

MARIANE CRISTINA INOCENTE

**Déficit hídrico em sementes de *Eugenia* spp.
(Myrtaceae): resistência e relações com a
regenerabilidade de raízes e plântulas**

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

MARIANE CRISTINA INOCENTE

**Déficit hídrico em sementes de *Eugenia* spp.
(Myrtaceae): resistência e relações com a
regenerabilidade de raízes e plântulas**

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**

Inocente, Mariane Cristina

I58d Déficit hídrico em sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae): resistência e relações com a regenerabilidade de raízes e plântulas / Mariane Cristina Inocente -- São Paulo, 2018.

57p. ; il.

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

Bibliografia.

1. Estresse hídrico. 2. Resistência. 3. Regeneração. I. Título

CDU: 547.455.65

Dedico aos meus pais, Marcos e Salete.

“The world is full of wonderful things you haven't seen yet.
Don't ever give up on the chance of seeing them”.

J. K. Rowling

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre guiar minha vida e permitir tantas realizações e conquistas.

Aos meus pais Marcos Antonio Inocente e Salete Canella Inocente, pelo apoio, ensinamentos e conselhos. E também, pelo exemplo de caráter, esforço, honestidade e humildade. Vocês me inspiram todos os dias.

Ao meu namorado Bruno Silva Aberaldo, que é minha calma em meio a todas as turbulências, obrigada por tudo que vivemos e principalmente pelo amor e paciência.

À minha irmã Ana Carolina Inocente, por sempre encorajar meus sonhos e me ajudar.

Ao orientador Claudio José Barbedo por toda ajuda, paciência, incentivo, amizade e conhecimentos compartilhados.

Às Dr.^{as} Fatima C. M. Piña-Rodrigues e Marina Crestana Guardia pelas contribuições neste trabalho.

À banca de qualificação pelas valiosas contribuições.

Ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade oferecida.

Ao Núcleo de Pesquisa em Sementes pela infraestrutura disponibilizada para a realização desse trabalho e a todos seus funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado fornecida.

A todos os familiares e amigos, que sempre me apoiam, desejam minha felicidade e comemoram minhas conquistas, em especial Abigail Roncada, Isabela de Andrade Vaz, Juliana Cristina Silvéria e Tatiane Cruz Lopes.

Às amigas/irmãs Bianca de Medeiros Vendramini, Giovanna Macedo Cancian, Isabela Pedroni Amorim, Nathalia Mariano Bottozzi e Paola Verssuti Peixoto, pela amizade infinita, por todo o apoio e por emocionalmente fazerem parte desse trabalho.

Às amigas Aline Testoni Cécel, Aparecida Juliana Martins Corrêa, Camila Rivero Alonso, Roseli Betoni Bragante e Vera Lygia El Id por toda amizade, companheirismo, risadas e apoio.

Ao amigo João Paulo Naldi Silva por toda ajuda, disponibilidade e paciência de ouvir minhas ideias e questionamentos acadêmicos.

E a todos que direta ou indiretamente apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Em várias espécies de *Eugenia* o fracionamento das sementes resulta na produção de mais de uma plântula. Contudo, não há produção de mais de uma plântula em cada fração, sugerindo algum processo de autocontrole da formação de várias plântulas simultaneamente a partir de uma mesma fração reprodutiva. Isso poderia ser interpretado como uma estratégia de ampliação, no tempo e no espaço, da disponibilidade de novas plântulas, como uma alternativa à tolerância à dessecação, uma vez que são recalcitrantes, e da dormência, demonstrada por sementes de diversas espécies. Um dos fatores ambientais capazes de criar ciclos temporais favoráveis e desfavoráveis ao desenvolvimento e estabelecimento de plântulas é a disponibilidade hídrica do solo. Sementes recalcitrantes também podem enfrentar condições não favoráveis ao desenvolvimento de plântulas, como períodos de seca. Em algumas regiões brasileiras, nas quais ocorre grande número de espécies do gênero *Eugenia*, há ciclos de grande precipitação pluvial seguidos de períodos de seca, resultando em grandes oscilações da disponibilidade de água no solo. Neste trabalho, buscou-se analisar a capacidade regenerativa de sementes de *Eugenia* como possível estratégia de garantir a produção de novas plântulas, mesmo quando a semente ou as plântulas sofrem danos e a primeira germinação não resulta em desenvolvimento de plantas por falta de suficiente disponibilidade hídrica no meio, bem como verificar se essas sementes apresentam mecanismos de resistência a déficits hídricos do meio, garantindo a manutenção de tecidos totipotentes capazes de manter um nível mínimo de hidratação que permita regenerar novas raízes e plântulas quando as condições do meio se tornam favoráveis. Para tanto, buscou-se simular condições de déficit hídrico a fim de encontrar o limite de tolerância das sementes à seca e da possibilidade desse déficit induzir a regeneração das plântulas. Foram utilizadas sementes de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora*. Os resultados evidenciaram a grande resistência das sementes de *Eugenia* ao déficit hídrico, chegando a suportar -5,0 MPa por 60 dias, e após isso continuar o desenvolvimento. Também demonstraram a continuação do desenvolvimento de raízes e partes aéreas a partir de um tecido aparentemente necrosado em sua superfície, evidenciando que, sob situação de estresse hídrico, quando necessário, as sementes de *Eugenia* utilizam-se do mecanismo de formação de novas raízes e plântulas para garantir a sobrevivência do exemplar, inclusive podendo germinar não só da semente, mas sendo capaz de emitir parte aérea a partir da raiz.

Palavras-chave: estresse hídrico, resistência, regeneração

ABSTRACT

Water deficit in seeds of Eugenia spp. (Myrtaceae): resistance and relationships with the regenerability of roots and seedlings

Cutting seeds of several *Eugenia* species results in the production of more than one seedling. However, there is no production of more than one seedling in each fraction, suggesting some process of self-control of the formation of several seedlings simultaneously from the same reproductive fraction. This could be understood as a strategy of spreading, in time and place, the availability of new seedlings, as an alternative to the desiccation tolerance, since they are recalcitrant, and of dormancy, demonstrated by seeds of several species. One of the environmental factors that could create favorable and unfavorable time cycles for the development and establishment of seedlings is the water availability of the soil. Recalcitrant seeds may also find environmental conditions unsuitable for seedling development, such as periods of drought. In some Brazilian regions, including those in which *Eugenia* species are commonly found, cycles of high rainfall followed by periods of drought are found, resulting in large fluctuations in the availability of water in the soil. This research aimed to analyze the regenerative capacity of *Eugenia* seeds as a possible strategy to guarantee the production of new seedlings even when the seed or seedlings suffer some damages and/or the first germination does not result in plant development due to lack of sufficient water availability in the middle. We also aimed to verify if these seeds present mechanisms of resistance to environment water deficits, maintenance the hydration, and the viability as well, of totipotent tissues which are capable of regenerate new roots and seedlings when the environment conditions become suitable. Therefore, we tried to simulate conditions of water stress in order to find the limit of tolerance of the seeds to the drought and the possibility of this stress to induce the regeneration of the seedlings. Seeds of *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* and *E. uniflora* were used. The results evidenced the amazing resistance of *Eugenia* seeds to the water deficit, surviving to water potential as negative as -5.0 MPa, for 60 days, after which it continued the development. They also demonstrated the continuation of the development of roots and aerial parts from a tissue apparently necrotic on its surface, evidencing that, under water stress situation, when necessary, *Eugenia* seeds can trigger mechanism of formation of new roots and seedlings to guarantee the survival of the species; this is possible not only from the seed, but also from the root.

Keywords: resistance, regeneration, water stress

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Frutos de *Eugenia* sp. utilizados neste trabalho. A. *E. brasiliensis*, B. *E. involucrata*, C. *E. pyriformis*, D. *E. uniflora*. 22
- Figura 2.** Avaliação do potencial hídrico de soluções de PEG. A. Solução de PEG pipetada na cápsula de avaliação; B. Cápsulas com as amostras aguardando estabilização térmica; C. Cápsula com a solução de PEG prestes a ser inserida na câmara de avaliação. 24
- Figura 3.** Sala de germinação utilizada para a condução dos testes. A. vista geral da sala; B. Detalhe do germinador com porta de vidro, dentro do qual permaneceram as sementes durante o teste de germinação. 25
- Figura 4.** Potencial hídrico real das soluções de PEG 6000 avaliadas com e sem papel de germinação em relação ao potencial hídrico alvo. 29
- Figura 5.** Germinação de sementes *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* e plântulas normais de *E. brasiliensis* e *E. pyriformis* submetidas a diferentes regimes de déficit hídrico: -0,0, -0,5, -1,0, -1,5, -2,0, -3,0, -4,0 e -5,0 MPa. Na tabela são apresentados os resultados da última avaliação, com a análise de variância para germinação (*E. brasiliensis* (Eb): F= 59,12, p<0,05; *E. involucrata* (Ei): F= 81,71, p<0,05; *E. pyriformis* (Ep): F= 31,40, p<0,05; *E. uniflora* (Eu): F= 47,29, p<0,05) e plântulas normais (*E. brasiliensis* (Eb): F= 127,06, p<0,05; *E. pyriformis* (Ep): F= 32,40, p<0,05) e os resultados do teste de Tukey a 5% (médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cada espécie). 30
- Figura 6.** Distribuição temporal de frequência da germinação de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* nos tratamentos -0,0 MPa, -0,5 MPa, -1,0, -1,5 MPa e -2,0 MPa. Os valores são expressos em número médio de sementes germinadas. 31
- Figura 7.** Germinação e plântulas normais de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora*, em água, oriundas de sementes previamente submetidas a diferentes regimes de déficit hídrico. 32
- Figura 8.** Germinação (G) e plântulas normais (PN) de *Eugenia brasiliensis* (G: F=2,81, p<0,05; PN: F=7,25, p<0,05), *E. involucrata* (G: F=1,20, p<0,35691; PN: F=5,90, p<0,05), *E. pyriformis* (sementes grandes (G: F=0,48, p<0,85421; PN: F=6,36, p<0,05) e pequenas (G: F=2,11, p<0,08956; PN: F=1,76, p<0,15271)) e *E. uniflora* (G: F=0,37, p<0,92012; PN: F=8,50, p<0,05) em diferentes regimes de oscilação hídrica e reposição de água do substrato em cada regime hídrico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cada espécie, pelo teste de Tukey a 5%. 33
- Figura 9.** Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* (sementes grandes e pequenas) e *E. uniflora* em diferentes regimes

de oscilação hídrica (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 34 dias). Os valores são expressos em número médio de sementes germinadas.	34
Figura 10. Teor de água (%) do substrato (areia) e quantidade de água (mL) necessária à saturação do substrato sob diferentes regimes de rega (dias).....	35
Figura 11. Temperatura (°C), umidade relativa (%) e ponto de orvalho (°C) do ar na sala de germinação em um intervalo de 48 dias.	36
Figura 12. Figura ilustrativa demonstrando a formação de nova raiz e/ou parte aérea, após sementes germinadas de <i>Eugenia involucrata</i> serem submetidas a diferentes níveis (-2,0, -3,0, -4,0 e -5,0 MPa) e intervalos (10-60 dias) de déficit hídrico e retornarem para substrato saturado com água. Setas vermelhas indicam as raízes e partes aéreas oriundas da primeira germinação. Setas azuis indicam novas raízes e partes aéreas formadas após o período de déficit hídrico.	42
Figura 13. Categorias de regenerabilidade (A) e frequência da distribuição dos modelos (B) em sementes de <i>Eugenia involucrata</i> germinadas durante armazenamento e posteriormente submetidas a diferentes níveis (-2,0, -3,0, -4,0 e -5,0 MPa) e intervalos (10-60 dias) de déficit hídrico. I (preto): semente que apresentou crescimento de nova raiz e/ou parte aérea a partir da estrutura pré-existente oriunda da primeira germinação; II (cinza): semente que apresentou formação de nova raiz e/ou parte aérea devido à perda da primeira germinação; III: semente que apresentou formação de mais de uma nova raiz e/ou parte aérea devido à perda da primeira germinação.	43
Figura 14. Sementes de <i>Eugenia involucrata</i> , evidenciando emissão da parte aérea a partir da raiz (indicado pela seta vermelha).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas geográficas das matrizes de <i>Eugenia brasiliensis</i> , <i>E. involucrata</i> , <i>E. pyriformis</i> e <i>E. uniflora</i> , no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, SP, das quais foram obtidos os frutos utilizados neste trabalho.....	22
Tabela 2. Conteúdo de água (%) e potencial hídrico (MPa) de sementes de <i>Eugenia brasiliensis</i> , <i>E. involucrata</i> , <i>E. pyriformis</i> e <i>E. uniflora</i> . Valores apresentados em média (desvio padrão).....	27
Tabela 3. Potencial hídrico (Ψ_w , MPa) do ar e da areia utilizada como substrato para sementes de <i>Eugenia brasiliensis</i> , <i>E. involucrata</i> , <i>E. pyriformis</i> (grandes e pequenas) e <i>E. uniflora</i> , avaliados em diferentes intervalos (dias) de umedecimento do substrato.....	36
Tabela 4. Porcentagem de sementes viáveis e inviáveis após diferentes níveis (-2,0 à -5,0 MPa) e intervalos (10 à 60 dias) de estresse hídrico e porcentagem das sementes viáveis que apresentaram regeneração formação de nova raiz e/ou parte aérea).....	41

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Myrtaceae e suas <i>Eugenias</i>	14
1.2 Potencial de regeneração de raízes e plântulas em <i>Eugenia</i>	15
1.3 Comportamento recalcitrante em sementes de <i>Eugenia</i>	17
1.4 Déficit hídrico	18
1.5 Estratégias de perpetuação das espécies pelas sementes	20
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Obtenção do material biológico	22
3.2 Determinação do teor de água e potencial hídrico das sementes	23
3.3 Análise das alterações do potencial hídrico de soluções de PEG	23
3.4 Resistência de sementes <i>Eugenia</i> spp. submetidas a déficit hídrico	24
3.4.1 Germinação de sementes de <i>Eugenia</i> spp. submetidas a déficit hídrico	24
3.4.2 Resistência das sementes às variações hídricas do substrato	25
3.5 Formação de novas raízes e plântulas em sementes de <i>Eugenia</i> spp. submetidas ao estresse hídrico	26
3.6 Delineamento experimental e análise estatística dos dados	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Determinação do teor de água e potencial hídrico das sementes	27
4.2 Análise das alterações do potencial hídrico de soluções de PEG	28
4.3 Resistência de sementes <i>Eugenia</i> spp. submetidas a déficit hídrico	29
4.4 Formação de novas raízes e plântulas em sementes de <i>Eugenia</i> spp. submetidas a déficit hídrico	40
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

As sementes são as grandes responsáveis pelo início da agricultura e, conseqüentemente, pelo início das civilizações (Barbedo *et al.* 2013), permitindo que a humanidade pudesse produzir sua própria comida em diferentes momentos da produção de sementes (Barbedo & Bilia 1998, Barbedo & Marcos Filho 1998). A tolerância à dessecação das sementes foi essencial para permitir ao homem armazenar sementes em tempos de escassez prolongada de alimentos. Assim, a secagem natural ao final da maturação sempre foi compreendida como um processo normal e a sobrevivência em um estado quase completamente seco foi sempre o comportamento esperado para as sementes (Barbedo & Bilia 1998). No entanto, na natureza este é um comportamento raro entre os seres vivos (Barbedo *et al.* 2013). O aumento no período de viabilidade das sementes em armazenamento, portanto, sempre esteve associado à redução tanto da temperatura quanto do teor de água das sementes, sendo inclusive previsível desde que fossem definidas a espécie, a temperatura de armazenamento e o teor de água das sementes (Roberts 1973).

Contudo, desde o início do século XX foi identificado um grupo de espécies cujas sementes apresentaram características diferentes, porque uma diminuição no seu teor de água tende a diminuir o período de viabilidade (Kidd 1914, Jones 1920, Castro & Krug 1951, Bacchi 1961, Zink & Rochelle 1964, Prange 1964). Desde 1973, os pesquisadores vêm estudando esse comportamento, chamado recalcitrante, tanto visando a desenvolver tecnologias que permitam armazenar tais sementes por escalas que variem de anos a décadas, quanto para compreender suas estratégias evolutivas de perpetuação da espécie.

Uma das estratégias mais interessantes, encontradas em um grupo de espécies do gênero *Eugenia*, que tem sementes recalcitrantes, é a capacidade de regenerar raízes e plântulas mesmo quando parte de seus tecidos é removida. Essa capacidade foi estudada, neste trabalho, procurando-se verificar sua relação com possíveis períodos de déficit hídrico, bem como sua resistência à saída de água de áreas vitais da semente para evitar a morte de tecidos capazes de produzir novas plântulas e propagar a espécie.

1.1 Myrtaceae e suas *Eugénias*

A família Myrtaceae é a segunda maior da ordem Myrtales e abrange cerca de 40% do total das espécies (Souza & Lorenzi 2008). Apresenta ampla distribuição nas zonas tropicais e subtropicais, concentrada principalmente na Oceania e Regiões Neotropicais, que são consideradas centros de diversidade (Wilson *et al.* 2001, Sytsma *et al.* 2004, Judd *et al.* 2007,

Heywood *et al.* 2007, Souza & Lorenzi 2008). Na Oceania ocorre a subfamília Leptospermoideae, caracterizada por folhas alternas, frutos secos e sementes pequenas, representada por gêneros como *Eucalyptus* e *Melaleuca*. Nas Américas, ocorre a subfamília Myrtoideae, caracterizada por folhas opostas ou verticiladas, frutos carnosos e sementes grandes, representada por gêneros como *Eugenia*, *Myrcia* e *Psidium* (Barroso *et al.* 1984, Lughadha & Proença 1996, Lughadha & Snow 2000).

