

CAMILA RIVERO ALONSO

**Germinação múltipla e sequencial de
sementes como estratégia de propagação em
espécies de *Eugenia* (Myrtaceae)**

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

SÃO PAULO
2018

CAMILA RIVERO ALONSO

**Germinação múltipla e sequencial de
sementes como estratégia de propagação em
espécies de *Eugenia* (Myrtaceae)**

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

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

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

Alonso, Camila Rivero

A454e Germinação múltipla e sequencial de sementes como estratégia de propagação em espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) / Camila Rivero Alonso -- São Paulo, 2018.
73p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2018.

Bibliografia.

1. Sementes recalcitrantes. 2. Estratégia ecológica. 3. Germinações sucessivas.
I. Título.

CDU: 631.53.01

Dedico
Ao meu filho Leonardo Alonso Macedo,
minha maior motivação.

"Todos os que desfrutam acreditam que da árvore o que importa é o fruto, quando na verdade o que importa é a semente: eis a diferença entre os que desfrutam e os que crêem".

F. Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pela oportunidade oferecida;

Ao CNPq, pela bolsa fornecida;

Às pesquisadoras Dra. Rosana C. Carreira, Dra. Ângela M. Ladeira, Dra. Luce M. Brandão Torres e Dra. Rita de Cassia Leone Figueiredo Ribeiro, do Núcleo de Pesquisa de Fisiologia e Bioquímica, pela oportunidade de estágio e primeiros ensinamentos científicos;

Ao Dr. Domingos Sávio Rodrigues, pela amizade e incentivo;

Ao meu orientador Dr. Claudio José Barbedo, pelo incentivo, amizade e também por todos os ensinamentos científicos;

Ao Núcleo de Pesquisa em Sementes, funcionários e pesquisadores: Nelson, José Marcos, Maurício, Lilian, Waldete, Waldyr, Mônica, em especial à Marina Crestana Guardia, por me receber no Núcleo de Sementes e pela oportunidade de estágio.

Às minhas companheiras de laboratório: Mariane C. Inocente, Giovanna Cancian, Aline Testoni, Isabela Pedroni, Daniella E. Uehara, Vera Lygia El Id, Carolina R. C. Nogueira, Beatriz Rocha, Roseli Betoni Bragante, Cibelle Françoso, Ana Clara Araújo, Talita Amador, Débora Molizane, Márcia Oliveiras, pelo companheirismo, auxílio e amizade;

Aos membros da banca de qualificação pelas valiosas críticas e sugestões;

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela atenção;

Aos meus pais Sueli e Damacio, pelo auxílio e incentivo;

Aos meus amigos, pela compreensão nos momentos de ausência;

Às pessoas que direta ou indiretamente me auxiliaram, apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Em contraste às ortodoxas, que são dispersas secas e frequentemente apresentam algum grau de dormência, as sementes recalcitrantes são lançadas ao ambiente em condições de germinar pronta e rapidamente, indicando que a pressão de evolução ocorreu no sentido de direcionar a energia para a produção vegetal. Apesar de apresentarem comportamento recalcitrante as sementes de *Eugenia*, parecem ter adquirido estratégia de propagação no tempo e no espaço diferente da desenvolvida pelas sementes ortodoxas. A germinação em condições desfavoráveis, letal para a maioria das sementes recalcitrantes, pode resultar na morte das primeiras plântulas produzidas por sementes de *Eugenia*, mas não da semente toda. Em trabalhos anteriores, sementes de *Eugenia* apresentaram alta capacidade regenerativa, produzindo plântulas a partir de sementes com apenas $\frac{1}{4}$ de sua massa. Esta capacidade poderia ser entendida como uma estratégia para propagação da espécie. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de sementes de *Eugenia* em formar novas plântulas quando as primeiras germinações são eliminadas. Frutos de três espécies de *Eugenia* (*E. candolleana*, *E. brasiliensis* e *E. involucrata*) foram coletados e tiveram suas sementes extraídas. Estas foram caracterizadas quanto ao teor de água através do método de estufa a 103 ± 2 °C. Em seguida, instalaram-se testes de germinação (25°C e luz constante) para todas as espécies. Os tratamentos compreenderam: a) eliminação de primeiro e segundo desenvolvimento de acordo com o estágio de maturação fisiológica para *E. candolleana*; b) eliminação de primeira e segunda germinação e eliminação de primeiro e segundo desenvolvimento em sementes intactas e fracionadas de *E. brasiliensis*; c) eliminação de primeira, segunda e terceira germinação e eliminação de primeiro, segundo e terceiro desenvolvimento para *E. involucrata*. As sementes das três espécies estudadas foram capazes de produzir novas raízes e formar plântulas normais, sucessivamente, mesmo após remoção da raiz e da parte aérea. Os resultados demonstraram que essa capacidade regenerativa pode, efetivamente, ter proporcionado estratégia evolutiva, que por sua vez, auxiliou a perpetuação das espécies em questão.

Palavras-chave: Sementes recalcitrantes; estratégia ecológica; germinações sucessivas.

ABSTRACT

In contrast to the orthodox ones, which are dry at shedding and can show some degree of dormancy, recalcitrant seeds are released into the environment ready to germinate quickly, indicating that evolutionary pressure has occurred in order to direct the energy to the plant development. Although exhibit recalcitrant behavior *Eugenia* seed propagation strategies can be directed to guarantee germination in different times and spaces not using the same ways of orthodox seeds. Unfavorable germination, lethal to most recalcitrant seeds, could result in the death of the first seedlings produced by *Eugenia* seeds; however, this could not be lethal for the whole seed. Previous works showed that seeds of *Eugenia* present high regenerative capacity, producing seedlings from seeds with only $\frac{1}{4}$ of their original mass. This capacity could be understood as a strategy for species propagation. This work aimed to evaluate the potential of *Eugenia* seeds to develop new seedlings when the first germinations are eliminated. Fruits of three *Eugenia* species (*E. candolleana*, *E. brasiliensis* and *E. involucrata*) were collected and their seeds extracted. The seeds were characterized for water content by stove at 103 ± 2 ° C. Then germination tests (25 ° C and constant light) were installed for all species. The treatments comprised: a) elimination of first and second development according to the stage of physiological maturation for *E. candolleana*; b) elimination of first and second germination and elimination of first and second development in intact and cut seeds of *E. brasiliensis*; c) elimination of first, second and third germination and elimination of first, second and third development for *E. involucrata*. The seeds of the three species studied were able to produce new roots and to form normal seedlings, successively, even after root and shoot removal. The results demonstrated that this regenerative capacity may, in fact, have provided an evolutionary strategy, which in turn, helped the perpetuation of the species in question for the species perpetuation.

Keywords: Recalcitrant seeds; ecological strategy; successive germinations.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sementes de <i>Eugenia brasiliensis</i> (A) e <i>E. involucrata</i> (B), separadas por tamanho, em graúdas (<i>g</i>) e miúdas (<i>m</i>), e frutos de <i>E. candolleana</i> (C), separados por características visuais da maturação: primeiro, segundo, terceiro e quarto (E1, E2, E3 e E4) estádios de maturação dos frutos e suas respectivas sementes. Barras 1 cm	28
Figura 2: Testes de germinação aplicados às sementes de <i>Eugenia brasiliensis</i> (A) e <i>Eugenia involucrata</i> (B), demonstrando o esquema de marcação com utilização de etiqueta plástica para cada semente.	29
Figura 3: Exemplares de plântulas de <i>E. candolleana</i> com cerca de 2 cm de parte aérea (A); Detalhe da eliminação realizada com auxílio de bisturi rente à superfície da semente (B). Barra 1cm	30
Figura 4: Esquema dos tratamentos de regenerabilidade em sementes de <i>Eugenia candolleana</i> . As setas vermelhas indicam eliminações.	31
Figura 5: Exemplar de semente de <i>E. brasiliensis</i> germinando com cerca de 2 cm de raiz primária (A); Detalhe da eliminação de raiz primária realizada com auxílio de bisturi rente à superfície da semente, retirando todo tecido referente à germinação (B). Barras 1cm	32
Figura 6: Tratamentos de regenerabilidade e estímulo para as sementes de <i>Eugenia brasiliensis</i> . As setas vermelhas indicam eliminações.	33
Figura 7: Representação esquemática dos tratamentos de estímulo nas sementes de <i>E. brasiliensis</i> . (A) semente evidenciando o hilo e (B) corte horizontal, com a fração à direita que continha o hilo. (Ilustração: Débora M. Molizane, adaptado e modificado de Teixeira, 2014)	34
Figura 8: Tratamentos de regenerabilidade em sementes de <i>Eugenia involucrata</i> . As setas vermelhas indicam eliminações.	36
Figura 9. Porcentagem de germinação de sementes de <i>E. candolleana</i> em diferentes estádios de maturação submetidas à eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD) e sem eliminações (CONTROLE). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparando os diferentes estádios de maturação e maiúsculas comparando os diferentes tipos de eliminações) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.	39
Figura 10. Porcentagem de desenvolvimento de plântulas em sementes de <i>E. candolleana</i> em diferentes estádios de maturação, submetidas à eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD) e sem eliminações (CONTROLE). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.	40
Figura 11. Tempo (dias) de regeneração de novas raízes e plântulas provenientes de sementes de <i>E. candolleana</i> em quatro estádios de maturação (E1, E2, E3 e E4), submetidas a eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (EPD) e sem eliminações (SE).	41
Figura 12. Médias de porcentagem de germinação de sementes de <i>E. brasiliensis</i> , graúdas e miúdas, inteiras e fracionadas submetidas à eliminação de primeira e segunda germinação (EPG e ESG), eliminação de primeiro e segundo desenvolvimento (EPD e ESD) e sem eliminações (controle). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.	44

- Figura 13.** Médias de porcentagem de desenvolvimento de plântulas em sementes de *E. brasiliensis*, graúdas e miúdas, inteiras e fracionadas submetidas à eliminação de primeira e segunda germinação (EPG e ESG), eliminação de primeiro e segundo desenvolvimento (EPD e ESD) e sem eliminações (controle). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. 45
- Figura 14.** Foram coletados frutos de *E. cerasiflora* predados naturalmente (A), realizou-se a identificação desses frutos e das respectivas frações (B), para acompanhamento de teste de germinação (C). Após, obteve-se exemplares de plântulas e frações de sementes de *E. cerasiflora* (D), sugerindo que o fracionamento em sementes ocorre também de forma natural. 47
- Figura 15.** Tempo (dias) de regeneração de novas raízes provenientes de sementes graúdas e miúdas de *E. brasiliensis*, inteiras e fracionadas, submetidas a eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD) e sem eliminações (SE). 48
- Figura 16.** Tempo (dias) de regeneração de novas plântulas provenientes de sementes graúdas e miúdas de *E. brasiliensis*, inteiras e fracionadas, submetidas a eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD) e sem eliminações (SE). 49
- Figura 17.** Porcentagem de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* de diferentes tamanhos (graúdas nas colunas em preto, miúdas em cinza) submetidas à eliminação de primeira, segunda e terceira germinação (EPG, ESG e ETG) e eliminação de primeiro, segundo e terceiro desenvolvimento (EPD, ESD e ETD). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparando graúdas com miúdas e maiúsculas comparando os diferentes tipos de eliminações) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. 51
- Figura 18.** Porcentagem de desenvolvimento de plântulas em sementes de *Eugenia involucrata* de diferentes tamanhos (graúdas nas colunas em preto, miúdas em cinza) submetidas à eliminação de primeira, segunda e terceira germinação (EPG, ESG e ETG) e eliminação de primeiro, segundo e terceiro desenvolvimento (EPD, ESD e ETD). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparando graúdas com miúdas e maiúsculas comparando os diferentes tipos de eliminações) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. 53
- Figura 19.** Tempo (dias) de regeneração de novas raízes provenientes de sementes graúdas e miúdas de *E. involucrata*, submetidas a eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de terceira germinação (ETG), eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD), eliminação de terceiro desenvolvimento (ETD), e sem eliminações (SE). 55
- Figura 20.** Tempo (dias) de regeneração de novas plântulas provenientes de sementes graúdas e miúdas de *E. involucrata*, submetidas a eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de terceira germinação (ETG), eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD), eliminação de terceiro desenvolvimento (ETD), e sem eliminações (SE). 56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro das sementes (DS), teor de água (TA), potencial hídrico (PH), massa fresca (MF), e massa seca (MS), de sementes de <i>E. candolleana</i> de acordo com o estágio de maturação dos frutos.	37
Tabela 2. Diâmetro das sementes (DS), teor de água (TA), potencial hídrico (PH), massa fresca (MF) e massa seca (MS), de sementes de <i>E. brasiliensis</i> de acordo com a separação em tamanho, graúdas e miúdas.	43
Tabela 3. Diâmetro das sementes (DS), teor de água (TA), potencial hídrico (PH), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de sementes de <i>E. involucrata</i> de acordo com a separação em tamanho, graúdas e miúdas.	50
Tabela 4. Medidas de comprimento da parte aérea e contagem do número de folhas em plântulas de <i>E. involucrata</i> , graúdas (G) e miúdas (M), que foram submetidas aos tratamentos de eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de terceira germinação (ETG) e sem eliminações (Controle) por 3 meses (iniciais) e 10 meses (finais).	54

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	12
1. 1 Conservação da biodiversidade.....	12
1. 2 Myrtaceae e <i>Eugenia</i>	12
1. 3 Sementes de <i>Eugenia</i> spp.....	14
1. 4 Sementes recalcitrantes.....	16
1. 5 Predação e herbivoria em sementes.....	18
1. 6 Espécies de <i>Eugenia</i> estudadas.....	19
1. 6. 1 <i>E. candolleana</i> DC.	19
1. 6. 2 <i>E. brasiliensis</i> Lam.	20
1. 6. 3 <i>E. involucrata</i> DC.	20
1. 7 Estratégias ecológicas de sobrevivência e propagação das espécies.....	20
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3. 1 Obtenção do material vegetal.....	27
3. 2 Caracterização dos lotes.....	27
3. 3 Avaliação do teor de água, matéria seca e potencial hídrico.....	28
3. 4 Testes de germinação.....	28
3. 4. 1 Experimento I – Regenerabilidade em diferentes estádios de maturação.....	29
3. 4. 2 Experimento II – Regenerabilidade múltipla e sucessiva.....	31
3. 5 Delineamento experimental e análise estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4. 1 Experimento I – Regenerabilidade em diferentes estádios de maturação.....	37
4. 2 Experimento II – Regenerabilidade múltipla e sucessiva.....	43
5. CONCLUSÕES.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conservação da biodiversidade

Dentre todos os biomas, Mata Atlântica é apontada com um dos “hot spots” brasileiros, compreende cerca de 15 Estados e abrange grande parte da costa brasileira, sua área original era 1.315.460 km², 15% do território brasileiro, seu remanescente é 102.012 km², sendo reduzida a 7,91% da sua extensão original (Lino, 2003; IESB, 2007; IBF, 2018).

A Mata Atlântica está entre as mais importantes florestas tropicais do mundo, sendo considerada prioridade em termos de conservação, devido ao seu grau de ameaça e megadiversidade (Leitão-Filho, 1987 e 1993). Uma característica marcante desse bioma é sua grande diversidade ambiental (Câmara, 1992).

Em virtude das suas irregularidades nas distribuições das chuvas, aliada à diversificada estrutura geomorfológica, formou-se uma ampla multiplicidade de habitats: florestas úmidas, florestas semi e inteiramente decíduas, manguezais, restingas, campos de altitude e até campos rupestres (Rizzini, 1997).

O avanço da cobertura de áreas protegidas na Mata Atlântica aumentou expressivamente ao longo dos últimos anos, com a contribuição dos governos federais, estaduais e mais recentemente dos governos municipais e iniciativa privada. No entanto, a maior parte dos remanescentes de vegetação nativa ainda permanece sem proteção. Assim, além do investimento na ampliação e consolidação da rede de áreas protegidas, as estratégias para a conservação da biodiversidade visam contemplar também formas inovadoras de incentivos para a conservação e uso sustentável da biodiversidade, tais como a promoção da recuperação de áreas degradadas e uso sustentável da vegetação nativa (MMA, 2018).

1.2 Myrtaceae e *Eugenia*

Dentre as famílias botânicas com expressiva distribuição destaca-se Myrtaceae, que apresenta cerca de 5.600 espécies reunidas em 132 gêneros, nos quais predominam os tipos de vegetação arbustiva e arbórea (Govaerts *et al.*, 2014). Os dois principais centros de dispersão da família Myrtaceae são América e Austrália (Joly, 1993; Ribeiro,

1999), com grande representatividade na formação atlântica brasileira (Salimon e Negrelle, 2001). No Brasil, é conhecida como uma das dez famílias com maior riqueza de espécies, com 23 gêneros e 976 espécies, das quais 707 são endêmicas da flora brasileira (Sobral *et al.* 2014).

Algumas espécies da família Myrtaceae têm sua sistemática extremamente dificultada pelo forte paralelismo filogenético entre os gêneros e pelas diferentes interpretações morfológicas dos caracteres que variam em função da distribuição geográfica das espécies (Barroso e Peixoto, 1995). Quando se estuda espécies brasileiras, muitos autores referem às dificuldades de delimitação entre os táxons (McVaugh, 1968; Barroso, 1984; Kawasaki, 1989), mas, por outro lado, Souza (2005) relatou que essa complexidade taxonômica de Myrtaceae, a ausência de levantamentos detalhados sobre a família e a grande pressão antrópica serviram de estímulo para a importância da continuidade dos estudos sobre a família botânica em questão (Souza, 2005).

Wilson *et al.* (2005) relataram que os dados morfológicos e moleculares mostram claramente que, embora a família como um todo seja monofilética, os grupos intrafamiliares precisam ser redefinidos, uma vez que certas características clássicas utilizadas em sua delimitação se mostram inconsistentes, o que torna facultativo os limites entre determinados gêneros (Landrum e Kawasaki, 1997).

Os diversos gêneros de árvores e arbustos das espécies brasileiras da família Myrtaceae podem ser utilizados como ornamental ou para a produção comercial de seus frutos, entre eles podemos citar como exemplo a goiabeira, a pitangueira e a jabuticabeira, que podem ser utilizados na fruticultura devido às suas qualidades e adaptação a algumas condições de clima subtropical (Donadio e Moro, 2004).

Os frutos produzidos pela família Myrtaceae são amplamente indicados para consumo humano, pois apresentam propriedades nutracêuticas, pela presença de compostos secundários fitoterápicos, aromáticos e antioxidantes (Limberger *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2014).

Aproximadamente um terço das espécies desta família pertence ao gênero *Eugenia*. Este gênero aparece com grande destaque (Landrum e Kawasaki, 1997; Souza e Lorenzi, 2005), com espécies que produzem frutos comestíveis de sabor agradável, como *E. stipitata* (araçá), *E. dysenterica* (cagaita), *E. pyriformis* (uvaia), *E. involucrata* (cereja-do-rio-grande), *E. brasiliensis* (grumixama) e *E. uniflora* (pitanga), além de terem características adequadas para uso na arborização urbana (Corrêa, 1975; Silva *et*

al., 2003). São bem representadas nas diversas formações vegetais quanto à riqueza, abundância e frequência de suas espécies (Klein, 1990; Peixoto e Gentry, 1990; Leitão Filho, 1993; Barroso e Perón, 1994; Rodrigues e Nave, 2000; Silva *et al.*, 2003).

1.3 Sementes de *Eugenia* spp.

Muitas espécies de *Eugenia* apresentam baixa densidade de ocorrência. Além da ocorrência de baixa produção de sementes, deve-se enfatizar que a maioria das espécies de *Eugenia* nativas do Brasil produzem frutos com poucas sementes, frequentemente uma ou duas, revelando a grande necessidade de se maximizar o aproveitamento das sementes obtidas. Isso dificulta a obtenção de mudas em larga escala (seja para comercialização de frutos ou restauração de áreas degradadas) (Silva *et al.*, 2005).

Diversas espécies do gênero *Eugenia* são interessantes para serem utilizadas em programas de recuperação florestal, em áreas de preservação permanente, pois seus frutos coloridos e com odor forte, costumam atrair muitos animais que se alimentam dos mesmos, principalmente as aves, um dos principais dispersores de sementes, auxiliando no enriquecimento e no estabelecimento dessas áreas (Delgado 2006).

Muitas dessas espécies de *Eugenia* são ricas em compostos do metabolismo secundário, entre eles os óleos essenciais e taninos, frequentemente utilizados na medicina popular (Pio Corrêa, 1984; Neves e Donato, 19; Pott e Pott, 1994; Lunardi *et al.*, 2001; Romagnolo *et al.*, 2006).

O embrião e as estruturas que o rodeiam constituem a unidade de dispersão (semente ou diásporo) e encontram-se, estrutural e fisiologicamente, preparados para desempenhar seu papel, com reserva alimentar capaz de sustentar o crescimento da plântula até que esta se estabeleça como um organismo autotrófico (Teixeira, 2014). Esses processos não dependem apenas de fatores biológicos, tais como a polinização e alocação de recursos da planta-mãe, como também são dependentes dos fatores ambientais como a precipitação anual e fragmentação do habitat (Koenig e Knops, 2000; Murren, 2002).

A presença de poliembrionia na maioria das espécies da família Myrtaceae e, ainda, de embrião aparentemente indiviso em *Eugenia*, sugerem a possibilidade de se aumentar o número de plântulas obtidas de cada semente (Gurgel e Soubiê Sobrinho, 1951; Gomes, 2011).

