1 foi responsável por 31,3% das variações encontradas, sendo que ao todo a PCA explicou 48% das mesmas. Observou-se que os compostos relacionados com a separação são principalmente a glicose, galactose, myo-inositol, ácido ascórbico, ácido málico e a sacarose. No perfil metabólico (Figura 13) houve aumento na proporção de galactose com a aplicação dos tratamentos, mas principalmente em T₂ e T₃, sendo que nesses dois tratamentos ocorreu redução de sacarose, ácido ascórbico e ácido málico.

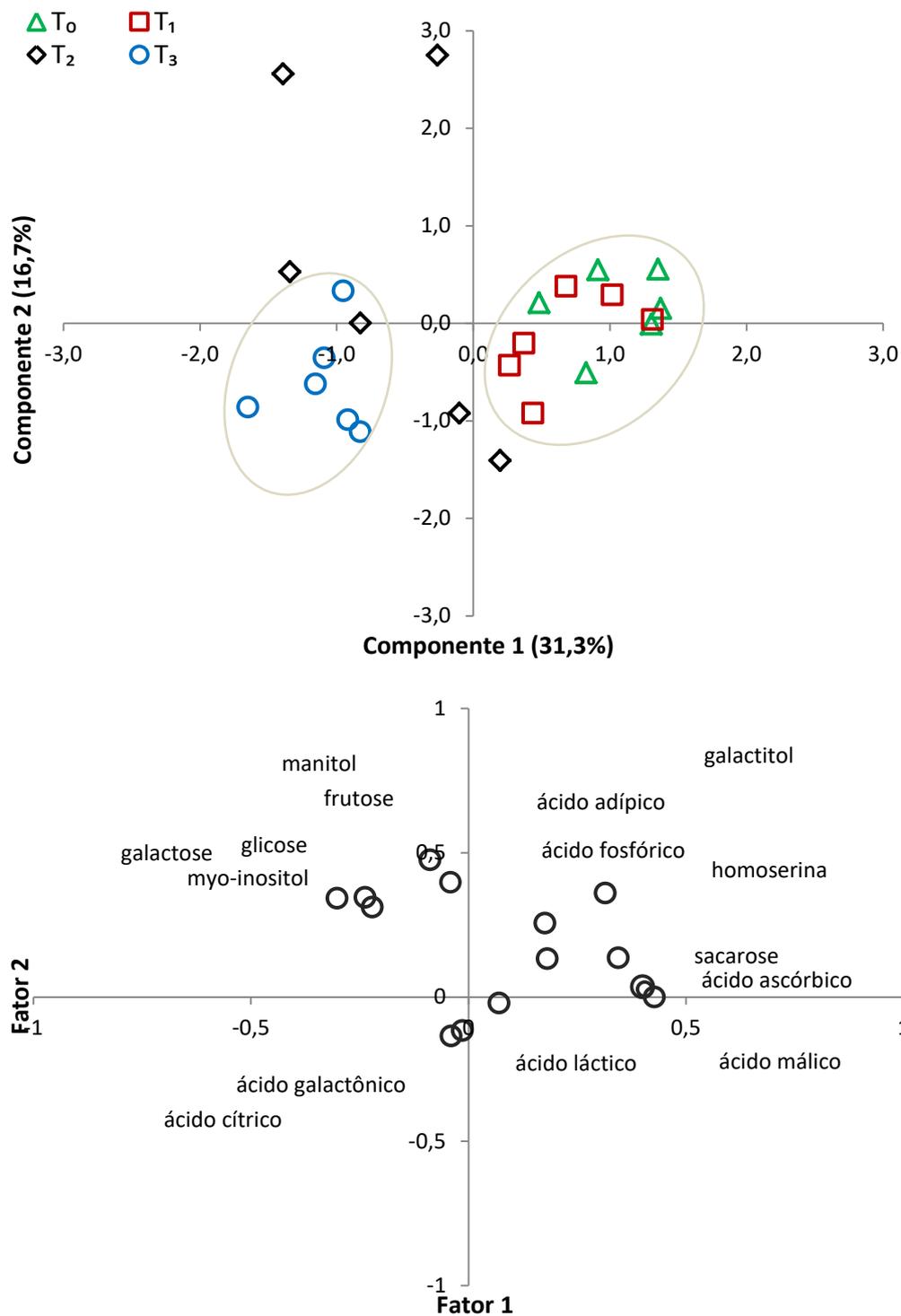


Figura 12. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de *Eugenia pyriformis* submetidos aos tratamentos físicos. Tratamentos: testemunha (T₀), 55°C/30min (T₁), -3,4MPa/7dias (T₂) e 55°C/30min com -3,4MPa/7dias (T₃). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

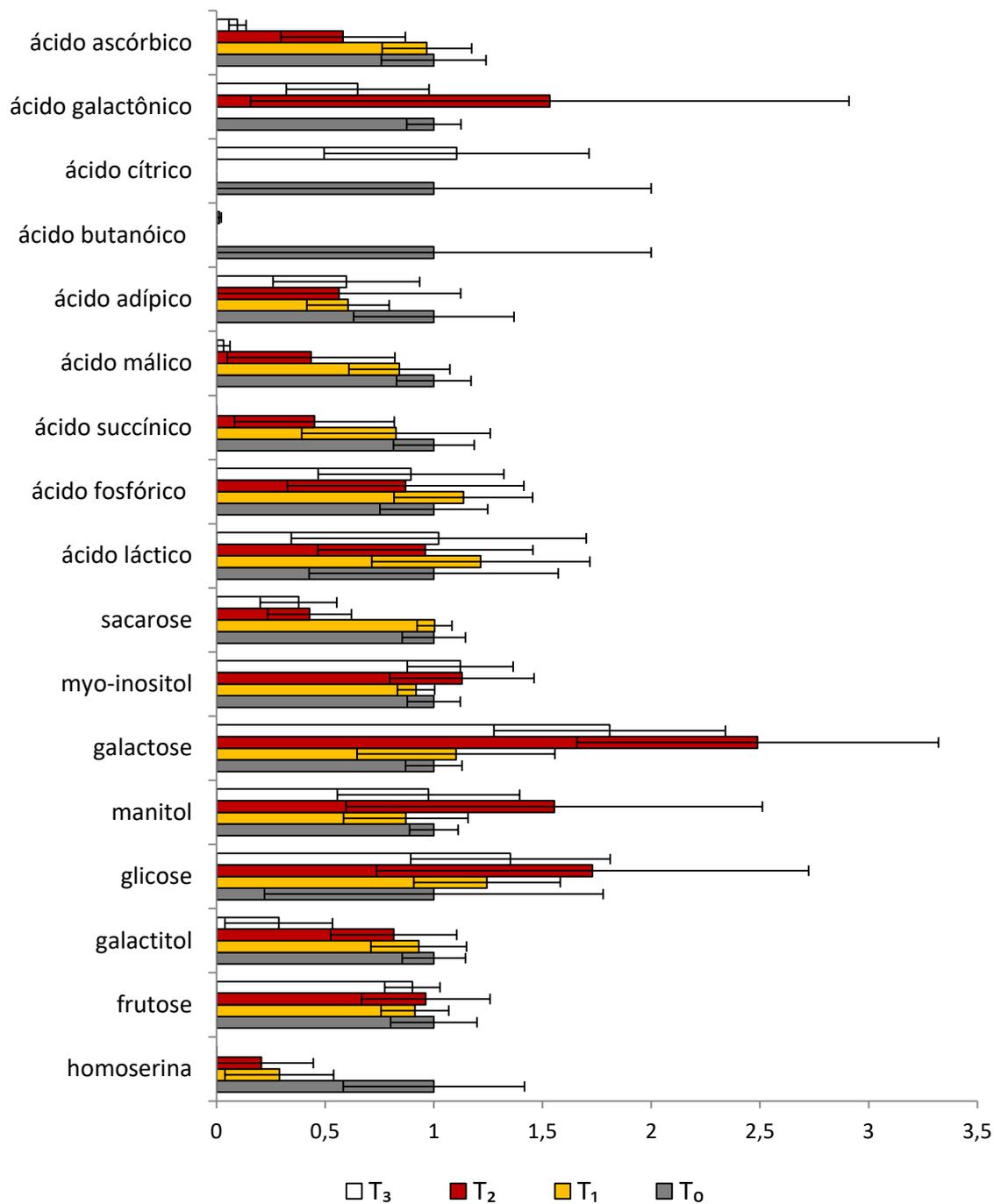


Figura 13. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*. Tratamentos: testemunha (T₀), 55°C/30min (T₁), -3,4MPa/7dias (T₂) e 55°C/30min com -3,4MPa/7 dias (T₃). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (T₀).

A PCA associando as alterações metabólicas dos tratamentos T₀A, T₁A, T₂A e T₃A (Figura 14), revelou que T₂A está agrupado no extremo negativo de CP 1, sendo que os pontos referentes à T₀A, T₁A e T₃A não se separaram. Contudo, os pontos referentes à T₀A e T₁A ficaram mais afastados entre si enquanto os pontos referentes à T₃A ficaram mais agrupados. Os principais compostos responsáveis pela separação foram, no extremo negativo do Fator 1, os ácidos orgânicos: ácido láctico, ácido málico e ácido fosfórico. Já no extremo positivo, no quadrante superior, destacaram-se frutose e galactitol e, no inferior, manitol e glicose. O CP 1 foi responsável por 37,1% das variações encontradas, sendo que toda a PCA explica 65,3% das mesmas. Na análise do perfil metabólico (Figura 15) observou-se em T₂A aumento de ácido láctico, em 500%, e ácido fosfórico e a redução de ácido málico, glicose, frutose e manitol. Já em T₃A houve redução de ácido fosfórico e frutose e aumento de ácido málico, glicose e, também, o ácido láctico, porém em 50%. Em T₁ houve aumento de ácido fosfórico, ácido málico, galactitol e frutose e redução de glicose, sendo que ácido láctico apresentou redução de 70%.

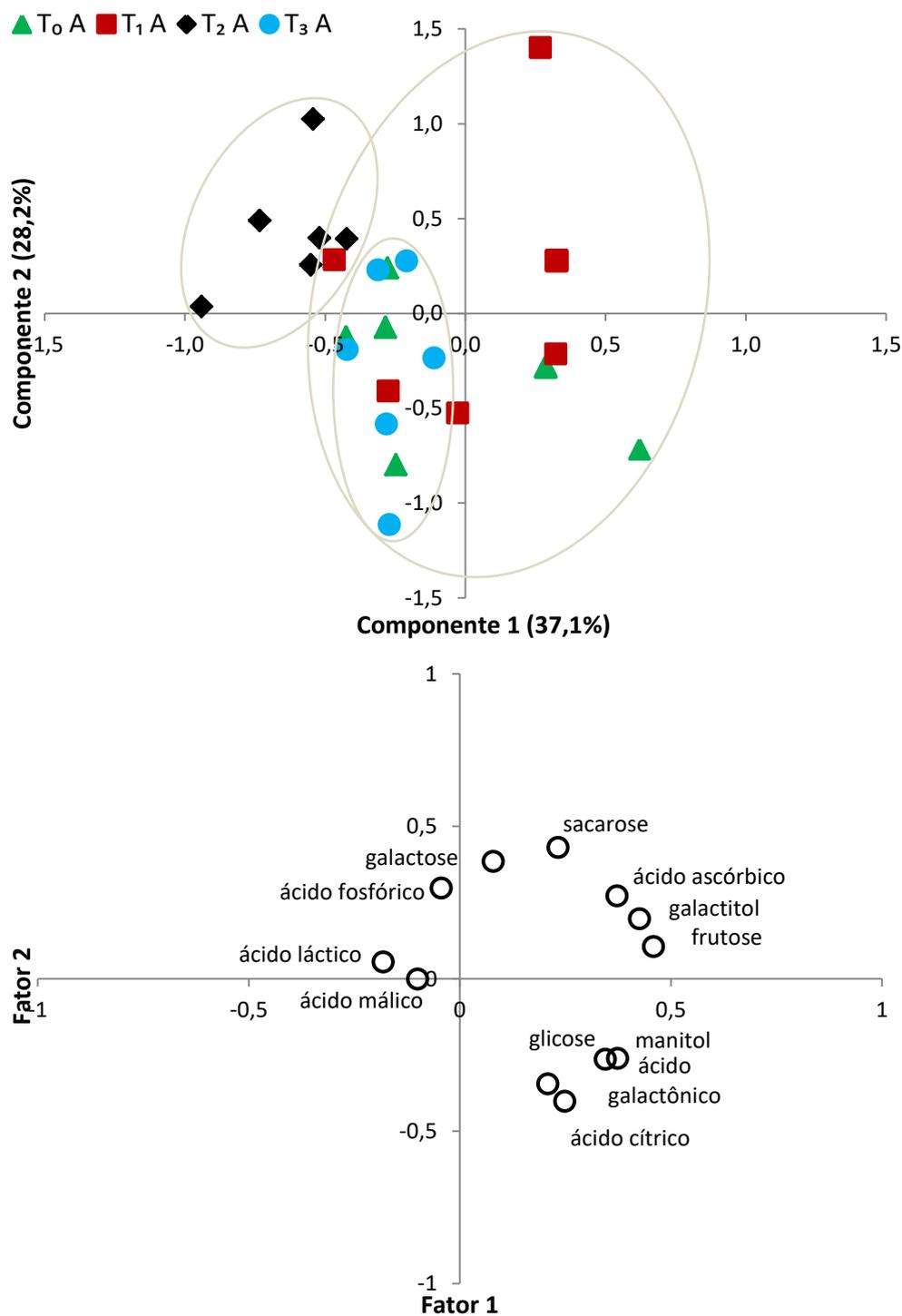


Figura 14. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas de embriões de *Eugenia pyriformis* submetidos aos tratamentos físicos e armazenadas por 30 dias. Tratamentos: testemunha (T₀A), 55°C/30min (T₁A), -3,4MPa/7dias (T₂A) e 55°C/30min com -3,4MPa/7dias (T₃A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

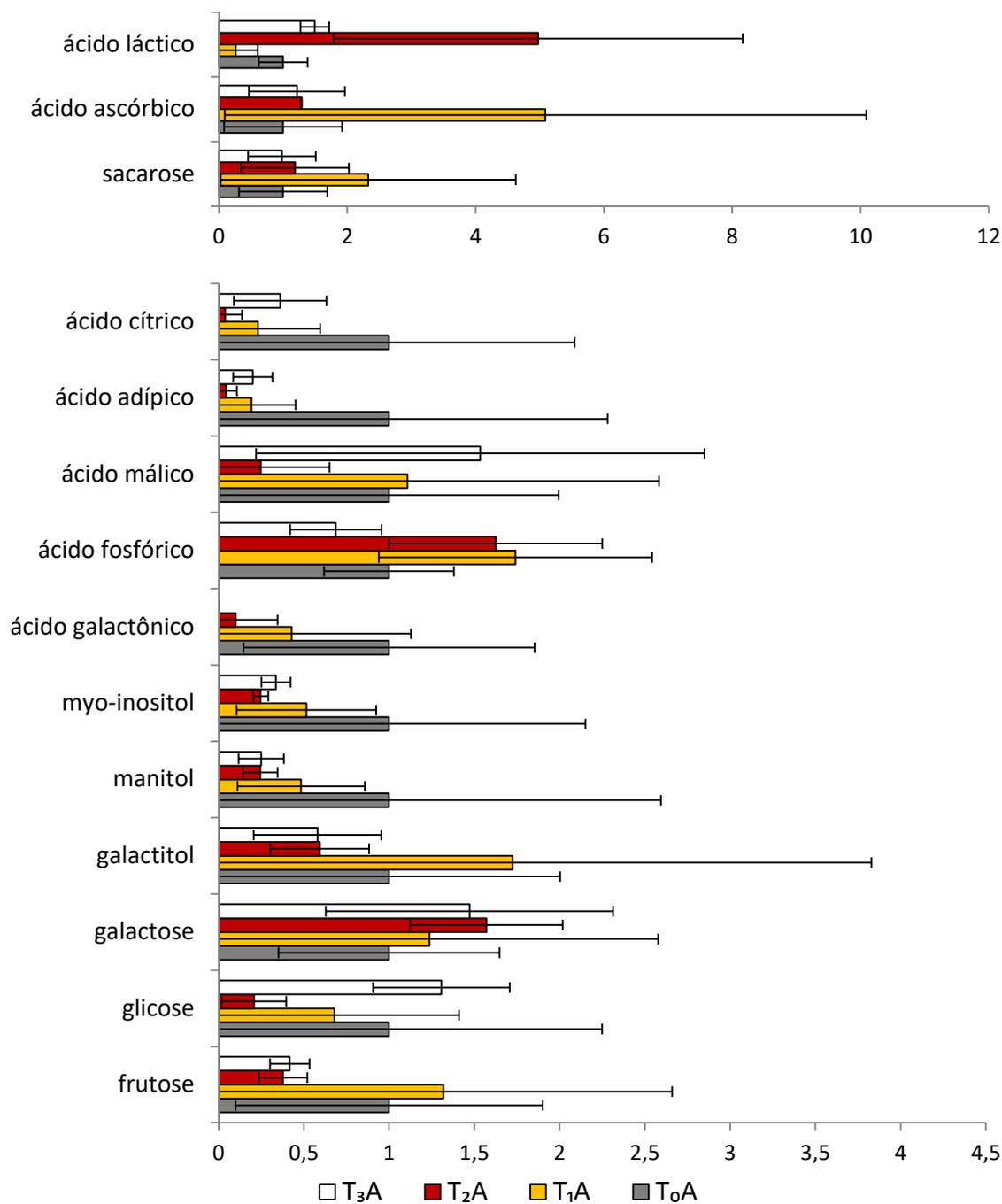


Figura 15. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia pyriformis*. Tratamentos após armazenamento de 30 dias: testemunha (T₀A), 55°C/30min (T₁A), -3,4MPa/7dias (T₂A) e 55°C/30min com -3,4MPa/7dias (T₃A). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (T₀A).

As sementes maduras de *Eugenia pyriformis* apresentaram envoltório delgado, de textura membranácea e cor castanha. O embrião é semigloboso, maciço, preenchendo completamente a cavidade seminal e de cor esbranquiçada. Não se distingue o eixo hipocótilo radícula a olho nu. A caracterização do envoltório e dos cotilédones do embrião do tratamento controle, sem armazenamento e com armazenamento de 30 dias, foi realizada conforme é apresentado a seguir.

Na semente madura o envoltório se restringe a várias camadas de células colapsadas, representadas, muitas vezes, apenas pelas paredes celulares. Nas células em que algum conteúdo pôde ser visualizado ele corou em verde, pelo Azul de Toluidina, indicando a presença de compostos fenólicos (Figura 16.1), o que foi confirmado pelo teste de Cloreto Férrico (Figura 16.3).

No embrião, os cotilédones são revestidos por epiderme uniestratificada (Figura 16.2). No mesofilo observou-se logo abaixo da epiderme do embrião, face abaxial, idioblastos corados de verde, pelo Azul de Toluidina, indicando compostos fenólicos (duas a quatro camadas), contudo nem sempre de forma contínua (Figura 16.2). O teste de Cloreto Férrico confirmou a presença de compostos fenólicos nos idioblastos, preenchendo completamente a célula (Figura 16.5) ou concentrados em gotículas menores (Figura 16.7). Já no mesofilo foram observadas células de parede delgada e ausência de compostos fenólicos (Figura 16.2).