Na família Myrtaceae, o gênero *Eugenia* encontra-se entre os mais importantes com espécies utilizadas na ornamentação urbana, na produção comercial de frutos (*in natura* e industrializados) e na obtenção de fármacos com propriedades antioxidantes, anti-diarréicas, antifúngicas, antibióticas e potencialidades para o controle da hipertensão, da diminuição de colesterol e ácido úrico, para emagrecimento e como adstringente e digestivo (Schmeda-Hirschmann *et al.* 1987, Almeida *et al.* 1995, Núñez *et al.* 2001, Holetz *et al.* 2002, Souza *et al.* 2002, Roesler *et al.* 2007). Ademais, suas espécies são de grande importância ecológica, estando bem representadas em diversas formações vegetacionais do Brasil, como Cerrado e Mata Atlântica (Leitão Filho 1993, Barroso & Peron 1994, Rodrigues & Nave 2000, Arantes & Monteiro 2002).

E. brasiliensis é uma arvoreta característica e exclusiva da mata pluvial atlântica no Sul do Brasil, bastante rara (Legrand & Klein 1969), com frutos de sabor agradável (Delgado & Barbedo 2007). *E. pyriformis*, de 5 a 15 m de altura, tem frutos com mesocarpo comestível de sabor adocicado e acidulado (Andrade & Ferreira 2000). *E. involucrata* é uma árvore de vasta distribuição nas submatas mais desenvolvidas, em solos úmidos e não muito acidentados (Legrand & Klein 1969). *E. uniflora* apresenta compostos potencialmente farmacológicos de efeito anti-inflamatório, diurético, anti-hipertensivo, anti-triglicérides e hipoglicêmico (Pepato *et al.* 2001), além de seus frutos serem comercializados na forma de sucos e distribuídos no mercado nacional (Delgado & Barbedo 2007).

1.2 Potencial de regeneração de raízes e plântulas em *Eugenia*

A baixa densidade de ocorrência natural das espécies de *Eugenia* associada com a produção de poucas sementes por fruto (Corrêa 1931, Ribeiro *et al.* 1985), dificulta a obtenção de sementes em quantidade que permita a produção de mudas em larga escala visando o aproveitamento comercial, sendo necessário maximizar o uso das sementes obtidas. A fim de ampliar a produção de mudas a partir de um mesmo lote, Silva *et al.* (2003) fracionaram sementes de *Eugenia* e observaram a manutenção da capacidade germinativa e de produção de plântulas normais das partes fracionadas.

Em várias espécies de *Eugenia* o fracionamento das sementes resulta na produção de mais de uma plântula. Apesar da família Myrtaceae possuir algumas espécies com sementes poliembriônicas (Landrum & Kawasaki 1997), as espécies de *Eugenia* são monoembriônicas (Gurgel & Soubihe Sobrinho 1951, Salomão & Allem 2001), deste modo, o surgimento de raízes e plântulas nas sementes fracionadas deve decorrer da formação de novos tecidos e não do desenvolvimento de embriões diferenciados já existentes, o que demonstra a capacidade regenerativa e totipotente dos tecidos cotiledonares dessas espécies (Silva *et al.* 2003, Justo *et al.* 2007, Delgado *et al.* 2010, Prativiera *et al.* 2015).

Aparentemente, o desenvolvimento de novos tecidos nessas sementes depende do fracionamento (Silva *et al.* 2003, 2005). É possível, portanto, que as lesões nas sementes iniciem processos de indução da formação de novas raízes e plântulas. Contudo, tal indução, caso existente, não é suficiente para a produção de mais de uma plântula em cada fração resultante (Teixeira & Barbedo 2012), sugerindo algum processo de autocontrole da formação de várias plântulas simultaneamente a partir de uma mesma fração reprodutiva (Amador & Barbedo 2011).

A presença de substâncias capazes de inibir a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de feijão e alface foi observada em extratos de sementes germinantes de *Eugenia dysenterica* e *E. uniflora* (Rizzini 1970, Delgado e Barbedo 2011). Amador & Barbedo (2015) verificaram elevada correlação entre a evolução da germinação das sementes *Eugenia brasiliensis* e *E. uniflora* e o potencial de inibir a formação de novas raízes e plântulas nestas sementes. Além disso, Amador (2015) verificou que as concentrações de ácido gálico e ácido elágico também oscilam com o avanço da germinação, indicando alguma relação entre esses ácidos e o controle de germinações simultâneas. É importante salientar que estes compostos apresentam potencial de bloquear a ação da alfa-glucosidase (Kam *et al.* 2013), enzima essencial para que se complete a germinação de sementes de diversas espécies (Buckeridge *et al.* 2004).

É possível, portanto, que uma vez iniciada a germinação, as sementes iniciem, ou aumentem, a produção de substâncias capazes de inibir a diferenciação de novos tecidos embrionários, pela migração de tais substâncias da região germinante para as demais regiões da semente (Silva *et al.* 2005, Amador & Barbedo 2011). Assim, uma fração da semente só poderia começar a desenvolver novas raízes e plântulas após ser completamente separada da fração germinante ou, ainda, após a primeira germinação não resultar em desenvolvimento de plântula e culminar com a morte da raiz inicialmente formada (Amador & Barbedo 2011). Neste caso, a associação entre a elevada capacidade regenerativa de sementes de *Eugenia* com o controle de germinações múltiplas, que esgotariam rapidamente as reservas da semente, poderia ser

interpretada como uma estratégia de ampliação, no tempo e no espaço, da disponibilidade de novas plântulas, aptas a garantirem a perpetuação da espécie (Silva *et al.* 2003, Amador & Barbedo 2011). Esta estratégia poderia ser vista como uma alternativa à tolerância à dessecação, característica das sementes ortodoxas, e da dormência, demonstrada por sementes de diversas espécies.

1.3 Comportamento recalcitrante em sementes de *Eugenia*

Sementes de *Eugenia* apresentam comportamento de armazenamento classificado como recalcitrante, ou seja, são sensíveis à dessecação, o que impede que sejam armazenadas por longos períodos (Barbedo *et al.* 1998, Anjos & Ferraz 1999, Andrade & Ferreira 2000, Andrade *et al.* 2003). Além disso, elas têm o potencial de gerar novas raízes e até plantas inteiras mesmo após a retirada de grande parte das suas reservas, o que é raro na natureza. Este recurso pode estar relacionado, evolutivamente, a dois fatores: a perda de grande parte do material de reserva decorrente do ataque de insetos, que chegam a consumir mais de três quartos da semente (Teixeira & Barbedo 2012), ou a necessidade de garantir sucessivas germinações ao longo do tempo, sempre com reservas suficientes para o desenvolvimento de uma nova plântula.

Um dos fatores ambientais capazes de criar ciclos temporais favoráveis e desfavoráveis ao desenvolvimento e estabelecimento de plântulas é a disponibilidade hídrica do solo. A água é fundamental na ativação dos processos metabólicos que resultam na germinação das sementes, agindo na expansão e divisão celular e como veículo para os produtos da fotossíntese. O teor de água das sementes mantém-se elevado até o final do desenvolvimento, normalmente de 30 a 40% do peso úmido, já ao final da maturação pode haver redução rápida no teor até valores próximos a 10%, de acordo com a espécie, levando a quiescência ou permanência do teor elevado, propiciando o início do processo germinativo, visto que as sementes estão completamente formadas, características que podem ser observadas na maioria das sementes ortodoxas e recalcitrantes, respectivamente (Barbedo & Marcos Filho 1998).

A diferença no comportamento das sementes ortodoxas e recalcitrantes pode ser decorrente do processo de seleção natural em conformidade com as condições ambientais no momento do desenvolvimento da espécie. As sementes ortodoxas provavelmente passaram por períodos inadequados ao desenvolvimento das plântulas, deste modo, àquelas que germinassem logo após a maturação seriam incapazes de sobreviver às condições adversas do meio. Tendo isto em vista, foram selecionadas as sementes que germinavam somente quando as condições fossem favoráveis ao desenvolvimento das plântulas. O baixo teor de água dessas sementes limitou a germinação a estes períodos favoráveis e evitou a deterioração. Já as sementes

recalcitrantes teriam sido selecionadas em ambiente favorável ao desenvolvimento das plântulas ao longo de todo o ano, sendo necessário que estas germinassem logo após a dispersão, devido à concorrência com outras espécies. Assim seria desfavorável a estas sementes a perda de água ao final da maturação, pois tornar-se-iam dependentes de um fator ambiental limitante: a presença de água suficiente no meio para iniciar o processo germinativo, o que prejudicaria a perpetuação da espécie (Barbedo & Marcos Filho 1998, Barbedo & Bilia 1998). Apesar disto, em campo, as sementes recalcitrantes podem enfrentar condições não favoráveis ao desenvolvimento de plântulas, como por exemplo, períodos de seca, em que a disponibilidade de água no solo seria um fator limitante e causador de estresse.

1.4 Déficit hídrico

O déficit hídrico é um dos estresses ambientais mais comuns enfrentados pelas plantas, além disto, é o fator que mais influencia o processo germinativo das sementes (Perez *et al.* 2001, Stefanello *et al.* 2006, Rego *et al.* 2011). Para que a germinação ocorra, é necessário que haja disponibilidade de água suficiente no meio, permitindo a ativação das reações químicas relacionadas ao metabolismo, e deste modo, a retomada do desenvolvimento do embrião.

A reativação do metabolismo embrionário nas sementes dá-se através da absorção de água em um processo denominado embebição. A absorção obedece a um padrão trifásico. Na fase I, há rápida entrada de água, devido a grande diferença de potencial hídrico entre as sementes e o substrato. Esta fase caracteriza-se também pelo início da degradação das substâncias de reserva (carboidratos, proteínas, lipídeos). Na fase II, a velocidade de absorção de água é mais lenta, tendendo para o equilíbrio entre os potenciais; ocorre também transporte ativo das substâncias do tecido de reserva para o tecido meristemático. Na fase III, há redução no potencial hídrico das sementes, devido à produção de substâncias osmoticamente ativas, o que resulta em rápida absorção de água do meio (Bewley & Black 1994, Carvalho & Nakagawa 2000).

O movimento de água para o interior da semente, regulado pelo potencial hídrico, ocorre tanto por capilaridade quanto por difusão, no sentido do maior para o menor potencial. Há um grau mínimo de umidade que a semente deve alcançar para que a germinação ocorra. A quantidade de água absorvida depende da espécie, da composição química da semente, do teor de água inicial, da permeabilidade do tegumento da semente ou do fruto à água, da temperatura, da disponibilidade de água em forma líquida ou gasosa no meio e do tamanho e forma da semente (área de contato solo-semente) (Mayer & Poljakoff-Mayber 1989, Calero *et al.* 1981, Vertucci & Leopold 1983, Popinigis 1985, Bewley & Black 1994).

O gradiente de potencial hídrico que existe entre a semente e o meio externo também afeta a embebição, pois o fluxo de água até a semente é influenciado pela característica do complexo coloidal do substrato (potencial mátrico e osmótico e textura do solo) (Bewley & Black 1994, Garcia *et al.* 1998). A textura influencia no grau de contato semente-solo e na condutividade da água, desta forma, para um mesmo potencial hídrico de solo, a resposta à germinação difere quando o solo é argiloso ou arenoso (Bewley & Black 1994). Além disto, os padrões de resposta de germinação podem diferir entre e dentre as espécies em faixas equivalentes de potenciais osmóticos e mátricos (McWilliam & Phillips 1971).

A embebição é um processo físico relacionado com as características de permeabilidade do tegumento e com as propriedades dos coloides constituintes das sementes, e ocorre independentemente do estado fisiológico da semente (dormente, quiescente ou morta) (Mayer & Poljakoff-Mayber 1989, Woodstock 1988, Copeland & McDonald 1995). É também dependente da temperatura, ocorrendo com maior velocidade em temperaturas mais elevadas (Mayer & Poljakoff-Mayber 1989).

A velocidade de entrada da água nos tecidos é um fator decisivo no sucesso da germinação (Braccini *et al.* 1997). Ao serem submetidas à rápida hidratação, as sementes com baixo conteúdo de água sofrem aumento na lixiviação de solutos decorrente da transição imediata da fase gel para líquido-cristalina dos fosfolipídios da membrana (Corrêa & Junior 1999), o que pode causar danos às sementes, acarretando em plântulas anormais e até ausência total de germinação (Lin 1990).

A velocidade de embebição modifica-se com as variações ambientais, porém a quantidade máxima de água a ser absorvida não se altera, pois, esse máximo é uma propriedade dos coloides hidrofílicos da semente, determinada pela maturação e pelo armazenamento. Durante a fase de absorção de água a respiração e a atividade metabólica se intensificam, pois no metabolismo celular a água é essencial para a atividade enzimática, solubilização e transporte de reagentes e digestão hidrolítica (Woodstock & Lao 1981).

Potenciais hídricos muito negativos, principalmente no início da embebição, influem na absorção de água pelas sementes, podendo impossibilitar a continuidade dos eventos do processo germinativo (Bansal *et al.* 1980, Mikusinsk 1987). A diminuição do potencial osmótico torna a absorção de água mais lenta, deste modo, a semente inicia a germinação, mas não havendo água suficiente para dar continuidade, o processo é cessado, podendo haver até a morte do embrião (Stefanello *et al.* 2006).

Quando as sementes são submetidas a estresse pela falta de água, há redução do potencial hídrico da célula, e conseqüente diminuição da pressão de turgor, o que afeta negativamente a expansão e o crescimento celular e o metabolismo (Popinigis 1985, Yasseen & Alomary 1994,

Jaleel *et al.* 2009). Deste modo, potenciais hídricos muito negativos inibem o crescimento do hipocótilo e da raiz primária, embora as sementes estejam metabolicamente ativas e aptas para a germinação (Santos *et al.* 2011).

A capacidade de germinar e a taxa de germinação em potenciais hídricos negativos varia entre as espécies (Koller & Hadas 1982), de modo que para cada espécie há um valor de potencial hídrico limite no solo, abaixo do qual a germinação não ocorre (Adegbuyi *et al.* 1981).

Além de ser importantíssima para o processo germinativo, a presença de água também é necessária em todas as outras fases subsequentes do metabolismo da planta (Stefanello *et al.* 2006, Rego *et al.* 2011). É essencial nas reações enzimáticas, na solubilização e no transporte de metabólitos e como reagente de hidrólise de proteínas, carboidratos e lipídios dos tecidos de reserva da semente (Carvalho & Nakagawa 2000, Mayer & Poljakoff-Mayber 1989). Entretanto, o excesso de água é prejudicial à semente, pois impede a penetração do oxigênio prejudicando a respiração, podendo haver atraso ou paralisação do desenvolvimento, ocorrência de anormalidades nas plântulas e até a morte do embrião (Hobbs & Obendorf 1972, Marcos Filho *et al.* 1987, Borges & Rena 1993).

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos empregando soluções com diferentes potenciais osmóticos, a fim de simular condições de baixa disponibilidade de água no solo ou visando a acelerar e uniformizar a germinação das sementes no campo (Delgado & Barbedo 2011, Carvalho *et al.* 2016, José *et al.* 2016, Matias *et al.* 2018). No osmocondicionamento (*priming*), por exemplo, as sementes são hidratadas de forma controlada em uma solução osmótica, de modo a permitir a ocorrência das etapas iniciais da germinação sem que haja a protrusão da raiz primária (Carvalho *et al.* 2000). Isto ocorre porque o potencial osmótico da solução utilizada regula a quantidade de água a ser absorvida pelas sementes durante o processo de embebição (Fanti e Perez 2003).

O Polietilenoglicol (PEG) 6000 cuja fórmula é $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ é o agente osmótico mais utilizado para simular os efeitos do déficit hídrico nas plantas por ser quimicamente inerte, não penetrar nas células, não ser degradado e não causar toxidez, devido ao seu peso molecular (Hasegawa *et al.* 1984, Villela *et al.* 1991).

1.5 Estratégias de perpetuação das espécies pelas sementes

A distribuição geográfica das espécies depende, principalmente, da capacidade de suas sementes de germinar em diversas condições climáticas, estabelecendo-se no clima que melhor se adaptam (Borghetti & Ferreira 2004). Em algumas regiões brasileiras, nas quais ocorre grande número de espécies do gênero *Eugenia*, há ciclos de grande precipitação pluvial

seguidos de períodos de seca, resultando em grandes oscilações da disponibilidade de água no solo.

O período de germinação e estabelecimento das plântulas é essencial à sobrevivência das espécies florestais, especialmente em locais onde a disponibilidade hídrica está limitada durante um período do ano (Rego *et al.* 2007). A tolerância à seca é uma característica importante a se considerar quando visa-se a recomendação de espécies capazes de suportar condições adversas de potenciais osmóticos em várias situações ecológicas, principalmente ao considerar os solos salinos e áreas com baixa disponibilidade hídrica (Rego *et al.* 2011). A capacidade de germinar sob condições de estresse hídrico que as sementes de algumas espécies apresentam, confere vantagens ecológicas em relação a outras espécies que são sensíveis à seca (Bewley & Black 1994, Rosa *et al.* 2005).