Sementes poliembriônicas são aquelas que contêm embriões nucleares e zigóticos (Degani *et al.*, 1993), ou podem apresentar apenas embriões nucleares, também denominados de apomíticos (Dornelles, 1997), são formados do tecido nucelar e as plântulas originadas desses embriões são geneticamente iguais à planta-mãe (Aron *et al.*, 1998). Alguns autores consideram que o embrião das *Eugénias* não possua distinção da linha de soldadura entre os cotilédones, porém outros afirmam que não há diferenciação entre o eixo embrionário e os cotilédones, sendo o mesmo denominado embrião conferruminado, ou seja, sem distinção da linha de soldadura dos cotilédones (Andrade e Ferreira, 2000; Lucas *et al.*, 2005).

Contudo, foi demonstrado que sementes de *Eugenia* são monoembriônicas, têm eixo embrionário diferenciado (visível apenas ao microscópio) e apresentam capacidade de produzir mais de uma raiz e/ou plântula (Silva *et al.*, 2003; Justo *et al.*, 2007).

Como há pouca produção de sementes por fruto no gênero *Eugenia*, a capacidade de produzir mais de uma raiz e/ou plântula é interessante, pois pode permitir a produção de um número maior de mudas a partir de um mesmo lote de sementes. A produção de sementes é importante para a espécie em seu ecossistema, pela formação de bancos no solo, para dispersão e sua sobrevivência (Silva *et al.*, 2005).

Durante a evolução das espécies tropicais algumas adquiriram a característica de sincronizar a maturidade fisiológica de suas sementes, com mudanças nas cores dos frutos, sugerindo uma ligação com a síndrome de dispersão, uma vez que poderia atrair potenciais animais dispersores (Piña-Rodrigues e Aguiar, 1993). Em consenso a esta associação, verificam-se os dados obtidos por Hung (2003) para sementes de *Dalbergia cochichiensis* que apresentaram níveis diferentes de vigor para cada estágio de desenvolvimento, sendo sempre possível à associação a diferentes cores.

Para os frutos carnosos, o problema maior é o reconhecimento da época em que ocorre a maturação fisiológica das sementes que nem sempre há necessidade de esperar a completa maturação “visual” do fruto (Alvarenga *et al.*, 1991).

Na literatura, a coloração dos frutos e das sementes pode ser considerada como um importante índice na determinação da maturidade fisiológica (Corvello *et al.*, 1999; Fowler e Martins, 2001).

A mudança de coloração dos frutos mostrou-se um índice eficaz para auxiliar na determinação da maturidade fisiológica das sementes de espécies nativas do Brasil, como *Euterpe edulis* (Lin, 1988), *Inga uruguensis*, *Caesalpinia echinata* (Borges *et al.*, 2005), *Ocotea catharinensis* (Silva, 1997), *Aniba rosaedora* (Rosa e Ohashi, 1999),

Trema micrantha (Castellani e Aguiar, 2001) e *Bixa orellana* (Mendes *et al.*, 2006). A coloração dos frutos foi eficiente para identificação da maturidade em *E. uniflora* (Avila *et al.* 2009), mas não para outras espécies de *Eugenia* (Pratavia, 2005; Lamarca *et al.*, 2013).

Com a maturação das sementes, muitas vezes o epicarpo modifica a coloração e o fruto torna-se sensível na fase pós-colheita. Frutos de espécies nativas apresentam desuniformidade na maturação dos frutos e sementes, por isso é necessário estabelecer outros critérios de seleção como cor, tamanho e massa seca que possam verificar o nível de maturação das sementes (Vendramin *et al.*, 2013). Estas evidências supracitadas corroboram com as pesquisas de Barbedo *et al.*, (2013) que apenas pela característica visual não se pode definir o ponto real de maturação das sementes recalcitrantes.

1.4 Sementes recalcitrantes

Todas as espécies de *Eugenia* que tiveram suas sementes estudadas quanto à tolerância à dessecação foram agrupadas dentre as recalcitrantes, ou seja, sensíveis à dessecação e com baixo potencial de armazenamento (Delgado e Barbedo, 2007; Sena *et al.*, 2010; Scalon *et al.*, 2012). Devido ao seu elevado conteúdo de água, sementes recalcitrantes são, via de regra, dispersas com metabolismo ainda elevado, diferente das ortodoxas que, por passarem por secagem ao final da maturação, são dispersas com metabolismo muito baixo (Barbedo *et al.*, 2013).

Na produção vegetal, a água desempenha papel fundamental, de maneira que sua deficiência ou seu excesso afetem de forma decisiva o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Reichardt, 1985).

O conhecimento sobre o teor de água a partir do qual se inicia a perda da viabilidade das sementes de espécies frutíferas brasileiras é essencial e além de fornecer importantes dados para trabalhos sobre armazenamento (Gentil, 2003), também pode interferir na maturação das sementes, período ideal de colheita, ao peso das sementes e a suscetibilidade a injúrias pelo calor, congelamento, danos mecânicos e danos causados por pragas (Sarmiento *et al.*, 2015).

O teor de água do zigoto após a fertilização do óvulo, em geral, excede 80%, declinando de forma gradual durante o desenvolvimento da semente até a maturidade fisiológica. O período de dessecação, para muitas espécies, é um evento normal no desenvolvimento do embrião, levando a um estado de metabolismo quiescente, que se

interpõe entre o desenvolvimento e a germinação. Dependendo do grau de dessecação, a semente entra em criptobiose, quando o intercâmbio de matéria e energia entre a semente e o ambiente circundante atinge níveis e velocidades especialmente baixos (Villela e Marcos-Filho, 1998).

Nas espécies recalcitrantes, as sementes podem passar da fase de desenvolvimento para a germinativa, sem que ocorra o período de quiescência, motivado pela redução da sensibilidade e/ou do nível de ácido abscísico (Kermode, 1995). Os processos envolvidos na germinação, em geral, dependem de fatores internos e externos à semente, dos quais a água, a temperatura, o oxigênio e a luz são os mais importantes (Baskin e Baskin, 1998). A germinação de sementes é um dos pontos críticos de um indivíduo para o estabelecimento como planta. O conhecimento e a compreensão desta fase do desenvolvimento são importantes para a explicação da ocorrência de uma espécie numa determinada região (Áquila e Ferreira, 1984).

As sementes de várias espécies brasileiras de *Eugenia* apresentam elevado teor de água (entre 40 e 70%) quando os frutos são dispersos e, conforme mencionado anteriormente, são consideradas sensíveis à dessecação (Barbedo e Bilia, 1998; Anjos e Ferraz, 1999; Andrade e Ferreira, 2000; Andrade *et al.*, 2003; Delgado e Barbedo, 2007), o que acarreta problemas no potencial de armazenamento dessas sementes (Gentil e Ferreira, 1999).

Para que o metabolismo das sementes recalcitrantes seja diminuído há necessidade de redução da temperatura. Calvi (2015) armazenou sementes de *Eugenia stipitata*, mantidas úmidas (40% de umidade) em temperaturas de 10 a 15°C, sendo possível manter a viabilidade das sementes por até um ano, mostrando a eficiência desta técnica na redução do metabolismo germinativo.

Trabalhos realizados por Barbedo *et al.* (1998) e Maluf *et al.* (2003) com *E. involucrata* mostraram que as sementes dessa espécie podem ser armazenadas por seis meses, quando o teor de água é reduzido a valores próximos a 1,1g água / g massa seca (Maluf *et al.*, 2003). Posteriormente, sementes de *E. brasiliensis* também foram armazenadas, sob condições similares, continuando viáveis por nove meses (Kohama *et al.*, 2006).

Reduções no teor de água podem causar a perda da viabilidade, situando tais sementes entre as recalcitrantes, em contraste às ortodoxas, que podem ser secas a valores abaixo de 0,08 g água / g massa seca (Roberts, 1973). Entretanto, alguns autores consideram a sensibilidade à dessecação das sementes recalcitrantes como fator

quantitativo, o que caracteriza níveis de recalcitrância (Berjak e Pammenter, 2000; Walters, 2000).

As diferenças entre sementes recalcitrantes e ortodoxas encontram-se no estágio de maturidade, no momento em que se desprendem da planta-mãe, nas recalcitrantes em uma fase mais imatura. É necessário que se desenvolvam técnicas que ampliem o tempo de maturidade dessas sementes, mantendo-as ligadas à planta-mãe por maior período, até que o processo de maturação tenha sido completamente concluído (Barbedo *et al.*, 2013), aumentando a capacidade de armazenamento após a colheita dessas sementes recalcitrantes.

1.5 Predação e herbivoria em sementes

A predação é caracterizada pelo consumo de um organismo vivo por outro organismo, sendo que as presas podem ser animais ou vegetais e podem ser consumidas em sua totalidade ou apenas partes delas (Begon *et al.*, 2007; Denno e Lewis, 2009), portanto, os indivíduos que participam desta interação também são considerados predadores de sementes.

A maioria desses predadores de sementes são considerados herbívoros, são também classificados como granívoros e esta interação entre as plantas e os animais que se alimentam de suas sementes é denominada de granivoria (Hulme e Benkman, 2002).

Antes mesmo da dispersão das sementes, a mesma pode ser acometida e consumida parcial ou totalmente. Quando se encontram ainda aderidas à planta-mãe, a predação é considerada pré-dispersão; quando a semente já foi dispersa, caracteriza-se a predação pós-dispersão (Crawley, 1992). Entre os predadores são encontradas várias ordens de insetos, roedores, veados, aves granívoras, entre outros (Janzen, 1971; Hulme e Kollmann, 2005).

A intensidade da predação varia de um ambiente para outro, entre as espécies e entre os indivíduos de uma mesma espécie (Janzen, 1971). A predação também sofre influência pelo tamanho das sementes e algumas fêmeas de insetos preferem sementes maiores no momento de sua oviposição, desta maneira garantindo maior taxa de sobrevivência para os seus descendentes (Cope e Fox, 2003). Em alguns casos, larvas de insetos se alimentam de mais de uma semente dentro do mesmo fruto durante o seu desenvolvimento (Szentesi e Jermy, 1995) e consomem a maioria do conteúdo de

reserva dos cotilédones como observado para sementes de *Eugenia punicifolia* (Senra, 2012).

Para as sementes do gênero *Eugenia* esta ação parece não ser prejudicial, pois sementes de *E. cerasiflora* que se mostraram intensamente predadas por larvas de insetos, ainda que essas sementes ficassem com pequena parte devido à predação, demonstraram capacidade de germinar e de produzir plântulas normais, evidenciando que originalmente possuem uma quantidade de reservas nutritivas acima da necessária para uma germinação (Teixeira, 2009).

Provavelmente, essas relações ecológicas integram as estratégias de permanência desses indivíduos no meio, sugerindo que haja coevolução entre essas espécies de semente e inseto.

1.6 Espécies de *Eugenia* estudadas

1.6.1 *E. candolleana* DC.

Popularmente conhecida como ameixa-da-mata, murta, murtinha ou cereja-roxa, *E. candolleana* é uma árvore que mede de 3-6 m de altura, dotada de copa aberta e flores brancas. Floresce durante os meses de dezembro-janeiro. Os frutos amadurecem principalmente em março-abril, são subglobosos, lisos, de cor roxo-negra, com polpa carnosasuculenta, doce, contendo 1-2 sementes. Possui ampla ocorrência que vai da Bahia passando pelo Rio de Janeiro à zona da Mata de Minas Gerais, na floresta pluvial de restinga, com distribuição descontínua ao longo de sua faixa de ocorrência: parece preferir solos frescos e bem úmidos, das regiões litorâneas, com maior frequência na costa norte do Espírito Santo (Lorenzi, 2009).

Existem poucas informações farmacológicas e químicas sobre essa espécie na literatura. No entanto, a infusão das folhas para o tratamento de dor e febre, tem sido usada, pois se sabe que o óleo essencial de folhas de *E. candolleana* possui propriedades anti-inflamatórias (Guimarães *et al.*, 2009; Nakamura, *et al.*, 2010).

O óleo essencial, rico em sesquiterpenos, também demonstrou atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, representando uma alternativa natural de erradicação do mosquito que transmite a febre amarela e a dengue (Neves *et al.*, 2017).

1.6.2 *E. brasiliensis* Lam.

E. brasiliensis é uma árvore exclusiva de mata pluvial atlântica do sul do Brasil, popularmente conhecida como grumixama, ocorre em associações primárias das planícies aluviais, bem como nas encostas, também ocorre em vegetações de subserra (Legrand e Klein, 1969).

Os frutos são um pouco ácidos, agradáveis e adocicados, muito utilizados em conservas. É considerada espécie ornamental, porém, em São Paulo, é mais cultivada como espécies florestais de rápido crescimento (Corrêa, 1975).

Existem variedades de frutos amarelos e de frutos pretos (roxo), os quais são procurados por aves, se tornando indispensável nos reflorestamentos heterogêneos destinados à recomposição de áreas de preservação permanente (Lorenzi, 1998).

Segundo Fernandez-Ferreira *et al.*, (1997), o óleo essencial de *E. brasiliensis* apresenta atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*.

1.6.3 *E. involucrata* DC.

Espécie conhecida popularmente como, cereja-do-rio-grande, *E. involucrata* é uma árvore de 8 a 14 metros de altura, apresentando copa bem formada. Encontra-se nas submatas mais desenvolvidas situadas em solos úmidos e não muito acidentados (Carvalho, 2008).

É frequentemente cultivada nos três estados do sul do Brasil (Sobral *et al.*, 2014) devido ao sabor de seus frutos, estes têm forma variável, com polpa espessa, carnosos e suculentos de sabor doce ou ácido, e são utilizados na fabricação de doces e licores ou para consumo *in natura* (Lorenzi, 1998). *E. involucrata* também se destaca pelas suas propriedades medicinais (Gomes *et al.*, 2016).

1.7 Estratégias ecológicas de sobrevivência e propagação das espécies

O benefício de uma estratégia depende das condições ambientais, da disponibilidade de recursos e das interações com predadores, patógenos e competidores. Fatores como estresse, predação, doenças e escassez de recursos são problemas que

impedem que os organismos alcancem seu desempenho potencial. Para superarem esses obstáculos, os organismos devem encontrar soluções que neutralizem ou minimizem a ação negativa desses fatores em seu desempenho. Os indivíduos que apresentam adaptações (características que lhes permitam resolver um determinado problema) conseguem, por essa razão, produzir um número de descendentes maior do que indivíduos que não estejam aptos a resolver problemas ou que não são tão eficientes em fazê-lo (Vaz, 2011).

Em sementes, as recalcitrantes são metabolicamente ativas mesmo após sua dispersão (Barbedo e Marcos-Filho, 1998). Em contraste às ortodoxas, que são dispersas secas e frequentemente apresentam algum grau de dormência (Bewley e Black, 1982; Hilhorst, 2007; Molizane, 2012), as recalcitrantes são lançadas ao ambiente em condições de germinar pronta e rapidamente, indicando que a pressão evolutiva ocorreu no sentido de direcionar a energia para o estabelecimento dessas espécies.

As ortodoxas, por sua vez, provavelmente foram selecionadas em ambiente com alguma estação desfavorável à propagação, necessitando manter a estrutura reprodutiva - a semente - capaz de atravessar esses períodos em estado latente (Barbedo *et al.*, 2013; Dekkers *et al.*, 2015).

Algumas sementes da família *Fabaceae* toleram ser secas a níveis abaixo de 10% de água, e suportam armazenamento a temperatura ambiente por períodos longos, como *Caesalpinia peltophoroides* (Silva, 2010), demonstrando seu comportamento ortodoxo. Diferenças podem ser observadas em espécies do mesmo gênero, em que *Caesalpinia echinata* (Figliolia *et al.*, 2001; Barbedo *et al.*, 2002) adquire a tolerância a dessecação dependendo do estágio de maturação e também sob influência do ambiente em que estão inseridas.

Em estudo realizado com duas espécies de palmeiras (*Arecaceae*) pôde-se verificar que frutos de *Euterpe edulis* são dispersos com altos teores de água e não há sincronidade visual entre os frutos e os pirênios de um estágio para outro, caracterizando um comportamento recalcitrante. Já em *Syagrus romanzoffiana*, apresentaram diferenças visuais, acúmulo de matéria seca e teor de água baixo na dispersão, aproximando-se mais das características de sementes ortodoxas (Garcia e Barbedo, 2016).

As sementes do gênero *Eugenia* são sensíveis à redução do teor de água para valores inferiores a 45% e, acima deste valor, apresentam diferentes graus de

sensibilidade à dessecação (Maluf *et al.*, 2003; Delgado e Barbedo, 2007). Assim como a maioria das sementes recalcitrantes, as espécies desse gênero podem ter adotado estratégia de propagação no tempo e no espaço diferente da desenvolvida pelas sementes ortodoxas (Teixeira, 2009).

A germinação em condições desfavoráveis, letal para a maioria das sementes recalcitrantes, pode resultar na morte das primeiras plântulas produzidas por sementes de *Eugenia*, mas não da semente toda. Isso porque tais sementes apresentam duas importantes características que permite germinações sucessivas: 1) tecidos e células capazes de diferenciar novas plântulas; 2) reservas suficientes para nutrir várias plântulas em seus estádios iniciais de desenvolvimento (Silva *et al.*, 2003, 2005; Delgado, 2010).

Delgado (2010) demonstrou que as raízes ou plântulas inteiras formadas em sementes de *Eugenia*, após seu fracionamento, têm origem na bainha dos feixes vasculares dos cotilédones. Já Amador (2015) identificou que há intensa produção dos ácidos gálico e elágico quando a primeira germinação se inicia. Estes compostos são descritos, na literatura, como potenciais inibidores da alfa-glucosidase (Kam *et al.*, 2013). Em sementes, uma alfa-glucosidase denominada maltase é responsável por evitar o acúmulo de moléculas de maltose resultantes da degradação do amido (Buckeridge *et al.*, 2004). O acúmulo de maltose poderia, por exemplo, ser um sinalizador para o bloqueio da germinação, potencialmente impedindo novas germinações, mas tal fato ainda necessita ser mais bem elucidado (Amador, 2015).

Portanto, os resultados de regeneração de plântulas a partir de sementes fracionadas e/ou germinantes demonstram um complexo sistema de controle da germinação em sementes de *Eugenia* no qual apenas uma plântula se desenvolve num determinado momento (Delgado e Barbedo, 2011; Amador e Barbedo, 2011). O estabelecimento da plântula pode ser afetado por diversos fatores, pela presença de patógenos, estresse hídrico e mecânico, herbívoros e competição intra e ou interespecífica (Janzen, 1970).

Sementes maduras demonstram maior capacidade regenerativa que as sementes imaturas, porém em imaturas também ocorre, isso indica que células meristemáticas totipotentes ou pluripotentes (Batygina e Vinogradova, 2007), que promovem a formação de embriões adventícios, já estejam presentes em embriões imaturos. A capacidade regenerativa após sementes sofrerem danos provocados por predação amplia o período de viabilidade da mesma no solo, contribuindo para preservação da espécie,

principalmente das recalcitrantes, que possuem baixa longevidade (Silva *et al.*, 2005; Teixeira, 2009; Teixeira e Barbedo, 2012).

Pesquisas constataram que estresses bióticos ou abióticos levam a alterações no padrão de expressão de proteínas das plantas, podendo ocorrer tanto à inibição quanto a indução da biossíntese de determinados constituintes proteicos. A respeito disso, Green e Ryan (1972), verificaram que há indução de inibidores de proteinases em tomate como um mecanismo possível de defesa contra insetos.

Há algumas reações envolvendo compostos químicos reconhecidos como potenciais indutores ou inibidores de processos fisiológicos em tecidos vivos, alguns dos quais (como exemplo, espécies reativas de oxigênio e antioxidantes), poderiam estar relacionados com os processos de inibição ou indução da regeneração de raízes e plântulas em sementes de espécies de *Eugenia* (Teixeira, 2014).

Trabalhos realizados com fragmentação de sementes de *Eugenia* evidenciaram que a partir de uma semente pode-se obter mais do que uma planta (Silva *et al.*, 2005; Amador e Barbedo, 2011, Teixeira *et al.*, 2012; Prata-viera *et al.*, 2015) e também que a dependência do fracionamento, para que esses novos tecidos se desenvolvam, indica que lesões nas sementes podem iniciar algum processo de indução da formação de novas raízes e plântulas, ou pode bloquear a autoinibição dessas formações em sementes (Delgado e Barbedo, 2011; Amador, 2015).

O fracionamento realizado em corte transversal de *Eugenia stipitata* demonstrou bom potencial regenerativo, nas metades que permaneceram com o eixo hipocótilo-radícula obteve-se 89% de germinação e, ainda, 20% nas suas metades opostas o que totalizaria 109% de germinação (Anjos e Ferraz, 1999; Calvi, 2015). Outros exemplos são das sementes de *E. pyriformis* (Silva *et al.*, 2003) com uma germinação de até 184% e *E. uniflora*, *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, com germinação também superando os 100%, variando de 114% a 166% (Silva *et al.*, 2005). Tais dados sugerem que este é um comportamento que pode ser estendido para todo o gênero (Delgado, 2010).

A capacidade regenerativa em sementes após o fracionamento foi observada também em dois gêneros da família Clusiaceae, *Garcinia* e *Allanblackia*, (Ha *et al.*, 1988; Malik *et al.*, 2005; Joshi *et al.*, 2006; Asomaning *et al.*, 2011; Ofori *et al.*, 2015), que também possuem sementes recalcitrantes (Nascimento *et al.*, 2001).

