ISABELA PEDRONI AMORIM

POTENCIAL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM INDUZIR RAÍZES NAS SEMENTES FRACIONADAS DE *EUGENIA* SPP. (MYRTACEAE)

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

ISABELA PEDRONI AMORIM

POTENCIAL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM INDUZIR RAÍZES NAS SEMENTES FRACIONADAS DE *EUGENIA* SPP. (MYRTACEAE)

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**

Amorim, Isabela Pedroni
A524p Potencial das espécies reativas de oxigênio em induzir raízes nas sementes fracionadas de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) / Isabela Pedroni Amorim -- São Paulo, 2020.
129p.; il.

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

1. Sementes recalcitrantes. 2. Metil viologênio. 3. N-acetil-l-cisteína. I. Título.

CDU: 582.4

À memória de Cida e Lauro,
meus queridos avós,
que foram e sempre serão a maior luz da minha vida.

“Though I do not believe that a plant will spring up
where no seed has been, I have great faith in a seed.
Convince me that you have a seed there, and I am prepared
to expect wonders.”

— H. D. Thoreau

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Claudio Barbedo, pela orientação, dedicação e por ter me proporcionado desde a Iniciação Científica a oportunidade de conhecer o melhor da ciência.

Ao Dr. João Paulo da Silva, pela sua colaboração indispensável em todas as etapas deste trabalho, desde a idealização do projeto inicial até a análise dos últimos resultados.

Ao Instituto de Botânica e ao Núcleo de Pesquisa em Sementes pela oportunidade e estrutura oferecidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

Aos funcionários e alunos dos Núcleos de Pesquisa em Plantas Ornamentais e em Fisiologia e Bioquímica, por cederem materiais e equipamentos que me permitiram fazer as análises bioquímicas.

Aos professores componentes da banca de defesa, Dr. Edmir Lamarca e Dra. Talita Amador, pelas críticas, correções e sugestões valiosas.

Aos professores examinadores da qualificação, Dra. Catarina Nievola, Dr. Marcio Bonjovani e Dr. Nelson dos Santos, por todas as críticas e sugestões.

Aos professores das disciplinas que cursei e que contribuíram não só para o desenvolvimento deste trabalho, mas principalmente para o meu desenvolvimento científico.

Às amizades que o IBt me proporcionou, e que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento deste trabalho: Aline Cécel, Cibelle Françoso, Debora Molizane, Gabriel Manoel, Giovanna Cancian, Jhonnatan Santos, Lara Moraes, Márcia Oliveira, Marina Silva, Matheus Siqueira, Roseli Bragante e Vera Lygia.

Às amigas Camila Alonso, Maiara Ribeiro, Mariane Inocente e Stephanie Alencar, que foram uma grande fonte de apoio, motivação e carinho.

Ao meu namorado, Victor Badaró, por tanta compreensão e carinho, mas, principalmente, por ser uma grande fonte de inspiração.

Finalmente, ao meu irmão Rafael Amorim, à minha tia Alda Pedroni e aos meus queridos pais, Luiz Amorim e Albameri Pedroni, por tanto amor e amparo, concedidos em todos os momentos da minha vida e em todas as decisões que tomei, e sem os quais eu certamente não teria percorrido o caminho que percorri.

RESUMO

O potencial morfogênico de *Eugenia* para regenerar novas plântulas a partir de sementes fracionadas é uma característica incomum na natureza, o que torna o gênero interessante não apenas do ponto de vista biológico, mas também tecnológico e conservacionista, uma vez que uma única semente, ao ser fracionada, pode dar origem a mais de uma planta. No entanto, o estímulo provocado pela lesão parece ser necessário para que tecidos cotiledonares sejam direcionados à formação de uma nova raiz, uma vez que sementes não fracionadas apresentam uma única germinação. Quando cortadas, as faces expostas ao ar escurecem rapidamente, indicando que intensos processos oxidativos estão ocorrendo no local da lesão. E, ainda que o acúmulo de radicais livres possa ser prejudicial às células, diversos trabalhos vêm demonstrando que, em baixas concentrações, estes compostos podem desempenhar um importante papel de sinalização celular, inclusive durante a germinação de sementes. Especialmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) são apontadas como moléculas indutoras de processos em plantas, e o tratamento de sementes com H_2O_2 exógeno ou com compostos geradores de EROs é capaz de induzir sua germinação. Por outro lado, a aplicação de compostos antioxidativos, que controlam a formação de radicais livres, podem inibir este efeito indutor. De fato, alguns trabalhos já demonstraram que a aplicação de antioxidantes parece inibir a germinação de sementes de *Eugenia*, indicando a existência de mecanismos fisiológicos de controle do processo germinativo em meio à formação de EROs nestas sementes. Tendo em vista que até o presente momento existe pouca informação sobre os mecanismos resposáveis por induzir e inibir a formação de raízes em sementes fracionadas de *Eugenia*, o objetivo deste estudo foi analisar a germinação e a capacidade regenerativa de sementes de *E. involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis* quando submetidas a um composto promotor (metil viologênio, MV) e um inibidor (N-acetilcisteina, NAC) de EROs. A incubação das sementes em MV não promoveu nenhum efeito positivo sobre sua germinação e foi prejudicial às sementes de vários tratamentos, indicando que a geração de EROs pode ter superado concentrações suportáveis pelas células, levando a um estresse oxidativo. A incubação no NAC apresentou efeito inibitório sobre o processo germinativo, assim como na regeneração das sementes. Ainda que os complexos caminhos metabólicos das plantas, especialmente das sementes, dificultem a obtenção de um conhecimento mais completo, os resultados apresentados aqui demonstram que as EROs desempenham diversos papéis na germinação de sementes de *Eugenia*, mas ainda estamos longe de compreender os detalhes desta relação.

Palavras-chave: radicais livres, sementes recalcitrantes, regeneração, metil viologênio, n-acetil-l-cisteína.

ABSTRACT

Eugenia's morphogenic potential to regenerate new seedlings from fractionated seeds is an unusual phenomenon in nature, making the genus interesting not just from the biological viewpoint, but also for technological and conservationist purposes, as a single seed can produce multiple seedlings after its sectioning. However, physical injuries seem to be the primary stimulus behind the projection of a new root from cotyledon tissues, as unfractionated seeds are restricted to a single root projection. After cutting, the air-exposed surface rapidly darkens, indicating that intense oxidative processes are taking place in the lesion area. Although the accumulation of free radicals can be harmful to cells, several studies have shown that in low concentrations these compounds can play a central role in plant cell signaling, even during seed germination. Reactive oxygen species (ROS) are known as process-inducing molecules, and the treatment of seeds with exogenous H_2O_2 or with other ROS-generating compounds can induce their germination. On the other hand, the application of antioxidative compounds, which control the formation of free radicals, has an inhibitory effect. In fact, previous studies demonstrated that the application of antioxidants seems to inhibit the germination of *Eugenia* seeds, indicating the existence of physiological mechanisms that control the germination process during the formation of ROS in these seeds. Given that, so far, there is few data on the mechanisms responsible for inducing and inhibiting the formation of roots in fractionated seeds of *Eugenia*, the aim of this study was to analyze the germination and regenerative capacity of *E. involucrata*, *E. uniflora* and *E. brasiliensis* seeds after their exposure to ROS promoter (methyl viologen, MV) and inhibitor (N-acetylcysteine, NAC). The incubation of seeds in MV did not promote any positive effect on their germination and was harmful to the seeds in several treatments, indicating that generation of ROS may have surpassed concentrations tolerated by the cells, leading to oxidative stress. Incubation in NAC had an inhibitory effect on the germination process, as well as on seed regeneration. Even though the complex metabolic pathways of plants, specially of their seeds, make it difficult to achieve a comprehensive knowledge, the present results show that ROS play several roles in *Eugenia* seeds germination, although we are far from understanding the details of this relation.

Keywords: free radicals, recalcitrant seeds, regeneration, methyl viologen, n-acetyl-l-cysteine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Duas sementes de *Eugenia brasiliensis* fracionadas longitudinalmente ao meio com as duas frações produzindo plântulas normais..... 11

Figura 2. Sementes de *Eugenia involucrata* fracionadas ao meio, evidenciando o escurecimento das faces cortadas após a exposição ao ar. Da direita para a esquerda, a primeira semente foi a primeira a ser cortada, e assim sucessivamente..... 17

Figura 3. Formação de diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio a partir do oxigênio basal ($_3O^2$). Adaptado de Apel & Hirt (2004)..... 20

Figura 4. Frutos e sementes de *Eugenia involucrata* (A) e *Eugenia uniflora* (B)..... 36

Figura 5. Testes de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* intactas em rolo de papel (A) e fracionadas em gerbox com papel (B) e de sementes de *Eugenia involucrata*, *Eugenia uniflora* e *Eugenia brasiliensis* em gerbox com vermiculita (C). 37

Figura 6. Semente de *Eugenia involucrata* cortada longitudinalmente em duas partes semelhantes..... 40

Figura 7. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata* incubadas em MV em concentrações de 4 mM, 2 mM, 1 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de MV dentro de frascos de vidro) e a incubações contínuas (em rolos de papel e em Gerbox com papel umedecidos com as soluções de MV)..... 41

Figura 8. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata*, armazenadas por mais de 120 dias, incubadas em MV em concentrações de 0,5 mM, 0,005 mM, 0,005 mM e em água. Sementes com raiz primária (CRP, esquerda) e sementes sem a raiz primária (SRP, direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de MV dentro de frascos de vidro) e a incubações contínuas (em rolos de papel e em Gerbox com papel umedecidos com as soluções de MV)..... 42

Figura 9. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata*, frescas e armazenadas por 60 dias, incubadas em MV em concentrações de 0,5 mM, 0,05 mM, 0,005 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de MV dentro de frascos de vidro) e a incubações contínuas (em rolos de papel e em Gerbox com papel umedecidos com as soluções de MV)..... 43

Figura 10. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*, incubadas em MV em concentrações de 0,005 mM, 0,0025 mM, 0,0005 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), foram submetidas a incubações por 3 e por 6 horas (submersas nas soluções de MV dentro de frascos de vidro)... 44

Figura 11. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata*, intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 1 mM, 2 mM e 4 mM de MV..... 47

Figura 12. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes frescas de *Eugenia involucrata*. Intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para tipo de incubação, maiúsculas para secagem e minúsculas em itálico para concentração do reagente)..... 48

Figura 13. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas por 60 dias. Intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para tipo de incubação, maiúsculas para secagem e minúsculas em itálico para concentração do reagente)..... 50

Figura 14. Emissão de raiz primária, formação de plântula normal (raiz + parte área) e formação de partes aéreas independentes em de sementes de *Eugenia involucrata* CRP (com raiz primária), armazenadas por mais de 120 dias, úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM de MV. (A) avaliação feita com 12 dias após a montagem do experimento e (B) após 50 dias. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para tipo de incubação, maiúsculas para secagem e minúsculas em itálico para concentração do reagente)..... 51

Figura 15. Sementes de *Eugenia involucrata* sem nenhum tipo de incubação (A) e incubadas em MV a 0,5 mM (B, C e D). Com parte aérea bem desenvolvida e ausência de raiz (B) ou parte aérea bem desenvolvida e raízes pouco desenvolvidas (C e D)..... 52

Figura 16. Emissão de raiz primária, formação de plântula normal (raiz + parte área) e formação de partes aéreas independentes em de sementes de *E. involucrata* SRP (sem raiz primária, isto é, com a raiz primária cortada), armazenadas por mais de 120 dias, úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM de MV. (A) avaliação feita com 12 dias após a montagem do experimento e (B) após 50 dias. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para tipo de incubação, maiúsculas para secagem e minúsculas em itálico para concentração do reagente)..... 53

Figura 17. Sementes de *Eugenia involucrata*, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 e 6 horas em água (0) e em soluções de 0,0005 mM, 0,0025 mM e 0,005 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente)..... 54

Figura 18. Sementes de *Eugenia uniflora*, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 e 6 horas em água (0) e em soluções de 0,0005 mM, 0,0025 mM e 0,005 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente)..... 55

Figura 19. Sementes de *Eugenia brasiliensis*, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 e 6 horas em água (0) e em soluções de 0,0005 mM, 0,0025 mM e 0,005 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente)..... 55

Figura 20. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes intactas de *E. involucrata* úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV..... 56

Figura 21. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes fracionadas de *E. involucrata* úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV..... 57

Figura 22. Tempo médio de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* intactas (colunas cinzas) e fracionadas (colunas pretas) incubadas continuamente e por 3 horas em água (0) e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV..... 57

Figura 23. Quantificação de H_2O_2 (µmol H_2O_2/g MF) em sementes de *Eugenia involucrata* úmidas e secas, intactas e fracionadas, incubadas em água (0) e em soluções de 0,5 mM de MV..... 59

Figura 24. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia involucrata* intactas e fracionadas incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV. Colunas brancas representam o consumo de O_2, colunas cinzas a liberação de CO_2 e colunas pretas o QR..... 61

Figura 25. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata* incubadas em NAC em concentrações de 200 mM, 100 mM, 50 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de NAC dentro de frascos de vidro) e a incubações contínuas (em rolos de papel e em Gerbox com papel umedecidos com as soluções de NAC)..... 73

Figura 26. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata*, *Eugenia uniflora* e *Eugenia brasiliensis*, incubadas em NAC em concentrações de 400 mM, 200 mM, 50 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de NAC dentro de frascos de vidro). Esquema elaborado pela própria autora..... 73

Figura 27. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes frescas de *Eugenia involucrata*, intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente)..... 75

Figura 28. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas por 60 dias, intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente)..... 76

Figura 29. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas por 120 dias, intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente)..... 77

Figura 30. Sementes de *Eugenia involucrata* úmidas e secas, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 200 mM e 400 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para secagem e maiúsculas para concentração do reagente)..... 78

Figura 31. Sementes de *Eugenia uniflora* úmidas e secas, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 200 mM e 400 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para secagem e maiúsculas para concentração do reagente)..... 79

Figura 32. Sementes de *Eugenia brasiliensis* úmidas e secas, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 200 mM e 400 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para secagem e maiúsculas para concentração do reagente)..... 79

Figura 33. Testes de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* fracionadas, incubadas por 3 horas em água (A) e em soluções de 50 mM (B), 100 mM (C) e 200 mM (D) de NAC..... 80

Figura 34. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes intactas de *E. involucrata* úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC..... 81

Figura 35. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes fracionadas de *E. involcurata* úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC..... 82

Figura 36. Tempo médio de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* intactas (colunas cinzas) e fracionadas (colunas pretas) incubadas continuamente e por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC..... 82

Figura 37. Quantificação de H_2O_2 (µmol H_2O_2/g MF) em sementes de *Eugenia involucrata* úmidas e secas, intactas e fracionadas, incubadas em água (0) e em soluções de 200 mM de NAC..... 84

Figura 38. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia involucrata* intactas e fracionadas incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC. Colunas brancas representam o consumo de O_2, colunas cinzas a liberação de CO_2 e colunas pretas o QR..... 85

Figura 39. Esquema do experimento com sementes de *Eugenia involucrata* pré-incubadas por 3 horas em NAC (200 mM) e submetidas a novos tratamentos de incubação em NAC (200 mM), MV (0,5 mM) e água..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Secagem de sementes de *Eugenia involucrata* por 3 horas, em estufa à 45 ºC, e seus respectivos teores de água a cada 1 hora..... 39

Tabela 2. Embebição de sementes de *Eugenia involucrata*, secas ou úmidas, intactas ou fracionadas, em papel saturado de água, e seus respectivos teores de água após 1, 24 e 48 horas de embebição..... 40

Tabela 3. Caracterização de sementes de *Eugenia involucrata*, de diferentes lotes e armazenadas por diferentes períodos, de acordo com o conteúdo de água (%), massa seca (g/g) e germinação..... 45

Tabela 4. Relação de siglas e descrições dos tratamentos utilizados para a quantificação de H_2O_2 em sementes de *Eugenia involucrata*..... 58

Tabela 5. Relação de siglas e descrições dos tratamentos utilizados para a quantificação de H_2O_2 em sementes de *Eugenia involucrata*..... 83

Tabela 6. Germinação (emissão de raiz primária) e formação de plântula normal, em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata* pré-incubadas por 3 horas em NAC (200 mM) e submetidas a novos tratamentos de incubação em NAC (200 mM), MV (0,5 mM) e água..... 87

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS iv
RESUMO v
ABSTRACT vi
LISTA DE FIGURAS vii
LISTA DE TABELAS xi

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. HISTÓRICO DOS ESTUDOS COM *EUGENIA* E SUA CAPACIDADE REGENERATIVA 8
1.1.1. O EMBRIÃO DE *EUGENIA* 9
1.1.2. A REGENERAÇÃO DAS SEMENTES 11
1.1.3. O AUTOCONTROLE DA REGENERAÇÃO 14
1.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E PROCESSOS OXIDATIVOS EM SEMENTES 19

2. *CAPÍTULO 1*: INDUÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *EUGENIA* SPP. PELA APLICAÇÃO DE METIL VIOLOGÊNIO 33
2.1. INTRODUÇÃO 34
2.2. MATERIAL E MÉTODOS 35
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

3. *CAPÍTULO 2*: INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *EUGENIA* SPP. PELA APLICAÇÃO DE N-ACETIL-L-CISTEÍNA 70
3.1 INTRODUÇÃO 71
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 72
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 75
3.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

4. DISCUSSÃO GERAL 92

5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DA DISCUSSÃO GERAL 98

1. INTRODUÇÃO

> "Seeds are spectacular and intriguing organisms. They are at the core of plant kingdom because they retain the genetic information of higher plant species, which survival and dissemination depend on seed longevity and successful germination. Seeds have some particularities which must be considered when investigating the role of ROS in their germination."
>
> - Bailly (2019, p.3019)

O Brasil é mundialmente reconhecido por sua imensa diversidade biológica, especialmente por sua flora, sendo considerado um dos principais centros de diversidade genética em espécies frutíferas do mundo (Pereira *et al.* 2012). E ainda que a Amazônia e o Cerrado sejam conhecidos por possuírem a maior variedade de espécies frutíferas nativas, a região sul também é detentora de uma grande riqueza em frutos silvestres, dentre os quais a família Myrtaceae ocupa um lugar de destaque. A família apresenta o maior número de espécies com potencial alimentício, que possuem inúmeras propriedades medicinais e poderiam ser comercializadas para o consumo *in natura* ou para uso na fabricação de sucos, sorvetes, iogurtes, licores, doces, geleias etc. (Pereira *et al.* 2012).

Muitos frutos de Myrtaceae são atrativos visualmente e agradáveis ao paladar, mas destacam-se principalmente por suas propriedades medicinais. A pitangueira (*Eugenia uniflora*), por exemplo, é utilizada há muito tempo na medicina popular para diferentes fins. A composição química de seus frutos, incluindo suas sementes, é rica em cálcio, fósforo, antocianina, flavonoides, carotenoides e vitamina C (ascorbato), que indicam sua alta propriedade antioxidativa (Franzon *et al.* 2018). O elevado consumo de frutos e outros vegetais com potencial antioxidativo pode estar associado a uma incidência reduzida de certos tipos de cânceres e a efeitos benéficos em doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e catarata (Steinmetz & Potter 1996, Ratnam *et al.* 2006, Pereira 2012). Os frutos de grumixama (*Eugenia brasiliensis*) são conhecidos como uma fonte rica em compostos bioativos relacionados a benefícios para a saúde e à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas (Teixeira *et al.* 2018). Os principais compostos bioativos encontrados nestes frutos são flavonoides, elagitaninos e carotenoides (Okuda *et al.* 1982, Reynertson *et al.* 2008, Abe *et al.* 2012, Fracassetti *et al.* 2013), que têm sido investigados como possíveis agentes responsáveis por reduzir a incidência de doenças crônicas, distúrbios tumorais, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e outros distúrbios inflamatórios crônicos

(Teixeira *et al.* 2018). Os frutos de uvaia (*Eugenia pyriformis*) também são considerados uma ótima fonte de ferro e zinco, além de um alto teor de vitamina C, compostos fenólicos e carotenoides, ou seja, igualmente constituindo uma fonte rica em antioxidantes (Pereira *et al.* 2014, Silva *et al.* 2018).

Portanto, frutos do gênero *Eugenia*, e da família Myrtaceae como um todo, podem proporcionar uma maior variedade à dieta de um público de consumidores mais conscientes que buscam por alimentos saudáveis, fornecendo antioxidantes naturais que protegem o organismo de diversas doenças e do envelhecimento precoce (Pereira 2012). Além disso, o aumento na produção desses frutos pode torna-los acessíveis às populações de baixa renda, que atualmente possuem um estado de saúde inferior ao das classes sociais mais altas, fato que está diretamente relacionado à qualidade inadequada de sua dieta, caracterizada pelo consumo insuficiente de hortaliças e frutos (Coelho *et al.* 2009). A produção e a construção de conhecimentos que unem as dimensões ambientais, sociais, culturais e de saúde, bem como a divulgação dessas informações para o público leigo, também podem favorecer a utilização destes frutos nativos na alimentação popular.