O estresse hídrico pode atuar positivamente ao estabelecimento das espécies, quando em condições naturais, uma vez que provoca considerável atraso no tempo de germinação das sementes (Borges *et al.* 1991, Fanti & Perez 2004), acarretando na distribuição da germinação no tempo e no espaço, e assim, elevando a chance das plântulas encontrarem condições ambientais favoráveis ao seu estabelecimento e desenvolvimento (Bewley & Black 1994). Assim, no presente projeto, tem-se como hipóteses que: 1) a capacidade regenerativa de sementes de *Eugenia* está relacionada com a estratégia de garantir a produção de novas plântulas, mesmo quando a semente ou as plântulas sofrem danos e a primeira germinação não resulta em desenvolvimento de plantas por falta de suficiente disponibilidade hídrica no meio; 2) sementes de *Eugenia* tem mecanismos de resistência a déficits hídricos do meio, garantindo a manutenção de tecidos totipotentes capazes de manter um nível mínimo de hidratação que permita formar novas raízes e plântulas quando as condições do meio se tornam favoráveis.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo verificar a resistência das sementes de diferentes espécies de *Eugenia* ao déficit hídrico e a possibilidade de uma segunda germinação em sementes de *Eugenia* quando a primeira é perdida, pela falta de água disponível no meio, decorrente do período de déficit. Para isto foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a absorção de água pelas sementes em função da disponibilidade hídrica;
- Determinar o limite de tolerância à seca das espécies de *Eugenia*;
- Verificar a capacidade regenerativa sobre diferentes condições de déficit hídrico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material biológico

Frutos de *Eugenia brasiliensis* Lam., *E. involucrata* DC., *E. pyriformis* Camb. e *E. uniflora* L. (figura 1) foram coletados no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, em São Paulo, SP (23°38'S e 46°37'W, 785 m de altitude), nos meses de outubro e novembro de 2017, a partir de, respectivamente, três, duas, quatro e três matrizes (tabela 1). O clima da região de coleta dos frutos caracteriza-se como clima temperado Cwb, de acordo com a classificação de Köppen (Santos & Funari 2002), ou seja, clima subtropical de altitude, com inverno seco e verão ameno.



Figura 1. Frutos de *Eugenia* sp. utilizados neste trabalho. A. *E. brasiliensis*, B. *E. involucrata*, C. *E. pyriformis*, D. *E. uniflora*.

Tabela 1. Coordenadas geográficas das matrizes de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora*, no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, SP, das quais foram obtidos os frutos utilizados neste trabalho.

	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4
<i>E. brasiliensis</i>	23°38'20,43"S e 46°37'14,57"W	23°38'23,27"S e 46°37'30,34"W	23°38'21,72"S e 46°37'32,36"W	
<i>E. involucrata</i>	23°38'21,74"S e 46°37'36,09"W	23°38'22,09"S e 46°37'36,02"W		
<i>E. pyriformis</i>	23°38'26,48"S e 46°37'29,92"W	23°38'26,16"S e 46°37'25,94"W	23°38'28,88"S e 46°37'26,79"W	23°38'24,16"S e 46°37'30,29"W
<i>E. uniflora</i>	23°38'21,06"S e 46°37'32,12"W	23°38'22,24"S e 46°37'33,63"W	23°38'22,83"S e 46°37'36,67"W	

Para a obtenção dos frutos, no dia anterior à primeira colheita, todos os frutos presentes no solo, sob a copa das árvores, foram removidos. A seguir, telas de sombreamento (sombrite) foram colocadas sob a copa dessas árvores. A partir do dia seguinte, e por cerca de sete dias consecutivos, para cada espécie, todos os frutos dispersos foram recolhidos do sombrite e

levados imediatamente ao laboratório. Uma primeira seleção de frutos foi realizada, eliminando-se frutos muito imaturos ou danificados por pássaros, insetos e microrganismos.

As sementes foram, então, extraídas manualmente, por fricção em peneira, seguido por lavagem em água corrente para remoção da polpa e separação das sementes. A separação da polpa foi feita, inicialmente, por decantação e ao final, os resíduos foram removidos manualmente. Para retirada da água superficial residual, as sementes permaneceram em repouso sobre papel de germinação (Germitest® tipo CEL - 065) por período não superior a uma hora. Sementes visualmente danificadas (mecanicamente ou por insetos) ou fora do padrão (excessivamente pequenas ou visualmente chochas) foram descartadas. Até o momento de seu uso, as sementes ficaram acondicionadas à 10°C em sacos plásticos de polietileno (0,10 µm) perfurados.

3.2 Determinação do teor de água e potencial hídrico das sementes

Após extração e beneficiamento, as sementes foram caracterizadas quanto ao teor de água e ao potencial hídrico. O conteúdo de água, expresso em porcentagem (em base úmida), foi determinado pelo método de estufa a $103\pm 3^\circ\text{C}/17\text{h}$ conforme descrito nas Regras Internacionais para Análise de Sementes (ISTA 2015), utilizando-se quatro repetições de dez sementes cada. O potencial hídrico, expresso em megapascal (MPa), foi medido utilizando-se quatro repetições de dez sementes cada, cortadas ao meio, colocadas em potenciômetro WP4 (Dewpoint Potentiometer, Decagon Devices, Pullmann). A medida do potencial hídrico foi obtida indiretamente, considerando-se o equilíbrio higroscópico entre a amostra e o ar da câmara e analisando-se a temperatura do ponto de orvalho do ar.

3.3 Análise das alterações do potencial hídrico de soluções de PEG

Ensaio deste trabalho utilizaram soluções aquosas de polietileno glicol 6000 (PEG) (marca Synth) em diferentes concentrações, produzindo diferenças no potencial osmótico a fim de simular condições de limitação hídrica no substrato. Inicialmente, portanto, estudou-se a relação hídrica do substrato para uma correta avaliação das condições de déficit hídrico.

O preparo das soluções foi baseado nos cálculos e recomendações de Michel & Kaufman (1973) e Vilella *et al.* (1991), com os potenciais osmóticos de 0,0 (água pura, utilizada como controle) até -10,0 MPa, em intervalos de -0,5 MPa. O potencial hídrico das soluções foi aferido por meio de potenciômetro WP4, conforme descrito anteriormente. Utilizou-se 1,92 mL das soluções de PEG (ou água, para 0,0 MPa). As amostras foram colocadas nas cápsulas e

mantidas em área de estabilização térmica do aparelho para, então, serem colocadas na câmara hermética para avaliação do potencial hídrico (figura 2). Após a aferição do potencial das soluções puras, foram adicionados 0,433g de papel de germinação cortados em discos de 2,5 cm. Assim que todo o papel estava visualmente umedecido pela solução, o potencial foi novamente verificado. Para cada concentração de potencial osmótico foram utilizadas quatro repetições.



Figura 2. Avaliação do potencial hídrico de soluções de PEG. A. Solução de PEG pipetada na cápsula de avaliação; B. Cápsulas com as amostras aguardando estabilização térmica; C. Cápsula com a solução de PEG prestes a ser inserida na câmara de avaliação.

3.4 Resistência de sementes *Eugenia* spp. submetidas a déficit hídrico

3.4.1 Germinação de sementes de *Eugenia* spp. submetidas a déficit hídrico

Sementes de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* foram semeadas em rolos de papel umedecidos com água (0,0 MPa) ou com soluções aquosas de PEG em diferentes concentrações, proporcionando os potenciais osmóticos de -0,5, -1,0, -1,5, -2,0, -3,0, -4,0 e -5,0 MPa. A quantidade de solução utilizada no umedecimento do substrato foi calculada e padronizada para todos os tratamentos, de modo que não houvesse necessidade de reposição até o final do experimento. As folhas de papel de germinação foram umedecidas previamente. Em seguida, foram utilizadas duas folhas para a base, nas quais as sementes foram semeadas, e uma folha para cobertura, para então se formarem os rolos. Estes foram colocados dentro de sacos plásticos e incubados em sala de germinação com luz branca contínua e temperatura constante de 25°C (figura 3).

Semanalmente, durante 60 dias, foi avaliada a germinação das sementes. Foram consideradas como germinadas aquelas que apresentaram comprimento radicular maior ou igual a 2 mm. Para *E. brasiliensis* e *E. pyriformis* foi analisada também a formação de plântulas normais. Para cada tratamento houve quatro repetições de 16 sementes cada.



Figura 3. Sala de germinação utilizada para a condução dos testes. A. vista geral da sala; B. Detalhe do germinador com porta de vidro, dentro do qual permaneceram as sementes durante o teste de germinação.

A porcentagem de germinação (%G) foi determinada pela equação descrita por Labouriau (1983):

$$G\% = (N/A) \cdot 100; \text{ onde:}$$

N = número de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar.

Ao final do experimento as sementes que não germinaram em cada tratamento foram divididas em dois grupos. As sementes do Grupo 1 continuaram na condição de déficit hídrico, com a finalidade de verificar se após um período maior de incubação a germinação ocorreria. As sementes do Grupo 2 foram lavadas em água corrente, até a remoção total de resíduos da solução de PEG, e colocadas em substrato umedecido com água, a fim de verificar se continuavam viáveis. A avaliação final foi realizada após 30 dias.

3.4.2 Resistência das sementes às variações hídricas do substrato

Sementes de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* foram colocadas para germinar em caixas plásticas tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) contendo como substrato areia umedecida com água. Devido a variação de tamanho, as sementes de *E. pyriformis* foram divididas em dois grupos: pequenas (0,5 a 1,0 cm) e grandes (1,0 a 2,0 cm).

Inicialmente os gerbox vazios foram pesados individualmente em balança analítica (*tara* - *T*). Em cada caixa foi adicionada areia (300 g) saturada com água de torneira e, então, o conjunto gerbox + areia umedecida foi pesado (*Peso inicial* - *Pi*). Após a adição das sementes os gerbox foram pesados novamente (*Peso inicial* + *sementes* - *Pis*).

A partir desse momento, os gerbox com as sementes foram divididos nos tratamentos de frequência de rega. Assim, a areia foi re-umedecida a cada 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 8 (T8), 10 (T10), 12 (T12), 14 (T14), 16 (T16) e 34 (T34) dias. Antes de cada re-umedecimento do substrato, as sementes foram retiradas dos gerbox, que foi pesado (*Peso final - Pf*). Em seguida, as sementes foram recolocadas nos mesmos gerbox e o conjunto foi novamente pesado (*Peso final + sementes - Pfs*). A diferença entre *Pi* e *Pf*, correspondendo à quantidade de água perdida no período, foi utilizada para a reposição da quantidade de água que permitisse que o gerbox retornasse ao peso inicial, com a mesma saturação inicial de areia.

O potencial hídrico do substrato foi medido por meio de potenciômetro WP4 no início e ao final do experimento e antes da primeira rega. As avaliações foram realizadas antes da reposição de água, exceto para a condição inicial que foi avaliada após a saturação da areia. A amostra de substrato coletada foi devolvida ao gerbox após a aferição. Ao final do experimento foi avaliada também a umidade do substrato, pelo método de estufa a $103^{\circ}\text{C}\pm 3/17\text{h}$ (ISTA, 2015). Cada tratamento foi composto por três repetições de 9 sementes cada.

Após o período regular do experimento (34 dias), com a finalidade de verificar se as sementes que não germinaram ou não formaram plântulas durante o período de estresse estavam viáveis, o substrato passou a ser umedecido regularmente, sempre que havia necessidade de reposição de água, e após 30 dias foi realizada nova avaliação.

Durante todo o período do experimento, foram monitoradas a temperatura do ar da sala de germinação, a umidade relativa e a temperatura do ponto de orvalho, utilizando-se datalogger RR (Rhino Research Group, Prichit, Tailândia), com registros a cada 30 minutos.

3.5 Formação de novas raízes e plântulas em sementes de *Eugenia* spp. submetidas ao estresse hídrico

Sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas pelo período de 1 ano a 10°C e que apresentavam protrusão de raiz, pois germinaram durante o armazenamento, foram diretamente semeadas (sem remoção da raiz) em rolos de papel umedecidos com água (0,0 MPa) e com soluções aquosas de PEG, conforme descrito anteriormente, nos potenciais osmóticos de -2, -3, -4 e -5 MPa.

Em intervalos de 10 dias, em um período total de 60 dias, foram retiradas amostras de 10 sementes acondicionadas nas soluções osmóticas e transferidas para substrato umedecido com água. As sementes foram colocadas em caixas plásticas do tipo gerbox com vermiculita.

A avaliação final foi realizada após 30 dias, no qual foram contabilizadas as sementes que apresentaram algum tipo de regeneração, de acordo com a seguinte classificação, ilustrada na

Figura 13A: I - semente que apresentava crescimento de nova raiz e/ou parte aérea a partir da estrutura pré existente oriunda da primeira germinação; II -semente que apresentava formação de nova raiz e/ou parte aérea devido à perda da primeira germinação; III - semente que apresentava formação de mais de uma nova raiz e/ou parte aérea devido à perda da primeira germinação.

3.6 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ao nível de 5% e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, também a 5% (Santana & Ranal 2004), utilizando o Sistema de Análise Estatística (SANEST).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do teor de água e potencial hídrico das sementes

O teor de água das espécies estudadas variou de 50,6% (*Eugenia brasiliensis* Lam.) a 79,0% (*E. pyriformis* Camb.) (Tabela 2). Valores elevados no conteúdo de água são comuns às sementes recalcitrantes e foram observados em diversas espécies do gênero *Eugenia*, como *E. cerasiflora* Miq. (62,8%, Delgado & Barbedo 2007), *E. dysenterica* DC. (47-53%, Andrade *et al.* 2003), *E. stipitata* ssp. *sororia* Mc Vaugh (58,8%, Gentil & Ferreira 1999; 59-66%, Anjos & Ferraz 1999), *E. umbelliflora* Berg. (42,5%, Delgado & Barbedo 2007) e *E. rostrifolia* Legr. (43%, Santos *et al.* 2004).

Tabela 2. Conteúdo de água (%) e potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora*. Valores apresentados em média (desvio padrão)

Espécies	Teor de água (%)	Potencial hídrico (MPa)
<i>E. brasiliensis</i>	50,6±1,0	-0,53±0,1
<i>E. involucrata</i>	62,2±0,9	-0,49±0,2
<i>E. pyriformis</i>	79,0±0,9	-0,47±0,1
<i>E. uniflora</i>	57,4±1,4	-0,55±0,1

Valores de teor de água semelhantes aos encontrados neste estudo foram observados por outros autores para *E. brasiliensis* (48,9%, Kohama *et al.* 2006; 49,6%, Delgado & Barbedo

2007; 47-47,5%, Amador & Barbedo 2015), *E. involucrata* (63,4%, Barbedo *et al.* 1998; 60,7%, Maluf *et al.* 2003) e *E. uniflora* (52,2-57,7%, Amador & Barbedo, 2015). Em contrapartida, Delgado & Barbedo (2007), Lamarca *et al.* (2011) e Amador & Barbedo (2011) observaram em *E. pyriformis* teores de água mais baixos, 66,8%, 60,4-66,4% e 57,8-59,4%, respectivamente. Segundo Barbedo *et al.* (2013), diferenças no teor de água de sementes dispersas, de uma mesma espécie, podem significar diferenças no grau de maturação quando se desligam da planta-mãe. Isso condicionaria, inclusive, o grau de recalcitrância da semente. O elevado teor de água das sementes de *E. pyriformis* estudadas distancia-se tanto do teor de água encontrado por outros autores para a mesma espécie, quanto para outras espécies do mesmo gênero, o que poderia sugerir que essas sementes foram dispersas mais imaturas.

4.2 Análise das alterações do potencial hídrico de soluções de PEG

A avaliação dos potenciais hídricos (Ψ_w) das diferentes soluções de PEG (Figura 4) demonstrou que ao serem colocadas em papel de germinação, o potencial real das soluções foi extremamente próximo ao potencial-alvo, porém quando as soluções são aferidas sem um substrato, há maior diferença entre estes potenciais, o potencial real sendo sempre mais positivo do que o potencial-alvo, com variação em média de -0,4 MPa, alcançando -0,7 MPa no potencial mais negativo. A partir de -4,5 MPa o distanciamento entre o potencial-alvo e real é mais evidente. Diversos fatores podem contribuir para essas diferenças. Primeiramente, o valor do potencial hídrico é dependente da temperatura. O equipamento utilizado neste trabalho (WP4) trabalha em temperatura ambiente, sem regulação interna. Dessa forma, dependendo da temperatura da sala de leitura pode-se ter pequenas variações nesse potencial.

Há, ainda, uma relação entre o aumento da negatividade e o aumento da diferença entre o potencial almejado e o potencial real das soluções, o que pode ser decorrente do aumento da viscosidade da solução. De acordo com Michel & Kaufmann (1973) a viscosidade aumenta de forma exponencial com a concentração de PEG, decorrente das mudanças estruturais no polímero. Deste modo, quanto mais negativo o potencial, maior será a concentração de PEG da solução e conseqüentemente maior a viscosidade.

Tendo em vista que os potenciais hídricos obtidos quando a solução estava em papel de germinação foram equivalentes ao potencial-alvo e que, neste trabalho, as soluções de PEG sempre foram utilizadas em conjunto com este substrato, pode-se garantir que as sementes foram submetidas aos potenciais-alvo e que foi possível obter o gradiente de déficit hídrico proposto.

