

ALINE TESTONI CÉCEL

Dinâmica da deterioração de sementes recalcitrantes de
Eugenia sp. (Myrtaceae) sob variações ambientais

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e 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

2020

ALINE TESTONI CÉCEL

Dinâmica da deterioração de sementes recalcitrantes de
Eugenia sp. (Myrtaceae) sob variações ambientais

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e 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**

Cécel, Aline Testoni
C387d Dinâmica da deterioração de sementes recalcitrantes de *Eugenia*
(Myrtaceae) sob variações ambientais / Aline Testoni Cécel -- São Paulo,
2020.
101p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de
Infraestrutura e Meio Ambiente, 2020.
Bibliografia.

1. Conservação de sementes. 2. Metabolismo respiratório. 3. Mata
Atlântica. I. Título.

CDU: 631.53.01

*A minha mãe,
por me ensinar o amor pela natureza.*

Dedico

Just like the seed
I'm chasing the water
I unravel myself
Growing in slow motion
'Cause just like the seed
Everything wants to live
We are burning our fingers
But we never forget

AURORA – The See

Agradecimentos

A Natureza por tanto.

Ao meu orientador, Dr. Claudio, por todos os ensinamentos, incentivo à pesquisa e grande orientação.

Ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente e ao Instituto de Botânica de São Paulo pela oportunidade.

A Dra. Adriana Fidalgo pelos primeiros ensinamentos na área da pesquisa e orientação.

A Dra. Catarina Nievola, Dra. Roseli Bragante e Dr. Nelson dos Santos Júnior, integrantes da banca examinadora na qualificação e defesa, pelas importantes críticas e contribuições.

A grande família, em especial a meu irmão Rafael por todo apoio e companheirismo sempre, a minha mãe Cilene e a meu pai Hélio por toda ajuda e incentivo, as minhas primas e primos que tornam a vida mais leve, a minha prima Vera que me fortalece.

A minha grande companheira Gabriella por todo amor, companheirismo, incentivo e por acreditar.

As amigas Camila Alonso, Daniella Uehara, Giovanna Cancian, Higor Domingues, Isabela Amorim, Mariane Inocente, Vera Lygia, que estiveram presentes em muitos momentos dessa jornada.

As grandes mulheres, que me acompanham desde a universidade, Izabel Cesar, Marcela Conde e Thainá Cortez pela amizade que permanece.

A todos do Núcleo de Pesquisa em Sementes e de todo Instituto de Botânica que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos que já passaram pela minha vida e, de alguma forma, foram importantes nesse processo.

A Capes pela bolsa concedida.

A Fapesp pelo financiamento dos recursos de laboratório utilizados para a realização dos experimentos.

RESUMO

As sementes representam um ganho evolutivo extraordinário para as plantas, pois além de carregarem informações para o desenvolvimento de uma planta completa podem, ainda, permanecer viáveis por centenas a milhares de anos. Não há, atualmente, tecnologias que permitam prolongar o tempo de armazenamento de sementes recalcitrantes, como as de espécies de *Eugenia*, em condições artificiais viáveis econômica e funcionalmente, para incluí-las em bancos de germoplasma. Mais do que isso, não há sequer suficiente conhecimento quanto a fisiologia e os processos envolvidos na deterioração das sementes recalcitrantes. Assim, o objetivo deste trabalho foi compreender a relação entre as taxas respiratórias e a velocidade de deterioração das sementes com diferentes níveis de hidratação e sob diferentes temperaturas, visando a reduzir estas taxas de deterioração, utilizando, como modelo, duas espécies de *Eugenia*. No Capítulo 1, procurou-se desenvolver metodologia que permita avaliar as taxas respiratórias dessas sementes, ajustando-se os tempos de incubação das sementes em respirômetros e, no Capítulo 2, analisou-se as taxas respiratórias e a capacidade germinativa dessas sementes com diferentes níveis de hidratação e sob diferentes temperaturas. Os resultados obtidos no Capítulo 1 mostraram que o aumento da concentração de CO₂ a partir de 2% alterou a atmosfera em que as sementes de *E. brasiliensis* estavam incubadas, diminuindo seu metabolismo respiratório. No Capítulo 2, vimos que tanto a elevação da temperatura de incubação quanto a diminuição do teor de água das sementes de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* aumentaram suas atividades respiratórias. No entanto, sementes de *E. brasiliensis* tiveram sua longevidade favorecida com a secagem, permanecendo viáveis mesmo após 720 dias armazenadas a 8 °C em saco plástico, quando provenientes do E2. Já sementes de *E. involucrata*, apesar de também permanecerem com elevadas taxas de germinação após 720 dias, isso só foi possível quando provenientes do E2 e mantidas úmidas a 8 °C em saco plástico. Apesar do avanço no armazenamento das sementes de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, não foi possível identificar um padrão na deterioração a partir de suas taxas metabólicas, o que reforça o quão complexas são e o quanto ainda se tem a estudá-las, principalmente com relação ao seu metabolismo.

Palavras-chave: conservação de sementes, metabolismo respiratório, Mata Atlântica

ABSTRACT

The seeds represent an extraordinary evolutionary gain for the plants, because in addition to carrying information to the development of the one complete plant, they can also remain viable for hundreds to thousands of years. Currently, there are not technologies to extend the storage of recalcitrant seeds, such as those of *Eugenia* species, in economically and functionally viable artificial conditions, to include them in germplasm banks. More than that, there is not even enough knowledge about the physiology and the process involved in deterioration of recalcitrant seeds. Thus, the objective of this work was to understand the relationship between the respiratory rates and the velocity deterioration of the seeds with different levels of hydration and under different temperatures, aiming to reduce this deterioration rates, using, as a model, two species of *Eugenia*. In Chapter 1, sought to develop methodology that allows to evaluate the respiratory rates of these seeds adjusting the incubation times of the seeds in respirometers, and in Chapter 2, analyzed the respiratory rates and the germination capacity of these seeds with different levels of hydration and under different incubation temperatures. The results obtained in Chapter 1 showed that the increase in CO₂ concentration from 2% changed the atmosphere in which *E. brasiliensis* seeds were incubated, decreasing their respiratory metabolism. In Chapter 2, we saw that both the increase in the incubation temperature and the decrease in the water content of the seeds of *E. brasiliensis* and *E. involucrata* increased their respiratory activities. However, *E. brasiliensis* seeds had their longevity favored with drying remaining viable even after 720 days at 8 °C in plastic bag when coming from E2. *E. involucrata* seeds, although they also remain with high germination rates after 720 days, it was only possible when they came from E2 and kept moist at 8 °C in plastic bag. Despite the advance in the storage of *E. brasiliensis* and *E. involucrata* seeds it was not possible identify a pattern in the deterioration from their metabolic rates, which reinforces how complex they are and how much we has yet to be studied, mainly regarding to their metabolism.

Keywords: seeds conservation, respiratory metabolism, Mata Atlântica

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob diferentes concentrações de CO₂.

Figura 1. Frascos de vidro de 600 mL com fechamento hermético (A) e tampa perfurada (B), recoberta por septo de borracha (C), por onde se fez a coleta da amostra de ar (D).....

Figura 2. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (A, barras verdes), consumo de O₂ (A, barras pretas) e liberação de CO₂ (A, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (B) das sementes de *Eugenia brasiliensis* incubadas a 25 °C por 17 horas em atmosferas com diferentes concentrações de CO₂. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Figura 3. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (A, barras verdes), consumo de O₂ (A, barras pretas) e liberação de CO₂ (A, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (B) das sementes de *Eugenia brasiliensis* incubadas a 25 °C por 41 horas em atmosferas com diferentes concentrações de CO₂. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Figura 4. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (A, barras verdes), consumo de O₂ (A, barras pretas) e liberação de CO₂ (A, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (B) das sementes de *Eugenia brasiliensis* incubadas a 25 °C por 24 horas após reabertura dos frascos para normalizar a atmosfera. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Capítulo 2: Armazenamento e taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. e *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae) sob diferentes condições ambientais.

Figura 1. Frutos de *E. brasiliensis* coletados no estágio 1 (A) e no estágio 2 (C) de maturação e frutos de *E. involucrata* coletados no estágio 1 (B) e no estágio 2 (D) de maturação.....

- Figura 2.** Plântula normal de *Eugenia involucrata* (A) e esquema de uma plântula considerada normal no presente estudo, com sistema radicular presente e eófilos desenvolvidos e sem defeitos (B).....
- Figura 3.** Teor de água (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas até 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C (A) e 25 °C (B).....
- Figura 4.** Potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C (A) e 25 °C (B).....
- Figura 5.** Teor de água (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C.....
- Figura 6.** Potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C.....
- Figura 7.** Sementes de *Eugenia brasiliensis* provenientes do E1 úmidas (A) e secas (B) e provenientes do E2 úmidas (C) e secas (D), armazenadas por 120 dias em plástico a 25 °C.....
- Figura 8.** Sementes de *Eugenia brasiliensis* provenientes do E1 úmidas (A) e secas (B) e provenientes do E2 úmidas (C) e secas (D), armazenadas por 120 dias em vidro a 25 °C.....
- Figura 9.** Semente de *Eugenia brasiliensis*, armazenada por 120 dias a 25 °C, rebrotando uma nova raiz a partir da raiz seca.....
- Figura 10.** Teor de água (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas até 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C (A) e 25 °C (B).....
- Figura 11.** Potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C (A) e 25 °C (B).....
- Figura 12.** Teor de água (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C.....

Figura 13. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C.....

Figura 14. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação, calculada por O₂-CO₂ /MS (D) de sementes de *Eugenia brasiliensis* com três teores água diferentes (39, 44 e 51%) incubadas por 6 horas a 8, 15 e 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula entre teores de água e maiúscula entre temperaturas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Figura 15. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação calculada por O₂-CO₂ /MS (D) de sementes de *Eugenia brasiliensis* com três teores água diferentes (38, 44 e 50%) incubadas por 360 horas (8 e 15 °C) e 24 horas (25 e 35 °C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula entre teores de água e maiúscula entre temperaturas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Figura 16. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação calculada por O₂-CO₂ /MS (D) de sementes de *Eugenia brasiliensis* com dois teores água diferentes (44 e 51%) incubadas por 24 horas a 8, 15, 18, 21 e 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula entre teores de água e maiúscula entre temperaturas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Figura 17. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação calculada por O₂-CO₂ /MS (D) de sementes de *Eugenia involucrata* com três teores água diferentes (46, 55 e 64%) incubadas por 360 (8 e 15 °C) e 24 horas (25 e 35 °C). Não houve diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Figura 18. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação calculada por O₂-CO₂ /MS (D) de sementes de *Eugenia involucrata* com dois teores água diferentes (46 e 61%) incubadas por 24 horas a 8, 15, 18, 21 e 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula entre teores de água e maiúscula entre temperaturas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Figura 19. Árvore (A), flores – foto: Santiago Noronha (C), frutos (E) e sementes (G) de *Eugenia brasiliensis* e árvore (B), flores (D), frutos (F) e sementes (H) de *Eugenia involucrata*, destacando a semelhança física das flores, frutos e sementes das duas espécies.....

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob diferentes concentrações de CO₂.

Tabela 1. Valores de O₂ e CO₂ almeçados e registrados no interior dos frascos com sementes de *E. brasiliensis*.....

Tabela 2. Teor de água (%) e germinação (%) de sementes de *E. brasiliensis* após o período de incubação a 25 °C em diferentes atmosferas.....

Tabela 3. Simulações de alteração nas concentrações de O₂ e CO₂ em frascos fechados hermeticamente conforme a massa de sementes de *E. brasiliensis* e o período de incubação a 25 °C.....

Capítulo 2: Armazenamento e taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. e *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae) sob diferentes condições ambientais.

Tabela 1. Teor de água, germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* coletadas em 2017 e 2018 em dois estádios de maturação (E1 e E2).....

Tabela 2. Teor de água, germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* coletadas em 2017 e 2018, de dois estádios de maturação (E1 e E2) e submetidas à secagem (Úmidas e Secas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 3. Teor de água, germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* coletadas em 2017 e 2018, em dois estádios de maturação (E1 e E2) e submetidas à secagem (Úmidas e Secas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 4. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 60 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 5. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 60 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não

diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 6. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 7. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 8. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 180 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 9. Germinação (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 270 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 10. Germinação (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 540 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 11. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 12. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas

por 60 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C e 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 13. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 14. Germinação (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 180 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 15. Plântula normal (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 180 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 16. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 270 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 17. Germinação (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 360 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 18. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 540 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

Tabela 19. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.....

SUMÁRIO

Introdução geral.....	1
CAPÍTULO 1 Taxas respiratórias de sementes de <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam. (Myrtaceae) sob diferentes concentrações de CO ₂ ¹	8
ABSTRACT	9
RESUMO	9
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	13
Resultados e Discussão	16
Agradecimentos.....	24
Referências bibliográficas	25
CAPÍTULO 2 Armazenamento e taxas respiratórias de sementes de <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam. e <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Myrtaceae) sob diferentes condições ambientais.....	30
ABSTRACT	31
RESUMO	31
Introdução.....	312
Material e métodos	33
Resultados e discussão	368
Referências bibliográficas	70
Considerações finais e conclusões	77
Referências bibliográficas da Introdução geral e das Considerações finais e conclusões.....	82

Introdução geral

Sementes representam um ganho evolutivo extraordinário por carregarem informações para o desenvolvimento de uma planta completa e, ainda, permanecerem viáveis por centenas a milhares de anos (Silva *et al.* 2018). Além de ser a mais complexa e bem-sucedida forma de reprodução sexual em plantas vasculares (Linkies *et al.* 2010), as sementes estão entre os contribuintes mais importantes para o estabelecimento de aldeias, cidades e países (Barbedo *et al.* 2013). Com a mudança do hábito nômade para o sedentário e o consequente desenvolvimento da agricultura, as civilizações puderam permanecer no mesmo local por longos períodos, produzindo sua própria comida em diferentes momentos da produção de sementes. Contudo, essas sementes deveriam ser capazes de ser armazenadas por longos períodos e, portanto, serem tolerantes à dessecação (Barbedo *et al.* 2013, Barbedo 2018).

Sementes tolerantes à dessecação, ao final de seu desenvolvimento, passam por um processo de secagem natural, em que atingem um estado mínimo de hidratação. Com isso, a mobilidade de compostos nas sementes praticamente cessa, o que resulta em sua sobrevivência por longos períodos (Pagnotta & Bruni 2006, Alpert 2005). Um exemplo de espécie com sementes tolerante à dessecação é a *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) conhecida como canela-de-velho, que tem suas sementes dispersas com aproximadamente 9% de água e são tolerantes a -18 °C, podendo ser armazenadas por muitos anos (Mayrinck *et al.* 2016). Há aproximadamente 100 anos atrás, sementes de comportamento inverso a este, ou seja, intolerantes à dessecação, começaram a ser estudadas, como sementes de *Hevea brasiliensis* (Kidd 1914), *Acer saccharum* Marsh., *A. saccharinum* L. (Jones 1920) e *Inga edulis* Mart. (Castro & Krug 1951). Essas sementes não passam pela secagem natural ao final da maturação e, se secas artificialmente, perdem sua capacidade de sobrevivência.

Em 1973, Roberts observou que o período de viabilidade da maioria das sementes pode ser estendido com a diminuição de seu teor de água e da temperatura do ambiente e que isso pode ser previsível. Diante disso, as sementes que seguiam esse padrão, sendo tolerantes à dessecação e a temperaturas de congelamento e de longevidade alta e previsível, foram chamadas de ortodoxas. Já as sementes que não se enquadravam nesse padrão, ou seja, intolerantes à dessecação e a temperaturas de congelamento e, portanto, de longevidade baixa e imprevisível, foram classificadas como recalcitrantes (Roberts 1973). Atualmente, sabe-se que existe um gradiente de tolerância à dessecação entre as sementes de diferentes espécies e, além disso, que esta característica é adquirida progressivamente durante a maturação da semente (Walters 2000, Manfre *et al.* 2009, Ellis 2011).

Ao longo da maturação, diversas modificações acontecem de forma geral com as sementes. No início do desenvolvimento, quando o teor de água das sementes ainda é muito elevado, devido a intensa divisão e multiplicação celular, as taxas metabólicas e respiratórias das sementes são também elevadas. Com o aumento do acúmulo de massa seca ocorre a expansão e vacuolização celular das sementes devido a deposição de reservas como carboidratos, proteínas e lipídeos (Bewley *et al.* 2013, Marcos Filho 2015, Guardia *et al.* 2018). Na fase de maturação, características como a capacidade de germinar, a tolerância à dessecação e o vigor vão sendo adquiridas e a antecipação ou o atraso dessas aquisições resultam na grande diversidade de comportamentos das sementes. Ao final do desenvolvimento, etapa também conhecida como maturação tardia, ocorre uma acentuada perda de água das sementes (das tolerantes à dessecação) que pode chegar a 10% ou menos de água. Nesse estado, o metabolismo das sementes é quase cessado, o que aumenta sua longevidade em armazenamento (Bewley *et al.* 2013, Barbedo *et al.* 2018).

Segundo Barbedo *et al.* (2013), sementes recalcitrantes poderiam ser ortodoxas dispersas antes de completar seu desenvolvimento, ou seja, ainda imaturas. Além disso, que

essa dispersão, antecipada ou tardia, seria dependente das condições ambientais em que as sementes foram formadas. Ou seja, se a condição ambiental for favorável para germinação e desenvolvimento ao longo do ano, a espécie investiria em rápida aquisição da capacidade em germinar e produzir plântulas, mesmo em sementes bem imaturas, como visto em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Inga vera* Willd. e *Eugenia pyriformis* Cambess. (Barbedo *et al.* 2013, Barbedo 2018). Por outro lado, em ambientes com períodos do ano desfavoráveis para a germinação, a espécie investiria na aquisição de tolerância à dessecação e na longevidade, para que pudessem sobreviver em condições adversas até que o ambiente fosse favorável para seu estabelecimento (Barbedo *et al.* 2013, Barbedo *et al.* 2018 Barbedo 2018). Alguns estudos têm mostrado que essa interferência ambiental pode ainda ocorrer entre sementes da mesma espécie coletadas em diferentes regiões ou períodos, dentro, inclusive, da mesma matriz (Daws *et al.* 2004, Martins *et al.* 2009, Lamarca *et al.* 2013, Lamarca & Barbedo 2015, Lamarca *et al.* 2016).

Assim que as sementes são dispersas no ambiente estão sujeitas a diversas condições desfavoráveis à sua sobrevivência como estresse hídrico, baixas temperaturas, excesso de radiação e até mesmo competição com outras espécies (Hilhorst *et al.* 2001). O vigor das sementes, adquirido ao longo da maturação, é definido como a soma das propriedades da semente que garantem uma emergência rápida, uniforme e com desenvolvimento de plântulas normais sob uma ampla faixa de condições ambientais. Além disso, é considerado um índice do grau de deterioração fisiológica das sementes (ISTA 1981, AOSA 1983).

A deterioração é considerada qualquer transformação degenerativa da semente que acarreta, ao final do processo, a queda de seu poder germinativo (Popinigis 1977). Assim que se desprende da planta mãe, ocorre a queda progressiva na qualidade da semente (devido a deterioração), que tem seus sistemas de membranas prejudicados, com perda do controle da permeabilidade e, conseqüentemente, de eletrólitos, açúcares e muitas outras substâncias.

Além disso, mecanismos energéticos e de síntese começam a ser afetados, diminuindo taxas respiratórias e atividade de enzimas das sementes (Carvalho & Nakagawa 2000, Delouche 2002). Ao final do processo de deterioração, a germinação e o crescimento das plântulas estarão mais lentos e com baixa uniformidade de emergência, as sementes serão mais susceptíveis às adversidades ambientais e o potencial de armazenamento será reduzido (Popinigis 1977).

Apesar do processo de deterioração das sementes ser inevitável, ele pode ser minimizado com um armazenamento em condições adequadas (Carneiro & Aguiar 1993). Para tanto, a associação da redução do teor de água das sementes e da temperatura do ambiente são técnicas que contribuem para a redução da atividade metabólica e respiratória das sementes e de outros organismos a elas associados (Barbedo *et al.* 2018). Para o sucesso do armazenamento, é necessário a redução do teor de água das sementes para até pelo menos 10%, acompanhado da refrigeração ou congelamento das sementes (Marcos-Filho 2015). Contudo, esse tipo de armazenamento só é eficiente para sementes tolerantes à dessecação pois a redução da temperatura do ambiente para tecidos hidratados pode resultar em cristalização do conteúdo celular, rompendo membranas e levando as sementes à morte (Barbedo & Marcos Filho 1998). Para o armazenamento de sementes intolerantes à dessecação é importante mantê-las hidratadas ou realizar pequenas secagens, dependendo da espécie, e em temperaturas de refrigeração suportada (Marcos-Filho 2015, Barbedo *et al.* 2018).

O armazenamento de sementes é indispensável tanto para o setor agrícola quanto para programas de conservação e restauração ambiental, pois além de garantir o fornecimento de sementes para a instalação de lavouras em épocas diferentes das quais as sementes são produzidas, sendo armazenamentos de curtos a médios períodos, é fundamental para a conservação *ex situ* de espécies vegetais em bancos de germoplasma, ferramenta necessária

para a preservação da biodiversidade devido aos danos causados pela ação antrópica sobre o meio ambiente (Barbedo *et al.* 2013, FAO 2013, Silva & Ferraz 2015). Diante disso, a conservação *ex situ* (manutenção genética das espécies em condições artificiais) vem ganhando importância cada vez maior, visto que a falta de conhecimento e tecnologia não permite a utilização de muitas espécies vegetais brasileiras (Botanic Gardens Conservation International 2001, Araújo 2017).