De fato, estudos sobre segurança alimentar e nutricional buscam reverter a tendência mundial de expansão das monoculturas de *commodities*, promovendo modelos de agricultura diversificados, equitativos e nutritivos (Keple 2014). Ao promover a inclusão desses produtos florestais nativos do Brasil em mercados, através de práticas sustentáveis e produção de alimentos de ampla qualidade, além da conservação da biodiversidade, fomenta-se a manutenção de valores socioambientais associados (Cadeias 2019), pois mais da metade da população de municípios com maior cobertura vegetal do Brasil vive em condições de pobreza (Kasecker *et al*. 2017). Estas iniciativas resguardariam, portanto, o protagonismo das famílias agricultoras e extrativistas, gerando renda e reduzindo a pobreza.

As espécies frutíferas nativas ainda são importantes para a recuperação de áreas degradadas, uma vez que seus frutos são atrativos para a fauna local, principalmente para aves e macacos, mas também para lagartos, morcegos, roedores, peixes etc. (Pizzo 2002, Castro & Galetti 2004, Gressler *et al*. 2006). Mas, infelizmente, a produção de insumos florestais para a comercialização, ou até mesmo para o uso na restauração de áreas degradadas, enfrenta alguns obstáculos, como, por exemplo, a natureza recalcitrante de suas sementes, que são dispersas com elevado teor de água e tendem a perder sua viabilidade quando secas a níveis necessários para sua conservação em armazenamento (Anjos & Ferraz 1999, Delgado & Barbedo 2007). Outro grande obstáculo encontrado é a indisponibilidade, em quantidades suficientes, de sementes de espécies florestais (Calvi 2015). Muitas espécies de *Eugenia*, por exemplo, apresentam baixa densidade de ocorrência natural, além de muitas

delas produzirem frutos com poucas sementes, frequentemente uma ou duas, dificultando a obtenção de quantidades suficientes que permitam a produção de mudas em larga escala (Silva *et al.* 2005).

Por outro lado, as sementes de *Eugenia* possuem uma característica rara, que pode permitir o desenvolvimento de tecnologias a fim de aumentar seu potencial em produzir mudas a partir de um mesmo lote de sementes (Silva *et al.* 2005). O potencial morfogênico de *Eugenia* para regenerar novas plântulas a partir de sementes fracionadas é um fenômeno incomum na natureza, tornando o gênero interessante não apenas do ponto de vista biológico, mas também tecnológico e conservacionista. Uma vez que uma única semente, ao ser fracionada, pode dar origem a mais de uma planta, seu uso pode ser maximizado (Anjos & Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003, 2005), proporcionando, possivelmente, uma vantagem ecológica para o grupo. De fato, muitas espécies de *Eugenia* são atacadas por insetos, principalmente devido ao desenvolvimento larval de Coleóptera no interior de suas sementes e frutos. Portanto, manter a capacidade de germinar após ter parte de sua massa removida e produzir plântulas normais em pequenas frações de sementes pode representar um ganho evolutivo, permitindo a propagação e o estabelecimento dessas espécies na natureza. Além disso, essa característica parece estar presente em todo o gênero, pois todas as espécies que foram testadas até o momento, domesticadas e não-domesticadas, demonstraram essa capacidade regenerativa (cf. Silva *et al.* 2003, 2005, Delgado *et al.* 2010, Calvi *et al.* 2016).

Ainda que a poliembrionia seja comum na família Myrtaceae, a formação de novas raízes e plântulas a partir de sementes fracionadas de *Eugenia* não pode ser atribuída a múltiplos embriões, pois este gênero, especificamente, possui sementes monoembriônicas (Delgado 2010). Em *E. pyriformis*, por exemplo, o eixo embrionário não pode ser visto a olho nu, mas com o auxílio de uma lupa de pequeno aumento é possível identificar o polo embrionário em uma das extremidades da cicatriz rafeal na superfície dos cotilédones (Justo *et al.* 2007). Essa dificuldade em localizar o eixo tem levado alguns autores a considerar que as sementes são compostas por embriões conferruminados sem distinção de cotilédones nem de eixo hipocótilo-radícula (Barroso *et al.* 1995). E além do potencial meristemático dos embriões, estas sementes têm sido consideradas totipotentes, devido à sua capacidade de voltar a brotar quando cortadas em partes (Anjos & Ferraz 1999, Mendes & Mendonça 2012).

Quando fracionadas, sementes de *Eugenia* podem produzir mais de uma raiz e parte aérea, além de poder germinar e produzir uma nova planta mesmo após a remoção de parte de suas reservas. Sementes de algumas espécies do gênero foram fracionadas em até oito partes e ainda assim foram capazes de germinar e produzir raízes em todos as frações (Silva

et al. 2003). Mas também foi demonstrado que o aumento no número de fracionamentos por sementes de *E. pyriformis* reduz sua capacidade regenerativa, principalmente em razão da redução na disponibilidade de reservas para cada plântula formada (Silva *et al.* 2003). O limite máximo de fragmentos germináveis parece não estar relacionado à capacidade de diferenciar novos tecidos, mas à quantidade de reservas resultantes na fração, decorrente do tamanho inicial dessas sementes e da quantidade de sementes por fruto (Prataviera *et al.* 2015).

Contudo, o estímulo da lesão parece ser necessário para que tecidos cotiledonares sejam direcionados à formação de uma nova raiz (que se inicia na bainha dos feixes vasculares), pois em sementes intactas, ou seja, àquelas que não foram submetidas a cortes, não costuma ocorrer mais de uma germinação (Delgado 2010). Além disso, quando fracionadas, cada fração geralmente produz apenas uma nova raiz e uma nova parte aérea, sugerindo a atuação de mecanismos de autocontrole da germinação responsáveis por evitar múltiplas germinações. Portanto, acredita-se que estas sementes produzam substâncias estimulantes e inibidoras da germinação, e que a resultante do balanço entre elas direcione os processos para a produção ou não de novas plântulas. Um balanço entre essas substâncias a favor da inibidora deve manter ativo apenas um processo germinativo, até que a interrupção no transporte dessa substância inibidora (causada pelo fracionamento) permita a produção de uma nova raiz e, consequentemente, uma nova plântula.

Já em 1970, Rizzini havia verificado que sementes de *Eugenia dysenterica* (cagaita) possuíam substâncias inibidoras da germinação e que esse potencial inibidor aumentava quando o embrião começava a germinar. Posteriormente, Delgado & Barbedo (2011) também demonstraram que extratos de sementes germinantes de *E. uniflora* apresentam potencial inibidor da germinação e do desenvolvimento inicial das plântulas de alface e feijão. Portanto, a primeira germinação parece iniciar a produção de inibidores de novas germinações nessas sementes.

Também foi demonstrado que o desenvolvimento de uma raiz ou plântula promove processos de inibição do desenvolvimento de novas germinações na mesma semente de *E. pyriformis* (Amador & Barbedo 2011). Os autores demonstraram que a produção de compostos inibidores deve ser contínua, cumulativa e oriunda da região na qual há crescimento da plântula, visto que, em sementes germinantes, nas quais a plântula estava há mais tempo ligada ao cotilédone, a percentagem de germinação foi menor do que nas não-germinantes. Em vista disso, suspeita-se que o desenvolvimento de uma segunda raiz em uma mesma semente de *E. pyriformis* é dependente do bloqueio de substâncias ou de processos de inibição que se iniciam quando a primeira germinação ocorre. Os resultados de

sementes fissuradas (i.e., com cortes incompletos) fornecem importantes indícios da presença de tais substâncias, pois enquanto o corte não foi completado, isolando definitivamente as metades da semente, apenas uma germinação foi verificada (Amador & Barbedo 2011).

Por outro lado, é preciso considerar a possibilidade de que as sementes fracionadas de *Eugenia* estejam sob influência dos dois processos, de indução e de inibição, com balanço ora favorável ao desenvolvimento de novas raízes e plântulas, ora desfavorável. Deste modo, nas sementes inteiras, a formação de uma única raiz pode ser decorrente da falta de estímulo à regeneração ou de um balanço favorável à inibição. Já nas fracionadas parece evidente que o estímulo à regeneração ocorre e que, quando a germinação se inicia, novamente se iniciam processos de inibição da regeneração de outras raízes e plântulas. O corte das sementes de *Eugenia* é seguido pelo rápido escurecimento da face cortada exposta ao ar, indicando intensos processos oxidativos ocorrendo no local da lesão (Anjos & Ferraz 1999). Curiosamente, espécies reativas de oxigênio (EROs) têm, entre outras propriedades, a capacidade de induzir processos biológicos, inclusive relacionados à germinação de sementes, e poderiam estar ligadas à indução da formação de novas raízes em sementes fracionadas de *Eugenia*.

As EROs, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), possuem propriedades citotóxicas e, em altas concentrações, podem oxidar descontroladamente proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, culminando na ruptura do metabolismo e na destruição das estruturas celulares (Desikan *et al.* 2005). De fato, a deterioração das sementes está relacionada, entre outros fatores, à oxidação por EROs, e sua longevidade pode ser aumenta com a eliminação dessas moléculas (Ishibashi *et al.* 2013). No entanto, as EROs também desempenham um importante papel de sinalização celular nas plantas, controlando processos como crescimento, desenvolvimento, produção hormonal, resposta a estímulos ambientais bióticos e abióticos e morte celular programada (Bailey-Serres & Mittler 2006).

O papel positivo desempenhado pelas EROs na germinação de sementes também tem sido observado em diversos trabalhos, e uma das principais fontes de EROs é a NADPH oxidase, que atua como enzima chave na germinação e no crescimento das plântulas (Ishibashi *et al.* 2010). Em algumas sementes, a embebição com H_2O_2 promoveu e acelerou a germinação e estimulou o crescimento das mudas (Barba-Espin *et al.* 2010, Gondim *et al.* 2010). Por outro lado, a aplicação de compostos antioxidativos, que eliminam as EROs do organismos, parece suprimir de forma significativa a germinação de sementes de algumas espécies (Ogawa & Iwabuchi 2001, Ishibashi & Iwaya-Inoue 2006).

Ao longo dos últimos anos o conhecimento acerca destas sementes avançaram bastante, mas até o presente momento, os mecanismos responsáveis por induzir e inibir a formação de raízes em sementes fracionadas de *Eugenia* ainda não estão esclarecidos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a capacidade regenerativa das sementes de *Eugenia*, intactas e fracionadas, quando submetidas a incubações em metil viologênio (MV), um composto indutor de EROs, e incubações em n-acetil-l-cisteína (NAC), um inibidor de EROs, procurando testar a hipótese de que as EROs estão relacionadas com a indução da formação de raízes nestas sementes. Para tanto, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro visa verificar se a aplicação exógena de MV pode exercer alguma influência positiva sobre a germinação de sementes intactas e fracionadas de *Eugenia*, como induzir a formação de novas raízes, acelerar o processo germinativo ou superar os inibidores produzidos por uma primeira germinação. Enquanto o segundo capítulo pretende verificar se a diminuição das taxas de EROs, através da aplicação de NAC, pode inibir a germinação e regeneração de sementes intactas e fracionadas de *Eugenia*. Além disso, considerando que os sistemas antioxidantes são formados durante a maturação das sementes (Arrigoni *et al.* 1992, Tommasi *et al.* 1999), e que sementes recalcitrantes podem não completar a maturação (Barbedo *et al.* 2013), também buscou-se avaliar se a aplicação de antioxidantes exógenos influencia outros aspectos das sementes recalcitrantes de *Eugenia*.

1.1. HISTÓRICO DOS ESTUDOS COM *EUGENIA* E SUA CAPACIDADE REGENERATIVA

A família Myrtaceae Juss., descrita pela primeira vez em 1789 por Antoine Laurent de Jussieu, em sua obra *Genera Plantarum*, possuí distribuição predominantemente Pantropical e subtropical, incluindo cerca de 130 gêneros e 4.000 espécies. No Brasil, as mirtáceas possuem uma grande representatividade, com 22 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies (Souza & Lorenzi 2012). Atualmente, a família é uma das mais complexas do ponto de vista taxonômico, tanto pelo número de espécies e escassez de estudos, quanto pela utilização de caracteres complexos na sua identificação, como, por exemplo, o tipo de embrião na distinção de grandes grupos (Souza & Lorenzi 2012).

Segundo McVaugh (1956), os representantes americanos da família Myrtaceae eram considerados um grupo ainda mais difícil e carente de estudos sistemáticos, e isso se devia em parte ao grande número de espécies nos trópicos americanos e em parte a certas características particulares das próprias plantas. A identificação do material floral já era bastante difícil, uma vez que as distinções entre gêneros foram feitas principalmente com base em caracteres do embrião maduro. Além disso, em material seco as identificações se tornam um desafio. Se mesmo nos espécimes com frutos maduros os caracteres dos embriões nem sempre são fáceis de serem observados, naquelas ainda em floração isso se torna quase impossível (McVaugh 1956).

De Candolle (1828) reconheceu as mirtáceas americanas, aquelas cujos frutos eram carnosos, como uma tribo, que ele chamou de Myrteae. Suas contribuições, e de Berg (1855-62), foram fundamentais para o conhecimento das espécies e gêneros de Myrteae. O autor também dividiu boa parte de Myrteae em três grupos principais, Myrciinae, Eugeniinae e Pimentinae (que, posteriormente, foram caracterizados por Berg como subtribos, Eugeniinae, Myrciinae e Myrtiinae), baseando-se, de novo, na morfologia dos embriões desses grupos (De Candolle 1828). Mas, curiosamente, um dos principais obstáculos para os estudos sobre as mirtáceas americanas durante o século passado parece ter sido os dois tratados complexos e fundamentais de Berg, que lançaram as bases para todos os trabalhos taxonômicos posteriores sobre os representantes americanos desta família. Suas monografias eram difíceis de serem usadas devido ao grande número de espécies em certos gêneros e em certas áreas. Além disso, a monografia de Berg considera um grande número de características que são observáveis apenas em espécimes com frutificação plenamente desenvolvida, o que se torna ainda mais crítico para as áreas onde muitas espécies são conhecidas (McVaugh 1956).

Atualmente os estudos com Myrtaceae continuam representando um grande desafio, e as identificações genéricas, feitas muitas vezes com caracteres ambíguos, podem desencorajar pesquisadores em potencial. A divisão de Myrteae nas três subtribos Eugeniinae, Myrciinae e Myrtiinae com base na morfologia dos embriões, ainda que complexa, continua sendo aceita, e a grande variação nos frutos e nas sementes do gênero *Eugenia* geram um interesse particular (Landrum & Kawasaki 1997). De acordo com Berg, as espécies de mirtáceas americanas conhecidas compreendiam um total de 1.726, das quais ele próprio propôs 1.008, com *Eugenia* já figurando um dos gêneros mais diversos, com 537 espécies (McVaugh 1956). Atualmente, *Eugenia* é considerado o maior gênero de Myrtaceae neotropical (Mazine *et al.* 2018), sendo o gênero de angiospermas com maior número de espécies no Brasil (BFG 2015) e o segundo gênero de árvores mais diverso em espécies do mundo (Beech *et al.* 2017), compreendendo cerca de 1.100 espécies (WCSP 2017).

1.1.1. O EMBRIÃO DE *EUGENIA*

A subtribo Eugeniinae, que compreende o gênero *Eugenia*, é caracterizada por seus embriões eugenióides, constituídos por duas formas básicas: (1) cotilédones grossos, separados, plano-convexos e hipocótilo em uma pequena protrusão; e (2) cotilédones fundidos parcial ou completamente em uma única massa e hipocótilo não-distinguível (Landrum & Kawasaki 1997). Além dessas características, as sementes de *Eugenia* são exalbuminosas, ocupando toda a cavidade delimitada pelo envoltório e consomindo todo o seu endosperma ao longo do desenvolvimento (Flores & Rivera 1989). Seu embrião é conferruminado (i.e., com cotilédones aderidos e sem vestígio de eixo hipocótilo-radícula, sugerindo a presença de tecido meristemático não diferenciado) e apontado como pseudomonocotiledonar (i.e., cotilédones parcialmente concrescidos entre si e indivisos) (McVaugh 1956). O material de reserva dessas sementes pode ser constituído por amido, grão de aleurona, óleo, entre outros, que podem se acumular nos cotilédones ou no eixo hipocótilo-radicular (Souza 2006).

As sementes de *Eugenia* possuem um único embrião, mas a poliembrionia é uma característica muito comum e amplamente estudada para alguns gêneros de mirtáceas, já tendo sido mencionada, inclusive, para sementes de *Eugenia* (cf. Johnson 1936, Litz 1984). No entanto, ainda que a delimitação de espécies em *Eugenia* seja controversa, a maioria dos estudos confirmam a monoembrionia do gênero e sugere-se que as espécies com sementes poliembriônicas devem ser incluídas no gênero *Syzygium* (Van Wyk & Botha 1984,

Lughadha & Proença 1996). Um estudo sobre a poliembrionia em mirtáceas frutíferas demonstrou que sementes de espécies do gênero *Eugenia* possuíam um único embrião, enquanto sementes de gêneros muito próximos, como *Syzygium* e *Myrciaria*, eram poliembriônicas (Gurgel & Soubihe-Sobrinho 1951). As espécies de *Eugenia* utilizadas neste estudo foram *E. uniflora*, *E. pyriformis*, *E. brasiliensis* e a antiga *Eugenia tomentosa* (cabeludinha), que hoje é classificada como *Plinia glomerata*. A *Myrcianthes edulis* (cereja-do-rio-grande) também foi descrita como monoembriônica, e atualmente é classificada como *Eugenia involucrata*. Posteriormente também foi confirmada a monoembrionia de *E. brasiliensis*, *E. uniflora*, *E. tomentosa* e *E. pyriformis*, e também verificada a monoembrionia em sementes de *Eugenia lucescens* e *Eugenia myrcianthes* (Lughadha & Proença 1996).

Em 1999, Anjos & Ferraz analisaram a morfologia de sementes de *Eugenia stipitata* (araçá-boi) e confirmaram sua monoembrionia e a natureza pseudomonocotiledonar de seu embrião, como nas espécies de *Eugenia* descritas anteriormente. Segundo os autores, seu único embrião não apresenta eixo embrionário distinto e é composto apenas pela massa cotiledonar volumosa e branco-leitosa, resultado da fusão lateral e parcial dos cotilédones, constituindo "áreas de soldadura" lateral que impedem que eles sejam separados sem que sejam danificados. Outros autores também demonstram a ausência de distinção entre o eixo hipocótilo-radícula e os cotilédones em sementes de *Eugenia* spp. (Andrade & Ferreira 2000, Lucas *et al.* 2005). Em *E. pyriformis*, por exemplo, o eixo embrionário não é visível a olho nu, mas com o auxílio de uma lupa de pequeno aumento é possível identificar o polo embrionário em uma das extremidades da cicatriz rafeal na superfície dos cotilédones (Justo *et al.* 2007). Essa dificuldade em localizar o eixo levou alguns autores a aceitarem a hipótese de que as sementes são compostas por embriões conferruminados (Barroso *et al.* 1999).

Ao longo dos últimos anos, muitos estudos foram feitos buscando caracterizar as sementes de *Eugenia*, principalmente no que se refere aos seus aspectos fisiológicos. Contudo, as áreas de estudos com sementes florestais nativas ainda são pouco exploradas e carecem de pesquisas nesse aspecto. Sabe-se que as sementes de *Eugenia* são dispersas com altos teores de água e são recalcitrantes (i.e., sensíveis à dessecação), não conseguindo, portanto, manter-se viáveis por longos períodos em armazenamento, no máximo por poucos meses (Flores & Clement 1984, Flores & Rivera 1989, Gentil & Ferreira 1999, Delgado & Barbedo 2007). No entanto, Inocente & Barbedo (2019) demonstraram que, ainda que sejam sensíveis à dessecação, as sementes de *Eugenia* são tolerantes ao déficit hídrico, o que as torna capazes de superar algumas condições adversas que podem encontrar na natureza ao serem dispersas, como a pouca disponibilidade de água no solo. Além disso, as sementes

desse gênero são muito resistentes a danos físicos, e quando fracionadas mantêm sua capacidade de germinar e de produzir plântulas em mais de uma fração (Anjos & Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003, 2005). Esta capacidade regenerativa (figura 1) também está presente em suas raízes e plântulas, que ao serem cortadas também são capazes de se regenerar (Alonso *et al.* 2019, Alonso & Barbedo 2020).

Figura 1. Duas sementes de *Eugenia brasiliensis* fracionadas longitudinalmente ao meio com as duas frações produzindo plântulas normais.

1.1.2. A REGENERAÇÃO DAS SEMENTES

O primeiro trabalho a relatar essa capacidade em sementes de *Eugenia* foi de Anjos & Ferraz, em 1999. Em observações preliminares os autores constataram que as sementes de *E. stipitata* eram resistentes a injúrias mecânicas, como cortes. Os autores então testaram esta capacidade cortando as sementes transversalmente ao meio e colocando as duas metades para germinar, lado-a-lado. Também realizaram cortes de 1 mm nas sementes, removendo apenas sua zona meristemática. Os resultados demostraram que, de fato, as sementes possuíam uma grande resistência aos danos físicos. Naquelas cortadas ao meio, 89% das metades que continham a zona meristemática germinaram, e, surpreendentemente, também houve a formação de plântulas em 20% das metades opostas à zona meristemática, que os

autores chamaram de “regeneração”. As sementes que tiveram sua zona meristemática removida também foram resistentes às injúrias, pois 77% delas desenvolveram plântulas normais (Anjos & Ferraz 1999).