Em *Eugenia*, curiosamente quando as sementes não são fracionadas, a germinação nunca é superior a 100%. Também é rara a formação de uma segunda raiz em cada fração dessas sementes, quando são cortadas. Isso pode indicar que a regeneração de um

segundo embrião em uma mesma semente somente ocorrerá quando a mesma é fracionada e que devem existir mecanismos de indução e/ou de inibição decorrentes do corte e da germinação (Silva *et al.*, 2003 e 2005).

Evidências de que haja um sistema de autocontrole nessas sementes foi reforçada pela presença de substâncias inibidoras da germinação nas sementes de *Eugenia*, como verificado em *E. dysenterica* (Rizzini, 1970) e em *E. uniflora* (Delgado e Barbedo, 2011), o que poderia impedir a germinação ou, até, a diferenciação de um segundo embrião.

Análises fitoquímicas de extratos envolvidos nos processos de indução e inibição da regeneração foram realizadas em algumas espécies do gênero *Eugenia*. Aparentemente, o controle do número de germinações está ligado ao balanço entre os ácidos gálico e elágico (Amador, 2015).

Com relação a estudos realizados com organogênese, a taxa de formação e o desenvolvimento de embriões somáticos ou zigóticos são fortemente influenciados pela composição química do meio. O balanço entre açúcares, aminoácidos e reguladores de crescimento, tem mostrado efeitos ora indutores, ora inibidores da formação de novos embriões (Deo *et al.*, 2010; Kanwar *et al.*, 2010; Karami e Saidi, 2010; Swamy *et al.*, 2010).

Sendo assim, em sementes de *Eugenia*, o início da protrusão radicular ou da formação de parte aérea poderia modificar o balanço daqueles compostos, o que tornaria o meio desfavorável à desdiferenciação de novas plântulas (Amador e Barbedo, 2011; Amador, 2015).

Para Delgado *et al.* (2010), a capacidade regenerativa pode ter se originado de uma pressão de seleção natural influenciada pela predação, em que células parenquimáticas subepidérmicas se desdiferenciaram e formaram uma faixa meristemática, demonstrando assim uma regeneração rápida dos tecidos fracionados como uma forma de resistência à predação.

O mecanismo de reprodução de cada espécie é importante, posto que confere a perpetuação de seus descendentes e para uma possível colonização de novos habitats, além de contribuir com o desenvolvimento dos processos evolutivos naturais (Darwin, 1859; Stebbins, 1950; Grant, 1971).

Organismos terrestres são constantemente confrontados com o estresse à dessecação impostos pela secura do ar, conseqüentemente, durante a evolução da vida vegetal na terra, adaptações que permitem sobreviver e / ou evitar a dessecação foram

necessárias. A capacidade de tolerar quase completamente a dessecação foi um passo evolutivo importante que desempenhou um papel fundamental na colonização da vida terrestre (Dekkers *et al.*, 2015).

Sementes recalcitrantes são muito sensíveis à dessecação, sendo assim supõe-se que a regeneração dessas sementes tenha sido uma dessas adaptações ecofisiológicas como estratégia compensatória a tolerância à dessecação para produzir sementes que germinam em um longo período do ano (Barbedo e Marcos - Filho, 1998).

A proposta deste trabalho foi estudar espécies brasileiras do gênero *Eugenia*, sobre sua capacidade regenerativa, demonstrada em trabalhos anteriores (Silva *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; Teixeira, 2009; Delgado, 2010; Teixeira, 2014; Amador, 2015), sobre sua estratégia em conferir segurança na reprodução, dispersão e também na propagação da espécie, sob a hipótese de que a capacidade das sementes de *Eugenia* spp. em produzir diversas plântulas e em controlar germinações simultâneas está associada a uma estratégia de adaptação à predação dessas sementes.

Para tanto, em um primeiro experimento, a capacidade regenerativa das sementes foi associada a níveis de maturação das sementes, a partir de visualizações do epicarpo dos frutos. Num segundo experimento, foi estudado além da regeneração de novas raízes e plântulas, o quanto a regenerabilidade foi afetada com a limitação da metade da reserva nutritiva e também a quantidade de regenerações a partir das eliminações realizadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de sementes de *Eugenia* em formar novas plântulas quando as primeiras germinações e plântulas são eliminadas.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o potencial de sementes de *E. candolleana* em diferentes estádios de maturação, em formar novas raízes e plântulas, quando as primeiras plântulas são eliminadas.

Avaliar o potencial de sementes inteiras ou fracionadas de *E. brasiliensis* em formar novas raízes e plântulas quando as primeiras germinações e plântulas são eliminadas.

Avaliar o potencial de sementes de *E. involucrata* em formar novas raízes e plântulas múltipla e sucessivamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

Frutos de três espécies do gênero *Eugenia* (*E. candolleana*, *E. brasiliensis* e *E. involucrata*) foram coletados das matrizes localizadas no Jardim Botânico de São Paulo, SP (23°38'S e 46°37'W), e encaminhados ao Núcleo de Pesquisa em Sementes do Instituto de Botânica para extração das sementes. Os frutos de *E. candolleana*, foram coletados diretamente das matrizes e depois separados em quatro estádios de maturação.

Para os frutos recém-dispersos, que foram coletados diretamente do solo (*E. brasiliensis* e *E. involucrata*), utilizou-se lona plástica (do tipo sombrite) para isolamento do contato do fruto com o solo. O processo de extração das sementes foi realizado manualmente, com auxílio de peneira, retirando-se os resíduos de polpa em água corrente, sendo imediatamente retirado o excesso de água em papel toalha.

3.2 Caracterização dos lotes

As sementes de *E. candolleana* foram separadas em quatro estádios de maturação de acordo com a diferença na coloração do epicarpo dos frutos: no estádio 1, verde; no estádio 2, verde com manchas róseas; no estádio 3, vermelho claro a vermelho escuro; no estádio 4, roxo escuro (figura 1 C). Já as sementes de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* foram separadas e classificadas de acordo com seu tamanho em duas categorias, graúdas e miúdas (figura 1 A e B), segundo o seu maior diâmetro.

As sementes das três espécies foram medidas com auxílio de paquímetro digital e caracterizadas pelo seu maior diâmetro. Em seguida, foram acondicionadas em sacos de polietileno semiperfurados, permanecendo em geladeira a 10°C, até a instalação dos experimentos.

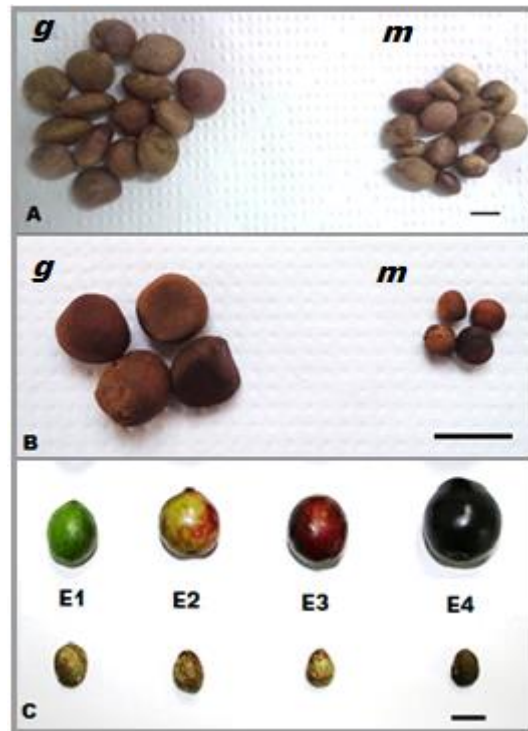


Figura 1: Sementes de *Eugenia brasiliensis* (A) e *E. involucrata* (B), separadas por tamanho, em graúdas (*g*) e miúdas (*m*), e frutos de *E. candolleana* (C), separados em quatro estádios de maturação (E1, E2, E3 e E4), com suas respectivas sementes. Escala: 1 cm.

3.3 Avaliação do teor de água, massa seca e potencial hídrico

O teor de água inicial, expresso em porcentagem, com base na massa de matéria úmida, e a massa seca das sementes (em g/semente) foram determinados segundo o procedimento recomendado pelas Regras Internacionais de Análise de Sementes, utilizando-se o método de estufa com circulação de ar, por 17 horas a 103°C (ISTA, 1996). O potencial de água das sementes foi medido por equipamento WP4 (Decagon, Pullmann, USA) com base na temperatura de ponto de orvalho, e expresso em megapascal (MPa) (Decagon Devices, 2001). Para as avaliações de teor de água, massa seca e potencial hídrico, foram realizados quatro repetições de cinco sementes.

3.4 Testes de germinação

A capacidade germinativa foi avaliada por teste de germinação, conduzido em câmara de germinação com luz branca contínua nas temperaturas constantes de 25°C,

com quatro repetições de vinte sementes para todas as espécies estudadas. As sementes foram acondicionadas em bandejas de plástico, contendo uma camada de dois centímetros de vermiculita como substrato, umedecidas com água de torneira (Brasil, 2009) até o limite de saturação.

A germinação foi considerada a partir da protrusão de 0,5 cm de raiz primária. Também foi registrado o desenvolvimento de plântulas, segundo critérios de Delgado e Barbedo (2007).

Para monitoramento dos eventos individuais nas sementes em cada tratamento, todas as sementes foram marcadas com etiquetas coloridas (Figura 2). Essas avaliações foram realizadas diariamente no primeiro mês e com intervalo de três dias nos nove meses subsequentes, para todas as espécies estudadas.

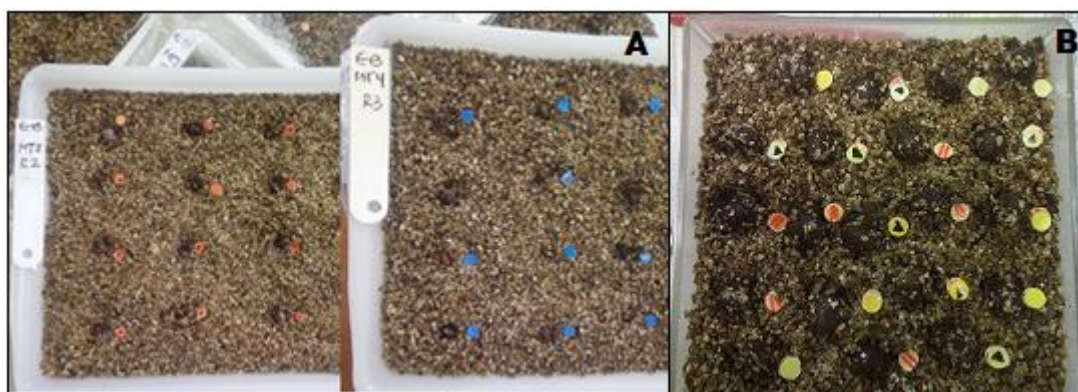


Figura 2: Testes de germinação aplicados às sementes de *Eugenia brasiliensis* (A) e *Eugenia involucrata* (B), demonstrando o esquema de marcação com utilização de etiqueta plástica para cada semente.

3.4.1 Experimento I – Regenerabilidade em diferentes estádios de maturação

Para a realização desse experimento a espécie utilizada foi *Eugenia candolleana*. Os frutos foram coletados diretamente das matrizes e separados de acordo com a coloração do epicarpo, para que posteriormente, as sementes provenientes desses frutos pudessem ser divididas em quatro estádios de maturação.

A extração das sementes foi realizada em água corrente com auxílio de peneira, para a separação das sementes da polpa, sendo imediatamente retirado o excesso de umidade com papel filtro. Para os frutos do primeiro estágio, o despulpamento foi manual com auxílio de bisturi em razão de apresentarem uma polpa mais consistente (Figura 1C).

Após o processo de extração em todos os estádios de maturação, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca e potencial hídrico. Em seguida, foram realizados os tratamentos de regenerabilidade (TR) para os quatro grupos. Assim, os tratamentos de TR compreenderam:

1. Germinação natural (GN) - sementes intactas foram colocadas para germinar em gerbox contendo uma camada de dois centímetros de vermiculita como substrato, umedecida com água, sem qualquer interferência, ou seja, simulando condições naturais;
2. Eliminação do primeiro desenvolvimento (EPD) - sementes intactas foram colocadas para germinar em gerbox contendo uma camada de dois centímetros de vermiculita como substrato, umedecida com água. Esperou-se formar uma plântula, apresentando sistema radicular e eófilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes (Delgado e Barbedo, 2007), que ao atingir cerca de 2 cm de parte aérea (Figura 3A), foi eliminada com auxílio de bisturi, rente à superfície da semente, retirando todo tecido proveniente da plântula (Figura 3B).
3. Eliminação do segundo desenvolvimento (ESD) - o procedimento adotado foi o mesmo de EPD, porém eliminou-se a plântula duas vezes (Figura 4).

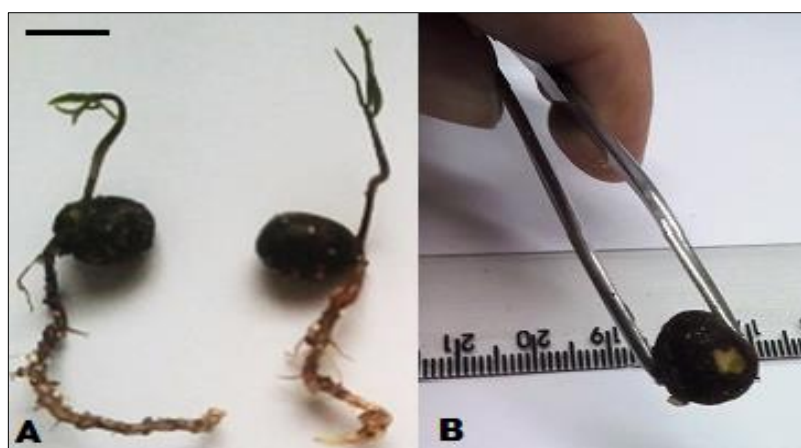


Figura 3: Plântulas de *E. candolleana* com cerca de 2 cm de parte aérea (A); Detalhe da eliminação realizada com auxílio de bisturi rente à superfície da semente (B). Escala: 1cm.

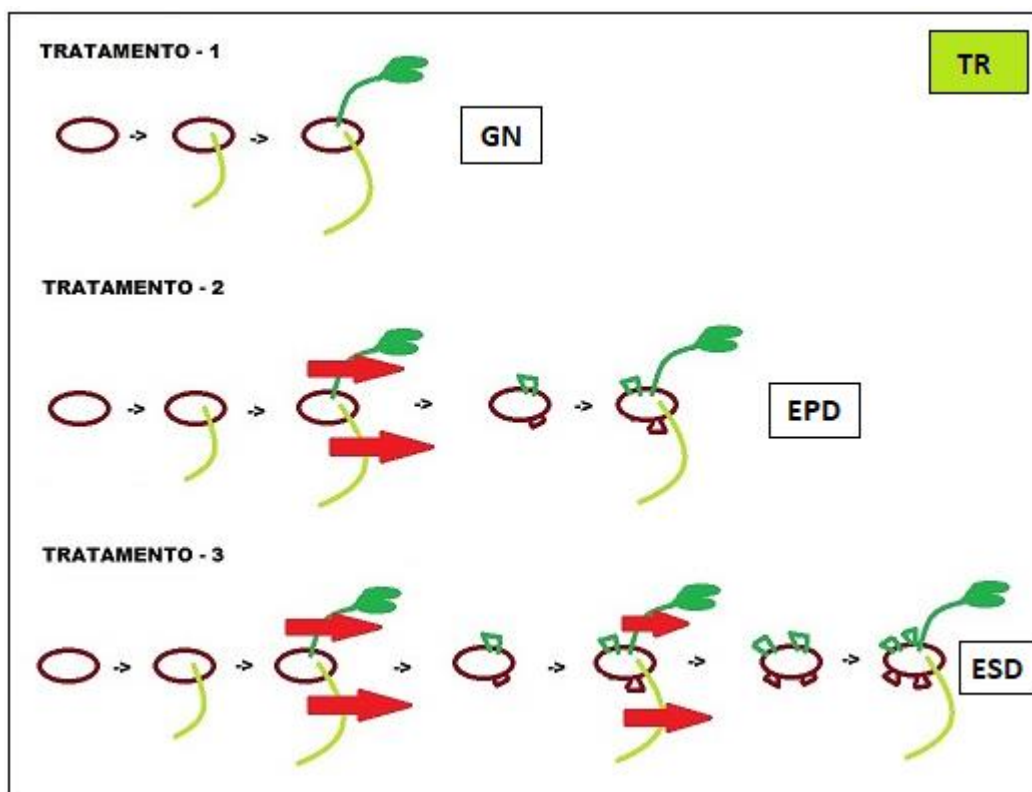


Figura 4: Esquema dos tratamentos de regenerabilidade (TR) em sementes de *Eugenia candolleana*, em que GN= Germinação natural; EPD= Eliminação de primeiro desenvolvimento e ESD= Eliminação de segundo desenvolvimento. As setas vermelhas indicam eliminações.

3.4.2 Experimento II – Regenerabilidade múltipla e sucessiva

Para a realização desse experimento utilizou-se as espécies *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata*. As sementes de ambas as espécies foram divididas em dois grupos e classificadas por tamanho, segundo seu maior diâmetro: *E. brasiliensis* graúdas ($10,4 \pm 0,1$ mm) e miúdas ($7,9 \pm 0,1$ mm) e *E. involucrata* graúdas ($12,7 \pm 0,5$ mm) e miúdas ($6,4 \pm 0,2$ mm).

Para *E. brasiliensis*, foram realizados os tratamentos de regenerabilidade (TR) e também os tratamentos de estímulo à formação de novas plântulas (TE) tanto para graúdas como miúdas. Em TR, foi avaliada a capacidade das sementes em produzir sucessivas germinações e em TE, além da capacidade regenerativa de TR, também foi avaliada a necessidade do estímulo do fracionamento. Dessa forma, os tratamentos de TR compreenderam:

1. Germinação natural (GN) - conforme descrito anteriormente;

2. Eliminação da primeira germinação (EPG) - sementes foram colocadas para germinar e, imediatamente após a raiz primária ter atingido 2 cm, foi removida por corte com bisturi rente à superfície da semente (Figura 5A e B). Posteriormente, as partes remanescentes das sementes retornaram para as bandejas sendo acompanhadas novas germinações, como descritas para GN;
3. Eliminação da segunda germinação de EPG (ESG) - sementes foram colocadas para germinar e, imediatamente após a raiz primária ter atingido 2 cm, foi removida por corte com bisturi. Logo após, as partes restantes das sementes retornaram para as bandejas e, imediatamente após a(s) nova(s) raiz(es) terem atingido 2 cm, também foram removida(s), sendo acompanhadas novas germinações, como descrito para GN;
4. Eliminação do primeiro desenvolvimento (EPD) - conforme descrito anteriormente;
5. Eliminação do segundo desenvolvimento (ESD) - conforme descrito anteriormente (Figura 6). Os tratamentos de TE foram os mesmos de TR, porém quando as sementes retornaram para o substrato para avaliar as novas germinações, foram fracionadas ao meio, horizontalmente de modo que o hilo permanecesse em uma das frações (Figura 7A e B).

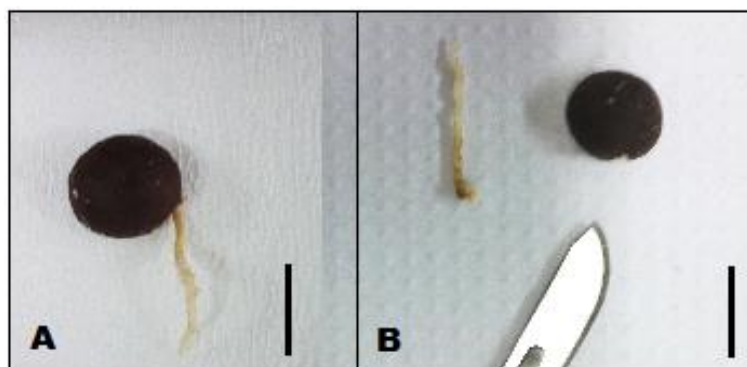


Figura 5: Exemplar de semente de *E. brasiliensis* germinando com cerca de 2 cm de raiz primária (A); Detalhe da eliminação de raiz primária realizada com auxílio de bisturi rente à superfície da semente, retirando todo tecido referente à germinação (B). Escala: 1cm.