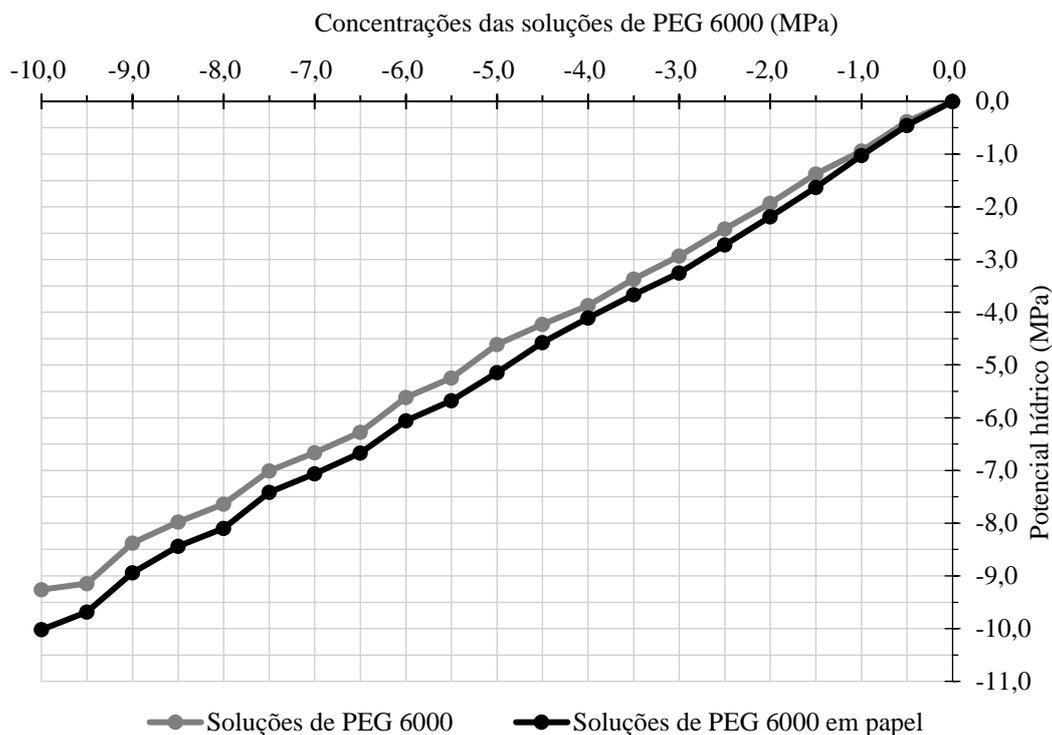


Figura 4. Potencial hídrico real das soluções de PEG 6000 avaliadas com e sem papel de germinação em relação ao potencial hídrico alvo.

4.3 Resistência de sementes *Eugenia* spp. submetidas a déficit hídrico

As sementes de *E. involucrata* submetidas a potenciais hídricos de até -1,0 MPa, germinaram acima de 70% e potenciais mais negativos impediram a germinação (figura 5). Para as sementes de *E. uniflora* não houve diferença na germinação a 0,0 e -0,5 MPa, e quando submetidas a -1,0 e -1,5 MPa a germinação manteve-se entre 39 e 61%, respectivamente.

Potenciais hídricos mais negativos que 0,0 MPa afetaram a germinação das sementes e a produção de plântulas normais de *E. brasiliensis* e *E. pyriformis*, de modo que, para *E. brasiliensis* em potenciais de até -1,5 MPa a germinação manteve-se entre 44% e 63%, porém a -0,5 MPa apenas 19% das sementes formaram plântulas. Enquanto isto, a -0,5 MPa a germinação das sementes de *E. pyriformis* foi próxima de zero e não houve formação de plântulas normais. Para nenhuma espécie houve germinação das sementes em potenciais mais negativos que -1,5 MPa. Os baixos valores de germinação de *E. pyriformis* podem sugerir que, nessa safra, as sementes foram dispersas mais imaturas, conforme apontado anteriormente.

Em água, a germinação das sementes de *E. involucrata* e *E. uniflora* concentrou-se nos primeiros 21 dias, já para *E. brasiliensis* e *E. pyriformis* o período estendeu-se aos 56 e 35 dias, respectivamente (figura 6). Potenciais inferiores a 0,0 MPa acarretaram em atraso no início da germinação e em maior distribuição ao longo do tempo, de modo que quanto mais negativo o

potencial hídrico do substrato, um maior número de dias foi necessário para que as sementes emitissem raiz primária, espalhando a germinação.

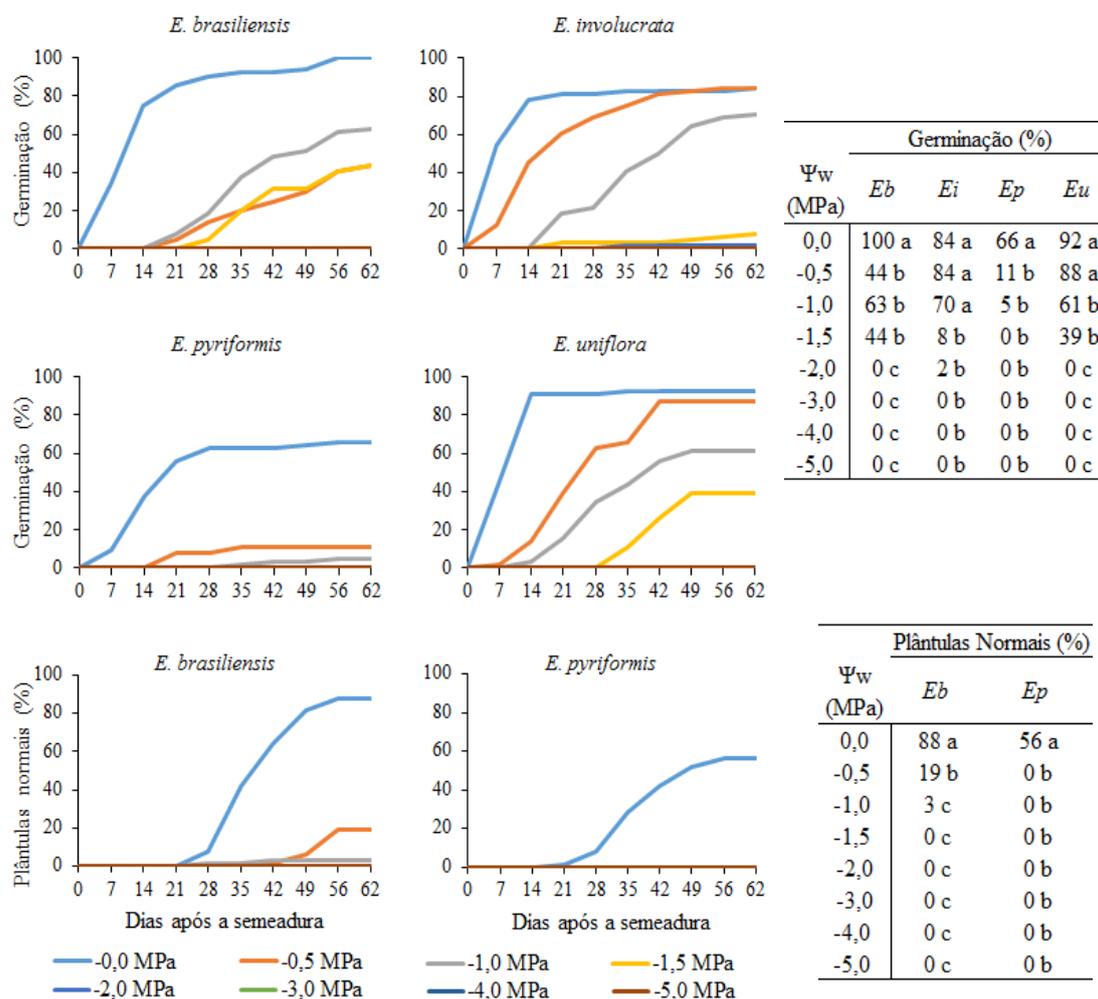


Figura 5. Germinação de sementes *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* e plântulas normais de *E. brasiliensis* e *E. pyriformis* submetidas a diferentes regimes de déficit hídrico: -0,0, -0,5, -1,0, -1,5, -2,0, -3,0, -4,0 e -5,0 MPa. Na tabela são apresentados os resultados da última avaliação, com a análise de variância para germinação (*E. brasiliensis* (Eb): $F= 59,12$, $p<0,05$; *E. involucrata* (Ei): $F= 81,71$, $p<0,05$; *E. pyriformis* (Ep): $F= 31,40$, $p<0,05$; *E. uniflora* (Eu): $F= 47,29$, $p<0,05$) e plântulas normais (*E. brasiliensis* (Eb): $F= 127,06$, $p<0,05$; *E. pyriformis* (Ep): $F= 32,40$, $p<0,05$) e os resultados do teste de Tukey a 5% (médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cada espécie).

As sementes de *E. uniflora* (Grupo 2), previamente submetidas aos potenciais hídricos de -2,0 e -3,0 MPa e que não germinaram, ao serem colocadas em substrato umedecido com água, apresentaram germinação elevada, chegando a 100% (figura 7). Até mesmo naquelas oriundas dos potenciais mais negativos, -4,0 e -5,0 MPa, verificou-se germinação superior a 50% quando retornaram para 0,0 MPa, o que foi também observado na produção de plântulas normais até -4,0, demonstrando que as sementes que não germinaram no condicionamento fisiológico continuaram viáveis e aptas a germinar assim que encontrassem água disponível.

Comportamento semelhante foi observado em *E. involucrata*. Contudo, a partir de -4,0 MPa houve redução da formação de plântulas normais, bem como da germinação.

As sementes de *E. brasiliensis* provenientes dos potenciais osmóticos de -2,0 e -3,0 MPa apresentaram germinação inferior a 35% e 15%, respectivamente, quando em substrato umedecido com água. Nos potenciais mais negativos não houve germinação. Tendo isto em vista, pode-se inferir que o condicionamento fisiológico afetou a viabilidade das sementes, visto que a testemunha (0,0 MPa) germinou 100% e até em solução osmótica de -1,5 MPa houve germinação.

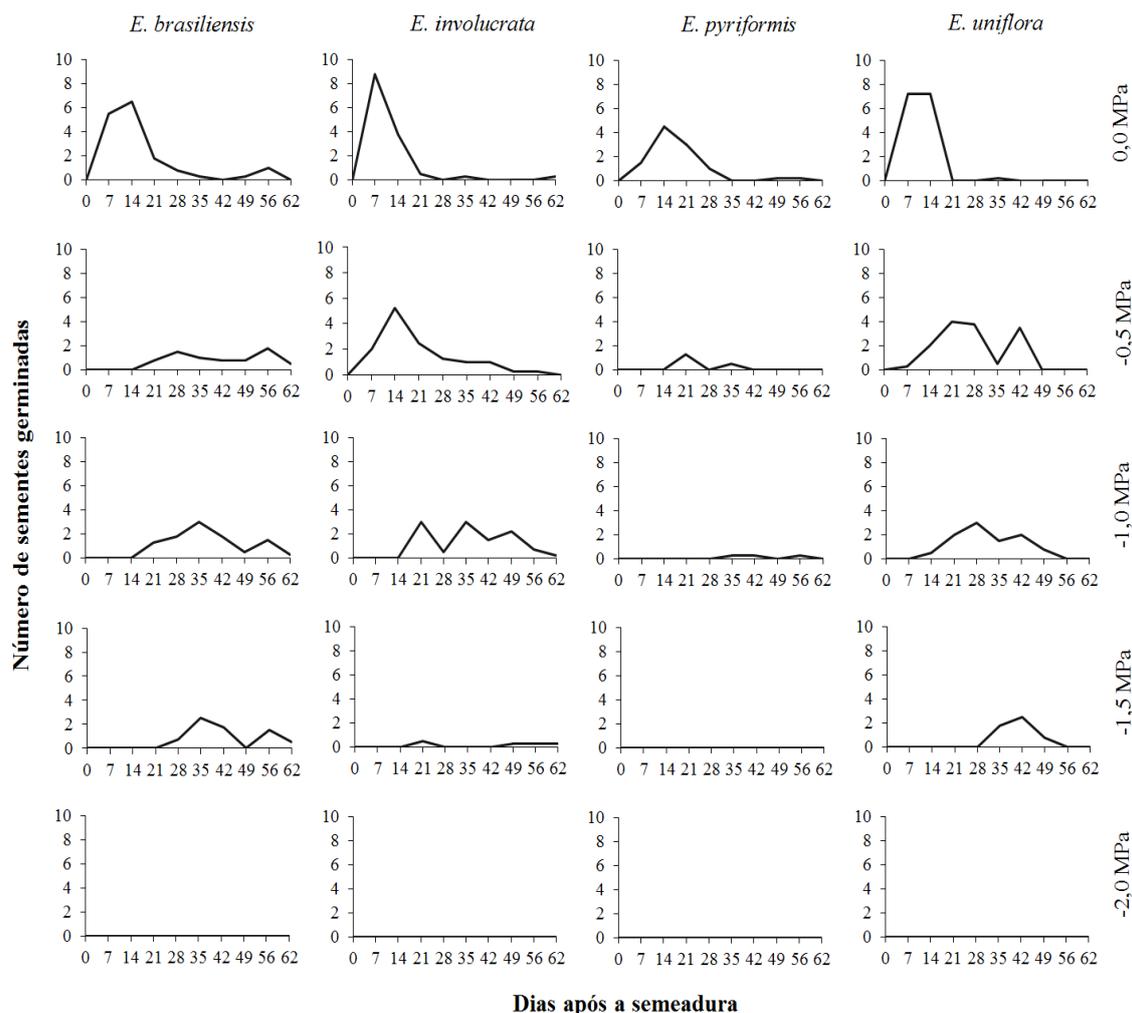


Figura 6. Distribuição temporal de frequência da germinação de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* nos tratamentos -0,0 MPa, -0,5 MPa, -1,0, -1,5 MPa e -2,0 MPa. Os valores são expressos em número médio de sementes germinadas.

Para *E. pyriformis* pôde-se observar que as sementes que não germinaram nas soluções de PEG até -2,0 MPa, ao serem colocadas em água apresentaram germinação e produziram plântulas normais. Exemplo disto são as sementes do tratamento de -1,0 MPa que na solução de PEG apresentaram germinação próxima de 0% e na água conseguiram germinar 30% e formar plântulas normais. Apesar disto, tendo-se em vista que 40% do lote já estava morto no

início do experimento, aquelas sementes ainda viáveis foram extremamente afetadas pelo condicionamento osmótico. Para nenhuma das espécies houve germinação das sementes que permaneceram por mais 30 dias em substrato umedecido com soluções de PEG (Grupo 1).

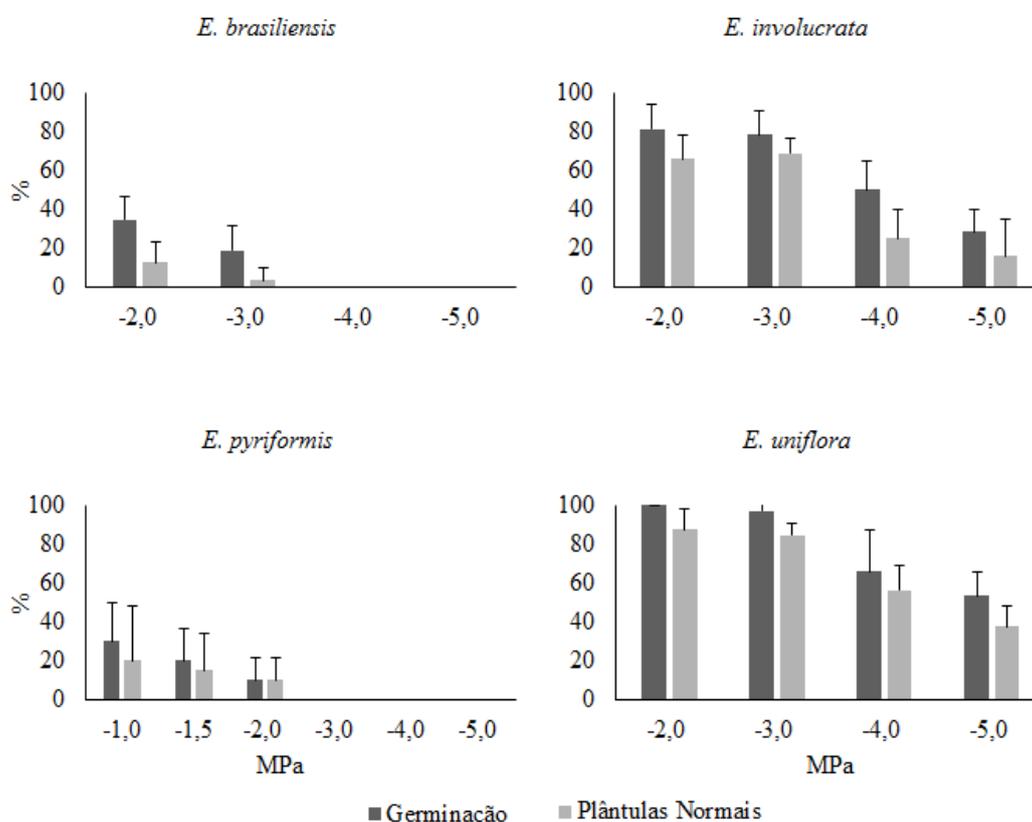


Figura 7. Germinação e plântulas normais de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora*, em água, oriundas de sementes previamente submetidas a diferentes regimes de déficit hídrico.

Quando as sementes encontravam-se em substrato com variações hídricas, de modo geral, pôde-se observar que, independente do regime de rega, a germinação das sementes de *Eugenia* foi elevada, mantendo-se acima de 70% (figura 8). Em *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* não houve diferença na germinação entre os tratamentos.