Um comportamento semelhante também foi observado em sementes recalcitrantes de *Garcinia* sp. e *Allanblackia* sp., da família Clusiaceae. Espécies desses gêneros demonstram uma capacidade regenerativa após serem fracionadas (Ha *et al.* 1988, Malik *et al.* 2005, Joshi *et al.* 2006, Asomaning *et al.* 2011, Ofori *et al.* 2015). Contudo, sementes de *Garcinia* sp., diferente das *Eugenia*, são agamospérmicas, pois o embrião, não-zigótico, se desenvolve sem fertilização (Ha *et al.* 1988). Ainda assim, sementes que passaram por algum tipo de dano físico demonstraram melhores chances de germinar do que aquelas que foram mantidas sem nenhum dano (Joshi *et al.* 2006).

A regeneração em sementes fracionadas de *Eugenia* ocorre a partir da desdiferenciação de células de tecidos perivasculares localizados na região apical dos cotilédones, demonstrando que as novas plantas produzidas apresentam genoma diferente da planta-mãe e idêntico ao do embrião resultado da fertilização, o que, provavelmente, confere um maior valor adaptativo (Delgado 2010). No trabalho de Delgado (2010) não foram utilizadas substâncias exógenas com ação reguladora de crescimento para a obtenção dos novos embriões, demonstrando que apenas a ação mecânica do fracionamento pôde estimular a desdiferenciação dos tecidos.

Em 2003, Silva e colaboradores realizaram diversos tipos de cortes em sementes de *E. pyriformis*, e observaram que esta espécie também possuía uma alta capacidade regenerativa e de resistência aos danos mecânicos. Neste trabalho, as sementes foram fracionadas de sete formas diferentes, obtendo-se duas, quatro ou até oito partes. Os autores observaram que o corte em um plano longitudinal foi o mais eficiente, e que mesmo frações que representavam apenas ¼ da semente conseguiam germinar e produzir plântulas normais em altas porcentagens. Até mesmo aquelas sementes que foram fracionadas em oito partes mantiveram a capacidade de germinar em pelo menos uma das frações (Silva *et al.* 2003).

Essa capacidade foi então testada e confirmada em mais três espécies do gênero, *E. involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*, espécies que, ainda que não sejam cultivadas, de certa forma já foram domesticadas pelo homem e sua reprodução é quase totalmente controlada (Silva *et al.* 2005). Posteriormente, a fim de verificar se essa característica se estendia às sementes de espécies não-domesticadas, foram testados quatro tipos de cortes em sementes de *Eugenia cerasiflora, Eugenia umbelliflora* e *Eugenia pruinosa* e demonstrado que a habilidade de germinar mesmo depois de ter parte de sua massa removida também está presente em espécies mais rústicas (Delgado *et al.* 2010). Neste ponto, a capacidade

regenerativa passou a ser considerada como possível estratégia adaptativa, uma vez que as reservas nutricionais não são desperdiçadas com germinações simultâneas, mas poupadas para situações de necessidade, como a predação por algum animal, podendo ter contribuído para a grande representatividade do gênero nas florestas brasileiras (Delgado *et al.* 2010).

Tendo em vista que essas sementes são sensíveis à dessecação e dispersadas com elevado teor de água (ao contrário das sementes tolerantes à dessecação, as ortodoxas), elas não conseguem passar por longos períodos no solo aguardando condições favoráveis para germinar, então estão sempre em processo de germinação ou de deterioração (Barbedo & Bilia 1998, Delgado & Barbedo 2007). E, além do teor de água, muitos fatores ambientais parecem influenciar a germinação e o desenvolvimento dessas sementes, como a temperatura do ar, que abaixo de 10 ºC ou acima de 35 ºC já exerce grande influência sobre suas características germinativas (Lamarca *et al*. 2011), ou a acidez do solo, que também pode prejudicar sua germinação (Koszo *et al*. 2007).

Ainda assim, é possível que essas adversidades ambientes sejam superadas de outras formas pelas sementes recalcitrantes de *Eugenia*. Mesmo que sejam sensíveis à dessecação, mostraram-se muito tolerantes aos déficits hídricos (Inocente & Barbedo 2019), e se a primeira raiz não encontra um ambiente favorável e acaba morrendo, uma nova germinação pode começar, pois as reservas internas são suficientes para o desenvolvimento de uma nova plântula. E, teoricamente, este ciclo pode se repetir sucessivamente até que uma das plântulas encontre condições adequadas e consiga se desenvolver sem precisar mais das reservas da semente (Delgado *et al.* 2010).

A capacidade dessas sementes em regenerar novas raízes ou plântulas após ter parte de sua massa removida, parece estar presente durante um longo período, do início do desenvolvimento até as últimas fases da germinação (Teixeira & Barbedo 2012). Sementes maduras de *E. cerasiflora*, *E. involucrata*, *E. uniflora*, *E. pyriformis* e *E. brasiliensis* submetidas ao fracionamento demonstraram um grande potencial regenerativo. No entanto, sementes imaturas também foram capazes de se regenerar, sugerindo que a capacidade regenerativa pode ser adquirida antes do final do processo de maturação, como uma estratégia para preservar sua capacidade de propagação (Teixeira & Barbedo 2012). A possibilidade de, através do fracionamento, se obter mais de uma planta por semente, pode representar uma vantagem reprodutiva para espécies que, como as *Eugenias*, possuem frutos bastante atrativos para diversos grupos de animais (Pizzo 2002, Castro & Galetti 2004, Gressler *et al*. 2006). Além disso, poder formar novas raízes e plântulas também torna essas sementes interessante do ponto de vista agronômico, pois seu fracionamento tem o potencial de ampliar a produção de mudas a partir de uma única semente, dado que as espécies de

Eugenia têm despertado cada vez mais interesse econômico, tanto alimentício quanto medicinal, e que suas mudas são de difícil obtenção (Silva *et al.* 2003).

Tanto o número de sementes por fruto quanto o tamanho das sementes afetam sua germinação e capacidade regenerativa. Um maior número de sementes por fruto resulta em sementes menores, e a massa das sementes parece afetar diretamente sua capacidade regenerativa após o fracionamento (Silva *et al*. 2003). Quando o fruto possui duas sementes, estas costumam ser menores do que aquelas provenientes de frutos com uma única semente, principalmente no que diz respeito ao comprimento e à espessura (Prataviera *et al.* 2015). No entanto, o tamanho das sementes tem maior influência sobre a regeneração do que a quantidade de sementes por fruto (Prataviera *et al.* 2015). Isso pode ser explicado pela redução na quantidade de reservas como consequência da fragmentação das sementes, o que, nas sementes pequenas, pode limitar o crescimento de raízes, plântulas e brotações (Silva *et al.* 2003, Teixeira & Barbedo 2012).

Por outro lado, a capacidade regenerativa não se limita aos tecidos das sementes, pois também estão presentes em raízes e partes aéreas. Sementes de *Eugenia candolleana* (ameixa-da-mata) demonstraram uma menor capacidade regenerativa quando comparadas a outras espécies do gênero (Alonso *et al.* 2019). Contudo, a eliminação das mudas produzidas (i.e., corte de raízes e partes aéreas) demonstraram que a capacidade regenerativa também está presente nas raízes e partes aéreas, pois são capazes de produzir novas mudas. Algumas delas puderam produzir até uma terceira plântula. O número de sementes capazes de produzir mudas foi menor que o de sementes capazes de desenvolver apenas raízes, demonstrando, novamente, a relação com a quantidade de reservas dos cotilédones (Alonso *et al.* 2019). Ainda segundo os autores, a capacidade regenerativa de sementes e mudas de *Eugenia* parece representar uma estratégia reprodutiva ao superar possíveis predações, dando continuidade ao desenvolvimento de novos indivíduos e garantindo a permanência da espécie no ambiente.

1.1.3. O AUTOCONTROLE DA REGENERAÇÃO

A ideia de que fragmentos de uma semente monoembriônica sejam capazes de germinar e gerar novas plântulas já é bastante interessante do ponto de vista biológico, mas as sementes de *Eugenia* ainda parecem possuir um refinado sistema de autocontrole da germinação, pois parece haver um impedimento da produção de mais de uma raiz por vez. Foi observado que, quando fracionadas, estas sementes são capazes de formar novas raízes,

e até plântulas inteiras em mais de uma fração, mas em sementes intactas a germinação nunca foi superior 100%, ou seja, nunca houve mais de uma germinação em sementes que não haviam sido fracionadas (Delgado & Barbedo 2011). Isso sugere a atuação de algum mecanismo de autorregulação, controlando a germinação nessas sementes ao produzir substâncias que inibem novas germinações assim que a primeira se inicia. A fim de investigar essa possível atividade inibidora da germinação em *E. uniflora*, extratos de suas sementes, germinadas e não-germinadas, foram utilizados em testes de germinação da própria espécie e em sementes de feijão e aquênios de alface (Delgado & Barbedo 2011). Os extratos inibiram a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de alface e de feijão, mas não foram capazes de inibir a germinação de suas próprias sementes. Esta resposta difere daquela encontrada por Rizzini (1970), no qual extratos de sementes germinantes de *E. dysenterica* foram capazes de inibir a germinação da própria espécie. Os autores atribuíram esta diferença de respostas às concentrações dos extratos, aos métodos de extração ou às particularidades de cada espécie (Delgado & Barbedo 2011).

Amador & Barbedo (2011) também investigaram o potencial inibidor da formação de raízes e plântulas em sementes de *E. pyriformis*. Para tanto, sementes germinadas (colocadas para germinação até a emissão de raízes de 1 cm de comprimento) e não-germinadas foram submetidas a dois tipos de incisão, parcial ou completa (sem e com separação em metades, respectivamente), que passavam pelo centro do hilo e, nas germinantes, um dos lados era mantido com toda a raiz. A produção de novas raízes nas sementes germinadas foi inferior às não-germinadas, reforçando a ideia de auto-inibição nessas sementes. Nas frações que foram completamente separadas da raiz (incisão completa) das sementes germinadas, a formação de novas raízes foi cerca de 50% dos valores obtidos para as frações não-germinadas (Amador & Barbedo 2011). Nas frações opostas às germinadas, além da taxa de regeneração de raízes ter sido inferior à das demais frações, também houve um atraso no início da emissão de novas raízes. E quando as não-germinadas foram apenas fissuradas (incisão parcial), os valores de formação de raízes foram superiores a 1,0, mas nas sementes germinadas isso não aconteceu. Os resultados evidenciaram a existência de processos de inibição do desenvolvimento de novas raízes, promovidos pelo desenvolvimento de uma raiz ou plântula na mesma semente. E as incisões demonstraram que, de alguma forma, a lesão representa um estímulo à germinação. Além disso, a produção de compostos inibidores deve ser contínua, cumulativa e oriunda da região na qual há o crescimento da plântula, visto que, em sementes germinadas, nas quais a plântula estava há mais tempo ligada ao cotilédone, a percentagem de germinação foi menor do que nas não-germinadas (Amador & Barbedo 2011).

Em um novo trabalho, os autores utilizaram sementes germinadas e não-germinadas de *E. uniflora* e *E. brasiliensis* submetidas ao fracionamento parcial e, posteriormente, ao fracionamento completo, separando-se as metades. Os resultados reforçaram a hipótese de que a primeira germinação em sementes de *Eugenia* inicia processos de inibição da regeneração de novas raízes e plântulas na mesma semente (Amador & Barbedo 2015). Quando o fracionamento das sementes que haviam sido apenas fissuradas (fracionamento parcial) foi completado, com a total separação das metades, as frações opostas àquelas com protrusão radicular formaram uma nova raiz em 28% a 75%, enquanto as sementes que foram mantidas apenas fissuradas nunca produziram mudas ou raízes na metade oposta (Amador & Barbedo 2015). Os resultados ainda mostraram um outro aspecto interessante: sementes maduras e não-germinadas de *E. uniflora* que foram fracionadas parcialmente apresentaram taxas de germinação maiores do que as sementes intactas (i.e., grupo controle que não passou por nenhum tipo de corte). É provável que a fissura tenha induzido a diferenciação de tecidos que produzem raízes e mudas, uma vez que as sementes intactas apenas emitiriam a raiz primária (Amador & Barbedo 2015).

Em síntese, as sementes fissuradas de *E. pyriformis* demonstraram que substâncias ou processos de inibição se iniciam quando a primeira germinação ocorre, bloqueando o desenvolvimento de uma segunda raiz em uma mesma semente (Amador & Barbedo 2011). No entanto, tendo em vista que a germinação dessas sementes é, provavelmente, resultado de um balanço entre fatores promotores e inibidores, é provável que as sementes fracionadas de *Eugenia* fiquem suscetíveis a processos de indução e inibição da germinação, e o balanço desses compostos é ora favorável ao desenvolvimento de novas raízes e plântulas, ora desfavorável (Amador & Barbedo 2011). Em sementes intactas, por exemplo, a produção de compostos inibidores ou a falta de estímulo à regeneração podem ser responsáveis pela formação de uma única raiz, e em sementes fracionadas é evidente que o estímulo à regeneração ocorre pela lesão do corte, e que quando a primeira germinação se inicia começam processos de inibição de novas raízes e plântulas (Amador & Barbedo 2011). Ainda, sementes fissuradas de *E. uniflora* apresentaram maiores taxas de germinação do que sementes inteiras, fornecendo mais uma evidência de que lesões nessas sementes induzem processos de germinação e formação de plântulas (Amador & Barbedo 2015).

Além disso, os trabalhos mostram que o fracionamento, principalmente em mais de duas partes, acarreta na maioria das frações desenvolvendo apenas novas raízes e sendo incapazes de desenvolver plântulas completas. Isso provavelmente está relacionado à redução na quantidade de reservas dos cotilédones decorrente de seu fracionamento. Ainda assim, mesmo quando os cotilédones não possuem reservas suficientes para dar origem a

uma nova plântula, a produção de uma – ou mais – raiz(es) é frequente, demonstrando que algum estímulo causado pelo fracionamento leva, inevitavelmente, à formação de raízes, ainda que aquela fração não tenha condições de dar continuidade ao desenvolvimento de plântulas completas.

Anjos & Ferraz (1999) observaram que nas sementes cortadas ao meio, as metades mantidas com a zona meristemática não germinaram na superfície do corte, no entanto, nas metades opostas, a germinação ocorreu justamente na superfície do corte, local que foi exposto ao ar. Os autores também constataram que no local da lesão as sementes se tornam marrom-avermelhado e atribuíram este acontecimento à possível oxidação dos compostos fenólicos presentes (figura 2).

Figura 2. Sementes de *Eugenia involucrata* fracionadas ao meio, evidenciando o escurecimento das faces cortadas após a exposição ao ar. Da direita para a esquerda, a primeira semente foi a primeira a ser cortada e assim sucessivamente.

Rizzini (1970) demonstrou uma relação íntima entre o oxigênio e processos de indução e inibição da germinação. O autor verificou que sementes de *E. dysenterica* possuíam baixa germinação quando comparadas às de *E. michelii* (sinônimo de *E. uniflora*). Uma vez que seus embriões, como em todas as *Eugenia*, são iguais, o autor atribuiu esse contraste a diferenças nos tegumentos, pois na pitanga este é membranáceo e fino enquanto na cagaita é coriáceo e grosso. Constatada a boa permeabilidade do tegumento à água e a ausência de esclerodermia (ou seja, ausência de resistência mecânica), algumas sementes foram escarificadas, produzindo uma pequena abertura na face superior, e outras foram excisadas da testa, resultando no embrião nu. Os resultados mostraram que sementes íntegras, escarificadas e sem testa precisaram de tempos bem diferentes para germinar a mesma porcentagem, demorando muito mais nas primeiras e bem menos nas últimas, sugerindo que a baixa taxa de germinação era resultado de uma deficiência de oxigênio decorrente de algum tipo de impermeabilidade do tegumento ao gás (Rizzini 1970). Mendes & Mendonça (2012) também demonstraram que a retirada parcial do tegumento das

sementes de *E. stipitata*, do lado da protrusão da raiz e da parte aérea, diminui o tempo médio de germinação de 91 para 48 dias, com 100% de emergência.

As sementes foram então colocadas sob elevada tensão de oxigênio (80%), mas o efeito foi contrário ao esperado, com a atmosfera rica neste gás não apenas não estimulando a germinação mas inibindo-a totalmente, e em embriões excisados, ou seja, totalmente expostos ao gás, detectou-se ainda a intensa liberação de uma substância inibidora da germinação (Rizzini 1970). Soma-se a isso o fato de que extratos do embrião em repouso tiveram um pequeno efeito inibitório sobre a germinação de sementes de feijão e extratos de embriões germinantes tiveram um grande efeito inibitório, demonstrando que a concentração do inibidor cresce no embrião em atividade. Portanto, supondo que a produção de inibidor cresce com a atividade do embrião e que o aumento de oxigênio acelera os processos metabólicos embrionários (Rizzini 1970), taxas de oxigênio muito elevadas (incluindo possivelmente a formação de EROs) podem provocar um superestímulo da germinação, demandando um aumento na produção do inibidor a fim de impedir uma competição intraespecífica dentro de uma mesma semente.

Em síntese, alguns trabalhos já sugeriram, ainda que de maneira indireta, que a germinação de sementes de *Eugenia* pode estar intimamente relacionada ao oxigênio, além do metabolismo respiratório. De fato, as EROs vêm sendo apontadas como peças-chave no processo germinativo de muitas espécies, e podem, portanto, estar relacionadas à indução da formação de novas raízes e plântulas em sementes fracionadas de *Eugenia*.

1.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E PROCESSOS OXIDATIVOS EM SEMENTES

O oxigênio é um elemento central na vida das sementes, como em todos os eucariontes, e desempenha diversos papéis em sua fisiologia e desenvolvimento. Ainda que algumas delas consigam sobreviver por períodos relativamente longos sob baixas concentrações de oxigênio, sua total ausência é letal para a maioria das espécies (Hendry 1993). Além da oxidação de compostos envolvida na formação de nutrientes e de moléculas energéticas para o desenvolvimento embrionário, a formação de EROs também está intimamente relacionada a vários aspectos fisiológicos das sementes (Bailly 2004).

De maneira a compreender os possíveis papéis desempenhados por este gás nos seres vivos, principalmente nas sementes, primeiramente precisamos compreendê-lo em sua estrutura química. Os elétrons envolvidos nas ligações químicas são os elétrons de valência, que para a maioria dos átomos são aqueles que ocupam a camada mais externa. Os átomos costumam ganhar, perder ou compartilhas elétrons a fim de atingir o mesmo número de elétrons que o gás nobre mais próximos a eles na tabela periódica (Brown *et al*. 2012). Os gases nobres têm arranjos de elétrons muito estáveis e, como todos eles (com exceção do hélio) têm oito elétrons de valência, muitos átomos que sofrem reações também terminam em oito elétrons de valência. Esse padrão de reação é conhecido como "a regra do octeto" (Brown *et al*. 2012).

A molécula de oxigênio contém um par de elétrons não-pareados em seu orbital mais externo, formando um estado conhecido como *tripleto*. Quando um átomo ou molécula possui elétrons não-pareados na sua camada de valência, a tendência é que eles busquem rapidamente pela estabilidade, ao preencher ou esvaziar totalmente seus orbitais através da perda ou ganho de elétrons. Esse par de elétrons não-pareados do oxigênio tripleto tem o mesmo giro, ou seja, o mesmo número quântico de rotação. Isso o que o torna pouco reativo (Green & Hill 1984), pois a maioria das moléculas biológicas tem rotações opostas (antiparalelas), e para que o O_2 consiga oxidar outro átomo ou molécula, aceitando um par de elétrons, ambos os elétrons adquiridos precisam ter uma rotação paralela. Isso limita o oxigênio molecular a uma reação de transferência de elétrons por vez e restringe sua capacidade oxidativa (Cadenas 1989). Por outro lado, sucessivas reduções do oxigênio por elétrons produzem espécies intermediárias que são relativamente estáveis, mas, se um dos dois elétrons não pareados estiver excitado e mudar de rotação, a espécie resultante, denominada oxigênio singleto ($^1O_2$), será um poderoso oxidante, visto que, com rotações em sentidos opostos, os dois elétrons podem reagir rapidamente com outros pares de elétrons, especialmente em ligações duplas (Turrens 2003). Nos organismos fotossintetizantes o

oxigênio singleto também pode ser gerado pela foto-excitação da clorofila (Desikan *et al.* 2005).

Moléculas que contêm um ou mais elétrons não-pareados, capazes de existir de forma independente, são chamadas de *radicais livres*. Devido a sua necessidade em parear os elétrons solitários, um radical livre tende a assimilar elétrons de moléculas vizinhas, o que o torna reativo, possibilitando a formação de novos radicais livres e potencialmente uma reação de auto-propagação em cadeia (Benson 1990, Halliwell 2006). Os radicais livres mais conhecidos são aqueles associados ao oxigênio, pois dois processos metabólicos essenciais para grande parte dos seres vivos, respiração e fotossíntese, geram inevitavelmente EROs nas mitocôndrias e nos cloroplastos (Apel & Hirt 2004).