Na ciência da conservação das sementes, o principal desafio, atualmente, é justamente a inclusão de espécies com sementes intolerantes à dessecação em bancos de germoplasma (Barbedo *et al.* 2013, 2018). Os atuais bancos de germoplasma que procuram preservar espécies de todo o mundo, como o Millenium Seed Bank e o Svalbard Global Seed Vault (Eastwood *et al.* 2015), conseguem armazenar apenas sementes tolerantes à dessecação. Já para a conservação de espécies com sementes intolerantes à dessecação, os métodos existentes atualmente envolvem a criopreservação de embriões, a cultura de tecidos e a manutenção de indivíduos adultos (Botanic Gardens Conservation International 2001, Nunes *et al.* 2012, MMA 2020). Contudo, além da utilização desses métodos exigirem mão de obra qualificada, são de custo elevadíssimo (Barbedo *et al.* 2018).

Estima-se que 20 a 25% das espécies espermatófitas existentes produzam sementes recalcitrantes e essa proporção aumenta para espécies arbóreas de florestas úmidas tropicais (Walters *et al.* 2013). Portanto, estudos que envolvam o conhecimento sobre a fisiologia e a deterioração de sementes recalcitrantes visando sua conservação são de extrema importância.

O bioma Mata Atlântica, um dos maiores e mais diversificados do Brasil, é o mais devastado e seriamente ameaçado, além de ser reconhecido como um dos 25 *hotspots* (áreas que perderam pelo menos 70% de sua biodiversidade original, mas que, juntas, abrigam mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta) de biodiversidade presentes no nosso planeta (Galindo-Leal & Câmara 2005, Barbosa & Mansano 2018).

A família Myrtaceae Juss. abrange cerca de 40% do total das espécies, com ampla distribuição em zonas tropicais e subtropicais (Souza & Lorenzi 2008) e bem representada em diversas formações vegetais do Brasil, como Cerrado e Mata Atlântica (Rodrigues & Nave 2000, Arantes & Monteiro 2002). Um dos principais e mais importantes gêneros dessa família é o *Eugenia* L., com espécies utilizadas na ornamentação urbana, na produção comercial de frutos (*in natura* ou industrializados) e na obtenção de fármacos com diversas propriedades (Schmeda-Hirschmann *et al.* 1987, Holetz *et al.* 2002, Roesler *et al.* 2007).

Dentre as espécies frutíferas nativas do Brasil, as do gênero *Eugenia* vêm despertando interesse econômico cada vez maior frente à crescente diversidade de usos descobertos para cada parte da planta. *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira) por exemplo, produz, na época natalina, frutas muito semelhantes em forma, cor e sabor às comumente importadas nesse mesmo período, mas sua produção em pomares comerciais ainda é reduzida e a espécie chegou a ser incluída nas listas das ameaçadas de extinção (Françoso & Barbedo 2016). *E. involucrata* DC., conhecida popularmente como cerejeira-do-mato ou cerejeira-do-rio-grande, é uma frutífera capaz de produzir mais de mil frutos por safra entre os meses de setembro e janeiro, dependendo da região (Carvalho 2009) e é cultivada em pomares domésticos nas regiões sul e sudeste do país (Lorenzi *et al.* 2006, Souza & Lorenzi 2008). Apesar de apresentarem potencial para cultivo em larga escala, há, ainda, necessidade de conhecer a fisiologia e os processos envolvidos na deterioração de sementes de grumixameiras e cerejeiras, uma vez que problemas quanto a conservação da viabilidade dessas sementes para produção de mudas ainda não foram solucionados.

Não há, atualmente, tecnologias que permitam prolongar o tempo de armazenamento de sementes recalcitrantes, como as de espécies de *Eugenia*, em condições artificiais viáveis econômica e funcionalmente, para incluí-las em bancos de germoplasma. Mais do que isso, não há sequer suficiente conhecimento da fisiologia dessas sementes que permita vislumbrar o

desenvolvimento dessas tecnologias em curto a médio prazo. É fundamental, portanto, que se procure compreender os processos envolvidos na deterioração das sementes recalcitrantes que as diferenciam das ortodoxas. Assim, o objetivo deste trabalho foi compreender a relação entre as taxas respiratórias e a velocidade de deterioração das sementes com diferentes níveis de hidratação e sob diferentes temperaturas, visando a reduzir estas taxas de deterioração, utilizando, como modelo, duas espécies de *Eugenia*. Essas informações poderão, de médio a longo prazo, serem essenciais para o desenvolvimento de tecnologias que permitam incluir espécies com sementes recalcitrantes em bancos de germoplasma. Para tanto, inicialmente se procurou desenvolver metodologia que permita avaliar as taxas respiratórias dessas sementes a partir de modelos desenvolvidos por Lamarca & Barbedo (2012), ajustando-se os tempos de incubação das sementes em respirômetros (capítulo 1) e, posteriormente, analisando-se as taxas respiratórias e a capacidade germinativa dessas sementes com diferentes níveis de hidratação e sob diferentes temperaturas (capítulo 2).

CAPÍTULO 1

Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae)

sob diferentes concentrações de CO₂¹

Aline Testoni Cécel² e Claudio José Barbedo^{2, 3}

¹Capítulo submetido à revista *Hoehnea*

² Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Sementes, Avenida Miguel Stéfano, 3687, São Paulo, SP, 04301-902

³ Autor para correspondência: cjbarbedo@yahoo.com.br

Título resumido: Respiração de sementes de grumixama

ABSTRACT - (Respiratory rates of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) seeds at different CO₂ concentrations). Successful seed conservation depends on reducing the metabolism of both the seeds and other associated organisms. The metabolic activity can be analyzed by the respiratory rates but it depends on the developing of methodological protocols. In addition, modified atmosphere has shown some control in respiration when O₂ and CO₂ concentrations are changed. This work evaluated the effect of changes in O₂ and CO₂ concentrations on the inhibition of the respiratory metabolism of *Eugenia brasiliensis* Lam seeds. The results showed that in atmospheres with CO₂ concentration between 2% and 3.5% it is possible to decrease the metabolism of these seeds. In addition, a model that allows controlling the factors involved in the analysis of respiratory rates in seeds is presented.

Key words: grumixama, seed conservation, respiratory metabolism, recalcitrant seeds.

RESUMO - O sucesso da conservação de sementes se resume à redução tanto do seu metabolismo quanto de outros organismos associados a elas. Uma das formas de se avaliar a intensidade metabólica é analisando-se as taxas respiratórias, mas há necessidade de se desenvolver protocolos metodológicos para isso. Além disso, atmosfera modificada tem demonstrado algum controle na respiração quando as concentrações de O₂ e CO₂ são alteradas. Neste trabalho avaliou-se o efeito da alteração das concentrações de O₂ e CO₂ na inibição do metabolismo respiratório das sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. Os resultados demonstraram que em atmosferas com concentração de CO₂ entre 2% e 3,5% é possível diminuir o metabolismo respiratório dessas sementes. Além disso, é apresentado um modelo que permite controlar os fatores envolvidos na análise das taxas respiratórias em sementes.

Palavras-chave: grumixama, conservação de sementes, metabolismo respiratório, sementes recalcitrantes.

Introdução

Sementes sensíveis à dessecação, dispersas com conteúdo elevado de água, assim como as tolerantes à dessecação coletadas ainda imaturas, apresentam menor tempo de vida útil em armazenamento, uma vez que seu metabolismo se encontra acelerado levando ao consumo de reservas e, caso não germinem, desencadeiam processos oxidativos com formação de radicais livres que aceleram sua deterioração (Barbedo *et al.* 2013, 2018).

O sucesso da conservação de sementes se resume à redução tanto do seu metabolismo, atrasando reações químicas prejudiciais à manutenção da viabilidade, quanto de outros organismos associados a elas como insetos e fungos, que acabam contribuindo para sua deterioração. Para evitar esses danos é fundamental que se reduza tanto o teor de água das sementes quanto a temperatura em que serão armazenadas (Barbedo *et al.* 2018). Contudo, quando se trabalha com sementes recalcitrantes (de elevados conteúdos de água, sensíveis a dessecação e a baixas temperaturas), os estudos sobre sua conservação ainda são inconclusivos, principalmente por ainda não terem sido desvendados os fatores que atuam em seu metabolismo durante o armazenamento (Bonjovani & Barbedo 2019). Como não se pode “desligar” esse metabolismo, as melhores condições de armazenamento devem considerar uma atividade fisiológica suficiente para mantê-las vivas e ainda evitar a germinação. Uma das formas de se avaliar a intensidade metabólica é analisando-se as taxas respiratórias, pois todo o metabolismo necessita energia. As alterações das concentrações de CO₂ e O₂ no ambiente em que as sementes se encontram podem ser úteis tanto para o diagnóstico das taxas respiratórias (aeróbicas ou não) e de outros processos de oxidação quanto para controle desse metabolismo (Ibrahim *et al.* 1983, Walters *et al.* 2001, Barbedo 2018). Na criopreservação de embriões de sementes recalcitrantes, por exemplo, que

necessitam prévia redução no teor de água, uma taxa respiratória que não ultrapasse o valor de 5.000 μmols de O_2 consumido durante o processo de secagem evita os danos comuns à dessecação de sementes recalcitrantes (Walters *et al.* 2001).

Uma atmosfera modificada rica em CO_2 e pobre em O_2 pode reduzir tanto a infestação por insetos e fungos, seja pela toxicidade causada pela alta concentração de CO_2 ou mesmo pela diminuição de seus metabolismos, como também a atividade metabólica de grãos armazenados, com redução de sua taxa respiratória e, conseqüentemente, das perdas por processos oxidativos (Aguiar *et al.* 2004, Villers *et al.* 2006). Um dos principais efeitos da baixa concentração de O_2 e elevada concentração de CO_2 é na respiração, em nível do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e na cadeia transportadora de elétrons, além de afetar a síntese e a atividade de enzimas. Para a conservação de frutas, por exemplo, a concentração adequada de cada gás varia de acordo com a espécie e o produto armazenado, mas geralmente o O_2 é reduzido a valores entre 1% e 3% e o CO_2 elevado a níveis entre 2% e 20% (Brackmann 2007). Em sementes, trabalhos realizados com arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), por exemplo, tem demonstrado algum controle na respiração quando as concentrações de O_2 e CO_2 são alteradas (Aguiar *et al.* 2015, Coelho *et al.* 2020). Contudo, na maioria das vezes o objetivo é o controle de insetos e microrganismos (Jayas & Jeyamkondan 2002), e não propriamente as taxas respiratórias das sementes.

Apesar dos diversos estudos quanto ao armazenamento de produtos vegetais sob atmosfera controlada, inclusive sementes, frequentemente os materiais são colocados em atmosfera já modificada. Pouco se conhece quanto às mudanças nas taxas respiratórias das sementes a medida em que a concentração de CO_2 é progressivamente aumentada, e/ou a de O_2 é reduzida, seja pela adição/remoção do gás ou como resultado da própria respiração das sementes. Isso dificulta diretamente dois aspectos importantes

na conservação das sementes: a análise das alterações metabólicas durante o armazenamento e o desenvolvimento de tecnologia que permita monitorar as alterações nas taxas metabólicas durante a incubação das sementes sob diferentes condições.

Em relação ao primeiro aspecto, deve-se lembrar que sementes da maioria das espécies são tolerantes à dessecação e, por isso, podem ser armazenadas com teor de água bastante reduzido, frequentemente abaixo de 8-10%. Nessa condição, o metabolismo é quase inexistente, bem como a respiração e, dessa forma, há pouquíssima redução na viabilidade das sementes (Barbedo *et al.* 2013). Contudo, para as sementes sensíveis à dessecação essa respiração torna-se um dos principais fatores a ser controlado (Ibrahim *et al.* 1983, Walters *et al.* 2001). Em relação ao segundo, quando se pretende analisar as taxas respiratórias das sementes sob diferentes condições, a alteração que a própria respiração das sementes pode promover na atmosfera da incubação pode alterar seu padrão respiratório e, até o momento, pouco se sabe sobre os limites (ou seja, as concentrações de O₂ e CO₂) até os quais esse padrão não é afetado, prejudicando a correta interpretação dos resultados específicos de cada tratamento.

E. brasiliensis Lam., a grumixameira, produz sementes sensíveis à dessecação (recalcitrantes), com capacidade de armazenamento de poucos meses (Kohama *et al.* 2006, Delgado & Barbedo 2007) e produz frutos de sabor agradável que podem ser consumidos *in natura* ou na forma de conservas e doces. Apresenta-se, portanto, como interessante material vegetal para o estudo das taxas respiratórias durante seu armazenamento, podendo auxiliar na busca por uma possível alternativa para o controle do metabolismo das sementes recalcitrantes pela modificação da atmosfera em que são armazenadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da alteração das

concentrações de O₂ e CO₂ na inibição do metabolismo respiratório das sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam.

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal - frutos de *Eugenia brasiliensis* Lam. foram coletados de matrizes do Jardim Botânico de São Paulo (23°38'21,2"S 46°37'37,1"W) e levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica (23°38'20,8"S 46°37'31,6"W) para extração, beneficiamento e lavagem das sementes em água corrente. Após a secagem superficial das sementes em bandejas forradas com papel Germitest[®], estas foram acondicionadas em saco plástico perfurado com agulha e colocadas em geladeira a 8 °C até o início dos experimentos, não ultrapassando 15 dias.

Avaliações físicas e fisiológicas - Inicialmente, as sementes foram caracterizadas quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca e germinação. O teor de água e o conteúdo de massa seca foram determinados gravimetricamente pelo método de estufa com circulação de ar forçada regulada a 103 ± 1 °C por 17 horas (Brasil 2009). Foram utilizadas 4 repetições de 10 sementes cada e os resultados foram expressos em porcentagem (base úmida) para o teor de água e em g . semente⁻¹ para o conteúdo de massa seca.

O teste de germinação foi realizado em caixas plásticas tipo Gerbox[®] com 200 ml de vermiculita saturada com água e utilizadas 4 repetições de 10 sementes cada. O material foi acondicionado em sala de germinação com temperatura constante de 25 °C, umidade relativa do ar de 90% e luz contínua. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com protrusão de raiz primária de pelo menos 5 mm de comprimento (Delgado & Barbedo 2007).

Para avaliar o consumo de O₂ e a liberação de CO₂ pelas sementes, estas tiveram sua massa fresca e volume medidos e em seguida foram colocadas em respirômetros

(frascos de 600 ml com fechamento hermético e tampa perfurada, recoberta por septo, por onde se fez a coleta da amostra de ar, como mostra a Figura 1), iniciando o experimento assim que os frascos foram fechados, assumindo uma composição atmosférica de 20,9% de O₂ e 0,03% de CO₂ (Lamarca & Barbedo 2012, Bonjovani & Barbedo 2019). As amostras de ar foram avaliadas em analisador de gases Modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsburg, USA) e o consumo de O₂ e a liberação de CO₂ foi calculado pela diferença entre os valores medidos pelo analisador e os valores da atmosfera inicial. Quando necessário, os resultados convertidos em micromols de O₂ e CO₂ pela equação de Clapeyron e expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{g massa fresca}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ (Lamarca & Barbedo 2012, Bonjovani & Barbedo 2019). O quociente respiratório (QR) também foi calculado dividindo a quantidade de CO₂ produzido pelo O₂ consumido (Kader & Saltveit 2003).

Incubação das sementes nos respirômetros com atmosfera modificada - para analisar a atividade respiratória das sementes em atmosfera modificada, almejou-se obter concentrações de 0,03% (controle), 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 3,5% de CO₂, em volume, por injeção direta de CO₂ nos respirômetros de 600 ml, com imediato fechamento hermético. Após a injeção de CO₂, e fechamento hermético dos respirômetros, as concentrações de O₂ e CO₂ foram novamente avaliadas, conforme descrito anteriormente, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 1, que ficaram muito próximos aos almejados. Os respirômetros foram, então, colocados a 25 °C, no escuro.

As avaliações das taxas respiratórias das sementes incubadas nas diferentes atmosferas foram realizadas após 17 e 41 horas. Após esse período os frascos foram abertos por alguns minutos para recompor a atmosfera normal de 20,9% de O₂ e 0,03% de CO₂ e novamente fechados, incubados a 25 °C e avaliados após 24 horas para

verificar as taxas respiratórias dessas sementes após a incubação em diferentes concentrações de CO₂.



Figura 1. Frascos de vidro de 600 mL com fechamento hermético (A) e tampa perfurada (B), recoberta por septo de borracha (C), por onde se fez a coleta da amostra de ar (D).

Tabela 1. Valores de O₂ e CO₂ almeçados e registrados no interior dos frascos com sementes de *E. brasiliensis*.

Atmosfera almeçada	Concentrações atingidas (%)	
	O ₂	CO ₂
Normal	20,9	0,0
1,0 % de CO ₂	19,5	0,9
1,5 % de CO ₂	18,3	1,4
2,0 % de CO ₂	17,9	1,9
2,5 % de CO ₂	15,9	2,6
3,5 % de CO ₂	11,8	3,7

Ao final do experimento, as sementes incubadas nas diferentes concentrações de CO₂ foram avaliadas quanto ao teor de água e germinação, como descrito anteriormente, para verificar sua viabilidade final.

Delineamento experimental e análise dos dados - utilizou-se delineamento inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância (teste F, a 5%), com médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Santana & Ranal 2004).

Resultados e Discussão

As sementes coletadas estavam com 51% de água, 0,142 g . semente⁻¹ de massa seca e 100% de germinação, valores comuns para sementes consideradas recalcitrantes e relatados por diversos autores para *E. brasiliensis* (Delgado & Barbedo 2007, Amador & Barbedo 2015, Inocente & Barbedo 2019).

Após 17 horas de incubação em atmosfera normal, as sementes apresentaram elevado consumo de O₂ (6,26% . kg massa fresca⁻¹ . hora⁻¹) e liberação de CO₂ (4,68% . kg massa fresca⁻¹ . hora⁻¹), evidenciando sua intensa atividade metabólica (Figura 2A). Esses valores correspondem, respectivamente, 1,38 e 1,03 μmol . gMF⁻¹ . h⁻¹, ou seja, pouco abaixo dos verificados para *Inga vera*, entre 2 a 3 μmol . gMF⁻¹ . h⁻¹ (Bonjovani & Barbedo 2019, Parisi *et al.* 2019), cujos embriões estão entre os com maior grau de recalcitrância (Bilia *et al.* 1998), mas bem acima dos apresentados por sementes de *Caesalpinia echinata*, em torno de 0,2 μmol . gMF⁻¹ . h⁻¹ (Lamarca & Barbedo 2012), que são ortodoxas (Barbedo *et al.* 2002). Considerando o conteúdo de água elevado e a temperatura de incubação dessas sementes é esperado que sua atividade respiratória seja elevada, uma vez que diversas reações metabólicas ocorrem nessas condições (Taiz *et al.* 2017, Barbedo *et al.* 2018). Quando sementes ortodoxas tem seu teor de água elevado, as taxas respiratórias também chegam a valores próximos aos obtidos para *E. brasiliensis*, como descrito para *Phaseolus vulgaris* L. (Bonjovani & Barbedo 2019) e *Caesalpinia echinata* (Lamarca & Barbedo 2012, Araujo & Barbedo 2017). Na atmosfera normal, o QR foi de 0,75 (Figura 2B), valor que poderia indicar a utilização de lipídeos como substrato da respiração, uma vez que a oxidação dessas moléculas produz menos CO₂ por molécula de O₂ (Tcherkez *et al.* 2003, Taiz *et al.* 2017), ou algum outro processo oxidativo diferente da respiração.