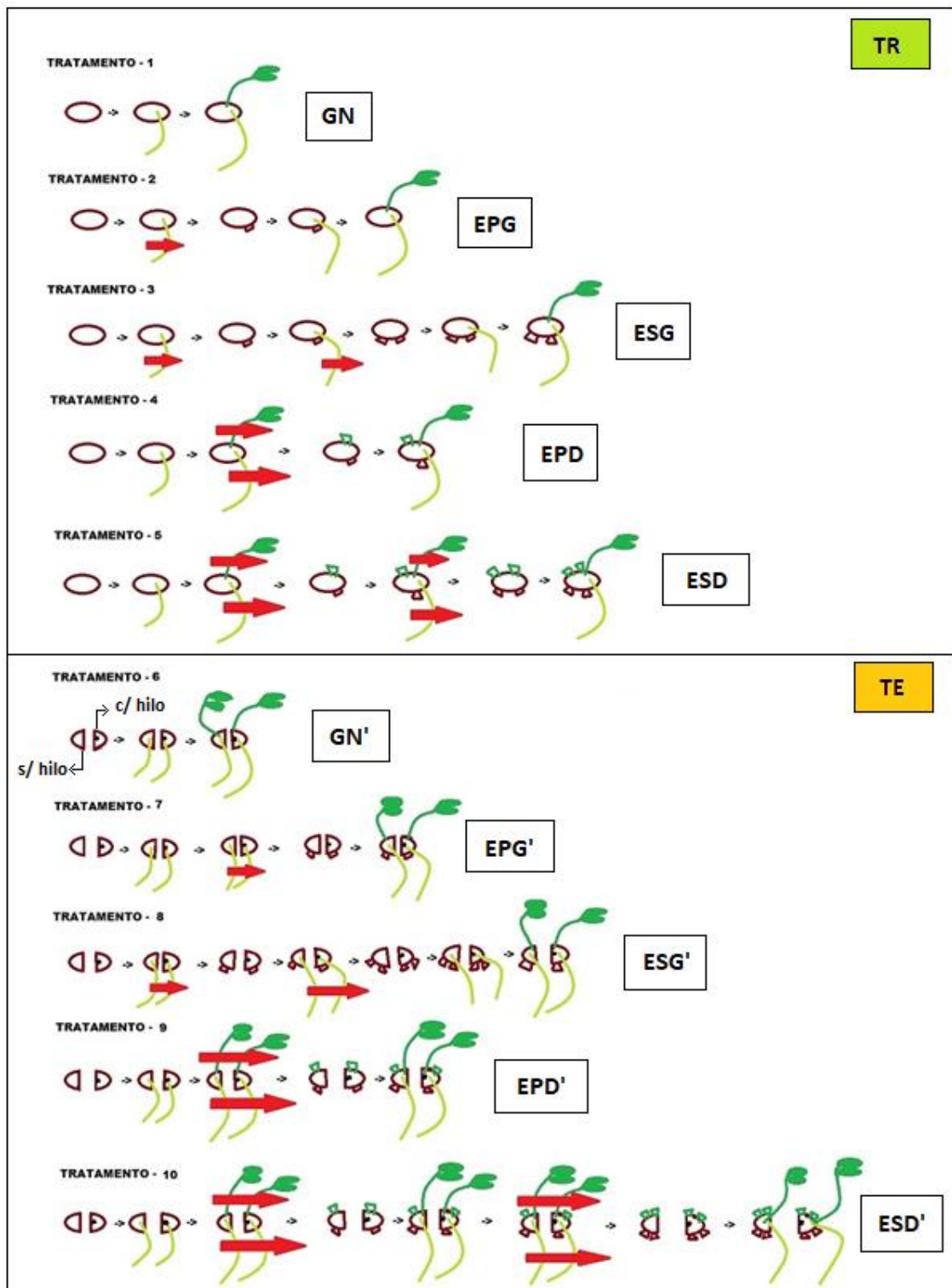


Figura 6: Tratamentos de regenerabilidade (TR) e estímulo (TE) para as sementes de *Eugenia brasiliensis*. TR compreendem: GN= Germinação natural; EPG= Eliminação de primeira germinação; ESG= Eliminação de segunda germinação; EPD= Eliminação de primeiro desenvolvimento; ESD= Eliminação de segundo desenvolvimento e TE compreendem os mesmos que em TR, porém as sementes foram fracionadas ('). As setas vermelhas indicam eliminações.

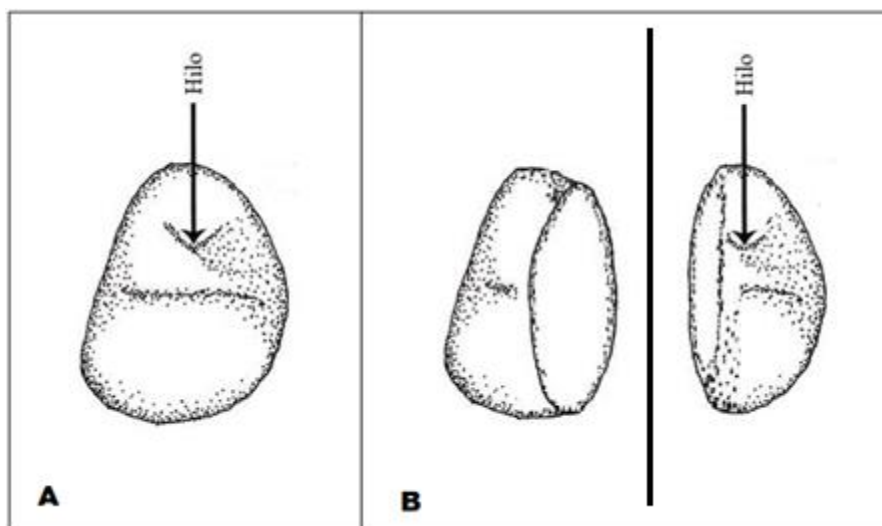


Figura 7: Representação esquemática dos tratamentos de estímulo nas sementes de *E.brasiliensis*. (A) semente evidenciando o hilo e (B) corte horizontal, com a fração à direita que continha o hilo. (Ilustração: Débora M. Molizane, adaptado e modificado de Teixeira, 2014).

Para *Eugenia involucrata*, foram realizados apenas os tratamentos de regenerabilidade (TR), sem o estímulo proporcionado pela lesão do fracionamento. Porém, neste experimento, os tratamentos de regenerabilidade estenderam-se até as terceiras eliminações de raízes e plântulas, para sementes graúdas e miúdas. Assim, os tratamentos deste ensaio compreenderam:

1. Germinação natural (GN) - conforme descrito anteriormente;
2. Eliminação da primeira germinação (EPG) – conforme descrito anteriormente;
3. Eliminação da segunda germinação de EPG (ESG) – sementes foram colocadas para germinar e, imediatamente após a raiz primária ter atingido 2 cm, foi removida por corte com bisturi. Logo após, as sementes retornaram para o gerbox e, imediatamente após a(s) nova(s) raiz(es) ter(em) atingido 2 cm, também fôr(am) removida(s), sendo acompanhadas novas germinações, até a formação de uma nova plântula;
4. Eliminação da terceira germinação de ESG (ETG) – sementes foram colocadas para germinar e, imediatamente após a raiz primária e a raiz secundária ter atingido 2 cm, foram removidas por corte com bisturi. Logo após, as sementes retornaram para o gerbox e, imediatamente após a(s) nova(s) raiz(es) terem atingido 2 cm, também for(am) removida(s), sendo acompanhadas novas germinações, até a formação de uma nova plântula;

5. Eliminação do primeiro desenvolvimento (EPD) – conforme descrito anteriormente;
6. Eliminação do segundo desenvolvimento (ESD) – conforme descrito anteriormente;
7. Eliminação do terceiro desenvolvimento (ETD) – o procedimento adotado foi o mesmo de ETG, porém eliminou-se a plântula normal (com cerca de 2 cm de parte aérea) ao invés da raiz terciária (Figura 8).

Neste experimento, foram avaliados o comprimento da parte aérea (cm) de novas plântulas e o número de folhas provenientes das sementes graúdas e miúdas de *E. involucrata*, dos tratamentos EPG, ESG e ETG, aos 3 e 10 meses, ou seja, no início e no final do experimento, com 4 repetições de 10 plântulas.

Para os dois experimentos foram realizados também a contagem de tempo (em dias) de regenerações das novas raízes e também do desenvolvimento de plântulas mediante o tipo de eliminações.

O cálculo da regenerabilidade de plântulas foi baseado em quantas sementes foram capazes de regenerar novas raízes e não sobre o total de sementes que foram colocadas para germinar inicialmente. Sendo assim,

$$\% R = \frac{NPR}{NRR}$$

onde,

% R = porcentagem de regeneração;

NPR= número de plântulas regeneradas;

NRR= número de raízes regeneradas.

Desta maneira, a porcentagem de plântulas que regeneraram é decorrente das raízes regeneradas.

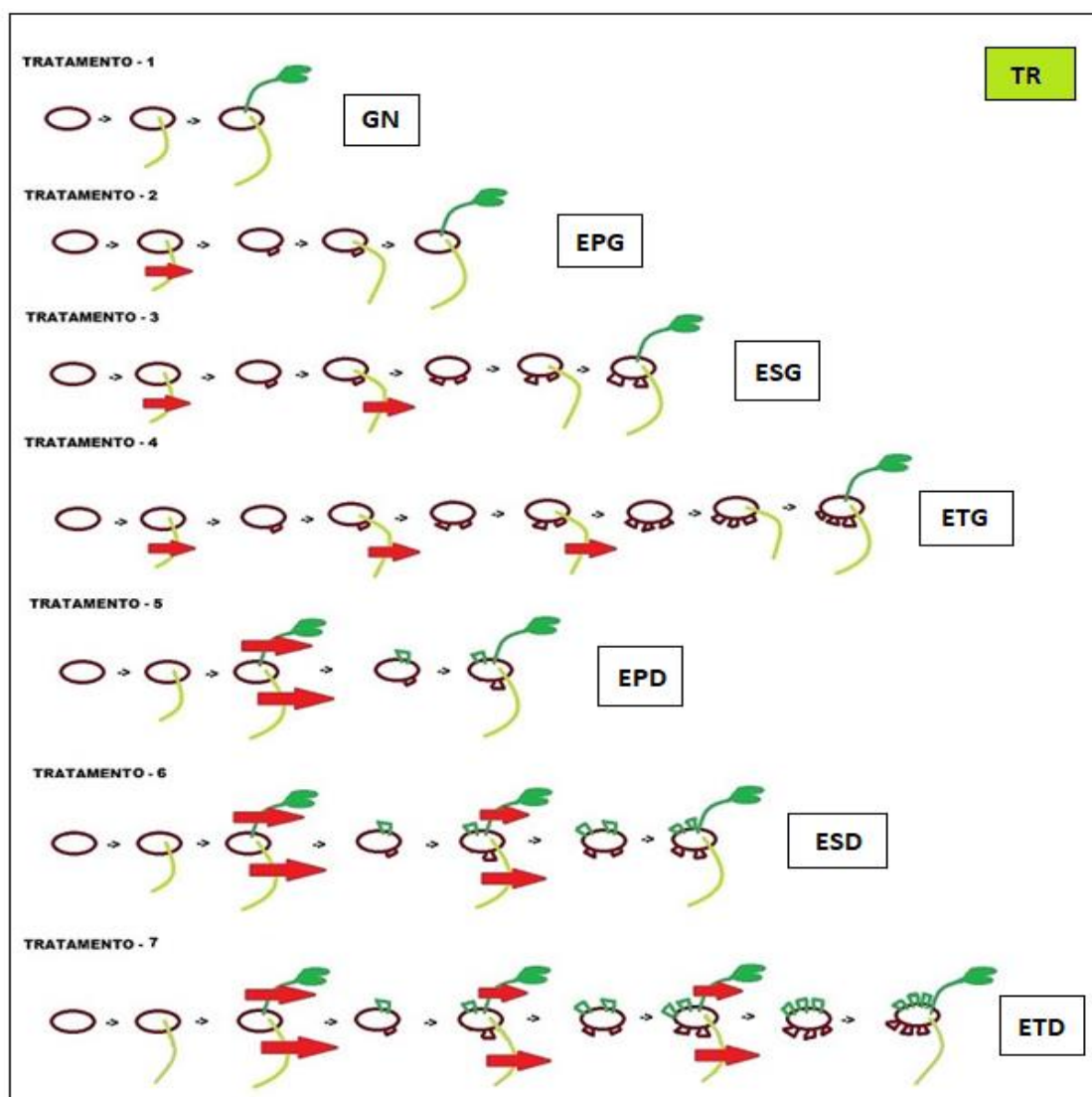


Figura 8: Tratamentos de regenerabilidade (TR) em sementes de *Eugenia involucrata*. GN= Germinação natural; EPG= Eliminação de primeira germinação; ESG= Eliminação de segunda germinação; ETG= Eliminação de terceira germinação; EPD= Eliminação de primeiro desenvolvimento; ESD= Eliminação de segundo desenvolvimento; ETD= Eliminação de terceiro desenvolvimento. As setas vermelhas indicam eliminações.

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental para todos os experimentos foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 4 x 3 (idades x eliminações) para *E. candolleana*, 2 x 5 x 2 (tamanho x eliminações x corte), para *E. brasiliensis* e 2 x 7 (corte x eliminações) para *E. involucrata*. Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F, 5%) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% (Santana e Ranal, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I – Regenerabilidade em diferentes estádios de maturação

Os dados de caracterização dos lotes das sementes de *Eugenia candolleana* mostraram que as sementes de todos os estádios possuem valores de tamanho, umidade e potencial hídrico semelhantes, com variação apenas na matéria fresca e seca (tabela 1). Os teores de água de todos os estádios de maturação apresentaram-se altos, característica típica de sementes recalcitrantes (Barbedo *et al.*, 1998 a; Barbedo *et al.*, 1998 b; Maluf *et al.*, 2003). As sementes recalcitrantes possuem comportamento diferente de sementes ortodoxas, que apresentam sistemas eficientes para adquirir tolerância à dessecação, permitindo sua secagem e conservação por períodos prolongados mesmo em condições naturais. Sementes recalcitrantes são consideradas intolerantes à perda de água. Por esta razão, apresentam seu metabolismo acelerado, quando dispersas. Assim, desenvolveram outras estratégias como a formação de bancos de plântulas ou a rápida e frequente colonização de novas áreas (Teixeira, 2009).

Tabela 1. Diâmetro das sementes (DS, mm), teor de água (TA, %), potencial hídrico (PH, MPa), massa fresca (MF, g/semente) e massa seca (MS, g/semente), de sementes de *E. candolleana* de acordo com o estágio de maturação dos frutos.

	Estádios de maturação			
	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4
DS	12 ($\pm$ 0,2) a	11,2 ($\pm$ 0,3) a	12,7 ($\pm$ 0,4) a	11,9 ($\pm$ 0,5) a
TA	57,0 ($\pm$ 1,4) a	54,0 ($\pm$ 0,5) a	55,0 ($\pm$ 1,4) a	56,5 ($\pm$ 1,8) a
PH	-1,41 ($\pm$ 0,28) a	-1,52 ($\pm$ 0,09) a	-1,38 ($\pm$ 0,14) a	-1,86 ($\pm$ 0,29) a
MF	1,724 ($\pm$ 0,122) c	2,320 ($\pm$ 0,185) b	2,256 ($\pm$ 0,200) bc	3,238 ($\pm$ 0,186) a
MS	0,736 ($\pm$ 0,047) c	1,064 ($\pm$ 0,079) b	1,010 ($\pm$ 0,083) bc	1,409 ($\pm$ 0,126) a

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

Ao observar os dados de massa seca, houve maior acúmulo no estágio 4 (1,409 g.semente⁻¹). Neste mesmo estágio, ocorreu também aumento da massa fresca de 1,724g.semente⁻¹ (estádio 1) a 3,238 g.semente⁻¹ (estádio 4), indicando que as sementes estão em processo de maturação, mesmo sem alterações no teor de água. Este

comportamento foi também observado em sementes *E. pyriformis* (Lamarca *et al.*, 2013), indicando a possibilidade de que, mesmo em estádios imaturos, as características fisiológicas das sementes estão completamente desenvolvidas logo cedo, de forma dessincronizada à maturação dos frutos.

A coloração dos frutos é um parâmetro eficaz para a identificação do ponto de maturidade fisiológica para sementes de algumas espécies de *Eugenia* (Ávila *et al.*, 2009; Oro *et al.*, 2012), mas não para outras, como observou Prata Vieira (2005), que sugeriu que a forma de identificar o ponto de maturidade fisiológica não deve levar em consideração apenas a coloração dos frutos. Entretanto, Barbedo *et al.* (2013) e Marcos Filho (2015) consideram que o máximo acúmulo de massa seca, o baixo teor de água e a elevada capacidade germinativa, frequentemente utilizados para identificar a maturidade em sementes ortodoxas, não apresentam a mesma eficiência para sementes recalcitrantes, uma vez que no período final de maturação os teores de água são elevados e não há um ponto definido para o término dessa fase de maturação correspondente ao início da germinação.

Em relação à germinação, houve interação significativa entre estádios de maturação e tipos de eliminações de novas raízes (figura 9). Porém, não houve interação entre esses fatores para porcentagem de desenvolvimento de plântulas (figura 10).

Os estádios imaturos demonstraram menor regenerabilidade que os estádios maduros, tanto para germinação quanto para formação de plântulas. A germinação prévia (controle) foi alta em todos os estádios (100%). Ao eliminar o primeiro desenvolvimento (EPD), a germinação de novas raízes ocorreu em todos os estádios (40% no estágio 1; 83% no estágio 2; 100% no estágio 3 e 100% estágio 4, figura 9). Ao eliminar o segundo desenvolvimento (ESD), apenas os estádios 2, 3 e 4 de maturação apresentaram germinação ou emissão de novas raízes (80% no estágio 2; 58% no estágio 3 e 33% no estágio 4). De fato, embora estádios mais imaturos de sementes de *Eugenia* já tenham a capacidade de regenerar raízes e partes aéreas, sua eficiência no processo é menor do que a verificada em sementes mais maduras (Teixeira e Barbedo, 2012).

A capacidade de regeneração de novas raízes após eliminação da primeira plântula, em sementes de *E. candolleana*, pode estar relacionada à grande quantidade de reservas das sementes, que permite que sejam predadas e, ainda assim, continuem capazes de germinar (Teixeira, 2009). Essa estratégia pode ser compreendida, também, sob o ponto de vista ecológico, como forma alternativa à secagem, observado para a

maioria das sementes ortodoxas, permitindo que a espécie se perpetue no ambiente por meio de sucessivas germinações a partir da mesma semente (Teixeira e Barbedo, 2012).

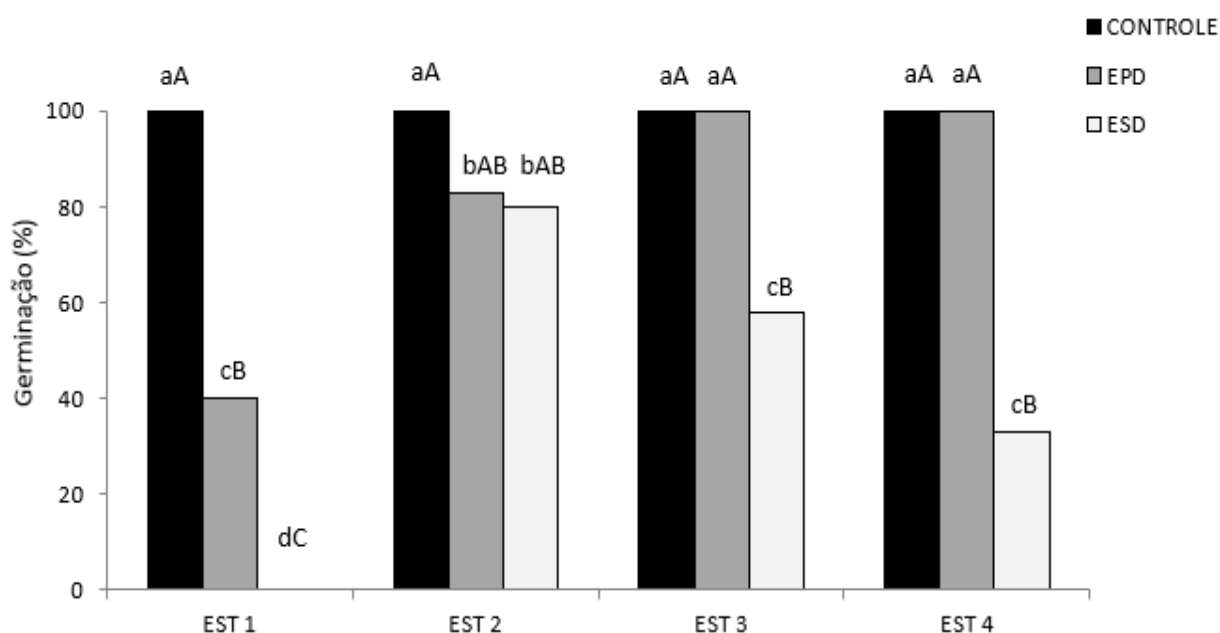


Figura 9. Porcentagem de germinação de sementes de *E. candolleana* em diferentes estádios de maturação submetidas à eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD) e sem eliminações (CONTROLE). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparando os diferentes estádios de maturação e maiúsculas comparando os diferentes tipos de eliminações) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O desenvolvimento de plântulas, em sementes que foram submetidas aos tratamentos EPD, ocorreu em todos os estádios (100%), porém quando se eliminou o segundo desenvolvimento (ESD), os valores decresceram nos estádios 3 e 4 (29% e 25%) e não ocorreu nos estádios 1 e 2 (figura 10). Resultados similares foram encontrados por Delgado (2010) e Teixeira e Barbedo (2012), em que sementes imaturas também apresentaram menor porcentagem de germinação e produção de plântulas que sementes maduras, demonstrando que o estágio de maturação pode afetar esta característica.

Ao comparar os dados de germinação e desenvolvimento de plântulas (figuras 9 e 10), foi possível observar que a porcentagem de desenvolvimento apresenta-se mais elevada em relação à germinação de novas raízes. Isto ocorreu porque o cálculo da porcentagem de produção de plântulas foi realizado de acordo com a quantidade de

sementes que regeneraram raízes e não baseado na quantidade de sementes que foram semeadas inicialmente antes dos tratamentos.