O radical ânion superóxido, resultado da redução do oxigênio por um elétron (figura 3), é o precursor da maioria das EROs. Em pH ácido, este ânion pode ser protonado (i.e., sofrer a adição de um próton H^+, resultando em um ácido conjugado), formando o radical per-hidroxila ($HO_2^{\bullet}$) (Bartosz, 1997; Turrens, 2003). A dismutação do $O_2^{\bullet-}$ (i.e., reação química na qual parte da molécula é oxidada e outra reduzida), que pode acontecer de maneira espontânea ou através de uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase, produz o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

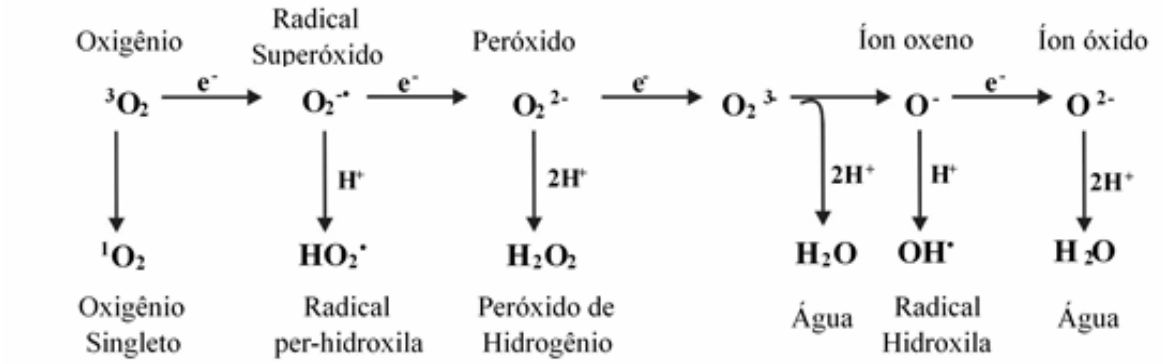


Figura 3. Formação de diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio a partir do oxigênio basal ($_3O^2$). Adaptado de Apel & Hirt (2004).

O H_2O_2 não é um radical livre e o oxigênio singleto não é outra forma de oxigênio, mas por conveniência essas sutilezas foram relevadas e ainda hoje todas as formas de oxigênio parcialmente reduzido (além de sua forma totalmente reduzida e inerte) são

referidas como EROs (Hendry 1993). Além disso, o H_2O_2 está na via de formação das outras EROs, podendo ser completamente reduzido a água ou, se adicionado um elétron e um próton, parcialmente reduzido a radical hidroxila (Turrens 2003). O $OH^{\bullet}$ por sua vez é um dos mais potentes agentes oxidantes da natureza, pois, uma vez formado, possivelmente irá reagir com a primeira molécula orgânica que encontrar (Elstner 1991).

Metais de transição, como o ferro (Fe), geralmente possuem elétrons não pareados, e são excelentes catalisadores de redução do O_2, reagindo rapidamente com o peróxido de hidrogênio e produzindo o radical hidroxila (Cadenas 1989). Fenton, em 1894, relatou pela primeira vez a reação em que o ferro reage com peróxido de hidrogênio. E, embora outros metais de transição sejam capazes de catalisar essa reação, a reação de Haber-Weiss, catalisada pelo ferro, é considerada o principal mecanismo pelo qual o $OH^{\bullet}$ é gerado em sistemas biológicos (Liochev 1999):

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \qquad \text{(Reação de Haber-Weiss) (1)}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} \qquad \text{(Reação de Fenton) (2)}$$

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet} \qquad \text{(Reação líquida) (3)}$$

Eliminar o ferro livre nos ambientes trouxe aos seres vivos uma grande vantagem, pois a vida aeróbica encontraria dificuldades em um mundo cheio desse metal disponível (Halliwell 2006). A reação de Fenton é endógena aos sistemas biológicos, que apresentam um cuidadoso controle da reação ao limitar a disponibilidade de Fe^{2+} e de H_2O_2 (Halliwell 2006, Chattopadhyaya 2012, Talapatra & Talapatra 2015). Todas as EROs, em altas concentrações, podem oxidar diversas estruturas celulares, e esta toxicidade é definida por sua meia-vida (i.e., tempo necessário para que a quantidade de uma ERO seja reduzida à metade) e pelo tempo que cada uma leva para oxidar outra molécula (Møller *et al.* 2007).

Condições ambientais estressantes podem provocar alterações nas cadeias transportadoras de elétrons, causando um desequilíbrio no número de elétrons que são transferidos para o oxigênio e levando à formação de EROs nas células (Hendry 1993 Ahmad 2014). Algumas condições são especialmente favoráveis à formação de EROs, como falta de água, alta salinidade, choque térmico, resfriamento, temperaturas elevadas, metais pesados, radicação ultravioleta, alta luminosidade, poluentes atmosféricos, privação de nutrientes, estresse mecânico e ataques por patógenos (Bartosz 1997). Dependendo da natureza do estresse, os efeitos observados podem ser positivos (e.g., aclimatação) ou

negativos (e.g., diminuição da atividade fotossintética, inibição do crescimento, senescência acelerada ou danos aos órgãos da planta).

Um dos alvos das EROs em células vegetais ou animais é a Ca^{2+}-ATPase, fundamental na regulação do Ca^{2+} nas células, e sua inibição resulta no aumento do Ca^{2+} citoplasmático, causando um desequilibrio celular que pode levar à diminuição na produção de ATP e interromper sua função sinalizadora (Bartosz 1997). Além disso, o acúmulo de EROs nas células tem potencial de desencadear outros processos oxidativos, tais como peroxidação lipídica de membranas, oxidação de proteínas, inibição enzimática, danos ao DNA e ao RNA e até a morte celular (Mittler 2002). O radical hidroxila, por exemplo, pode se ligar à maioria das moléculas presentes em tecidos vivos, e ao se ligar às bases nitrogenadas causa mutações ou quebras nas fitas de DNA, além disso, ele também pode iniciar direta ou indiretamente a peroxidação lipídica e a inativação de enzimas (Hendry 1993). O oxigênio singleto é particularmente reativo com ligações duplas conjugadas, como encontrado em ácidos graxos poli-insaturados. Já o radical superóxido reage principalmente com os centros de proteínas Fe-S (Møller *et al.* 2007). Ainda que o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio sejam bem menos reativos, as células devem limitar a sua produção, uma vez que eles podem reagir e gerar o radical hidroxila (Apel & Hirt 2004).

Da embriogênese à germinação das sementes, as EROs são produzidas continuamente e causam diversos danos ao oxidar proteínas, açúcares, lipídios e ácidos nucleicos, podendo levar ao estresse oxidativo e resultar na sua deterioração (Bailly *et al.* 2008). Evidentemente, isto também representa um problema para o armazenamento das sementes. A peroxidação lipídica é um dos processos mais citados como resultado do estresse oxidativo e é considerada uma das principais causas de deterioração de sementes ortodoxas oleaginosas, quando os sistemas enzimáticos de defesa não estão atuantes (Bailly 2004). Ela ocorre quando a molécula de oxigênio presente em um radical livre é incorporada a um lipídeo, resultando na remoção de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno adjacente a uma ligação dupla (Hendry 1993). Em condições aeróbicas, o radical de carbono, proveniente da abstração de hidrogênio, é estabilizado pelo oxigênio e produz um radical peroxil (ROO), que é capaz de remover um átomo de hidrogênio de outra cadeia de ácido graxo para formar um hidroperóxido lipídico (LOOH) (Bailly 2004). A cadeia de reação continua indeterminadamente ou até a reação com um antioxidante solúvel em gordura, como o tocoferol, interrompendo a peroxidação lipídica (Hendry 1993). A peroxidação lipídica conduz à deterioração de ácidos graxos poliinsaturados. Estas remoções de hidrogênio dos lipídeos de membrana podem diminuir a fluidez lipídica, e além das

alterações na estrutura da membrana, as proteínas ligadas a ela são inativadas e a permeabilidade da membrana é afetada (Hendry 1993).

Dois processos fisiológicos parecem ser especialmente danosos para as sementes, uma vez que estão estreitamente ligados à produção de radicais livres, ao estresse oxidativo e a danos celulares: a dessecação e o envelhecimento (Bailly *et al.* 2008). Em sementes ortodoxas, que passam por uma grande variação no teor de água e na atividade metabólica ao longo de seu desenvolvimento, a formação de EROs varia consideravelmente (Borisjuk & Rolletschek 2009). Nos estágios iniciais do seu desenvolvimento, o teor de água elevado reflete uma intensa atividade metabólica necessária para as divisões celulares da embriogênese, além de ser fundamental para o transporte de metabólitos e o acúmulo de reservas no embrião ou em suas estruturas adjacentes (Bewley & Black 1994). Durante esse período o gasto energético demanda altas taxas respiratórias, que resultam inevitavelmente na formação de EROs (Huang *et al.* 2012). Após esse estágio, as sementes ortodoxas passam por uma etapa de secagem, que as torna tolerantes a diferentes níveis de dessecação, mas que também provoca a formação de EROs, tornando-as dependentes de mecanismos adaptativos, como as moléculas antioxidantivas, para evitar o estresse oxidativo e garantir sua sobrevivência (Bailly 2004).

Semelhantes às sementes ortodoxas nos primeiros estágios do desenvolvimento, sementes recalcitrantes possuem um alto metabolismo e altas taxas respiratórias durante todo o seu desenvolvimento (Barbedo *et al.* 2013). Sensíveis à dessecação, estas sementes permanecem úmidas desde sua formação até a germinação. Condições ambientais que levem essas sementes à ocasionais perdas de água estão associadas ao acúmulo de radicais livres, à peroxidação lipídica e a danos celulares, e vários mecanismos de proteção das estruturas celulares contra a geração de EROs tornam-se progressivamente ineficientes durante a perda de água e posterior reidratação (Bailly *et al.* 2008).

A sensibilidade à dessecação das sementes recalcitrantes está relacionada à sua incapacidade em diminuir o metabolismo durante a secagem, levando ao aumento no dano oxidativo durante a desidratação (Leprince *et al.* 1999). Contudo, a secagem de eixos embrionários isolados pode ser uma alternativa viável e resulta em uma maior tolerância à desidratação do que sementes intactas (Pritchard 1991). Sementes de *Inga uruguensis*, por exemplo, são bastante sensíveis à dessecação, e mesmo pequenas reduções no teor de água, de 57% para menos de 50%, resulta na perda da viabilidade (Bilia & Barbedo 1997). Quando embriões de *Inga vera* são excisados e submetidos a uma redução parcial de água através do osmocondicionamento com polietilenoglicol 6000 (PEG), a perda da longevidade é menor (Bonjovani & Barbedo 2008). Esses dados sugerem que uma pequena redução na quantidade

de água de sementes recalcitrantes pode diminuir levemente o metabolismo respiratório e, portanto, a produção de EROs. Somado à diminuição da temperatura de armazenamento, é possível que essas sementes possam ser conservadas por períodos mais prolongados (Bonjovani & Barbedo 2008).

Por outro lado, quando terminam a maturação, as sementes ortodoxas permanecem secas e com uma atividade metabólica quase inativa, permitindo que sejam armazenadas por longos períodos (Bewley & Black 1994). Durante o armazenamento das sementes as EROs também exercem grande influência. Sob condições ideais, o armazenamento pode diminuir e/ou retardar a deterioração, mas não a impedir completamente. Aos poucos, diversos danos vão comprometendo a vigor dessas sementes e a longo prazo isso resulta na redução gradual até a perda total da viabilidade (Benson 1990). Alguns eventos que ocorrem durante o armazenamento envolvem áreas do metabolismo altamente sensíveis ao estresse oxidativo, como o desacoplamento respiratório e a anormalidade no metabolismo de nucleotídeos, fornecendo rotas geradoras de radicais livres (Benson 1990).

O estresse oxidativo em sementes ortodoxas armazenadas pode ser dividido em duas fases de danos: na primeira, as condições de armazenamento permitem um processo lento, mas constante, de peroxidação lipídica, resultando na formação de hidroperóxidos. Em geral, a semente tem pouca quantidade de água e não consegue reparar qualquer dano resultante (Benson 1990). Baixas temperaturas podem prejudicar a atividade antioxidante enzimática, e a ruptura das membranas também pode prejudicar a função dos antioxidantes e permitir a proliferação de radicais livres (Bailly *et al.* 2008). Por fim, a segunda fase do estresse oxidativo em sementes secas ocorre durante a embebição, quando qualquer lesão sofrida durante o armazenamento se torna expressa na ativação metabólica, levando à proliferação de radicais livres e a danos oxidativos descontrolados (Benson 1990). Em sementes recalcitrantes, que permanecem úmidas durante todo o desenvolvimento, até o final da maturação e dispersão, a formação de radicais livres deve ser contínua.

As sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) são particularmente interessantes no estudo de processos oxidativos durante o armazenamento. Ainda que sejam dispersas secas e armazenadas com baixo teor de água e sob temperaturas baixas (ou até o congelamento), a respiração e as reações oxidativas durante este período parecem afetar o vigor dessas sementes e levar à perda da viabilidade em curto e médio prazo (Lamarca & Barbedo 2012). A grande discrepância entre o consumo de O_2 e a liberação de CO_2 sugere uma intensa formação de radicais livres, que aceleram sua deterioração e levam à perda da capacidade germinativa. Foi verificado que a secagem de sementes de *C. echinata* promove uma redução em suas taxas respiratórias, no entanto, gera danos no metabolismo respiratório

e aumento nos processos oxidativos, levando a uma diminuição substancial na capacidade de germinação e de produção de plântulas normais (Araujo & Barbedo 2017). Por outro lado, sementes submetidas a soluções osmóticas de PEG parecem ter tido uma redução nos processos oxidativos responsáveis pela rápida deterioração dessas sementes (Araujo & Barbedo 2017). O osmocondicionamento em PEG também parece ajudar na recuperação da capacidade germinativa de sementes submetidas ao envelhecimento acelerado, ao restaurar os mecanismos antioxidantes das células que são fortemente prejudicados durante o envelhecimento das sementes (Bailly *et al.* 1998).

Após a dispersão das sementes ortodoxas, quando o ambiente é favorável e ocorre a reidratação, as mitocôndrias são reativadas para dar início à germinação e, novamente, inicia-se a formação de EROs (Benson 1990). Vários outros eventos bioquímicos complexos parecem ocorrer neste período, como o reparo, a reorganização da membrana e a eliminação de radicais livres, diminuindo a peroxidação lipídica. Mas à medida que os produtos tóxicos das reações de radicais livres se acumulam, macromoléculas como proteínas, DNA, lipídios e citocromos vão sendo danificadas (Benson 1990). Se a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico tenham sido prejudicados e as membranas mitocondriais danificadas, as cadeias transportadoras de elétrons podem ser facilmente desviadas para a produção de radicais livres (Benson 1990). E as mitocôndrias são, provavelmente, uma das principais fontes de EROs no desenvolvimento ou germinação de sementes (Moller 2001), e aproximadamente 2% a 3% do oxigênio utilizado leva à produção de superóxido e peróxido de hidrogênio (Chance *et al.* 1973, Puntarulo *et al.* 1988). A quantidade de H_2O_2 produzida é, portanto, diretamente proporcional à atividade respiratória (Staniek & Nohl 2000). Mas os cloroplastos também podem gerar EROs durante o desenvolvimento das sementes. Em alguns casos podem se tornar não-funcionais com o avanço da maturação e em outros, como em sementes de embriões verdes, podem continuar ativos. No entanto, estes processos ainda não estão bem esclarecidos (Borisjuk & Rolletschek 2009). Os peroxissomos produzem $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2, e em sementes, glioxissomos, um tipo particular de peroxissomo envolvido na mobilização de lipídios em sementes oleosas, contêm enzimas de oxidação e o ciclo do glioxilato, que convertem as reservas lipídicas em açúcares durante os primeiros estágios do desenvolvimento das mudas (El-Maarouf-Bouteau & Bailly 2008).

Contra todos estes danos causados pelas EROs, a primeira forma de defesa das células se dá por mecanismos que impedem a formação dessas moléculas, e os seres vivos desenvolveram inúmeras estratégias, de comportamentais a bioquímicas, que buscam evitar os processos oxidativo (Sies 1997). O $OH^{\bullet}$, por exemplo, não pode ser eliminado das células, pois não existem, ou não são conhecidos, agentes capazes de fazê-lo. Portanto, a única

maneira de evitar o dano oxidativo causado por ele é controlando sua produção (Apel & Hirt 2004). Por outro lado, o desenvolvimento de defesas antioxidativas endógenas é capaz de minimizar ou evitar os danos oxidativos causado por outras EROs, e na maior parte do tempo os antioxidantes mantêm um equilíbrio quase estável nas taxas de agentes oxidantes dentro das células (Sies 1991, 1997). Além disso, atualmente, além de papéis cruciais na defesa contra as EROs e como cofatores enzimáticos, os antioxidantes também influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, fornecem informações essenciais sobre o estado redox celular e influenciam a expressão gênica associada às respostas ao estresse biótico e abiótico para maximizar a defesa (Foyer & Noctor 2005).

As substâncias antioxidativas são de natureza enzimática e não-enzimática, estão em concentrações baixas quando comparadas a um substrato oxidável e têm o papel de atrasar ou inibir a oxidação desses substratos (Halliwell & Gutteridge 1989, Sies 1997). As células vegetais como um todo, mas principalmente em algumas de suas organelas – mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos – contêm um conjunto completo de moléculas de defesa contra o ataque oxidativo, controlando os níveis de EROs e evitando condições de estresse. Situações de estresse induzem tanto a formação de EROs e os danos celulares, quanto as respostas de proteção. Nas plantas, os cloroplastos são as fontes mais ricas de antioxidantes, e os principais deles são os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C) e os carotenos (pró-vitamina A) (Hendry 1993, Møller *et al.* 2007).

O sistema antioxidativo não-enzimático inclui uma rede de antioxidantes de baixa massa molecular. São eles o ascorbato (ácido ascórbico), a glutationa (GSH), o tocoferol, flavonoides, alcaloides e carotenoides. Plantas mutantes (i.e., selecionadas artificialmente) produzem menos ácido ascórbico e menos GSH que as plantas selvagens e são, portanto, mais sensíveis aos danos oxidativos (Apel & Hirt 2004). Ao metabolizar as EROs, a GSH é oxidada a glutationa dissulfeto (GSSG) e o ascorbato é oxidado a monodehidroascorbato (MDA) e dehidroascorbato (DHA). Para voltarem às suas formas originais, antioxidantes (glutationa e ascorbato), GSSG, MDA e DHA são reduzidos através do ciclo ascorbato-glutationa (Apel & Hirt 2004). Algumas condições ambientais como seca, baixas temperaturas, choque térmico e ataque de patógenos podem estimular o aumento na biossíntese de GSH. É fundamental que as taxas de GSH e ascorbato reduzidos sejam sempre superiores à sua versão oxidada. A glutationa redutase (GR), a monodehidroascorbato redutase (MDAR) e a dehidroascorbato redutase (DHAR) são responsáveis por manter os estados reduzidos nos antioxidantes, usando NDPH como agente redutor (Apel & Hirt 2004).

Já o sistema antioxidativo enzimático das plantas inclui a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), as peroxidases e alguns produtos desintoxicantes de peroxidação

lipídica, como a glutationas S-transferases, o fosfolipídio-hidroperóxido, a glutationa peroxidase (GPX) e a ascorbato peroxidase (APX) (Blokhina *et al.* 2003). A princípio, a SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, liberando O_2 no processo: $2\ O_2^{\bullet-} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O + H_2O_2$ (Blokhina *et al.* 2003, Halliwell 2006). As superóxido dismutases e as redutases devem trabalhar em conjunto com enzimas que eliminam H_2O_2. A CAT é uma proteína que catalisa a detoxificação de H_2O_2 ao usá-lo para oxidar outros substratos, como o ácido ascórbico. No entanto, existe pouca ou nenhuma catalase nas mitocôndrias e nos cloroplastos, onde o H_2O_2 é gerado; grande parte ou toda a catalase, em plantas e animais, está nos peroxissomos (Sies 1997, Blokhina *et al.* 2003, Halliwell 2006).

Em seguida, as APX, GPX e CAT desintoxicam o H_2O_2. Diferente da CAT, a APX necessita de um sistema de regeneração, o ciclo ascorbato-glutationa. A APX desoxigena o H_2O_2 por oxidação do ascorbato a MDA. A MDAR pode regenerar o ascorbato com a ajuda de NADPH. Também pode ocorrer a dismutação espontânea do MDA em dehidroascorbato. A regeneração do ascorbato é mediada pela DHAR, através da oxidação de GSH a GSSG (Apel & Hirt 2004). Por fim, a GR é capaz de regenerar tanto a glutationa quanto sua forma oxidada, usando NADPH como agente redutor (Apel & Hirt 2004). A GPX também detoxifica o H_2O_2 para H_2O, no entanto, utiliza diretamente GSH como agente redutor. Uma vez que a amplitude do estresse oxidativo é determinada pela quantidade de EROs, este complexo enzimático é essencial para o controle das EROs nos cloroplastos, mitocôndrias e citosol, a CAT e a SOD nos peroxissomos (Sies 1997, Apel & Hirt 2004).