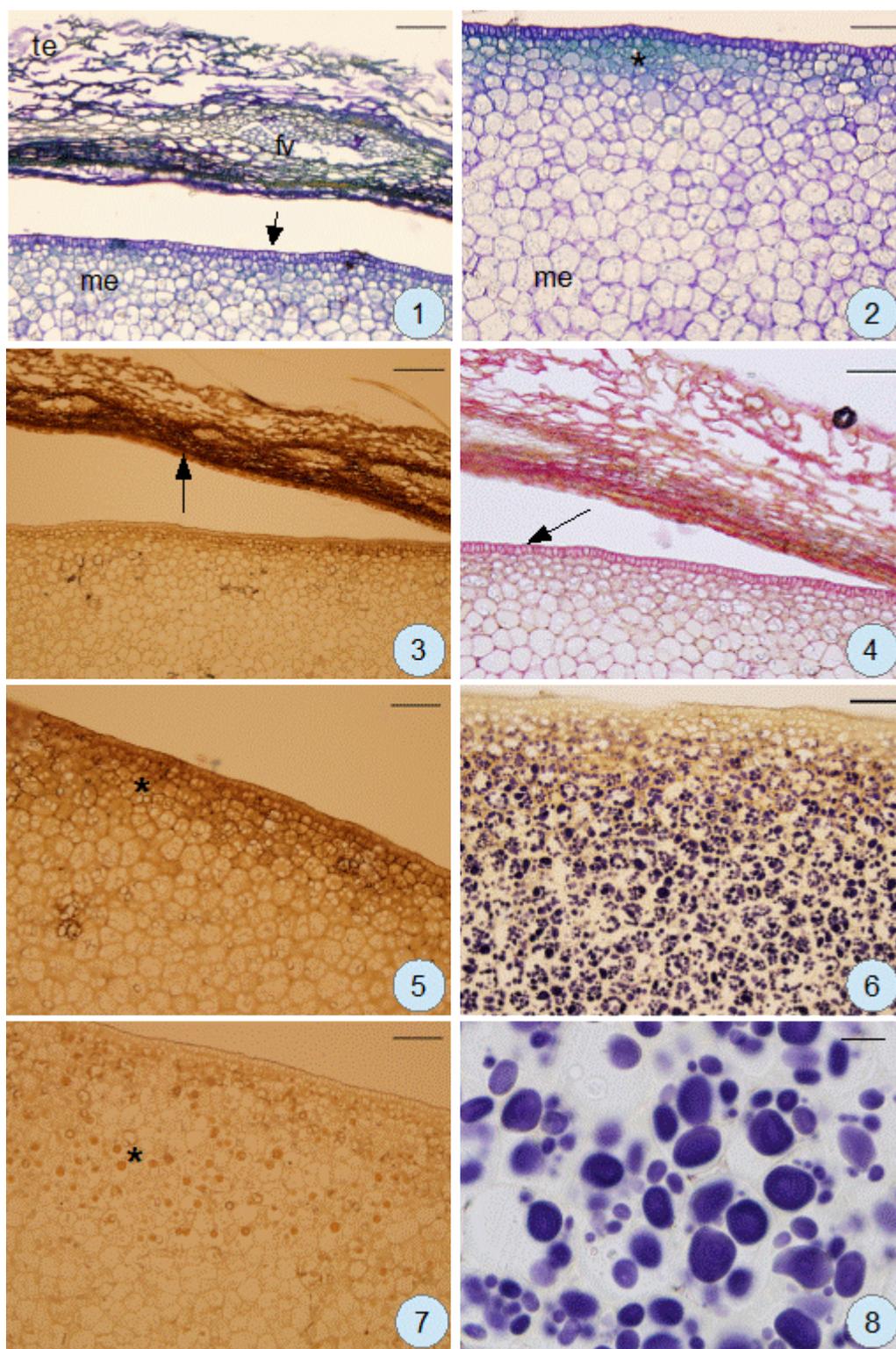


Figura 16. Secções longitudinais de sementes, do tratamento controle (T_0), de *E. pyriformis*. 1 e 2: coradas em Azul de Toluidina, evidenciando: tegumento (te), epiderme do embrião (seta), mesofilo (me), feixes vasculares (fv), idioblastos (*) e região de intersecção entre os cotilédones (ri). 3, 5 e 7: Teste de Cloreto de Ferro III corando compostos fenólicos. 4: teste de Vermelho de Rutênio corando as substâncias pécicas. 6 e 8: Teste com Lugol corando os grânulos de amido. 3: detalhe do tegumento com idioblastos contendo compostos fenólicos (seta). 5: idioblastos com compostos fenólicos (*) nas primeiras camadas abaixo da epiderme do embrião. 7: idioblastos com compostos fenólicos (seta). Barras de escala: 2, 5, 6, 7 e 8: 20 μm ; 1 e 3: 100 μm ; e 4: 200 μm .

Pelo teste de Vermelho de Rutênio observou-se a presença de parede primária contendo pectina, contudo sem espessamento de parede, no envoltório, no mesofilo e na epiderme do embrião (Figura 16.4).

O teste de Xilidine Ponceau, para proteínas, e o teste Sudan IV, para lipídios, foi negativo, não se observando o acúmulo de reservas desses compostos em nenhuma das partes do embrião.

Os cotilédones apresentaram parênquima repleto de amiloplastos, confirmado em teste de Lugol (Figura 16.6 e 16.8), indicando reserva de amido nessas sementes. Os grãos preenchem todo o citoplasma das células, apresentando tamanhos variados e grãos arredondados, ovais, subtriangulares, elipsoides e piriformes.

Nas análises histológicas e histoquímicas realizadas não se observou qualquer alteração, quer seja estrutural ou por meio dos tratamentos histoquímicos utilizados, em T₁, T₂ e T₃ em relação à T₀ ou em T₁A, T₂A e T₃A em relação à T₀A. Também não foram observadas alterações entre T₀ e T₀A.

4.4. Discussão

A aplicação dos tratamentos físicos e o armazenamento não provocaram alterações estruturais visíveis pelas técnicas anatômicas empregadas, contudo foram observadas alterações significativas no metabolismo das sementes de *E. pyrifomis*.

Embora o armazenamento cause importante impacto no metabolismo de *E. pyrifomis* (Figura 11), constatou-se que o tratamento osmótico alterou significativamente o metabolismo das sementes em T₂ e T₃, sendo que T₃ apresentou maior alteração no metabolismo em relação a T₀ (Figura 12). Contudo, a longo prazo houve grande diferença no efeito do tratamento osmótico no metabolismo das sementes (Figura 14), dependendo se ele foi aplicado sozinho ou associado ao tratamento térmico. O tratamento associado armazenado, T₃A, passou a apresentar metabolismo semelhante ao controle, T₀A, enquanto o tratamento osmótico, T₂A, apresentou metabolismo diferente dos outros tratamentos. Assim sendo, ambos os tratamentos apresentaram efeito de longo prazo no metabolismo das sementes, porém atuando de formas diferentes no mesmo.

As alterações metabólicas provocadas pela aplicação do tratamento osmótico causaram inicialmente a inibição do desempenho germinativo, com queda drástica na germinação (Figura 10), além de aumento da severidade de *Fusarium* sp. Contudo, após o armazenamento novas alterações metabólicas foram observadas, culminando na reversão do quadro em T₃A e em um processo de deterioração em T₂A, que manteve baixa porcentagem de germinação. Oliveira *et al.* (2011) constataram que, embora *E. brasiliensis* e *E. uniflora* tenham demonstrado tolerância ao potencial de -4 MPa, *E. pyrifomis* apresentou certa sensibilidade ao tratamento osmótico, no caso de -2,5 MPa, com redução na germinação de 90% para 60%.

Assim sendo, as sementes de *E. pyrifomis* apresentaram maior sensibilidade ao estresse hídrico provocado pelo tratamento osmótico, com queda na germinação e aumento na severidade, contudo, conforme foi observado nas análises em T₃A, tal susceptibilidade não

ocorreu com a associação do tratamento osmótico ao térmico. França & Barbedo (2014), obtiveram resultado semelhante em sementes de *E. brasiliensis*, que apresentaram 46% de formação de plântula com tratamento de -3,4 MPa e de 29%, com tratamento de -4 MPa, após armazenamento de 60 dias, contra 71% da testemunha no mesmo período. Contudo, nos dois tratamentos, a associação com o tratamento 55°C por 150 minutos obteve germinação superior a 80%, resultado semelhante ao do tratamento 55°C por 150 minutos aplicado isolado.

Sabe-se que as sementes respondem ativamente ao estresse abiótico com a ativação de mecanismos de defesa e a produção de compostos para atuar nos mesmos (Pascholati & Leite 1995, Hammond-Kosack & Jones 2000). Desse modo, mecanismos de defesa ativados em resposta ao estresse térmico, que é aplicado antes do osmótico, podem estar relacionados à menor sensibilidade dessas sementes ao estresse hídrico.

Processos de indução de resistência em plantas levam a ativação de um conjunto diverso de mecanismos de defesa em resposta a estresses bióticos e abióticos, sendo que a resposta envolve a transdução de sinais, como abertura de canais de íons, modificações do status de fosforilação de proteínas e ativação transcricional de numerosos genes relacionados à defesa e de enzimas pré-formadas para promover modificações específicas no metabolismo primário e secundário (Cordeiro & Sá 1999).

Nas análises de perfil metabólico observou-se redução de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (Figura 13), principalmente em T₂ e T₃, com destaque a redução de ácido málico, sugerindo menor atividade do metabolismo respiratório, especificamente, do ciclo do ácido tricarboxílico e da cadeia transportadora de elétrons. Andreo *et al.* (2006) destacou o potencial do tratamento osmótico em reduzir o metabolismo das sementes recalcitrantes, sendo que alguns autores têm observado atuação do mesmo no metabolismo respiratório dessas sementes.

Oliveira *et al.* (2011) constatou redução de $\frac{1}{3}$ na produção de CO₂ em sementes de *Inga vera* quando tratadas osmoticamente. Já Françoso (2012) destacou a ocorrência de alterações nas taxas respiratórias de sementes de *E. brasiliensis* após a aplicação dos tratamentos osmóticos, de -3,4 MPa e -4 MPa, indicando tal influência do tratamento osmótico também em sementes de *Eugenia*. Segundo a autora, houve redução no metabolismo respiratório, indicado por queda significativa no consumo de O₂ e na produção de CO₂ com a aplicação do tratamento osmótico, isolado ou associado, contudo esse efeito não se manteve após armazenamento, ocorrendo aumento nas taxas respiratórias no tratamento osmótico isolado, enquanto o associado foi semelhante ao controle.

Embora tenha se observado redução inicial no metabolismo respiratório das sementes tratadas osmoticamente, os desdobramentos dos seus efeitos ao longo do armazenamento se mostraram mais complexos. Contudo, constatou-se que com a associação dos tratamentos não ocorreu apenas a soma dos efeitos de cada tratamento, sendo que um tratamento influenciou no efeito do outro.

Sabe-se que na fase de dessecação em sementes ortodoxas, como *Arabidopsis*, o desligamento do metabolismo respiratório parece ocorrer, principalmente, pela redução dos componentes do ciclo do ácido tricarboxílico, o que diminuiria as taxas respiratórias e evitaria processos oxidativos na mitocôndria (Pammenter & Berjak 1999, Fait *et al.* 2006). Contudo, sementes recalcitrantes mantêm alto teor de água, metabolismo ativo e, inevitavelmente, produção de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (Tommasi *et al.* 1999). Assim sendo, tais mudanças no metabolismo respiratório, não estão relacionadas necessariamente a redução geral no metabolismo da semente. Apesar da redução dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico nas sementes submetidas aos tratamentos osmóticos, observam-se alterações nas proporções de compostos relacionados à atividade de sistemas antioxidantes, como atividade da via biossintética do ascorbato e da rota dos polióis, conforme será discutido adiante.

Diversos fatores, como a deterioração, o ataque de microrganismos ou até estresses abióticos, podem resultar em incremento na formação de radicais livres, principalmente espécies reativas de oxigênio, originadas pelo desequilíbrio no metabolismo respiratório, em especial na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Pukacka *et al.* 2011).

Acredita-se que muitos compostos atuam minimizando o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como glutathiona, ascorbato, tocoferóis, quinonas, flavonoides, compostos fenólicos e polióis (Kranner & Birtic 2005, Nishizawa *et al.* 2008). No entanto, a produção excessiva de EROS e uma ação limitada de defesas antioxidantes podem induzir estresse oxidativo (Dekkers *et al.* 2015).

Polióis, como galactinol, *myo*-inositol, manitol e sorbitol são capazes de diminuir os efeitos das EROS (Smirnoff & Cumbes 1989), contudo não foram observadas alterações significativas na proporção dos polióis detectados.

Houve tendência de redução na proporção de ácido ascórbico em T₂ e T₃, sendo que após o armazenamento não diferiram de T₀A. O ácido ascórbico confere proteção contra espécies reativas de oxigênio via sistema antioxidante ascorbato-glutathiona (Foyer & Noctor 2005), atuando no sistema antioxidante não-enzimático da célula vegetal (Gratão *et al.* 2005). 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). A redução na proporção de ácido ascórbico pode estar relacionada à proteção contra radicais livres, contudo as sementes possivelmente se utilizam também de outras rotas antioxidantes na tentativa de controlar a deterioração causada pelo estresse oxidativo.

T₂A apresentou tendência à redução na proporção de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico e aumento expressivo de ácido láctico. O ácido láctico está associado às vias fermentativas, ocorrendo no final da glicólise (Taiz & Zeiger 2009). O favorecimento de vias

fermentativas pode estar relacionado à baixa concentração de oxigênio interno ou até dano nas mitocôndrias, o que levaria a aumento da glicólise como única fonte de ATP.

A concentração de oxigênio limita a produção de ATP mitocondrial (fosforilação oxidativa) em condição de hipóxia, enquanto que em anóxia não há essencialmente oxigênio disponível para a respiração mitocondrial. Uma capacidade restrita de difusão de oxigênio, em conjunto com uma alta taxa de metabolismo celular, pode gerar hipóxia mesmo em órgãos aéreos, como o fruto (Ke *et al.* 1995), em certos tecidos vasculares (Kimmers & Stringer 1988), grão de pólen (Leprince & Hoekstra 1998) e em sementes (Rolletschek *et al.* 2002).

Acredita-se que a transcrição de genes associados à glicólise e ao metabolismo energético mitocondrial (ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e ciclo da cadeia transportadora de elétrons) são regulados *in vivo* pelas alterações dos níveis de oxigênio interno. Sendo que os níveis de produtos da fermentação e a atividade de enzimas fermentativas diminui com o aumento no suprimento de O₂. As mudanças no oxigênio interno são inversamente proporcionais à atividade fermentativa (Borisjuk & Rolletschek 2009).

Sementes deterioradas apresentam alta taxa de respiração, sendo possível que uma alta taxa de metabolismo celular tenha levado ao consumo de oxigênio interno e o favorecimento das vias fermentativas em T₂A. Assim sendo, acredita-se que o tratamento osmótico desencadeou nas sementes uma aceleração na deterioração, tendo como consequência alta severidade de *Fusarium* sp. e redução da germinação.

Em T₃A a proporção de ácido láctico é 50% superior ao controle, contudo está muito abaixo do observado em T₂A. A severidade de *Fusarium* sp. nesse tratamento chegou a ser superior em relação ao controle, mas é muito menor que a severidade em T₂A, indicando uma possível relação direta entre a produção de ácido láctico pela semente e um aumento na severidade do fungo.

Constatou-se ainda que o potencial hídrico foi significativamente mais negativo em T₂ e T₃, em relação a T₀. A redução dos valores de potencial hídrico das sementes, sem que haja

redução do teor de água, sugere a quebra de moléculas na semente, no caso possivelmente a sacarose, levando ao aumento de sítios de ligação onde a água ficaria mais tempo retida, reduzindo os valores do potencial hídrico, devido a menor disponibilidade de água livre (Taiz & Zeiger 2009). Tal alteração pode ser causada por resposta ao estresse hídrico ou mesmo por processos de deterioração da própria semente, de degradação das sementes e desestruturação de suas células e compostos de reserva.

Por fim, a análise dos dados de germinação nos mostra que as sementes de *E. pyrifomis* apresentam deterioração considerável após apenas 30 dias de armazenamento, apresentando perda de 39% da safra em T₀A. Tal perda foi reduzida com a aplicação de T₁ para 19%. Pode-se atribuir esse resultado ao controle de *Fusarium* sp., observado com a redução da severidade do fungo, já que a própria micota pode intensificar a taxa de deterioração, preservando assim a integridade da semente. Contudo também foram observadas alterações no metabolismo dessas sementes.

Em T₁ observamos que, de modo geral, seu metabolismo foi semelhante a T₀. O melhor desempenho de T₁A pode estar associado à tendência de aumento na proporção de ácido ascórbico e galactitol, que atuariam minimizando o estresse oxidativo, e a redução drástica na via fermentativa, indicada pela redução do ácido láctico. Pode se supor que a menor necessidade de combater o patógeno tenha permitido a semente concentrar esforços nos mecanismos de reparo, necessários em sementes recalcitrantes devido ao seu metabolismo elevado durante armazenamento.

4.5. Conclusões

Os tratamentos físicos aplicados causam alterações no metabolismo das sementes, contudo não é possível constatar alterações anatômicas com os métodos empregados.

O tratamento térmico isolado foi o que manteve maior qualidade fisiológica e sanitária das sementes. O controle do desenvolvimento de patógenos e a redução na via fermentativa parecem ser os principais fatores envolvidos.

O tratamento osmótico provocou inicialmente uma tendência de redução do metabolismo respiratório e levou a inibição das taxas germinativas. Contudo, há menor sensibilidade ao estresse hídrico em sementes submetidas previamente ao tratamento térmico. Mecanismos de defesa ativados em resposta ao estresse térmico podem ter reduzido a sensibilidade ao estresse hídrico.

4.6. Referências bibliográficas

- Andréo, Y., Nakagawa, J. & Barbedo, C.J.** 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). *Revista Brasileira de Botânica* 29(2): 309-318.
- Ashraf, M. & Harris, P.J.C.** 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Berjak, P. & Pammenter, N.W.** 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science* 4(Article 478): 1-9.
- Berlyn, G.P. & Miksche, J.P.** 1976. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University, pp.121-276.
- Borisjuk, L. & Rolletschek, H.** 2009. The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist* 182: 17–30.
- Brasil.** 2009. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Brasília, 399p.
- Chaouch, S. & Noctor, G.** 2010. *Myo*-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal H₂O₂. *New Phytologist*, v. 188, pp. 711–718.
- Cocuron, J.C., Anderson, B., Boyd, A. & Alonso, A.P.** 2014. Targeted metabolomics of *Physaria fendleri*, an industrial crop producing hydroxy fatty acids. *Plant Cell Physiology* 55(3): 620–633.
- Conde, A., Silva, P., Agasse, A., Conde, C. & Gerós, H.** 2011. Mannitol Transport and Mannitol Dehydrogenase Activities are Coordinated in *Olea europaea* Under Salt and Osmotic Stresses. *Plant Cell Physiology*, v. 52, n. 10, pp. 1766–1775.
- Cordeiro, M.C.R. & Sá, M. De F.G.** 1999. Biotecnologia e resistência a patógenos. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*, Brasília- DF, v. 2, n.10, pp. 34-39.
- Decagon.** 2001. WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual. Pullman: Decagon Devices, Inc.
- Dekkers, B.J., Costa, M.C.D., Maia, J., Bentsink, L., Ligterink, W. & Hilhorst, H.W.M.** 2015. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta*, v. 241, pp. 563–577.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(2): 265-272.

- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55(4): 583-590.
- 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*, v. 142, pp. 839-854.
- Ferreira, D.F.** 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35(6): 1039-1042.
- Françoso, C.F.** 2012. Tratamentos térmicos e osmóticos para controle de fungos associados a sementes de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia uniflora*. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. 78p.
- Françoso, C.F. & Barbedo, C.J.** 2014. Tratamentos osmóticos e térmicos para controle de fungos em sementes de grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Hoehnea* 41(4): 541-552.
- Foyer, C. & Noctor, G.** 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, v. 17, pp. 1866–1875.
- Gerrits, P.O. & Smid, L.** 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal Microscopy*, v.95, pp.150-155.
- 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*, v. 32, pp. 481-494.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D.** 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1): 1-9.
- Hammond-Kosack, K. & Jones, J.D.G.** 2000. Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. *Biochemistry e molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, pp.1102-1156.
- Hummel, J., Strehmel, N., Selbig, J., Walther, D. & Kopka, J.** 2010. Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. *Metabolomics*, v.6, pp.322-333.
- ISTA - International Seed Testing Association.** 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, v. 13, pp. 356-513.
- Johansen, D.A.** 1940. *Plant Mycrotechnique*. McGraw-Hill Book Co, New York, 112p.

- Ke, D., Yahia, E., Hess, B., Zhou, L. & Kader, A.A.** 1995. Regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbon dioxide stresses. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v. 120, pp. 481–490.
- Kimmers, T.W. & Stringer, M.A.** 1988. Alcohol dehydrogenase and ethanol in the stems of trees: evidence for anaerobic metabolism in the vascular cambium. *Plant Physiology*, v. 87, pp. 693–697.
- Kohama, S., Maluf, A.M., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes* 28(1): 72-78.
- Kranner, I. & Birtić, S.** 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45(5): 734-740.
- Leprince, O. & Hoekstra, F.A.** 1998. The response of cytochrome redox state and energy metabolism to dehydration support a role for cytoplasmic viscosity in desiccation tolerance. *Plant Physiology*, v. 118, pp. 1253–1264.
- Loewus, F.A. & Murthy, P.P.N.** 2000. *Myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*, v. 150, pp.1–19.
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C.** 1980. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo: Ed. Edgard Blucher-FUNCAMP, 69p.
- Michel, B.E. & Kaufmann, M.R.** 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51(5): 914-916.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. & Shigeoka, S.** 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, v. 147, pp. 1251-1263.
- O'brien, T.P., Feder, N. & Mccully, M.E.** 1964. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. *Protoplasma*, v.59, pp. 368-373.
- Oliveira, C.F., Oliveira, D.C., Parisi, J.J.D. & Barbedo, C.J.** 2011. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. *Revista Brasileira de Sementes* 33(3): 520-532.
- Pammenter, N.W. & Berjak, P.** 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research*, v. 9, pp. 13-37.
- Pascholati, S.F. & Leite, B.** 1995. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorin, L. *Manual de fitopatologia*. São Paulo: Ceres, pp.417-453.
- Pearse, A.G.E. 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*, 4 ed., v.2. Livingstone, Edinburgh. 624p.

- Parisi, J.J.D., Biagi, J.D., Barbedo, C.J. & Medina, P.F.** 2013. Viability of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. embryos according to the maturation stage, fungal incidence, chemical treatment and storage. *Revista Brasileira de Sementes* 35(1): 70-76.
- 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*, v. 33, pp. 2219–2227.
- Ramos, A. & Souza, G. B.** 1991. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante o armazenamento. *Boletim de Pesquisa Florestal*, v. 22/23, pp. 21–27.
- 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(1): 11-29.
- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Koschorrek, M., Wobus, U. & Weber, H.** 2002. Legume embryos develop in a hypoxic environment. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, pp. 1099–1107.
- Smirnoff, N. & Cumbes, Q.J.** 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible Solutes. *Phytochemistry* 28(4): 1057-1060.
- Stoop, J.M.H., Williamson, J.D. & Pharr, D.M.** 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, v. 1, p. 139–144. 10.1016/S1360-1385(96)80048-3
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2009. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- Takahashi, S., Katagiri, T., Hirayama, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K.** 2001. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant and Cell Physiology*, v. 42, pp. 214–222.
- 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.
- Tommasi, F., Paciolla, C. & Arrigoni, O.** 1999. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seed. *Physiologia Plantarum*, v. 105, pp. 193-198.
- Torabinejad, J., Donahue, J.L., Gunesekara, B.N., Allen-Daniels, M.J. & Gillaspay, G.E.** 2009. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, v. 150, pp. 951–961.
- Ventrella, M.C., Almeida, A.L., Nery, L.A. & Coelho, V.P.M.** 2013. *Métodos histoquímicos aplicados às sementes*. Viçosa, MG: Ed. UFV. 40p.

5. Capítulo 4

Reações metabólicas de diferentes safras de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamentos osmótico (osmoterapia) e térmico (termoterapia)

5.1.Introdução

As sementes denominadas recalcitrantes apresentam intolerância às baixas temperaturas e redução do teor de água, sendo, conseqüentemente, armazenadas hidratadas. Desse modo, há o favorecimento da proliferação de microrganismos, principalmente de fungos, o que acelera consideravelmente a velocidade de deterioração (Berjak & Pammenter 2013, Delgado & Barbedo 2012, Parisi *et al.* 2013).

Sabe-se ainda que as sementes recalcitrantes apresentam alta variação dentro e entre espécies, bem como inter e intra-sazonalmente (Berjak & Pammenter 2013). Um dos principais obstáculos hoje no uso de termoterapia e osmoterapia em sementes de espécies de *Eugenia* é a grande variação que os tratamentos têm apresentado no controle dos fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. e, em alguns casos, até em seu efeito na qualidade fisiológica das sementes.

Com a aplicação do tratamento osmótico de -3,4 MPa nas sementes de *E. brasiliensis*, por exemplo, foi observada a menor porcentagem de germinação, de 14%, sendo que no controle foi de 75% até os 60 dias de armazenamento (Capítulo 1). Contudo, Oliveira *et al.* (2011) e Françoso & Barbedo (2014), não observaram alteração da germinação em relação ao controle com a aplicação dos tratamentos osmóticos de -3,4 MPa e -4 MPa, que se manteve superior a 85%.

De modo geral, um mesmo tratamento tem apresentado resultados diferentes na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de espécies diferentes e até mesmo da mesma espécie, como se têm constatado em safras de *E. pyriformis*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis* (Oliveira *et al.* 2011, Françoso & Barbedo 2014, Françoso 2012).

Assim sendo, o presente trabalho objetiva analisar possíveis alterações bioquímicas e estruturais relacionadas com as respostas aos estresses térmicos e hídricos, provocados pela aplicação de tratamentos físicos em duas safras, coletadas em períodos diferentes, de *E. brasiliensis*.

5.2. Material e Métodos

Sementes de *Eugenia brasiliensis* foram obtidas de matrizes plantadas no Jardim Botânico, em São Paulo, SP (23°38'S e 46°37'W), sendo coletada uma safra em 2012 (denominada S₁) e outra safra em 2013 (denominada S₂), ambas em dezembro. O processo de extração e beneficiamento das sementes foi realizado através da extração manual da polpa e eliminação de sementes danificadas por insetos e imaturas, sendo em seguida armazenadas em sacos de polietileno, em câmara fria a 7°C (Kohama *et al.* 2006), até a instalação dos experimentos, não ultrapassando 15 dias.

Para as análises bioquímicas (perfil metabólico) foram selecionados os tratamentos térmicos e osmóticos que, além de manter a qualidade fisiológica das sementes, apresentaram os resultados mais promissores e significativos no controle da severidade de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (metodologia e resultados apresentados no Capítulo 1). Sendo assim, foram analisados os tratamentos (sem armazenamento/ com armazenamento de 30 dias): 55 °C/ 150 minutos (denominado T₁/ T_{1A}), -3,4 MPa/7 dias (denominado T₂/ T_{2A}), associado de 55 °C/150 minutos com -3,4 MPa/7 dias (denominado T₃/ T_{3A}) e a testemunha, que foi caracterizada pelas sementes que não receberam quaisquer dos tratamentos, térmico ou osmótico (denominada T₀/ T_{0A}).

Para a aplicação do tratamento térmico as sementes são imersas em água destilada, em béqueres de vidro acondicionados em estufa com circulação de ar, nas temperaturas e períodos descritos anteriormente. Foi utilizada a proporção de 1:5 entre o peso das sementes e o peso da água do tratamento. Os béqueres foram periodicamente agitados e, ao término do período de exposição, as sementes foram resfriadas com água destilada a temperatura ambiente por duas horas e depositadas sobre papel de filtro para retirada do excesso de água superficial (Oliveira *et al.* 2011, França & Barbedo 2014).

O tratamento osmótico consistiu da incubação das sementes em solução de polietileno glicol 6000 (PEG) por sete dias, em caixas tipo gerbox, a 7 °C. Após os tratamentos

osmóticos, as sementes foram lavadas por cinco vezes consecutivas em água destilada, para remoção da solução residual de PEG (Oliveira *et al.* 2011). As soluções osmóticas foram preparadas ajustando-se a concentração do sal em função da temperatura de incubação (Michel e Kauffmann 1973), com aferição em analisador de potencial hídrico WP4 (Decagon 2001).

A associação de tratamentos foi feita realizando-se inicialmente o tratamento térmico e após o resfriamento, descrito anteriormente, as sementes foram incubadas no tratamento osmótico, seguindo-se o mesmo procedimento dos tratamentos isolados.

Após a aplicação dos tratamentos, as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno, em câmara fria a 7 °C (Kohama *et al.* 2006), durante 30 dias. Inicialmente, após a aplicação dos tratamentos e após o armazenamento, foi avaliada a qualidade fisiológica (sementes germináveis e germinação), a qualidade sanitária (incidência e severidade) e foram coletadas amostras para as análises bioquímicas (perfil metabólico).

As análises de sanidade da safra 2013 (incidência e severidade) são apresentadas no Capítulo 1, sendo neste capítulo apresentado o resultado das análises sanitárias da safra 2012 (incidência de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.).

O teor de água foi determinado gravimetricamente, pelo método de estufa com circulação de ar a 103 °C por 17h (ISTA 1985), sendo os resultados apresentados em porcentagem, em base úmida, para teor de água (BRASIL 2009). O potencial hídrico foi medido, em sementes seccionadas ao meio, por meio de potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Pullman, EUA), baseando-se na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada, conforme metodologia descrita por Delgado & Barbedo (2012), sendo os resultados apresentados em MPa (Decagon 2001).

O teste de germinação foi conduzido em rolos de papel Germitest, previamente umedecidos (Brasil 2009), mantidos em câmaras de germinação reguladas para $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com luz contínua e 100% de umidade relativa do ar (Delgado & Barbedo 2007). As avaliações

foram realizadas a cada quatro dias, durante 70 dias, registrando-se a porcentagem de sementes com emissão de raiz primária (sementes germináveis), de plântulas normais desenvolvidas (germinação) e de sementes germináveis que não desenvolveram plântulas (anormais). Devido à disponibilidade de material foram utilizadas quatro repetições de 12 sementes na safra 2012 e de 25 sementes na safra 2013.

O teste de sanidade foi realizado pelo método de incubação em papel de filtro (Brasil 2009). As sementes foram distribuídas equidistantemente em placas de Petri (90x15mm), contendo três folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada e incubadas por sete dias a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz/escuro, utilizando-se quatro repetições, de 12 sementes para a Safra 1, com seis sementes por placa. A identificação e a contagem dos fungos foram realizadas examinando-se as colônias fúngicas desenvolvidas nas sementes com auxílio de microscópio estereoscópico. Para o cálculo da incidência de fungos nas sementes, em porcentagem, cada fungo foi analisado individualmente. Em cada análise foi considerado o número de sementes com presença do fungo analisado em relação ao total de sementes incubadas. Em alguns casos, a identificação do fungo foi complementada pela visualização das características morfológicas em microscópio óptico (Barnett & Hunter 1999).

Análises estruturais (anatomia e histoquímica)

Amostras de sementes de cada tratamento foram fixadas em FAA (Formaldeído, Ácido Acético, etanol 50%; 1:1:18 v/v) por 24h (Johansen 1940). Em seguida as amostras foram lavadas em etanol 50% por duas horas e estocadas em etanol 70%. O material foi então seccionado longitudinal e transversalmente e submetido à desidratação em etanol 96% e 100%, por duas horas cada. Em seguida foi realizada a inclusão em resina plástica (Historesin® Leica), seguindo-se a técnica descrita por Gerrits & Smid (1983) e as recomendações do fabricante. Para tanto, foram realizadas duas pré infiltrações (etanol 100%, solução de infiltração; 1:1 seguida de 1:2 v/v), por 25 dias cada, seguida de infiltração em solução de infiltração pura, também por 25 dias. O material foi submetido à bomba de vácuo

durante todas as etapas e durante toda a infiltração foi acondicionado a 7 °C. Após a inclusão, os materiais foram montados em blocos de madeira e seccionados, longitudinal e transversalmente, em micrótomo rotativo manual na espessura de 7 µm. Os cortes foram aderidos às lâminas sendo distendidos com água destilada em placa aquecedora. Todo o procedimento descrito foi realizado para três sementes por tratamento, utilizando-se, assim, três repetições, que foram coradas e analisadas conforme descrito a seguir.

Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (AT) a 0,05% em tampão acetato, pH 4,7, durante cinco minutos seguido de lavagem em água corrente por três minutos, e as lâminas foram montadas temporariamente em água (O'Brien *et al.* 1964).

Para os testes histoquímicos os cortes foram tratados com: Lugol 1%, por 30 segundos, para identificação de amido (Berlyn & Miksche 1976); Cloreto de Ferro III a 20%, durante 24 horas, para fenólicos (Johansen 1940, Ventrella *et al.* 2013); Xilidine Ponceau 0,1%, durante 15 minutos seguido de 30 minutos em ácido acético 3%, para proteínas (Mello & Vidal 1980); Vermelho Sudão IV em etanol a 70%, durante 15 minutos e a 60°C, para lipídios (Pearse, 1985); Vermelho de Rutênio de 1000 ppm, durante 25 minutos, para substâncias pécnicas (Johansen, 1940). Os aspectos relevantes foram registrados através de imagens (600 dpi) obtidas em fotomicroscópio Olympus BX41.

Para poder identificar qualquer possível alteração estrutural foi realizada a caracterização inicial do material de forma detalhada, atentando para as características que eram apenas variação natural entre indivíduos e evitando, assim, falsos positivos.

Análise de Perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS) seguindo método de Roessner *et al.* (2001), modificado. Amostras de sementes submetidas a cada tratamento, seis repetições de dez nas duas safras, foram seccionadas ao meio, congeladas em nitrogênio líquido e tiveram seus tegumentos removidos. Foram em seguida liofilizadas e homogeneizadas com a ajuda de um almofariz e pistilo.

Aproximadamente 20 mg de material seco foi utilizado para extração e derivatização. O material foi extraído em 500 µl de metanol:clorofórmio:água, na proporção de 12:5:1, com adição de 50 µl de padrão interno (0,2 mg ml⁻¹ de adonitol em água) para normalização. A mistura foi incubada a 60°C por 30 minutos sob agitação contínua e centrifugada a 13000 rpm por 2 minutos. A fase polar (superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 ml e a ela foi adicionado 350 µl de água. A mistura foi agitada e após 5 minutos foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos. Trezentos µl da fase polar (fase superior) foram coletados e secos à vácuo, sendo então armazenados a -80°C até derivatização. Para derivatização, 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) foram adicionados ao material seco, sob agitação durante 1h a 75°C. As amostras foram então transferidas para frascos de vidro, os quais foram lacrados, e 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 m 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 min 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 e com o banco de dados Golm Metabolome Database – GMD (Hummel *et al.* 2010).

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os dados do teste de germinação 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 correlação acima de 0,95.

5.3.Resultados

Análise comparativa das safras

Considerando as diferenças observadas em sementes de coletas de anos diferentes, mas submetidas a um mesmo tratamento, os perfis metabólicos das testemunhas de duas safras de *E. brasiliensis* (S₁T₀, S₁T₀A, S₂T₀ e S₂T₀A) foram submetidos à análise de componentes principais (PCA; Figura 17), visando avaliar se de fato as safras eram diferentes metabolicamente desde o princípio. A PCA revelou uma separação principal no CP 1 (componente principal 1), com S₂T₀ e S₂T₀A concentrados no extremo negativo, em oposição a S₁T₀ e S₁T₀A. Observa-se que os pontos referentes à S₁T₀ e S₂T₀ estão mais agrupados e localizados no extremo negativo na CP 2 (componente principal 2). A separação principal parece estar relacionada principalmente aos polióis, concentrados no lado positivo do Fator 1, em oposição aos ácidos orgânicos (ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido chiquímico, ácido quínico e ácido málico). No total, 70,39% das variações entre as safras são explicadas pelo CP 1 (53,83%) e pelo CP 2 (16,56%).

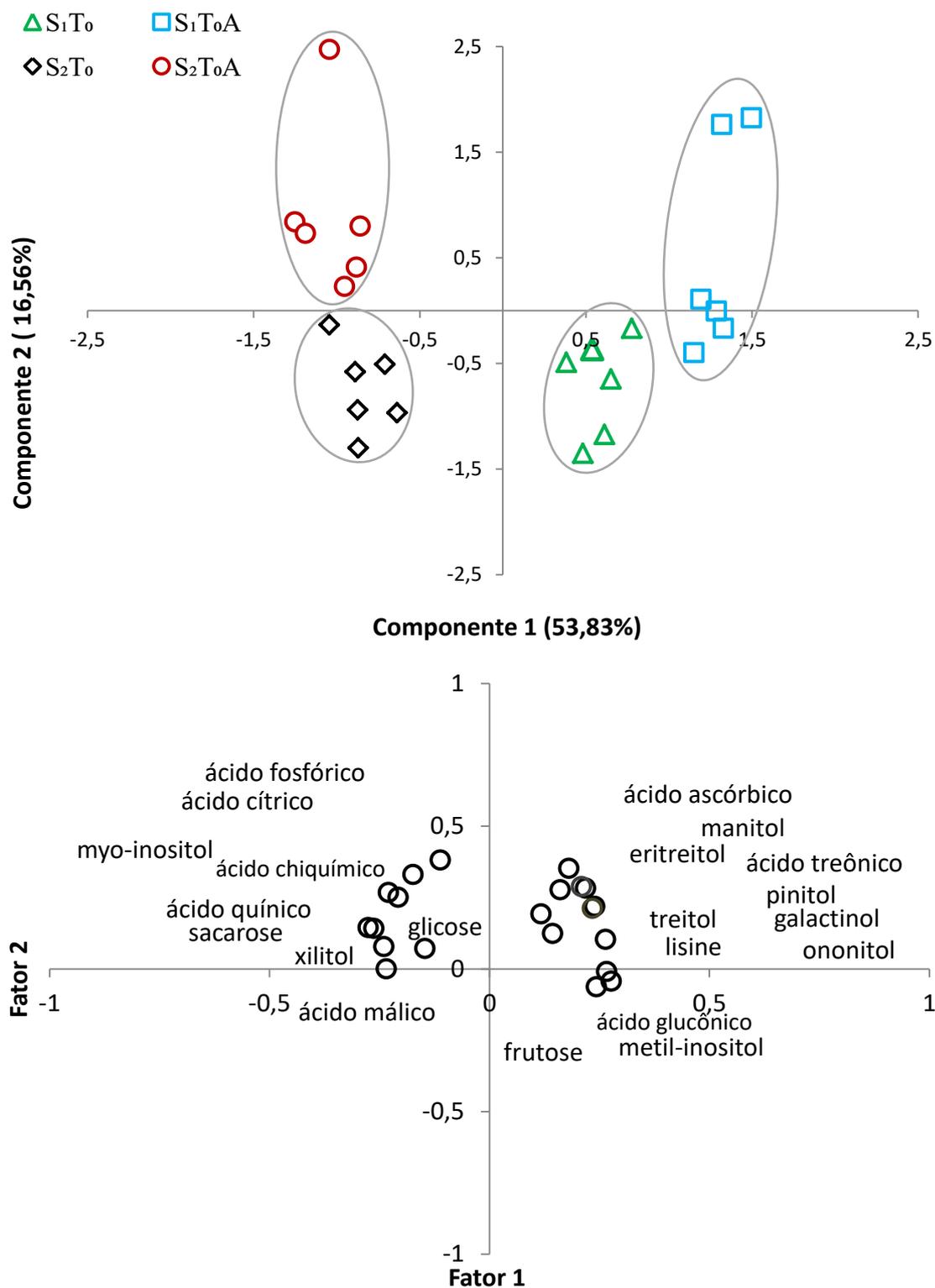


Figura 17. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, sem armazenamento e após 30 dias de armazenamento, da Safra 2012 (S₁T₀/ S₁T₀A) e da Safra 2013 (S₂T₀/ S₂T₀A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

Em S_1T_0 , S_1T_0A , S_2T_0 e S_2T_0A (Figura 18) ocorre aumento nas proporções de ácido fosfórico, ácido málico, ácido cítrico, ácido chiquímico, ácido quínico, sacarose e galactose com o armazenamento, sendo que ocorre maior proporção dos mesmos em S_2T_0 e S_2T_0A . Os polióis também tendem a aumentar com o armazenamento, contudo S_2T_0 e S_2T_0A apresentam maiores proporções de myo-inositol e treitol, enquanto S_1T_0 e S_1T_0A apresentam maiores proporções de pinitol, galactitol e manitol, além de galactinol, metil-inositol e ononitol, polióis ausentes em S_2 . Também são ausentes em S_2 os aminoácidos essenciais lisina, fenilalanina e glicina.