As sementes grandes de *E. pyriformis* germinaram acima de 88% em todos os tratamentos, contrastando com as sementes pequenas, que apresentaram germinação entre 40-50% em T2 e T16 e inferiores nos demais tratamentos. Isto pode ter ocorrido devido ao tamanho das sementes ou à diferença no grau de maturidade entre elas. Sementes menores podem, em alguns casos, representar sementes que não acumularam toda a massa seca necessária para seu completo desenvolvimento (Carvalho & Nakagawa 2000). Deve-se lembrar que as sementes de *E. pyriformis* não separadas por tamanho apresentaram germinação baixa em relação a outros trabalhos com a mesma espécie, por exemplo, Silva *et al.* (2003), Lamarca *et al.* (2011) e Teixeira & Barbedo (2012) observaram germinação próxima a 100%.

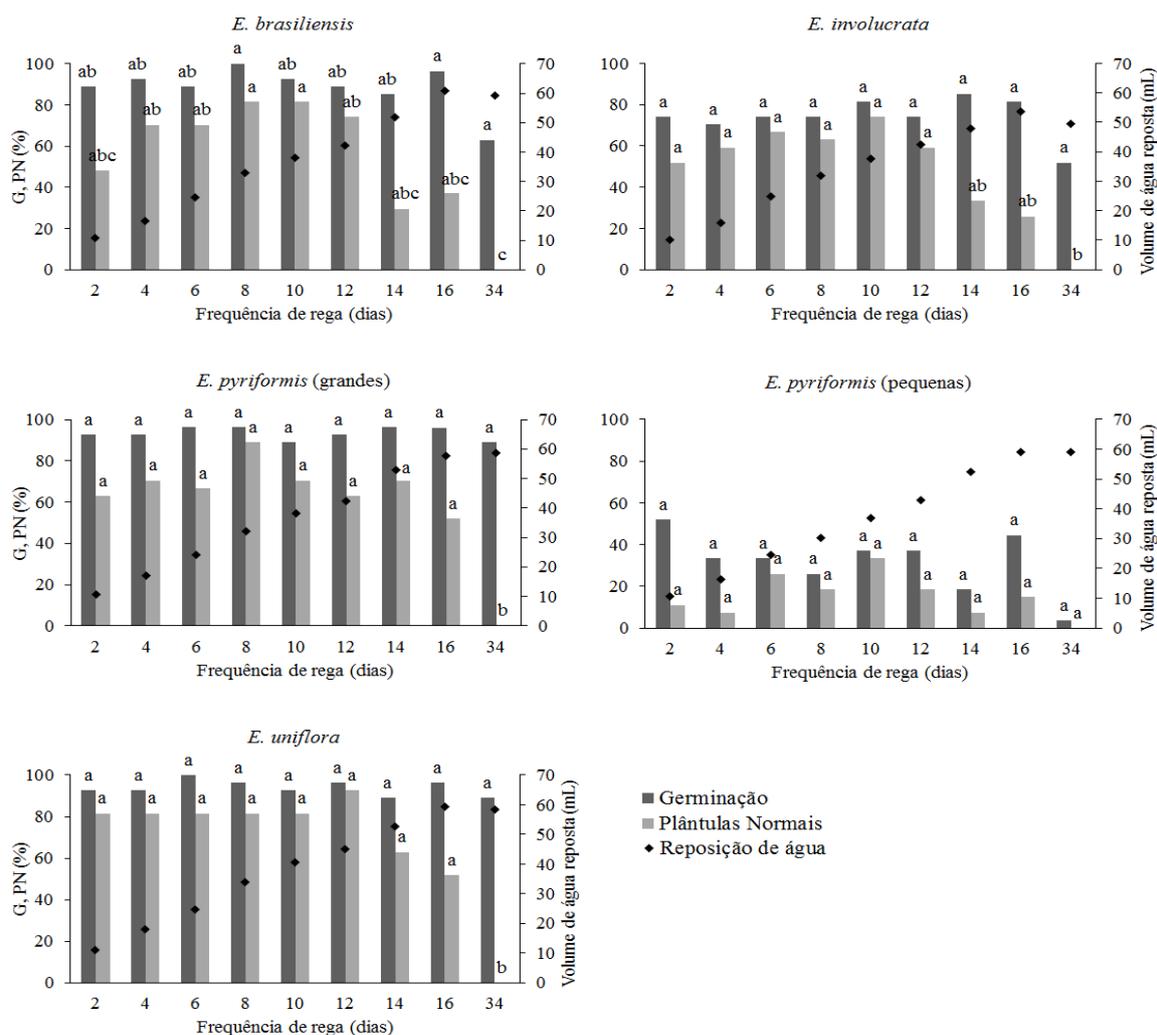


Figura 8. Germinação (G) e plântulas normais (PN) de *Eugenia brasiliensis* (G: $F=2,81$, $p<0,05$; PN: $F=7,25$, $p<0,05$), *E. involucrata* (G: $F=1,20$, $p<0,35691$; PN: $F=5,90$, $p<0,05$), *E. pyriformis* (sementes grandes (G: $F=0,48$, $p<0,85421$; PN: $F=6,36$, $p<0,05$) e pequenas (G: $F=2,11$, $p<0,08956$; PN: $F=1,76$, $p<0,15271$)) e *E. uniflora* (G: $F=0,37$, $p<0,92012$; PN: $F=8,50$, $p<0,05$) em diferentes regimes de oscilação hídrica e reposição de água do substrato em cada regime hídrico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cada espécie, pelo teste de Tukey a 5%.

Levando em consideração que no início do experimento o substrato estava saturado com água, pode-se perceber que as variações hídricas não foram suficientes para impedir ou reduzir drasticamente a germinação das sementes. Porém, o desenvolvimento de plântulas normais foi afetado. Com isto, sugere-se que as sementes conseguiram aproveitar a água disponibilizada inicialmente para iniciar a germinação e que, provavelmente, nos tratamentos em que o intervalo de rega foi maior e o substrato estava mais seco, as sementes acionaram mecanismos de proteção à perda de água. Essas sementes são recalcitrantes e, portanto, intolerantes à dessecação (Delgado & Barbedo 2007, 2012). Deste modo, evolutivamente não investiram na tolerância à dessecação para manutenção de sua viabilidade em períodos secos. Podem, por outro lado, ter investido na resistência à dessecação, com mecanismos para evitar a perda de

água em tecidos vitais, essenciais para a continuidade do desenvolvimento de plântulas quando a disponibilidade hídrica do meio se torna favorável.

A distribuição temporal de frequência (figura 9) mostrou que, além das sementes de *Eugenia* demonstrarem resistência a secas prolongadas, por outro lado não toleram tão bem o excesso de água, ou ao menos a manutenção do substrato em nível hidratado. Quando o regime de regas foi de dois em dois dias, ou até mesmo a cada quatro dias, os resultados de germinação foram inferiores, em velocidade e em porcentagem, aos das sementes mantidas em turnos de rega de seis dias ou mais. Portanto, aparentemente os mecanismos de preservação da água em tecidos essenciais parecem ser mais efetivos do que os que evitam o excesso hídrico.

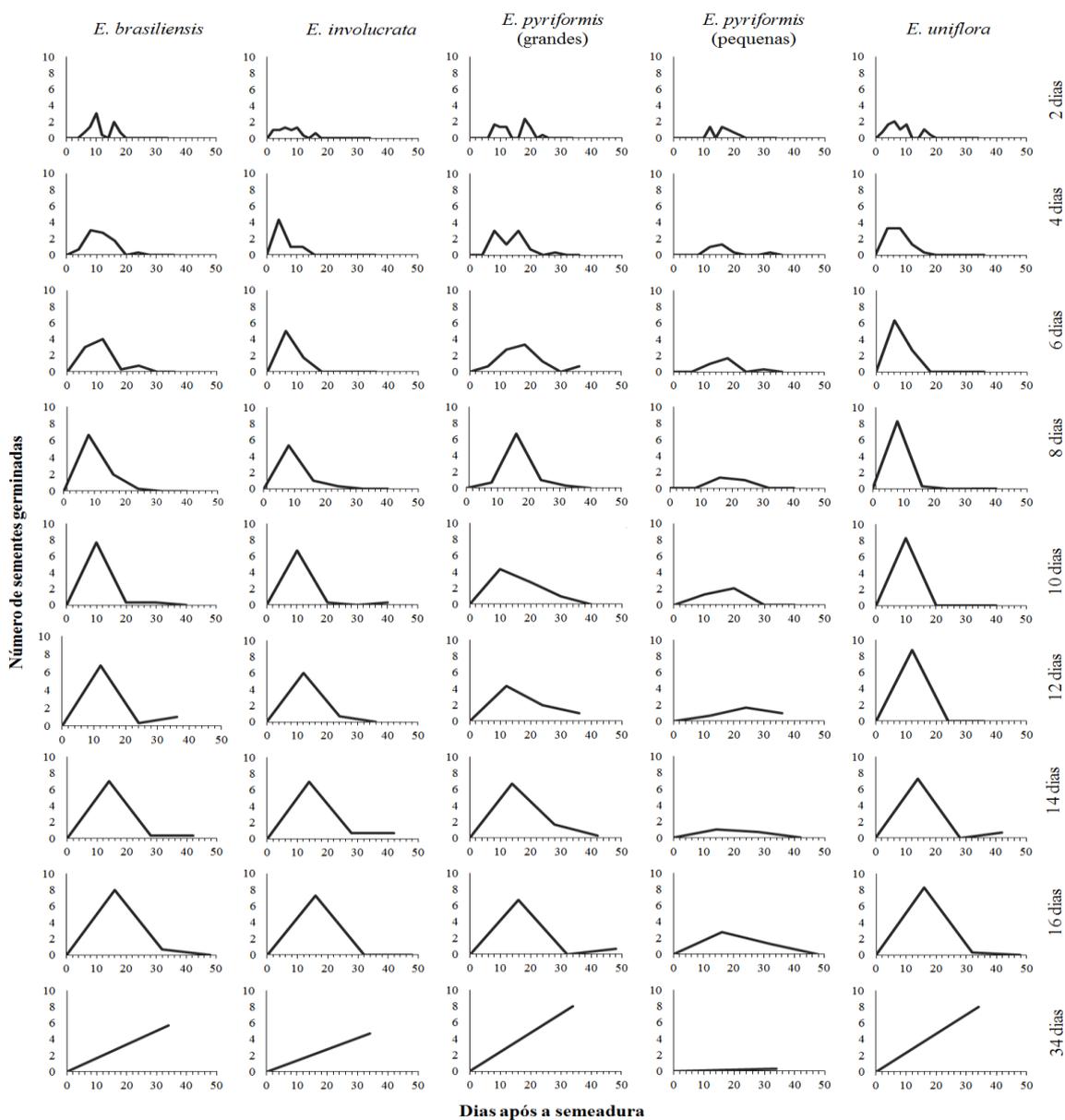


Figura 9. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* (sementes grandes e pequenas) e *E. uniflora* em diferentes regimes de oscilação hídrica (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 34 dias). Os valores são expressos em número médio de sementes germinadas.

Em relação ao substrato, pôde-se observar que com o aumento do intervalo de regas, o teor de água foi reduzido e maior quantidade de água foi necessária para saturar novamente o substrato (figura 10). Até os 16 dias a reposição de água aumenta de forma linear, já aos 34 dias há uma ligeira diminuição. Essa redução da necessidade de água pode estar relacionada ao fato do potencial hídrico do substrato (tabela 3) aos 34 dias ser muito negativo em relação ao potencial hídrico do ar e também a umidade relativa do ar (figura 11) estar sempre elevada, de modo que não havia evaporação de quantidades muito elevadas da água do substrato.

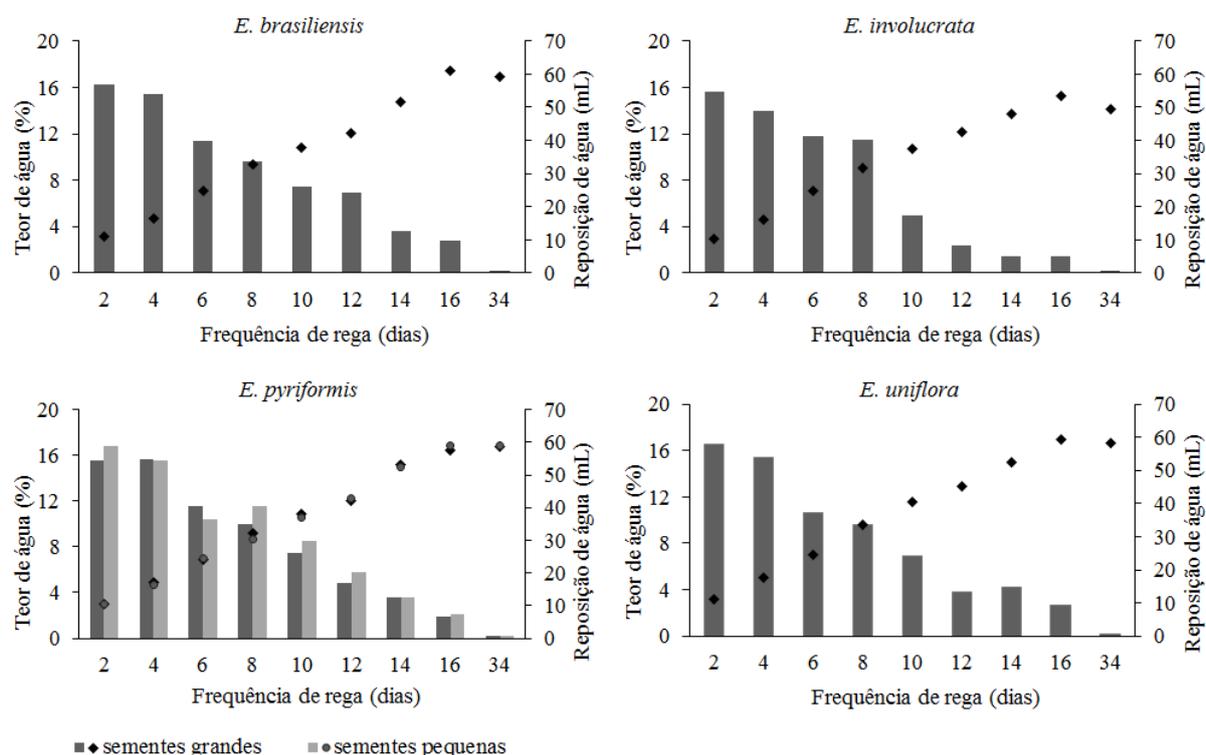


Figura 10. Teor de água (%) do substrato (areia) e quantidade de água (mL) necessária à saturação do substrato sob diferentes regimes de rega (dias).

A diminuição do teor de água e o aumento da negatividade do potencial hídrico do substrato tornam-se mais expressivos a partir dos 12 dias. De modo geral, não houve grandes diferenças no teor de água e potencial hídrico dos substratos entre as espécies (figura 10, tabela 3). Apesar da diferença de tamanho entre as sementes de *E. pyriformis* grandes e pequenas, o teor de água, o potencial hídrico e quantidade de água repostas no substrato foi semelhante. A maior diferença mostrou-se aos 34 dias, em que o potencial hídrico do substrato das sementes grandes estava em -32 MPa e das sementes pequenas em -50 MPa (tabela 3).

Tabela 3. Potencial hídrico (Ψ_w , MPa) do ar e da areia utilizada como substrato para sementes de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* (grandes e pequenas) e *E. uniflora*, avaliados em diferentes intervalos (dias) de umedecimento do substrato.

Regimes de rega (dias)		2	4	6	8	10	12	14	16	34
	Ψ_w ar	-13,1	-9,56	-10,73	-9,56	-9,56	-10,73	-7,39	-9,56	-10,58
<i>E. brasiliensis</i>		-0,17	-0,09	-0,12	-0,12	-0,15	-0,34	-0,71	-0,94	-47,51
<i>E. involucrata</i>		-0,13	-0,14	-0,14	-0,19	-0,40	-2,56	-2,29	-3,87	-50,53
<i>E. pyriformis</i> (grandes)	Ψ_w areia	-0,11	-0,09	-0,12	-0,16	-0,18	-0,41	-0,45	-1,65	-32,60
<i>E. pyriformis</i> (pequenas)		-0,09	-0,12	-0,18	-0,10	-0,17	-0,43	-0,54	-1,65	-53,98
<i>E. uniflora</i>		-0,07	-0,07	-0,16	-0,05	-0,20	-0,62	-0,47	-0,70	-49,55

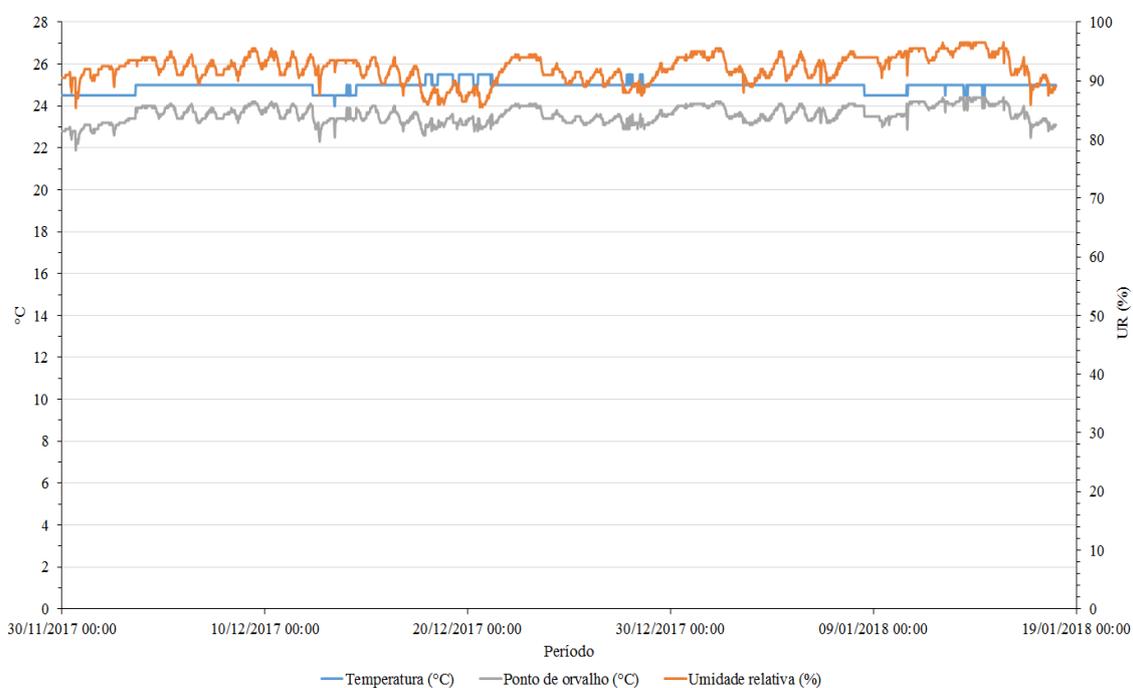


Figura 11. Temperatura (°C), umidade relativa (%) e ponto de orvalho (°C) do ar na sala de germinação em um intervalo de 48 dias.