Diversos compostos antioxidativos desempenham um papel fundamental na aquisição da tolerância à dessecação, no desenvolvimento, na conclusão da germinação e na longevidade das sementes (Bailly 2004). Já foi demonstrado que muitos antioxidantes, como ascorbato, deidroascorbato, glutationa, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e catalase mantem-se elevados durante toda a embriogênese, tendo em vista que a grande atividade respiratória necessária durante esse período implica na alta produção de EROs (Arrigoni *et al.* 1992, Tommasi *et al.* 1999, De Gara *et al.* 2003). A síntese de ascorbato pelo embrião, regulada pela atividade mitocondrial, diminuí radicalmente, ou de fato cessa, ao final da maturação de sementes tolerantes a dessecação (Arrigoni *et al* 1992, Tommasi *et al.* 1999, De Gara *et al.* 2003).

Enquanto o conteúdo de deidroascorbato e a atividade das enzimas de regeneração de ascorbato são considerados importantes para os períodos iniciais de embebição de sementes ortodoxas, em sementes recalcitrantes, os níveis destes compostos permanecem elevados durante o desenvolvimento e após a dispersão, uma vez que seu metabolismo é

contínuo (Tommasi *et al.* 1999). Sementes ortodoxas são desprovidas de ácido ascórbico e ascorbato peroxidase (essencial na eliminação de peróxido de hidrogênio), mas sementes recalcitrantes contêm ácido ascórbico e uma alta atividade de ascorbato peroxidase, uma vez que seu alto teor de água e metabolismo sempre ativo inevitavelmente produzem peróxido de hidrogênio. As ortodoxas não necessitam destes compostos antioxidativos por serem secas, com baixa atividade metabólica oxidativa e, consequentemente, baixa produção de peróxido de hidrogênio (Tommasi *et al.* 1999).

A produção de EROs nas sementes foi por muito tempo considerada unicamente prejudicial, uma vez que os primeiros trabalhos focavam principalmente no envelhecimento ou na dessecação, duas situações estressantes e que geralmente levam ao estresse oxidativo. No entanto, nos últimos anos tornou-se indiscutível o importante papel desempenhado pelas EROs na sinalização celular das plantas e das sementes (El-Maarouf-Bouteau & Bailly 2008), e já foram identificadas enzimas geradoras de EROs, que tornam as células vegetais capazes de produzir e ampliar a produção de EROs para fins de sinalização (Bailey-Serres & Mittler 2006). Desde que exista um equilíbrio entre a produção e a eliminação, as EROs podem afetar positivamente a germinação e, em particular, atuarem como um sinal positivo para a superação da dormência. A interação entre EROs e rotas de sinalização hormonal levam a mudanças na expressão gênica, no estado redox celular ou movimentos de cálcio (Bailly *et al.* 2008).

Como moléculas relacionadas à sinalização celular, as EROs interagem com outras moléculas – em especial com os hormônios –, e estão envolvidas com o desenvolvimento das sementes, participando dos processos de crescimento que ocorrem no início da embriogênese e dos mecanismos ligados à protrusão radicular durante a germinação. As EROs também desempenham uma função reguladora na expressão gênica durante o desenvolvimento, a dormência e a germinação das sementes (Bailly 2004), e oferecem uma proteção contra agentes patogênicos, sendo diretamente tóxicas aos patógenos ou isolando a região atacada através de morte celular programada (El-Maarouf-Bouteau & Bailly 2008). Acredita-se que a produção de EROs em sementes germinantes de rabanete (*Raphanus sativus*) representa uma função fisiologicamente ativa para proteger as mudas emergentes contra os ataques de patógenos (Schopfer *et al.* 2001).

A capacidade de germinação das sementes parece estar relacionada ao acúmulo de H_2O_2, uma vez que sementes embebidas não dormentes parecem produzir mais H_2O_2 do que sementes embebidas dormentes, sugerindo uma regulação diferencial dos mecanismos de produção e de eliminação de EROs nestes dois tipos de sementes (Oracz *et al.* 2007, Bailly *et al.* 2008). Curiosamente, também há um acumulo de H_2O_2 durante o armazenamento de

sementes secas, que, além do envelhecimento durante armazenamentos prolongados, pode estar associado à superação de dormência no pós-amadurecimento, condição na qual sementes de algumas espécies, secas e dispersas, só eliminam a dormência durante o armazenamento em condições secas ou na embebição em baixas temperaturas (Kibinza *et al.* 2006, Oracz *et al.* 2007, Bailly *et al.* 2008).

Após o amadurecimento há um acúmulo progressivo de radicais superóxido e peróxidos de hidrogênio nas células do eixo embrionário. Este acúmulo ocorre simultaneamente com a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas embrionárias específicas. Sementes dormentes foram incubadas na presença de metil viologênio (ou paraquat), um herbicida bipiridílico tóxico para as plantas devido à sua propensão a desviar elétrons de cadeias transportadoras de elétrons diretamente para o oxigênio e promover a produção de EROs (Leprince *et al.* 1993), e os autores verificaram a superação da dormência nestas sementes, bem como a oxidação de um conjunto específico de proteínas embrionárias (Oracz *et al.* 2007). A NADPH oxidase, uma das principais fontes de EROs, atua como enzima chave na germinação e no crescimento das plântulas (Ishibashi *et al.* 2010). Em algumas sementes, a embebição com H_2O_2 promoveu e acelerou a germinação, além de estimular o crescimento precoce das mudas (Barba-Espin *et al.* 2010, Gondim *et al.* 2010).

As peroxidases e oxalato oxidases também são fontes de H_2O_2 nas sementes, mas a NADPH oxidase fornece NADPH necessária para reduzir a tioredoxina (importante na regulação da germinação e na defesa antioxidante das sementes - Gutteridge & Halliwell 2015). Por outro lado, a aplicação de antioxidantes parece suprimir de forma significativa a germinação de sementes de algumas espécies (Ogawa & Iwabuchi 2001, Ishibashi & Iwaya-Inoue 2006). A aplicação de n-acetil-l-cisteína, precursos da glutationa que atua como um antioxidante, pode inibir a produção de H_2O_2 no eixo embrionário após a embebição e diminuir a germinação de sementes, sendo seu efeito potencializado com o aumento da concentração (Ishibashi *et al.* 2013).

Além disso, é provável que exista uma relação entre as EROs e o ácido abscísico (ABA), inibidor de germinação, ou a giberelina (GA), indutor de germinação. A aplicação de ABA não só inibe significativamente a germinação como reduz a taxa de H_2O_2 em sementes. Além disso, a regulação do conteúdo de ABA e o aumento de GA sugere uma interação entre as EROs e estes hormônios (Su *et al.* 2016). A produção de H_2O_2 pode ser induzida por GA em células de aleurona, e suprimida por ABA. O H_2O_2 exógeno parece promover a indução de α-amilases por GA, enquanto antioxidantes suprimem a indução de α-amilases. Portanto, o H_2O_2 gerado por GA em células de aleurona, promoveria a produção

de α-amilase, sugerindo que o H_2O_2 é uma molécula que antagoniza a sinalização do ABA (Ishibashi *et al.* 2012).

Contudo, a relação entre a função sinalizadora das EROs e as sementes recalcitrantes ainda é pouco explorada, mas alguns estudos pioneiros começaram a mostrar que esta relação existe, tanto quanto em sementes ortodoxas. Muitos trabalhos mostram que a produção de radicais superóxido em sementes e eixos de sementes recalcitrantes aumentam gradualmente com a desidratação, correlacionando com o declínio nas atividades das enzimas antioxidantes (cf. Pukacka & Ratajczak 2006, Cheng & Song 2008). Foi demonstrado que a excisão do eixo embrionário em sementes recalcitrantes de *Castanea sativa* resultou em um nítido aumento na produção extracelular de EROs, imediatamente antes do alongamento do eixo, sendo o $O_2^{\bullet-}$ o componente principal dessa explosão oxidativa (Roach *et al*. 2008) Essa produção extracelular de radical superóxido pareceu desempenhar papéis fundamentais na sobrevivência e germinação dessas sementes recalcitrantes submetidas a leves secagens (Roach *et al.* 2010). No geral, estes estudos demonstraram que o radical superóxido produzido pelos eixos embrionários em determinadas janelas do tempo podem ser vistos como respostas catalisadas por enzimas, participando de vias de sinalização que estão relacionadas a mecanismos de defesa ou proteção ao aumento do estresse pela dessecação em sementes recalcitrantes, favorecendo a regeneração e o crescimento dos tecidos (Roach *et al.* 2010).

A leve desidratação de eixos embrionários de *Trichilia dregeana*, acompanhada por altos níveis de $O_2^{\bullet-}$, estimulou sua germinação, sugerindo um gatilho bioquímico para a germinação (Varghese *et al.* 2011). Os autores sugerem que a diminuição nos níveis de superóxido após a desidratação para teores de água menores poderia ser responsável pelo declínio da germinação nos eixos de *Trichilia dregeana* parcialmente secos. Curiosamente, também foi demonstrado que o $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 desempenham um papel crucial na germinação *Trichilia dregeana* e *Avicennia marina*, além de uma forte correlação positiva entre a captação de água, a taxa de produção de EROs e a germinação máxima dessas sementes (Moothoo-Padayachie *et al*. 2016). Outra evidência da relação positiva entre a germinação de sementes recalcitrantes de *A. marina* e *T. dregeana* e a produção de EROs é que, quando expostas a *diphenylene iodonium*, um potente inibidor da NADPH oxidase, a respiração não foi bloqueada, mas a germinação foi inibida. Além disso, a germinação *A. marina* também foi comprometida com a exposição a *dimethylthiourea*, um eliminador de H_2O_2 (Moothoo-Padayachie *et al.* 2016).

O uso de EROs como moléculas de sinalização nas plantas sugere que, ao longo do tempo, houve uma adaptação dos mecanismos de eliminação de EROs, permitindo às células

que superassem sua toxicidade e utilizassem essas moléculas como transdutoras de sinais (Bailey-Serres & Mittler 2006). Estudos sobre os efeitos das EROs em sementes têm enfrentado um desafio ao tentar esclarecer a diversidade dos papéis desempenhados por esses compostos. Além dessa dificuldade, também há a necessidade de estudos que procurem documentar adequadamente as prováveis fontes desses compostos, bem como identificar seus alvos celulares e determinar se eles são uma conexão entre sinais ambientais e sinalização hormonal (Bailly *et al.* 2008).

Sensores de EROs podem ser ativados para induzir cascatas de sinalização que afetam a expressão gênica nas plantas. A transdução de sinal é um processo de transmissão de informações da parte externa da célula para vários elementos internos, resultando em mudanças no transcriptoma nuclear (Ahmad *et al.* 2008). Uma grande rede de genes é necessária para controlar a toxicidade de EROs e ao mesmo tempo utilizá-las na sinalização celular. Diferentes sinais, internos ou externos às plantas, alimentam a cadeia de sinalização de EROs e perturbam seu equilíbrio de maneiras específicas. Os níveis desequilibrados de EROs são percebidos por diferentes proteínas, enzimas ou receptores, que modulam caminhos de desenvolvimento, de defesa ou metabólicos (Mittler *et al.* 2004).

A interação entre os caminhos de produção e de eliminação das EROs nas células determina a intensidade, a duração e a localização dos seus sinais. A rede de genes das EROs modula o nível estável de EROs nas células para fim de sinalização, bem como para proteção contra danos oxidativos (Mittler *et al.* 2004). A quantidade e a natureza da ERO determinam o tipo de resposta. O radical superóxido e o peróxido de hidrogênio parecem desempenhar um papel chave como moléculas transdutoras de sinal, pois podem induzir genes diferentes, em combinação ou separadamente, dando mais flexibilidade à função de sinalização das EROs (Breusegem *et al.* 2001, Mittler *et al.* 2004).

Níveis inofensivos de EROs podem aclimatar as plantas a condições de estresse biótico ou abiótico, bem como reduzir seu crescimento como uma resposta adaptativa. No entanto, os mecanismos moleculares de adaptação ainda são mal compreendidos e as vias de sinalização envolvidas permanecem incertas. Novos estudos moleculares e fisiológicos devem ajudar a elucidar questões quanto a posição de sinais das EROs em cascatas de transdução e melhorar nossa compreensão sobre sua percepção e tradução em respostas celulares (Breusegem *et al.* 2001).

Embora muitos trabalhos tenham sido publicados sobre o tema nos últimos anos, a grande maioria se restringe a sementes ortodoxas, com pouca ou nenhuma atenção quanto ao papel das EROs no desenvolvimento de sementes recalcitrantes. Entretanto, tem sido revelado que, como em sementes ortodoxas, as EROs também desempenham um papel

crucial na germinação das recalcitrantes (Roach *et al.* 2010, Varghese *et al.* 2011, Moothoo-Padayachie *et al.* 2016). E o universo fisiológico das sementes recalcitrantes exibe uma miríade de adaptações que as tornam extremamente vigorosas e competitivas em seus ambientes naturais – embora, de forma colateral, as tornem inviáveis para o armazenamento –, com as EROs certamente relacionadas a muitas delas.

2. *CAPÍTULO 1:*

INDUÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *EUGENIA* SPP. PELA APLICAÇÃO DE METIL VIOLOGÊNIO

2.1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um grande avanço nos estudos sobre EROs em tecidos vegetais, inclusive em sementes. Os trabalhos em sementes evidenciaram a produção dessas moléculas durante o armazenamento e sua capacidade de reagir com praticamente todas as moléculas biológicas, demonstraram que a oxidação de proteínas específicas (como a desidrogenase alcoólica, uma isoforma precursora da globulina, e uma albumina, todas associadas à germinação) produzia efeitos que não eram necessariamente deletérios e que as EROs podiam desempenhar um papel de sinalização celular (Oracz *et al.* 2007).

Grande parte dos trabalhos que buscam alterar as concentrações de EROs a fim de avaliar sua influência sobre alguma característica específica de sementes – e até de outras estruturas vegetais – usam soluções de peróxido de hidrogênio propriamente dito ou de metil viologênio (MV), também conhecido como Paraquat. O MV é um composto orgânico muito utilizado como herbicida, pois é um forte oxidante que interfere diretamente na transferência de elétrons. Em tecidos fotossintetizantes, quando exposto à luz, o MV aceita elétrons do fotossistema I e os transfere ao oxigênio molecular, formando o $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell 1984). Além disso, o MV também pode aceitar elétrons de uma fonte mitocondrial, proveniente da cadeia respiratória transportadora de elétrons, levando igualmente à formação do radical superóxido. Portanto, ao incubar algum material vegetal em soluções de MV no escuro, é possível analisar os efeitos da formação de $O_2^{\bullet-}$ nas mitocôndrias, uma vez que não haverá o transporte de elétrons fotossintéticos (Bowler *et al.* 1991).

Em 2007, Oracz e colaboradores levantaram a hipótese de que esses compostos poderiam facilitar a mudança de um status de inatividade para um de atividade nas sementes, e, usando o MV como ferramenta, foi então o primeiro trabalho a testar a capacidade que as EROs tinham em superar a dormência de sementes. Os autores demonstraram que a produção de EROs e a oxidação de um conjunto específico de proteínas embrionárias levou à liberação da dormência de sementes de girassol e propuseram a partir daí um novo mecanismo de quebra de dormência em sementes, envolvendo a produção de EROs e a carbonilação de proteínas (Oracz *et al.* 2007). De fato, o tratamento com H_2O_2 exógeno ou com o MV foi capaz de induzir a germinação de sementes de algumas espécies (Oracz *et al* 2007, Ogawa & Iwabuchi 2001, Ishibashi *et al.* 2013, Su *et al.* 2016).

No presente trabalho também optou-se pelo uso do MV como agente oxidante (ou seja, indutor da formação de EROs) por dois motivos: (1) se aplicássemos o H_2O_2 diretamente teríamos uma carga pontual de EROs no momento em que as sementes entrassem em contato com a solução, o que seria interessante se já conhecêssemos seus

efeitos sobre essas sementes e buscássemos por uma concentração específica, por exemplo. Neste caso, como buscamos por uma relação ainda pouco conhecida, optamos pelo uso do MV em diferentes períodos de incubação e com diferentes concentrações, fornecendo assim cargas de EROs mais duradouras e, ao mesmo tempo, em diferentes intensidades; (2) a grande maioria dos trabalhos que buscam entender o papel das EROs na fisiologia de sementes, usa sementes ortodoxas como objeto de estudo, e não existe na literatura descrição de metodologia de indução e inibição de EROs em sementes recalcitrantes. Portanto, foi preciso desenvolver métodos que adaptassem aqueles utilizadas para sementes secas. E para as sementes úmidas, que possuem um metabolismo mais ativo, nos pareceu mais eficiente e menos agressivo uma formação indireta de EROs, que pode ser obtida através da aplicação do MV.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Obtenção do material vegetal

Frutos maduros de *Eugenia involucrata* DC. (figura 4A), *Eugenia uniflora* L. (figura 4B) e *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) foram coletados de matrizes do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (23°38'S e 46°37'W) e do Parque Distrital da Mooca (23°33'S e 46°35'W), ambos no Estado de São Paulo, entre os meses de setembro e dezembro de 2017, 2018 e 2019.

As sementes foram extraídas dos frutos manualmente com a ajuda de peneiras, lavadas em água corrente e em seguida colocadas sobre papel para absorver o excesso de umidade. Imediatamente após sua obtenção, as sementes foram caracterizadas quanto ao teor de água, ao conteúdo de massa seca e à porcentagem de germinação, conforme descrito abaixo. Após estas análises as sementes foram acondicionadas em sacos de polietileno com perfurações (permitindo sua respiração) e armazenadas em câmaras frias a 10ºC até a instalação dos experimentos (Barbedo *et al*. 1998). Por ter apresentado uma produção mais abundante e constante durante o período de realização do trabalho, *E. involucrata* foi a espécie escolhida como modelo para testar as metodologias.

Figura 4. Frutos e sementes de *Eugenia involucrata* (A) e *Eugenia uniflora* (B).

2.2.2. Determinações físicas e fisiológicas

Teor de água e potencial hídrico

O teor de água e conteúdo de massa seca foram determinados gravimetricamente pelo método de estufa à 103 °C por 17 horas (ISTA 2015), com 4 repetições de 10 sementes. Os resultados foram apresentados em porcentagem (base úmida) para teor de água e em mg.semente^{-1} para massa seca (Brasil 2009). O potencial hídrico foi medido por meio de 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) para sementes de *Eugenia* spp., com resultados apresentados em MPa.

Germinação

Os primeiros testes de germinação com *E. involucrata* foram conduzidos com 3 repetições de 16 sementes, colocando-as em rolo de papel Germitest (para sementes intactas, figura 5A) e em caixas plásticas do tipo Gerbox forradas com papel Germitest (para sementes fracionadas, com a superfície cortada virada para baixo, figura 5B), ambos com duas folhas para a base e uma para a cobertura, umedecidas com água até a saturação. As diferenças nos testes de germinação para sementes intactas e fracionadas tiveram o intuito de garantir que a absorção fosse a mais uniforme possível em toda a superfície das sementes intactas ou a

mais precisa possível na superfície de corte das sementes fracionadas. Os rolos e os gerbox foram acondicionados em sala de germinação climatizada com temperatura constante de 25 ºC, 100% de umidade relativa do ar e luz contínua (Delgado & Barbedo 2007). De posse dos primeiros resultados com *E. involucrata*, alguns ajustes foram feitos na metodologia, e os demais testes de germinação, novamente com *E. involucrata* e com *E. uniflora* e *E. brasiliensis*, foram feitos com 4 repetições de 15 sementes, colocadas em Gerbox preenchidos até a metade com vermiculita (de granulometria média) umedecida com água até a saturação (figura 5C). As avaliações foram realizadas periodicamente, registrando-se o número de sementes com protrusão de raiz primária (para o cálculo da porcentagem de germinação) e o de sementes que produziram parte aérea (para o cálculo da porcentagem de plântulas normais). Também foram calculados os tempos médios de germinação (Santana & Ranal 2004).