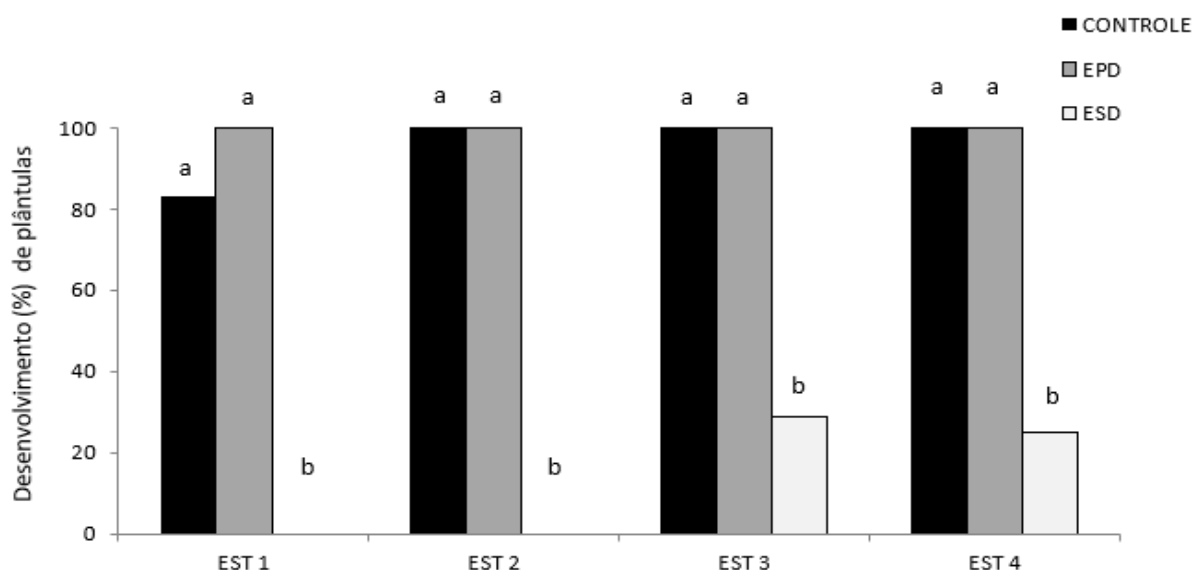


Figura 10. Porcentagem de desenvolvimento de plântulas em sementes de *E. candolleana* em diferentes estádios de maturação, submetidas à eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD) e sem eliminações (CONTROLE). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O estudo de maturação em sementes de *Eugenia* é de grande relevância para compreender o comportamento das espécies perante a regeneração de novas estruturas. Em vista disso, os resultados deste experimento mostraram que as sementes de *Eugenia candolleana* possuem alta capacidade de germinar sucessivas vezes e produzir plântulas, independente de EPD ou ESD. Contudo, a eficiência do processo depende do estágio de maturação da semente. Isso pode ter relação com adaptações da espécie contra a predação, bem como pode ser considerada uma estratégia ecológica como meio de propagação dessas sementes (Teixeira, 2009; Delgado, 2010).

É importante ressaltar que, na ocorrência de fatores ambientais como chuvas torrenciais, vendavais, eventuais quedas de frutos imaturos ou mesmo predação, há possibilidade da semente germinar e se tornar uma plântula e se, ainda assim, essa plântula for consumida por um predador, ela germinará novamente, não havendo perda na produção e aumentando as chances de perpetuar a espécie (Delgado, 2010).

O tempo médio de germinação pode variar, de acordo com as características de cada espécie e das condições ambientais (Borghetti e Ferreira, 2004). Nas sementes de

E. candolleana o tempo de regeneração de novas raízes e plântulas aumentou de acordo com o tipo de eliminação (figura 11). Os tratamentos ESD nos estádios finais de maturação (estádios 3 e 4) foram os que demandaram maiores períodos para regenerar, tanto em relação às novas raízes quanto às novas plântulas. Conforme aumentou a quantidade de eliminações nas sementes, espaçou também o tempo para as sementes regenerarem novas raízes e plântulas.

Todos os processos envolvidos na desdiferenciação de tecidos parenquimáticos (Batygina e Vinogradova, 2007), exigem tempo (cerca de 30 a 37 dias para sementes de *E. candolleana* formarem novas raízes e plântulas, quando submetidas ao tratamento ESD) e a cada vez que ocorre uma lesão às estruturas da semente ou a ela mesma, a quantidade de dias para regenerar também pode aumentar (figura 11) (Delgado, 2010; Mendes e Mendonça, 2012). Nos processos relacionados à germinação, todo o metabolismo da semente que estaria direcionado a sua permanência no ambiente, foi interrompido pela lesão e a mesma necessitou passar por eventos de desdiferenciação das células dos tecidos perivasculares que se encontram na região apical dos cotilédones, para produzir novos embriões e iniciar uma nova germinação (Delgado, 2010).

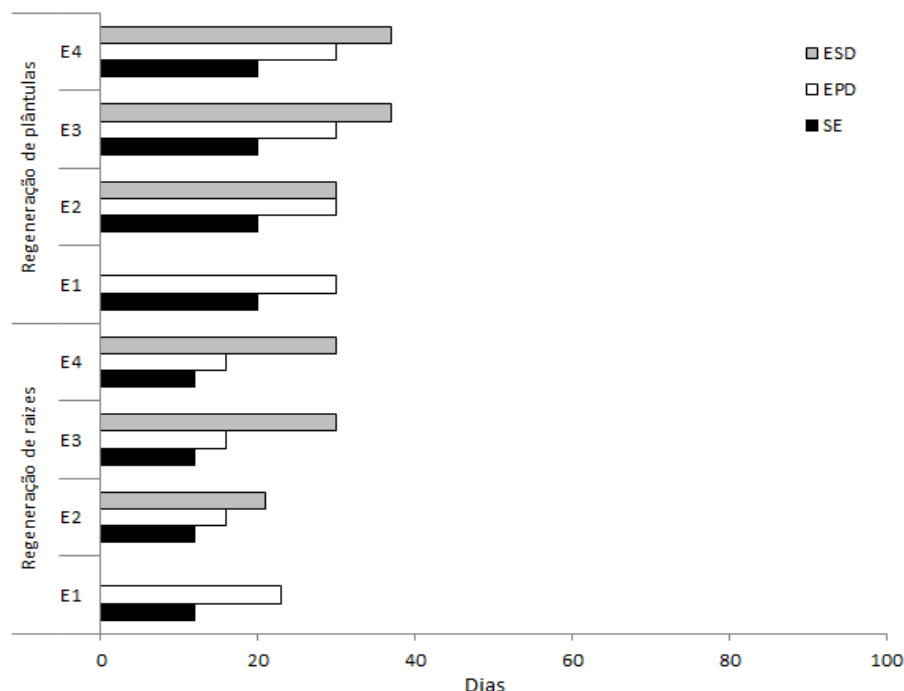


Figura 11. Tempo (dias) de regeneração de novas raízes e plântulas provenientes de sementes de *E. candolleana* em quatro estádios de maturação (E1, E2, E3 e E4), submetidas a eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (EPD) e sem eliminações (SE).

Pode-se considerar, também, que esses processos de eliminações e regenerações subsequentes proporcionam à semente maior período de permanência no meio. A ampliação de tempo pode estar relacionada à estratégia de propagação dessas espécies, investindo mais energia nas sementes com qualidades que favoreçam o estabelecimento e a sobrevivência das plântulas, do que aquelas com qualidades favoráveis a sua dispersão como, por exemplo, sementes tolerantes a dessecação (Teixeira e Barbedo, 2012).

A capacidade de regeneração das sementes do gênero *Eugenia* foi previamente relatada por Anjos e Ferraz (1999). Outras espécies do mesmo gênero já tiveram a capacidade de regeneração testada após sofrerem fracionamentos em diversas direções, como por exemplo, *E. pyriformis* (Silva *et al.*, 2003; Amador e Barbedo, 2011), *E. involucrata*, *E. uniflora*, *E. brasiliensis* (Silva *et al.* 2005), *E. cerasiflora*, *E. pyriformis*, *E. brasiliensis* (Teixeira, 2009), *E. cerasiflora*, *E. umbeliflora*, *E. pruinosa* (Delgado *et al.*, 2010), e *E. stipitata* (Mendes e Mendonça 2012; Calvi, 2015).

Entretanto, a possibilidade de utilizar a capacidade de regeneração para produzir mais de uma germinação na mesma semente, havia sido testada em sementes de *Eugenia* apenas por Calvi *et al.* (2017), em *E. stipitata* var. *sororia*, que obtiveram uma segunda germinação após o corte da plântula. Se o processo de germinação começar e em seguida cessar com a perda da raiz principal, a semente iniciará um novo processo de germinação, com reservas internas suficientes para o desenvolvimento de uma nova planta (Delgado *et al.*, 2010). Tais evidências sugerem que este comportamento, considerado um evento raro na natureza, pode ser comum às espécies do gênero.

É importante a compreensão dos fatores associados à regeneração de novas plântulas, como por exemplo, a morfologia e anatomia do embrião de *Eugenia* (Justo *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2010). Apesar da existência de poliembrionia em espécies de Myrtaceae (Landrum e Kawasaki, 1997), os embriões de *Eugenia* têm sido descritos como monoembriônicos, se apresentam como estruturas globosas, em que a diferenciação entre cotilédone e eixo hipocótilo-radícula é visível apenas microscopicamente (Gurgel e Soubihe Sobrinho, 1951; Salomão e Allem, 2001; Justo *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2010).

Em decorrência da morfologia dessas sementes, talvez seja necessário algum tipo de fracionamento, indicando que lesões podem iniciar algum processo de indução da formação de novas raízes e plântulas. As sementes que são fracionadas podem gerar plântulas, mas raramente mais de uma nova formação em cada fragmento, sugerindo

algum autocontrole na formação de várias plântulas (Delgado *et al.*, 2011; Amador e Barbedo, 2011; Amador, 2015). É provável que exista uma relação entre o fracionamento e as formas de predação em sementes do gênero *Eugenia*.

4.2 Experimento II – Regenerabilidade múltipla e sucessiva

As sementes de *Eugenia* são extremamente predadas por insetos (Ribeiro, 2004; Silva e Pinheiro, 2009; Masetto *et al.*, 2009; Teixeira, 2009; Rodrigues, 2013) e também atraem pássaros e outros animais (Maluf *et al.*, 2003). Por esta razão, neste experimento, utilizou-se o fracionamento como forma de simulação de herbivoria, para verificar se o mesmo foi capaz de induzir a regeneração de novas raízes e desenvolvimento de plântulas, em sementes com apenas a metade da reserva nutritiva. Para este experimento, as espécies utilizadas foram *E. brasiliensis*, e *E. involucrata* dividindo os lotes em dois grupos, em sementes graúdas e miúdas.

Com relação à caracterização dos lotes de *E. brasiliensis* (tabela 2), os dados indicaram que as sementes graúdas apresentaram massa fresca e massa seca maiores que miúdas. Porém, os valores para os teores de água, foram superiores em sementes miúdas (50%) do que em sementes graúdas (47,5%) e o potencial hídrico em sementes miúdas demonstrou-se mais negativo (-1,76 MPa) do que em sementes graúdas que (-1,23 MPa).

Tabela 2. Diâmetro das sementes (DS), teor de água (TA), potencial hídrico (PH), massa fresca (MF) e massa seca (MS), de sementes de *E. brasiliensis* de acordo com a separação em tamanho, graúdas e miúdas.

Característica avaliada	Tamanho das sementes	
	Graúdas	Miúdas
DS (mm)	10,4 ($\pm 0,1$)	7,9 ($\pm 0,1$)
TA (%)	47,5 ($\pm 0,8$)	50 ($\pm 0,2$)
PH (-MPa)	- 1,23 ($\pm 0,50$)	- 1,76 ($\pm 0,45$)
MF (g.semente ⁻¹)	0,414 ($\pm 0,038$)	0,164 ($\pm 0,013$)
MS (g.semente ⁻¹)	0,217 ($\pm 0,020$)	0,082 ($\pm 0,007$)

Na figura 12, pode-se observar a germinação de sementes graúdas e miúdas de *E. brasiliensis* que foram submetidas ao fracionamento e posteriormente aos tratamentos EPG, ESG, EPD e ESD, sendo que, sementes fracionadas permaneceram

apenas com metade da semente (representados por EPG', ESG', EPD' e ESD' na figura 6). Os dados mostram que, de maneira geral, a emissão de novas raízes ocorreu para a maioria dos tratamentos.

Não houve interação significativa entre os três fatores (tamanho, tipos de eliminações e fracionamento), para as variáveis regeneração de novas raízes (figura 12) e desenvolvimento de novas plântulas (figura 13). Sementes miúdas regeneraram ligeiramente melhor que graúdas, mas as inteiras regeneraram bem melhor que fracionadas (figura 12). Em estudos anteriores, em *E. pyrifomis*, curiosamente sementes maiores regeneraram melhor (Lamarca *et al.*, 2013; Prativiera *et al.*, 2015), demonstrando que essa característica deve ser melhor estudada. Marcos-Filho (2015) sugere que as sementes miúdas podem não ter completado a maturação, tendo recebido quantidade significativamente menor de reservas. Porém, no presente trabalho isso não deve ter ocorrido.

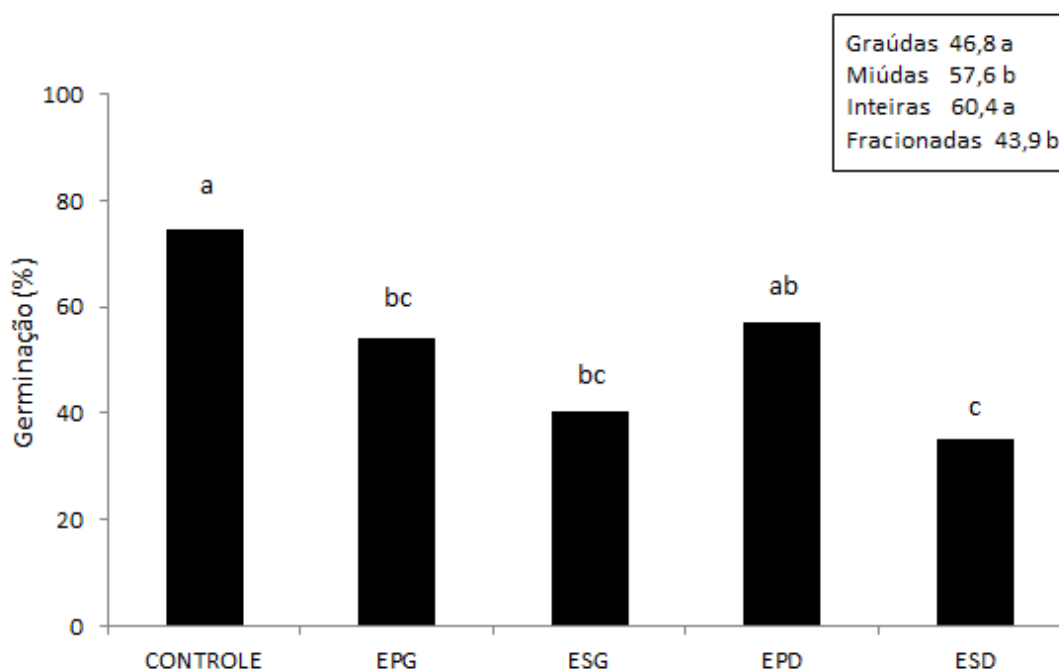


Figura 12. Médias de porcentagem de germinação de sementes de *E. brasiliensis*, graúdas e miúdas, inteiras e fracionadas submetidas à eliminação de primeira e segunda germinação (EPG e ESG), eliminação de primeiro e segundo desenvolvimento (EPD e ESD) e sem eliminações (controle). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Para o desenvolvimento de plântulas (figura 13), também não houve interação para quaisquer dos fatores. O tamanho não influenciou na regenerabilidade e as sementes miúdas e graúdas foram semelhantes. Diferenças foram observadas com

relação ao fracionamento, em que sementes inteiras apresentaram maiores médias que fracionadas. Independente da interação dos fatores, a regeneração de novas raízes e plântulas acontece.

Os valores de porcentagem de desenvolvimento de plântulas em *E. brasiliensis* chegaram a ser maiores que os de germinação (figura 13), porque o cálculo da formação de plântulas foi baseado na quantidade de raízes que regeneraram, e não na quantidade de sementes que foram semeadas inicialmente, como realizado também para *E. candolleana* no primeiro experimento.

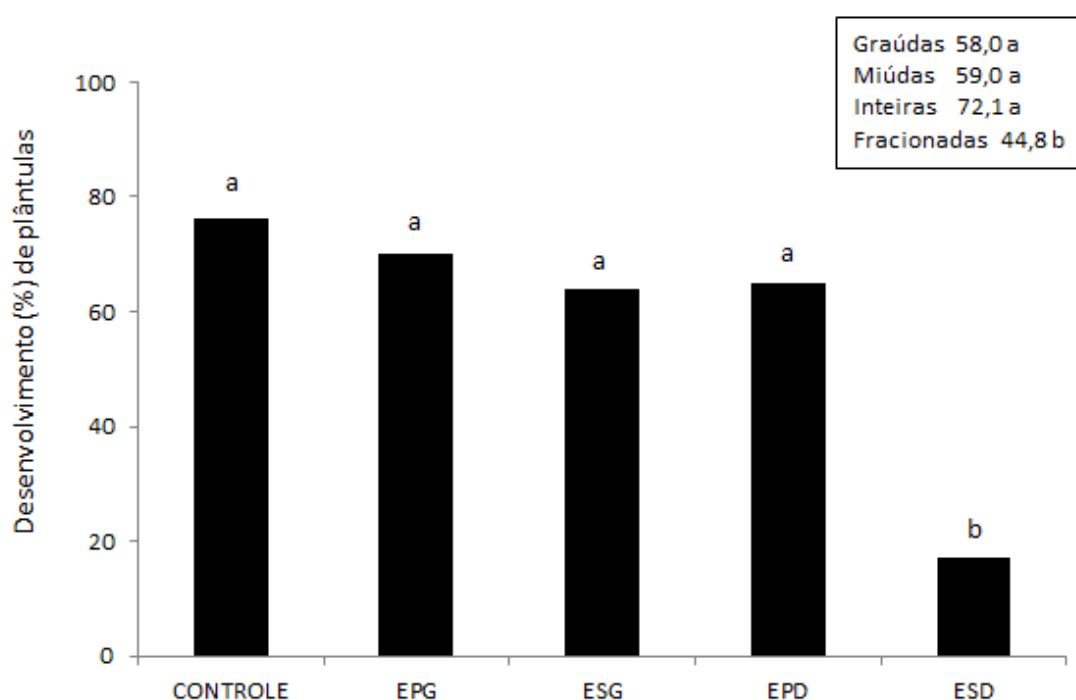


Figura 13. Médias de porcentagem de desenvolvimento de plântulas em sementes de *E. brasiliensis*, graúdas e miúdas, inteiras e fracionadas submetidas à eliminação de primeira e segunda germinação (EPG e ESG), eliminação de primeiro e segundo desenvolvimento (EPD e ESD) e sem eliminações (controle). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

As sementes miúdas e graúdas de *E. brasiliensis*, tanto inteiras quanto fracionadas, tiveram redução na capacidade de produzir plântulas, principalmente quando submetidas ao tratamento ESD. Isto deve ter ocorrido devido à redução de reservas das sementes, comprometendo o estabelecimento da plântula (Teixeira, 2009).

Segundo Castro *et al.*, (2004), a plântula se desenvolve a partir de carboidratos, proteínas e lipídios. Uma semente fracionada em duas partes, com redução em sua fonte

de energia e de nutrição para a plântula pela metade, poderia ser comparada a uma semente pequena que, segundo Carvalho e Nakagawa (2012), pode apresentar menor vigor e desenvolvimento de plântula. Foi possível observar, neste estudo, que sementes de *E. brasiliensis* com apenas metade da sua reserva foram capazes de regenerar novas raízes e produzir plântulas (Silva *et al.*, 2003; Teixeira, 2009), quando essas primeiras raízes e plântulas foram eliminadas. É provável que a capacidade regenerativa em sementes fracionadas de *Eugenia* tenha se manifestado através de uma pressão de seleção natural influenciada pela predação (Teixeira, 2009), em que as células parenquimáticas subepidérmicas se desdiferenciam e formaram uma faixa meristemática, demonstrando uma regeneração rápida dos tecidos fracionados como forma de resistência ao ataque de predadores (Delgado 2010).

Em estudo com sementes de *E. stipitata*, Anjos e Ferraz (1999) sugerem que as frações opostas ao hilo são fragmentos de sementes que não apresentam a região meristemática, por esta razão as avaliações realizadas no presente trabalho foram apenas com a metade da semente que apresentava o hilo, pois a presença do hilo é considerada importante por ser o local de emergência da plântula para diversas espécies de *Eugenia* (Silva *et al.*, 2005) e onde ocorre a diferenciação dos meristemas apicais radicular e caulinar (Mendes e Mendonça, 2012).

Neste trabalho, as frações opostas das sementes de *E. brasiliensis* não foram descartadas e também apresentaram regeneração de novas raízes e desenvolvimento de plântulas, embora de forma não tão expressiva quanto à metade da semente que possuía o hilo.