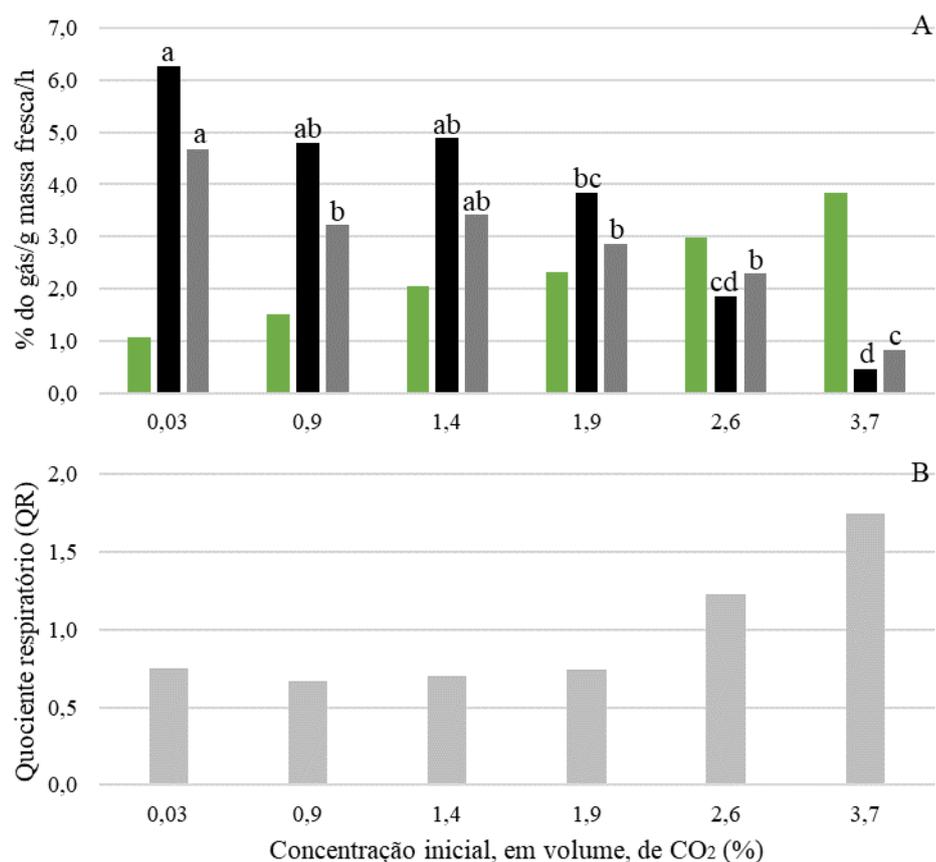


Figura 2. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (A, barras verdes), consumo de O₂ (A, barras pretas) e liberação de CO₂ (A, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (B) das sementes de *Eugenia brasiliensis* incubadas a 25 °C por 17 horas em atmosferas com diferentes concentrações de CO₂. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Alguns estudos têm demonstrado que o aumento da concentração de CO₂ pode inibir a captação de O₂ de mitocôndrias isoladas em até 15%, além de afetar a atividade de enzimas mitocondriais em tecidos vegetais (Reuveni *et al.* 1995, González-Meler *et al.* 1996a). Aparentemente, isso pode ter ocorrido com as sementes do presente trabalho quando se aumentou a concentração de CO₂, pois houve declínio no consumo de O₂, a partir da atmosfera com 2% de CO₂, mas de forma mais expressiva na atmosfera com 3,5% de CO₂, chegando a quase zerar o consumo de O₂ (0,5% . kg massa fresca⁻¹ . hora⁻¹, Figura 2A, equivalendo a 0,3 μmol . gMF⁻¹ . h⁻¹). González-Meler *et al.* (1996b)

verificaram que, ao dobrar o CO₂ atmosférico, a atividade do citocromo *c* oxidase e succinato desidrogenase (complexos proteicos que participam do transporte de elétrons) de mitocôndrias isoladas de cotilédones e raízes de *Glicine max* (Fabaceae) foi reduzida e, conseqüentemente, também foi reduzido seu metabolismo respiratório. Outros estudos relacionam a redução da atividade respiratória com a diminuição da concentração externa de O₂ (Stiles 1960, Raymond & Pradet 1980, Saglio *et al.* 1983). Estudando fatias de batata incubadas por duas horas em diferentes concentrações de O₂ (diminuindo de 40% a 1%), Geigenberger *et al.* (2000) verificaram uma contínua redução do estado energético celular com a diminuição da concentração de O₂, especialmente quando o O₂ cai para 12% ou 8%. Além disso, essa redução também resulta na inibição de atividades biosintéticas, economizando ATP e permitindo a diminuição no consumo de O₂ (Geigenberger 2003).

Após as primeiras 17 horas de incubação os valores da concentração de CO₂ nos respirômetros havia subido (Figura 2A). A partir desse ponto, com mais 24 horas de incubação as sementes tiveram redução ainda maior nas taxas de respiração e, especialmente para as sementes incubadas inicialmente com 2,0% e 2,5%, houve mudança nos valores de QR, indicando presença de reações oxidativas não respiratórias (Figura 3), como também observado por Lamarca & Barbedo (2012) para sementes de *Caesalpinia echinata*. Surpreendentemente, porém, essas reações não foram deletérias para as sementes, pois ao final da incubação todas estavam vivas e capazes de germinar (Tabela 2). Quando o substrato respiratório passou a ser ácidos orgânicos, indicado pelos valores de QR acima de 1,0, como mostra a Figura 2B (Taiz *et al.* 2017), a atmosfera com 2,5% e 3,5% também não foi prejudicial. Nesse caso, a respiração dessas sementes pode ter sido reduzida a uma concentração crítica, resultando em respiração anaeróbica ao invés de aeróbica (Kays 1991). A redução nas taxas respiratórias com o

aumento na concentração de CO₂ e redução de O₂ não se traduziu em perda da viabilidade das sementes, mas sim um provável estado de dormência ou hibernação, pois quando as sementes voltaram à atmosfera normal, voltaram a apresentar os níveis iniciais de respiração (Figura 4A), inclusive com valores de QR mais estáveis e próximos de 1,0 (Figura 4B).

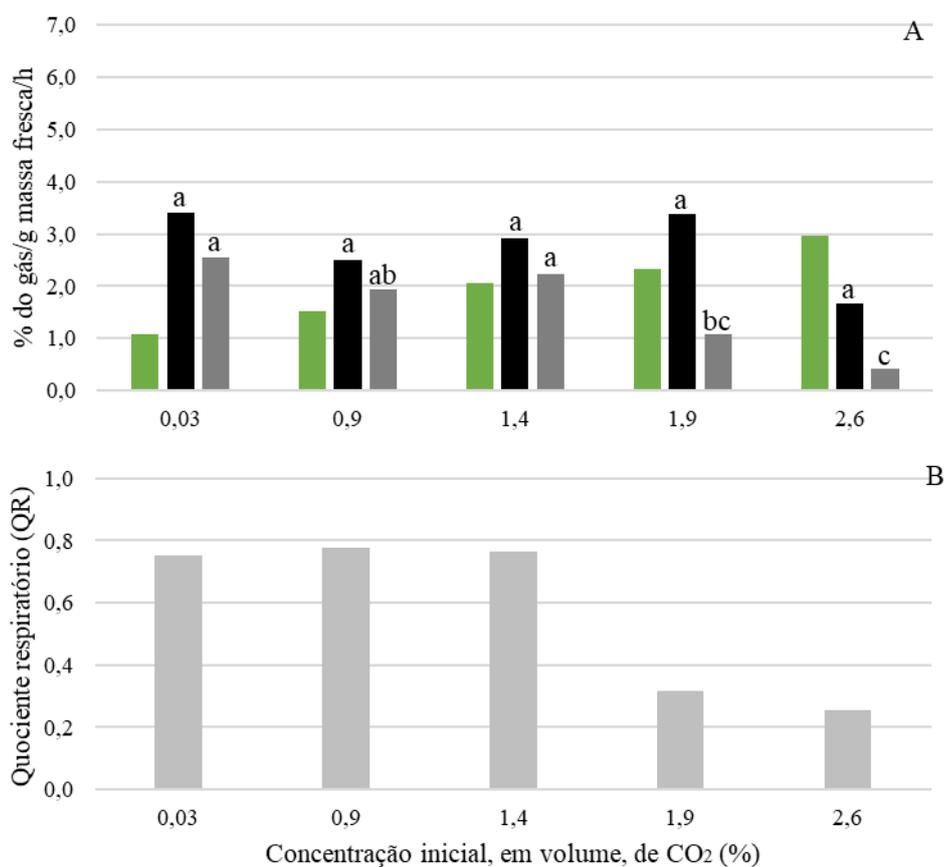


Figura 3. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (A, barras verdes), consumo de O₂ (A, barras pretas) e liberação de CO₂ (A, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (B) das sementes de *Eugenia brasiliensis* incubadas a 25 °C por 41 horas em atmosferas com diferentes concentrações de CO₂. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 2. Teor de água (%) e germinação (%) de sementes de *E. brasiliensis* após o período de incubação a 25 °C em diferentes atmosferas.

Atmosfera inicial	Teor de água (%)	Germinação (%)
0,0 % de CO ₂	45,2	100
0,9 % de CO ₂	43,3	99
1,4 % de CO ₂	45,9	99
1,9 % de CO ₂	43,5	95
2,6 % de CO ₂	47,8	99
3,7 % de CO ₂	47,4	99

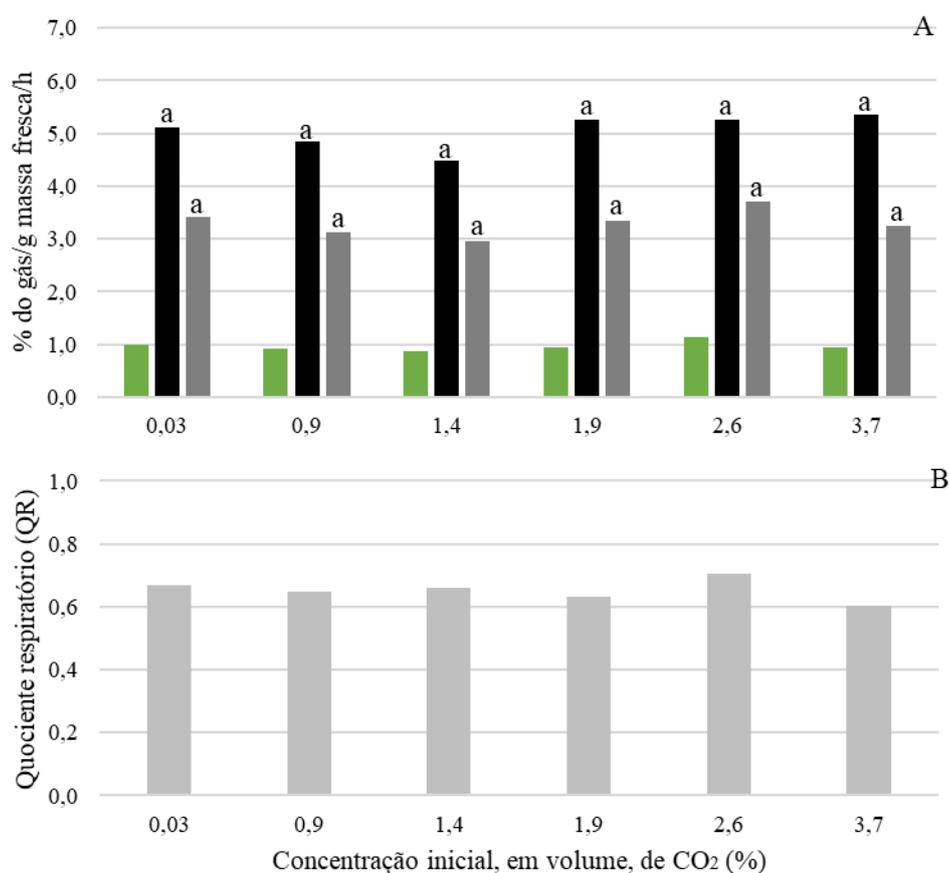


Figura 4. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (A, barras verdes), consumo de O₂ (A, barras pretas) e liberação de CO₂ (A, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (B) das sementes de *Eugenia brasiliensis* incubadas a 25 °C por 24 horas após reabertura dos frascos para normalizar a atmosfera. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

No presente estudo, as sementes de *E. brasiliensis* incubadas na concentração mais alta de CO₂ (3,5%) e mais baixa de O₂ (12%), tiveram seu metabolismo respiratório desacelerado, indicando dois aspectos importantes: o primeiro, a perspectiva de controle do metabolismo de sementes sensíveis à dessecação, durante seu armazenamento, pelo aumento da concentração de CO₂ (e/ou redução da concentração de O₂); o segundo, uma maior garantia metodológica para a análise das taxas respiratórias enquanto a concentração de CO₂ da atmosfera do respirômetro estiver abaixo de 2%, e a de O₂ acima de 18%. Neste segundo aspecto, as taxas médias observadas para aumento na concentração de CO₂ (0,0047% . gMF⁻¹ . h⁻¹) e redução de O₂ (0,0063% . gMF⁻¹ . h⁻¹) permitiram obter uma excelente estimativa da faixa de tempo em que as sementes devem permanecer incubadas para, ao mesmo tempo em que se evita valores muito pequenos, que poderiam ser incluídos na faixa de erro de medida dos gases do equipamento, também se evita que a alteração na concentração dos gases do respirômetro cause alguma alteração significativa nas taxas respiratórias das sementes incubadas. De acordo com essas taxas obtiveram-se duas equações:

- 1) $CO_{2,\%V} = 100 \cdot (MF \cdot t \cdot 0,0282) \cdot V_r^{-1}$, onde CO_{2,%V} é a concentração final de CO₂ no respirômetro, em porcentagem do volume, MF é a massa fresca em g, t é o tempo em horas e V_r é o volume do respirômetro em mL
- 2) $O_{2,\%V} = 100 \cdot (MF \cdot t \cdot 0,0378) \cdot V_r^{-1}$, onde O_{2,%V} é a concentração final de O₂ no respirômetro, em porcentagem do volume, MF é a massa fresca em g, t é o tempo em horas e V_r é o volume do respirômetro em mL.

De acordo com essas equações, algumas simulações podem ser feitas, como as da Tabela 3. Se, por exemplo, se for analisar as taxas respiratórias de sementes de *E. brasiliensis*, colocando-se 10 sementes em um respirômetro com capacidade para 500 a 1.000 mL, a 25 °C, pode-se incubá-las por 72 horas, evitando-se a margem de erro do

equipamento mas garantindo que não haverá alteração no padrão respiratório das sementes. Já em um respirômetro de 100 mL deve-se incubar por apenas 24 horas. Aumentando-se o número de sementes para 20, as 72 horas de incubação somente seria possível se se utilizar respirômetro de 1.000 mL. Pela Tabela 3 pode-se verificar diferentes situações para escolha do melhor modelo de análise das taxas respiratórias, mas é possível construir mais modelos, inclusive variando-se a temperatura. Com isso pode-se ter maior confiabilidade nos resultados e na metodologia adotada para estudos de respiração de sementes.

Tabela 3. Simulações de alteração nas concentrações de O₂ e CO₂ em frascos fechados hermeticamente conforme a massa de sementes de *E. brasiliensis* e o período de incubação a 25 °C.

Número de sementes	Massa fresca (g)	Incubação (h)	Concentração O ₂ (%)			Concentração CO ₂ (%)		
			volume do frasco (mL)			volume do frasco (mL)		
			100	500	1.000	100	500	1.000
10	3,0	24	18,2	20,4	20,6	2,0	0,4	0,2
10	3,0	72	12,7	19,3	20,1	6,1	1,2	0,6
20	6,0	12	18,2	20,4	20,6	2,0	0,4	0,2
20	6,0	72	14,6	17,6	19,3	12,2	2,4	1,2
30	9,0	12	16,8	20,1	20,5	3,0	0,6	0,3
50	15,0	12	14,1	19,5	20,2	5,1	1,0	0,5

A atmosfera modificada com altas pressões parciais de CO₂ já é muito utilizada para a conservação de frutos como maçã, pêssigo e caqui, diminuindo taxas respiratórias, retardando processos de maturação e o consumo de reservas durante o armazenamento (Donazzolo & Brackmann 2002, Jayas & Jayamkondan 2002, Nava & Brackmann 2002). No armazenamento de sementes, o uso da adição de CO₂ é usado, principalmente, por possuir um efeito tóxico na maioria dos organismos presentes nas sementes (Cirio & Lima 2003, Zardetto 2005, Aguiar *et al.* 2010), além de ser eficiente na manutenção do vigor e longevidade das sementes durante o armazenamento (Aguiar *et al.* 2012). No presente trabalho se verificou que em atmosferas com concentração de

CO₂ entre 2% e 3,5% é possível diminuir o metabolismo respiratório das sementes de *Eugenia brasiliensis*. Isso pode trazer importante contribuição para o desenvolvimento de tecnologia que permita armazenar sementes recalcitrantes por longos períodos que, atualmente, é o maior desafio para os profissionais da conservação de sementes em bancos de germoplasma.

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica, pela permissão para as coletas; ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, pela oportunidade do curso de mestrado da primeira autora; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida à primeira autora.

Referências bibliográficas

- Aguiar, R.W.S., Sarmiento, R.A., Vieira, S.M. & Didonet, J.** 2004. Controle de pragas em grãos armazenados utilizando atmosfera modificada. *Bioscience Journal* 20: 21-27.
- Aguiar, R.W.S., Faroni, L.D'A., Guedes, R.N.C., Sousa, A.H. & Rosado, A.F.** 2010. Toxicidade da combinação de dióxido de carbono e fosfina sob diferentes temperaturas para *Tribolium castaneum*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 08, p. 32-129, 2010.
- Aguiar, R.W.S., Brito, D.R., Ootani, M.A., Fidelis, R.R. & Peluzio, J. N.** 2012. Efeito do dióxido do carbono, temperatura e armazenamento sobre sementes de soja e micoflora associada. *Revista Ciência Agronômica* 43: 554-560.
- Aguiar, R.W.S., Brito, D.R., Lopes, M.M., Silva, R.R., Fidelis, R.R., Sousa, C.M. & Santos, G.R.** 2015. Effect of carbon dioxide on quality of rice seeds. *Bioscience Journal* 31: 1413-1422.
- 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: 241-247.
- Araujo, A.C.F.B. & Barbedo, C.J.** 2017. Changes in desiccation tolerance and respiratory rates of immature *Caesalpinia echinata* Lam. seeds. *Journal of Seed Science* 39: 123-132.
- Barbedo, C.J.** 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science* 40: 221-236.
- Barbedo, C.J., Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40: 583-593.

- Barbedo, C.J., Silva, J.P.N., Françoso, C.F. & Parisi, J.J.D.** 2018. Armazenamento de sementes. *In*: Barbedo, C.J. & Santos-Junior, N.A. (eds.) Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira. Instituto de Botânica/ SMA, São Paulo, pp. 81-108.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância  dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Botânica* 2: 431-439.
- Bilia, D.A.C., Marcos Filho, J. & Novembre A.D.C.L.** 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20: 48-54.
- Brackmann, A.** 2007. Uso da atmosfera controlada é recente no Brasil. *Visão Agrícola*: 50-52.
- Brasil.** 2009. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília.
- Cirio, G.M. & Lima, M.L.R.Z.C.** 2003. Métodos de detecção do gnero *Aspergillus* em sementes de milho (*Zea mays* L.) em 270 dias de armazenamento. *Visão Acadmica* 4: 19-23.
- Coelho, S.R.M., Alves Filho, E.G., Silva, L.M.A., Bischoff, T.Z., Ribeiro, P.R.V., Zocolo, G.J., Canuto, K.M., Bassinello, P.Z. & Brito, E.S.** 2020. NMR and LC-MS assessment of compound variability of common bean (*Phaseolus vulgaris*) stored under controlled atmosphere. *LWT - Food Science and Technology* 117: 108673.
- Delgado, L.F., Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância  dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 265-272.

- Donazzolo, J & Brackmann, A.** 2002. Efeito do co2 em atmosfera controlada na qualidade de caqui (*Diospyros kaki*, L.) cv. Fuyu. Revista Brasileira de Agrociência 8: 241-245.
- Geigenberger, P.** 2003. Response of plant metabolism to too little oxygen. Current Opinion in Plant Biology: 247-256.
- Geigenberger, P., Fernie, A.R., Gibon, Y., Christ, M. & Stitt, M.** 2000. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. Journal of Biological Chemistry 381: 723-740.
- González-Meler, M.A., Drake, B.G. & Azcón-Bieto J.** 1996a. Rising atmospheric carbon dioxide and plant respiration. *In*: Breymeyer, A.I., Hall, D.O., Melillo, J.M. & Agren, G.I. (eds.) Global change: effects on coniferous forests and grasslands. John Wiley & Sons, Reino Unido, pp. 161-181.
- González-Meler, M.A., Ribas-Carbo, M., Siedow, J.N. & Drake, B.G.** 1996b. Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO₂. Plant Physiology 112: 1349-1355.
- Ibrahim, A.E., Roberts, E.H. & Murdoch, A.J.** 1983. Viability of lettuce seeds II. Survival and oxygen uptake in osmotically controlled storage. Journal of Experimental Botany 34: 631-640.
- Inocente, M.C. & Barbedo, C.J.** 2019. Germination of *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis*, and *E. uniflora* (Myrtaceae) under water-deficit conditions. Journal of Seed Science 41: pp. 76-85.
- Jayas, D.S., & Jeyamkondan. S.** 2002. Modified atmosphere storage of grains meats fruits and vegetables. Biosystems Engineering 82: 235-251.

- Kader, A.A. & Saltveit, M.E.** 2003. Respiration and gas exchange. *In*: Bartz, J.A. & Brecht, J.K. (eds.) Postharvest physiology and pathology of vegetables. 2 ed. Marcel Deckker, New York, pp. 7-29.
- Kays, S. J.** 1991. Postharvest physiology of perishable plant products. Van Nostrand Reinhold, New York.
- 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: 72-78.
- Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J.** 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. Hoehnea 39: 577-586.
- Nava, G.A. & Brackmann, A.** 2000. Armazenamento de pêssegos (*Prunus persica* (L.) batsch), cv. Chiripá, em atmosfera controlada. Revista Brasileira de Fruticultura 24: 328-332.
- Parisi, J.J.D., Biagi, J.D., Barbedo, C.J. Medina, P.F., Lamarca, E.V.** 2019. Respiratory rates of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D.Penn. seeds. Floresta e Ambiente 26: e20171033.
- Raymond, P. & Pradet, A.** 1980. Stabilisation of the adenine nucleotide ratios at various values by an oxygen limitation in germinating lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. Biochemical Journal 190: 39-44.
- Reuveni, J., Gale, J. & Mayer, A.M.** 1995. High ambient carbon dioxide does not affect respiration by suppressing the alternative cyanide-resistant respiration. Annals of Botany 76: 291-295.
- Saglio, P.H., Raymond, P. & Pradet, A.** 1983. Oxygen transport and root respiration of maize (*Zea mays*) seedlings: a quantitative approach using the correlation between

- ATP:ADP and the respiration rate controlled by oxygen tension. *PlantPhysiol* 72: 1035-1039.
- Santana, D.G. & Ranal, M.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Universidade de Brasília, Brasília.
- Stiles, W.** 1960. The composition of the atmosphere (oxygen content of air, soil, intercellular spaces, diffusion, carbon dioxide and oxygen tension). *In*: Ruhland, W. (ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology, Plant Respiration Inclusive Fermentations and Acid Metabolism*. Springer, Heidelberg, pp. 114-148.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M. & Murphy, A.** 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Tcherkez, G., Nogués, S., Bleton, J., Cornic, G., Badeck, F. & Ghashghaie, J.** 2003. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO₂ in French bean. *Plant Physiology* 131: 237-244.
- Villers, P., Bruin, T. & Navarro, S.** 2006. Safe storage of grain in the tropics: a comparison of hermetic storage in flexible silos versus rigid metal or concrete silos. *In*: West, A. & Brown, J. (eds.) *Feed Technology Update*. Linx Publishing, Honolulu, pp. 17-22.
- Walters, C., Pammenter, N.W., Berjak, P. & Crane, J.** 2001. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerance and sensitive seeds. *Seed Science Research* 11: 135-148.
- Zardetto, S.** 2005. Effect of modified atmosphere packaging at abuse temperature on the growth of *Penicillium aurantiogriseum* isolated from fresh filled pasta. *Food Microbiology* 22: 367-371.