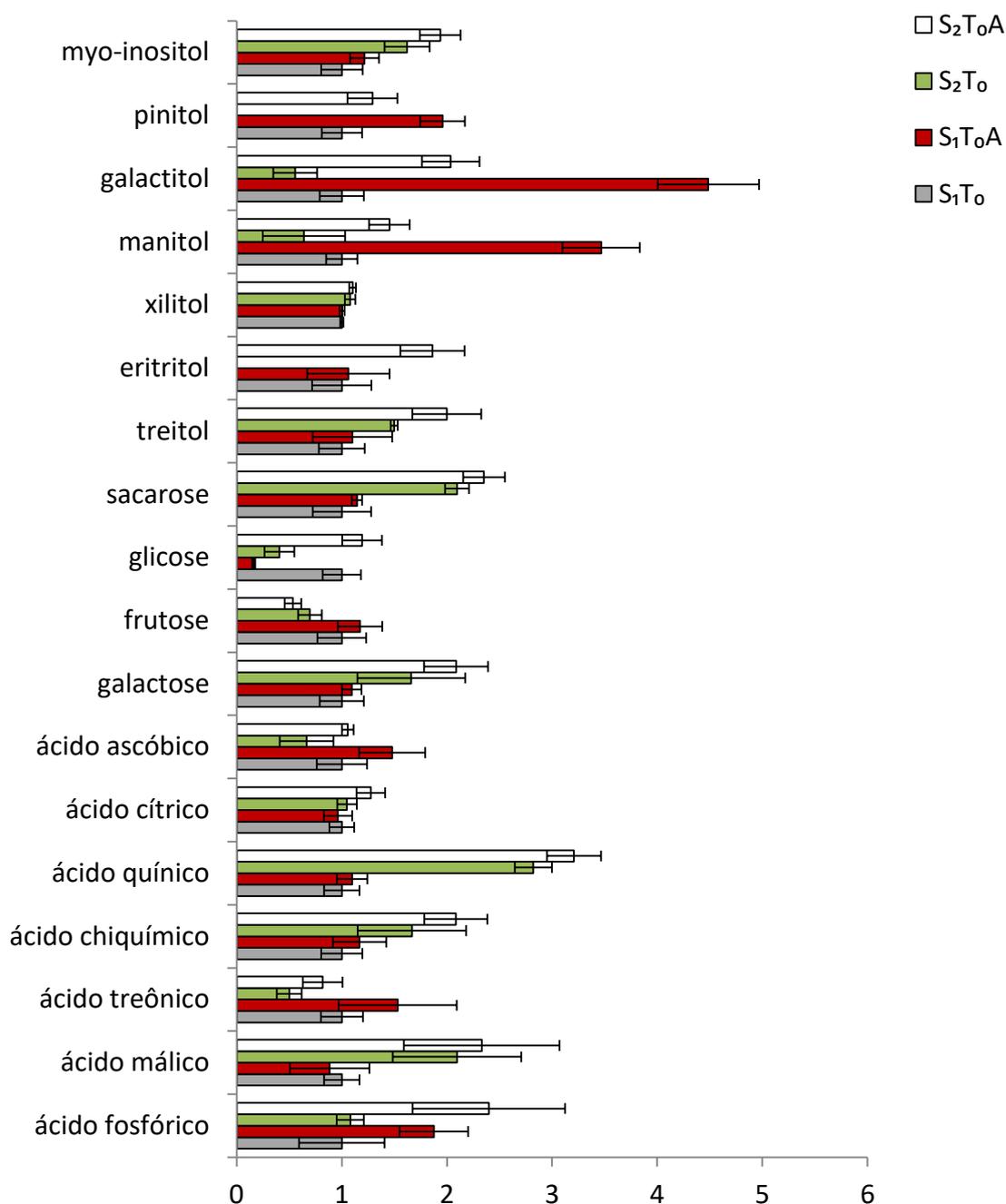


Figura 18. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis*, sem armazenamento e após 30 dias de armazenamento, da Safra 2012 (S₁T₀/ S₁T₀A) e da Safra 2013 (S₂T₀/ S₂T₀A). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média de S₁T₀.

Em S₁T₀ ocorre alta porcentagem de sementes germináveis e germinação, havendo redução na germinação após armazenamento, em S₁T₀A, de 96% para 65%. Já S₂T₀ apresenta alta porcentagem de sementes germináveis e baixa germinação, com 31%. Contudo, em S₂T₀A a porcentagem de germinação foi de 81% (Figura 19).

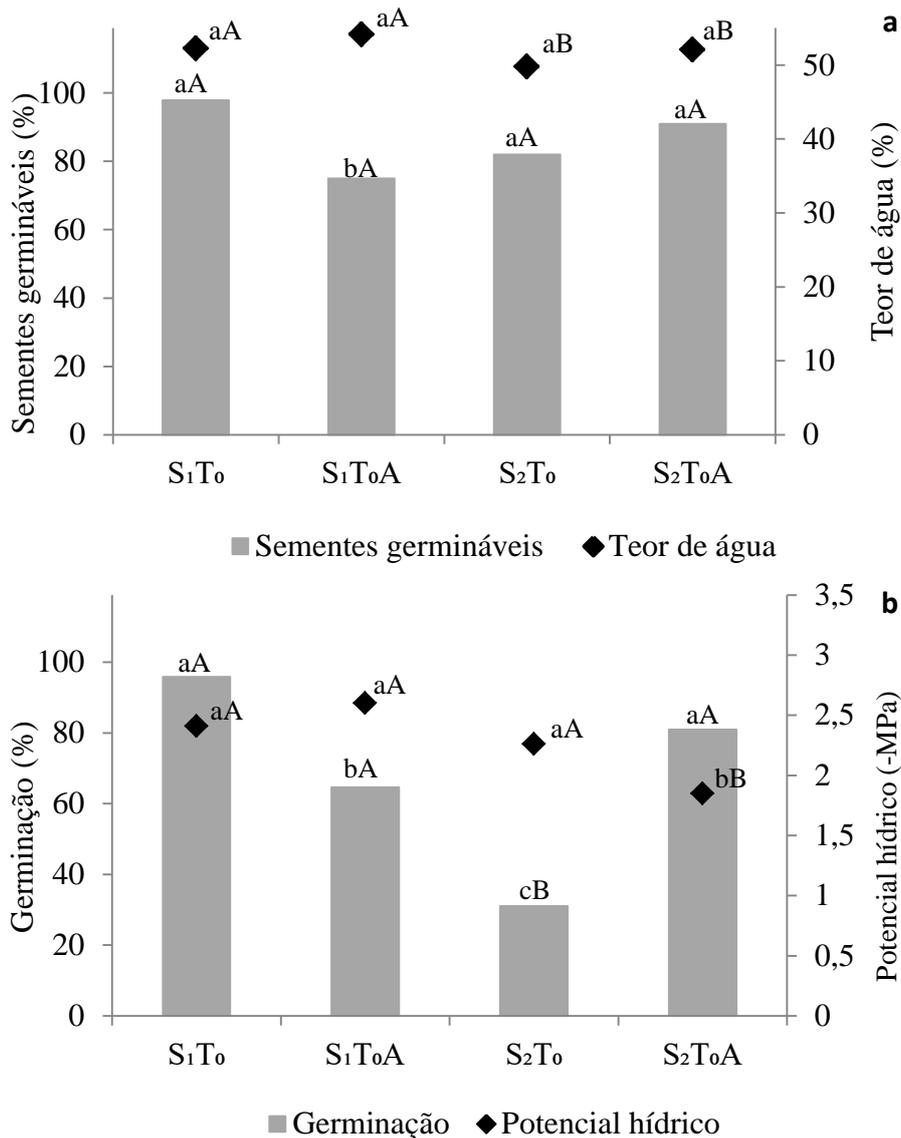


Figura 19. Teor de água (%), sementes germináveis (%), germinação (%) e potencial hídrico (-MPa), da Safra 2012 (S₁) e da Safra 2013 (S₂) de sementes de *Eugenia brasiliensis* tratadas. Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T₀), 55°C/150min (T₁), -3,4MPa/7dias (T₂) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (T₃). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas: compara os períodos de armazenamento dentro de cada safra; maiúsculas: comparação entre as safras dentro de cada período de armazenamento) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Análise da Safra 1

S₁T₀ apresentou 96% de germinação, enquanto em S₁T₂ e S₁T₃ ocorreu queda na germinação, com 58% e 50%, respectivamente. Contudo, após armazenamento não houve diferença significativa nos valores de germinação entre S₁T₀A e S₁T₁A, S₁T₂A e S₁T₃A. O

potencial hídrico foi significativamente menos negativo em S₁T₁A, que também apresentou maior teor de água (Tabela 4).

Tabela 4. Teor de água (%), potencial hídrico (-MPa), sementes germináveis (%) e germinação de sementes de *Eugenia brasiliensis*, tratadas e após 30 dias de armazenamento (A), pertencentes a Safra 2012 (S₁). Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T₀/T₀A), 55°C/150min (T₁/T₁A), -3,4MPa/7dias (T₂/T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (T₃/T₃A)⁽¹⁾.

Tratamentos de sementes	Armazenamento		Média
	Inicial	30 dias	
<i>Teor de água</i>			
T ₀	52,2 aA	54,1 abA	
T ₁	52 aB	57 aA	
T ₂	48,1 aB	52 bcA	
T ₃	51 aA	49,4 cA	
CV	3,44%		
<i>Potencial hídrico</i>			
T ₀	-2,5	-2,6	-2,56 a
T ₁	-2,1	-2,2	-2,14 b
T ₂	-2,7	-2,8	-2,74 a
T ₃	-2,4	-3	-2,72 a
Média	-2,4 B	-2,7 A	
CV	9,45%		
<i>Sementes germináveis</i>			
T ₀	97,9 aA	75 aB	
T ₁	81 abA	92 aA	
T ₂	63 bA	77 aA	
T ₃	63 bA	73 aA	
CV	18,21%		
<i>Germinação</i>			
T ₀	96 aA	65 aB	
T ₁	79 abA	79 aA	
T ₂	58 bcA	58 aA	
T ₃	50 cA	56 aA	
CV	18,88%		

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas: comparação dentro das colunas; maiúsculas: comparação dentro das linhas) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A análise de incidência mostrou que não houve crescimento de *Penicillium* sp. em S₁T₀ e S₁T₀A, contudo com a aplicação de S₁T₁ e S₁T₃ ocorre o crescimento do mesmo, respectivamente de 11% e 38%, sendo observada redução da incidência após armazenamento (Figura 20). No entanto, *Fusarium* sp. teve alta incidência inicial em todos os tratamentos. Após armazenamento S₁T₁A apresenta redução da incidência de *Fusarium* sp., com 42%, e S₁T₂A aumento, com 100% (Figura 20).

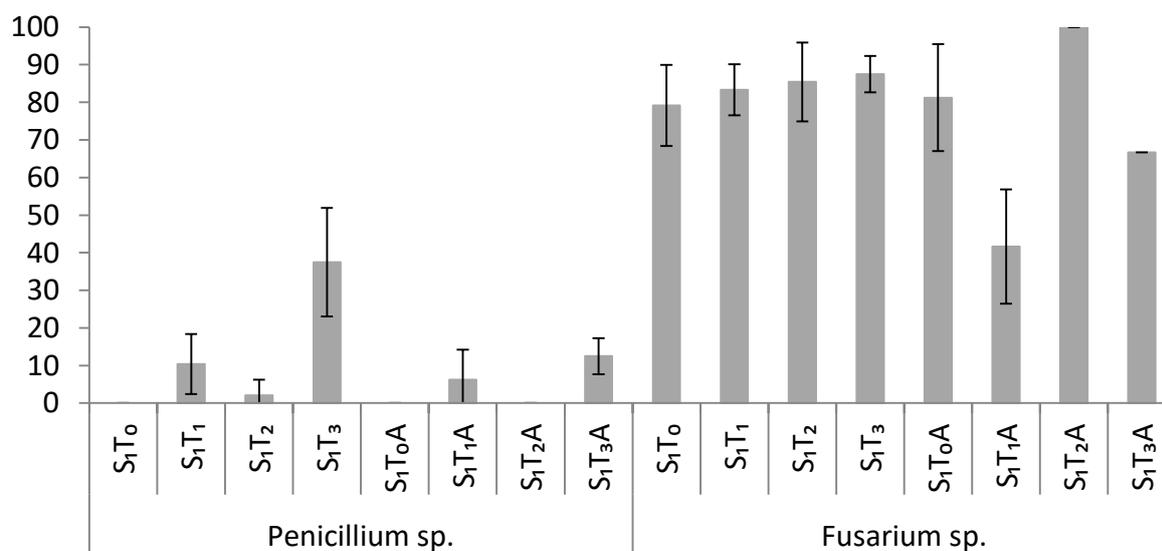


Figura 20. Incidência de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. em sementes de *E. brasiliensis* do Safra 2012 (S₁) submetidas a tratamentos físicos e armazenadas (A). Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (S₁T₀/ S₁T₀A), 55°C/150min (S₁T₁/ S₁T₁A), -3,4MPa/7dias (S₁T₂/ S₁T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₁T₃/S₁T₃A). É apresentada as médias e o desvio padrão.

Os compostos encontrados na análise de perfil metabólico de cada tratamento da safra 2012 (S₁) foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), visando avaliar os efeitos dos tratamentos físicos e do armazenamento no perfil metabólico nas sementes (Figura 21). A PCA revelou grande proximidade entre S₁T₀ e S₁T₀A e os tratamentos armazenados (S₁T₁A, S₁T₂A e S₁T₃A), sendo que esses tratamentos apresentaram separação de S₁T₁, S₁T₂ e S₁T₃. Os pontos referentes à S₁T₂ e S₁T₃ estavam desagrupados. 51,4% das variações entre os tratamentos são explicadas pelo CP 1 (34,83%) e pelo CP 2 (16,56%), sendo que os compostos responsáveis pela separação foram ácido ascórbico, galactose, glicose, *myo*-

inositol, treitol, ácido treônico e galactitol. No perfil metabólico observa-se maior proporção de ácido treônico, galactitol, treitol e *myo*-inositol em S₁T₁, S₁T₂ e S₁T₃ em relação à S₁T₀ (Figura 22), enquanto há redução em ácido ascórbico. Após armazenamento há, principalmente em S₁T₂A, redução na proporção dos polióis, de ácido treônico e da galactose e aumento de glicose (Figura 23).

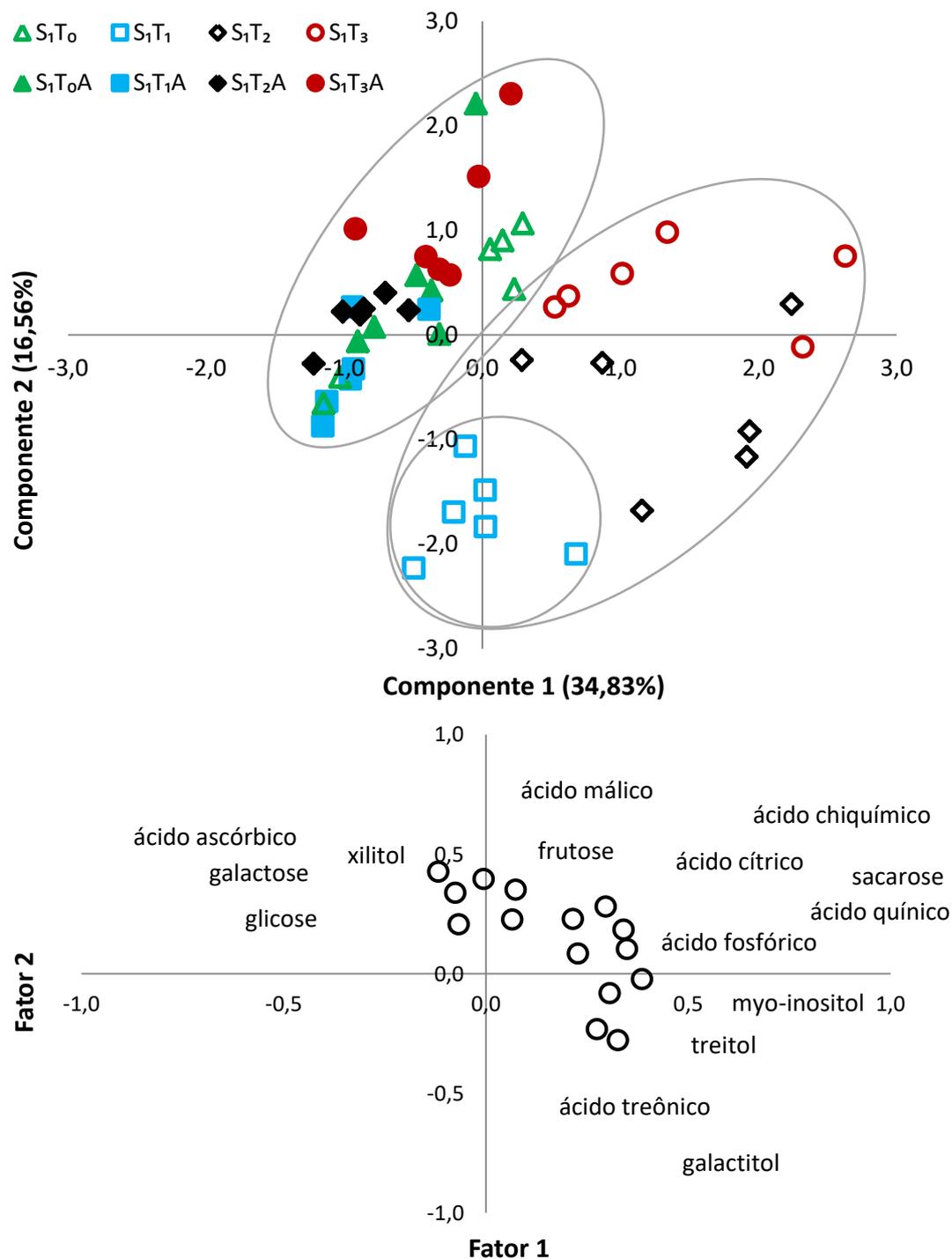


Figura 21. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, inicialmente e após 30 dias de armazenamento (A), da Safra 2012 (S₁). Tratamentos (sem armazenamento /armazenado): testemunha (S₁T₀/ S₁T₀A), 55°C/150min (S₁T₁/ S₁T₁A), -3,4MPa/7dias (S₁T₂/ S₁T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₁T₃/ S₁T₃A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