É importante ressaltar que o evento de partição ou fracionamento espontâneo (natural) de sementes também ocorre na natureza. Ao observar matrizes de *E. cerasiflora*, em constatação de campo, foi possível perceber que há intensa predação por aves (não identificada) em seus frutos. Analisando visualmente esses frutos, pôde-se verificar que as aves tentavam se alimentar da larva presente dentro dele, inserida dentro da semente, pois a polpa do fruto não apresentou nenhuma avaria em decorrência de bicadas.

As aves cortam a semente ao meio e a mesma é dispersa no ambiente, na forma fracionada (figura 14A). Foi realizado um teste de germinação (figura 14B, C) com essas sementes e suas frações, que eram dispersas já fracionadas, com o intuito de comprovar a regenerabilidade de raízes e plântulas. Após avaliação do teste de

germinação foi possível verificar que esses eventos também acontecem de forma natural e as duas frações partidas regeneram raízes e formaram plântulas (figura 14D).

Portanto, em uma condição de herbivoria em que um possível ataque (larvas de insetos) aconteça, eliminando grande parte das reservas da semente (predação), e que suas primeiras germinações e primeiros desenvolvimentos sejam eliminados, ainda assim as sementes demonstram capacidade para regenerar novas estruturas, como observado em trabalhos anteriores (Silva *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; Teixeira, 2009; Delgado, 2010).

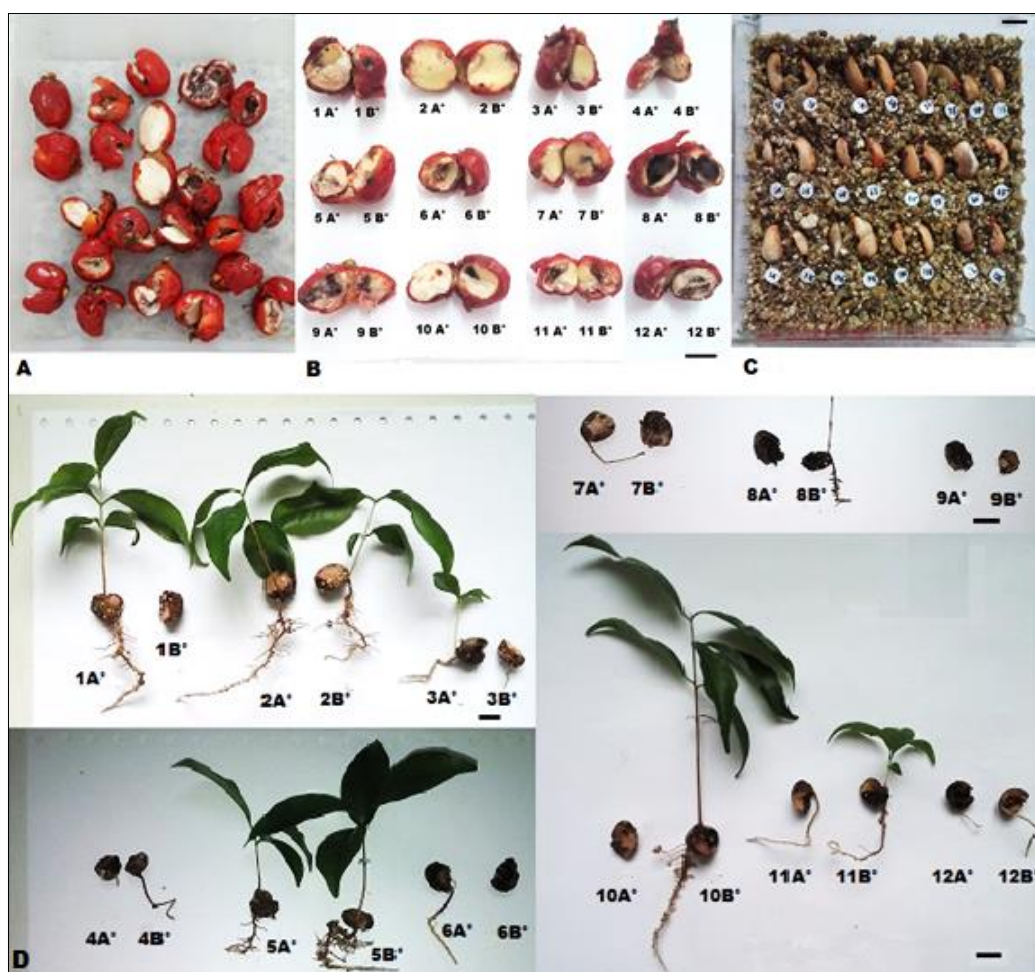


Figura 14. Foram coletados frutos de *E. cerasiflora* predados naturalmente (A), realizou-se a identificação desses frutos e das respectivas frações (B), para acompanhamento de teste de germinação (C). Após, obteve-se exemplares de plântulas e frações de sementes de *E. cerasiflora* (D), sugerindo que o fracionamento em sementes ocorre também de forma natural.

Sendo assim, fica evidente que existe uma dependência do fracionamento para que esses tecidos presentes nas sementes se desenvolvam, corroborando com as pesquisas de Amador e Barbedo (2011) que indicam que lesões em sementes podem

promover processos de indução da formação de novas raízes e plântulas ou bloquear a autoinibição dessas formações em sementes.

Para os resultados da contagem de tempo das regenerações das novas raízes e plântulas em sementes de *E. brasiliensis*, pode-se observar que os dados seguiram a mesma tendência que em *E. candolleana*, em que as sementes que passaram pelos tratamentos EPG, ESG e EPD regeneraram entre 11 e 21 dias, diferente do controle que foi entre 4 e 6 dias, as sementes inteiras que foram submetidas a ESD, regeneraram entre 37 e 41 dias, assim, o tempo vai espaçando na medida em que aumentaram as eliminações, porém em sementes fracionadas, não apresentaram regenerações de raízes (figura 15).

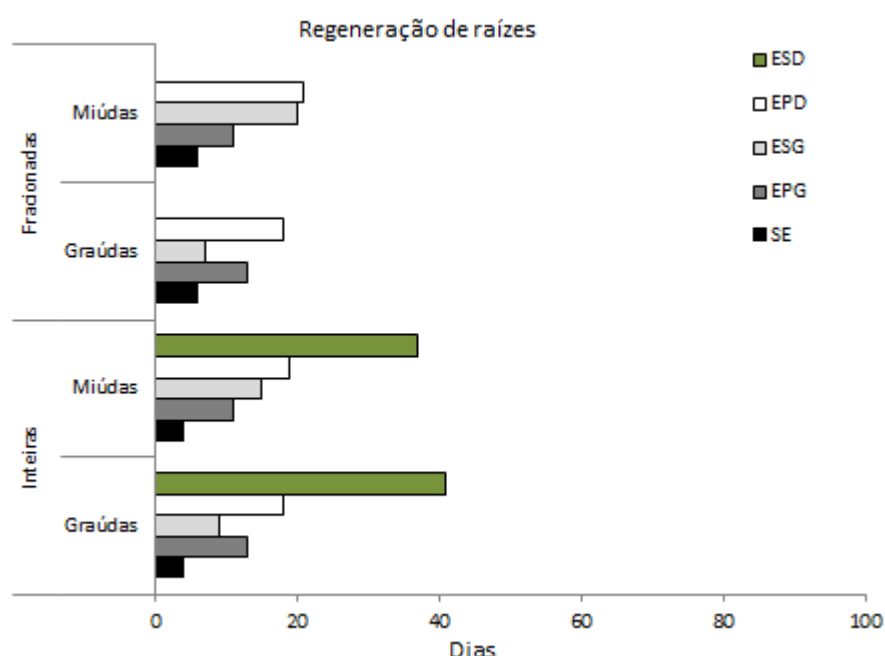


Figura 15. Tempo (dias) de regeneração de novas raízes provenientes de sementes graúdas e miúdas de *E. brasiliensis*, inteiras e fracionadas, submetidas a eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD) e sem eliminações (SE).

O tempo para produção de novas plântulas (figura 16) aumentou em comparação ao tempo para formação de novas raízes (figura 15). Em EPG e ESG, a nova regeneração de plântulas foi entre 20 e 63 dias, diferente do tratamento controle que foi entre 15 e 22 dias. As sementes inteiras que foram submetidas à EPD e ESD entre 15 e 22 dias. As sementes inteiras que foram submetidas à EPD e ESD

regeneraram entre e 47 a 77 dias. Já as sementes fracionadas do tratamento ESD, não apresentaram formação de plântulas, tanto para graúdas como para miúdas.

Estes dados reforçam as pesquisas de Delgado (2010), sugerindo que o tempo de regeneração de novas raízes e plântulas deve estar relacionado aos processos de desdiferenciação de células dos tecidos parenquimáticos presentes nos cotilédones, responsáveis pela produção de novos embriões. Conferindo, desta forma, a permanência da semente por um longo período no meio ambiente, mantendo-se viáveis (Teixeira e Barbedo, 2012).

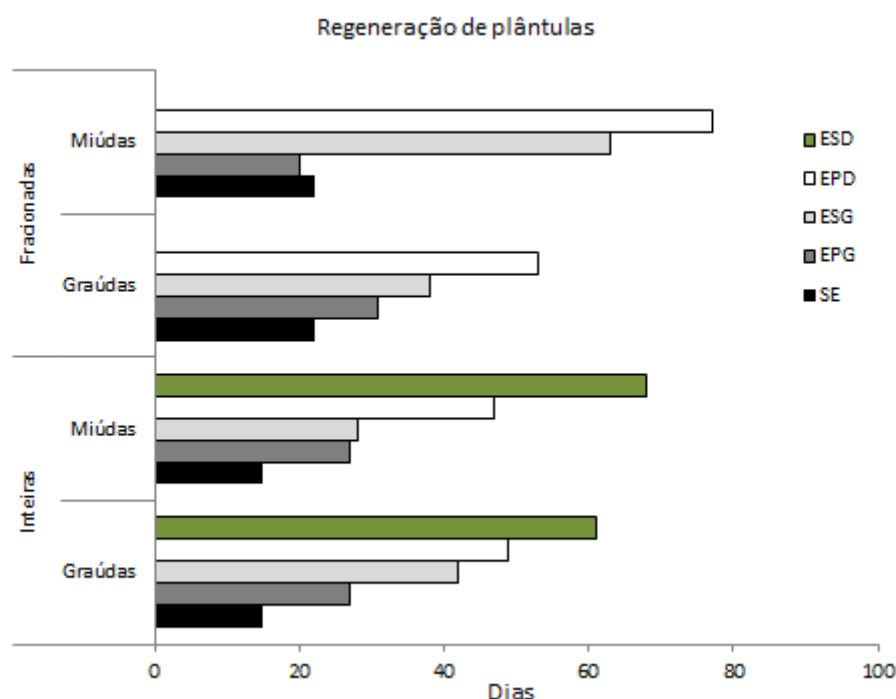


Figura 16. Tempo (dias) de regeneração de novas plântulas provenientes de sementes graúdas e miúdas de *E. brasiliensis*, inteiras e fracionadas, submetidas a eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD) e sem eliminações (SE).

Sementes de *E. involucrata* graúdas apresentaram massa fresca e massa seca maiores que miúdas (tabela 3). Os teores de água também apresentaram diferenças em ambas às categorias, as sementes graúdas com 56% e as sementes miúdas com 69%. Porém, neste caso, a capacidade de regeneração de novas raízes, decaiu em sementes miúdas, quando comparada com as graúdas (figura 17).

Cabe ressaltar que, em ambos os experimentos em que se avaliou a regenerabilidade associada ao tamanho das sementes em *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, ocorreu variação no tamanho das sementes miúdas de uma espécie para outra. As sementes miúdas de *E. brasiliensis* possuíam dimensões mais elevadas que as sementes miúdas de *E. involucrata* (tabelas 2 e 3), fato que resultou na maior capacidade regenerativa dessas sementes em comparação com as sementes miúdas de *E. involucrata*.

Talvez a maior quantidade de massa nutricional tenha favorecido sementes miúdas de *E. brasiliensis*, apresentando assim, valores mais elevados de regeneração de raízes que as sementes miúdas de *E. involucrata* (figuras 12 e 17).

Tabela 3. Diâmetro das sementes (DS), teor de água (TA), potencial hídrico (PH), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de sementes de *E. involucrata* de acordo com a separação em tamanho, graúdas e miúdas.

Característica avaliada	Tamanho das sementes	
	Graúdas	Miúdas
DS (mm)	12,7 ($\pm$ 0,5)	6,4 ($\pm$ 0,2)
TA (%)	56 ($\pm$ 0,3)	69 ($\pm$ 0,0)
PH (-MPa)	- 0,46 ($\pm$ 0,06)	- 0,86 ($\pm$ 0,17)
MF (g.semente ⁻¹)	1,315 ($\pm$ 0,071)	0,145 ($\pm$ 0,009)
MS (g.semente ⁻¹)	0,579 ($\pm$ 0,031)	0,045 ($\pm$ 0,003)

Para porcentagem de germinação e de desenvolvimento houve interação entre os fatores tamanho das sementes e tipos de eliminações. Os dados para emissão de novas raízes em sementes graúdas de *E. involucrata*, que foram submetidas aos tratamentos EPG, ESG e ETG, foram superiores a 90%. E quando submetidas à EPD, ESD e ETD, a germinação nos três tratamentos também foi elevada, acima de 80% (figura 17).

Em sementes miúdas a regeneração de novas raízes também ocorreu, porém mais baixa (44% em EPG, 42% em ESG e 64% em ETG) em comparação com as sementes graúdas. Nos tratamentos EPD e ESD, ocorreu produção de novas raízes em porcentagem menor (12% em EPD e 25% em ESD) quando comparada com sementes graúdas (98% em EPD e 85% em ESD). Entretanto, quando se eliminou o terceiro desenvolvimento (ETD), as sementes miúdas não produziram novas raízes (figura 17).

Os dados indicam que, de maneira geral, a regeneração pode ser possível para germinação de novas raízes, mesmo sendo eliminadas sucessivas vezes tanto para sementes graúdas como miúdas. Estes eventos podem estar associados às sementes de maior tamanho poder armazenar maior quantidade de substâncias de reserva durante a fase de desenvolvimento, o que proporcionará embriões mais desenvolvidos, aumentando a probabilidade de sucesso no estabelecimento da plântula (Delgado, 2010).

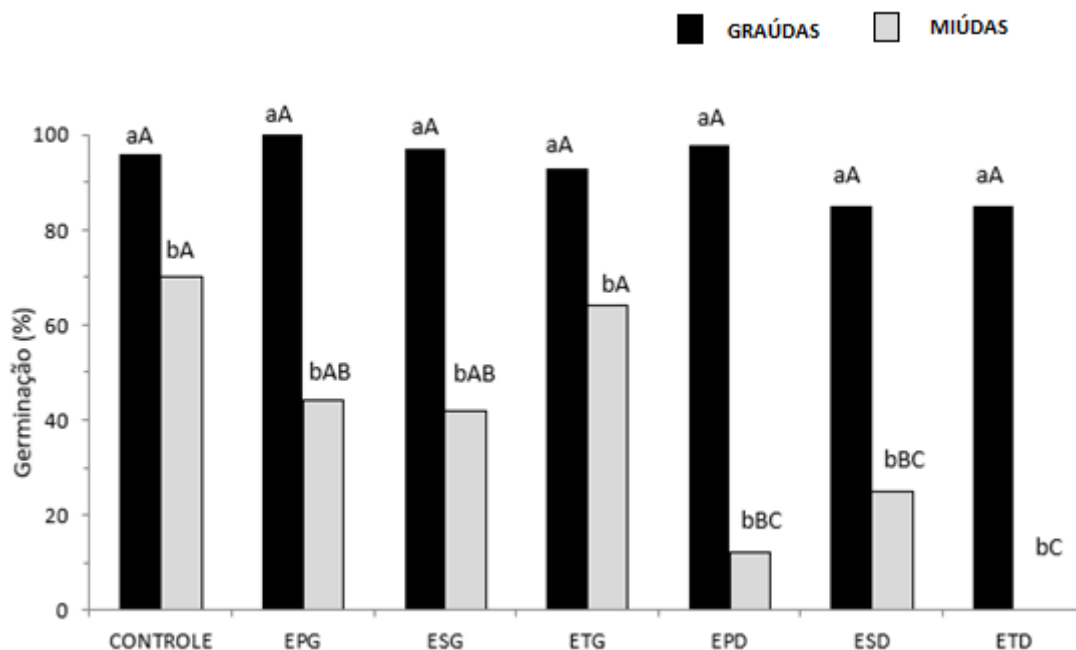


Figura 17. Porcentagem de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* de diferentes tamanhos (graúdas nas colunas em preto, miúdas em cinza) submetidas à eliminação de primeira, segunda e terceira germinação (EPG, ESG e ETG) e eliminação de primeiro, segundo e terceiro desenvolvimento (EPD, ESD e ETD). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparando graúdas com miúdas e maiúsculas comparando os diferentes tipos de eliminações) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No que se refere ao desenvolvimento de plântulas, pôde-se verificar que a produção de plântulas foi maior, principalmente quando se elimina as raízes, em sementes graúdas (acima de 90%) que em sementes miúdas (acima de 35%) (figura 18).

Os tratamentos EPG, ESG e ETG, em sementes graúdas, demonstraram elevada capacidade regenerativa na produção de novas plântulas (98%, 94% e 92%, respectivamente). O mesmo foi observado quando essas sementes foram submetidas aos

tratamentos EPD, ESD e ETD em que obtiveram 93%, 82% e 71%, demonstrando altos níveis de regenerabilidade.

No caso das sementes miúdas, ficou evidenciada a formação de novas plântulas (42% em EPG, 60% em ESG e 35% em ETG), porém quando se eliminou os desenvolvimentos, apenas para o tratamento EPD obteve formação de plântulas (12%). Não houve formação de novas plântulas para os tratamentos ESD e ETD em sementes miúdas.

Como dito anteriormente, a plântula se desenvolve a partir de carboidratos, proteínas e lipídios (Castro *et al.*, 2004), sendo assim, a quantidade de reserva nutricional em sementes miúdas é bem menor do que em sementes graúdas o que pode promover menor vigor e desenvolvimento de plântula (Carvalho e Nakagawa, 2012); talvez por essa razão, as sementes miúdas dos tratamentos ESD e ETD, não formaram novas plântulas.

Não deve ser descartada a possibilidade de que as sementes miúdas tenham consumido grande parte de suas reservas para manutenção e estabelecimento das plântulas que emitiram, não sendo capazes de produzir novas plântulas após as eliminações. Neste caso, a possibilidade do crescimento de plântulas pode estar correlacionada com o tamanho da semente e quantidade de reservas (White e Gonzalés, 1990).

Sementes graúdas foram capazes de regenerar até a quarta raiz e plântula, indicando que a quantidade e qualidade das reservas nas sementes podem afetar diretamente o desenvolvimento de uma plântula (Melo *et al.*, 2004). Sendo assim, é provável que as sementes graúdas de *E. involucrata*, pudessem ainda produzir germinações e plântulas, submetidas a mais eliminações, pois as sementes graúdas, ao final do experimento, apresentavam-se firmes e vigorosas, diferente das miúdas que estavam vazias (ocas), apenas com o tegumento no substrato.

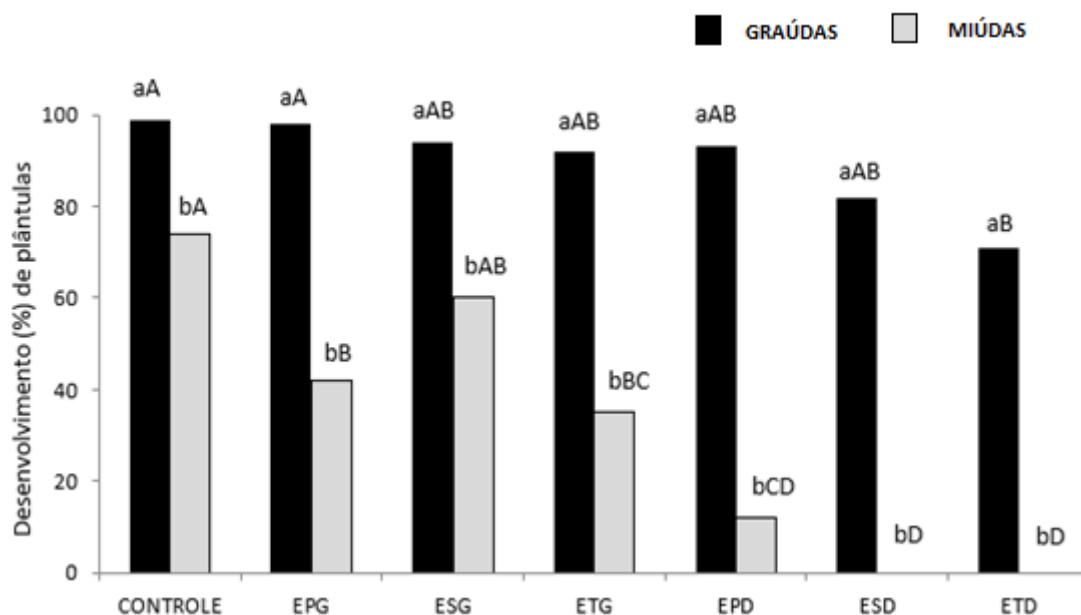


Figura 18. Porcentagem de desenvolvimento de plântulas em sementes de *Eugenia involucrata* de diferentes tamanhos (graúdas nas colunas em preto, miúdas em cinza) submetidas à eliminação de primeira, segunda e terceira germinação (EPG, ESG e ETG) e eliminação de primeiro, segundo e terceiro desenvolvimento (EPD, ESD e ETD). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparando graúdas com miúdas e maiúsculas comparando os diferentes tipos de eliminações) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tais resultados sugerem que as sementes graúdas, por terem a quantidade de massa maior que as miúdas, possuem também quantidade de reserva nutricional maior (Teixeira, 2009) e a regenerabilidade pode estar diretamente relacionada com quantidade e a disponibilidade das reservas nas sementes.