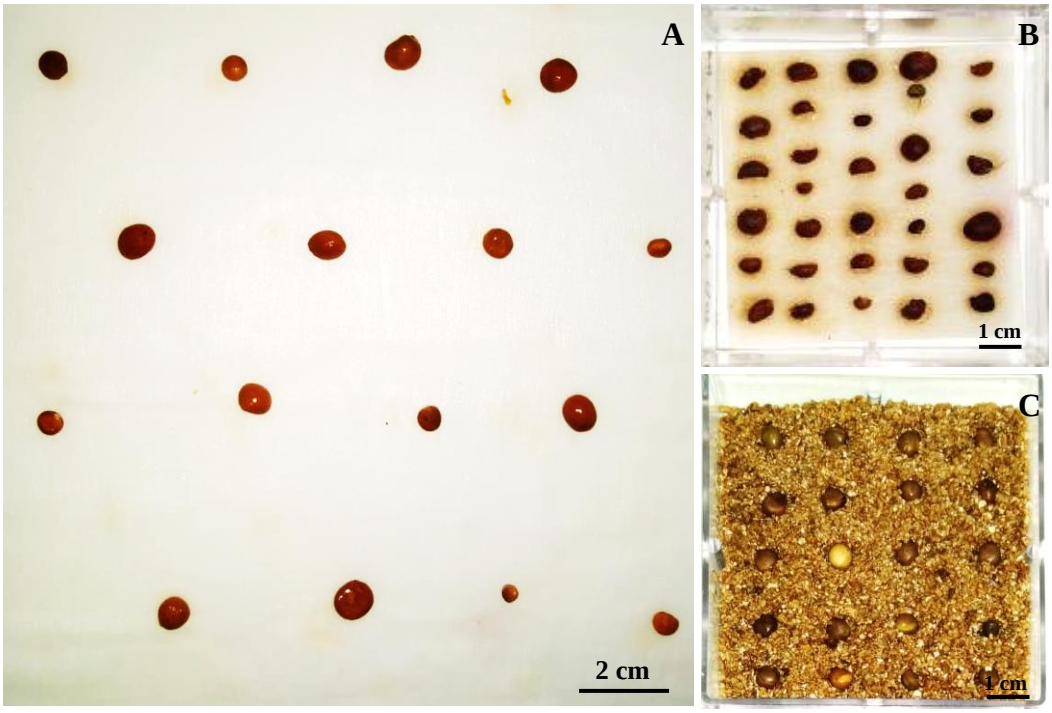


Figura 5. Testes de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* intactas em rolo de papel (A) e fracionadas em gerbox com papel (B) e de sementes de *Eugenia involucrata*, *Eugenia uniflora* e *Eugneia brasiliensis* em gerbox com vermiculita (C).

Respiração

A capacidade respiratória e as taxas de oxidação foram determinadas pela incubação das sementes em respirômetros (vidros de 600 mL, hermeticamente fechados, com orifícios na tampa recobertos por selo de borracha, por onde são inseridos os coletores da amostra de ar) a 25 °C, seguido de análise do consumo de oxigênio (O_2) e da produção de dióxido de carbono (CO_2), conforme metodologia descrita por Lamarca & Barbedo (2012). Antes da introdução das sementes, foram determinadas suas massas frescas (g) e seus teores de água, bem como o volume total do ar das embalagens, para que posteriormente o volume total do ar fosse calculado, descontando-se o volume total ocupado pelas sementes. O fechamento das embalagens foi determinado como o início da incubação. Após 24 horas, amostras do ar dos respirômetros foram coletadas e analisadas em analisador de gases Illinois 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsburg, EUA), registrando-se a porcentagem de O_2 (obtida por sensores à base de óxido de zircônio) e de CO_2 (por infravermelho).

A liberação de CO_2 é obtida diretamente pelo valor registrado no analisador, enquanto o consumo de O_2 é obtido pela diferença entre o valor registrado e a concentração do O_2 atmosférico (20,9%). Os valores de ambos foram convertidos para μmol por grama de massa seca por dia ($\mu mol.gMS^{-1}.h^{-1}$), considerando-se a pressão atmosférica local (0,9 atm), o volume total de ar do frasco (0,6 L), a constante universal dos gases perfeitos (0,082 $atm.L.mol^{-1}.K^{-1}$), a temperatura (medida em Celsius e convertida para Kelvin, 298), a massa seca total da amostra (conforme descrito anteriormente) e o número de dias de incubação (1 d). Também foi calculado o quociente respiratório (QR), dividindo-se o valor obtido para produção de CO_2 pelo obtido para consumo de O_2 ($QR = CO_2.O_2^{-1}$), segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Quantificação de H_2O_2

A fim de verificar se a aplicação de compostos indutores e inibidores alteraram, de fato, a concentração de EROs nas sementes *E. involucrata*, foi feita a quantificação de H_2O_2, de acordo com a metodologia de Bailly & Kranner (2011), baseada no método DMAB/MBTH (Oracz *et al.* 2009). Para tanto, 3 repetições de 5 sementes (aprox. 1,2-2 g) foram homogeneizadas em sete volumes de ácido tricloroacético 0.1%, a 4 ºC, em almofariz de porcelana. Os extratos foram então centrifugados a 4300 rpm, por 10 minutos, a 4 ºC. Alíquotas de 200 µl de cada extrato (em triplicatas) foram retiradas do sobrenadante e adicionadas à 200 µl de tampão Fosfato 200 mM pH 7.4 e 800 µl de Iodeto de potássio. Cada amostra foi homogeneizada e incubada a 4 ºC por 1 hora. Após incubação foram realizadas leituras de absorbância das amostras em espectro fotômetro a 390 nm. A concentração de

peróxido de hidrogênio nos tecidos foi determinada utilizando uma curva padrão e os resultados foram expressos em µmol H_2O_2 g^{-1} de massa fresca (Bailly & Kranner 2011).

2.2.3. Armazenamento

Uma vez que a produção dos frutos de *Eugenia* spp. se estende ao longo de aproximadamente um mês e que a preparação para alguns tratamentos requer alguns dias, a montagem dos experimentos pode demorar até que se obtenha a quantidade de sementes necessária e as condições ideais para a aplicação dos tratamentos. Pensando nisso, os experimentos de teste de metodologia foram feitos com sementes de *E. involucrata* frescas (com menos de 1 semana de coleta), armazenadas por 60 dias e armazenadas por 120 dias (dentro de sacos de polietileno com perfurações, em câmaras frias a 10 ºC), a fim de verificar a influência do armazenamento nas taxas de germinação e nas respostas das sementes aos tratamentos, tendo em vista que são sementes úmidas que acabam germinando lentamente durante o armazenamento e que podem, portanto, responder aos tratamentos de maneira diferente que àquelas recém-colhidas.

2.2.4. Secagem

Com o intuito de aumentar a intensidade de absorção dos reagentes e, portanto, a sua eficácia, as sementes das três espécies foram submetidas a secagens de 1 hora em estufa à 45 ºC com circulação de ar forçada. A metodologia foi baseada em trabalhos anteriores que demonstraram que secagens rápidas (de poucas horas), à temperaturas entre 40 ºC e 50 ºC, são eficientes na remoção de água e danificam muito pouco ou quase nada as sementes de *Eugenia* spp. (Maluf *et al.* 2003, Delgado & Barbedo 2007). Testes realizados previamente (tabela 1) também demonstraram que a primeira hora de secagem é quando essas sementes perdem a maior quantidade de água (sem ultrapassar 45%, limite seguro para as sementes dessas três espécies segundo Delgado & Barbedo 2007), e nas horas seguintes a secagem é menor e mais lenta.

Tabela 1. Secagem de sementes de *Eugenia involucrata* por 3 horas, em estufa à 45 ºC, e seus respectivos teores de água a cada 1 hora.

Período (horas)	Teor de água (%)
0 (inicial)	63,03
1	56,06
2	54,83
3	53,60

Além disso, sementes secas por 1 hora, quando colocadas em papel germitest umedecido com água embeberam proporcionalmente mais que sementes que não passaram pela secagem (tabela 2). Sementes que não foram secas (i.e., mantidas com seus teores de água iniciais) foram utilizadas como grupo controle, para avaliar o efeito da secagem sobre as sementes e sua influência nas respostas aos tratamentos.

Tabela 2. Embebição de sementes de *Eugenia involucrata*, secas ou úmidas, intactas ou fracionadas, em papel saturado de água, e seus respectivos teores de água após 1, 24 e 48 horas de embebição.

Período (horas)	Teor de água (%)			
	Intactas		Fracionadas	
	Secas	Úmidas	Secas	Úmidas
0 (inicial)	53,75	60,3	53,75	60,3
1	57,53	62,81	58,41	62,82
24	59,16	63,14	62,02	64,65
48	59,85	63,29	63,3	65,21

2.2.5. Fracionamento

As sementes de *E. involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis* foram submetidas ao fracionamento longitudinal ao meio (figura 6), pois trabalhos anteriores demonstraram que este tipo de corte é o mais eficiente para a regeneração de sementes fracionadas de *Eugenia* spp. (cf. Silva *et al.* 2003, Delgado & Barbedo 2010). Os cortes foram feitos com a ajuda de pinça de dessecação e bisturi. Como grupo controle também foram utilizadas no experimento sementes intactas, a fim de avaliar os efeitos dos tratamentos químicos sobre as sementes de *Eugenia* sem a influência dos cortes.

Figura 6. Semente de *Eugenia involucrata* cortada longitudinalmente em duas partes semelhantes.

2.2.6. Aumento nas concentrações de EROs

Experimento 1 (figura 7)

Inicialmente, sementes de *E. involucrata*, após armazenamento por 120 dias, úmidas e secas, intactas e fracionadas, foram submetidas a dois tipos de incubação no MV: (1) *incubação por 3 horas*, na qual as sementes foram submersas em soluções de MV de três concentrações diferentes (1, 2 e 4 mM, e em água destilada como grupo controle) acondicionadas em frascos de vidro no escuro. Após as incubações foram realizados testes de germinação como descrito anteriormente; (2) *incubação contínua*, na qual as sementes foram incubadas diretamente no MV, em papéis de germinação umedecidos com as soluções de mesmas concentrações citadas acima, além do grupo controle, umedecido apenas com água. Após as incubações temporárias e durante as incubações contínuas, as sementes foram avaliadas quanto à porcentagem de germinação, como descrito anteriormente.

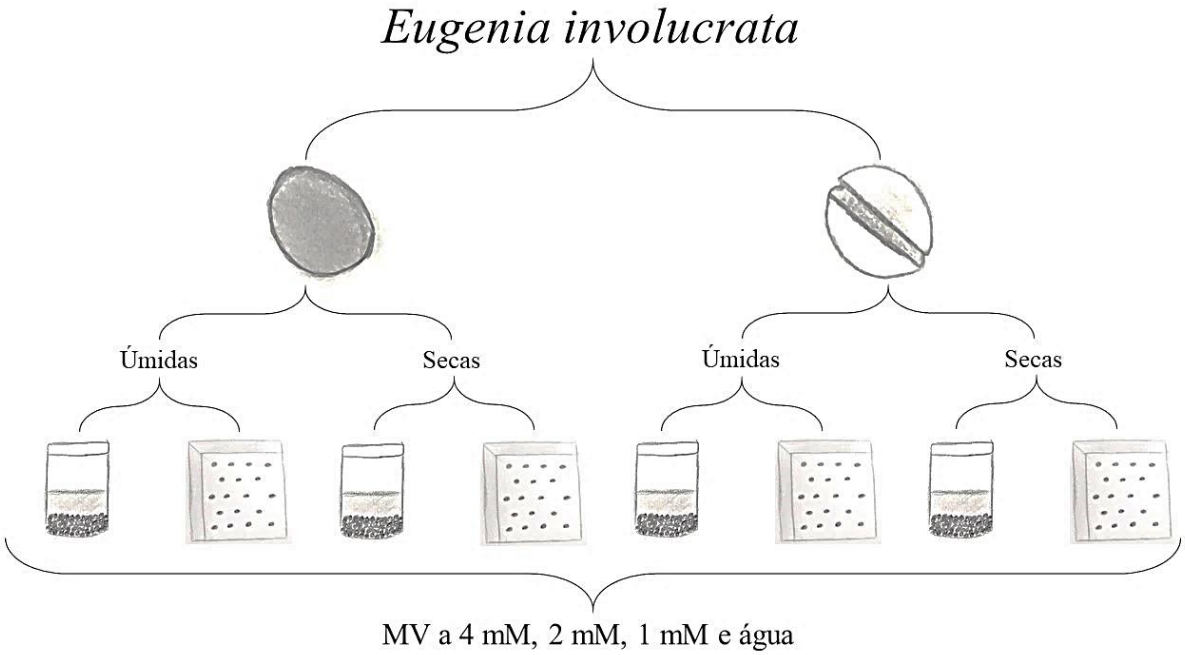


Figura 7. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata* incubadas em MV em concentrações de 4 mM, 2 mM, 1 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de MV dentro de frascos de vidro) e a incubações contínuas (em rolos de papel e em Gerbox com papel umedecidos com as soluções de MV).

Experimento 2 (figura 8)

Essas primeiras concentrações de MV foram muito altas e mataram todas as sementes de *E. involucrata* submetidas aos dois tipos de incubação (figura 11). Portanto, um segundo experimento foi montado com sementes de *E. involucrata* submetidas aos dois tipos de incubação no MV descritos anteriormente, mas em concentrações menores, de 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM. Contudo, como as sementes já estavam armazenadas por mais de 120 dias, e a maioria delas já havia começado a germinar (emitido raiz primária), os novos experimentos foram montados com sementes secas e não-secas com a raiz primária (CRP) e sementes com a raiz primária cortada (SRP) ao invés de sementes intactas e fracionadas. Após as incubações temporárias e durante as incubações contínuas, as sementes foram avaliadas quanto a germinação, como descrito anteriormente.

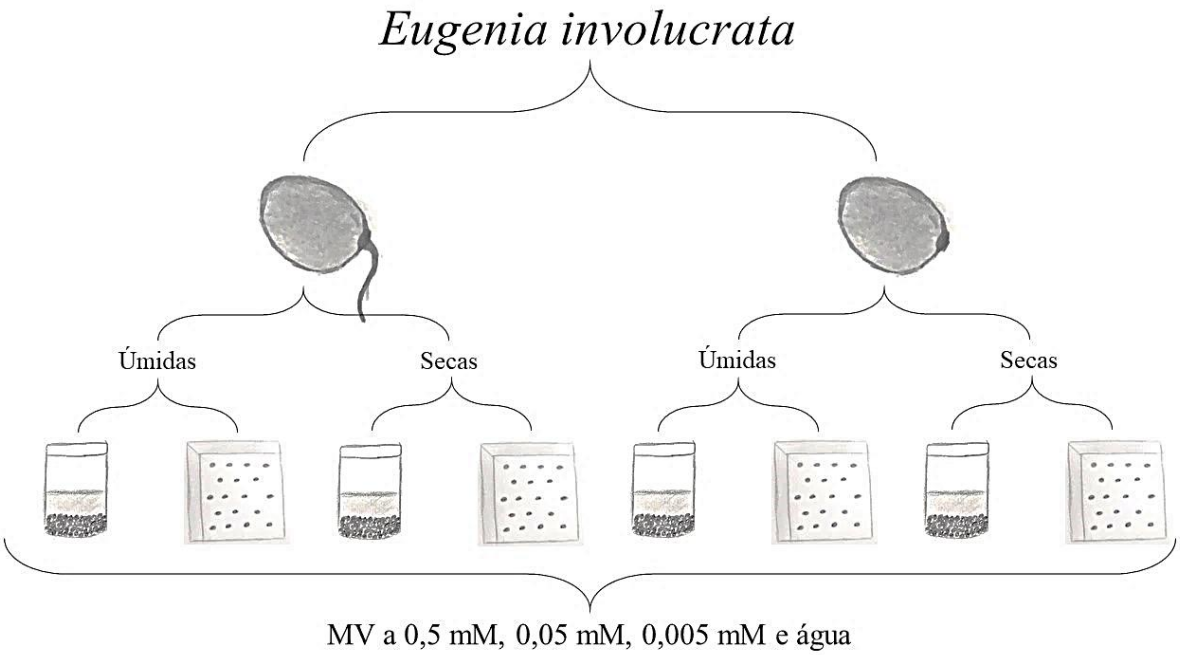


Figura 8. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata*, armazenadas por mais de 120 dias, incubadas em MV em concentrações de 0,5 mM, ,005 mM, 0,005 mM e em água. Sementes com raiz primária (CRP, esquerda) e sementes sem a raiz primária (SRP, direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de MV dentro de frascos de vidro) e a incubações contínuas (em rolos de papel e em Gerbox com papel umedecidos com as soluções de MV)..

Experimento 3 (figura 9)

Com base nesses primeiros resultados, novos experimentos foram montados com as sementes de *E. involucrata*, frescas e armazenadas por 60 dias, incubadas em MV nas concentrações de 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM. As sementes frescas, submetidas a cada um dos tratamentos também foram incubadas em frascos herméticos para avaliar as mudanças das taxas respiratórias e oxidatvias (conforme descrito anteriormente).

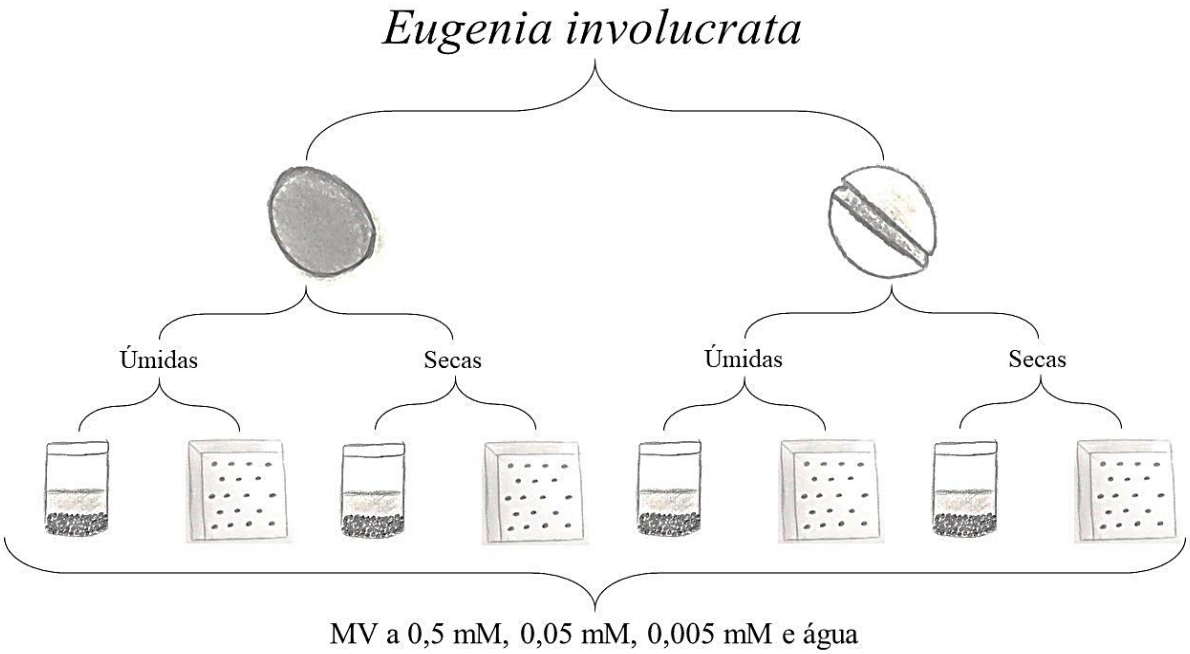


Figura 9. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata*, frescas e armazenadas por 60 dias, incubadas em MV em concentrações de 0,5 mM, 0,05 mM, 0,005 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de MV dentro de frascos de vidro) e a incubações contínuas (em rolos de papel e em Gerbox com papel umedecidos com as soluções de MV).

Experiemento 4 (figura 10)

Uma nova metodologia foi desenvolvida e novos experimentos foram montados com sementes frescas de *E. uniflora*, *E. brasiliensis* e, novamente, *E. involucrata*. As sementes das três espécies, fracionadas e intactas, foram submetidas apenas à *incubação temporária*, mas por dois diferentes períodos, de 3 de 6 horas. As incubações temporárias foram feitas como descrito anteriormente, mas com soluções de MV em concentrações ainda mais diluídas, de 0,005 mM, 0,0025 mM e 0,0005 mM e em água destilada. Após as incubações as sementes foram colocadas para germinar e avaliadas como descrito acima.

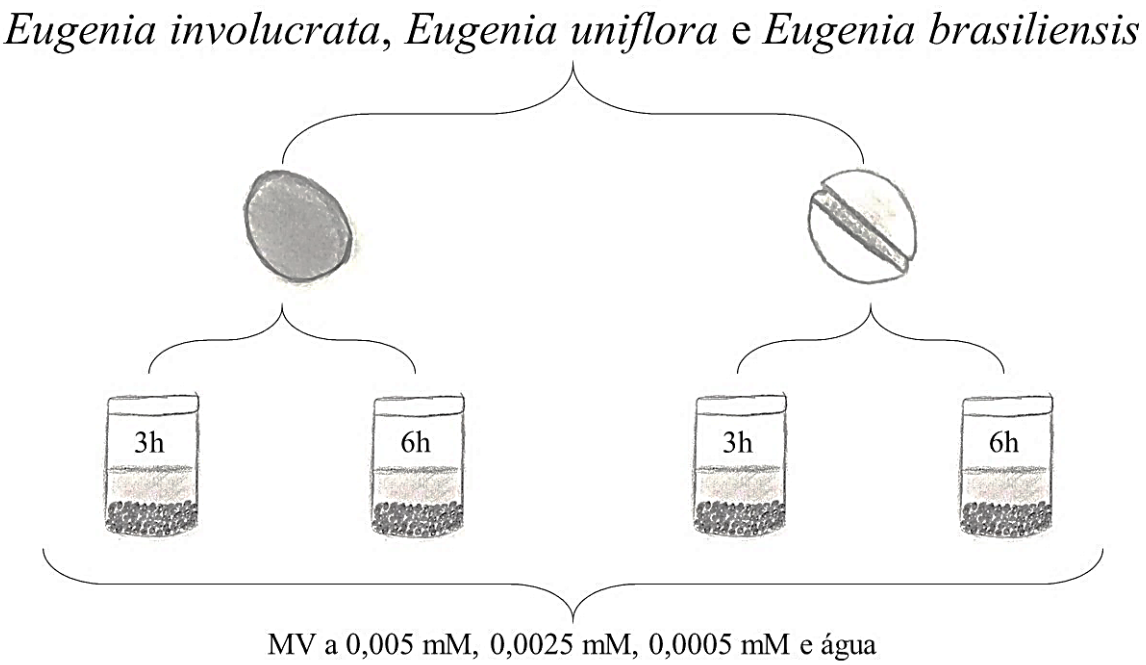


Figura 10. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*, incubadas em MV em concentrações de 0,005 mM, 0,0025 mM, 0,0005 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), foram submetidas a incubações por 3 e por 6 horas (submersas nas soluções de MV dentro de frascos de vidro).