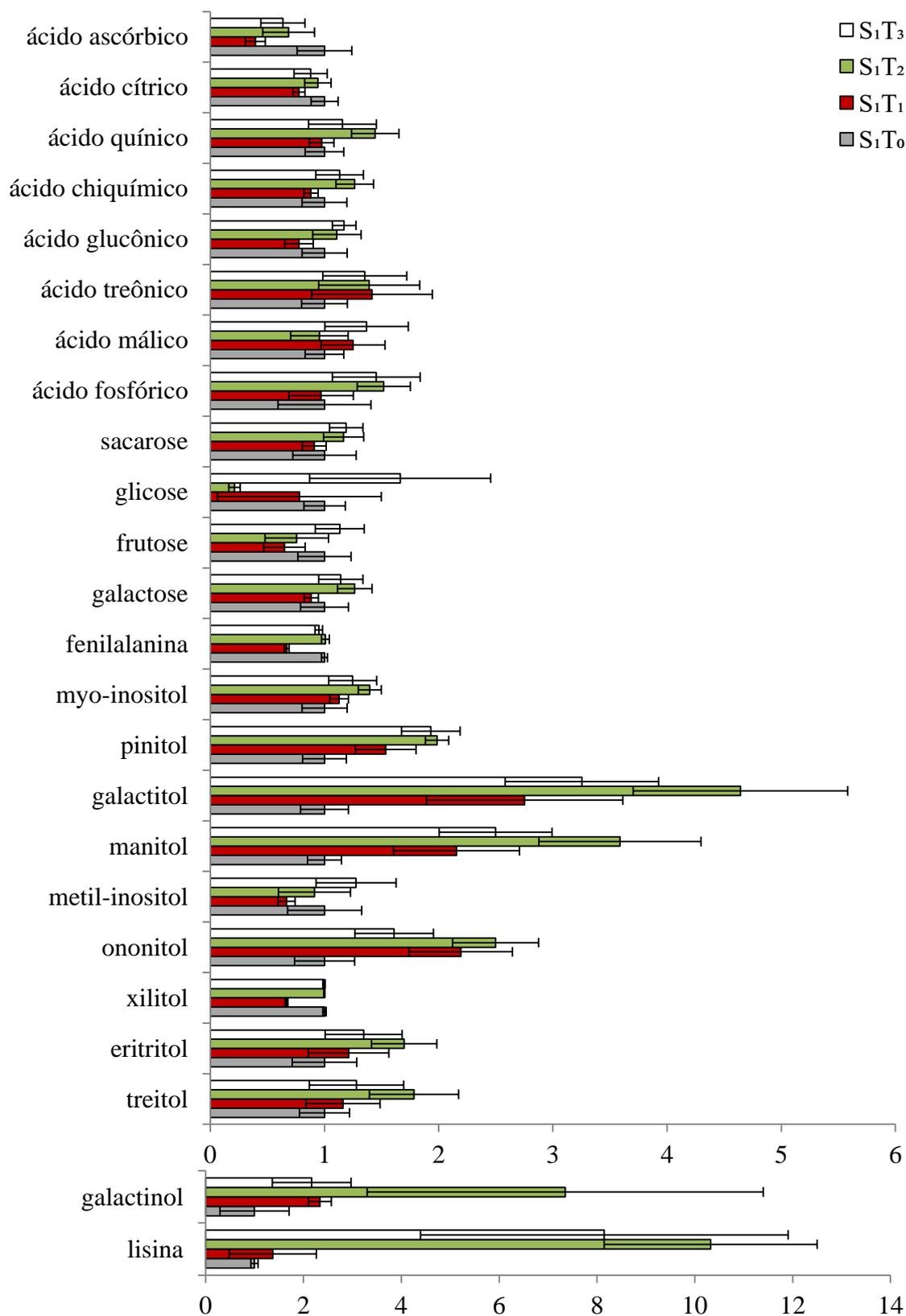


Figura 22. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis* pertencentes a Safra 2012 (S₁). Tratamentos: testemunha (S₁T₀), 55°C/150min (S₁T₁), -3,4MPa/7dias (S₁T₂) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₁T₃). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (S₁T₀).

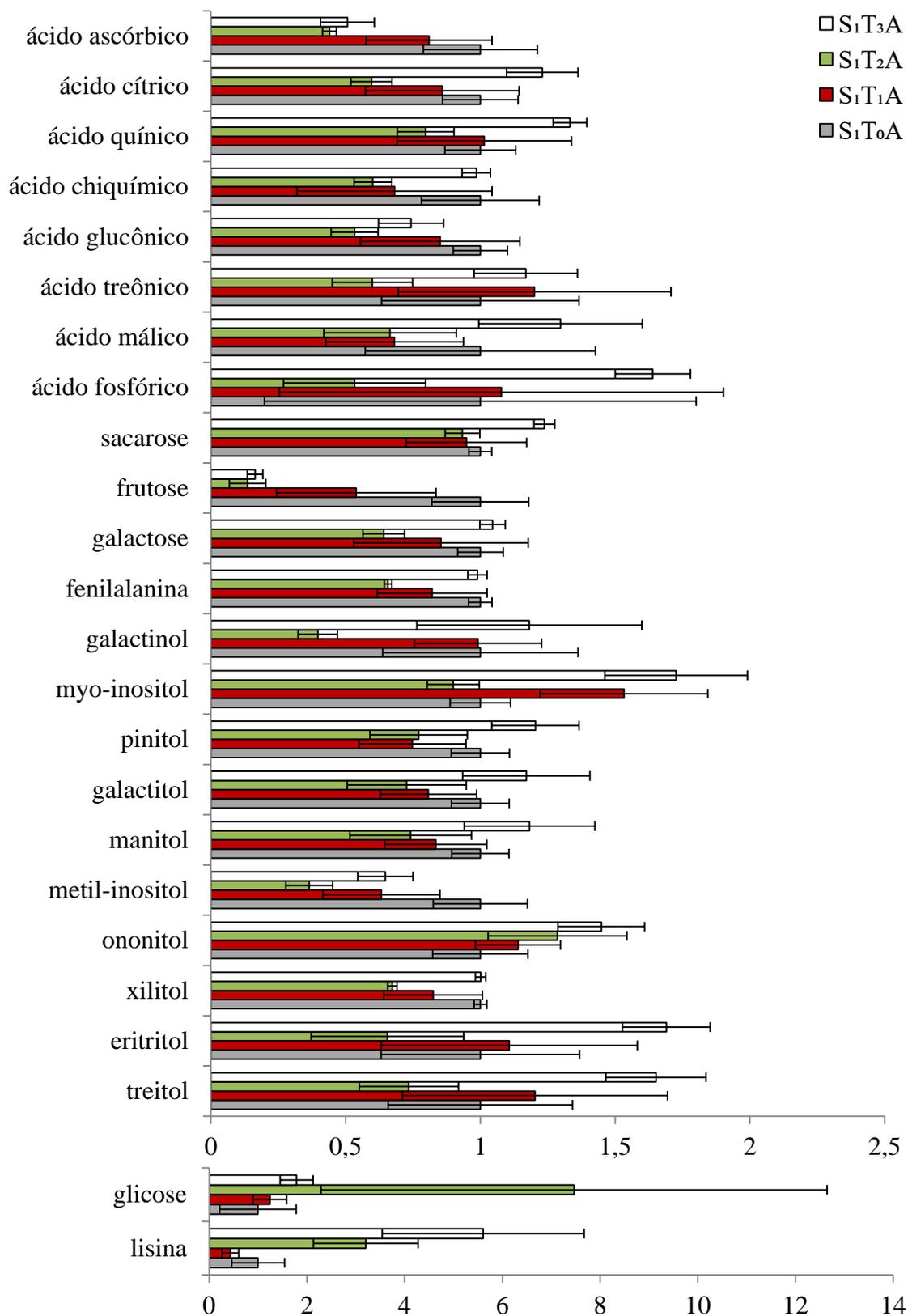


Figura 23. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis* pertencentes à Safra 2012 (S₁) e armazenados por 30 dias (A). Tratamentos: testemunha (S₁T₀A), 55°C/150min (S₁T₁A), -3,4MPa/7dias (S₁T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₁T₃A). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (S₁T₀A).

Na PCA relacionando o metabolismo das sementes em S₁T₀, S₁T₁, S₁T₂ e S₁T₃ (Figura 24), observam-se três separações principais. No CP 1 há separação de S₁T₂, S₁T₀ e S₁T₁, tendo S₁T₃ como intermediário. S₁T₁ está agrupado no extremo negativo da CP 2, sendo que S₁T₀ está agrupado no extremo positivo. Ao todo a PCA explica 57,6% das alterações observadas, sendo que o CP 1 foi responsável por 37,78% das e o CP 2 19,79%. Os compostos responsáveis pela separação foram principalmente galactitol, ononitol, ácido treônico, metil-inositol, glicose e frutose. A análise do perfil metabólico (Figura 22) revela aumento de galactitol e ononitol com a aplicação dos tratamentos, mas em maior proporção em S₁T₂. Também há aumento de ácido treônico com a aplicação dos tratamentos, contudo com maior proporção em S₁T₁. Metil-inositol, frutose e glicose aumentam em S₁T₃ e reduzem em S₁T₁ e S₁T₂.

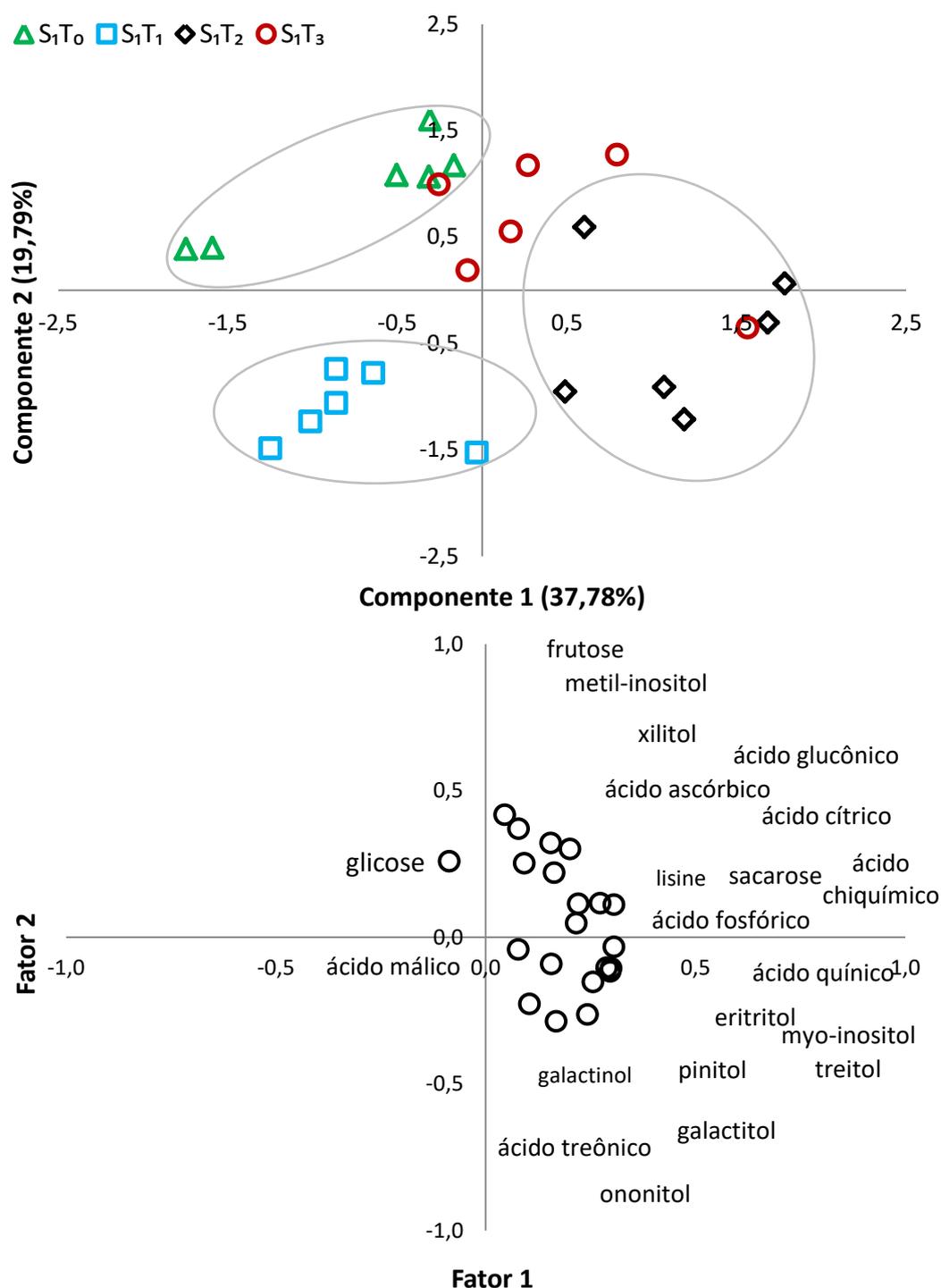


Figura 24. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, pertencentes à Safra 2012 (S_1), submetidos aos tratamentos físicos. Tratamentos: testemunha (S_1T_0), $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ (S_1T_1), $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_1T_2) e $55^\circ\text{C}/150\text{min}$ com $-3,4\text{MPa}/7\text{dias}$ (S_1T_3). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

Na PCA relacionando o metabolismo das sementes em S₁T₀A, S₁T₁A, S₁T₂A e S₁T₃A (Figura 25), observam-se três separações principais. Os pontos referentes aos tratamentos S₁T₂A e S₁T₃A estão mais agrupados e localizados opostamente nos extremos do CP 1, tendo S₁T₀A e S₁T₁A como intermediários. A CPA explica 71,4% das variações encontradas, sendo que a CP 1 é responsável por 51,49% das mesmas e a CP 2 por 19,91%. A glicose e os ácidos orgânicos foram os principais responsáveis pela separação no fator 1, enquanto no fator 2 há maior importância de lisine, ononitol, frutose, ácido ascórbico, ácido glucônico e metil-inositol. No perfil metabólico (Figura 23) é constatado aumento de glicose, com destaque a S₁T₂A, que apresentou aumento de 750% do composto. De modo geral, S₁T₂A apresentou expressiva redução na proporção dos compostos, com exceção de ononitol e lisina. Já em S₁T₃A é constatado aumento dos polióis, com redução apenas de metil-inositol. Também ocorre aumento de ácido cítrico, ácido málico, ácido fosfórico, sacarose e glicose, com redução de frutose. S₁T₁A apresenta redução de ácido cítrico, ácido málico, frutose, galactose e dos polióis xilitol, metil-inositol, manitol, galactitol e pinitol, enquanto há aumento dos polióis treitol, eritreitol, ononitol e myo-inositol.

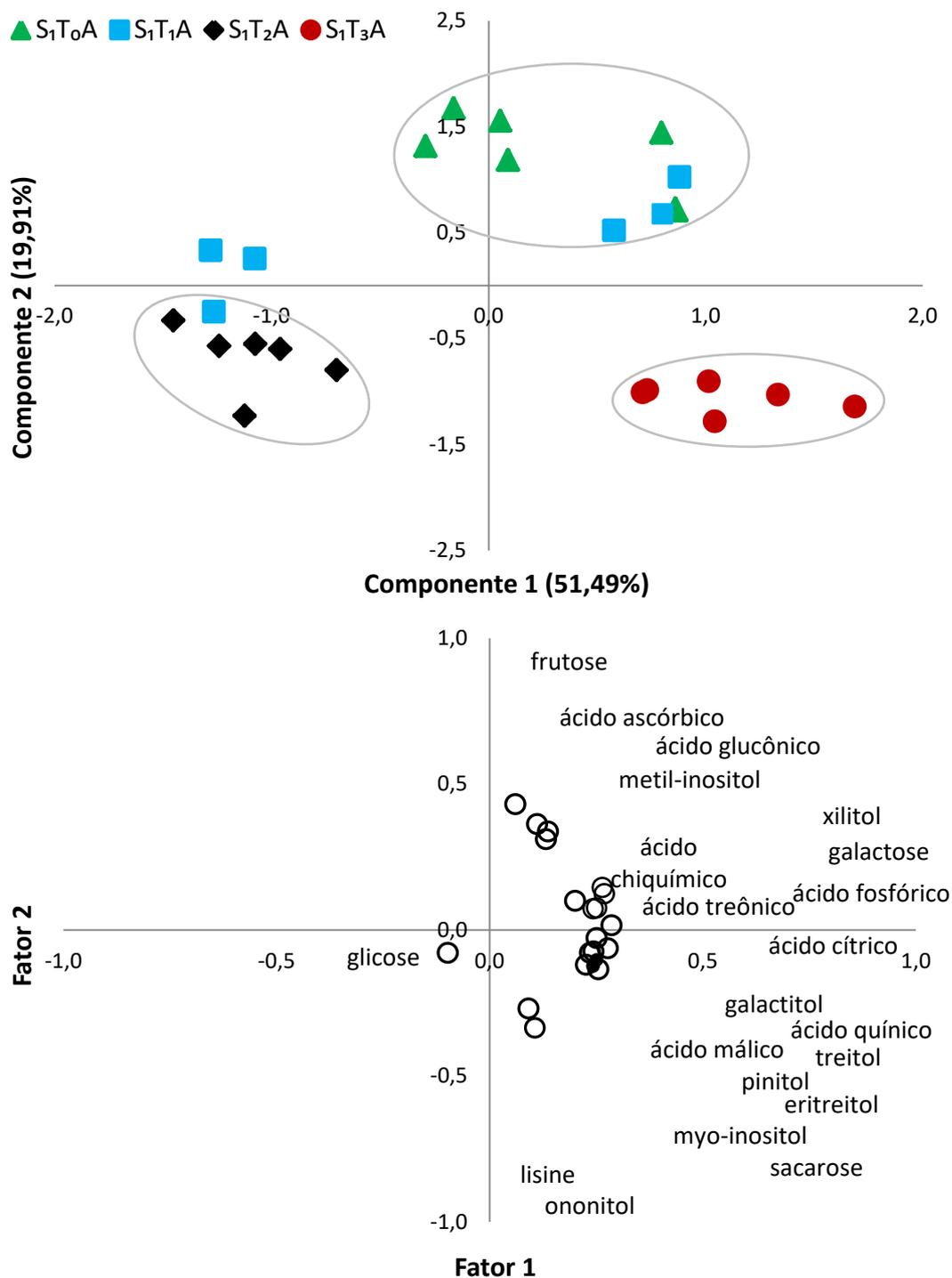


Figura 25. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, pertencentes à Safra 2012 (S₁), submetidos aos tratamentos físicos e armazenados por 30 dias (A). Tratamentos: testemunha (S₁T₀A), 55°C/150min (S₁T₁A), -3,4MPa/7dias (S₁T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₁T₃A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

Análise da Safra 2

S₂T₀ apresenta 82% de sementes germináveis e 31% de germinação, contudo S₂T₁ e S₂T₃ apresentam alta germinação, com 72% e 81%, respectivamente. S₂T₂ apresenta as menores taxas de germinação, mesmo após armazenamento (S₂T₂A). Em S₂T₀A há maior germinação em relação a S₂T₀, com 81% (Tabela 4).