Os valores de porcentagem de desenvolvimento de plântulas (figura 18) em *E. involucrata* também apresentaram valores elevados quando comparados com os valores de germinação (figura 17). Isso aconteceu, porque o cálculo da formação de plântulas foi baseado na quantidade de raízes que regeneraram, e não na quantidade de sementes que foram semeadas inicialmente, como realizado também para *E. candolleana* e *E. brasiliensis* nos experimentos anteriores.

Referente à medição do comprimento de parte aérea e número de folhas em plântulas de *E. involucrata* (tabela 4), foi possível observar diferenças entre sementes graúdas e miúdas submetidas aos tratamentos EPG, ESG e ETG, em que graúdas apresentaram os valores mais elevados tanto em comprimento quanto em número de folhas. Este fato também foi observado em estudos anteriores (Klein *et al.*, 2007;

Vendramin *et al.*, 2013) em que as sementes grandes de pitanga formaram plântulas com maior massa seca que as sementes pequenas e que, as sementes pequenas geraram plântulas de menor massa.

Estes dados corroboram com pesquisas anteriores (Aguilar *et al.*, 1982; Frazão *et al.*, 1983; Aguiar *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2006) que designam que sementes menores apresentam germinação menor do que sementes de tamanhos maiores e que uma plântula proveniente de uma semente pequena tem seu desenvolvimento mais lento do que uma proveniente de uma semente grande. Assim, o tamanho da semente parece influir principalmente sobre o peso da plântula resultante, uma vez que as sementes grandes são aquelas que dispõem de maior quantidade de substâncias de reserva para o desenvolvimento do eixo embrionário (Carleton e Cooper, 1972).

Tabela 4. Medidas de comprimento da parte aérea e contagem do número de folhas em plântulas de *E. involucrata*, graúdas (G) e miúdas (M), que foram submetidas aos tratamentos de eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de terceira germinação (ETG) e sem eliminações (Controle) por 3 meses (iniciais) e 10 meses (finais).

	<i>Comprimento de parte aérea (cm)</i>							
	Controle		EPG		ESG		ETG	
	G	M	G	M	G	M	G	M
Comprimento Inicial	6,2 a	2,6 b	5,6 a	0,5 b	3,6 a	0 b	0 b	0 b
Comprimento Final	8,9 a	2,5 b	7,5 a	0,4 b	7 a	0,4 b	6,6 b	0,3 b
	<i>Número de folhas</i>							
	Controle		EPG		ESG		ETG	
	G	M	G	M	G	M	G	M
Nº Folhas Inicial	9,2 a	5,8 b	7,7 a	0,8 b	4,8 a	0 b	0 b	0 b
Nº Folhas Final	8,2 a	3,6 b	7,1 a	0,2 b	8 a	0,5 b	7,5 a	0,5 b

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

Na contagem de tempo das regenerações das novas raízes e plântulas em sementes de *E. involucrata*, foi possível verificar que ocorre um aumento de dias para regeneração de acordo com a eliminação, fato também observado para *E. candolleana* e *E. brasiliensis*. As sementes graúdas submetidas aos tratamentos EPG, ESG e ETG regeneraram entre 10 e 17 dias, as miúdas entre 17 e 28 dias, diferente do controle, que em 7 dias, já apresentou emissão de raízes (figura 19). Porém ao eliminar o desenvolvimento (EPD, ESD e ETD) o

tempo se estendeu entre 15 a 31 dias para sementes graúdas. As sementes miúdas não apresentaram regeneração de raízes nos tratamentos ESD e ETD.

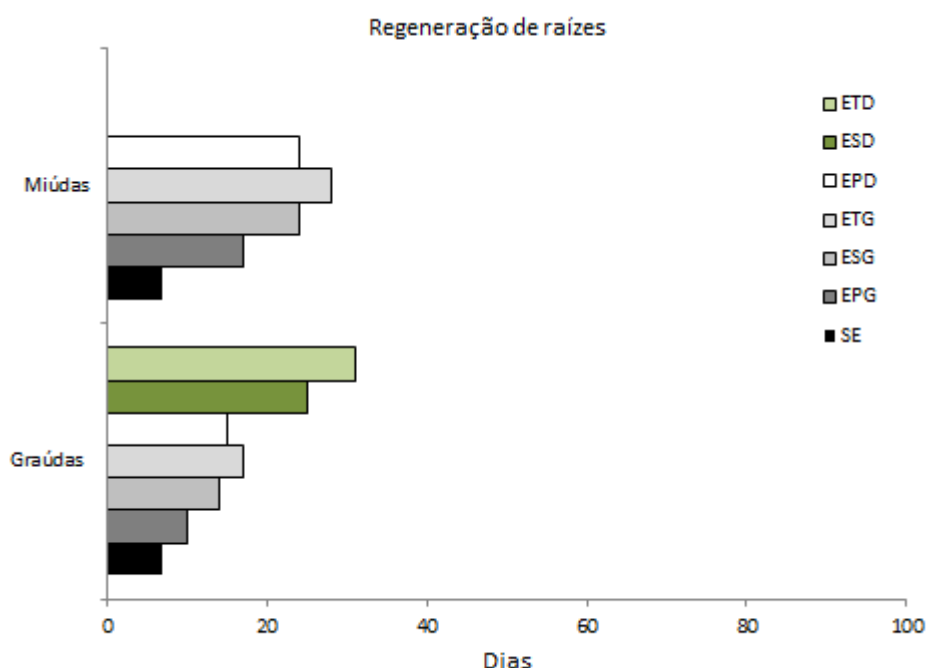


Figura 19. Tempo (dias) de regeneração de novas raízes provenientes de sementes graúdas e miúdas de *E. involucrata*, submetidas a eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de terceira germinação (ETG), eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD), eliminação de terceiro desenvolvimento (ETD), e sem eliminações (SE).

Para a produção de novas plântulas (figura 20), o tempo também aumentou em comparação ao tempo para formação de novas raízes (figura 19). Em EPG, ESG e ETG a regeneração de plântulas foi entre 21 e 49 dias em sementes graúdas e entre 41 e 77 dias para miúdas, diferente do tratamento controle que em 10 dias produziu plântulas. Quando se eliminou o desenvolvimento (EPD, ESD e ETD) o tempo de regeneração de novas plântulas foi entre 35 e 84 dias em sementes graúdas. As sementes miúdas também não apresentaram regeneração de plântulas nos tratamentos ESD e ETD.

Outras espécies de *Eugenia* também apresentaram variações no tempo para a germinação, como *E. pyriformis*, de 66 dias (Neves, 2011) e *E. dysenterica*, de 103 dias (Silva, 1999; Souza *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2006), porém nenhuma das espécies tiveram as raízes ou plântulas eliminadas. Estes dados indicam que o tempo de

regeneração de novas raízes e plântulas pode estar associado aos processos de desdiferenciação de células dos tecidos parenquimáticos presentes nos cotilédones, responsáveis pela produção de novos embriões, como elucidado por Delgado (2010).

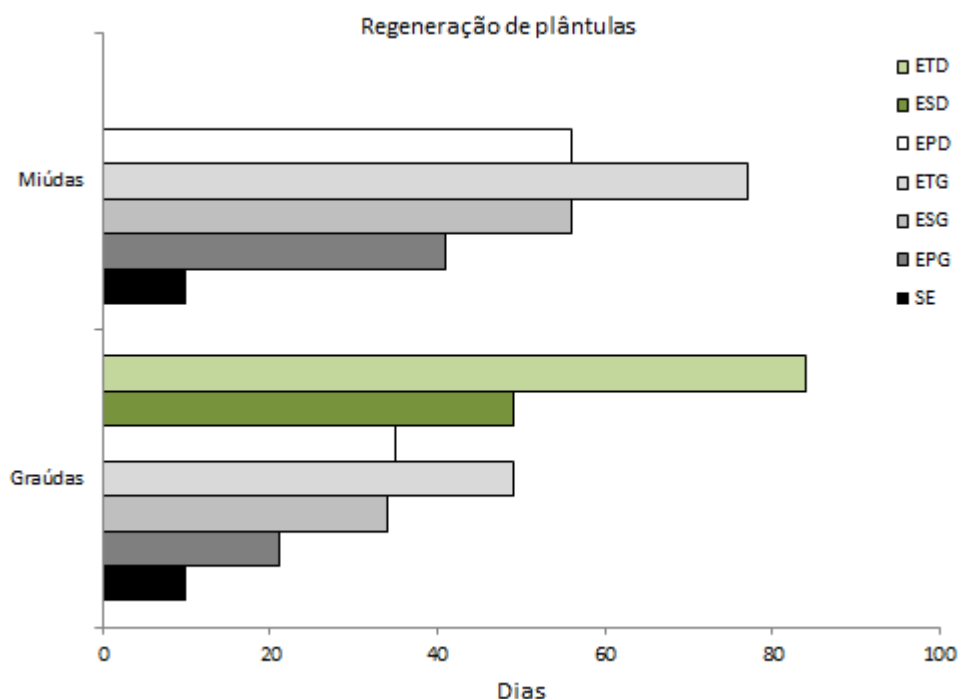


Figura 20. Tempo (dias) de regeneração de novas plântulas provenientes de sementes graúdas e miúdas de *E. involucrata*, submetidas a eliminação de primeira germinação (EPG), eliminação de segunda germinação (ESG), eliminação de terceira germinação (ETG), eliminação de primeiro desenvolvimento (EPD), eliminação de segundo desenvolvimento (ESD), eliminação de terceiro desenvolvimento (ETD), e sem eliminações (SE).

Além disso, os experimentos realizados para as três espécies de *Eugenia* duraram em média 11 meses, para cada espécie. Desta maneira, sementes com pouca durabilidade, em decorrência a intolerância a dessecação, permaneceram em condições favoráveis durante quase um ano, produzindo germinações sucessivas e permanecendo viáveis, preservando sua longevidade, mantendo o potencial germinativo, sendo possível conservá-las sem que apresentem perda de viabilidade (Cardoso, 2004; Teixeira e Barbedo, 2012).

O período no qual as sementes permanecem viáveis varia dentro de uma mesma espécie, devido a diferenças no genótipo, além da dependência por fatores de

armazenamento (Hong e Ellis, 1996; Barbedo *et al.*, 2013). Entretanto, para Berjak e Pammenter (2008) as principais maneiras de manter o vigor e a viabilidade de sementes recalcitrantes é mantê-las em condições que evitem perda de água, temperatura mais baixa, bem como tratamentos que evitem a infestação ou minimizem a microflora associada a sementes (Munaro, 2017). A partir dos resultados obtidos neste trabalho pôde-se observar que houve regeneração de novas raízes e plântulas em todos os experimentos realizados com as três espécies de sementes de *Eugenia* estudadas. Estes dados corroboram com os estudos anteriormente realizados, respondendo a hipótese deste estudo e evidenciando que essas espécies podem ter desenvolvido essa estratégia de regeneração como forma de propagação da espécie no ambiente, alternativa a tolerância à dessecação e também como proteção contra a herbivoria.

Pôde-se, também, estabelecer a compreensão dos processos tecnológicos das sementes recalcitrantes, contribuindo com o conhecimento das relações ecológicas e práticas do potencial regenerativo de sementes do gênero *Eugenia*, uma vez que as mesmas possam regenerar sucessivas vezes depois de terem suas raízes e partes aéreas extraídas.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que as sementes de *E. candolleana*, *E. brasiliensis* e *E. involucrata* apresentaram capacidade em formar novas plântulas quando as primeiras germinações e plântulas são eliminadas, reforçando ideias de trabalhos anteriores quanto à ampla capacidade regenerativa das sementes do gênero *Eugenia*. Ainda que se variem espécie, grau de maturação, tamanho de sementes, tipo de fracionamento, e quantidade de eliminações, com maior ou menor intensidade sempre se observou a regeneração de novas raízes, inclusive com formação de plântulas normais. Portanto, é possível concluir que a regeneração se apresenta como importante estratégia de perpetuação da espécie, propagando-se à revelia da predação das sementes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, I. B.; Nakane J. T.; Neme, A. M. 1982.** Tamanho de sementes de *Eucalyptus citriodora* Hook: influência sobre o desenvolvimento de mudas. Boletim Técnico do Instituto Florestal, 36 (1): 19-28.
- Aguiar, F. F. A.; Kanashiro, S.; Barbedo, C. J.; Semaco, M. 1996.** Influência do tamanho sobre a germinação de sementes de *Caesapinia echinata* Lam. (pau-brasil). Revista Brasileira de Sementes, 18 (2): 283-285.
- Alvarenga, E. M.; Silva, R. F.; Araújo, E. F.; Leiro, L. S. 1991.** Maturação fisiológica de sementes de abóbora italiana. Revista Brasileira de Sementes, v.13, p.147-150.
- Amador, T. S.; Barbedo, C. J. 2011.** Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de *Eugenia pyriformis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 46, p. 814-821.
- Amador, T. S. 2015.** Estudos fitoquímicos e fisiológicos dos processos de indução e inibição da regeneração de plântulas se sementes de *Eugenia*. Tese de doutorado do Instituto de Biociências da UNESP. Botucatu - SP. 117p.
- Amador, T. S.; Barbedo, C. J. 2015.** Germination inhibits the growth of new roots and seedlings in *Eugenia unifora* and *Eugenia brasiliensis*. Journal of Seed Science, v.37, n.3, p. 241-247.
- Andrade, R. N. B.; Ferreira, A. G. 2000.** Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) - Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes 22(2): 118-125.
- Andrade, A. C. S.; Cunha, R.; Souza, A. F.; Reis, R. B.; Almeida, K. L., 2003.** Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. Seed Science and Technology, v.31, p.125-137.
- Anjos, A. M. G.; Ferraz, I. D. K. 1999.** Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Acta Amazonica, Manaus, v.29, n.3, p.337-348.
- Áquila, M. E. A.; Ferreira, A. G. 1984.** Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. Ciência e Cultura, v.36, n.9, p. 1583 - 1590.
- Aron, Y.; Czosnek, H.; Gazit, S.; Degani, C. 1998.** Polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) is controlled by a single dominant gene. **Hort Science**, v. 33, n. 7, p. 1241-1242.

- Asomaning, J. M.; Olympio, N. S.; Sacande, M. 2011.** Desiccation sensitivity and Germination of Recalcitrant *Garcinia kola* Heckel Seeds. Research Journal of Seed Science 4: 15-27.
- Ávila, A. L.; Argenta, M. S.; Muniz, M. F. B.; Poletto, I.; Blume, E. 2009.** Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (pitanga), Santa Maria, RS. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 19, n. 1, p. 61-68.
- Barbedo, C. J. 2005.** Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 851-861.
- Barbedo, C. J.; Bilia, D. A. C. 1998.** Evolution of research on recalcitrant seeds. Sci. agric., Piracicaba, 55(Número Especial), p.121-125.
- Barbedo, C. J.; Bilia, D. A. C.; Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2002.** Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. Brazilian Journal of Botany 25: 431–439.
- Barbedo, C. J.; Centeno, D. C.; Ribeiro, R. C. L.F. 2013.** Do recalcitrant seeds really exist? Hoehnea 40(4): 583-593.
- Barbedo, C. J.; Kohama, S.; Maluf, A. M.; Bilia, D. A. C. 1998.** Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. Revista Brasileira de Sementes, vol. 20, no 1, p.184-188.
- Barbedo, C. J.; Marcos-Filho, J. 1998.** Tolerância a dessecação em sementes. Acta Bot. bras. 12(2), p.145-164.
- Barroso, G. M. 1984.** Sistemática de angiospermas do Brasil. Editora Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 377p.
- Barroso, G. M.; Peron, M. 1994.** *Myrtaceae*. In Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Aspectos florísticos das espécies vasculares, v. 1 (P.M.P. Lima & R.R.Guedes-Bruni eds.). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 259-302.
- Barroso, G. M.; Peixoto, A.L. 1995.** Myrtaceae da Reserva Florestal de Linhares, ES, Brasil – gêneros *Calyptranthes* e *Marlierea*. Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. Ser). 3: 3-38.
- Baskin, C. C.; Baskin, J. M. 1998.** Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego: Academic Press. 666 p.
- Batygina, T. B.; Vinogradova, G. Y. 2007.** Phenomenon of Polyembryony. Genetic Heterogeneity of Seeds. Russian Journal of Developmental Biology. Vol. 38 N. 3

- Begon, M.; Townsend, C. R.; Harper, J. L. 2007.** Ecologia: De Indivíduos a Ecossistemas. Artmed, Porto Alegre. 740 p.
- Berjak, P.; Pammenter, N. W. 2000.** What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12(número especial): 22-55.
- Berjak, P.; Pammenter, N. W. 2008.** From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany* 101: 213-218.
- Bewley, J. D.; Black, M. 1982.** Physiology and biochemistry of seed in relation to germination: viability, dormancy and environmental control. Berlin: Springer-Verlag, p. 375.
- Borges, I. F.; Del Giudice Neto, J.; Bilia, D. A. S.; Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.; Borghetti, F.; Ferreira, A. G. 2004.** Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). Germinação do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, p.51-67.
- Brasil, 2009.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Regras para Análise de Sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. 399 p.
- Buckeridge, M. S.; Santos, H. P.; Tiné, M. A. S.; Aida, M. P. M. 2004.** Mobilização de reservas. In: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação, do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, pp. 163-185.
- Calvi, G. P. 2015.** Armazenamento das sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: aspectos tecnológicos e fisiológicos. Tese de doutorado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, 89 p.
- Calvi, G. P.; Anjos, A. M. G.; Kranner, I.; Pritchard, H. W.; Ferraz, I. D. K. 2017.** Exceptional flooding tolerance in the totipotent recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata*. *Seed Science Research* , p. 1- 10.
- Câmara, I. G. 1992.** Plano de Ação para a Mata Atlântica. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica /Editora Interação, 1992.
- Cardoso, V. J. M. 2004.** Germinação. In: KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 386-408.
- Cardoso, C. A. L.; Lima, A. S. V.; Ré-Poppi, N.; Vieira, M. C. 2009.** Fruit oil of *Campomanesia xantocarpa* O. Berg and *Campomanesia adamantium* O.Berg. *Journal of Essential Oil Research*; 21(6): 481-483.
- Carleton, A. E.; Cooper, C. V. 1972.** Seed size effects upon seedling vigor of three forage legumes. *Crop Science*, 12: 183 – 6.

- Carvalho, A. R.; Gomes, G. A.; Ferreira, R. O.; Carvalho, M. G. 2014.** Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). *Quimica Nova* 2014; 37(3): 477-482.
- Carvalho, N. M.; Nakagawa, J. 2012.** Sementes: Ciencia, tecnologia e produção. Ed. Funep – Jaboticabal. 5ª edição.
- Carvalho, P. E. R. 2008.** Espécies arbóreas brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso de madeira. Brasília DF – Embrapa florestas. 593 p.
- Castellani, E. D.; Aguiar, I. B. 2001.** Seed maturation and effect of temperature regime on *Trema micrantha* (L.) Blume seed germination. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 29, n. 1, p. 73-82.
- Castro, R. D.; Bradford, K. J.; Hilhorst, H. W. M. 2004.** Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p.51-67.
- Cope, J. M.; Fox, C. W. 2003.** Oviposition decisions in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): effects of seed size on superparasitism. *Journal of Stored Products Research* 39: 355–365.
- Corrêa, M. P. 1975.** Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro - RJ.
- Corvello, W. B. V.; Villela, F. A., Nedel, J. L.; Peske, S. T. 1999.** Maturação fisiológica de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). *rev. bras. sem.* 21(2):23-27.
- Costa, R. S., Oliveira, I. V. M., Môro, F. V.; Martins, A. B. G. 2006.** Aspectos morfológicos e influência do tamanho da semente na germinação do jambo-vermelho. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(1), 117-120.
- Crawley, M. J. 1992.** Population dynamics. In.: *Natural Enemies: the Population Biology of Predators, Parasites and Diseases*. Crawley, M. J. (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 40-89.
- Darwin, C. 1859.** A origem das espécies. Tradução Eugênio Amado. Belo Horizonte, Vila Rica ed. Grandes Obras da Cultura Universal.
- Decagon D. 2001.** WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual, Pullman, WA, Decagon Devices.
- Degani, C.; Cohen, M.; Reuveni, O.; El-Bastri, R.; Gazit, S., 1993.** Frequency and characteristics of zygotic seedlings from polyembryonic mango cultivars, determined using isozymes as genetic markers. *Acta Horticulturae*, v. 341, p. 78-85.