CAPÍTULO 2

Armazenamento e taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. e *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae) sob diferentes condições ambientais

Aline Testoni Cécel

ABSTRACT – Seeds with recalcitrant behavior are difficult to store due mainly to their high water content. The objective of this work was to evaluate the conservation of *Eugenia brasiliensis* and *E. involucrata* seeds stored under different environmental conditions. Seeds of the two species and of two different maturation stages were stored with two different water contents, in semipermeable and impermeable packaging and at 8 and 25 °C. Physical and physiological seed evaluations were performed periodically. In addition, respiratory rates of seeds incubated with different water contents and at different temperatures were evaluated. *E. brasiliensis* seeds remained with a high germination rate after 720 days when stored dry, in semipermeable packaging and at 8 °C. *E. involucrata* seeds remained with high germination rates after 720 days when stored moist, in semi-permeable packaging and at 8 °C. The lowest respiratory rates were observed at 8 °C.

Key words: seeds conservation, desiccation sensitivity, deterioration, respiratory metabolism

RESUMO – Sementes com comportamento recalcitrante são de difícil conservação devido, principalmente, ao seu elevado conteúdo de água. Objetivou-se neste trabalho avaliar a conservação de sementes de *Eugenia brasiliensis* e *E. involucrata* armazenadas em diferentes condições ambientais. Sementes das duas espécies e de dois estádios de maturação distintos foram armazenadas com dois teores de água diferentes, em embalagem semipermeável e impermeável e a 8 e 25 °C. Periodicamente foram realizadas avaliações físicas e fisiológicas das sementes. Além disso, foram avaliadas as taxas respiratórias das sementes incubadas com diferentes teores de água e em diferentes temperaturas. Sementes de *E. brasiliensis* permaneceram com elevada taxa de germinação após 720 dias quando armazenadas secas, em embalagem semipermeável e a 8 °C. Já sementes de *E. involucrata* permaneceram com elevadas taxas de germinação após 720 dias quando armazenadas úmidas, em embalagem semipermeável e a 8 °C. As menores taxas respiratórias foram observadas a 8 °C.

Palavras-chave: conservação de sementes, sensibilidade à dessecação, deterioração, metabolismo respiratório

Introdução

O sucesso da conservação de sementes se resume à redução tanto do seu metabolismo, atrasando reações químicas prejudiciais à manutenção da viabilidade, quanto de outros organismos associados a elas como insetos e fungos, que acabam contribuindo para sua deterioração. Para evitar esses danos é fundamental que se reduza tanto o teor de água das sementes quanto a temperatura em que serão armazenadas (Barbedo *et al.* 2018).

Contudo, sementes sensíveis à dessecação devem ser mantidas com altos teores de água e, conseqüentemente, em temperaturas próxima, ou acima, de 0 °C (Bonjovani & Barbedo 2008, Sershen *et al.* 2012a). Estas condições permitem que as sementes mantenham seu metabolismo acelerado e, particularmente quando as sementes não dispõem de suficiente água para germinar, pode haver grande liberação de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (Walters *et al.* 2002, Sershen *et al.* 2012b). Além disso, também pode haver intenso crescimento de microrganismos que acabam favorecendo a deterioração e dificultando a conservação das sementes (Françoso & Barbedo 2016, Parisi *et al.* 2016). Quando se trabalha com sementes recalcitrantes (de elevados conteúdos de água, sensíveis a dessecação e a baixas temperaturas), os estudos sobre sua conservação ainda são inconclusivos, principalmente por ainda não terem sido desvendados os fatores que atuam em seu metabolismo durante o armazenamento (Bonjovani & Barbedo 2019).

Recentemente, alguns grupos têm dedicado atenção aos processos fisiológicos e bioquímicos que acontecem durante a deterioração de sementes recalcitrantes como, por exemplo, as taxas respiratórias e outros processos oxidativos envolvidos nessa deterioração (Lamarca & Barbedo 2012, Parisi *et al.* 2016, Araújo & Barbedo 2017, Bonjovani & Barbedo 2019). Apesar das poucas informações sobre a relação entre taxas

respiratórias e deterioração e a interferência do grau de hidratação e da temperatura nesses processos, é evidente o efeito acelerador de processos oxidativos, respiratórios ou não, na deterioração de sementes. Portanto, o estabelecimento de relações entre esses processos pode trazer uma contribuição substancial para a conservação de sementes e, conseqüentemente, da conservação em germoplasma (Lamarca & Barbedo 2012).

Dentre as espécies frutíferas nativas do Brasil, as do gênero *Eugenia* (Myrtaceae) vêm despertando interesse econômico cada vez maior frente à crescente diversidade de usos descobertos para cada parte da planta. *Eugenia uniflora* (pitangueira), por exemplo, que já há algum tempo era explorada pela indústria de sucos e sorvetes, foi recentemente incluída na cadeia de produção de cosméticos e têm comprovadas suas potencialidades farmacêuticas (Schmeda-Hirschmann *et al.* 1987, Delgado *et al.* 2010, Amador & Barbedo 2011, Delgado & Barbedo 2012). Já *E. brasiliensis* (grumixameira) produz frutas muito semelhantes em forma, cor e sabor às comumente importadas, mas sua produção em pomares comerciais ainda é reduzida e a espécie chegou a ser incluída nas listas das ameaçadas de extinção (Françoso & Barbedo 2016).

Objetivou-se neste trabalho avaliar a conservação de sementes de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* armazenadas em diferentes condições ambientais, visando a redução das taxas de deterioração com a associação da redução do teor de águas das sementes e da temperatura de armazenamento.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal - frutos de *Eugenia brasiliensis* (Figura 1A e C) e *Eugenia involucrata* (Figura 1B e D) foram coletados em dois anos (2017 e 2018) de matrizes do Jardim Botânico de São Paulo (23°38'21,2"S 46°37'37,1"W), em duas fases distintas: 1) E1 - estágio 1, frutos imaturos, de coloração predominante vermelha

(Figura 1A e B), com sementes já capazes de germinar e 2) E2 - estágio 2, frutos maduros já dispersos, de coloração predominante roxa (Figura 1C e D). Os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica (23°38'20,8"S 46°37'31,6"W) para extração, beneficiamento e lavagem das sementes em água corrente. Após a secagem superficial das sementes, estas foram acondicionadas em saco plástico perfurado com agulha e colocadas em geladeira a 8 °C até o início dos experimentos, não ultrapassando 15 dias.



Figura 1. Frutos de *E. brasiliensis* coletados no estágio 1 (A) e no estágio 2 (C) de maturação e frutos de *E. involucrata* coletados no estágio 1 (B) e no estágio 2 (D) de maturação.

Avaliações físicas e fisiológicas - inicialmente, as sementes foram caracterizadas quanto ao teor de água, germinação e formação de plântulas normais. O teor de água foi determinado gravimetricamente pelo método de estufa com circulação de ar forçada

regulada a 103 ± 1 °C por 17 horas (Brasil 2009). Foram utilizadas 3 repetições de 5 sementes cada e os resultados foram expressos em porcentagem (base úmida).

O teste de germinação foi realizado utilizando-se 3 repetições de 10 sementes em rolos de papel Germitest[®], com duas folhas para a base e uma para a cobertura, umedecidas sem excesso visível de água (Brasil 2009) O material foi acondicionado em sala de germinação com temperatura constante de 25 °C, umidade relativa do ar de 90% e luz contínua. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com protrusão de raiz primária de pelo menos 5 mm de comprimento para germinação e em porcentagem de sementes que produziram plântula normal com sistema radicular presente e eófilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes, como mostra a Figura 2 (Delgado & Barbedo 2007).

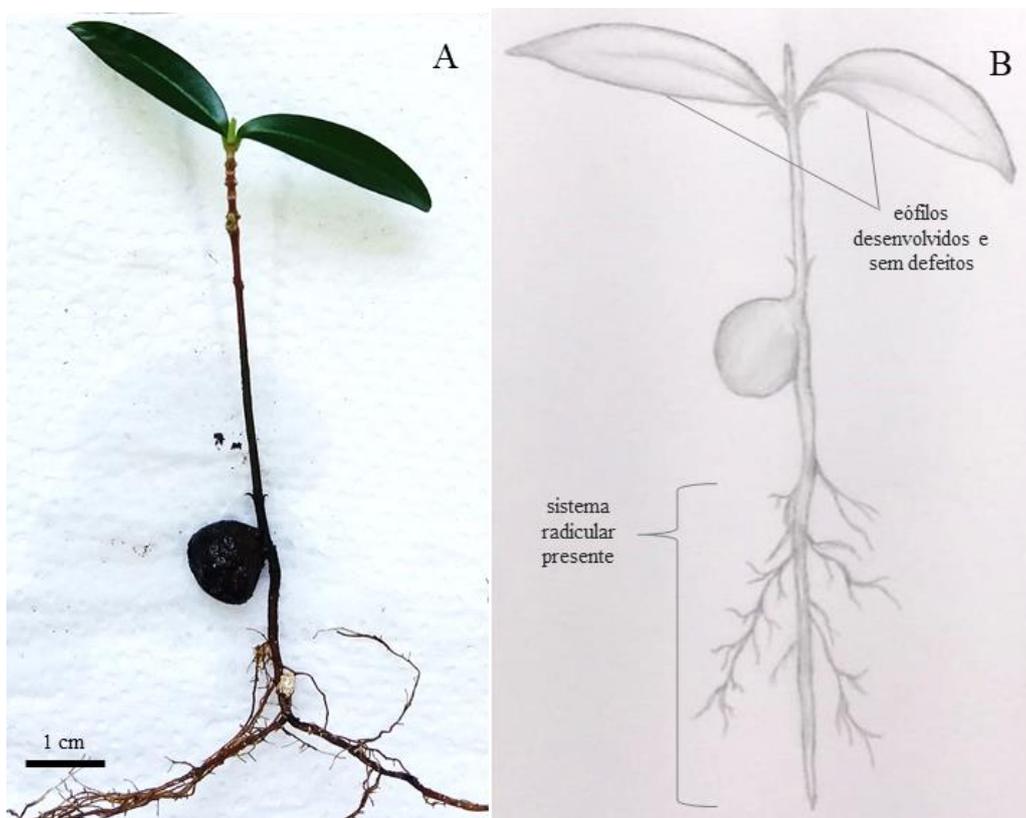


Figura 2. Plântula normal de *Eugenia involucrata* (A) e esquema de uma plântula considerada normal no presente estudo, com sistema radicular presente e eófilos desenvolvidos e sem defeitos (B).

O potencial de água das sementes foi medido em potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Pullman, EUA), que se baseia na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada (Decagon 2001), seguindo metodologia descrita por Delgado & Barbedo (2012), com resultados apresentados em MPa.

Para avaliar o consumo de O₂ e a liberação de CO₂ pelas sementes, as sementes das duas espécies tiveram sua massa fresca e volume medidos e em seguida foram colocadas em respirômetros (frascos de 600 mL com fechamento hermético e tampa perfurada, recoberta por septo, por onde se fez a coleta da amostra de ar), iniciando o experimento assim que os frascos foram fechados, assumindo uma composição atmosférica normal de 20,9% de O₂ e 0,03% de CO₂ (Lamarca & Barbedo 2012, Bonjovani & Barbedo 2019). As amostras de ar foram avaliadas em analisador de gases Illinois 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, USA) e o consumo de O₂ e a liberação de CO₂ foi calculado pela diferença entre os valores medidos pelo analisador e os valores da atmosfera inicial. Os resultados foram convertidos em micromols de O₂ e CO₂ pela equação de Clapeyron e expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{g massa seca}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ (Lamarca & Barbedo 2012, Bonjovani & Barbedo 2019). Além disso, o quociente respiratório (QR) foi calculado dividindo a quantidade de CO₂ produzido pelo O₂ consumido (Kader & Saltveit 2003) e a taxa de oxidação foi calculada dividindo a diferença de O₂ e CO₂ pela massa seca (MS) das sementes incubadas.

Secagem e armazenamento das sementes de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* – sementes das suas espécies provenientes do E1 e E2 foram divididas em dois grupos. No primeiro, as sementes foram mantidas úmidas, sem nenhum tratamento. No segundo, foram secas até atingirem teores de água próximos aos considerados críticos para essas espécies (entre 45 e 50%) por Delgado & Barbedo (2007). Para tanto, foram colocadas em estufa regulada a 50 °C (Delgado & Barbedo 2007) e, conforme a perda

de peso, foram monitoradas até atingirem os valores de teor de água desejados. Ao final das secagens, as sementes (úmidas e secas) foram armazenadas em duas embalagens distintas: frascos de vidro herméticos (vidro - embalagem impermeável) e sacos de polietileno perfurados com agulha (plástico - embalagem semipermeável). As sementes de todos os tratamentos, obtidas em 2018, foram armazenadas a 8 e 25 °C e amostras foram retiradas e avaliadas aos 60 e 120 dias quanto ao teor de água, potencial hídrico, germinação e formação de plântulas normais, como descrito anteriormente. Já as sementes obtidas em 2017 foram armazenadas a 8 °C e amostras foram retiradas e avaliadas aos 180, 360, 540 e 720 dias.

Incubação das sementes nos respirômetros em diferentes condições ambientais – para avaliar a atividade respiratória das sementes de *E. brasiliensis* em diferentes condições ambientais, foram realizados três experimentos: 1) sementes com três teores de água distintos (51, 44 e 39%) foram colocadas em respirômetros de 600 mL, com fechamento hermético. Esse material foi incubado em câmaras do tipo BOD reguladas a 8, 15 e 25 °C e, após 6 horas, realizada avaliação das taxas respiratórias das sementes em analisador de gases Illinois 6600; 2) sementes com três teores de água distintos (50, 44 e 38%) foram colocadas em respirômetros de 600 mL, com fechamento hermético e incubadas a 8, 15, 25 e 35 °C e, após 24 horas (25 e 35 °C) e 360 horas (8 e 15 °C), realizada avaliação das taxas respiratórias; 3) sementes com dois teores de água distintos (51 e 44%) foram colocadas também em respirômetros de 600 mL, com fechamento hermético e incubadas a 8, 15, 18, 21 e 25 °C e, após 24 horas, realizada avaliação das taxas respiratórias. Para avaliar a atividade respiratória das sementes de *E. involucrata* em diferentes condições ambientais foram realizados dois experimentos: 1) sementes com três teores de água distintos (64, 55 e 46%) foram colocadas em respirômetros de 600 mL, com fechamento hermético e incubadas a 8, 15, 25 e 35 °C e,

após 24 horas (25 e 35 °C) e 360 horas (8 e 15 °C), realizada avaliação das taxas respiratórias; 2) sementes com dois teores de água distintos diferentes (61 e 46%) foram colocadas em respirômetros de 600 mL, com fechamento hermético e incubadas a 8, 15, 18, 21 e 25 °C e, após 24 horas, realizada avaliação das taxas respiratórias. Para a secagem das sementes, estas foram colocadas em estufa regulada a 50 °C e, conforme a perda de peso, foram monitoradas até atingirem os valores de teor de água desejados.

Delineamento experimental e análise dos dados - utilizou-se delineamento inteiramente casualizado para as duas espécies estudadas, com esquema fatorial foi 2 x 2 x 2 (anos de coleta x estádios de maturação x níveis de secagem) para os dados iniciais, 2 x 2 x 2 x 2 (estádios de maturação x níveis de secagem x embalagens x temperaturas) para os dados de armazenamento inicial (60 e 120 dias) e 2 x 2 x 2 (estádios de maturação x níveis de secagem x embalagens) para os dados de armazenamento final (de 180 a 720 dias). Para os dados de respiração de *E. brasiliensis*, o esquema fatorial foi 3 x 3 (níveis de secagem x temperaturas) para o experimento 1, 3 x 4 (níveis de secagem x temperaturas) para o experimento 2 e 2 x 5 (níveis de secagem x temperaturas) para o experimento 3. Para os dados de respiração de *E. involucrata*, o esquema fatorial foi 3 x 4 (níveis de secagem x temperatura) para o experimento 1 e 2 x 5 (níveis de secagem x temperatura) para o experimento 2. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F, a 5%), com médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Santana & Ranal 2004).

Resultados e discussão

Caracterização inicial das sementes nos dois anos de coleta – inicialmente o teor de água das sementes das duas espécies, dos dois estádios de maturação e nos dois anos de coleta foram elevados, bem como as taxas de germinação e formação de plântulas

normais, como mostra a Tabela 1. Contudo os teores de água das sementes de *E. brasiliensis* apresentaram diferença de um ano para o outro, coincidindo com maior formação de plântulas normais em 2018 quando o teor de água dessas sementes foi menor (Tabela 2). Essa diferença entre os anos de coleta pode estar relacionada às condições temporais do ambiente em que as sementes foram formadas, uma vez que a coleta realizada em 2018 ocorreu no mês de dezembro, dois meses depois do período da coleta realizada em 2017, que ocorreu em outubro. Segundo Barbedo (2018), essas variações na época de coleta e, conseqüentemente, nas condições do ambiente, condicionariam o comportamento das sementes a cada nova formação podendo, assim, antecipar ou atrasar desde a dispersão das sementes até os valores máximos de germinação e plântulas normais. Tanto para o teor de água quanto para a viabilidade das sementes não houve diferença significativa entre os dois estádios de maturação, que mostraram valores elevados de germinação e plântulas normais, sugerindo uma maturidade muito próxima entre eles. Apesar da secagem ter sido eficiente e diminuído o teor de água das sementes, não houve prejuízos à sua viabilidade, apresentando taxas elevadas de germinação e plântulas normais.

Tabela 1. Teor de água, germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* coletadas em 2017 e 2018 em dois estádios de maturação (E1 e E2).

Espécie	Período de coleta	Estágio de maturação	Teor de água (%)	Germinação (%)	Plântula normal (%)
<i>Eugenia brasiliensis</i>	out/17	E1	51,6	97,2	66,7
		E2	51,6	97,2	69,4
	dez/18	E1	49,0	100,0	93,3
		E2	48,2	100,0	93,3
<i>Eugenia involucrata</i>	out/17	E1	63,5	83,3	58,4
		E2	63,3	94,4	86,1
	out/18	E1	68,3	63,3	36,7
		E2	66,2	83,3	50,0

Tabela 2. Teor de água, germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* coletadas em 2017 e 2018, de dois estádios de maturação (E1 e E2) e submetidas à secagem (Úmidas e Secas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Teor de água (%)	Germinação (%)	Plântula normal (%)
Ano	2017	49,1 a	95,2 a	64,6 b
	2018	47,0 b	98,3 a	88,3 a
Maturação	E1	47,9 a	97,2 a	75,6 a
	E2	48,2 a	96,3 a	77,4 a
Secagem	Úmidas	50,1 a	98,6 a	79,0 a
	Secas	46,0 b	94,9 a	73,9 a

Sementes de *E. involucrata*, inicialmente, apresentaram teor de água elevado nos dois anos de coleta, como mostra a Tabela 3. No entanto, em 2018, esse teor foi maior do que em 2017, coincidindo com menor germinação e formação de plântulas normais. Além disso, maior sensibilidade à dessecação foi observada em sementes dispersas em 2018, que perderam quase completamente a germinação quando foram secas. De acordo com os resultados de germinação e formação de plântulas normais, houve diferença entre os comportamentos das sementes do E1 e E2, sendo este último um estágio mais maduro com maior germinação e formação de plântulas normais.

Apesar de pertencerem ao mesmo gênero e apresentarem sementes com características muito próximas, como a capacidade de germinar e produzir plântulas mesmo quando mais da metade de seu tecido de reserva é removido (Silva *et al.* 2005), neste trabalho as sementes de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* mostraram comportamentos distintos, a começar pela diferença no teor de água inicial, que foi bem mais elevado em sementes de *E. involucrata*, nos dois anos de coleta. Além disso, se mostraram mais sensíveis à dessecação do que as sementes de *E. brasiliensis*, principalmente em 2018, quando perderam radicalmente sua viabilidade ao serem secas.

Tabela 3. Teor de água, germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* coletadas em 2017 e 2018, em dois estádios de maturação (E1 e E2) e submetidas à secagem (Úmidas e Secas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem	
		Úmidas	Secas
Ano		<i>Teor de água (%)</i>	
	2017	63,4 bA	47,9 aB
	2018	67,2 aA	45,4 aB
Maturação	E1	56,6 a	
	E2	55,4 a	
Ano		<i>Germinação (%)</i>	
	2017	89,0 aA	73,6 aB
	2018	73,3 bA	8,3 bB
Maturação	E1	55,9 b	
	E2	66,3 a	
Maturação		<i>Plântula normal (%)</i>	
	E1	47,5 bA	27,2 aB
	E2	68,1 aA	28,1 aB
Ano			
	2017	60,4 a	
	2018	25,0 b	

Portanto, de acordo com os resultados obtidos para as duas espécies e com a teoria proposta por Barbedo (2018), sementes de *E. brasiliensis* seriam dispersas mais maduras do que as sementes de *E. involucrata*, apresentando valores menores de teor de água, elevadas taxas de germinação e plântulas normais e menor sensibilidade à dessecação comparadas às sementes de *E. involucrata*. Resultados semelhantes foram observados por Lamarca *et al.* (2016) em sementes de *E. pyriformis* que apresentaram diferentes graus de tolerância à dessecação entre as regiões e épocas de coleta, inclusive dentro da mesma matriz, quando as sementes são coletadas em anos distintos. Outros autores também observaram essas variações em sementes de *Aesculus hippocastanum* (Daws *et al.* 2004) e *Inga vera* (Lamarca & Barbedo 2015).

Armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* em diferentes condições - o teor de água das sementes de *E. brasiliensis*, até 120 dias de armazenamento, pouco se alterou nas diferentes condições, exceto quando foram armazenadas em embalagem semipermeável (plástico) a 25 °C, apresentando uma redução significativa após 120 dias (Figura 3B). Como esperado, o potencial hídrico das sementes permaneceu menor em sementes secas e, após 120 dias, mostrou uma drástica redução quando armazenadas em plástico a 25 °C (Figura 4B), coincidindo com os resultados do teor de água.

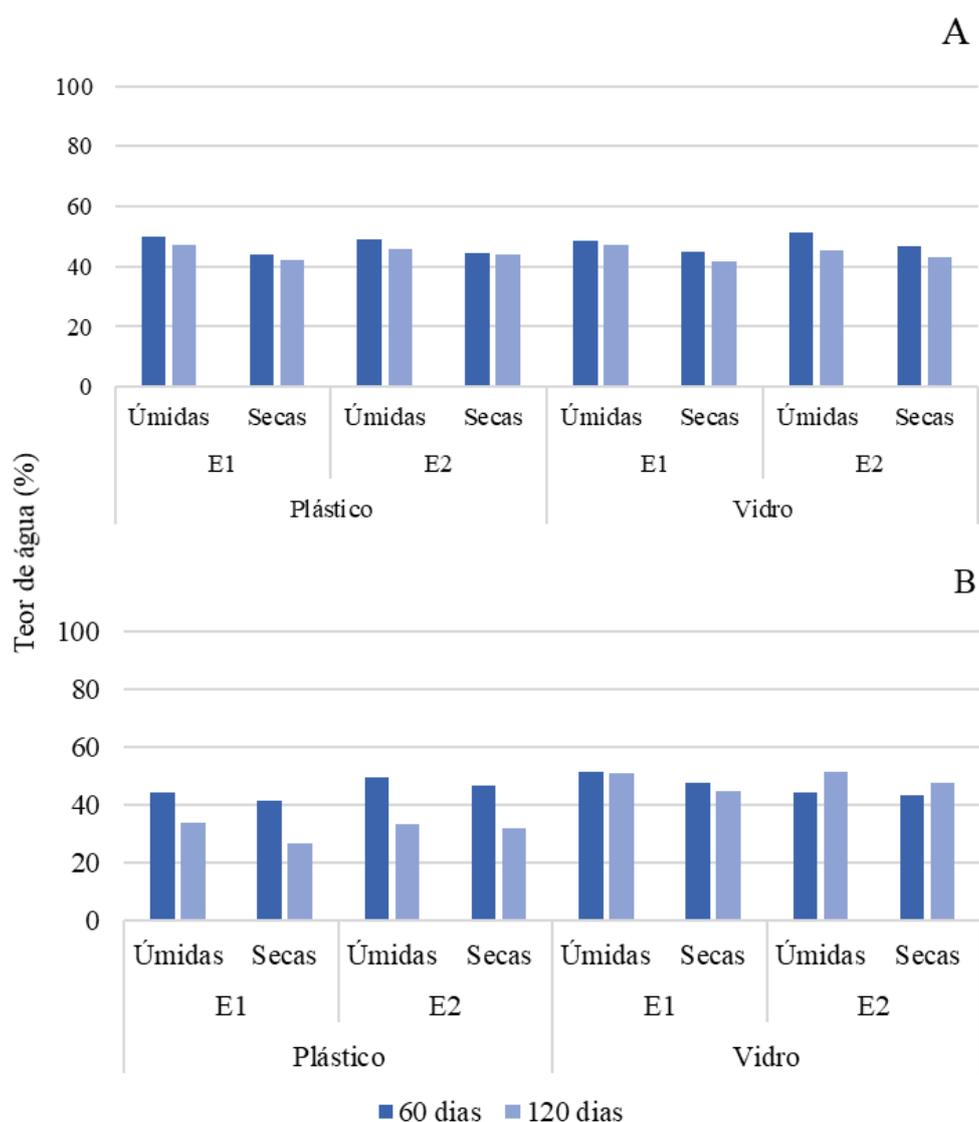


Figura 3. Teor de água (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas até 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C (A) e 25 °C (B).

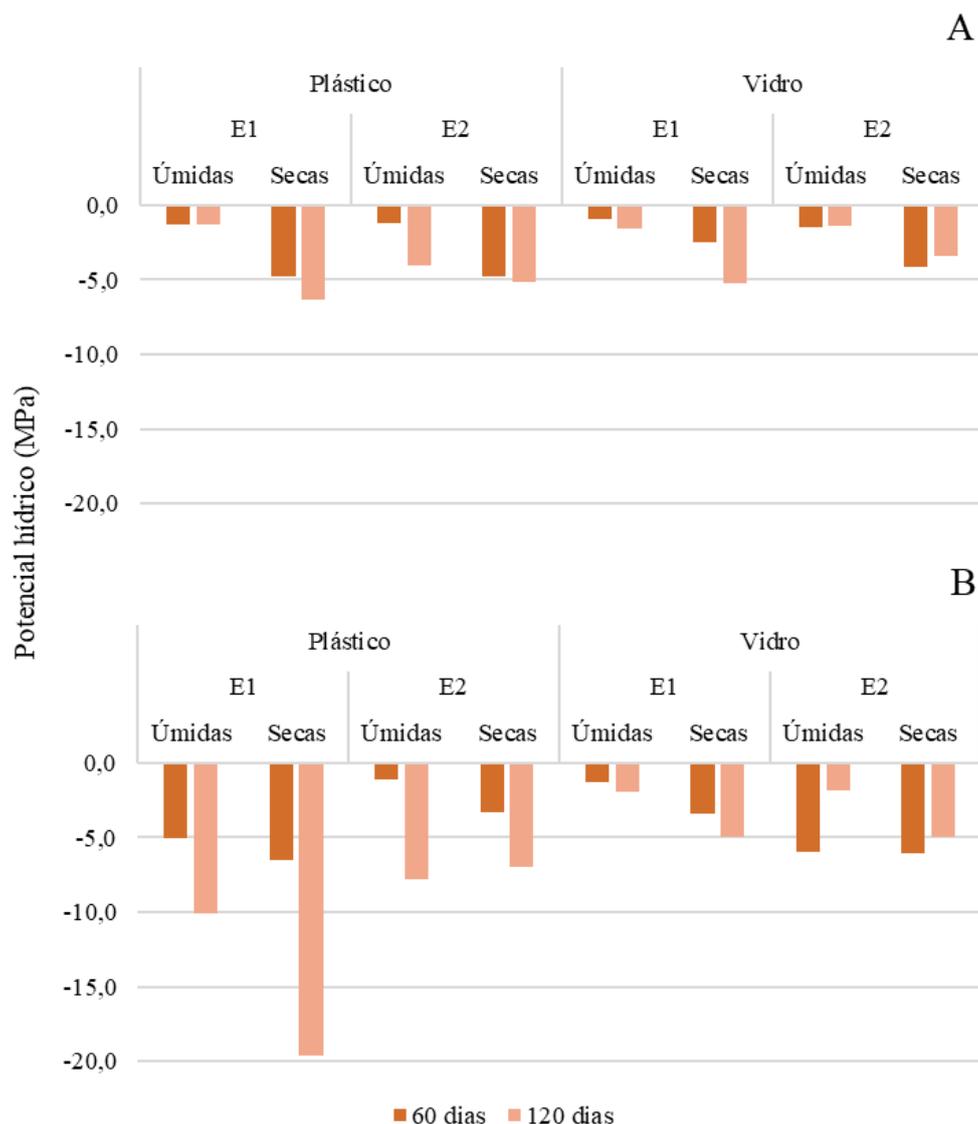


Figura 4. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C (A) e 25 °C (B).

De forma geral, ao longo dos 720 dias, o teor de água das sementes armazenadas em plástico foi maior do que quando em vidro (embalagem impermeável), bem como quando armazenadas úmidas, como é possível observar na Figura 5. Nesses períodos, os potenciais hídricos das sementes foram bem irregulares, mas, geralmente, sempre maiores quando armazenadas úmidas em embalagem semipermeável (Figura 6).

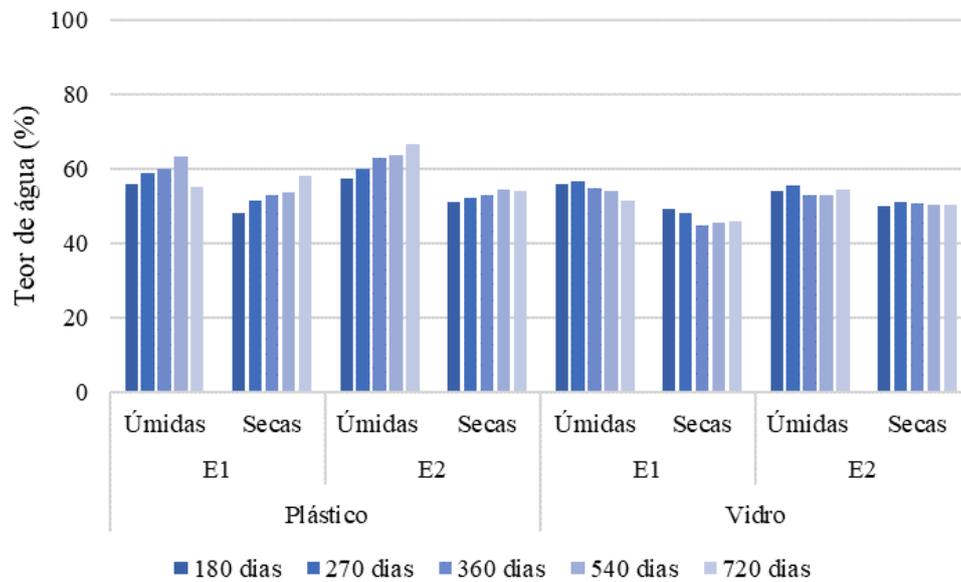


Figura 5. Teor de água (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C.

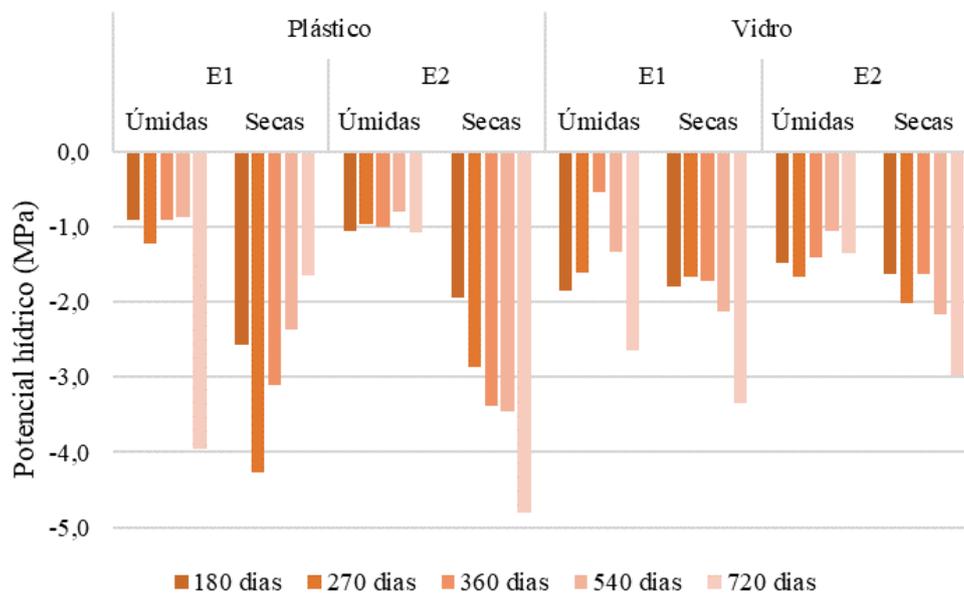


Figura 6. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C.

As taxas de germinação e plântulas normais se mantiveram altas em todas as condições a 8 °C e apresentaram melhora em sementes do E1 quando foram secas (Tabela 4). Comumente, sementes de comportamento recalcitrante apresentam redução de sua viabilidade com a redução do teor de água (Delgado & Barbedo 2007, Masetto *et al.* 2008, Martins *et al.* 2009, Souto *et al.* 2017), no entanto, alguns autores têm relatado uma possível melhora na conservação de sementes recalcitrantes com uma pequena redução em seu teor de água, como observado para embriões de *Inga vera* (Faria *et al.* 2006, Bonjovani & Barbedo 2008) e sementes de açaí (Nascimento *et al.* 2010).

Tabela 4. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 60 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	83,3 aAa	90,0 aAa	93,3 aAa	83,3 aAa
	Vidro	76,7 aAb	86,7 aAa	100,0 aAa	83,3 aBa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	70,0 aBb	86,7 aAa	86,7 aAa	76,7 aAa
	Vidro	73,3 aAb	76,7 aAa	100,0 aAa	83,3 aBa

Já no armazenamento em plástico a 25 °C, a germinação e formação de plântulas normais se mantiveram altas nos dois estádios de maturação e nos dois níveis de secagem, como visto na Tabela 5. Em sementes recalcitrantes de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) foram observadas elevadas taxas de germinação aos 60 dias de armazenamento em temperatura ambiente. No entanto, antes mesmo da instalação do teste de germinação, essas taxas já eram altas, diferentemente de quando armazenadas

em temperatura próxima de 5 °C (Garcia *et al.* 2014), fato também observado em sementes de *E. brasiliensis* no presente estudo. Segundo Pammenter *et al.* (1984), o metabolismo de sementes recalcitrantes não é interrompido durante o armazenamento, podendo inclusive apresentar diferenciação celular similar à que ocorre durante a germinação. Quando armazenadas em vidro, a 25 °C, apenas sementes do E2 submetidas a secagem mantiveram alta viabilidade, evidenciando seu grau de maturação avançado comparado ao E1 que teve a germinação zerada nessa condição. Inicialmente, as sementes de *E. brasiliensis* não apresentaram diferenças entre os dois estádios de maturação, contudo, após 60 dias de armazenamento em condições ambientais estressantes (secagem, embalagem hermética e temperatura elevada) as sementes do E2 se mostraram mais resistentes a esses estresses, apresentando valores elevados de germinação e plântulas normais.

Tabela 5. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 60 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	100,0 aAa	100,0 aAa	93,3 aAa	76,7 bBb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAb	0,0 bBa	96,7 aAa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	93,3 aAa	93,3 aAa	93,3 aAa	73,3 bBb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAb	0,0 bBa	96,7 aAa

Após esse período, a germinação e formação de plântulas normais das sementes armazenadas a 8 °C permaneceu alta, exceto quando úmidas, provenientes do E1 e

armazenadas em vidro (Tabela 6). Nessa condição a viabilidade dessas sementes reduziu significativamente e produziu apenas 17% de plântulas normais.

Tabela 6. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	83,3 aAa	93,3 aAa	100,0 aAa	83,3 aAa
	Vidro	16,7 bBb	86,7 aAa	86,7 aAa	76,7 aAa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	80,0 aAa	93,3 aAa	100,0 aAa	76,7 aBa
	Vidro	16,7 bBb	76,7 aAa	86,7 aAa	66,7 aAa

Mesmo após 120 dias em plástico a 25 °C, sementes úmidas permaneceram com altas taxas de germinação nos dois estádios de maturação, como pode ser visto na Tabela 7. Esse fato foi observado para sementes de *Adonidia merrillii* (Arecaceae), classificadas também como recalcitrantes, que se mantiveram vigorosas após 120 dias de armazenamento em condições de ambiente (Féliz *et al.* 2017). No entanto, quando as sementes foram secas, houve uma redução significativa na germinação e na formação de plântulas normais nos dois estádios de maturação (que coincide com a redução no teor de água das sementes armazenadas em plástico), como mostra a Tabela 7. Esses resultados podem estar relacionados com o teor de água e o potencial hídrico em que essas sementes se encontravam. De acordo com Delgado & Barbedo (2012), o início da perda da viabilidade de sementes de *E. brasiliensis* ocorre entre -5 e -10 MPa e atingem o limite de tolerância à dessecação em -19,6 MPa, este último atingido no presente

trabalho em sementes do E1 secas e armazenadas em plástico, que perderam radicalmente sua viabilidade após esse período. Já em vidro, as sementes secas do E2 permaneceram com alta viabilidade apresentando mais de 90% de plântulas normais.

Tabela 7. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	100,0 aAa	100,0 aAa	20,0 aBb	43,3 bAb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAb	0,0 bBa	96,7 aAa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	93,3 aAa	70,0 aBa	20,0 aAb	33,3 bAb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAb	0,0 aBa	96,7 aAa

Tabela 8. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 180 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	73,3 aAa	30,0 aBb	80,0 aAa	93,3 aAa
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	60,0 aAa	23,3 aBb	60,0 aBa	83,3 aAa
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa

É importante ressaltar que, aos 120 dias, a maioria das sementes úmidas, dos dois estádios de maturação, armazenadas em plástico já haviam germinado durante o armazenamento e apresentavam raízes com sinais de secagem, como mostra a Figura 7. Bem como, as sementes secas provenientes do E2 armazenadas em vidro (Figura 8). No entanto, quando colocadas para germinar, rebrotavam novas raízes a partir da raiz seca e continuavam seu desenvolvimento, como é possível ver na Figura 9. Esse fato foi também observado por Inocente & Barbedo (2019), após colocar sementes de *Eugenia* submetidas a estresses hídricos, novamente em condições hídricas normais e elas continuarem seu desenvolvimento, sugerindo algum mecanismo que previna a perda de água dos tecidos essenciais dessas sementes.

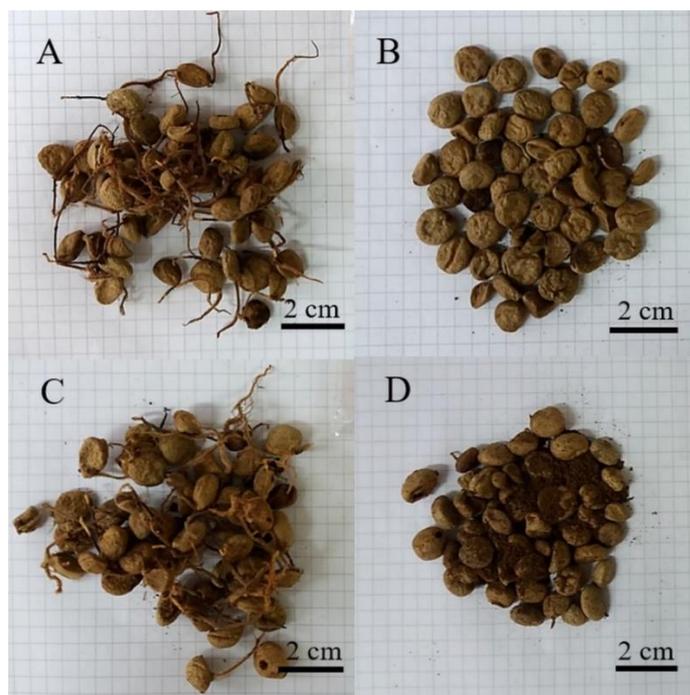


Figura 7. Sementes de *Eugenia brasiliensis* provenientes do E1 úmidas (A) e secas (B) e provenientes do E2 úmidas (C) e secas (D), armazenadas por 120 dias em plástico a 25 °C.

Curiosamente, após 180 dias armazenadas em plástico, sementes úmidas do E1 mostraram maior viabilidade do que as do E2 que formaram apenas 23% de plântulas

normais (Tabela 8). Considerando que as sementes do E2 foram coletadas já dispersas, ou seja, caídas no chão, é possível que esses resultados estejam relacionados com a qualidade inicial das sementes. Oro *et al.* 2012 observou em sementes de *E. pyriformis* e *E. involucrata* os menores valores de plântulas normais formadas quando estas foram coletadas do chão, sugerindo que a queda dos frutos pode ter favorecido a taxa de deterioração dessas sementes. Por outro lado, a secagem favoreceu as sementes do E2 que apresentaram valores altos de germinação e plântulas normais, ainda maiores do que as sementes secas do E1, indicando maturidade mais avançada e, conseqüentemente, maior tolerância à dessecação. Já as sementes armazenadas em vidro a 8 °C perderam completamente sua viabilidade aos 180 dias.



Figura 8. Sementes de *Eugenia brasiliensis* provenientes do E1 úmidas (A) e secas (B) e provenientes do E2 úmidas (C) e secas (D), armazenadas por 120 dias em vidro a 25 °C.

Apesar de embalagens totalmente impermeáveis, como vidros herméticos, manterem as condições iniciais das sementes, como, por exemplo, o teor de água,

impedem também a saída de gases como o CO₂ ou o vapor de água liberado pela respiração (Barbedo *et al.* 2018), o que pode ter prejudicado a conservação das sementes de *E. brasiliensis* armazenadas hermeticamente. Portanto, embalagens semipermeáveis, como sacos de polietileno, se mostram adequadas para o armazenamento de sementes de elevado conteúdo de água, uma vez que preservam a umidade das sementes e não impede completamente as trocas gasosas com o meio.