Tabela 5. Teor de água (%), potencial hídrico (-MPa), sementes germináveis (%) e germinação de sementes de *Eugenia brasiliensis*, tratadas e após 30 dias de armazenamento (A), pertencentes a Safra 2013 (S₂). Tratamentos (sem armazenamento/armazenado): testemunha (T₀/T₀A), 55°C/150min (T₁/T₁A), -3,4MPa/7dias (T₂/T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (T₃/T₃A)⁽¹⁾.

Tratamentos de sementes	Armazenamento		Média
	Inicial	30 dias	
	<i>Teor de água</i>		
T ₀	49,80	52,07	50,94 ab
T ₁	49,94	53,82	51,88 a
T ₂	48,59	48,25	48,42 c
T ₃	48,24	49,19	48,71 bc
Média	49,14 B	50,83 A	
CV	3,33%		
	<i>Potencial hídrico</i>		
T ₀	2,26 aA	1,86 cB	
T ₁	1,88 aA	1,76 cA	
T ₂	2,13 aA	2,43 bA	
T ₃	2,21 aB	3,85 aA	
Média			
CV	9,08%		
	<i>Sementes germináveis</i>		
T ₀	82 bB	91 aA	
T ₁	90 abA	95 aA	
T ₂	25 cB	68 bA	
T ₃	94 aA	93 aA	
CV	7,66%		
	<i>Germinação</i>		
T ₀	31 bB	81 aA	
T ₁	72 aB	87 aA	
T ₂	14 cB	52 bA	
T ₃	81 aA	77 aA	
CV	13,51%		

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas: comparação dentro das colunas; maiúsculas: comparação dentro das linhas) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Conforme observado no Capítulo 1 (Figura 3a), a incidência de *Penicillium* sp. em S₂T₀ (Heat-2 Osm-0) é baixa, ficando abaixo de 15% mesmo após armazenamento, sendo o mesmo observado em S₂T₂ (Heat-0 Osm-1). Contudo, há aumento da incidência em S₂T₁ e S₂T₃, com 31% e 96%, respectivamente, aos 30 dias de armazenamento.

Há aumento da incidência de *Penicillium* sp. em S₂T₁, S₂T₃, S₂T₁A e S₂T₃A e redução significativa de *Fusarium* sp. (Capítulo 1, Figura 3, inicial e armazenado de Heat-2 Osm-0 e Heat-2 Osm-1), ambos em maior proporção após armazenamento. S₂T₁ e S₂T₁A apresentam a menor incidência e severidade de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. (Capítulo 1, Figura 4, inicial e armazenado de Heat-2 Osm-0 e Heat-2 Osm-1). S₂T₃A apenas de reduzir *Fusarium* sp. apresenta a maior severidade de *Penicillium* sp.

Os compostos encontrados na análise de perfil metabólico de cada tratamento da safra 2013 foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), visando avaliar os efeitos dos tratamentos físicos e do armazenamento no perfil metabólico nas sementes (Figura 26). A PCA revelou duas separações principais entre os tratamentos S₂T₁A, S₂T₂A e S₂T₃A e os tratamentos S₂T₁, S₂T₂ e S₂T₃, tendo S₂T₀ e S₂T₀A agrupados entre si e como intermediários entre as duas separações. 44,69% das variações entre os tratamentos são explicadas pelo CP 1 (24,62%) e pelo CP 2 (20,07%), sendo que os compostos responsáveis pela separação foram ácido ascórbico, ácido fosfórico, ácido chiquímico, ácido treônico, ácido cítrico, myo-inositol, leucina, valina e sacarose.

Observa-se no perfil metabólico (Figura 27) que os tratamentos S₂T₁, S₁T₂ e S₁T₃ apresentam aumento de ácido ascórbico e redução de ácido treônico, enquanto em S₂T₁A, S₂T₂A e S₂T₃A ocorre o oposto (Figura 28). Com a aplicação dos tratamentos ocorre redução de ácido chiquímico e aumento de leucina e valina, que é mais acentuada após armazenamento. Sacarose e myo-inositol reduzem em S₂T₁ e S₂T₂, contudo aumentam em S₂T₁ e S₁T₃. Em S₂T₂A, S₂T₂A e S₂T₃A há também redução de ácido fosfórico, pinitol, galactitol e manitol.

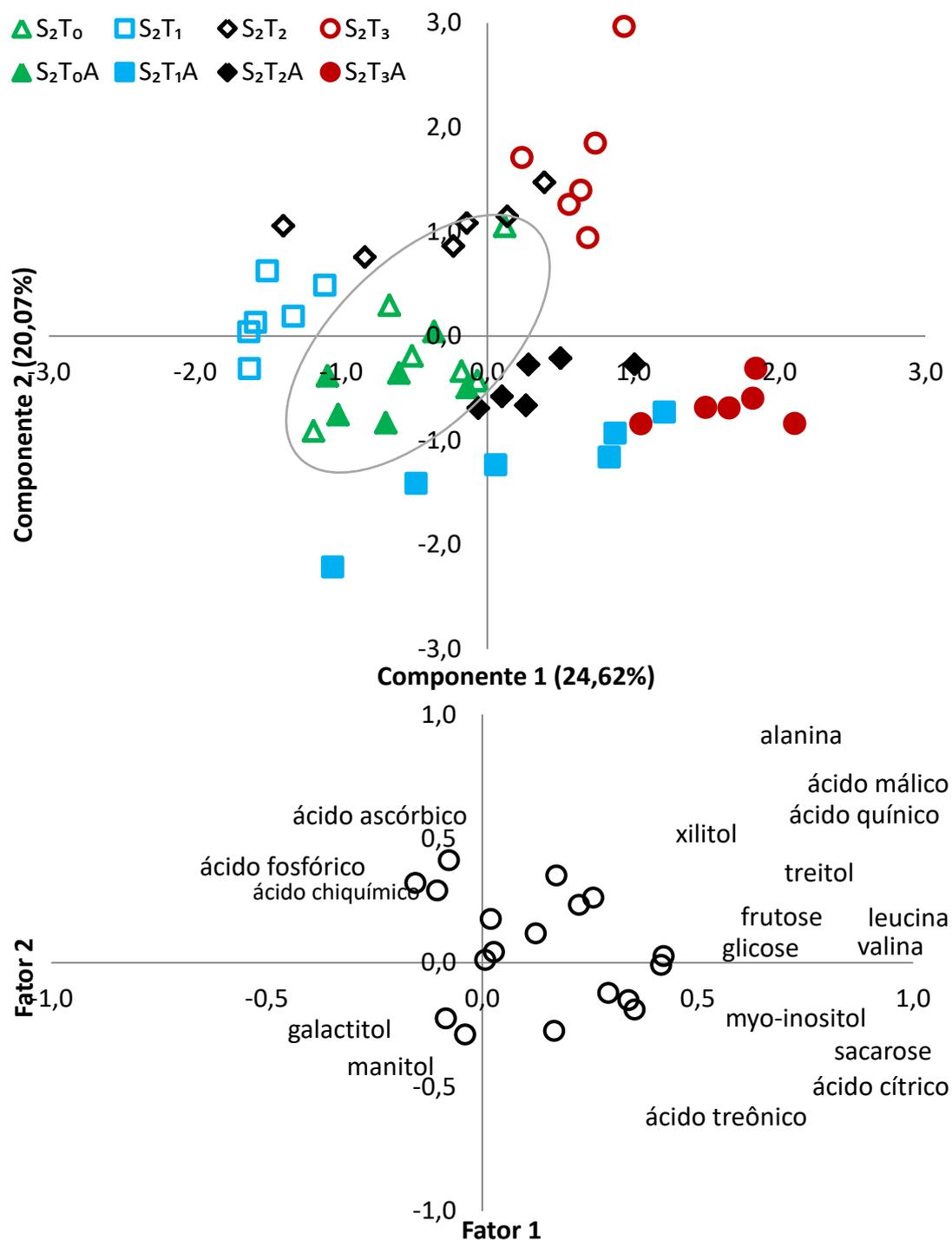


Figura 26. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, inicialmente e após 30 dias de armazenamento (A), da Safra 2013 (S₂). Tratamentos (sem armazenamento /armazenado): testemunha (S₂T₀/ S₂T₀A), 55°C/150min (S₂T₁/ S₂T₁A), -3,4MPa/7dias (S₂T₂/ S₂T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₂T₃/ S₂T₃A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

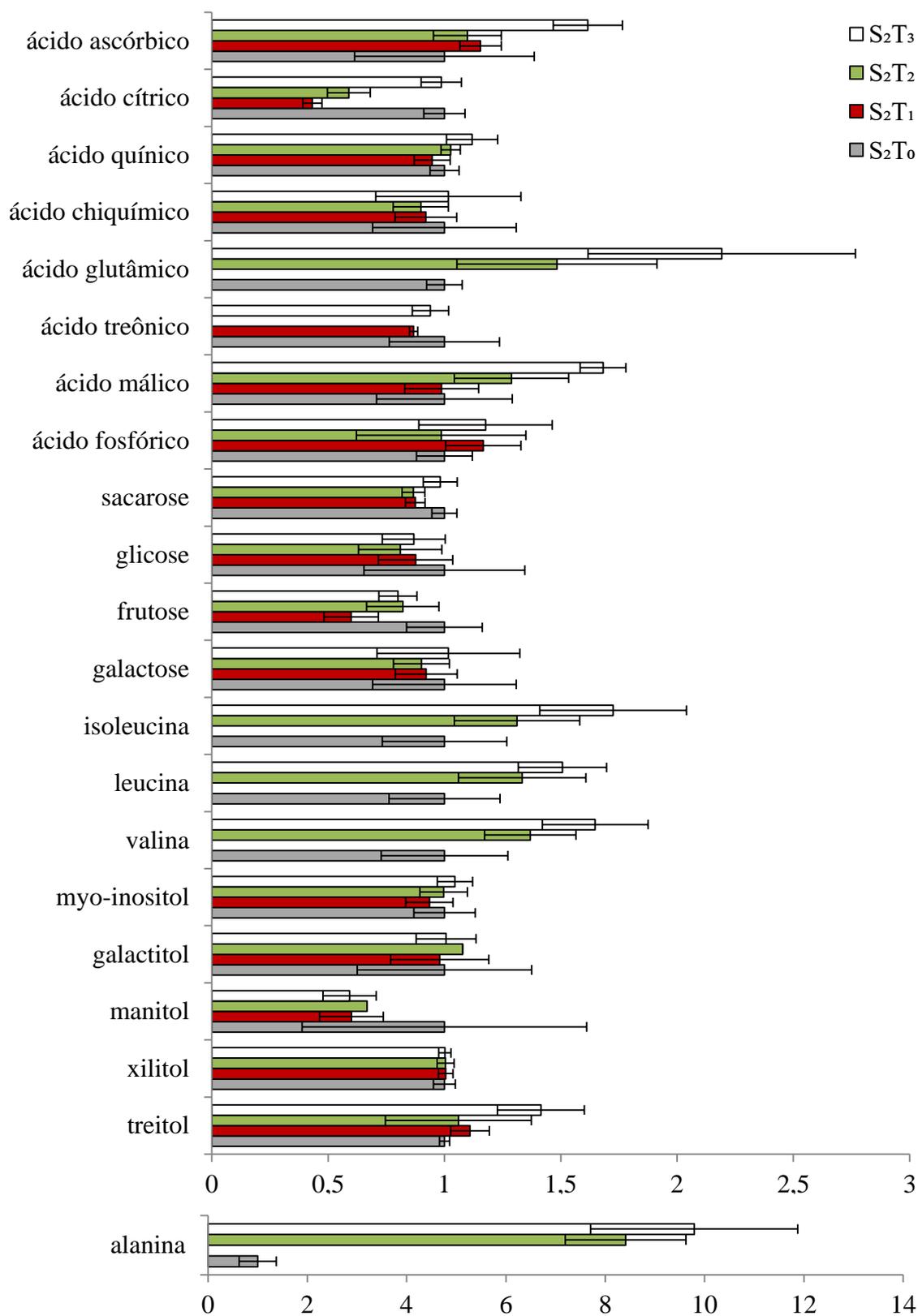


Figura 27. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis* pertencentes à Safra 2013 (S₂). Tratamentos: testemunha (S₂T₀), 55°C/150min (S₂T₁), -3,4MPa/7dias (S₂T₂) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₂T₃). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (S₂T₀).

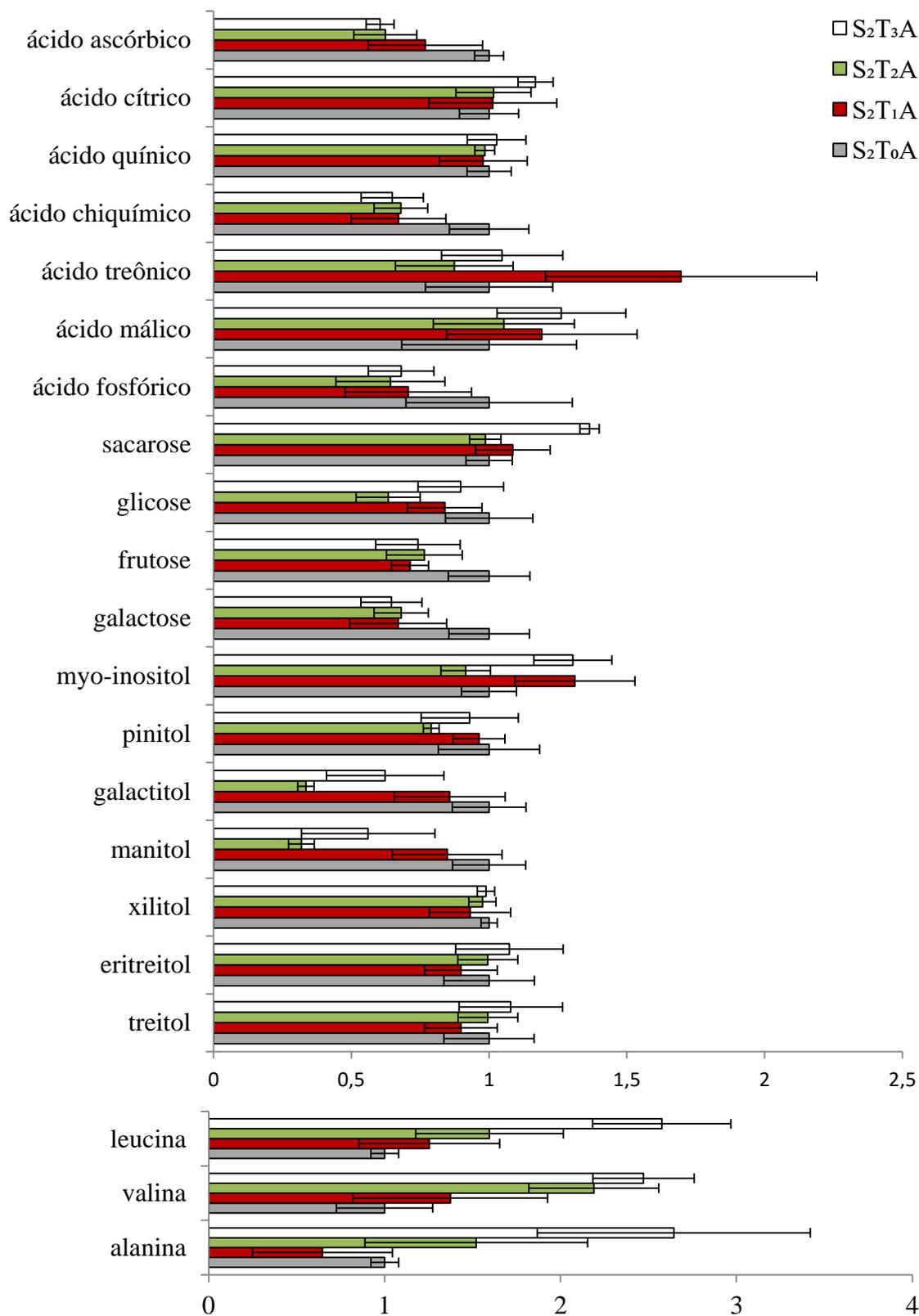


Figura 28. Perfil metabólico de embriões de *Eugenia brasiliensis* pertencentes à Safra 2013 (S₂) e armazenados por 30 dias (A). Tratamentos: testemunha (S₂T₀A), 55°C/150min (S₂T₁A), -3,4MPa/7dias (S₂T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₂T₃A). Compostos foram identificados por GC/MS. Barras representam os valores médios acompanhados de desvio padrão. Valores foram normalizados pela média da testemunha (S₂T₀A).

Na PCA relacionando o metabolismo das sementes em S₂T₀, S₂T₁, S₂T₂ e S₂T₃ (Figura 29), observam-se duas separações principais. S₂T₁ está agrupado no extremo negativo da CP 1 e S₂T₃ no extremo positivo, tendo S₂T₀ e S₂T₂ como intermediários. Ao todo a PCA explica 49,71% das alterações observadas, sendo que o CP 1 foi responsável por 34,97% das alterações e a CP 2 14,74%. Os compostos responsáveis pela separação são principalmente galactitol, manitol, valina, leucina, ácido treônico e glicose. Em S₂T₁, S₂T₂ e S₂T₃ é observado aumento de ácido ascórbico e redução de ácido treônico e manitol. Em S₂T₂ e S₂T₃ há aumento de valina, leucina, ácido málico, ácido fosfórico e redução de glicose e frutose. Em S₂T₁, há redução de glicose e frutose, ocorrendo aumento de ácido fosfórico (Figura 27).