Após 34 dias sem rega as sementes perderam a primeira germinação e apresentaram características de estarem secas, com tecidos escurecidos na superfície, como se necrosados. Após voltarem para a água, apenas as sementes de *E. pyriformis* grandes e *E. uniflora* conseguiram germinar novamente e formar plântulas normais. Portanto, foram necessários 34 dias para que se verificassem manifestações de estresse hídrico nas sementes de *Eugenia*, pois até o regime de 16 dias de rega, simulando intervalos de 16 dias sem chuva, não haveria danos evidentes à germinação e ao desenvolvimento inicial das plântulas. Tal fato sugere a existência

de mecanismos para conservar a pouca água existente no ambiente em estruturas essenciais, preservando alguns tecidos vitais.

As sementes de *Eugenia* estudadas apresentaram diferença na resistência a déficits hídricos, a qual foi evidenciada não só por meio da capacidade de germinar sob amplo espectro de potenciais hídricos, mas também na sobrevivência das sementes a estes potenciais.

Níveis distintos de tolerância à dessecação, baseados no conteúdo de água, foram observados entre as sementes do gênero *Eugenia* (Barbedo *et al.* 1998, Anjos & Ferraz 1999, Andrade & Ferreira 2000, Andrade *et al.* 2003, Delgado & Barbedo 2007, Masetto *et al.* 2008). Delgado & Barbedo (2007), identificaram três níveis críticos de teor de água, nos quais inicia-se a perda da viabilidade das sementes de *Eugenia*. De acordo com estes níveis *E. pyriformis* foi considerada a mais sensível à perda de água e *E. brasiliensis*, *E. involucrata* e *E. uniflora* apresentaram sensibilidade intermediária.

A sensibilidade à dessecação das sementes recalcitrantes não é um fator “tudo ou nada” e sim um fator quantitativo, que permite caracterizar níveis de recalcitrância (Berjak & Pammenter 2000, Walters 2000) e classificar as sementes de acordo com o potencial hídrico mínimo suportado (Walters 2000). As diferenças na tolerância à dessecação das sementes de diferentes espécies podem estar relacionadas ao nível de maturação em que se encontram quando são dispersas, pois a relação entre o potencial hídrico e os níveis de hidratação é dependente da maturidade (Vertucci & Farrant 1995, Walters *et al.* 2005). É possível, conforme os resultados observados no presente trabalho, que tal gradiente também exista para a resistência aos déficits hídricos do ambiente.

Estudo realizado por Delgado e Barbedo (2012) demonstrou que, para o mesmo teor de água, os embriões das sementes de diferentes espécies de *Eugenia* apresentam alta variação no potencial hídrico, o que poderia explicar as diferenças entre os comportamentos apresentados por essas espécies em relação a tolerância à dessecação e ao conteúdo de água. Braz & Mattos (2010) observaram redução de 50% na germinação de sementes de *Eugenia umbelliflora*, em relação ao controle, quando submetidas a potencial hídrico de -0,37 MPa, entretanto as mesmas sementes apresentaram baixa sensibilidade à secagem. Tendo isto em vista, sementes de *Eugenia* apresentam diferença não só na tolerância a dessecação, mas na resistência ao estresse hídrico.

No presente estudo verificou-se que as sementes de *Eugenia* que não são capazes de germinar durante o estresse hídrico, conseguem manter-se viáveis até determinado potencial hídrico, viabilizando a germinação e o desenvolvimento de plântulas quando há novamente disponibilidade de água no meio. Com isto, pode-se sugerir que durante o estresse a semente

desenvolve ou ativa algum processo para evitar a perda de água do embrião, mantendo-o vivo mesmo que a semente não consiga absorver água do meio.

Delgado & Barbedo (2012) observaram para seis espécies de *Eugenia*, que após a secagem os valores de potencial hídrico do embrião são sempre maiores do que aqueles apresentados para o tegumento da semente, e que supostamente há um equilíbrio higroscópico entre esses tecidos. Assim, pode-se considerar a presença de algum processo ativo com a finalidade de manter um nível mínimo de hidratação do embrião e, também, que a diferença nos potenciais hídricos entre essas partes das sementes seja uma estratégia para reduzir o risco de morte do embrião por dessecação.

Algumas espécies de clima temperado poderiam reduzir o risco de morte do embrião, dispersando suas sementes recalcitrantes durante o outono e o inverno, de modo que as baixas temperaturas e baixo déficit de pressão de vapor retardariam a perda de água (Pammenter & Berjak 2000). Provavelmente, as espécies de *Eugenia* desenvolveram seus próprios mecanismos para evitar a perda de água, dispersando suas sementes nas estações mais quentes (Delgado & Barbedo 2012).

Estudos avaliaram o efeito do estresse hídrico em sementes florestais classificadas como ortodoxas e demonstraram que, para algumas espécies, o potencial hídrico limitante no qual a germinação não ocorre se concentra em valores próximos a -1,0 MPa, como nos casos de *Bowdichia virgilioides* (-0,9 MPa, Silva *et al.* 2001), *Adenantha pavonina*, *Ateleia glazioviana* (-1,0 MPa, Fonseca & Perez 2003, Rosa *et al.* 2005) e *Anadenanthera colubrina* (-1,2 MPa, Rego *et al.* 2011). Deste modo, pode-se considerar que as sementes de *Eugenia* são bastante resistentes ao estresse hídrico, visto que algumas espécies germinam em potencial de -1,5 MPa. Além disto, sementes de *Eugenia* parecem ser mais tolerantes à dessecação do que a maioria das sementes recalcitrantes, visto que mantêm a viabilidade mesmo quando o potencial hídrico do embrião está a -20 MPa (Delgado & Barbedo 2012), e geralmente embriões de sementes recalcitrantes não toleram potenciais tão negativos quanto -15 MPa (Walters 2000).

Calvi *et al.* (2017) observaram que sementes de *Eugenia stipitata* (espécie endêmica da Amazônia) são capazes de germinar submersas em água sob diferentes profundidades e manter a viabilidade após 12 meses de submersão. Deste modo, aparentemente, sementes de *Eugenia* são resistentes tanto a falta de água quanto ao alagamento, conseguindo germinar em amplo espectro de potenciais hídricos e adaptando suas sementes às mais variadas condições. Esta variabilidade deve estar relacionada às condições ambientais nas quais as sementes são desenvolvidas, visto que isto ocorre em relação aos diferentes níveis de tolerância a dessecação entre ou dentre espécies (Berjak & Pammenter 1994, Walters 2000, Daws *et al.* 2004).

Lamarca *et al.* (2013) observaram que as variações hídricas e térmicas do ambiente durante o desenvolvimento das sementes de *Eugenia pyriformis*, influenciam não só na maturação, mas são capazes de determinar o ciclo de formação e a qualidade final da semente, o que evidencia a capacidade do ambiente de moldar o comportamento da semente. Durante o desenvolvimento e maturação dos frutos e sementes de *Eugenia*, pode-se observar ampla variação física e fisiológica (Pio *et al.* 2005, Ávila *et al.* 2009, Cardoso & Lomônaco 2003, Borges *et al.* 2010, Braz e Mattos 2010, Lamarca *et al.* 2011), o que demonstra a capacidade adaptativa do gênero para sobreviver em diversos ambientes

As características de germinação das espécies em uma comunidade podem ser determinadas não só através dos efeitos das condições ambientais típicas de um habitat, mas também, devido a origem geográfica das espécies (Baskin & Baskin 2001). De acordo com Braz & Mattos (2010) ao considerar-se que a colonização de novos habitats pode, de algum modo estar relacionada ao conservadorismo de nicho, as características das espécies estarão mais relacionadas a sua origem geográfica do que ao surgimento de novidades evolutivas que podem propiciar a ocupação de um habitat semelhante ao habitat de origem.

As espécies de florestas úmidas tropicais muitas vezes dispersam sementes ao longo de todo o ano, enquanto a maioria das espécies que ocorrem em habitats secos e/ou sazonais dispersam as sementes durante a estação seca (Oliveira 1998, Morellato *et al.* 2000). Isto foi observado para sementes de *E. umbelliflora* da restinga, que dispersam suas sementes durante a estação seca (Braz & Mattos 2010). Espécies que ocorrem em habitats secos frequentemente apresentam maior capacidade de germinar sob potenciais hídricos negativos do que àquelas de florestas úmidas (Facelli & Ladel 1996, Sy *et al.* 2001, Zheng *et al.* 2004). Porém, algumas espécies de ambientes secos também podem apresentar diminuição na germinação quando expostas a potenciais hídricos negativos. Supõe-se que, nestes casos, a germinação elevada das sementes não seria suficiente para conferir vantagens ao recrutamento em solos arenosos, pois a exposição das plântulas a baixa disponibilidade de água aumenta as taxas de mortalidade (Evans & Etherington 1990, Tobe *et al.* 2005).

A capacidade de germinar e se estabelecer em solos com baixa disponibilidade hídrica, pode aumentar a ocorrência das espécies em ambientes secos, enquanto que a elevada necessidade de água para que ocorra a germinação pode restringir a distribuição das espécies aos ambientes úmidos (Adams 1999, Sy *et al.* 2001, Schütz *et al.* 2002, Zheng *et al.* 2004). Quanto maior a amplitude de tolerância à seca maior será a plasticidade da espécie e mais ampla sua distribuição geográfica (Hartmann *et al.* 2011).

É provável que exista diferença na resistência ao estresse hídrico não somente entre sementes de *Eugenia*, mas também em relação as plântulas. Calvi *et al.* (2017) notaram maior

concentração de glutathiona dissulfeto (GSSG) em sementes de *Eugenia* que desenvolveram plântulas embaixo da água, do que naquelas que não germinaram submersas, sugerindo que o estresse por alagamento foi mais intenso para as plântulas do que para as sementes.

Considerando as diferenças na resistência ao déficit hídrico observadas nas sementes das espécies de *Eugenia* estudadas, sugere-se que caso as sementes encontrassem restrição hídrica no ambiente logo após a dispersão, *E. uniflora* e *E. involucrata* seriam menos afetadas pela falta de água no início da germinação, e assim que água estivesse disponível novamente as sementes poderiam retomar o processo germinativo. As sementes de *E. brasiliensis* poderiam garantir o desenvolvimento de alguns exemplares desde que o período de escassez não fosse prolongado.

4.4 Formação de novas raízes e plântulas em sementes de *Eugenia* spp. submetidas a déficit hídrico

Sementes de *Eugenia involucrata* germinadas durante o armazenamento e que posteriormente foram submetidas a diferentes níveis e intervalos de déficit hídrico, mantiveram-se viáveis e aptas a formar plântulas normais quando colocadas em substrato com disponibilidade de água (tabela 4). Nos potenciais hídricos mais positivos houve maior taxa de sementes viáveis do que em potenciais hídricos mais negativos. Este fato também foi observado quanto ao tempo de exposição ao déficit hídrico, de modo que as maiores taxas de sementes viáveis deram-se nos menores períodos de déficit.

Essa relação deu-se também quanto a quantidade de sementes viáveis que apresentaram algum tipo de regeneração (I, II ou III). Isto demonstra a relação entre a negatividade do substrato e a periodicidade do estresse, pois, de modo geral, quanto mais negativo o potencial hídrico e maior o tempo de exposição, mais a semente e a germinação são afetadas.

Em todos os tratamentos de déficit hídrico foi possível observar formação de novas raízes e/ou partes aéreas, após as sementes serem acondicionadas em substrato com disponibilidade hídrica (Figura 12). Em relação as categorias de regenerabilidade (Figura 13 A), notou-se que I ocorreu naquelas sementes em que houve a desidratação parcial da raiz e/ou parte aérea já existente, já II e III ocorreram em caso de morte da primeira germinação.

De modo geral a categoria I foi predominante. Em 19 dos 24 tratamentos essa categoria representou mais de 70% do total das demais categorias (figura 13 B). Aparentemente, não houve um padrão de distribuição das categorias de acordo com os tratamentos prévios de estresse hídrico, mas nota-se que a categoria III foi mais frequente nas sementes previamente submetidas a -5,0 MPa. Considerando que as categorias II e III incluem sementes que

apresentaram segunda germinação, verifica-se que o estresse hídrico pode induzir, com certa frequência, a formação de novas raízes e plântulas.

Tabela 4. Porcentagem de sementes viáveis e inviáveis após diferentes níveis (-2,0 à -5,0 MPa) e intervalos (10 à 60 dias) de estresse hídrico e porcentagem das sementes viáveis que apresentaram regeneração (formação de nova raiz e/ou parte aérea).

	Dias sob déficit hídrico	Sementes inviáveis (%)	Sementes viáveis (%)	Sementes viáveis apresentaram regeneração (%)
-2,0 MPa	10	0	100	20
	20	0	100	50
	30	10	90	70
	40	20	80	90
	50	10	90	100
	60	20	80	100
-3,0 MPa	10	0	100	20
	20	0	100	60
	30	20	80	90
	40	30	70	90
	50	10	90	100
	60	20	80	100
-4,0 MPa	10	0	100	60
	20	0	100	60
	30	40	60	100
	40	30	70	100
	50	40	60	100
	60	10	90	100
-5,0 MPa	10	0	100	70
	20	20	80	80
	30	50	50	70
	40	30	70	100
	50	80	20	100
	60	40	60	100

Durante as avaliações, um fato curioso foi observado: após a perda da primeira parte aérea (devida ao déficit hídrico), houve a emissão de uma nova parte aérea a partir de um ponto diferente (Figura 14). Isso demonstra que o déficit hídrico pode induzir as sementes de *Eugenia* a utilizarem o mecanismo de formação de novas raízes e plântulas para garantir a sobrevivência do indivíduo. Além disso, este mecanismo pode ser empregado não apenas para formar novas raízes a partir da raiz antiga mas, também, emitir parte aérea a partir desta raiz.