Figura 9. Semente de *Eugenia brasiliensis*, armazenada por 120 dias a 25 °C, rebrotando uma nova raiz a partir da raiz seca.

Estudos sobre a conservação de sementes recalcitrantes têm mostrado a eficiência desse tipo de embalagem, como em sementes de *Geoffroea spinosa* (Souza *et al.* 2011), *Eriobotrya japonica* (Brasileiro *et al.* 2011) e *Calophyllum brasiliense* (Nery *et al.* 2017).

Após 270 dias a secagem permaneceu favorecendo as sementes dos dois estádios de maturação armazenadas em plástico, como mostra a Tabela 9. Quando passam pela

secagem e são armazenadas em plástico, as sementes apresentam maior formação de plântulas normais (47%) do que as sementes úmidas (10%) ou quando armazenadas em embalagem hermética (0%). Essa observação permanece aos 360 dias, quando as sementes apresentaram 60 e 48% de germinação e plântulas normais, respectivamente, ao serem armazenadas secas em embalagem semipermeável. Fowler (2018) também verificou elevadas taxas de germinação em sementes recalcitrantes de *Araucaria angustifolia* armazenadas, parcialmente secas, em embalagens de polietileno de diferentes espessuras, mesmo após 270 dias nessas condições.

Para algumas espécies de *Eugenia*, como *E. involucrata* (Maluf *et al.* 2003), e *E. pyriformis* (Scalon *et al.* 2012) e *E. uniflora* (Comin *et al.* 2014), a secagem das sementes prejudicou o armazenamento, visto inclusive para sementes de *E. brasiliensis* (Kohama *et al.* 2006). Possivelmente, as sementes coletadas por Kohama *et al.* (2006) naquele ano e naquela região, devido a diferenças ambientais, como sugere Barbedo (2018), foram mais sensíveis à secagem e ao armazenamento do que as sementes coletadas neste trabalho.

Tabela 9. Germinação (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 270 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem	Plástico	50,0 aAb	10,0 aBb	66,7 aBa	90,0 aAa
	Vidro	0,0 bAa	0,0 aAa	0,0 bAa	0,0 bAa

Na Tabela 10 é possível notar a diferença nas taxas de germinação das sementes armazenadas úmidas e secas em embalagem plástica após 540 dias de armazenamento,

evidenciando a redução de sua longevidade quando mantidas úmidas. Sementes armazenadas com elevado grau de umidade e, conseqüentemente, elevado metabolismo tem sua qualidade fisiológica reduzida devido a intensificação do processo de deterioração, gerando prejuízos fisiológicos e bioquímicos, uma vez que não apresentam mecanismos de reparo ou manutenção ao longo do tempo, características comuns em sementes recalcitrantes (Marcos-Filho 2015).

Tabela 10. Germinação (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 540 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem	Plástico	40,0 aAb	0,0 aBb	63,3 aAa	70,0 aAa
	Vidro	0,0 bAa	0,0 aAa	0,0 bAa	0,0 bAa

Após 720 dias, sementes de *E. brasiliensis* secas e armazenadas em embalagem semipermeável mantiveram elevadas taxas de germinação, principalmente quando provenientes do E2 (Tabela 11). Apesar de, após esse período, a produção de plântulas normais ficar abaixo de 50% em sementes do E2, essa taxa foi maior do que a observada no E1, provavelmente pela diferença do estágio de maturação entre elas. Sementes com comportamento recalcitrante, como é o caso da *Eugenia brasiliensis*, são sensíveis à dessecação e, conseqüentemente, a baixas temperaturas, apresentando baixa longevidade (Delgado & Barbedo 2007, Barbedo *et al.* 2013). Contudo, no presente trabalho, essas sementes se mostraram tolerantes a dessecação até valores próximos de

45% e a temperatura de armazenamento de 8 °C, apresentando elevada taxa de germinação, quando provenientes do E2, mesmo após 720 dias nessas condições.

Tabela 11. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia brasiliensis* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	23,3 aAb	0,0 aBb	66,7 aAa	80,0 aAa
	Vidro	0,0 bAa	0,0 aAa	0,0 bAa	0,0 bAa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	3,3 aAb	0,0 aAb	26,7 aBa	43,3 aAa
	Vidro	0,0 aAa	0,0 aAa	0,0 bAa	0,0 bAa

Armazenamento de sementes de *Eugenia involucrata* em diferentes condições - o teor de água das sementes de *E. involucrata* pouco variaram até os 120 dias de armazenamento nas diferentes condições, sendo significativamente maior em sementes úmidas do que em sementes secas (Figura 10), bem como seu potencial hídrico, apresentado na Figura 11.

De forma geral, ao longo dos 720 dias de armazenamento, o teor de água e o potencial hídrico das sementes, apresentados na Figura 12 e 13, respectivamente, permaneceram maiores quando mantidas úmidas ou quando armazenadas em embalagem semipermeável.

Aos 60 dias de armazenamento, as sementes mantidas a 25 °C, nas duas embalagens, perderam radicalmente sua viabilidade, bem como as mantidas secas a 8 °C, como mostra a Tabela 12. Ao armazenar sementes de *E. involucrata* em temperatura

ambiente, Maluf *et al.* (2003) também verificaram uma drástica redução na germinação e no vigor dessas sementes logo nos primeiros 60 dias de armazenamento. Esses resultados evidenciam o alto grau de sensibilidade à dessecação das sementes de *E. involucrata*, que só mantiveram alta viabilidade em condições que garantiram sua umidade, como a associação da embalagem impermeável (vidro) com a baixa temperatura (8 °C).

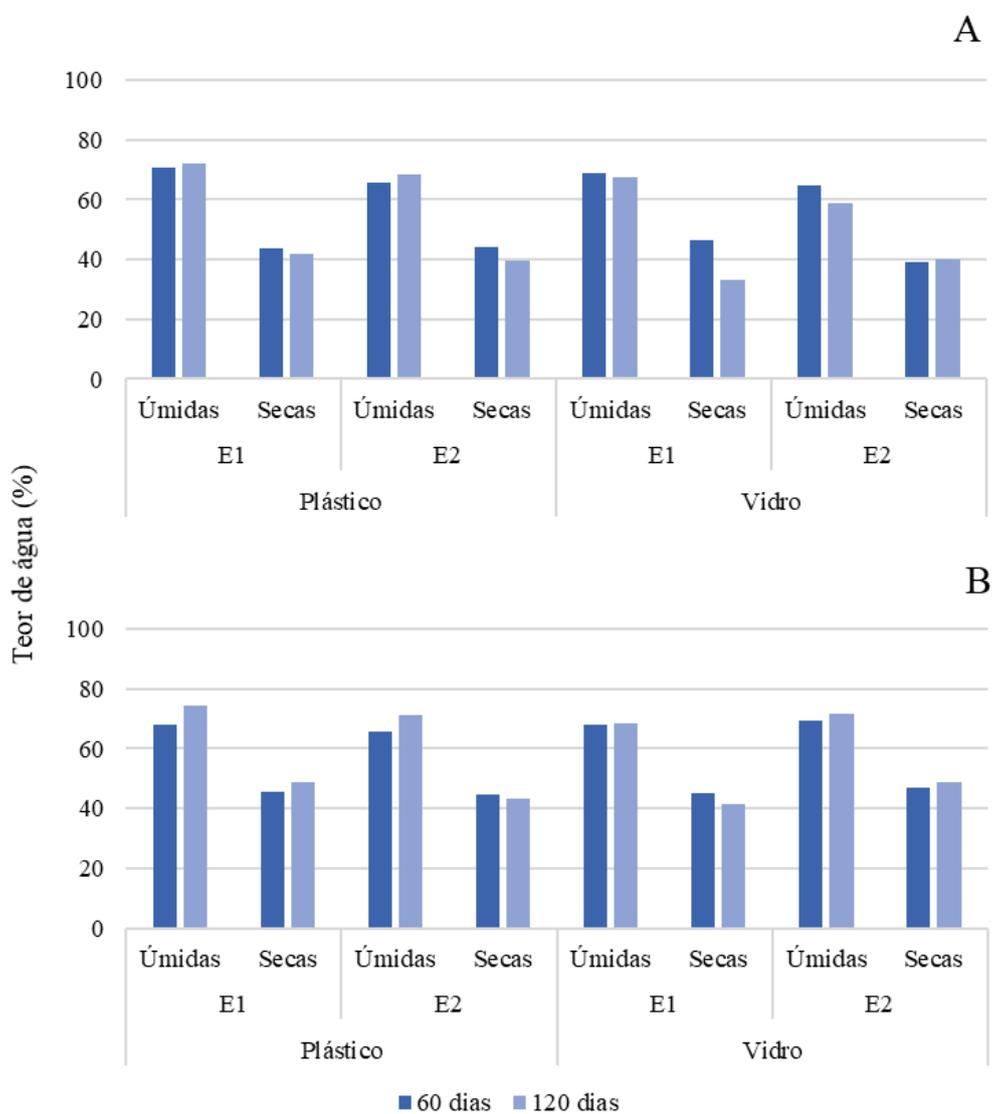


Figura 10. Teor de água (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas até 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C (A) e 25 °C (B).

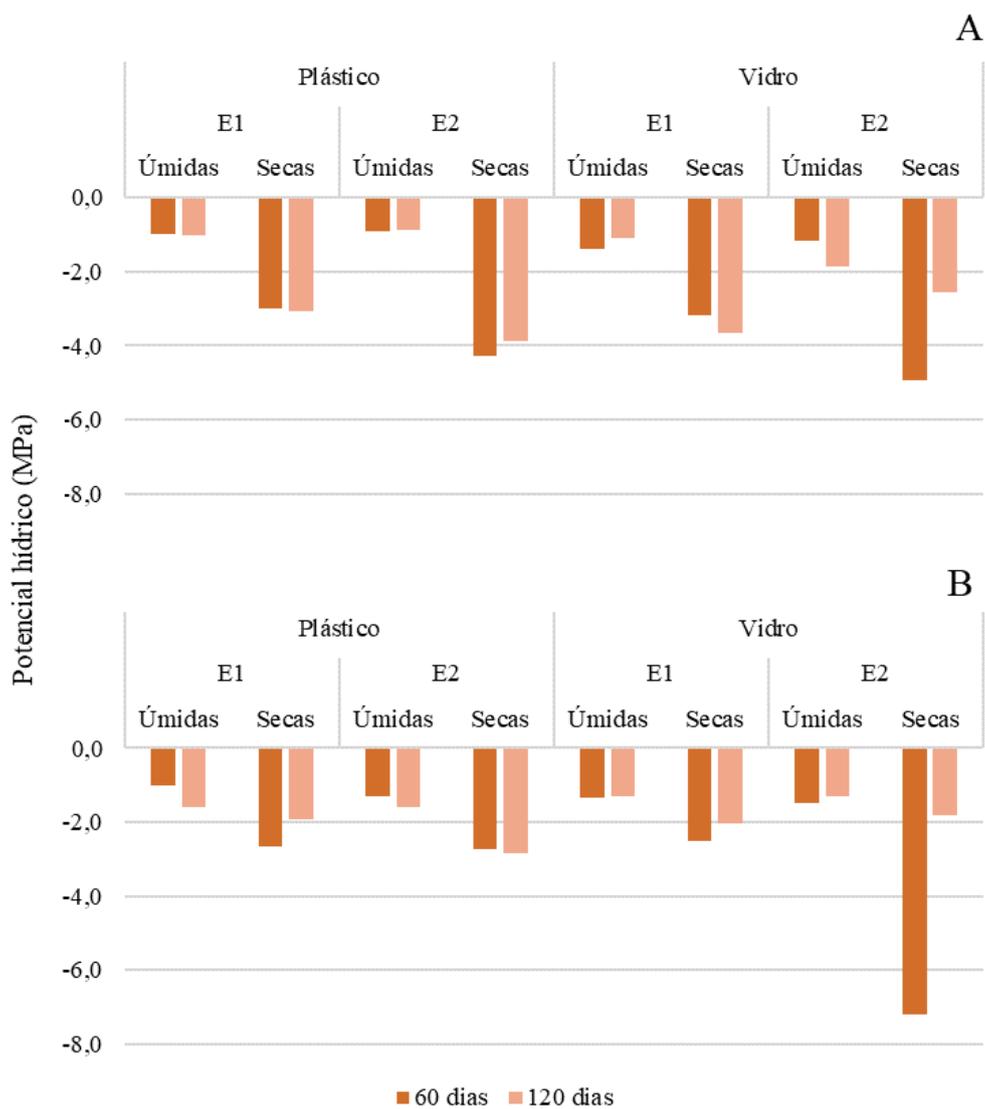


Figura 11. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C (A) e 25 °C (B).

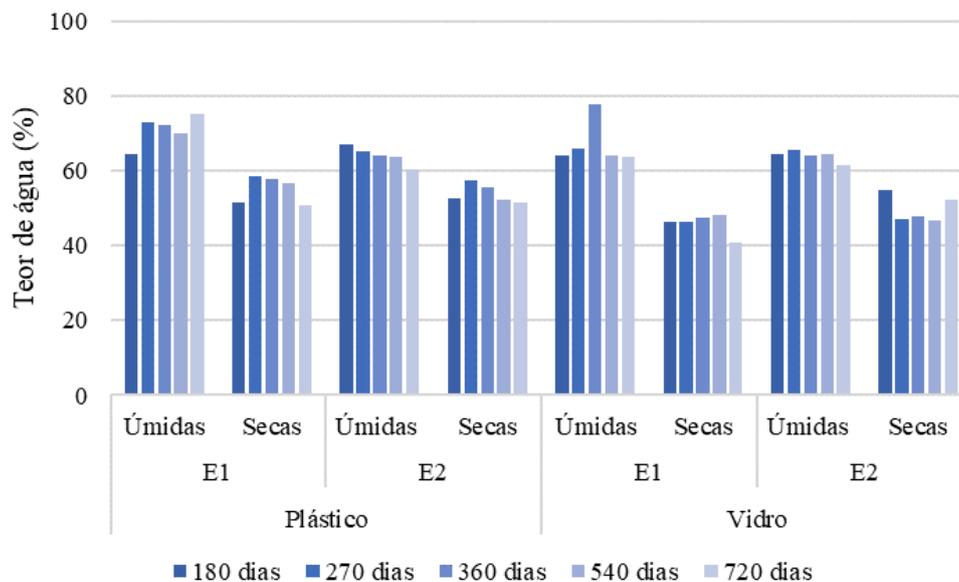


Figura 12. Teor de água (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C.

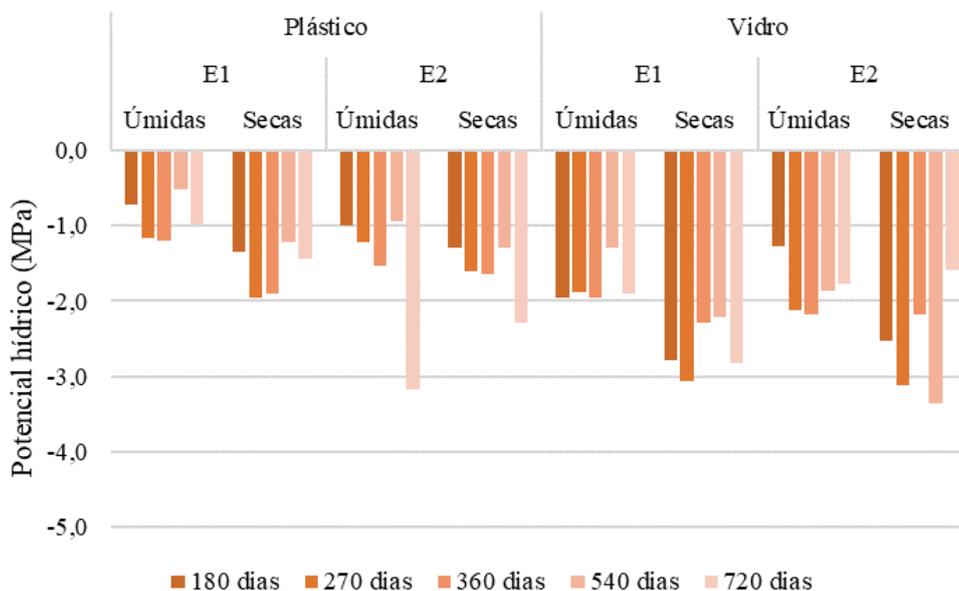


Figura 13. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por até 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C.

Tabela 12. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 60 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C e 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Temperatura			
		8°C		25°C	
		Úmidas	Secas	Úmidas	Secas
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	33,3 bAa	6,7 aBa	0,0 aAb	8,3 aAa
	Vidro	81,7 aAa	5,0 aBa	0,0 aAb	5,0 aAa
Maturação	E1	14,6 a			
	E2	20,4 a			
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	26,7 bAa	6,7 aBa	0,0 aAb	1,7 aAa
	Vidro	63,3 aAa	3,3 aBa	0,0 aAb	1,7 aAa
Maturação	E1	10,42 a			
	E2	15,42 a			

É possível observar na Tabela 13 que as maiores taxas de germinação foram de sementes úmidas do E2 armazenadas nas duas embalagens a 8 °C. No entanto, apenas em vidro a taxa de germinação e de formação de plântulas normais foi alta, chegando a 77% de plântulas normais formadas. Alegretti *et al.* (2015), estudando o armazenamento de sementes de *E. involucrata* em embalagens a vácuo, verificou elevadas taxas de germinação e índices de velocidade de emergência (IVG) após 30 dias a 5 °C. Apesar de embalagens impermeáveis não serem recomendáveis para sementes de metabolismo intenso, como é o caso da *E. involucrata*, devido a impossibilidade de trocas gasosas nessa condição (Barbedo *et al.* 2018), é possível que, neste trabalho, estas tenham se beneficiado com esse tipo de embalagem que também evita ou minimiza alterações nas condições iniciais das sementes. Emer *et al.* (2019) também verificaram altas taxas de germinação, formação de plântulas e vigor em sementes

recalcitrantes de *Campomanesia aurea* (Myrtaceae) armazenadas em embalagem impermeável a 8 °C, mesmo após 150 dias nessa condição.

Após 120 dias a 25 °C a germinação zerou em, praticamente, todas as condições, restando apenas 7% de germinação e plântulas normais quando as sementes eram provenientes do E2 e foram armazenadas em plástico, evidenciando uma temperatura de armazenamento desfavorável para as sementes de *E. involucrata*. Scalon *et al.* (2004) estudando sementes de *E. uvalha* armazenadas em duas condições ambientais por 120 dias, também verificaram maior longevidade em temperatura mais baixa (10 °C).

Tabela 13. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2) e com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 120 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	20,0 aBa	43,3 bAa	23,3 aAa	10,0 aBb
	Vidro	0,0 bBa	90,0 aAa	0,0 bAa	6,7 aAb
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	20,0 aBa	36,7 bAa	20,0 aAa	10,0 aAb
	Vidro	0,0 bBa	76,7 aAa	0,0 bAa	3,3 aAb

Aos 180 dias, as sementes dos dois estádios de maturação apresentaram as maiores taxas de germinação quando armazenadas em plástico. Bem como as sementes de *E. involucrata*, sementes de *Eriobotrya japonica* (Rosaceae), espécie amplamente cultivada no sudeste do Brasil, apresentam características de sementes recalcitrantes, são dispersas com elevados conteúdos de água e também demonstraram melhor conservação quando armazenadas em embalagem plástica a 8 °C, mantendo 83% de

germinação após 180 dias de armazenamento (Brasileiro *et al.* 2011). Já no armazenamento hermético (vidro), foi evidente a imaturidade das sementes de *E. involucrata* provenientes do E1, que perderam completamente sua viabilidade nessa condição, diferentemente das sementes provenientes do E2, como mostra a Tabela 14. A Tabela 15, que apresenta a porcentagem de plântulas normais formadas aos 180 dias, evidencia a sensibilidade à dessecação das sementes, com menor produção de plântulas normais em sementes secas e a imaturidade das sementes provenientes do E1, que apresentou menor produção de plântulas normais do que o E2.

Tabela 14. Germinação (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 180 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Maturação	
		E1	E2
Embalagem	Plástico	61,7 aA	73,3 aA
	Vidro	0,0 bB	46,7 bA
Secagem	Úmidas	40,0 aB	80,0 aA
	Secas	21,7 bB	40,0 bA

Tabela 15. Plântula normal (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 180 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem	
		Úmidas	Secas
Embalagem	Plástico	83,3 aA	41,7 aB
	Vidro	10,0 bA	10,0 bA
Maturação	E1	29,2 b	
	E2	43,3 a	

Na Tabela 16 é possível observar que as sementes armazenadas em vidro perderam completamente sua viabilidade após 270 dias, diferentemente das armazenadas em plástico que apresentaram as maiores taxas de germinação em sementes úmidas, principalmente quando provenientes do E2, chegando a 90% de germinação. Segundo Maluf *et al.* (2003), a redução do teor de água para valores inferiores a 51% prejudica a capacidade germinativa e o potencial de armazenamento de sementes de *E. involucrata*, que se mantém viáveis por até 180 dias quando secas até 53% e mantidas sob condições de câmara fria e em embalagens plásticas. Nery *et al.* (2017) observaram que embalagens de polietileno impedem o acúmulo de umidade e a deterioração acelerada das sementes de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) que, apesar de seu comportamento recalcitrante, conservou-se por até nove meses em câmara fria.