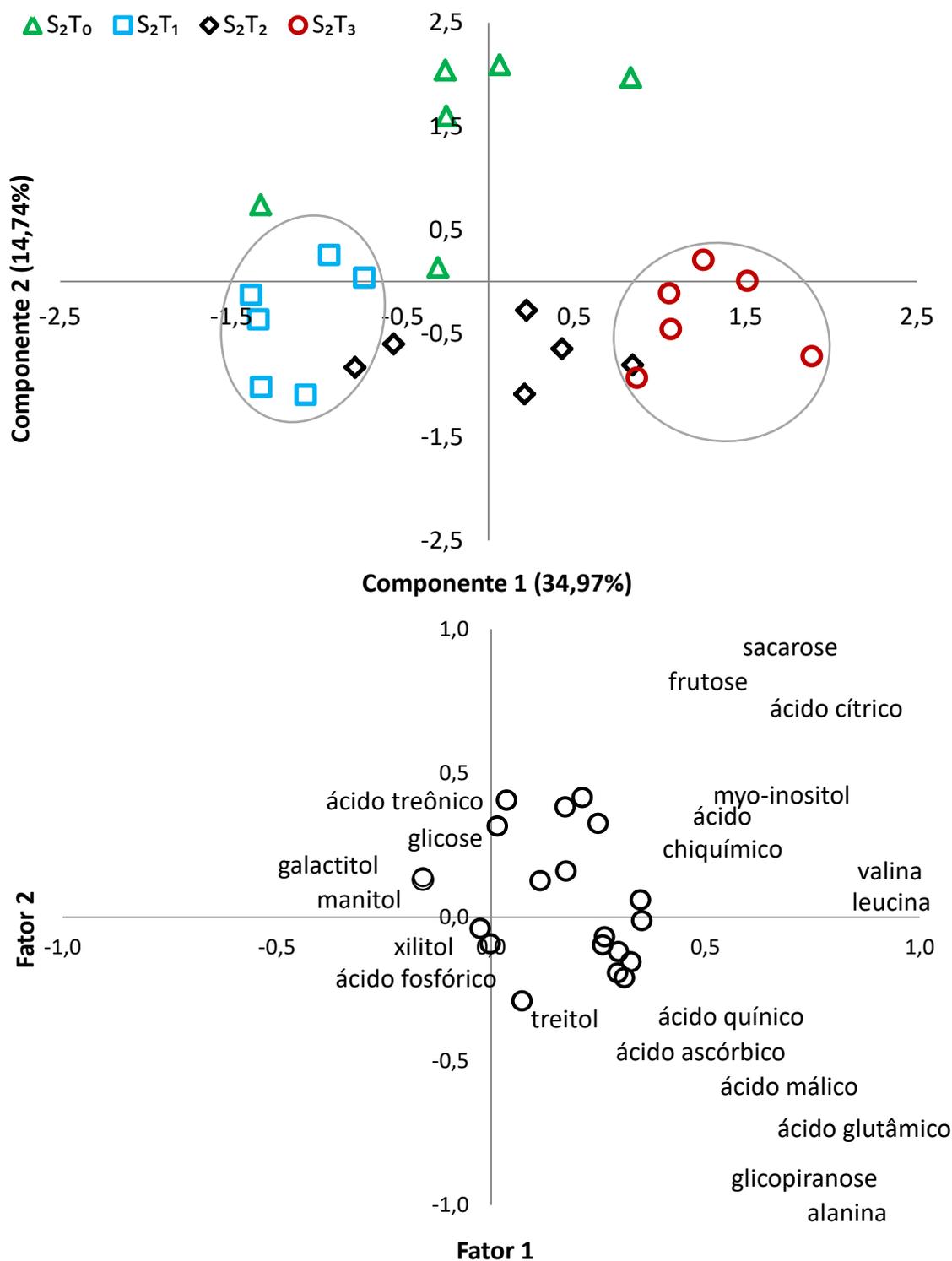


Figura 29. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, pertencentes à Safra 2013 (S₂), submetidos aos tratamentos físicos. Tratamentos: testemunha (S₂T₀), 55°C/150min (S₂T₁), -3,4MPa/7dias (S₂T₂) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₂T₃). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

Na PCA relacionando o metabolismo das sementes em S₂T₀A, S₂T₁A, S₂T₂A e S₂T₃A (Figura 30), observam-se duas separações principais. S₂T₀A está agrupado no extremo negativo da CP 1 e S₂T₃ no extremo positivo, tendo S₂T₁A e S₂T₂A como intermediários. Ao todo a PCA explica 61,05% das alterações observadas, sendo que o CP 1 foi responsável por 32,68% das alterações e a CP 2 28,37%. Os compostos responsáveis pela separação são principalmente galactitol, ácido chiquímico, ácido fosfórico, ácido ascórbico, frutose, alanina, valina, leucina e sacarose.

Na análise do perfil metabólico se observa em S₂T₁A, S₂T₂A e S₂T₃A redução de ácido fosfórico, ácido chiquímico, frutose, galactitol e aumento de leucina e valina. S₂T₁A e S₂T₃A apresentam redução de ácido ascórbico e aumento de ácido treônico (Figura 28).

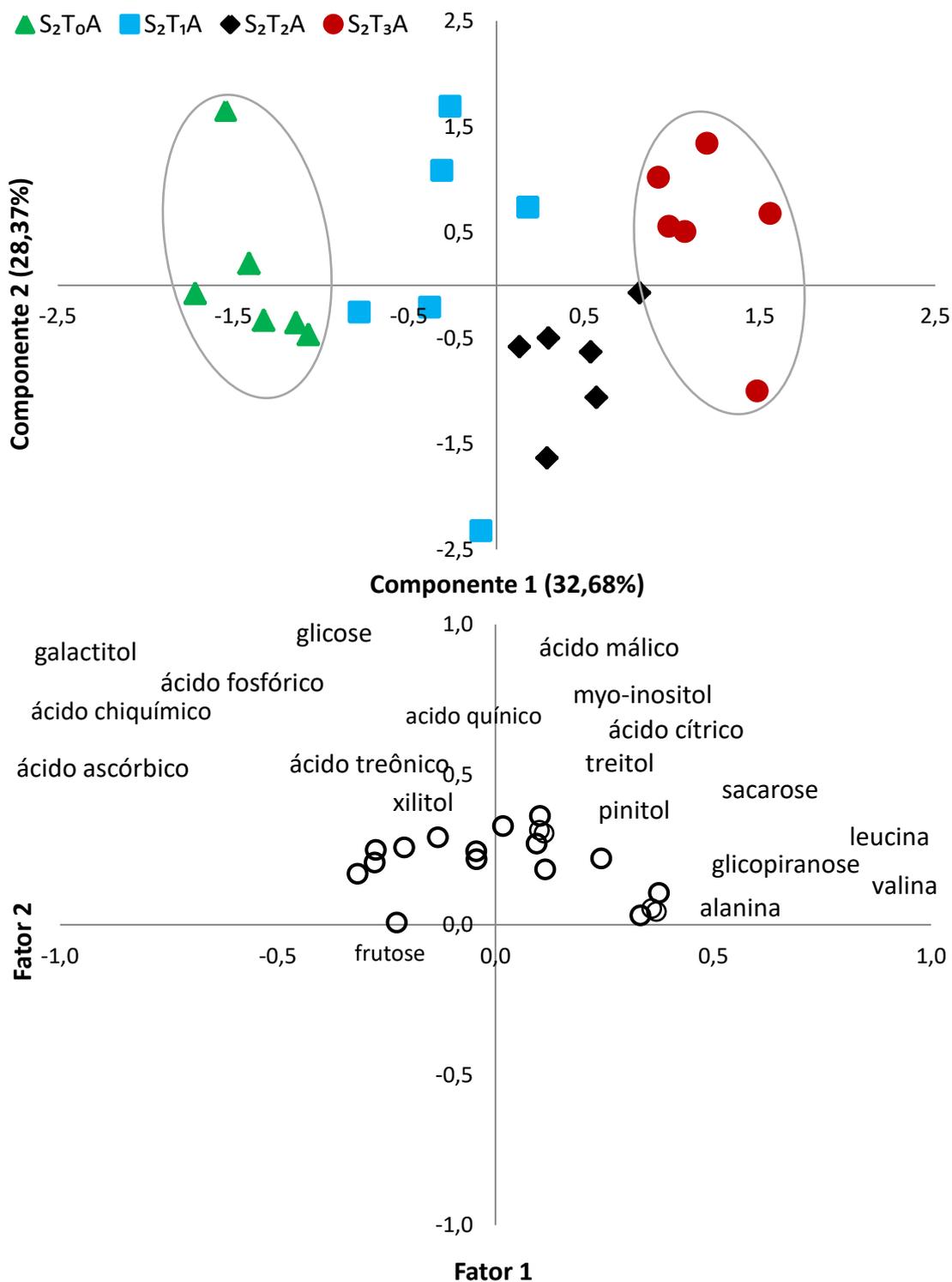


Figura 30. Análise de componentes principais (PCA) das alterações metabólicas em embriões de *Eugenia brasiliensis*, pertencentes à Safra 2013 (S₂), submetidos aos tratamentos físicos e armazenados por 30 dias (A). Tratamentos: testemunha (S₂T₀A), 55°C/150min (S₂T₁A), -3,4MPa/7dias (S₂T₂A) e 55°C/150min com -3,4MPa/7dias (S₂T₃A). PCA é apresentado como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica independente.

Análises estruturais (anatomia e histoquímica)

As sementes maduras de *Eugenia brasiliensis* apresentam envoltório delgado, de textura membranácea e cor castanha. O embrião é semigloboso, maciço, preenchendo completamente a cavidade seminal e de cor esbranquiçada. Não se distingue o eixo hipocótilo radícula a olho nu.

Nas sementes maduras o envoltório se restringe a várias camadas de células compactadas e/ou colapsadas, representadas muitas vezes apenas pelas paredes celulares. Nas células que algum conteúdo pode ser visualizado este está corado em verde, pelo Azul de Toluidina, indicando a presença de compostos fenólicos (Figura 31.1 e 31.2), o que foi confirmado pelo teste de Cloreto Férrico III (Figura 31.3 e 31.4).

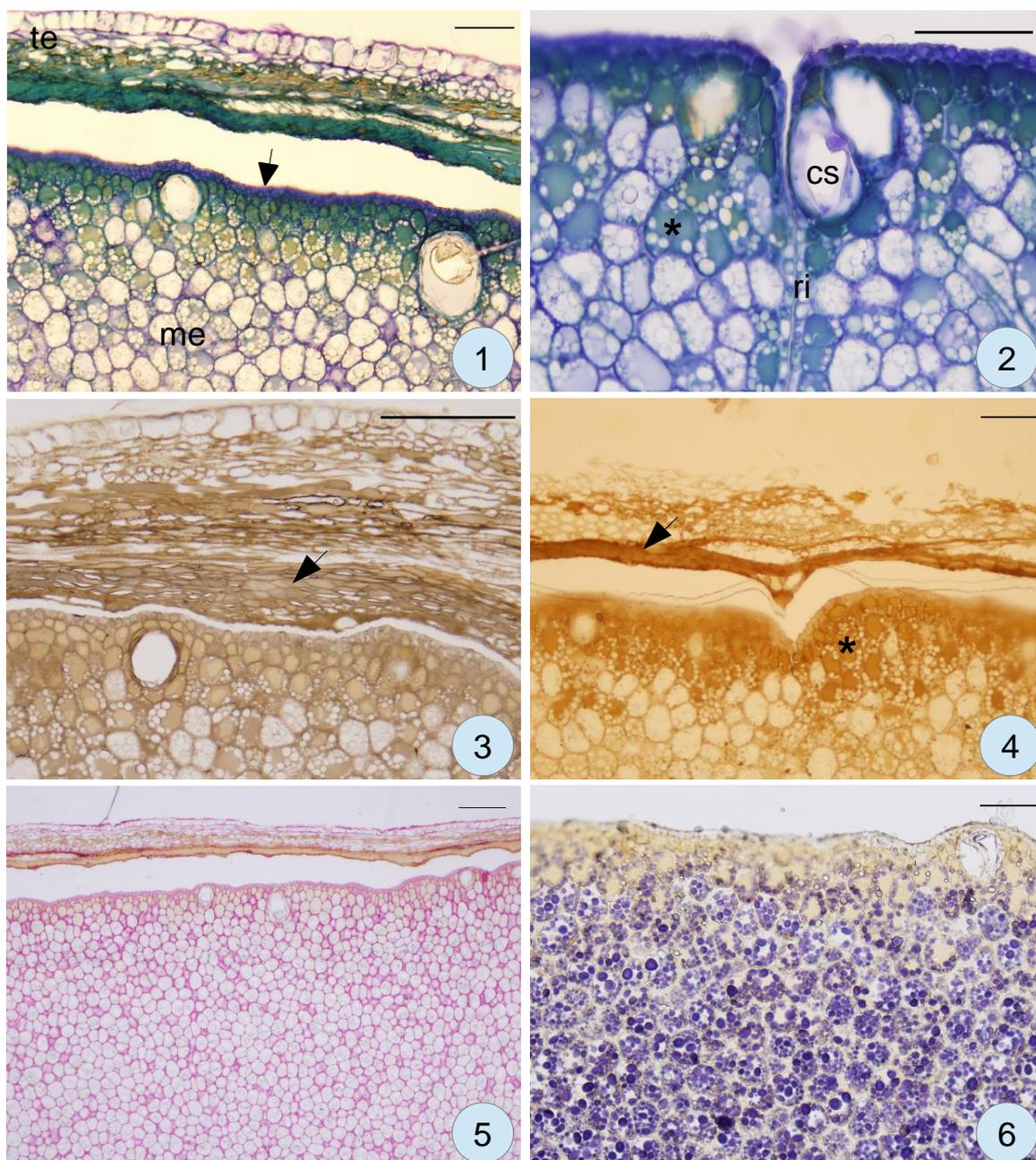


Figura 31. Secções longitudinais de sementes, do tratamento controle, de *E. brasiliensis* 1 e 2: coradas em Azul de Toluidina, evidenciando: tegumento (te), epiderme (seta), mesofilo (me), cavidade secretora (cs), idioblastos (*) e região de intersecção entre os cotilédones (ri). 3 e 4: Teste de Cloreto de Ferro III corando compostos fenólicos. 4: envoltório com células colapsadas e por vezes preenchidas de compostos fenólicos (seta). 5: teste de Vermelho de Rutênio corando as substâncias pécticas presentes nas paredes. 6: Teste de Lugol corando amido. Barras de escala: 2: 50 μm ; 1, 3, 4 e 6: 100 μm ; 5: 200 μm .

No embrião os cotilédones são revestidos por uma epiderme uniestratificada (Figura 31.1). No mesofilo foi observado logo abaixo da epiderme, face abaxial, idioblastos com compostos fenólicos (Figura 31.3 e 31.4). Foi constatado também grande número de

cavidades secretoras, que eram subepidérmicas e constituídas de epitélio delimitando um lume (Figura 31.2).

Pelo teste de Vermelho de Rutênio observou-se a presença de parede primária contendo pectina, contudo sem espessamento de parede, no envoltório, no mesofilo e na epiderme do embrião (Figura 31.7 e 31.8).

O teste de Xilidine Ponceau, para proteínas, e o teste Sudan IV, para lipídios, foi negativo, não se observando o acúmulo de reservas desses compostos em nenhuma das partes do embrião.

Os cotilédones apresentam parênquima repleto de amiloplastos, confirmado pelo teste de Lugol (Figura 31.6). Os grãos preenchem todo o citoplasma das células, apresentam tamanhos variados e grãos predominantemente na forma de grãos arredondados e ovais, semelhante ao observado em *E. pyriformis* (Figura 16.8).

Nas análises histológicas e histoquímicas realizadas, em ambas as safras, não se observou qualquer alteração, quer seja estrutural ou por meio dos tratamentos histoquímicos utilizados, em T₁, T₂ e T₃ em relação à T₀ ou em T₁A, T₂A e T₃A em relação à T₀A. Também não foram observadas alterações entre T₀ e T₀A.

5.4. Discussão

Nas sementes de *E. brasiliensis*, das duas safras, não foram observadas alterações estruturais visíveis pelas técnicas anatômicas empregadas após a aplicação dos tratamentos físicos e o armazenamento. Contudo, nas duas safras analisadas observou-se que, em maior ou menor proporção, os tratamentos físicos tiveram um impacto imediato no metabolismo das sementes, sendo que as alterações provocadas ainda refletiram no mesmo após o armazenamento.

De modo geral, constatou-se através das PCAs que, após armazenamento, o metabolismo pode reorganizar-se a uma condição semelhante ao observado antes da aplicação dos tratamentos ou alterar-se novamente, ficando diferente da testemunha e do seu inicial, como foi observado para todos os tratamentos na safra 2013.

Na safra 2012, S₁T₂A e S₁T₃A se diferenciaram da testemunha e apresentaram também diferença entre seus metabolismos, demonstrando que a associação dos tratamentos causa efeitos no metabolismo que são diferentes dos observados quando esses tratamentos são aplicados isoladamente, o que também ocorre na safra 2013 e nas sementes de *E. pyriformis* (Capítulo 3).

Observou-se pela análise das PCAs que, de modo geral, os tratamentos tiveram efeitos diferentes em cada safra. Por exemplo, na safra 2012, o tratamento osmótico, S₁T₂, foi o que mais afetou o metabolismo das sementes, sendo que o tratamento associado, S₁T₃, provocou menor alteração metabólica em relação à testemunha na safra 1 (Figura 24). Contudo, na safra 2013, o tratamento associado, S₂T₃, foi o que mais se diferenciou da testemunha (Figura 29). A análise do perfil metabólico demonstrou que na safra 2012 houve uma resposta imediata à aplicação dos tratamentos, com aumento expressivo de polióis (Figura 22), enquanto na safra 2013 não ocorreram alterações significativas na proporção dos polióis (Figura 27). Tais resultados indicam que os efeitos dos tratamentos físicos podem ser diferentes, e até opostos, no metabolismo de sementes de *E. brasiliensis* de safras diferentes.

A diferença no efeito dos tratamentos físicos entre safras foi também observada em relação à incidência dos fungos, sendo que em S₂T₁ e S₂T₃ há redução na incidência de *Fusarium* sp., contudo, em S₁T₁ e S₁T₃ não há controle do fungo. A aplicação do tratamento de 55 °C por 150 minutos diretamente em *F. verticillioides* e *P. aculeatum*, isolados de *E. brasiliensis*, controla com eficiência o desenvolvimento desses fungos, que eram os mais resistentes e persistentes nessas sementes (Capítulo 2). Assim sendo, tais variações no controle dos fungos estão em grande parte relacionadas às alterações metabólicas provocadas nas sementes pelos tratamentos osmóticos e térmicos.

Ao se analisar as testemunhas, sem armazenamento e armazenada, são constatadas diferenças importantes entre as safras. A safra 2013 apresenta alta taxa de sementes germináveis, semelhante à safra 2012, contudo reduzida porcentagem de germinação em S₂T₀, sendo que após armazenamento há alta germinação. Tal fato pode indicar que as sementes da safra 2013 foram dispersas enquanto ainda não apresentavam totalmente as condições metabólicas necessárias à formação de uma plântula normal, podendo ter sido dispersas ainda imaturas ou apresentando substância inibidora à sua germinação.

A redução de sementes germináveis e germinação observada na safra 2012, em S₁T₀A, é esperada para a espécie que, por apresentar baixa longevidade em armazenamento, tende a ter redução natural de sua qualidade fisiológica, sendo que tais resultados condizem com o observado em trabalhos anteriores (Oliveira *et al.* 2011, Françoso & Barbedo 2014). Contudo, o comportamento observado na safra 2013 foi atípico, não havendo relatos até o momento para a espécie.

A análise metabólica revelou que as testemunhas da safra 2012 e da safra 2013 apresentaram diferenças importantes no metabolismo (Figura 17), sendo que na safra 2013 é constatado um metabolismo mais ativo que na safra 2012 (Figura 18). A taxa respiratória é mais intensa na safra 2013, com maior acúmulo de ácido málico, ácido cítrico e ácido fosfórico e redução de hexoses, principalmente frutose. O metabolismo elevado, contudo, não

parece ligado a processos de deterioração, já que a germinação após armazenamento é ainda elevada. Ocorre alta proporção de ácido chiquímico e ácido quínico, indicando maior metabolismo secundário em atividade, o que poderia explicar o alto metabolismo respiratório.