2.2.7. Delineamento experimental e tratamento estatístico

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x4 (secagem x tipo de incubação x concentração do reagente) para sementes de *E. involucrata* frescas e armazenadas por 60 e 120 dias, intactas e fracionadas. Ou de 2x4 (tempo de incubação x concentração do reagente) para sementes de *E. involucrata, E. unfilora* e *E. brasiliensis* frescas, intactas e fracionadas. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando F foi significativo, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Ferreira 2008).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, os lotes de 2017, 2018 e 2019 eram bastante semelhantes quanto ao teor de água e ao conteúdo de massa seca. Em relação à germinação, o lote de 2018 era um pouco menos vigoroso quando comparado com os outros lotes. A tabela 3 fornece uma comparação entre teor de água, conteúdo de massa seca e germinação das sementes de *E. involucrata* coletadas nos três diferentes anos e armazenadas por dois diferentes períodos (em 2017 e 2018), fornecendo uma visão das particularidades de cada lote, antes e após os períodos de armazenamento.

Tabela 3. Caracterização de sementes de *Eugenia involucrata*, de diferentes lotes e armazenadas por diferentes períodos, de acordo com o conteúdo de água (%), massa seca (g/g) e germinação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para teor de água, maiúsculas para massa seca e itálico para germinação).

Características analisadas	**2017**		**2018**		**2019**
	Inicial	**Após 120 dias**	**Inicial**	**Após 60 dias**	
Teor de água (%)	62 a	62 a	59 a	59 a	62 a
Massa seca (g/g)	0,11 A	0,13 A	0,11 A	0,11 A	0,11 A
Germinação (%)	95 *a*	60 *b*	87 *a*	87 *a*	94 *a*

Teores de água semelhantes aos encontrados neste trabalho, entre 59% e 62%, também foram encontrados por outros autores para a mesma espécie (63,4% por Barbedo *et al.* 1998, 60,7% por Maluf *et al.* 2003, 58,2% por Delgado & Barbedo 2007 e 62,2% por Inocente & Barbedo 2019). Após 120 dias de armazenamento do lote de 2017, ainda que o teor de água não tenha variado, a germinação caiu de 95% para 60%. O lote de 2018 apresentou uma leve variação no teor de água e massa seca iniciais quando comparado com os outros lotes, além da taxa de germinação inicial que já era um pouco menor que dos outros anos. Mas, após 60 dias de armazenamento, não houve alteração em nenhuma dessas características, inclusive na germinação, que se manteve em 87% e não difere dos outros significativamente.

As sementes de *Eugenia* são consideradas sementes de curta longevidade, pois são dispersas com elevado teor de água (entre 40% e 70%) e são sensíveis à dessecação, dificultando seu armazenamento e preservação por longos períodos (Barbedo *et al.* 1998, Anjos & Ferraz 1999, Maluf *et al.* 2003, Kohama *et al.* 2006). Ainda assim, o

armazenamento de sementes de *E. involucrata* em câmara fria e acondicionadas em sacos plásticos perfurados permite conservar sua germinação por até 120 dias sem prejudicar seu vigor (Barbedo *et al.* 1998). Contudo, as variações ambientais exercem grande influência sobre o desenvolvimento e maturação das sementes de *Eugenia*, inclusive dentro de diferentes lotes de uma mesma espécie (Barbedo 2018). Em diferentes anos, os lotes podem apresentar variações no comportamento com relação à capacidade de manter sua viabilidade, e essas variações podem acontecer como consequência de diversos fatores, como a estação em que os diásporos foram produzidos e seu grau de amadurecimento (Maluf *et al.* 2003). Em anos mais chuvosos e de maior amplitude térmica, por exemplo, foram produzidas sementes de *E. pyriformis* de maior qualidade fisiológica (Lamarca *et al*. 2013). Variáveis como temperatura e disponibilidade hídrica são fatores significativos durante a formação dessas sementes, podendo determinar seu ciclo de formação e influenciar a qualidade final dessas sementes (Lamarca *et al*. 2013, Hell 2014).

Para os testes com sementes frescas o lote utilizado foi o de 2019 e para as sementes armazenadas por 120 e 60 dias foram utilizados os lotes de 2017 e 2018, respectivamente. As sementes incubadas nas primeiras concentrações testadas de MV, que eram mais altas (de 4 mM, 2 mM e 1 mM, experimento 1) morreram, demonstrando que, ainda que fossem usadas em outros trabalhos com sementes, foram concentrações muito altas e provavelmente tóxicas para as sementes de *E. involucrata* (figura 11).

Essas concentrações preliminares de MV devem ter causado inúmeros danos celulares e, consequentemente, um estresse oxidativo. Elas foram escolhidas justamente por serem usadas em trabalhos com sementes, a maioria deles visando a quebra de dormência através da aplicação EROs ou indutores de EROs. Contudo, todos esses trabalhos foram feitos com sementes ortodoxas, ou seja, sementes secas, que possuem um metabolismo pouco ativo e nas quais as mitocôndrias, que são a principal organela afetada pelo MV em sementes, são pouco diferenciadas e estruturalmente incompletas no estado seco (Bewley & Black 1985). Portanto, é possível que sementes secas necessitem de maiores quantidades de MV para que algum efeito seja percebido, enquanto sementes úmidas, como as de *Eugenia*, que são metabolicamente muito ativas e com suas mitocôndrias em pleno funcionamento, devem ser mais sensíveis ao MV, já que seu substrato de ação é abundante nessas sementes.

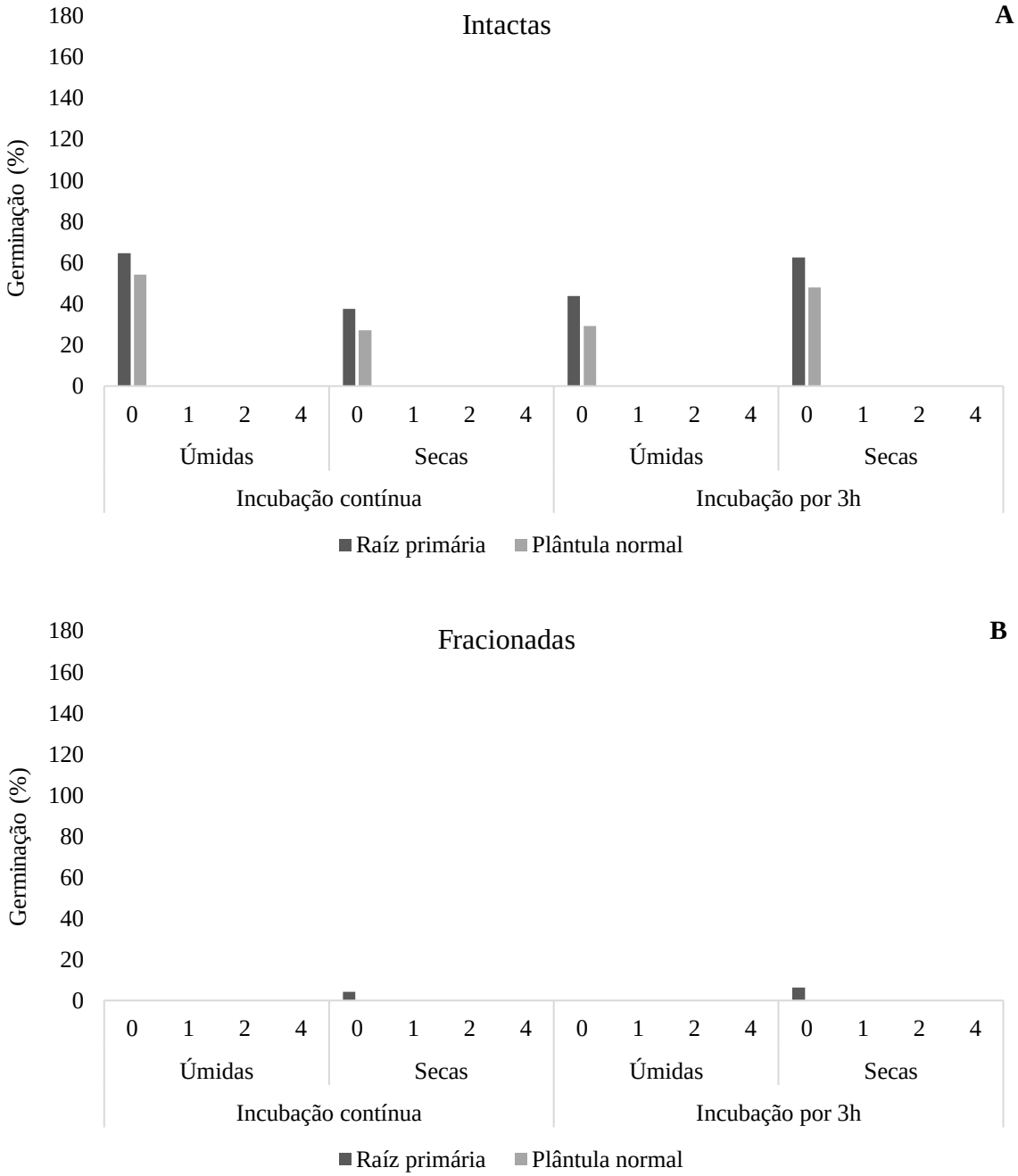


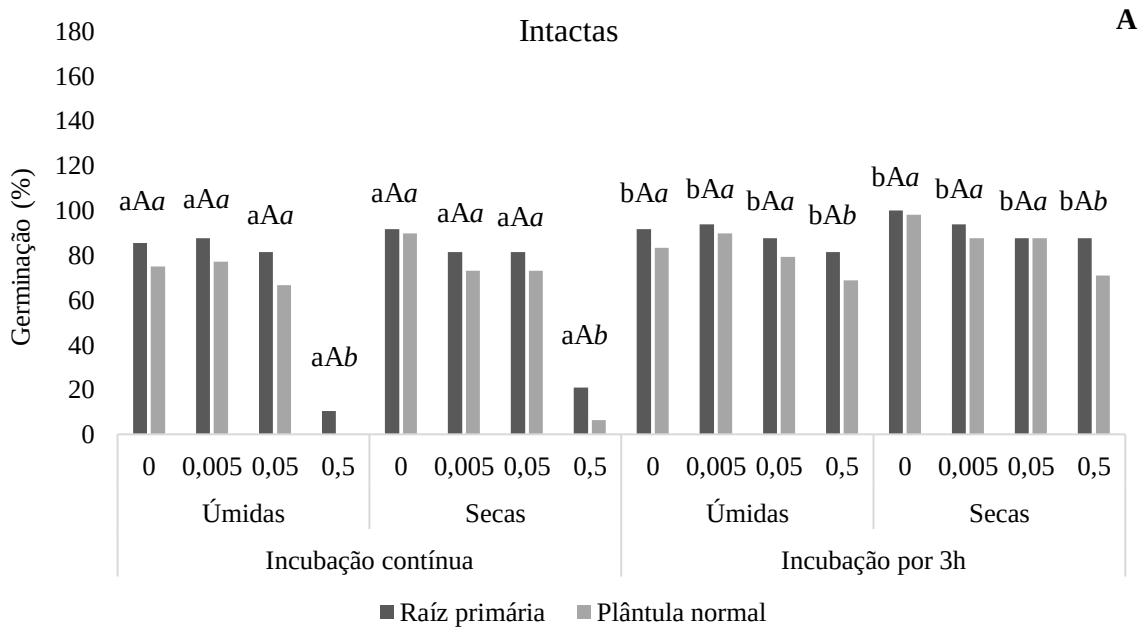
Figura 11. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata*, intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 1 mM, 2 mM e 4 mM de MV.

Estes primeiros resultados foram importantes para que as concentrações de MV fossem ajustadas e pudessem ser suportadas pelas sementes de *Eugenia* e, ainda, produzissem algum efeito positivo sobre sua germinação. Os dados a seguir, de incubações no MV com concentrações mais baixas, estão apresentados de sementes frescas até sementes armazenadas por mais de 120 dias, tendo em vista que as sementes frescas representam o

comportamento padrão esperado, respondendo aos tratamentos sem a influência dos fatores que se alteram ao longo do armazenamento.

As sementes frescas que foram mantidas intactas (experimento 2) tiveram sua germinação prejudicada pela incubação contínua na maior concentração (0,5 mM), caindo de 85,5% e 91,7% (úmidas e secas, respectivamente), para 10,5% e 20,9% (figura 12A). Essa concentração está mais próxima das anteriores testadas (4 mM, 2 mM e 1 mM) do que das outras duas concentrações usadas no mesmo experimento (0,05 mM e 0,005 mM), portanto, uma quantidade excessiva de EROs deve ter sido gerada nas sementes quando colocadas permanentemente nessa concentração do reagente, levando ao estresse oxidativo nas células. No entanto, na incubação por 3 horas, estas novas concentrações de MV parecem ter sido menos agressivas, afetando muito pouco a germinação das sementes frescas intactas. A secagem também não demonstrou nenhum efeito significativo sobre a germinação.

Já as sementes fracionadas, mesmo as frescas, parecem ser mais suscetíveis aos danos, possivelmente por ficarem mais expostas ao reagente, ao perderem parte da proteção proporcionada pelo tegumento. Na incubação contínua mesmo a concentração mais baixa, de 0,005 mM, já foi capaz de reduzir significativamente a capacidade regenerativa dessas sementes, que caiu de 154% do grupo controle para 110% (figura 12B). É provável que, quando fracionadas, as faces expostas ao ar já comecem a sofrer processos oxidativos que, quando somados à aplicação exógena de EROs (nessas concentrações de MV), podem ter ultrapassado o limite suportável pelas sementes, prejudicando-as mais do que as sementes intactas.



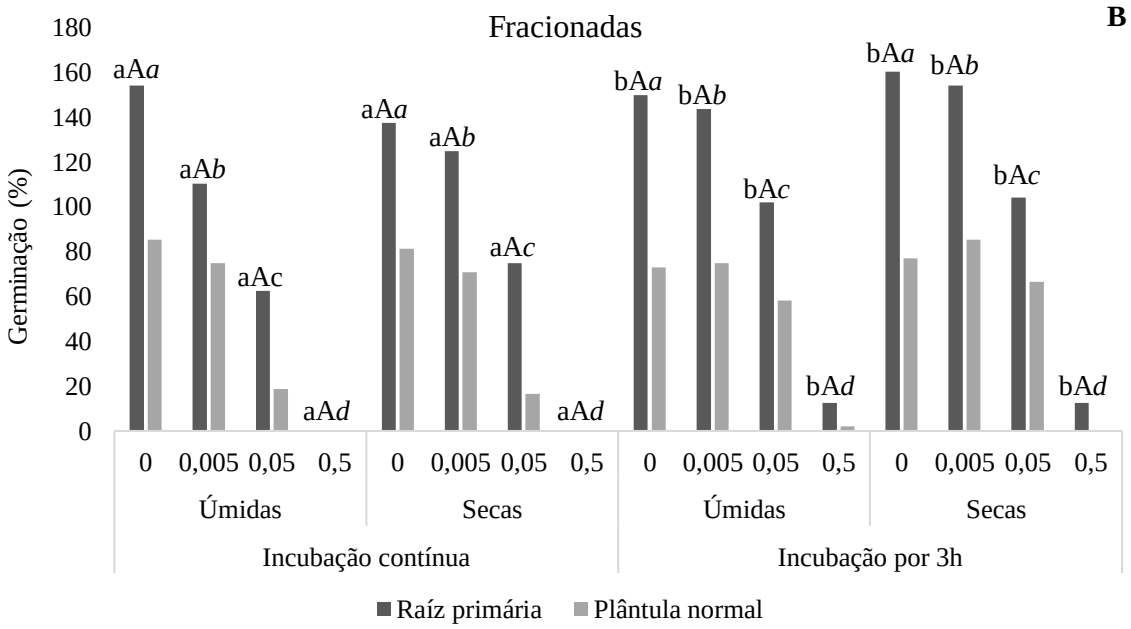


Figura 12. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes frescas de *Eugenia involucrata*. Intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para secagem e itálico para concentração do reagente).

Ainda que o lote de 2018 já apresentava uma viabilidade um pouco menor quando comparado aos demais, após 60 dias de armazenamento não demonstrou redução na taxa de germinação, permanecendo com os mesmos 87% e com altas taxas de regeneração quando fracionadas, de 168,7% e 147,9%, para sementes úmidas e secas, respectivamente. Quando submetidas às incubações em MV, as sementes desse lote demonstraram uma maior sensibilidade ao reagente, que pode estar relacionada com a menor viabilidade inicial do lote. Mesmo as intactas incubadas por 3 horas já foram afetadas pela concentração mais alta do reagente, o que não havia acontecido nas sementes intactas frescas (figura 13A). E, como observado nas sementes frescas, quando comparadas às intactas, as fracionadas também demonstraram uma sensibilidade maior ao MV, principalmente na produção de plântulas normais (figura 13B).

Quando armazenadas por mais de 120 dias, as sementes CRP (ou seja, aquelas que foram mantidas com as raízes que haviam emitido durante o armazenamento) tinham uma taxa de germinação quase igual à inicial, de 94% e 90% de formação de plântulas normais (figura 14).

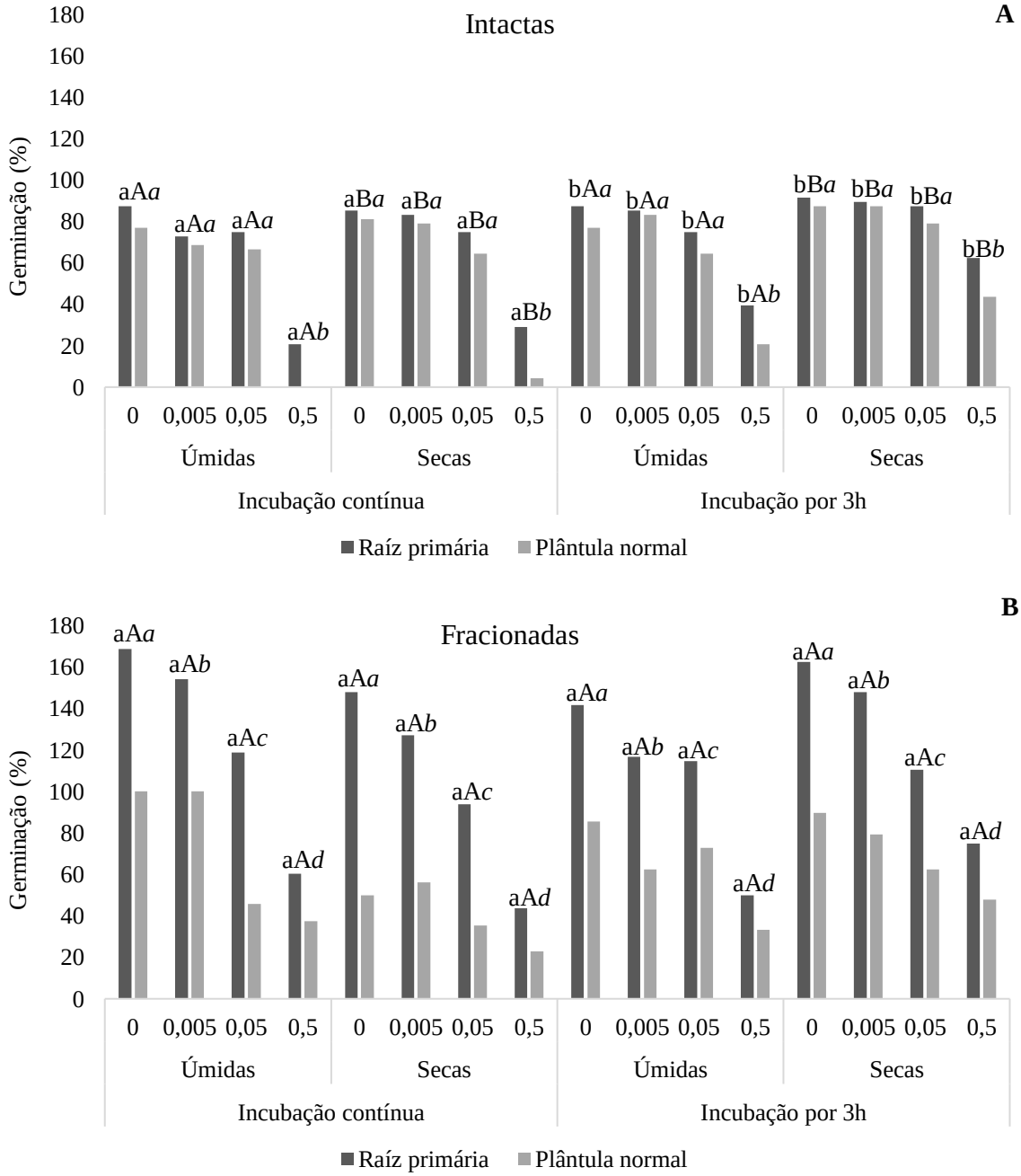


Figura 13. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas por 60 dias. Intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para secagem e itálico para concentração do reagente).