Tabela 16. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 270 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	63,3 aBa	90,0 aAa	43,3 aAb	23,3 aBb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	46,7 aBa	80,0 aAa	40,0 aAa	20,0 aBb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa

Aos 360 dias de armazenamento a germinação se manteve alta apenas quando as sementes eram provenientes do E2 e foram armazenadas úmidas em plástico (Tabela

17). No entanto, curiosamente, sementes secas do E1 apresentaram maior germinação do que quando úmidas, diferentemente das sementes do E2 que, quando passaram pela secagem, perderam mais da metade da germinação.

Os resultados de germinação e plântulas normais aos 540 e 720 dias, apresentados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente, foram muito próximos e, apesar das sementes úmidas, proveniente do E1 e armazenadas em plástico mostrarem alguma germinação nesses períodos, a formação de plântulas normais foi muito baixa, evidenciando sua menor longevidade em comparação com as sementes do E2 que apresentaram elevadas taxas de germinação e plântulas normais (quando mantidas úmidas e em plástico), mesmo após 720 dias de armazenamento.

Tabela 17. Germinação (%) de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 360 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem	Plástico	26,7 aBb	86,7 aAa	46,7 aAa	40,0 aAb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa

Neste trabalho, as sementes de *E. involucrata* se mostraram sensíveis à dessecação e, conseqüentemente, ao armazenamento na condição seca. O armazenamento das sementes úmidas em embalagem semipermeável a 8 °C é o mais indicado para a espécie, que conserva sua viabilidade mesmo após dois anos de armazenamento.

Tabela 18. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 540 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	23,3 aBa	86,7 aAa	30,0 aAa	26,7 aAb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	13,3 aBa	76,7 aAa	20,0 aAa	10,0 aAb
	Vidro	0,0 aAa	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 aAa

Tabela 19. Germinação e plântula normal de sementes de *Eugenia involucrata* de dois estádios de maturação (E1 e E2), com dois níveis de secagem (Úmidas e Secas) armazenadas por 720 dias em duas embalagens (Plástico e Vidro) a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula nas colunas, maiúscula nas linhas e itálico entre úmidas e secas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Fator	Níveis	Secagem			
		Úmidas		Secas	
		E1	E2	E1	E2
Embalagem		<i>Germinação (%)</i>			
	Plástico	43,3 aBa	90,0 aAa	6,7 aAb	6,7 aAb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 bAa
Embalagem		<i>Plântula normal (%)</i>			
	Plástico	13,3 aBa	70,0 aAa	0,0 aAb	6,7 aAb
	Vidro	0,0 bAa	0,0 bAa	0,0 aAa	0,0 bAa

Taxas respiratórias das sementes *E. brasiliensis* e *E. involucrata* em diferentes condições ambientais - sementes de *E. brasiliensis* incubadas em baixas temperaturas (8 e 15 °C) só apresentaram alguma taxa respiratória quando foram secas. Com o aumento da temperatura para 25 °C, essa taxa também aumentou, como é possível observar na Figura 14A e B. Contudo, nessa temperatura, o consumo de O₂ foi muito maior quando

as sementes passaram por alguma secagem (Figura 14A). Em condições de maior estresse, como sementes submetidas a secagem ou incubadas em maior temperatura, o valor de QR ficou abaixo de 0,5, indicando a presença de reações oxidativas não respiratórias (Figura 14C) como também observado por Lamarca & Barbedo (2012) para sementes de *Caesalpinia echinata* (Fabaceae). Avaliando o vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* em testes de tetrazólio, Lamarca *et al.* (2009) sugere que o aumento na atividade respiratória das sementes pode indicar situação de estresse, uma vez que as regiões coradas mais intensamente pela solução (indicando intensa atividade respiratória) eram as mais expostas às condições de estresse. Como mostra a Figura 14D, quando as sementes de *E. brasiliensis* são incubadas a 25 °C as taxas oxidativas são muito maiores e aumentam ainda mais com a secagem das sementes, quando estão em duas situações estressantes (secagem e elevada temperatura).

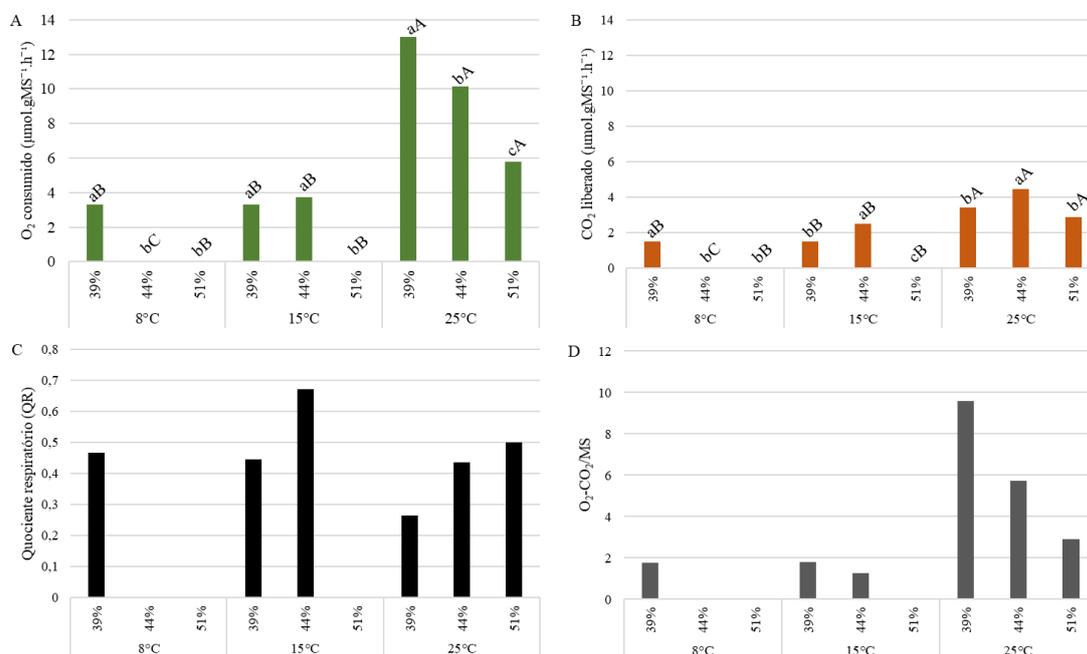


Figura 14. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação, calculada por O₂-CO₂/MS (D) de sementes de *Eugenia brasiliensis* com três teores água diferentes (39, 44 e 51%) incubadas por 6 horas a 8, 15 e 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula entre teores de água e maiúscula entre temperaturas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

No segundo experimento com *E. brasiliensis*, podemos observar a taxa respiratória das sementes ainda maior quando incubadas a 35 °C do que a 25 °C e, mais uma vez, com menor consumo de O₂ e liberação de CO₂ quando o teor de água das semente é próximo de 50%, como mostra a Figura 15A e B. A redução de taxas respiratórias com a diminuição da temperatura do ambiente também foi observada em embriões imaturos de *Inga vera* Willd. (Fabaceae), que tiveram seu metabolismo respiratório reduzido em temperaturas próximas de 0 °C (Bonjovani & Barbedo 2019). Apesar de os valores de QR nas temperaturas mais elevadas (25 e 35 °C) ficarem todos entre 0,5 e 0,6 (Figura 15C), a taxa oxidativa foi duas vezes maior a 35 °C quando as sementes foram incubadas secas, como é possível observar na Figura 15D.

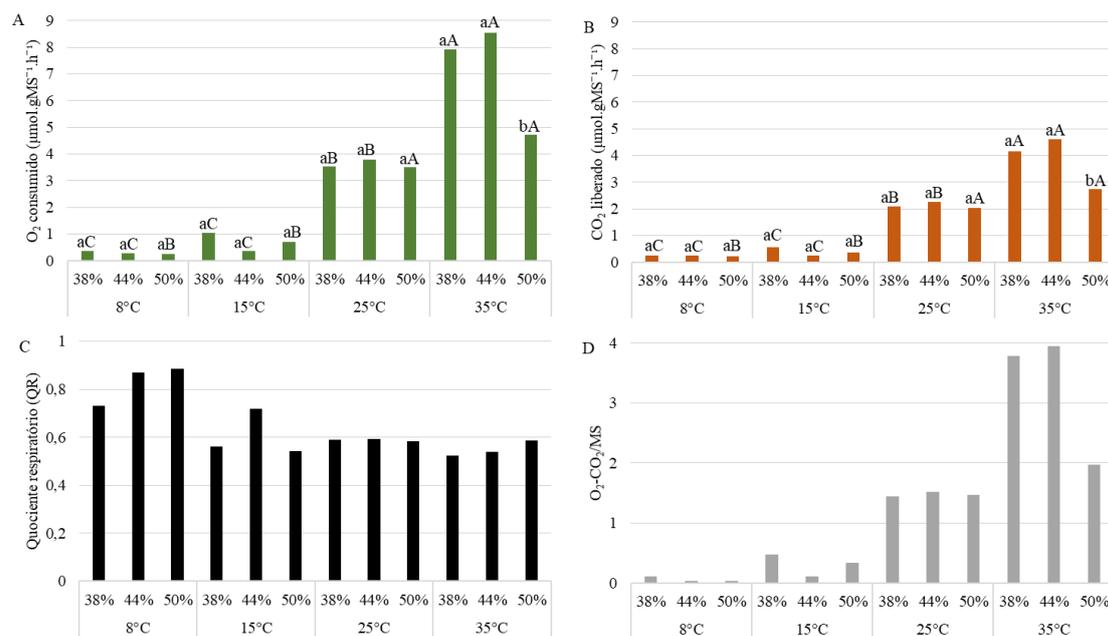


Figura 15. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação calculada por O₂-CO₂/MS (D) de sementes de *Eugenia brasiliensis* com três teores água diferentes (38, 44 e 50%) incubadas por 360 horas (8 e 15 °C) e 24 horas (25 e 35 °C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula entre teores de água e maiúscula entre temperaturas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Observando os resultados da atividade respiratória das sementes de *E. brasiliensis* nas temperaturas entre 8 e 25 °C, é possível notar um aumento gradativo no consumo de O₂ com o aumento da temperatura de incubação (Figura 16A), tanto para sementes úmidas (51%) quanto para sementes secas (44%). Contudo, a partir de 15 °C, esse consumo é significativamente maior quando as sementes são secas. Esse aumento também ocorre nas taxas oxidativas apresentadas na Figura 16D, com maior intensidade quando as sementes são secas. De acordo com Carneiro & Aguiar (1993) a umidade relativa do ar e a temperatura do ambiente são fatores que interferem diretamente na velocidade respiratória das sementes.

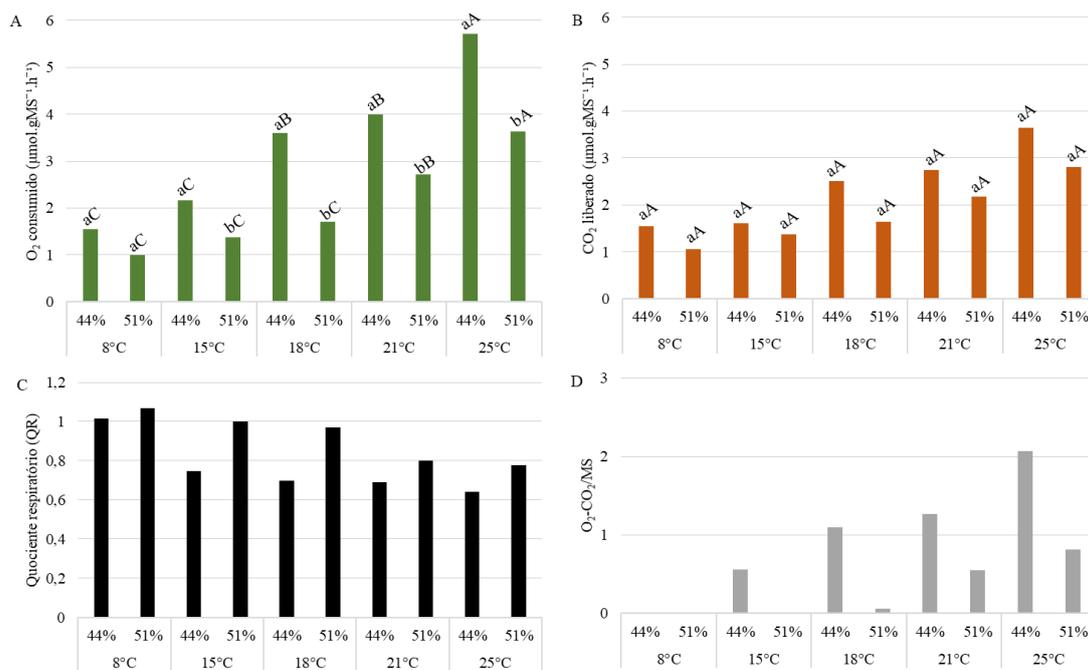


Figura 16. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação calculada por O₂-CO₂/MS (D) de sementes de *Eugenia brasiliensis* com dois teores água diferentes (44 e 51%) incubadas por 24 horas a 8, 15, 18, 21 e 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula entre teores de água e maiúscula entre temperaturas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Para sementes de *E. involucrata*, não houve interação significativa entre teor de água e temperatura de incubação nas taxas respiratórias. Contudo, essas taxas foram significativamente maiores a 25 °C e ainda maiores quando incubadas a 35 °C, como mostra a Figura 17A e B. Além disso, o consumo de O₂ foi maior em sementes com 46% de água do que em sementes com 64% de água (Figura 17A). O aumento da taxa respiratória com o aumento da temperatura de incubação também foi observado em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, que apresentou gradual aumento na respiração entre 2 e 40 °C (Amarante *et al.* 2007). Bem como observado em sementes de *E. brasiliensis*, apesar dos valores de QR das sementes de *E. involucrata*, em todas as condições, ficarem entre 0,5 e 0,7 (Figura 17C), as taxas oxidativas foram maiores quando em temperaturas elevadas, como 25 e 35 °C, e ainda maiores quando as sementes são secas, como mostra a Figura 17D.

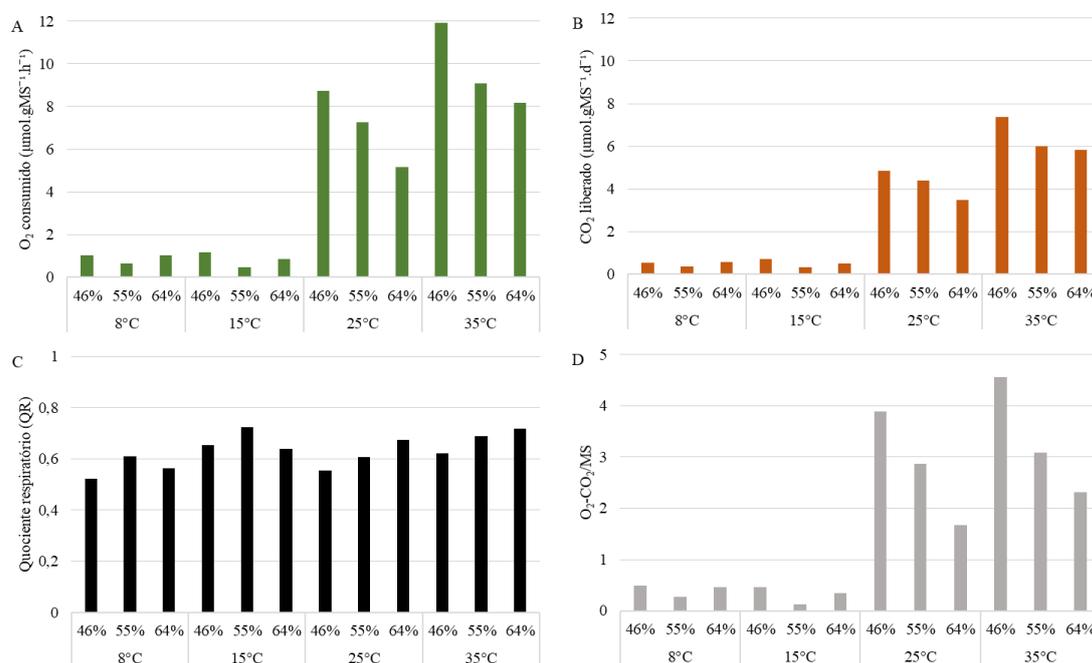


Figura 17. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação calculada por O₂-CO₂/MS (D) de sementes de *Eugenia involucrata* com três teores água diferentes (46, 55 e 64%) incubadas por 360 (8 e 15 °C) e 24 horas (25 e 35 °C). Não houve diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Analisando o metabolismo respiratório das sementes de *E. involucrata* na faixa de temperaturas entre 8 e 25 °C, foi possível observar um aumento significativo no consumo de O₂ a partir de 18 °C, tanto em sementes úmidas quanto secas. Contudo, sementes com 61% de água já mostravam maior consumo de O₂ e liberação de CO₂ em 15 °C. Em 25 °C esse consumo foi ainda maior em sementes secas, como mostra a Figura 18A. Já a quantidade de CO₂ liberado aumentou a partir de 21 °C e foi ainda maior a 25 °C, principalmente quando as sementes foram secas (Figura 18B). As taxas oxidativas aumentaram a partir de 18 °C, sendo mais elevadas a 21 e 25 °C, principalmente quando as sementes foram secas (Figura 18D).

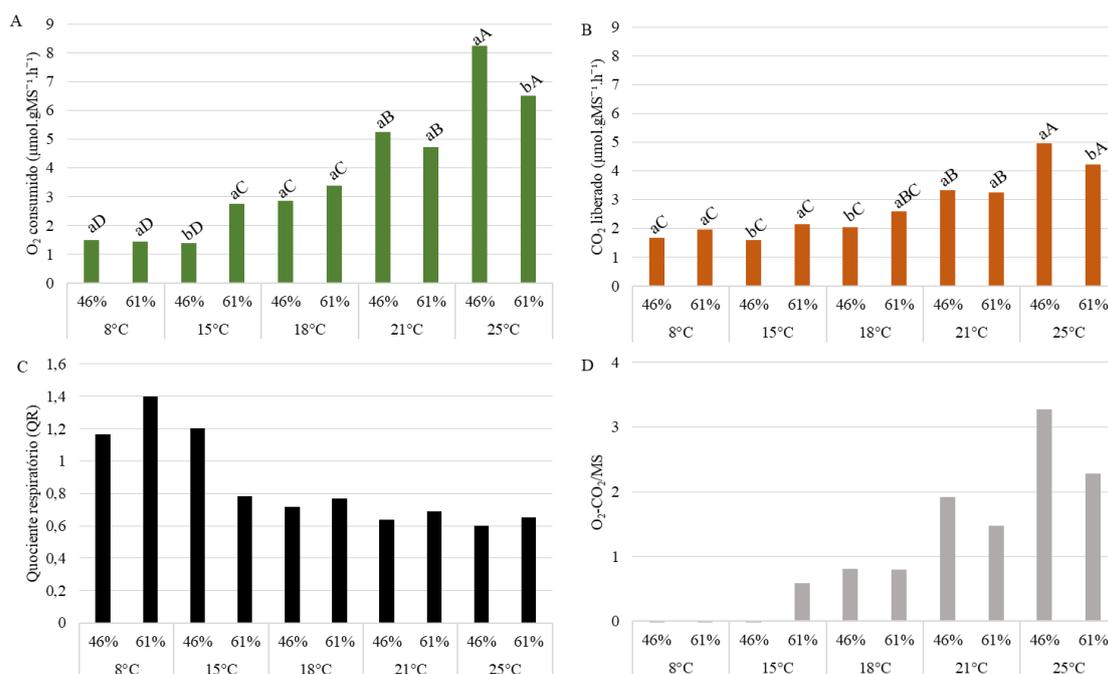


Figura 18. Consumo de O₂ (A), liberação de CO₂ (B), quociente respiratório (C) e taxa de oxidação calculada por O₂-CO₂ /MS (D) de sementes de *Eugenia involucrata* com dois teores água diferentes (46 e 61%) incubadas por 24 horas a 8, 15, 18, 21 e 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúscula entre teores de água e maiúscula entre temperaturas), de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Apesar da redução do teor de água das sementes das duas espécies em temperaturas mais altas causar aumento em seu metabolismo respiratório, nas temperaturas mais baixas esse metabolismo foi intensamente reduzido, como mostram os resultados a 8 °C. Para *E. brasiliensis* a associação dessas reduções favoreceu a conservação de suas sementes, que mantiveram elevada taxa de germinação mesmo após 720 dias de armazenamento em saco plástico. Já sementes de *E. involucrata*, por serem mais sensíveis à dessecação, se conservaram melhor quando mantidas úmidas a 8 °C, porém com elevadas taxas de germinação e plântulas normais após 720 dias de armazenamento em saco plástico. Apesar de as sementes dessas duas espécies possuírem características de sementes recalcitrantes foi possível conservá-las a médio prazo, o que garante seu estoque até que a nova safra seja obtida (Barbedo *et al.* 2018).

Referências bibliográficas

- Alegretti, A. L., Júnior, A. W., Bortolini, A., Hossel, C., Zanela, J. & Citadin, I.** 2015. Armazenamento de sementes de cerejas-do-mato (*Eugenia involucrata*) DC. submetidas ao recobrimento com biofilmes e embalagem a vácuo. *Revista Ceres* 62: 124-127.
- 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: 814-821.
- Amarante, C. V. T., Mota, C. S., Megguer, C. A. & Ide, G. M.** 2007. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. *Ciência rural* 37: 346-351.
- Araujo, A.C.F.B. & Barbedo, C.J.** 2017. Changes in desiccation tolerance and respiratory rates of immature *Caesalpinia echinata* Lam. seeds. *Journal of Seed Science* 39: 123-132.
- Barbedo, C.J.** 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science* 40: 221-236.
- Barbedo, C.J., Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40: 583-593.
- Barbedo, C.J., Silva, J.P.N., Françoso, C.F. & Parisi, J.J.D.** 2018. Armazenamento de sementes. *In*: Barbedo, C.J. & Santos-Junior, N.A. (eds.) *Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira*. Instituto de Botânica/ SMA, São Paulo, pp. 81-108.