Apesar da safra 2013 apresentar maior proporção de myo-inositol e treitol, observa-se menor proporção da maioria dos polióis. S₁T₀A, além de apresentar maior acúmulo de manitol, galactitol e pinitol, também apresenta ononitol, metil-inositol e galactinol, ausentes na safra 2013. Uma variedade maior de osmolitos pode ocorrer por diversos motivos, sabe-se, por exemplo, que a mistura de açúcares álcoois aumenta a pressão osmótica de modo mais eficiente, reduz a toxicidade associada a altas concentrações de um único composto e previne mecanismo de feedback que regulam as vias metabólicas na presença de altas concentrações dos produtos (Davis *et al.* 2000). A presença destas moléculas resulta na proteção contra estresses abióticos durante a germinação, secagem e armazenamento das sementes (Mello *et al.* 2011, Ribeiro *et al.* 2011). Desse modo, a safra 2012, por apresentar maior proporção e variedade de polióis, seria menos susceptível a efeitos deletérios com a aplicação do tratamento osmótico.

Nas monocotiledôneas, onde o amido é o carboidrato mais importante acumulado no endosperma, tal qual nas *Eugénias*, durante a maturação há primeiro o acúmulo de sacarose, que é posteriormente convertido em amido, ou seja, o teor de sacarose decresce paralelamente ao acréscimo de amido durante a maturação (Marcos-Filho 2015). A maior proporção de sacarose na safra 2013 pode ser um indicador de que as sementes foram dispersas mais imaturas em relação à safra 2012.

Barbedo *et al.* (2013) sugerem que os diferentes comportamentos observados em sementes após a dispersão poderiam ser o resultado do quanto à maturação de cada semente se estendeu, evidenciado pela redução da umidade da semente durante este processo, e aliado às condições ambientais e às características de cada espécie, acumuladas no seu processo evolutivo.

As variações na sensibilidade a dessecação dependem da origem do material e podem estar relacionadas com as condições hídricas e térmicas do ambiente de formação, as quais condicionam o ciclo de maturação bem como a tolerância à dessecação. Foi observado, para sementes de *E. pyriformis*, que as condições ambientais podem afetar o período de desenvolvimento antes da dispersão das sementes, sendo que sementes formadas sob condições ambientais diversas, dispersas diferentemente desenvolvidas, podem ser mais ou menos tolerantes a estresses bióticos e abióticos (Lamarca *et al.* 2013, Pratavieira *et al.* 2015).

Assim sendo, constata-se que as safras apresentam diferenças fundamentais em suas características fisiológicas e metabólicas. As diferenças entre as safras, possivelmente relacionadas a uma maior ou menor imaturidade, refletiram nas respostas dessas sementes aos tratamentos, principalmente ao tratamento osmótico, onde as sementes da safra 2013 apresentaram maior sensibilidade ao estresse hídrico, o que levou aos menores índices de germinação e aumento da severidade de *Fusarium* sp..

Tratamentos osmóticos e térmicos

Não foi observada qualquer alteração no metabolismo que possa ser ligada diretamente à maior germinação ocorrida em S₂T₁ e S₂T₃ em relação a S₂T₀. No presente estudo o foco das análises foi o metabolismo primário, sendo assim, é possível que o efeito metabólico que influenciou positivamente a germinação esteja relacionado ao metabolismo secundário.

A safra 2012, conforme foi discutido previamente, apresentou uma resposta imediata ao estresse físico dos tratamentos, principalmente com o aumento da proporção dos polióis. Acredita-se que os polióis *myo*-inositol e manitol sejam capazes de diminuir os efeitos das espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Cumbes 1989). O *myo*-inositol é precursor de inúmeros compostos, inclusive outros ciclitóis, como o galactinol e o pinitol, que desempenham um papel importante no ajuste osmótico intracelular entre o vacúolo e citoplasma (Loewus & Murthy 2000, Ashraf & Harris 2004, Nishizawa *et al.* 2008). O *myo*-

inositol está também relacionado à síntese de ascorbato (Torabinejad *et al.* 2009), na resposta a estresse abiótico protegendo componentes intracelulares (Takahashi *et al.* 2001, Conde *et al.* 2011) e, indiretamente, na resposta de resistência a patógenos (Chaouch & Noctor 2010). Já o manitol tem um importante papel como osmólito e soluto compatível, protegendo contra o estresse salino e atuando na osmorregulação (Stoop *et al.* 1996), além de atuar na tolerância à seca diminuindo os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Cumbes 1989). Dessa maneira, a presença destes compostos, juntamente com demais polióis, pode indicar uma estratégia de proteção contra o estresse abiótico, como estresse hídrico e térmico provocados pelos tratamentos físicos aplicados.

Os aumentos mais significativos na proporção dos polióis na safra 2012 ocorreram após os tratamentos osmóticos, indicando relação dos polióis na maior ou menor tolerância ao estresse hídrico em sementes de *E. brasiliensis*. Na safra 2013, além de apresentar menor variedade de polióis, não houve alteração significativa na proporção dos mesmos, o que pode estar relacionado a maior sensibilidade dessas sementes ao estresse hídrico.

O ácido ascórbico confere proteção contra espécies reativas de oxigênio via sistema antioxidante ascorbato-glutationa (Foyer & Noctor 2005), atuando no sistema antioxidante não enzimático da célula vegetal (Gratão *et al.* 2005). 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). Desse modo, o acúmulo de ácido treônico indica uma redução na via do ácido ascórbico, já que se trata de uma forma irreversível. A redução da proporção ou até a ausência de ácido treônico nas sementes tratadas osmoticamente sugere maior atuação da via do ácido ascórbico, com resposta elevada ao estresse oxidativo. Uma maior taxa de estresse oxidativo pode estar relacionada com as menores taxas germinativas observadas nesse tratamento após o estresse hídrico.

Os resultados sugerem a tendência de aumento na proporção de ácido treônico, nas duas safras, após aplicação do tratamento térmico, principalmente após armazenamento, indicando menor atividade da via do ácido ascórbico e, possivelmente, menor ocorrência de estresse oxidativo nessas sementes.

Assim sendo, nas duas safras analisadas o tratamento térmico de 55 °C por 150 minutos foi o mais eficiente em manter a qualidade fisiológica e controlar a incidência de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Diferente do tratamento osmótico, o tratamento térmico não afetou negativamente as sementes apesar das diferenças fisiológicas observadas entre as safras. Na safra 2013 o tratamento térmico foi o único tratamento a reduzir a severidade de *Fusarium* sp. a longo prazo.

Já o tratamento osmótico aplicado sozinho levou ao aumento da incidência de *Fusarium* sp. nas duas safras e, na safra 2013, ao aumento da severidade do mesmo. Na safra 2013 o tratamento osmótico foi o que apresentou menor desempenho na germinação. Contudo a osmotherapia não influenciou na germinabilidade na safra 2012, que foi mais tolerante ao estresse hídrico, possivelmente devido a um maior avanço na maturação em relação à safra 2013.

5.5. Conclusão

As alterações metabólicas provocadas nas sementes pelos tratamentos osmóticos e térmicos estão em grande parte relacionadas ao resultado desses tratamentos no controle dos fungos.

Sementes de *Eugenia* podem responder diferentemente aos tratamentos físicos dependendo de suas características fisiológicas quando da dispersão. Sementes de *E. brasiliensis* podem ser dispersas com menor ou maior sensibilidade ao estresse hídrico provocado pelo tratamento osmótico, sendo que a maior tolerância ao estresse esta positivamente relacionada ao aumento, na concentração e variedade, de polióis.

O tratamento térmico de 55 °C por 150 minutos foi o mais eficiente em manter a qualidade fisiológica e controlar a incidência de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., independente das características fisiológicas apresentadas pelas sementes de *E. brasiliensis*.

5.6.Referências bibliográficas

- Barbedo, J.C., Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? Review Paper. *Hoehnea* 40(4): 583-593.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B.** 1999. Illustrated genera of imperfect fungi. 3ed. Minnesota, Burgess Publishing Company. 241p.
- Berjak, B. & Pammenter, N.W.** 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontier in Plant Science* 4: 478.
- Berlyn, G.P. & Miksche, J.P.** 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: Iowa State University, p.121-276.
- Brasil.** 2009. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Brasília, 399p.
- Davis, D.J., Burlak, C. & Money, N.** 2000. Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycology Research* 104: 800–804.
- Decagon.** 2001. WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual. Pullman: Decagon Devices, Inc.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(2): 265-272.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55(4): 583-590.
- Ferreira, D.F.** 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35(6): 1039-1042.
- Foyer, C. & Noctor, G.** 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875.
- Françoso, C.F.** 2012. Tratamentos térmicos e osmóticos para controle de fungos associados a sementes de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia uniflora*. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. 78p.
- Françoso, C.F. & Barbedo, C.J.** 2014. Tratamentos osmóticos e térmicos para controle de fungos em sementes de grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Hoehnea* 41(4): 541-552.
- Gerrits, P.O. & Smid, L.** 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal Microscopy* 95: 150-155.

- 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.
- Gutterman, Y.** 2000. Maternal Effects on Seeds During Development. In: *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, 2nd edition (ed. M. Fenner).
- 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.
- 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.
- ISTA - International Seed Testing Association.** 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13: 356-513.
- Johansen, D.A.** 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co, New York. 112p.
- Kohama, S., Maluf, A.M., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes* 28(1): 72-78.
- Lamarca, E.V., Prativiera, 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.
- Marcos Filho, J.** 2015. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Abrates, Londrina 660p.
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C.** 1980. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo: Ed. Edgard Blucher-FUNCAMP. 69p.
- 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
- Michel, B.E. & Kaufmann, M.R.** 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51(5): 914-916.
- O'brien, T.P., Feder, N. & Mccully, M.E.** 1964. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Oliveira, C.F., Oliveira, D.C., Parisi, J.J.D. & Barbedo, C.J.** 2011. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. *Revista Brasileira de Sementes* 33(3): 520-532.

- Parisi, J.J.D., Biagi, J.D., Barbedo, C.J. & Medina, P.F.** 2013. Viability of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. embryos according to the maturation stage, fungal incidence, chemical treatment and storage. *Revista Brasileira de Sementes* 35(1): 70-76.
- Pearse, A.G.E.** 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*, 4 ed., v.2. Livingstone, Edinburgh. 624p.
- Prataviera, J.S., Lamarca, E.V., Teixeira, C.C. & Barbedo, C.J.** 2015. The germination success of the cut seeds of *Eugenia pyriformis* depends on their size and origin. *Journal of Seed Science* 37(1): 047-054.
- 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.
- 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(1): 11-29.
- Tavares, J.T.Q., Cardoso, R.L., Costa, J.A., Fadigas, F.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.
- Ventrella, M.C., Almeida, A.L., Nery, L.A. & Coelho, V.P.M.** 2013. *Métodos histoquímicos aplicados às sementes*. Viçosa, MG: Ed. UFV. 40p.

6. Considerações Finais

Através das técnicas utilizadas não foi possível observar alterações anatômicas nas *Eugénias* estudadas, contudo ainda não é descartada a ocorrência das mesmas. Alterações em organelas, parede e membrana celular não seriam observáveis pelos testes empregados, devido à sua menor sensibilidade. Em trabalhos futuros pode ser empregada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nesta técnica, os elétrons penetram em cortes ultrafinos de tecido e atingem um filme fotográfico, mostrando a estrutura fina do plasmalema (membrana celular) e os detalhes das estruturas intracelulares (Ramos 2013).

Os resultados obtidos com os tratamentos *in vitro*, aplicados diretamente nos fungos isolados das sementes, permitiram evidenciar que as alterações metabólicas provocadas nas sementes pelos tratamentos osmóticos e térmicos estão em grande parte relacionadas ao resultado desses tratamentos no controle dos fungos. Ficou evidente com os resultados obtidos que as vias do ácido ascórbico e dos polióis apresentam intensa atividade nas sementes estudadas, com importantes alterações após os tratamentos.

Foi constatado que todos os tratamentos apresentaram efeito de longo prazo no metabolismo das sementes, porém, atuando de formas diferentes no mesmo. Contudo, o tratamento térmico foi, nas duas espécies, o que apresentou melhor resultado de qualidade fisiológica e sanitária das sementes, controlando a incidência e a severidade de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., independente do ponto de maturidade da semente. Assim sendo, a aplicação do tratamento térmico seria a mais indicada para otimizar o armazenamento e a produção de mudas.

Apesar de o metabolismo respiratório apresentar sempre grande variação, não há destaque de um comportamento em resposta a determinado tratamento, contudo, observa-se com clareza a associação dessa via a uma maior ou menor deterioração das sementes.

Possivelmente, nas sementes com processo de deterioração menos avançado, o metabolismo respiratório oscile primordialmente em função do aumento ou redução da

atividade das vias do ácido ascórbico e dos polióis. Tais vias se mostraram, nas duas espécies, de grande importância no combate ao estresse oxidativo e na tolerância ao estresse hídrico, sendo que o estresse térmico demonstrou potencial na ativação dessas vias. Contudo, ambas as vias podem também estar relacionadas na resposta a patógenos.

As análises realizadas tem como foco o metabolismo primário, mas há indícios de que o metabolismo secundário tem grande importância na manutenção da qualidade fisiológica e sanitária dessas sementes. Desse modo, acredita-se que, em trabalhos futuros, o estudo do metabolismo secundário deve ser priorizado.

Estudos vêm demonstrando a possibilidade de uma relação entre ácido salicílico, *myo*-inositol e as espécies reativas de oxigênio nas reações de resposta a patógenos, de hipersensibilidade e morte celular programada (Chaouch & Noctor 2010). *Myo*-inositol é o precursor de inúmeros compostos, incluindo muitos com possível atividade antioxidante, podendo também estar envolvido na síntese de ascorbato (Loewus & Murthy 2000, Nishizawa *et al.* 2008, Torabinejad *et al.* 2009). Uma resposta de defesa precoce que caracteriza o início de respostas a patógenos é o acúmulo de ácido salicílico (Lamb & Dixon 1997), sendo que alguns efeitos da ação do ácido salicílico são claramente relacionados às espécies reativas de oxigênio (Bi *et al.* 1995), embora muitos fatores permanecem não identificados nessa relação (Vlot *et al.* 2009). Desse modo, futuros estudos que visem abordar as reações de resposta aos patógenos em sementes de *Eugenia* sp. devem focar, além das espécies reativas de oxigênio e a via dos polióis, com destaque ao *myo*-inositol, em possíveis alterações na via do ácido salicílico.

6.1. Referências bibliográficas

Bi, Y.M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R. & Draper, J. 1995. Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant Journal* 8: 235–245.

Chaouch, S. & Noctor, G. 2010. Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal hydrogen peroxide. *New Phytologist* 188: 711–718.

Lamb, C. & Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251–275.

Loewus, F.A. & Murthy, P.P.N. 2000. Myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150: 1–19.

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.

Ramos, T.M. 2013. Potencialidades da microscopia eletrônica (transmissão e varredura) e microscopia confocal como ferramentas para análises de amostras biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências. 48 p.

Torabinejad, J., Donahue, J.L., Gunsekara, B.N., Allen-Daniels, M.J. & Gillasp, G.E. 2009. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant Physiology* 150: 951–961.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A. & Klessig, D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177–206.

7. Anexos

7.1. Anexo I



Figura A. *Eugenia brasiliensis*: grumixameira (a), suas flores (b) e frutos (d), mostrando um fruto maduro (*) e *E. pyriformis*: uvaieira (e), suas flores (c) e frutos (f), mostrando um fruto maduro (**). Semente com protrusão da raiz, semente germinável (I), e desenvolvimento da parte aérea (II) até formação da plântula normal, germinação (III).

7.2. Anexo II

Estudos moleculares para identificação de isolados de *Fusarium* e *Penicillium*

Para a extração do DNA, primeiramente, pequenos fragmentos das culturas mantidas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) foram retirados, transferidos para eppendorfs e submetidos ao protocolo CTAB (hexadecyl trimethyl ammoniumbromide), adaptado de Dellaporta *et al.* (1983).

Foi adicionado 100 µL de tampão de extração CTAB, feita a maceração do material fúngico com pistilo plástico, seguida de ressuspensão com 500 µL de tampão de extração CTAB e incubação, sob agitação, a 65°C por 30 minutos (termomixer). Foi adicionado 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), para que ocorresse a remoção de proteínas e carboidratos, e feita agitação em vortex por 10 segundos, seguida de centrifugação a 12000 rpm (~14000 g), durante 10 min. Em um novo eppendorfs foi adicionado 500 µL do sobrenadante e 0,6 volumes de isopropanol (300 µL), seguida de homogeneização por inversão do microtubo e centrifugação a 12000rpm, por 10 min. O sobrenadante foi descartado, preservando o pellet, que foi submetido a lavagem com 500 µL de etanol 70% e centrifugação a 12000 rpm durante 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e os microtubos passados em centrífuga a vácuo, 5 a 10 minutos, para secagem. Em seguida realizou-se a ressuspensão do pellet adicionando-se 50 µL de água MiliQ estéril e os eppendorfs foram armazenados em freezer. Para a reação de PCR, foi preparado um mix de reagentes contendo: 1µL do primer ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), 1µL do primer ITS4 (5'- TCC TCC GCT TATTGA TAT GC-3'), 10µL do tampão 5x, 1µL de DNTPs, 0,2 µL Taq, 35,8µL de água MilliQ estéril. Para cada amostra foi utilizado 1µL de DNA. O programa do termociclador constou de: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C/10 s-54°C/30 s-72°C/40 s e extensão final a 72°C/4 minutos. Para a PCR do isolado de *Penicillium*, foi necessário alterar a temperatura de anelamento de 54°C para 48°C.

A verificação da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose na concentração de 0,8% contendo 0,8 g de agarose diluídos em 100mL de tampão TAE 1X. A solução foi misturada e aquecida por 5 minutos até completa fusão. Posteriormente foi adicionado 1µL de brometo de etídio para cada 100 mL de gel, o conteúdo foi agitado e a solução foi transferida para a cuba de eletroforese, com o pente contendo o número de amostras utilizadas. Depois de solidificado, as amostras foram aplicadas no gel que foi submetido à eletroforese a 90 V por 30 minutos.

Para purificação dos produtos amplificados por PCR foi realizada precipitação com PEG (polietilenoglicol). Para cada 50 μL de produto de PCR foram adicionados 21 μL de solução de PEG 6000 a 50%, 8,1 μL de NaCl 5 M e 1,6 μL de EDTA 0,5M. Os microtubos foram agitados em vortex por 10 segundos, centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado com uma pipeta. Foram adicionados 125 μL de etanol 70% e realizada a homogeneização por inversão, seguida de centrifugação a 12000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi retirado com a pipeta novamente, os eppendorfs foram centrifugados a vácuo por 10 minutos e foi feita a ressuspensão com 30 μL de água MilliQ estéril. Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento adicionando-se a 6,7 μL do produto, 2 μL do reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems), 1 μL de tampão de diluição e 0,3 μL do primer ITS1.

A reação foi realizada em termociclador utilizando-se o programa: 96°C/1 minutos seguido de 25 ciclos de 96°C/10 s-50°C/30 s-60°C/4 minutos. A reação de sequenciamento foi purificada por precipitação adicionando-se 40 μL de isopropanol 75% e centrifugando-se a 12000 rpm por 20 minutos. O pellet foi lavado com 100 μL de isopropanol 75% e secado em centrífuga a vácuo por 10 minutos. O pellet foi ressuscitado em 10 μL de formamida deionizada e desnaturado a 95°C por 2 minutos antes da aplicação da amostra no sequenciador de DNA. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático capilar modelo 3500XL (Applied Biosystems).

Com as sequências obtidas foram realizadas buscas no Genbank utilizando-se a ferramenta Blastn (ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Através da similaridade com sequências de fungos previamente identificados e sequenciados, foi possível identificar as espécies analisadas no presente trabalho.

Referência

Dellaporta S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.