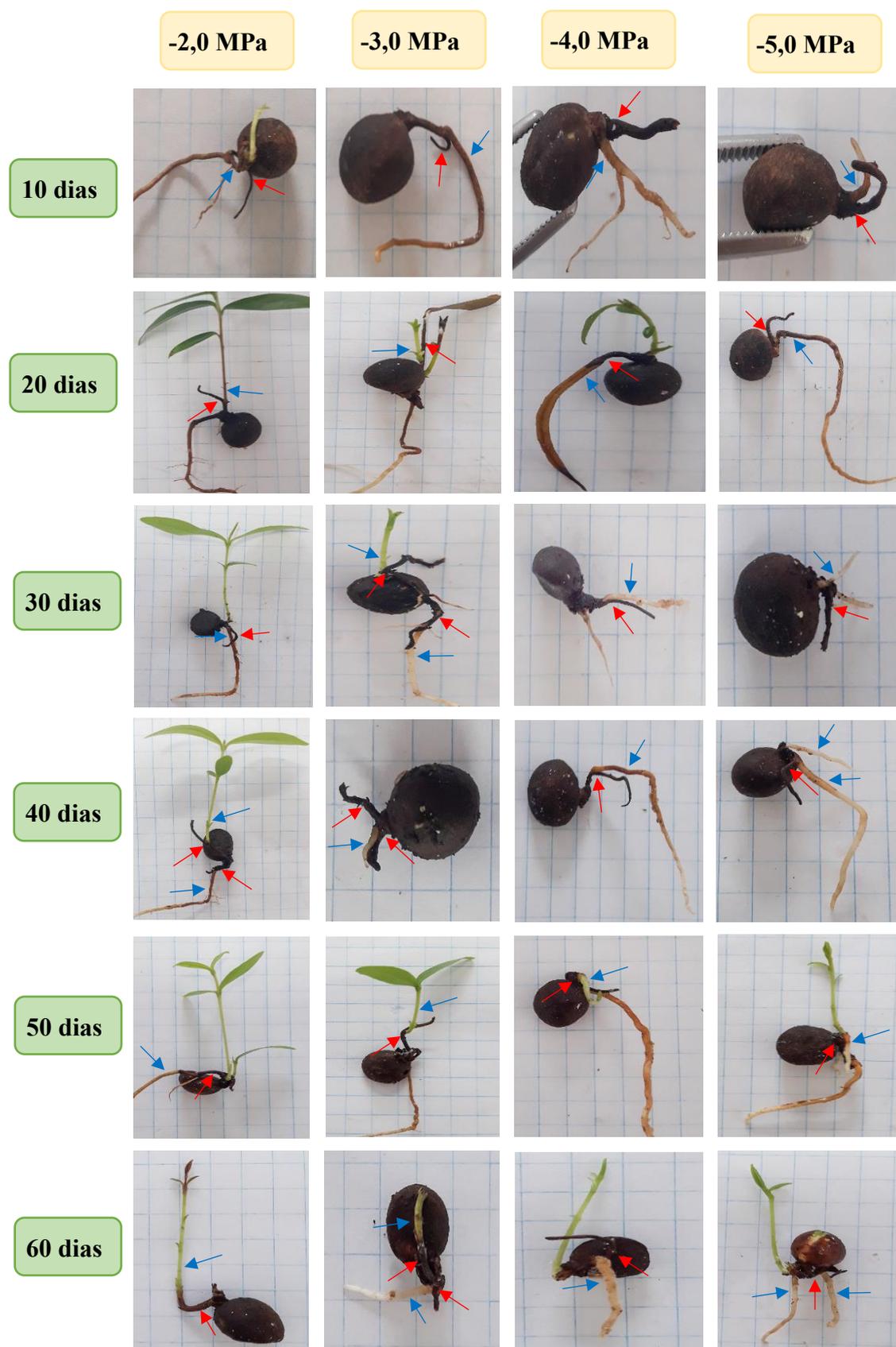


Figura 12. Figura ilustrativa demonstrando a formação de nova raiz e/ou parte aérea, após sementes germinadas de *Eugenia involucrata* serem submetidas a diferentes níveis (-2,0, -3,0, -4,0 e -5,0 MPa) e intervalos (10-60 dias) de déficit hídrico e retornarem para substrato saturado com água. Setas vermelhas indicam as raízes e partes aéreas oriundas da primeira germinação. Setas azuis indicam novas raízes e partes aéreas formadas após o período de déficit hídrico.

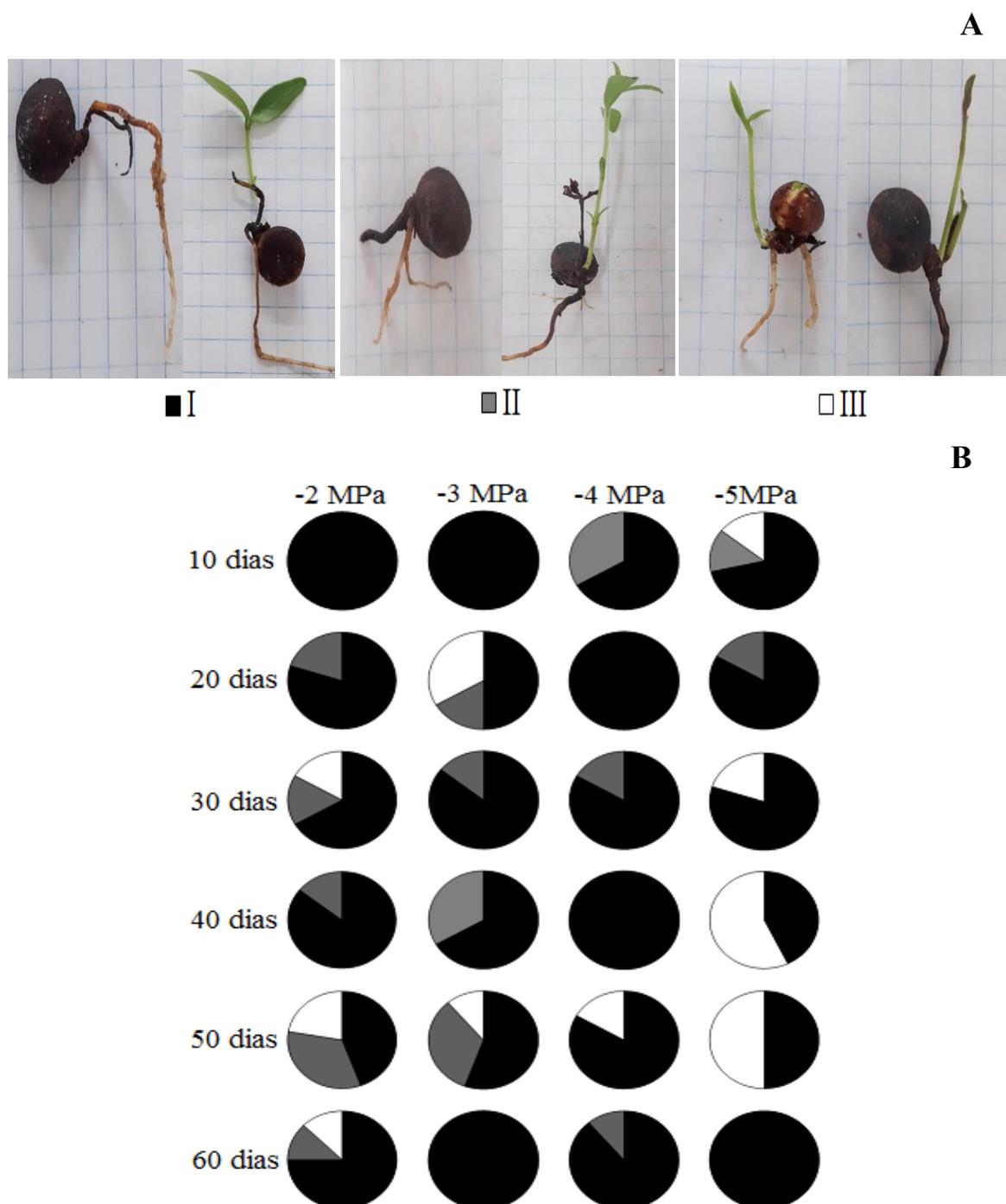


Figura 13. Categorias de regenerabilidade (A) e frequência da distribuição dos modelos (B) em sementes de *Eugenia involucrata* germinadas durante armazenamento e posteriormente submetidas a diferentes níveis (-2,0, -3,0, -4,0 e -5,0 MPa) e intervalos (10-60 dias) de déficit hídrico. I (preto): semente que apresentou crescimento de nova raiz e/ou parte aérea a partir da estrutura pré-existente oriunda da primeira germinação; II (cinza): semente que apresentou formação de nova raiz e/ou parte aérea devido à perda da primeira germinação; III: semente que apresentou formação de mais de uma nova raiz e/ou parte aérea devido à perda da primeira germinação.



Figura 14. Sementes de *Eugenia involucrata*, evidenciando emissão da parte aérea a partir da raiz (indicado pela seta vermelha)

A capacidade de produzir novas raízes e plântulas a partir de frações da mesma semente ou sementes fissuradas foi bem estudada em espécies de *Eugenia* domesticadas (*E. brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis*, *E. stipitata* e *E. uniflora*) e não domesticadas (*E. cerasiflora*, *E. pruinosa*, *E. umbelliflora*) (Anjos & Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003, 2005, Delgado *et al.* 2010, Amador & Barbedo 2011, Teixeira & Barbedo 2012, Amador & Barbedo 2015, Pratavieira *et al.* 2015). Este mecanismo também foi observado em sementes fracionadas de *Myrcianthes* (*M. coquimbensis*), *Allanblackia* (*A. parviflora*) e *Garcinia* (*G. cambogia*, *G. gummi-guta*, *G. indica*, *G. kola* e *G. xanthochymus*) (Malik *et al.* 2005, Joshi *et al.* 2006, Asomaning *et al.* 2011, Loayza *et al.* 2015, Ofori *et al.* 2015).

A formação de novas raízes e partes aéreas a partir de um tecido aparentemente necrosado em sua superfície (categoria I), ressalta a capacidade que as sementes de *Eugenia* possuem de evitar a perda de água de tecidos essenciais para a continuidade do desenvolvimento de plântulas. Isto possibilita prosseguir o desenvolvimento sem a necessidade de iniciar uma nova germinação a partir do zero, como ocorre em frações não germinantes quando as sementes são fracionadas ou quando há a perda da primeira germinação.

Quando as sementes de *Eugenia* são fracionadas há o estímulo para que a fração diferencie um novo indivíduo, semelhante ao eixo hipocótilo-radícula original (Silva *et al.* 2005). Considerando, nas sementes de *Eugenia*, que há substâncias inibidoras (Rizzini 1970, Amador & Barbedo 2011, Delgado & Barbedo 2011), que o balanço entre os inibidores e promotores da germinação governam a formação de novas raízes e partes aéreas e impedem múltiplas germinações (Amador & Barbedo 2011, 2015) e que uma nova germinação só ocorre após a perda da primeira (Teixeira & Barbedo 2012), é provável que, em uma situação de déficit hídrico em que a raiz e/ou parte aérea sofrem desidratação parcial, esses inibidores impeçam a

formação de uma nova estrutura a partir do zero, visto que não houve perda da germinação inicial, de modo que é necessário aproveitar a estrutura já existente para a nova germinação.

Estudos anteriores demonstraram que a formação de novas raízes e plântulas em *Eugenia*, ocorre somente após o fracionamento das sementes (Silva *et al.* 2003, 2005). Também foi demonstrado que, em sementes intactas (não fracionadas), há a protrusão de apenas uma raiz e o desenvolvimento de apenas uma plântula, porém quando submetidas ao fracionamento, mais de uma raiz primária ou parte aérea podem ser desenvolvidas a partir da mesma fração (Delgado *et al.* 2010). Neste estudo verificou-se não só a formação de novas raízes e plântulas em sementes intactas de *Eugenia involucrata*, mas também a formação de mais de uma dessas estruturas. É possível, portanto, que o efeito do déficit hídrico seja equivalente ao estímulo causado pela lesão quando há fracionamento e, por isso, as sementes intactas apresentaram comportamento semelhante às sementes fracionadas em relação a formação de novas estruturas.

Ressalta-se que, neste estudo, uma segunda germinação só ocorreu quando a primeira foi perdida devido ao déficit hídrico, corroborando com o observado por Teixeira & Barbedo (2012). Em sementes intactas de *Eugenia stipitata* também foi observada a formação de uma nova plântula após a eliminação da primeira germinação (Calvi *et al.* 2017), o que reforça o mecanismo de autocontrole de múltiplas germinações que essas sementes apresentam, que evita a perda das reservas em germinações simultâneas.

O sucesso reprodutivo de uma espécie está relacionado à sua dinâmica populacional, pois sua estabilidade no ambiente depende principalmente da quantidade e qualidade de seus descendentes (Wiens 1984, Wiens *et al.* 1987). Contudo, fatores limitantes podem ocorrer durante o processo reprodutivo, reduzindo sua eficiência e influenciando diretamente no recrutamento populacional como, por exemplo, a predação de flores, frutos e sementes (Cunningham 2000, Wenny 2000, Mahoro 2003, Cardoso & Lomônaco 2003).

Silva & Pinheiro (2009) observaram, em frutos e sementes de *Eugenia uniflora*, *E. neonitida*, *E. puniceifolia* e *E. rotundifolia*, elevada taxa de predação: mais de 97% das sementes de três espécies estavam consumidas. A predação deu-se, principalmente, pelo desenvolvimento de larvas de Coleoptera, Diptera e Hymenoptera dentro das sementes, mas também foi observada a predação por formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilora* Forel. Teixeira & Barbedo (2012) também notaram intenso ataque de larvas de insetos em sementes de *Eugenia cerasiflora*. Em ambos estudos verificou-se que a maior parte das sementes tiveram seu conteúdo total ou parcialmente consumido. Tendo em vista que a fauna é atraída pelos frutos carnosos das espécies de *Eugenia* e, conseqüentemente, injúrias às sementes podem ser causadas, a capacidade de formar novas raízes e partes aéreas confere alguma segurança para a reprodução, dispersão e propagação do gênero (Silva *et al.* 2003).

Aparentemente, a capacidade que as sementes de *Eugenia* possuem de formar novas raízes e plântulas foi desenvolvida ao longo da evolução, com a finalidade de repor uma perda por lesão devido a intensa predação das sementes (Silva *et al.* 2003, Delgado *et al.* 2010, Teixeira & Barbedo 2012). Considerando que essas sementes apresentam elevada resistência à falta de água e, ainda, elevada capacidade de impedir a saída de água de regiões vitais, é provável que a capacidade regenerativa dessas sementes tenha sido desenvolvida mais em função de uma adaptação à predação do que propriamente uma adaptação à déficits hídricos. Contudo, ficou evidente que, sob situação de estresse hídrico, as sementes de *Eugenia* podem utilizar-se dessa capacidade regenerativa para garantir o desenvolvimento de novas raízes e plântulas.

No presente trabalho demonstrou-se a excepcional capacidade que essas espécies desenvolveram em criar situações alternativas para fugir de estresses. Primeiramente, mostrou-se a resistência das sementes a déficits hídricos severos e prolongados e, em seguida, demonstrou-se que mesmo quando esse sistema de resistência falha é possível acionar um segundo sistema, o de regeneração de qualquer fragmento de sementes ou plântulas que tenha sobrevivido, sendo capazes de formar raiz e parte aérea novamente.

5. CONCLUSÃO

Sementes de *Eugenia* spp. apresentam grande resistência a déficits hídricos, tanto em intensidade quanto em duração, preservando tecidos vitais capazes de continuar o desenvolvimento das plântulas e garantir a propagação da espécie. Embora aparentemente a capacidade de formar novas raízes e plântulas, demonstrada por sementes de espécies de *Eugenia* que sofrem algum tipo de lesão, não seja decorrente do processo de seleção para a resistência a déficits hídricos, sementes de *Eugenia* podem, eventualmente, se utilizar dessa característica para garantir novos desenvolvimentos de plântulas quando os mecanismos de resistência à seca falham.

6. REFERÊNCIAS

- Ackerly, D.D.** 2004. Adaptation, niche conservatism, and convergence: Comparative studies of leaf evolution in the California chaparral. *The American Naturalist* 163(5): 654–671.
- Adams, R.** 1999. Germination of *Callitris* seed in relation to temperature, water stress, priming and hydration-dehydration cycles. *Journal of Arid Environments* 43(4): 437–448.
- Adegbuyi, E., Cooper, S.R. & Don, R.** 1981. Osmotic priming of some herbage grass seed using polyethyleneglycol (PEG). *Seed Science and Technology* 9: 867-878.

- Almeida, C.E., Karnikowski, M.G., Foletto, R. & Baldisserotto, B.** 1995. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista de Saúde Pública* 29(6): 428-433.
- Amador, T.S.** 2015. Estudos fitoquímicos e fisiológicos dos processos de indução da regeneração de plântulas de sementes de *Eugenia*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.
- 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* 46(8): 814-821.
- Amador, T.S. & Barbedo, C.J.** 2015. Germination inhibits the growth of new roots and seedlings in *Eugenia uniflora* and *Eugenia brasiliensis*. *Journal of Seed Science* 37(3): 241-247.
- 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* 31: 125-137.
- Andrade, R.N.B. & Ferreira, A.G.** 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) - Myrtaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 22(2): 118-125.
- Anjos, A.M.G. & Ferraz, I.D.K.** 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). *Acta Amazonica* 29(3): 337-348.
- Arantes, A.A. & Monteiro, R.** 2002. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 3(2): 111-127.
- 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(1): 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). *Ciência Florestal* 19(1): 61-68.
- Bacchi, O.** 1961. Estudos sobre a conservação de sementes. IX - Ingá. *Bragantia* 20: 805-814.
- Braccini, A.L., Reis, M.S., Moreira, M.A. & Scapim, C.A.** 1997. Avaliação das alterações bioquímicas em sementes de soja durante o condicionamento osmótico. *Revista Brasileira de Sementes* 19(1): 116-125.
- Bansal, R.P., Bhati, P.R. & Sen, D.N.** 1980. Differential specificity in water inhibition of Indian arid zone. *Biologia Plantarum* 22(5): 327-331.
- Barbedo, C.J. & Bilia, D.A.C.** 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola* 55 (Especial): 121-125.

- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1998. Tolerância a dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12(2): 145-164.
- 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* 20(1): 184-188.
- Baretta, D.** 2016. Desempenho fisiológico de cultivares de soja com regulação hídrica por manitol. *Revista Agrarian* 9(31): 34-43.
- Barroso, G.M. & Peron, V.** 1994. Myrtaceae. *In*: Lima, M.P.M. de & Guedes-Bruni, R.R. (orgs.). Reserva Ecológica de Macaé de Cima: Nova Friburgo, RJ: aspectos florísticos das espécies vasculares. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 1, pp. 261-302.
- Barroso, G.M., Peixoto, A.L., Ichaso, C.L.F., Costa, C.G., Guimarães, E.F. & Lima, H.C.** 1984. Sistemática de angiospermas do Brasil. v. 2. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, Rio de Janeiro.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M.** 2001. *Seeds: Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego.
- Berjak, P. & Pammenter, N.W.** 1994. Recalcitrance is not an all-or-nothing situation. *Seed Science Research* 4: 263-264.
- Berjak, P. & Pammenter, N.W.** 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 22-55.
- Bewley, J.D. & Black, M.** 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2 ed.: Plenum Press, New York, London.
- Borges, E.E.L. & Rena, A.B.** 1993. Germinação de sementes. *In*: Aguiar, I.B., Piña-Rodrigues, F.C.M. & Figliolia, M.B. (eds.). *Sementes Florestais Tropicais*: ABRATES, Brasília, pp. 83-135.
- Borges, E.E.L., Vasconcelos, P.C.S., Carvalho, D.V. & Borges, R.C.G.** 1991. Estudos preliminares sobre o efeito do estresse hídrico na germinação de sementes de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra*) e cedro-rosa (*Cedrela fissilis*). *Revista Brasileira de Sementes* 13(2): 115-118.
- Borges, K.C.F., Santana, D.G., Melo, B. & Santos, C.M.** 2010. Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32(2): 471-478.