- Bonjovani, M. R. & Barbedo, C. J.** 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. toleram temperatura subzero. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 345-356.
- Bonjovani, M. R. & Barbedo, C. J.** 2019. Respiration and deterioration of *Inga vera* ssp. *affinis* embryos stored at different temperatures. *Journal of Seed Science* 41: 44-53.
- Brasil.** 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília.
- Brasileiro, B.G., Silva, D. F. P., Bhering, M. C., Moura, E. B. B. & Bruckner, C. H.** 2011. Qualidade fisiológica de sementes de nêspera armazenadas em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 686-691.
- Carneiro, J. G. A. & Aguiar, I. B.** 1993. Armazenamento de sementes. In: I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia (eds.). *Sementes florestais tropicais*. ABRATES, Brasília, pp. 333-350.
- Carvalho, P. E. R.** 2009. Comunicado técnico, 224: Cerejeira *Eugenia involucrata* DC. Embrapa, Colombo.
- Comin, A., Pereira, L. D., Maciel, C. G., Chies, J. & Muniz, M. F. B.** 2014. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia uniflora* L. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 9: 84-90.
- Daws, M. I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C. A. & Pritchard, H. W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157-166.
- Decagon.** 2001. WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual. Pullman, Decagon Devices, Inc.

- Delgado, L.F., Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42: 265-272.
- 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: 624-634.
- 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: 583-590.
- Emer, A. A., Lucchese, J. R., For, C. S. & Schafer, G.** 2019. Viabilidade de sementes de *Campomanesia aurea* em diferentes temperaturas de armazenamento. Pesquisa Florestal Brasileira 39: 1-5.
- Faria, J. M. R., Davide, L. C., Silva, E. A. A., Davide, A. C., Pereira, R. C., Van Lammeren, A. A. M. & Hilhorst, H. W. M.** 2006. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *affinis* embryos during storage. Brazilian Journal of Plant Physiology 18: 503-513.
- Félix, F. C., Araújo, F. S., Ferrari, C. S. & Pacheco, M. V.** 2017. Dessecação e armazenamento de sementes de *Adonidia merrillii* (Becc.) Becc. Revista Brasileira de Ciências Agrárias 12: 86-91.
- Fowler, J. A. P.** 2018. Armazenamento das sementes de pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* Bert. O. Ktze.). In: 4º Encontro Brasileiro de Silvicultura, Ribeirão Preto, pp. 219-224.
- Françoso, C. F. & Barbedo, C. J.** 2016. Osmotic and heat treatment son control of fungi associated with seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis* (Myrtaceae). Journal of Seed Sciences 38: 195-203.

- Garcia, C., Coelho, C. M. M., Maraschin, M. & Oliveira, L. M.** 2014. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze durante o armazenamento. *Ciência Florestal* 24: 857-867.
- Inocente, M.C. & Barbedo, C.J.** 2019. Germination of *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis*, and *E. uniflora* (Myrtaceae) under water-deficit conditions. *Journal of Seed Science* 41: pp. 76-85.
- Kader, A. A. & Saltveit, M. E.** 2002. Respiration and gas exchange. *In*: Bartz, J. A., Brecht, J. K. & Weichmann, J. (eds). Postharvest physiology and pathology of vegetables. Marcel Dekker, New York, p.7-29.
- 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: 72-78.
- Lamarca, E. V. & Barbedo, C. J.** 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. *Hoehnea*, v.39, p.577-586, 2012.
- Lamarca, E. V. & Barbedo, C. J.** 2015. Sensibilidade à dessecação de embriões de *Inga vera* Willd. formados sob diferentes condições ambientais. *Revista Árvore* 39: 1083-1092.
- Lamarca, E. V., Leduc, S. N. M., & Barbedo, C. J.** 2009. Viability and vigor of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood-Leguminosae) by tetrazolium test. *Brazilian Journal of Botany* 32: 793-803.
- Lamarca, E. V., Camargo, M. B. P., Teixeira, S. P., Silva, E. A. A., Faria, J. M. R. & Barbedo, C. J.** 2016. Variations in desiccation tolerance in seeds of *Eugenia pyriformis*: dipsersal at different stages of maturation. *Revista Ciência Agronômica* 47: 118-126.

- Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M. T. C. & Sartori, S. F.** 2006. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura*. Plantarum, Nova Odessa.
- Maluf, A. M., Bilia, D. A. C. & Barbedo, C. J.** 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. Scientia Agricola 60: 471-475.
- Marcos-Filho, J.** 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. 2ed. Abrates, Londrina.
- Martins C. C., Bovi M. L. A., Nakagawa J. & Machado C. G.** 2009. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. Revista Árvore 33: 635-642.
- 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: 51 -56.
- Nascimento, W. M. O., Cicero, S. M. & Novembre, A. D. L. C.** 2010. Conservação de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Revista Brasileira de Sementes, 32: 24-33.
- Nery, F. C., Prudente, D. O., Alvarenga, A. A., Paiva, R. & Nery, M. C.** 2017. Storage of *Calophyllum brasiliense* Cambess. seeds. Brazilian Journal of Biology 77: 431-436.
- Oro, P., Schulz, D. G., Volkweis, C. R., Bandeira, K. B., Malavasi, U. C. e Malavasi, M. M.** 2012. Maturação fisiológica de sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess e *Eugenia involucrata* DC. Revista Biotemas 25: 11-18.
- Pammenter, N.W., Farrant, J.M. & Berjak, P.** 1984. Recalcitrant seeds: short term storage effects in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. may be germination associated. Annals of Botany 54: 843-846.

- Parisi, J. J. D., Biagi, J. D., Medina, P. F. & Barbedo, C.J.** 2016. Fungicide and drying effects on the viability of recalcitrant seeds of *Inga vera* subsp. *affinis*. *Tropical Plant Pathology* 41: 177-182.
- Santana, D. G. & Ranal, M. A.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Editora Universidade de Brasília, Brasília.
- Scalon, S., Scalon Filho, H. & Rigoni, M. R.** 2004. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. *Ciência e Agrotecnologia* 28: 1228-1234.
- Scalon, S. P. Q., Neves, E. M. S., Maseto, T. E. & Pereira, Z. V.** 2012. Sensibilidade à dessecação e ao armazenamento em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia). *Revista Brasileira de Fruticultura* 34: 269-276.
- Sershen, Varghese, B., Pammenter, N.W. & Berjak, P.** 2012a. Cryo-tolerance of zygotic embryos from recalcitrant seeds in relation to oxidative stress – a case study on two amaryllid species. *Journal of Plant Physiology* 169: 999-1011.
- Sershen, Berjak, P., Pammenter, N.W. & Wesley-Smith, J.** 2012b. Rate of dehydration, state of subcellular organisation and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. *Protoplasma* 249: 171-186.
- Silva, C. V., Bilia, D. A. C. & Barbedo, C. J.** 2005. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. *Revista Brasileira de Sementes*, v.27, p.86-92, 2005.
- Silva, J. C. A.** 2017. Caracterização de frutos, sementes e qualidade fisiológica de sementes de mungumba submetidas à secagem. *Magistra* 29: 182-191.
- Souto, P. C., Gonçalves, E. P., Viana, J. S., Ferreira, D. T. R. G., Ralph, L. N. & Souza, V. C., Andrade, L. A., Cruz, F. R. S., Fabricante, J. R. & Oliveira, L. S.**

- B.** 2011. Conservação de sementes de marizeiro *Geoffroea spinosa* Jacq. utilizando diferentes embalagens e ambientes. *Ciência Florestal* 21: 93-102.
- Souza, V. C. & Lorenzi; H.** 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa.
- Walters, C., Farrant, J. M., Pammenter, N. W. & Berjak, P.** 2002. Desiccation stress and damage. *In*: Black, M. & Pritchard, H. W. (Eds.). *Desiccation and survival in plants: drying without dying*. Wallingford, CABI Publishing, pp. 263-291.

Considerações finais e conclusões

Sabendo-se que uma atmosfera modificada rica em CO₂ e pobre em O₂ pode reduzir taxas respiratórias de sementes armazenadas (Aguiar *et al.* 2004, Villers *et al.* 2006), com os resultados obtidos no Capítulo 1 sobre o aumento da concentração de CO₂ na incubação das sementes de *E. brasiliensis*, foi possível estimar por quanto tempo incubar as sementes nas diferentes condições (Capítulo 2) sem que a alteração na concentração dos gases devido a própria respiração das sementes causasse alguma alteração significativa nas taxas respiratórias obtidas.

Diante disso, os resultados de respiração obtidos no Capítulo 2, nos mostram o aumento da atividade respiratória das sementes de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* quando se aumenta a temperatura de incubação e, ainda mais, quando se diminui o teor de água dessas sementes. Segundo Carneiro & Aguiar (1993), durante o armazenamento, a respiração das sementes deve ser mantida a nível mínimo, uma vez que taxas elevadas esgotam rapidamente as substâncias de reservas acumuladas na semente que seriam utilizadas para promover a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula.

Quando se compara as duas espécies, as sementes de *E. brasiliensis* mostraram taxas respiratórias mais baixas do que as de *E. involucrata*, principalmente quando são mantidas úmidas. De acordo com o modelo proposto por Barbedo *et al.* (2013) de que o nível de recalcitrância das sementes é baseado no grau de maturação em que são dispersas, sementes de *E. brasiliensis* são dispersas mais maduras do que as de *E. involucrata*, uma vez que aquelas apresentam menor conteúdo de água e menor sensibilidade à dessecação, como mostram os resultados obtidos no Capítulo 2. Além disso, a diferença nas taxas respiratórias obtidas entre as duas espécies também indica

essa diferença no grau de maturação entre elas. Segundo Marcos-Filho (2015), no início da formação das sementes (fase I e II) a taxa respiratória é elevada e estável, diminuindo apenas no final da maturação quando as sementes passam pela secagem natural e têm seu metabolismo quase cessado. Contudo, sementes de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* não passam pela secagem ao final da maturação, sendo dispersas com conteúdo de água elevado e comportamentos de sementes imaturas.

Considerando que existe um gradiente de tolerância à dessecação entre as sementes de diferentes espécies e que esta característica é adquirida progressivamente ao longo da maturação (Walters 2000, Ellis 2011), as sementes de *E. involucrata* estudadas apresentaram maior sensibilidade à dessecação do que as de *E. brasiliensis*, e ainda maior quando foram coletadas em 2018, indicando que foram dispersas ainda mais imaturas neste ano, provavelmente devido às condições ambientais em que foram formadas (Barbedo *et al.* 2013, Barbedo 2018).

Apesar das duas espécies estudadas apresentarem características físicas muito semelhantes, como mostra a Figura 19, ao longo do armazenamento das sementes, visto no Capítulo 2, foi possível observar grandes diferenças entre as espécies estudadas. Sementes de *E. brasiliensis* tiveram sua longevidade favorecida com a secagem, permanecendo viáveis mesmo após 720 dias armazenadas a 8 °C em saco plástico, quando provenientes do E2 (embalagem semipermeável). Além disso, sobreviveram por 120 dias armazenadas a 25 °C, inclusive em embalagem impermeável (vidro hermético) quando provenientes do E2. Já sementes de *E. involucrata*, apesar de também permanecerem com elevadas taxas de germinação e plântulas normais após 720 dias, isso só foi possível quando provenientes do E2 e foram armazenadas úmidas a 8 °C em saco plástico. Diferentemente do observado para sementes de *E. brasiliensis*, sementes

de *E. involucrata* perderam rapidamente sua viabilidade quando armazenadas a 25 °C, evidenciando sua baixa resistência ao armazenamento em condições desfavoráveis.



Figura 19. Árvore (A), flores – foto: Santiago Noronha (C), frutos (E) e sementes (G) de *Eugenia brasiliensis* e árvore (B), flores (D), frutos (F) e sementes (H) de *Eugenia involucrata*, destacando a semelhança física das flores, frutos e sementes das duas espécies.

Lamarca *et al.* (2016) também observaram diferentes comportamentos em sementes de *Eugenia pyriformis* que, quando coletadas em regiões ou épocas distintas, apresentaram diferentes graus de tolerância à dessecação. Além disso, verificaram que essas variações estavam relacionadas às condições hídricas e térmicas do ambiente no momento de formação das sementes, condicionando seu ciclo de maturação, sua qualidade fisiológica e a aquisição de tolerância à dessecação.

Apesar de, inicialmente as sementes das duas espécies não apresentarem diferenças entre os dois estádios de maturação coletados (E1 e E2), ao final do armazenamento apenas as sementes provenientes do E2 mantiveram elevadas taxas de germinação, evidenciando seu grau de maturação avançado comparado ao E1.

O tipo de embalagem utilizada para armazenar sementes é um fator que pode prolongar sua conservação, protegendo-as do contato com o ambiente e do ataque de insetos e outros organismos prejudiciais às sementes (Costa 2012). Os resultados obtidos no Capítulo 1 mostraram que o aumento da concentração de CO₂ na incubação das sementes de *E. brasiliensis* em vidros herméticos diminuiu seu metabolismo respiratório sem causar danos a sua viabilidade. Contudo, quando armazenadas por longos períodos em embalagens impermeáveis, é possível que o aumento na concentração de CO₂ e consequente diminuição de O₂, causado pela própria respiração das sementes, tenha provocado algum prejuízo durante esse armazenamento, uma vez que as sementes logo perderam sua viabilidade nessa condição. No presente estudo, apesar de as sementes de *E. involucrata* apresentarem alguma germinação após 180 dias em embalagem impermeável, a melhor embalagem foi a semipermeável (saco plástico) para as duas espécies estudadas, pois manteve altas taxas de germinação após 720 dias nessa condição.

Considerando que as duas espécies estudadas neste trabalho apresentam características potenciais para a produção comercial em larga escala, como a época de produção, a quantidade produzida e o sabor agradável dos frutos, os resultados de armazenamento obtidos aqui trazem uma importante contribuição quanto a conservação de suas sementes para a produção de mudas dessas espécies.

Apesar do avanço no armazenamento das sementes de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, não foi possível identificar um padrão na deterioração a partir de suas taxas metabólicas, o que reforça o quão complexas são e o quanto ainda se tem a estudá-las, principalmente com relação ao seu metabolismo.

Referências bibliográficas da Introdução geral e das Considerações finais e conclusões

- Aguiar, R.W.S., Sarmiento, R.A., Vieira, S.M. & Didonet, J.** 2004. Controle de pragas em grãos armazenados utilizando atmosfera modificada. *Bioscience Journal* 20: 21-27.
- Alpert P.** 2005. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology* 45: 685-695.
- Arantes, A. A. & Monteiro, R.** 2002. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 3: 111-127.
- AOSA.** 1983. Seed vigor testing handbook. Association of Official Seed Analysts. Contribution N° 32.
- Araújo, A. C. F. B.** 2017. Níveis de tolerância à dessecação de sementes ortodoxas imaturas de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Barbedo, C.J.** 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science* 40: 221-236.
- Barbedo, C.J., Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40: 583-593.
- Barbedo, C.J., Silva, J.P.N., Françoso, C.F. & Parisi, J.J.D.** 2018. Armazenamento de sementes. *In: Barbedo, C.J. & Santos-Junior, N.A. (eds.) Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira.* Instituto de Botânica/ SMA, São Paulo, pp. 81-108.

- Barbosa, J. P. L. & Mansano, S. R. V.** 2018. O reflorestamento da Mata Atlântica Brasileira: um estudo sobre as relações de poder na área ambiental. *Revista Org e Demo* 19: 109-126.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M. & Nonogaki, H.** 2013. Longevity, storage, and deterioration. *In* J.D. Bewley, K.J. Bradford, H.W.M. Hilhorst & H. Nonogaki 44 (eds.). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. 3ed. Springer, New York, pp. 341-376.
- Botanic Gardens Conservation International.** 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de jardins botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, Rio de Janeiro.
- Carneiro, J. G. A. & Aguiar, I. B.** 1993. Armazenamento de sementes. *In*: I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia (eds.). *Sementes florestais tropicais*. ABRATES, Brasília, pp. 333-350.
- Carvalho, N. M. & Nakagawa, J.** 2000. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.ed. 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.
- Costa, C. J.** 2012. Deterioração e armazenamento de sementes de hortaliças. Embrapa Clima Temperado, Pelotas.
- Daws, M. I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C. A. & Pritchard, H. W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157-166.
- Delouche, J.C.** 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News* 6: 1-7.

- Eastwood, R. J., Cody, S. T., Westengen, O. & Bothmer, R.** 2015. Conservation roles of the Millennium Seed Bank and the Svalbard Global Seed Vault. *In* S.S. Yadav, N. Maxted, M.E. Dulloo, L. Guarino, P. Smith (eds) *Crop Wild Relatives and Climate Change* R. Redden. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.
- Ellis, R. H.** 2011. Rice seed quality development and temperature during late development and maturation. *Seed Science Research* 21: 95-101.
- FAO.** 2013. Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Roma.
- Françoso, C. F. & Barbedo, C. J.** 2016. Osmotic and heat treatment son control of fungi associated with seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis* (Myrtaceae). *Journal of Seed Sciences* 38: 195-203.
- Galindo-Leal, C. & Câmara, I. G.** 2005. Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo.
- Hilhorst, H. W. M., Bewley, J. D., Castro, R. D., Silva, E. A. A., Therezinha, M., Brandão JR., D., Guimarães, R. M., Machado, J. C. Rosa, S. D. V. F. & Bradford, K. J.** 2001. Curso avançado em fisiologia e tecnologia de sementes. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- 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: 1027-1031.
- ISTA.** 1981. Handbook of vigour test methods. International Seed Testing Association. Zurich, Switzerland.
- Jones, H. A.** 1920. Physiological study of maple seeds. *Botanical Gazette* 69: 127-152.

- Kidd, F.** 1914. The controlling influence of carbon dioxide in the maturation, dormancy and germination of seeds. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character 7: 408-421.
- Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J.** 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. Hoehnea 39: 577-586.
- Lamarca, E. V. & Barbedo, C. J.** 2015. Sensibilidade à dessecação de embriões de *Inga vera* Willd. formados sob diferentes condições ambientais. Revista Árvore 39: 1083-1092.
- Lamarca, E. V., Camargo, M. B. P., Teixeira, S. P., Silva, E. A. A., Faria, J. M. R. & Barbedo, C. J.** 2016. Variations in desiccation tolerance in seeds of *Eugenia pyriformis*: dispersal at different stages of maturation. Revista Ciência Agronômica 47: 118-126.
- 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: 223-233.
- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C. & Leubner-Metzger, G.** 2010. The evolution of seeds. New phytologist 186: 817-831.
- Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M. T. C. & Sartori, S. F.** 2006. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura*. Plantarum, Nova Odessa.
- Manfre, A. J., LaHatte, G. A., Climer, C. R. & Marcotte Jr., W. R.** 2009. Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. Plant and Cell Physiology 50: 243-253.

- Marcos-Filho, J.** 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. 2ed. Abrates, Londrina.
- Martins, C. C., Bovi M. L. A., Nakagawa J. & Machado C. G.** 2009. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. *Revista Árvore* 33: 635-642.
- Mayrinck, R., Vaz, T. A. A. & Davide, A. C.** 2016. Physiological classification of forest seeds regarding the desiccation tolerance and storage behavior. *Cerne* 22: 85-92.
- MMA.** 2020. Conservação *in situ*, *ex situ* e *on farm*. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-douso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-insitu,-ex-situ-e-on-farm> (acesso em 03/03/2020).
- Nunes, E. C., Pilatti, F. K., Rescarolli, C. L. Gerber, T. Benson, E. E. & Viana, A. M.** 2012. The *in vitro* conservation of plants native to the Brazilian Amazon an Atlantic Forest. *In: Normah, M., Chin, H. F. & Reed, B. M. (eds) Conservation of Tropical Plant Species.* Springer-Verlag, New York, pp. 347-372.
- Pagnotta, S. E. & Bruni, F.** 2006. The glassy state of water: a 'stop and go' device for biological processes. *In: G.H. Pollack, I.L. Cameron & D.N. Wheatley (eds.). Water and the cell.* Springer, Dordrecht, pp. 93-112
- Popinigis, F.** 1985. Fisiologia da semente. 2.ed.: ABRATES, Londrina.
- Roberts, E. H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & 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: 53-60.
- Schmeda-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.
- Silva, A. & Ferraz, I. D. K.** 2015. Armazenamento de sementes. *In*: Piña-Rodrigues, F.C.M.; Figliolia, M.B.; Silva, A. (eds.) *Sementes florestais tropicais: da ecologia à produção*. ABRATES, Londrina, pp. 219-242.
- Silva, E. A. A., Oliveira, J. M. & Pereira, W. V. S.** 2018. Fisiologia de sementes. *In*: Barbedo, C. J. & Santos-Junior, N. A. (eds.) *Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira*. Instituto de Botânica/ SMA, São Paulo, pp. 15-40.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H.** 2008. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil*. Plantarum, Nova Odessa.
- Villers, P., Bruin, T. & Navarro, S.** 2006. Safe storage of grain in the tropics: a comparison of hermetic storage in flexible silos versus rigid metal or concrete silos. *In*: West, A. & Brown, J. (eds.) *Feed Technology Update*. Linx Publishing, Honolulu, pp. 17-22.
- Walters, C.** 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 7-21.
- Walters, C., Berjak, P., Pammenter, N., Kennedy, K. & Raven, P.** 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science* 339: 915-916.