- Dekkers, B. J. W.; 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* 241: 563–577.
- Delgado, L. F. 2006.** Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. 96f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- Delgado, L. F.; Barbedo, C. J. 2007.** Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.265-272.
- Delgado, L. F. 2010.** Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de *Eugenia* (Myrtaceae). Tese de doutorado do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. 92p.
- Delgado, L. F.; Mello, J. I. O.; Barbedo, C. J. 2010.** Potential for regeneration and propagation from cut seeds of *Eugenia* (Myrtaceae) tropical tree species. *Seed Sci Technol* 38:624–634
- Delgado, L. F.; Barbedo, C. J. 2011.** Atividade inibidora da germinação em extratos de sementes de *Eugenia uniflora* L. *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, n. 3, p. 463-471.
- Denno, R. F.; Lewis, D. 2009.** Predator-prey interactions. In: Levin S. A. (ed.), *The Princeton guide to ecology*. Princeton University Press, New Jersey. 202-212.
- Deo, P. C.; Tyagi, A. P.; Taylor, M.; Harding, R.; Becker, D. 2010.** Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, v.28, p.27-40.
- Donadio, L.C.; Moro, F.V. 2004.** Potential of Brazilian *Eugenia* (Myrtaceae) as ornamental and as a fruit crop. *Acta Horticulturae*, v.632, p.65-68.
- Dornelles, C. M. M. 1977.** Laranja tobias cultivar promissora para a indústria de sucos. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*, Sociedade Brasileira de Fruticultura, Salvador /BA, p. 369.
- Duarte, E. F.; Naves, R. V.; Borges, J. D.; Guimarães, N. N. R. 2006.** Germinação e vigor de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* MART. ex DC.) em função de seu tamanho e tipo de coleta. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 36 (3): 173-179.
- Fernandez-Ferreira, F.; Santos, R.; Soares, R. O. A.; Branquinho, L. F.; Ramos, M. F. S.; Henriques, M. G. M. O.; Siani, A. C.; Guimarães, A. C. 1997.** Avaliação da atividade de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae e Burseraceae como agentes

tripanossomicidas. III Jornada Paulista de Plantas Medicinais. CPQBA. UNICAMP. Campinas, Brasil.

Figliolia, M. B.; Silva, A.; Aguiar, I. B.; Perecin, D. 2001. Efeito do acondicionamento e do ambiente de armazenamento na conservação de sementes de sibipiruna. *Revista Brasileira Horticultura Ornamental*, v.7, n.1, p.57-62.

Frazão, D. A. C.; Figueiredo, F. J. C.; Correa, M. P. F.; Oliveira, R. P.; Popinigis, F. 1983. Tamanho da semente de guaraná e sua influência na emergência e no vigor. *Revista Brasileira de Sementes*, 5 (1): 81-91.

Fowler, J. A. P.; Martins, E. G. 2001. Manejo de sementes de espécies florestais. Embrapa Florestas. Colombo – PR. 71p.

Garcia, V. A.; Barbedo, C. J. 2016. Estudo fenológico de *Bactris gasipaes* Kunth, *Euterpe edulis* Mart. e *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman no Vale do Ribeira, SP, Brasil. *Hoehnea* 43(1): 135-149.

Gentil, D. F. O. ; Ferreira, S. A. N. 1999. Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). *Acta Amazônica*, v. 29, n. 1, p. 21-31.

Gentil, D. F.O. 2003. Conservação de sementes de *Myrciaria dúbia* (H.B.K.) McVaugh. Tese de doutorado da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 51p.

Gomes, J. P. 2011. Germinação e armazenamento de sementes de *Myrtaceae*. Dissertação do Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. Lages / SC. 91 p.

Gomes, J. P.; Oliveira, L. M.; Silva, K. M.; Ferreira, P. I.; Dacoregio, H. M. 2016. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia involucrata*. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. Lages, v.15, n.2, p.118-123.

Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B. K.; Landrum, L. L.; Matsumoto, K.; Mazine, F. F.; Lughadha, E. N.; Proença, C.; Soares-silva, L. H.; Wilson, P. G.; Lucas, E. 2014. World Check-List of *Myrtaceae*. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew.

Grant, V. 1971. Plant speciation. Ed. Columbia University Press.

Green, T. R.; Ryan, C. A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in Plant Leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science*, 18: 175(4023) p.776-777.

Guimarães, A. G.; Melo, M. S.; Bonfim, R. R.; Luiz O. Passos, L. O.; Machado, S. M. F.; Ribeiro, A. S.; Sobral, M.; Sara M. Thomazzi, S. M.; Quintans-Júnior, L. J.

- 2009.** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19(4), p. 883-887.
- Gurgel, J. T. A.; Soubihe-Sobrinho, J. 1951.** Poliembrionia em mirtáceas frutíferas. *Bragantia*, v.11, p.141-163.
- Ha, C. O.; Sands, V. E. 1988.** Reproductive patterns of selected understorey trees in the Malaysian rain forest: the apomictic species. *Botanical Journal of the Linnean Socio* 97: 3 17-33 1.
- Hilhorst, H. W. M. 2007.** Definitions and hypotheses of seed dormancy. In: K. J. Bradford; H. Nonogaki (Eds.); *Seed Development, Dormancy and Germination*. Oxford: Blackwell Publishing. p.367.
- Hong, T. D.; Ellis, R. H. A. 1996.** A protocol to determine seed storage behavior. *IPGRI Technical Bulletin*, n. 1, 62 p.
- Hulme, P. E.; Benkman, C. W. 2002.** Granivory. In: Herrera C. M. & Pellmyr O. (eds.), *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*. Blackwell, Oxford. 132-154p.
- Hulme, P. E.; Kollmann, J. 2005.** Seed predator guilds, spatial variation in postdispersal seed predation and potential effects on plant demography: a temperate perspective. In: Forget P., Lambert J. E., Hulme P. E. Vander Vall S. B. (eds.) *Seed fate: predation, dispersal and seedling stablishment*. Cabi Publishing, Wallingford, UK. 9-30p.
- Hung, L. Q. 2003.** Effect of maturation on seed germination of *Dalbergia cochichinensis* Pierre. *Seed Technology*, v.25, p.124-127,
- IBF, 2018.** Instituto Brasileiro de Florestas. Disponível em: <<https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>> Acesso em 10/01/2018.
- IESB, 2007.** Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia. Levantamento da Cobertura Vegetal Nativa do Bioma Mata Atlântica. Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica brasileira – Probio.
- ISTA – International Seed Testing Association. 1996.** International rules for testing seeds. *Seed Science and Technology*, v.16, p.113-115.
- Janzen, D. H. 1970.** Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *The American Naturalist*, v.104, p.501-527.
- Janzen, D. H. 1971.** Seed predation by animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2: 465-492.

- Joly, A. B. 1993.** Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 777p.
- Joshi, G.; Kumar, A. N. A.; Gowda, B.; Srinivasa, Y. B. 2006.** Production of supernumerary plants from seed fragments in *Garcinia gummi – gutta*: evolutionary implications of mammalian frugivory. Current science 91:372-376.
- Justo, C.F.; Alvarenga, A.A.; Alves, E.; Guimarães, R.M.; Strassburg, R.S. 2007.** Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. Acta Botanica Brasilica, v.21, p.539-551.
- Kam, A.; Li, K. M.; Razmovski-Naumovski, V.; Nammi, S.; Shi, J.; Chan, K.; Li, G. Q. 2013.** A comparative study on the inhibitory effects of different parts and chemical constituents of pomegranate on alpha-amylase and alpha-glucosidase. Phytother Res. 27(11) p. 1614-1620.
- Kanwar, K.; Joseph, J.; Deepika, R. 2010.** Comparison of in vitro regeneration pathways in *Punica granatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.100, p.199-207.
- Karami, O.; Saidi, A. 2010.** The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. Molecular Biology Reports, v.37, p.2493-2507.
- Kawasaki, M. L. 1989.** Flora da Serra do Cipó, MG, Brasil: *Myrtaceae*. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 11:121-170.
- Kermode, A. R. 1995.** Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: Interactions between the embryo and the seed environment. In: Kigel, J. & Galili, G. (Eds) Seed Development and Germination. Marcel Dekker, New York. 273-332.
- Klein, R. M. 1990.** Importância sociológica das mirtáceas nas florestas rio-grandensis. In: Congresso Nacional de Botânica, 24., Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil, 1990. p.367-375.
- Klein, J.; Zucareli, V.; Kestring, D.; Camili, L.; Rodrigues, J. D. 2007.** Efeito do tamanho da semente na emergência e desenvolvimento inicial de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 861-863.
- Koenig, W. D.; Knops, J. M. H. 2000.** Patterns of annual seed production by northern hemisphere trees: A global perspective. The American Naturalist 155: 59-69.

- 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, v.28, p.72-78.
- Lamarca, E.V.; Prata, J. S.; Borges, I. F.; Delgado, L. F.; Teixeira, C. C.; Camargo, M. B. P.; 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, v. 85, n. 1, p. 223-233.
- Landrum, L. R.; Kawasaki, M. L. 1997.** The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. Brittonia v.49, p.508-536.
- Legrand, C. D. J.; Klein, R. M. 1969.** Mirtáceas. p. 45-216. In: P. R. Reitz (ed.). Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues.
- Leitão-Filho, H. F. 1987.** Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. Scientia, IPEF- Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais n.35, p.41-46. Campinas SP.
- Leitão-Filho, H. F. 1993.** Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão (SP). Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, 192p.
- Limberger, R. P.; Apel, M. A.; Sobral, M.; Moreno, P. R. H.; Henriques, A. T.; Menut, C. 2001.** Aromatic plant from Brazil chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). The Journal of Essential Oil Research; 13: 113-115.
- Lin, S. S. 1988.** Efeito do tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de palmito. Revista Brasileira de Sementes, v.8, p.57-66.
- Lino, C. F. O. 2003.** Bioma Mata Atlântica. In: Lino, C.F.; Dias, H. (Org.). Água e floresta da mata atlântica: por uma gestão integrada São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 132p. (Caderno da RNBMA: série política pública, 27).
- Lorenzi, H. 1998.** Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Lorenzi, H. 2009.** Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum. vol. 3.
- Lucas, E. J.; Belsham, S. R.; NicLughadha, E. M.; Orlovich, D. A.; Sakuragui, C. M.; Chase, M. W.; Wilson, P. G. 2005.** Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. Plant Systematics and Evolution 251: 35-51.

- Lunardi, I.; Peixoto, J. L. B.; Silva, C. C.; Shuquel, I. T. A.; Basso, E. A.; Vidotti, G. J. 2001.** Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. Journal of Brazilian Chemical Society, v.12, p.180-183.
- Malik, S. K.; Chaudhury, R.; Kalia, R. K. 2005.** Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. Scientia Horticulturea 106: 539 -553.
- Maluf, A. M.; Bilia, D. A. C.; Barbedo, C. J. 2003.** Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. Scientia Agricola, v. 60, n.3, p.471-475.
- Masetto, T. E.; Davide, A. C.; Faria, J. M. R.; Silva, E. A. A.; Rezende, R. K. S. 2009.** Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia pleurantha* (Myrtaceae) pelos testes de germinação e tetrazólio. Agrarian, v.2, n.5.
- Marcos-Filho, J. 2015.** Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Editora ABRATES Associação Brasileira de Tecnologia em Sementes. 660p.
- McVaugh, R. 1968.** The genera of American *Myrtaceae* - an interim report. Taxon 17:354-418.
- Melo, F. P. L.; Aguiar Neto, A. V.; Tabarelli, M. S. 2004.** Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. p.237-241.
- Mendes, A. M.; Figueiredo, A. F.; Silva, J. F. 2006.** Crescimento e maturação de frutos e sementes de urucum. Revista Brasileira de Sementes, v.28, p.133-141.
- Mendes, A. M. S.; Mendonça, M. S. 2012.** Tratamentos pré-germinativos em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata*). Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 921-929.
- Ministério do meio ambiente – MMA.** Disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica> Acesso: 19/01/2018
- Molizane, D. M. 2012.** Estabelecimento e superação de dormência em sementes de *Erythrina speciosa* Andrews. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP- Botucatu/ SP. 77p.
- Munaro, D. 2017.** Comportamento fisiológico durante armazenamento e dessecação de sementes de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae): aspectos bioquímicos e ultraestruturais. Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina. 87p.
- Murren, C. J. 2002.** Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. Journal of Ecology 90: 100-107.

- Nakamura, M. J.; Monteiro, S. S.; Bizarri, C. H. B.; Siani, A. C.; Ramos, M. F. S. 2010.** Essential oils of four *Myrtaceae* species from the Brazilian southeast. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 1170–1175.
- Nascimento, W. M. O.; Tomé, A. T.; Carvalho, J. E. U. ; Müller, C. F. 2001.** Comportamento fisiológico de sementes de mangostão (*Garcinia mangostana* L.) submetidas a diferentes períodos de fermentação da polpa *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 735-737.
- Neves, L. J.; Donato, A. M. 1989.** Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae). *Bradea*, v.5, p.273-286.
- Neves, E. M. S. 2011.** Dessecação, armazenamento e condicionamento osmótico em sementes de espécies frutíferas do cerrado. Dissertação de Mestrado em Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, 79f.
- Neves, I. A.; Rezende, S. R. F.; Kirk, J. M.; Pontes, E. G.; de Carvalho, M.G. 2017.** Composition and larvicidal activity of essential oil of *Eugenia candolleana* DC. (Myrtaceae) against *Aedes aegypti*. *Revista Virtual Quimica*. Vol 9, No. 6, p. 2305-2315.
- Ofori, D. A.; Asomaning, J. M.; Peprah, T.; Agyeman, V. K.; Anjarwalla, P.; Tchoundjeu, Z.; Mowo, J. G.; Jamnadass, R. 2015.** Addressing constraints in propagation of *Allanblackia* spp. through seed sectioning and air layering. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. Volume – 3(1), p.89 – 96.
- Oro, P.; Schulz, D. G.; Volkweis, C. R.; Bandeira, K. B.; Malavasi, U. C.; Malavasi, M. M. 2012.** Maturação fisiológica de sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess e *Eugenia involucrata* DC. *Biotemas*, 25 (3), 11-18.
- 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*, v.13, p.19-25.
- Piña-Rodrigues, F. C. M.; Aguiar, I. B. 1993.** Maturação e dispersão de sementes In: Aguiar, I. R.; Piña-Rodrigues, F. C. M; Figliolio, M. B. (Ed.) *Sementes Florestais Tropicais*. Brasília: ABRATES, p.215-74.
- Pio Corrêa, M. 1984.** Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Pott, A.; Pott, V.J. 1994.** Plantas do Pantanal. Brasília: Embrapa. 320p.

- Prataviera, J.S. 2005.** Modificações na coloração de frutos como indicativas da maturidade fisiológica de sementes de *Eugenia*. (Trabalho de conclusão de curso) - Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo. 39f.
- 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*, v. 37, n.1, p. 047-054.
- Reichardt, K. 1985.** Processos de transferência no sistema solo-planta-atmosfera. Campinas, Fundação Cargill. 421p.
- Ribeiro, J. E. L. S. 1999.** Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 800p.
- Ribeiro, L. F. 2004.** Dispersão e predação de grandes sementes por *Sciurus aestuans* L. em fragmentos de Floresta Atlântica Montana no estado do Espírito Santo, ES, Brasil. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco. 179 p.
- Rizzini, C. T. 1970.** Inibidores de germinação e crescimento em *Andira humilis* Benth. *An. Acad. brasil. Ciênc.* 42 (Supl.), p.329-366.
- Rizzini, C. T. 1997.** Tratado de Fitogeografia do Brasil, aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. 2ª edição. Editora Âmbito Cultural, Rio de Janeiro – RJ, 747p.
- Roberts, E. H. 1973.** Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1: 499-514.
- Rodrigues, L. M. S. 2013.** Insetos predadores de sementes e suas relações com a qualidade e a morfologia de frutos e sementes. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.
- Rodrigues, R. R.; Nave, A. G. 2000.** Heterogeneidade florística das matas ciliares. *In*: Rodrigues, R. R.; Leitão Filho, H. F. (Eds.). *Matas ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo: Edusp/Fapesp, p.45-71.
- 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 bot. bras.* 20(3): 529-548.
- Rosa, L. S.; Ohashi, S. T. 1999.** Influência do substrato e do grau de maturação dos frutos sobre a germinação do pau-rosa (*Aniba rosaedora* Ducke). *Revista de Ciências Agrárias*, v.31, p.49- 55.

- Salimon, C. I.; Negrelle, R. R. B. 2001.** Natural Regeneration in a Quaternary Coastal Plain in Southern Brazilian Atlantic Rain Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44(2):155-163.
- Salomão, A. N.; Allem, A. C. 2001.** Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. *Acta bot. bras.* 15(3): 369-378.
- Santana, D. G. Ranal, M. A. 2004.** Análise da germinação: Um enfoque estatístico. Editora UnB, Brasília.
- Sarmiento, H. G. S.; David, A. M. S. S.; Barbosa, M. G.; Nobre, D. A. C.; Amaro, H. T. R. 2015.** Determinação do teor de água em sementes de milho, feijão e pinhão-manso por métodos alternativos. *Energ. Agric., Botucatu*, vol. 30, n.3, p.249-256.
- Scalon, S. P. Q.; Neves, E. M. S.; Maseto, T. E.; Pereira, Z. V. 2012.** Sensibilidade à dessecação e ao armazenamento em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.34, n.1, p.269-276.
- Sena, L. H. M.; Matos, V. P.; Ferreira, E. G. B.S.; Sales, A. G. F. A.; Pacheco, M. V. 2010.** Qualidade fisiológica de sementes de pitangueira submetidas a diferentes procedimentos de secagem e substratos - parte 1. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, n.4, p.405-411.
- Senra, T. V. 2012.** Ocorrência da broca (Coleoptera: Curculionidae) em frutos de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (pedra-ume-caá) em uma área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas – UFAM / Manaus. 40f.
- Silva, A. 1997.** Padrão de florescimento e frutificação, caracterização de diásporos e germinação de sementes de canela-preta (*Ocotea catharinensis* Mez.). Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal. 94f.
- Silva, A. L. G.; Pinheiro, M. C. B. 2009.** Reproductive success of four species of *Eugenia* L. (Myrtaceae) *Acta bot. bras.* 23(2): 526-534. 2009.
- Silva, C. V.; Bilia, D. A. C.; Barbedo, C. J. 2005.** Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 27, n. 1, p. 86-92.
- Silva, C. V.; Bilia, D. A. C.; Maluf, A. M.; Barbedo, C. J. 2003.** Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 26, n. 2, p. 213-221.
- Silva, J. P. N. 2010.** Mecanismos de controle de tolerância à dessecação em sementes de *Caesalpinia echinata* LAM. (pau-brasil) e *Caesalpinia peltophoroides* BENTH.

(sibipiruna). Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu / SP. 130p.

Silva, R. S. M. 1999. Caracterização de subpopulações de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) da região sudeste do Estado de Goiás, Brasil. Dissertação de Mestrado. Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. 107p.

Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F.; Lucas, E. 2014. *Myrtaceae*. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>.

Souza, E. B.; Carneiro, I. F.; Naves, R. V.; Borges, J. D.; Leandro, W. M.; Chaves, L. J. 2002. Crescimento e sobrevivência de mudas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC) nas condições de cerrado. Revista Brasileira de Fruticultura, v.24, n.2,p.491-495.

Souza, M. C. 2005. *Myrtaceae* Juss. da restinga de Marambaia, RJ – Brasil. Dissertação Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro. 152 f.

Souza, V. C.; Lorenzi, H. 2005. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 639p.

Stebbins, G. L. 1950. Variation and Evolution in Plants. Columbia University Press.

Swamy, M. K.; Sudipta, K. M.; Balasubramanya, S.; Anuradha, M. 2010. Effect of different carbon sources on in vitro morphogenetic response of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.). Journal of Phytology, v.2, p.11-17.

Szentesi, A.; Jermy, T. 1995. Predispersal seed predation in leguminous species: seed morphology and bruchid distribution. Oikos 73: 23-32.

Teixeira, C. C. 2009. Regeneração de embriões em sementes fracionadas de espécies brasileiras de *Eugenia*: influência do estágio de maturação, do armazenamento e da fase de germinação. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu – SP.

Teixeira, C. C.; Barbedo, C. J. 2012. The development of seedlings from fragments of monoembryonic seeds as an important survival strategy for *Eugenia* (Myrtaceae) tree species. Trees, Structure and Function, v. 26, n. 3, p. 1069-1077.

Teixeira, C. C., 2014. Relação entre o perfil metabólico da semente de *Eugenia pyriformis* e sua capacidade de regenerar novas plântulas. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP. 70p.

- Vaz, M. C. 2011.** Diversidade de estratégias ecológicas das espécies de árvore dominantes de uma floresta de terra firme da Amazônia Central. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da USP. 109p.
- Vendramin, D. W.; Carvalho, R. I. N. 2013.** Qualidade fisiológica de sementes de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (Myrtaceae). *Est. Biol.* 35 (84): 59-65.
- Villela, F. A.; Marcos-Filho, J. 1998.** Estados energéticos e tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 20, n. 2, p.79-83.
- Walters, C. 2000.** Levels of recalcitrance in seeds. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 12 (Edição Especial) p.7-21.
- White, J. W.; Gonzáles, A. 1990.** Characterization of the negative association between seed yield and seed size among genotypes of common bean. *Field Crops Research*, 23: 159 – 175.
- Wilson, P. G.; O'Brien, M. M.; Heslewood, M. M.; Quinn, C. J. 2005.** Relationships within *Myrtaceae sensu lato* based on a matk phylogeny. *Plant Systematic and Evolution* 251:3-19