- Borghetti, F. & Ferreira, A.G.** 2004. Interpretação de resultados de germinação. *In*: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, pp. 209-222.
- Braz, M.I.G. & Mattos, E.A.de.** 2010. Seed dispersal phenology and germination characteristics of a drought-prone vegetation in Southeastern Brazil. *Biotropica* 42(3): 327-335.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. & Aidar, M.P.M.** 2004. Mobilização de reservas. *In*: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, pp. 163-185.
- Calero, E., West, S.H. & Hinson, K.** 1981. Water absorption of soybean seed and associated causal factors. *Crop Science* 21(6):926-933.
- 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 stiptata*. *Seed Science Research* 27: 121-130.
- Cardoso, G.L. & Lomônaco, C.** 2003. Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. *Revista Brasileira de Botânica* 26(1): 131-140.
- Carvalho, I.R., Souza, V.Q., Follmann, D.N., Nardino, M., Schmidt, D., Pelissari, G. & Carvalho, L.F., Medeiros-Filho, S., Rossetti, A.G. & Teófilo, E.M.** 2000. Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. *Revista Brasileira de Semente* 22(1): 185-192.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ed. FUNEP, Jaboticabal.
- Castro, Y.G.P. & Krug, H.P.** 1951. Experiências sobre germinação e conservação de sementes de *Inga edulis*, espécie usada em sombreamento em cafeeiros. *Ciência e Cultura* 3: 263-264.
- Copeland, L.O. & McDonald, M.B.** 1995. Principles of seed science and technology. 2. ed. Macmillan, New York.
- Corrêa, M.P.** 1931. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. v. 2. Serviço de Informação Agrícola, Rio de Janeiro.
- Corrêa, P.C. & Júnior, P. C. A.** 1999. Uso do teste de condutividade elétrica na avaliação dos danos provocados por diferentes taxas de secagem em sementes de feijão. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 1(1): 21-26.
- Cunningham, S.A.** 2000. What determines the number of seed produced in a flowering event? A case study of *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Arecaceae). *Australian Journal of botany* 48: 659-665.

- Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C.A. & Pritchard, H.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastaneum* across Europe. *New Phytologist* 162(1): 157-166.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(2): 265-272.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2011. Atividade inibidora da germinação em extratos de sementes de *Eugenia uniflora* L. *Revista Brasileira de Sementes* 33: 463-471.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55(4): 583-590.
- 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 Science and Technology* 38(3): 624-634.
- Evans, C.E. & Etherington, J. R.** 1990. The effect of soil water potential on seed germination of some British plants. *New Phytologist* 115: 539-548.
- Facelli, J. M. & Ladel, B.** 1996. Germination requirements and response to leaf litter of four species of Eucalypt. *Oecologia* 107(4): 441-445.
- Fanti, S.C. & Perez, S.C.J.G.A.** Efeito do estresse hídrico e envelhecimento precoce na viabilidade de sementes osmocondicionadas de paineira (*Chorisia speciosa*). 2003. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(4): 537-543.
- Fanti, S.C. & Perez, S.C.J.G.A.** 2004. Processo germinativo de sementes de paineira sob estresses hídrico e salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(9): 903-909.
- Fonseca, S.C.L. & Perez, S.C.J.G.A.** 2003. Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Sementes* 25(1): 1-6.
- Garcia, R., Pereira, O.G., Altueve, S.M. & Alvarenga, E.M.** 1998. Efeito do potencial hídrico na germinação de sementes de três gramíneas forrageiras tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia* 27(1): 9-15.
- Gentil, D.F.O. & Ferreira, S.A.N.** 1999. Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). *Acta Amazonica* 29(1): 21-31.
- Gurgel, J.T.A. & Soubiê Sobrinho, J.** 1951. Poliembrião em mirtáceas frutíferas. *Bragantia* 11(4-6):141-163.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, J.R. F.T. & Geneve, R.L.** 2011. *Hartmann & Kester's Plant Propagation: principles and practices*. Prentice Hall, New Jersey.

- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Handa, S. & Handa, A.K.** 1984. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *Hortscience*, Alexandria 19(3): 371-377.
- Heywood, V. H., Brummit, R.K., Culham, A. & Seberg, O.** 2007. Flowering plant families of the world. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hobbs, P.R. & Obendorf, R.L.** 1972. Interaction of initial seed moisture and imbibitional temperature on germination and productivity of soybean. *Crop Science* 12(5): 664-667.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V. & Dias Filho, B.P.** 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(7): 1027-1031.
- ISTA.** 2015. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13: 356-513. Disponível em http://www.seedtest.org/en/international-rules-_content---1--1083.html
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H.J., Omasundaram, R. & Panneerselvam, R.** 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology* 11(1):100-105.
- Jones, H.A.** 1920. Physiological study of maple seeds. *Botanical Gazette* 69: 127-152.
- José, A.C., Silva, N.C.N., Faria, J.M.R. & Pereira, W.V.S.** 2016. Influence of osmotic conditioning of *Eucalyptus* spp. seeds in the tolerance to salt stress. *Journal of Seed Science* 38(4): 329-334.
- 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.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J.** 2007. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. 3.ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães, R.M. & Strassburg, R.S.** 2007. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. *Acta Botanica Brasilica* 21:539-551.
- 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 alfa-amylase and alfa-glucosidase. *Phytotherapy Research* 27: 1614-1620.
- Kidd, F.** 1914. The controlling influence of carbon dioxide in the maturation, dormancy and germination of seeds. Part II. *Proceedings of the Royal Society of London* 87: 609-625.
- Kohama, S., Maluf, A.M., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes* 28(1): 72-78.

- Koller, D. & Hadas, A.** 1982. Water relations in the germination of seeds. *In*: Lange, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B. & Ziegler, H. (eds.). Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, v. 12B. Physiological Plant Ecology II. Water Relations and Carbon Assimilation. Springer-Verlag, Berlin, pp. 401-431.
- Labouriau, L.G.** A germinação das sementes. 1983. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington.
- Lamarca, E.V., Prativiera, 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* 85(1): 223-233.
- Lamarca, E.V., Silva, C.V. & Barbedo, C.J.** 2011. Limites térmicos para a germinação em função da origem de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) nativas do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 25(2): 293-300.
- Landrum, L.R. & Kawasaki, M.L.** 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536.
- Legrand, C.D. & Klein, R.M.** 1969. Flora ilustrada catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí.
- Lorenzi, H.** 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas. v. 1. Plantarum, Nova Odessa, São Paulo.
- Leitão Filho, H.F.** 1993. Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão. Editora da UNESP e Editora da Universidade de Campinas, Campinas.
- Lin, S.S.** 1990. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2: 1-6.
- Loayza, P.A., Gachon, P., García-Guzmán, P., Carvajal, D.E. & Squeo, F.A.** 2015. Germination, seedling performance, and root production after simulated partial seed predation of a threatened Atacama Desert shrub. *Revista Chilena de Historia Natural* 88(1): 10.
- Lughadha, E.N. & Proença, C.** 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83(4): 480-503.
- Lughadha, E.N. & Snow, N.** 2000. Biology and Evolution of the Myrtaceae: a symposium. *Kew Bulletin* 55: 591-592.
- Mahoro, S.** 2003. Effects of flower and seed predators and pollinators on fruit production in two sequentially flowering congeners. *Plant Ecology* 166: 37-48.
- Malik, S.K., Chaudhury, R. & Abraham, Z.** (2005). Seed morphology and germination characteristics in three *Garcinia* species. *Seed Science and Technology* 33: 595-604.

- Maluf, A.M., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. *Scientia Agricola* 60(3): 471-475.
- Marcos-Filho, J., Cícero, S. M. & Silva, W.R.** 1987. Avaliação da qualidade de sementes. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Masetto, T.E., Faria, J.M.R., Davide, A.C. & Silva, E.A.A.** 2008. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg. (Myrtaceae) seeds. *Revista Brasileira de Sementes* 30(1): 175-180.
- Matias, J.R., Torres, S.B., Leal, C.C.P., Leite, M.S. & Carvalho, S.M.C.** 2018. Hydropriming as inducer of salinity tolerance in sunflower seeds. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 22(4): 255-260.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A.** 1989. The germination of seeds. 2. ed. Pergamon Press, Oxford.
- McWilliam, J.R. & Phillips, P.J.** 1971. Effect of osmotic and potentials on the availability of water for seed germination. *Australian Journal of Biological Sciences*, 24(3): 433-47.
- Michel, B.E. & Kaufmann, M.R.** 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.
- Mikusinsk, O.M.** 1987. Testes de embebição e germinação em sementes de *Ipomoea aristolochiaefolia*. *Revista Brasileira de Sementes* 9(3):103-108.
- Morellato, L.P.C., Talora, D.C., Takahasi, A., Bencke, C.C., Romera, E.C. & Zipparo, V. B.** 2000. Phenology of the Atlantic rain forest trees: a comparative study. *Biotropica* 32: 811-823.
- Núñez, L., D'Aquino, M. & Chirife, J.** 2001. Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 123-126.
- Ofori, D.A., Asomaning, J.M., Pephrah, 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* 3:89-96.
- Oliveira, P.E.** 1998. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies de cerrado. *In*: Sano, S.M. & Almeida, S.P.de. (eds.). Cerrado: ambiente e flora, EMBRAPA, Planaltina, pp. 169–188.
- Pammenter, N. W. & Berjak, P.** 2000. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. *Seed Science and Technology* 10: 301-306.
- Pepato, M.T., Folgado, V.B.B., Kettelhut, I.C. & Brunetti, I.L.** 2001. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 389-395.

- Perez, S.C.J.G. de A., Fanti, S.C. & Casali, C.A.** 2001. Influência da luz na germinação de sementes de canafístula submetidas ao estresse hídrico. *Bragantia* 60(3):155-166.
- Pio, R., Gontijo, T.C.A., Ramos, J.D. & Chalfun, N.N.J.** 2005. Características físico-químicas de frutos de pitangueira em função da altura de inserção na planta. *Revista Brasileira de Agrociência* 11(1): 105-107.
- Prange, P.W.** 1964. Estudo de conservação do poder germinativo das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Oltze. *Anuário Brasileiro de Economia Florestal* 16: 43-48.
- Prataviera, J.S., Lamarca, E.V., Teixeira, C.C. & Barbedo, C.J.** 2015. The germination success of the cut seeds of *Eugenia pyriformis* depends on their size and origin. *Journal of Seed Science* 37(1): 47-54
- Popinigis, F.** 1985. Fisiologia da semente. 2 ed. AGIPLAN, Brasília.
- Rego, S.S., Ferreira, M.M., Nogueira, A. C. & Grossi, F.** 2007. Influência de potenciais osmóticos na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan (angico-branco) - Mimosaceae. *Revista Brasileira de Biociências* 5(2):549-551.
- Rego, S.S., Ferreira, M.M., Nogueira, A. C., Grossi, F., Sousa, R.K. de, Brondani, G.E., Araujo, M.A. & Silva, A. L. L. da.** 2011. Estresse hídrico e salino na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2(4): 37-42.
- Ribeiro, J.F., Silva, J.C. & Batmanian, G.J.** 1985. Fitossociologia de tipos fisionômicos do Cerrado em Planaltina-DF. *Revista Brasileira de Botânica* 8(2): 131-142.
- Rizzini, C.T.** 1970. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 30: 381-402.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seed. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- Rodrigues, R.R. & Nave, A.A.** 2000. Heterogeneidade florística das Matas Ciliares. *In:* Rodrigues, R.R. e Leitão-Filho, H.F. Matas ciliares: conservação e recuperação. Edusp/Fapesp, São Paulo.
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S. & Pastore, G.M.** 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27(1): 53-60.
- Rosa, L.S., Felippi, M., Nogueira, A.C. & Grossi, F.** 2005. Avaliação da germinação sob diferentes potenciais osmóticos e caracterização morfológica da semente e plântula de *Ateleia glazioviana* Bail (Timbó). *Revista Cerne* 11(3): 306-314.
- Salomão, A.N. & Allem, A.C.** 2001. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. *Acta Botanica Brasilica* 15: 369-378.

- Santana, D.G. & Ranal, M.A.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. UnB, Brasília.
- Santos, P.M. & Funari, F.L.** 2002. Clima local. *In*: D.C. Bicudo; M.C. Forti, & C.E.M. Bicudo (orgs.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga: unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 29-48.
- Santos, C.M.R., Ferreira, A.G. & Áquila, M.E.A.** 2004. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. *Ciência Florestal* 14:13-20.
- Santos, A.R.F., Silva-Mann, R., Ferreira, R.A.** 2011. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.). *Revista Árvore* 35(2): 213-220.
- Scheda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E.B. & Arias, A.R.** 1987. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 21:183-186.
- Schütz, W., Milberg, P. & Lamont, B.B.** 2002. Germination requirements and seedling responses to water availability and soil type in four Eucalypt species. *Acta Oecologica* 23: 23-30.
- Silva, A.L.G. & Pinheiro, M.C.B.** 2009. Reproductive success of four species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Botanica Brasilica* 23(2): 526-534.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2005. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. *Revista Brasileira de Sementes* 27: 86-92.
- Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M. & Barbedo, C.J.** 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 213-221.
- Silva, L.M.M., Aguiar, I.B. & Rodrigues, T.J.D.** 2001. Seed germination of *Bowdichia virgilioides* Kunth, under water stress. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 5(1): 115-118.
- Souza, L.K.H., Oliveira, C.A., Ferri, P.H., Santos, S.C., Oliveira Júnior, J.G., Miranda, A.T.B., Lião, L.M. & Silva, M.R.R.** 2002. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 123-126.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H.** 2008. *Botânica Sistemática*. 2.ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Stefanello, R., Garcia, D.C., Menezes, N.L., Muniz, M.F.B. & Wrasse, C.F.** 2006. Efeito da luz, temperatura e estresse hídrico no potencial fisiológico de sementes de funcho. *Revista Brasileira de Sementes* 28(2):135-141.

- Sy, A., Grouzis, M. & Danthu, P.** 2001. Seed germination of seven Sahelian legume species. *Journal of Arid Environments* 49(4): 875–882.
- Sytsma, K.J., Litt, A., Zjhra, M.L., Pires, J.C., Nepokroeff, M., Conti, E. & Wilson, P.** 2004. Clades, clocks, and continents: historical and biogeographical analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and relatives in the Southern Hemisphere. *International Journal of Plant Sciences* 165: 85-105.
- 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* 26(3): 1069-1077.
- Tobe, K., Zhang, L. & Omasa, K.** 2005. Seed germination and seedling emergence of three annuals growing on desert sand dunes in China. *Annals of Botany* 95(4): 649-59.
- Vertucci, C. W., Farrant, J. M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In*: Kigel, J. & Galili, G. (eds.). *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York, pp. 237-271.
- Vertucci, C.W. & Leopold, A.C.** 1983. Dynamics of imbibition of soybean embryos. *Plant Physiology* 72: 190-193.
- Vieira, R.D. & Carvalho, N.M.** 1994. Testes de vigor em sementes. FUNEP, Jaboticabal.
- Villela, F.A., Filho, L.D. & Sequeira, E.L.** 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 26(11/12): 1957-1968.
- Walters, C.** 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 7-21.
- Walters, C., Hill, L.M. & Wheeler J.** 2005. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integrative and Comparative Biology* 45(5): 751-758.
- Wenny, D.G.** 2000. Seed dispersal, seed predation, and seedling recruitment of a neotropical montane tree. *Ecological Monographs* 70: 331-351.
- Wiens, D.** 1984. Ovule survivorship, brood size, life story, breeding systems, and reproductive success in plants. *Oecologia* 64: 47-53.
- Wiens, D., Calvin, C.L., Wilson, C.A., Davern, C.I., Frank, D. & Seavey, S.R.** 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. *Oecologia* 71: 501-509.
- Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Gadek, P.A., Quinn, C.J.** 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial group. *American Journal of Botany* 88: 2013-2025.
- Woodstock, L.W.** 1988. Seed imbibition: a critical period for successful germination. *Journal of Seed Technology* 12(1): 1-15.

Woodstock, L.W. & Lao, K.L.J. 1981. Prevention of injury in low vigor soybean embryonic axes by osmotic control of water uptake. *Physiologia Plantarum* 51(1): 133-139.

Yasseen, B.T. & Alomary, S.S. 1994. An analysis of the effects of water-stress on leaf growth and yield of 3 barley cultivars. *Irrigation Science* 14(3): 157-162.

Zheng, Y., Xie, Z., Gao, Y., Jiang, L., Shimizu, H. & Tobe, K. 2004. Germination responses of *Caragana korshinskii* Kom. to light, temperature and water stress. *Ecological Research* 19: 553–558.

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