Após os tratamentos com MV elas apresentaram um comportamento semelhante àquelas armazenadas por 60 dias, sem qualquer efeito positivo sobre a germinação, mas sofrendo com os danos causados pelas concentrações mais altas, principalmente na incubação contínua (figura 14B). Mas neste caso em que as sementes foram mantidas com a raiz primária, quando colocadas para germinar, a maioria daquelas primeiras raízes

necrosavam e a semente emitia uma nova raiz. Em raras exceções a primeira raiz se mantinha viável. Portanto, na avaliação foi considerado como emissão de raiz primária aquelas raízes que se mantinham viáveis ou aquelas novas que eram emitidas após a morte da primeira.

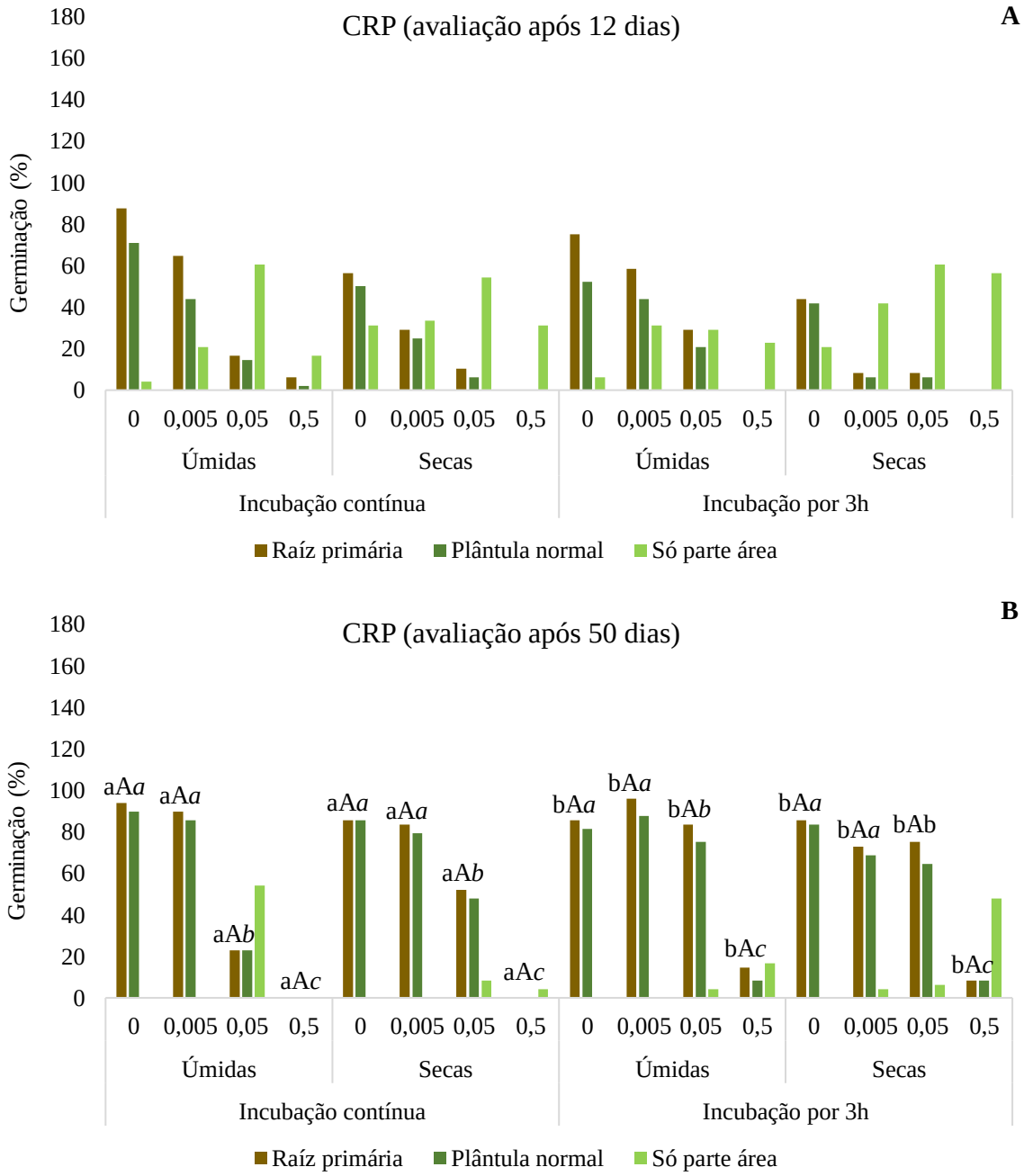


Figura 14. Emissão de raiz primária, formação de plântula normal (raiz + parte área) e formação de partes aéreas independentes em de sementes de *Eugenia involucrata* CRP (com raiz primária), armazenadas por mais de 120 dias, úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM de MV. (A) avaliação feita com 12 dias após a montagem do experimento e (B) após 50 dias. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para secagem e itálico para concentração do reagente).

Um comportamento que já havia sido observado anteriormente nas sementes incubadas no MV, mas em menores proporções, tornou-se mais frequente nas sementes CRP e SRP (aquelas em que as raízes produzidas durante o armazenamento foram cortadas). Algumas delas produziram parte aérea sem que a raiz fosse produzida - uma nova raiz, no caso das SRP, e uma nova raiz quando a primeira havia necrosado, no caso das CRP. Quando o mesmo comportamento foi observado nas sementes frescas ou armazenadas por 60 dias, que ainda não possuíam raízes, a parte aérea era produzida sem que a raiz primária fosse emitida ou com uma raiz muito pouco desenvolvida (figura 15).

Figura 15. Sementes de *Eugenia involucrata* sem nenhum tipo de incubação (A) e incubadas em MV a 0,5 mM (B, C e D). Com parte aérea bem desenvolvida e ausência de raiz (B) ou parte aérea bem desenvolvida e raízes pouco desenvolvidas (C e D).

As sementes tratadas com as maiores concentrações (de 0,05 mM e 0,5 mM) foram as que mais apresentaram a formação de parte área antes que novas raízes fossem produzidas (figura 14A), mas com o passar de alguns dias as novas raízes começaram a ser emitidas (figura 14B), formando então plântulas normais. Por isso os gráficos foram apresentados em 2 períodos diferentes: no começo do experimento, com 12 dias (figura 14A) e no final, como 50 dias (figura 14B). Demonstrando, assim, a evolução dessas partes aéreas e plântulas normais. Portanto, a aplicação do MV, a formação de EROs e a geração de processos oxidativos, parece prejudicar a formação de raízes e/ou favorecer a formação de parte aérea.

Nas sementes em que a raiz emitida durante o armazenamento foi retirada antes de passar pelos tratamentos (SRP), tanto a germinação quanto a formação de plântulas normais

foram mais demoradas e, ainda que em quantidades menores, algumas sementes também emitiram parte área antes da formação de uma nova raiz (figura 16A).

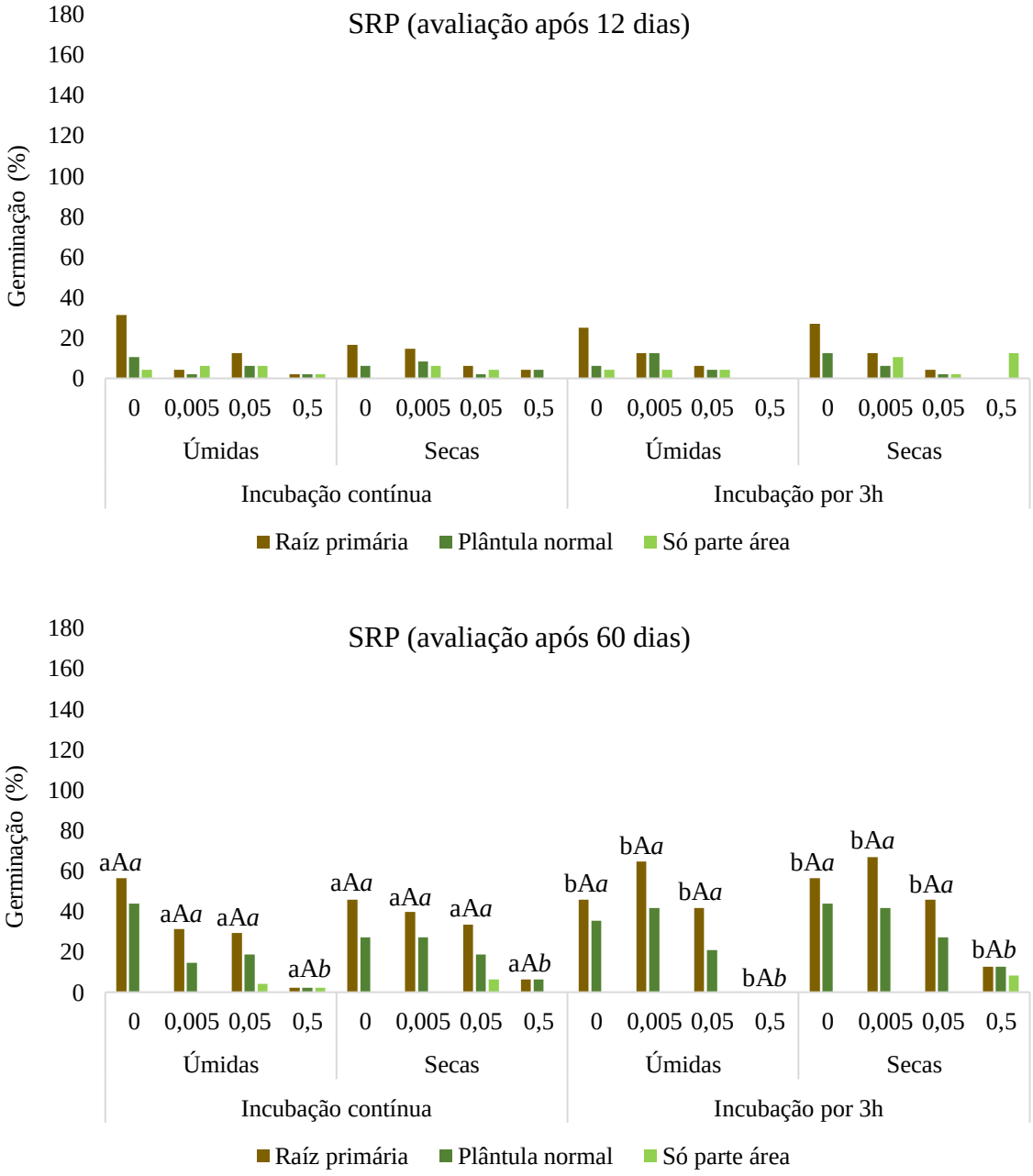


Figura 16. Emissão de raiz primária, formação de plântula normal (raiz + parte área) e formação de partes aéreas independentes em de sementes de *E. involucrata* SRP (sem raiz primária, isto é, com a raiz primária cortada), armazenadas por mais de 120 dias, úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM de MV. (A) avaliação feita com 12 dias após a montagem do experimento e (B) após 50 dias. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para secagem e itálico para concentração do reagente).

A incubação por 3 horas na menor concentração do MV, de 0,005 mM, pareceu ter um efeito positivo sobre estas sementes, que aumentaram de 56% do grupo controle para 65% e 67% em sementes úmidas e secas, respectivamente (figura 16B). Mas, como nos outros experimentos, em todos os outros tratamentos as sementes parecem ter sido afetadas negativamente pelo MV, e as taxas de germinação diminuíram à medida que houve o aumento das concentrações do reagente, sendo o efeito ainda mais severo na incubação contínua.

Uma vez que as concentrações utilizadas parecem não ter beneficiado a germinação na incubação por 3 horas, e já prejudicado na incubação contínua (principalmente nas concentrações mais altas), no novo experimento (experimento 4), feito com sementes de *E. involucrata* (figura 17), *E. uniflora* (figura 18) e *E. brasiliensis* (figura 19), as sementes foram incubadas em concentrações de MV ainda menores e por períodos diferentes, de 3 horas e de 6 horas, já que a incubação contínua pareceu ser muito agressiva. Contudo, a diminuição nas concentrações de MV, para 0,005 mM, 0,0025 mM e 0,0005 mM, e as mudanças nos tempos de incubação também não demonstraram nenhum efeito significativo sobre a germinação das sementes de nenhuma das três espécies.

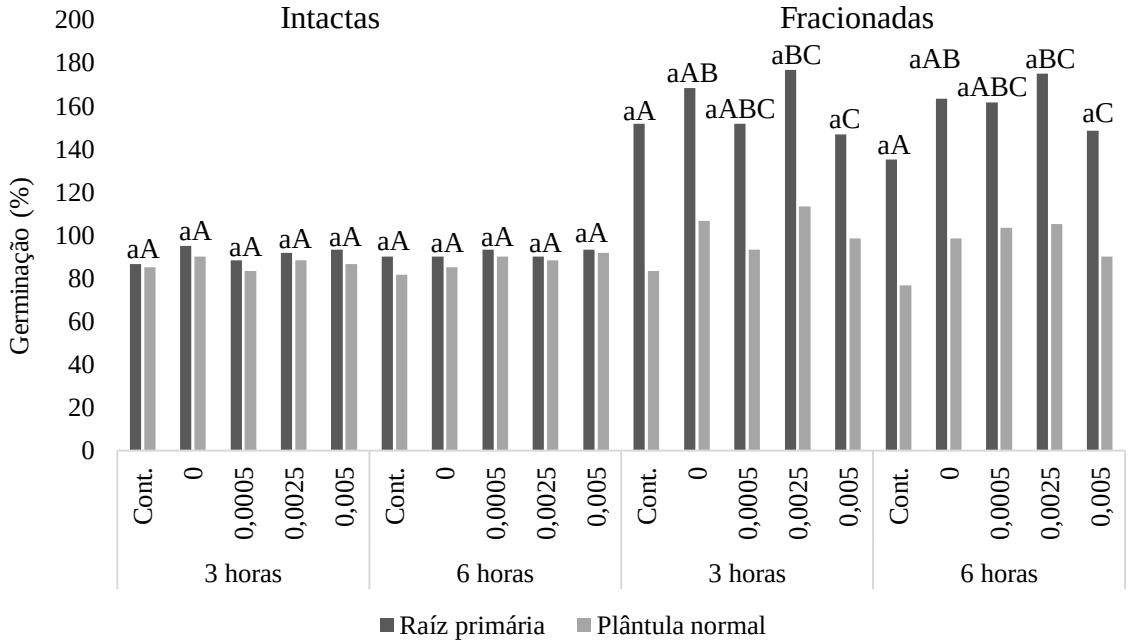


Figura 17. Sementes de *Eugenia involucrata*, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 e 6 horas em água (0) e em soluções de 0,0005 mM, 0,0025 mM e 0,005 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente).

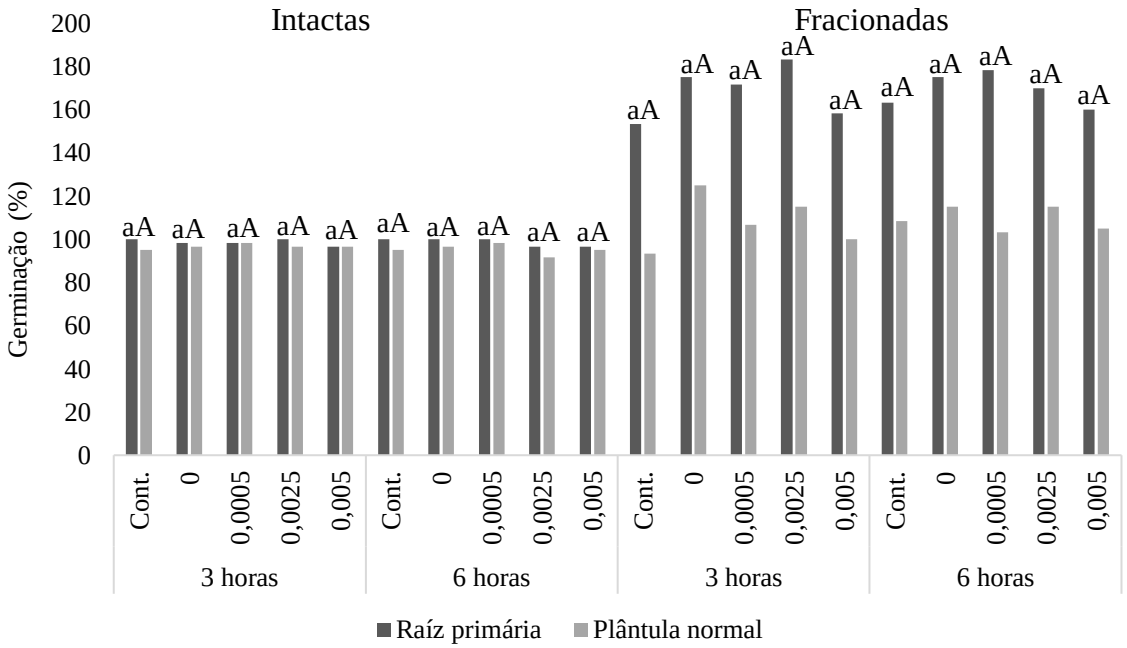


Figura 18. Sementes de *Eugenia uniflora*, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 e 6 horas em água (0) e em soluções de 0,0005 mM, 0,0025 mM e 0,005 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente).

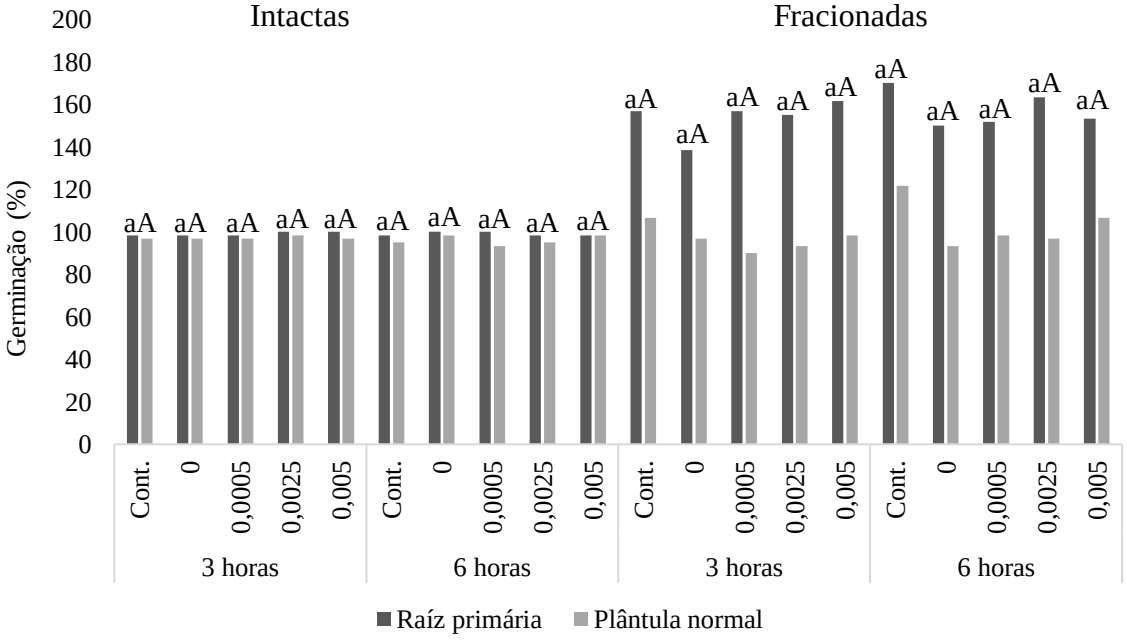


Figura 19. Sementes de *Eugenia brasiliensis*, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 e 6 horas em água (0) e em soluções de 0,0005 mM, 0,0025 mM e 0,005 mM de MV. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para concentração do reagente).

Tendo em vista que os efeitos positivos do MV, ou das EROs no geral, sobre as sementes podem ser observados não só pela indução, mas também pela aceleração da germinação, também foi desenvolvida a distribuição temporal de frequência da germinação (figuras 20 e 21) e calculado o tempo médio de germinação (TMV, figura 22) de sementes frescas de *E. involucrata*. Mas os resultados demonstraram que a incubação em MV, nessas concentrações, atrasou a germinação das sementes, ao aumentar seu TMG, enquanto o esperado era que a geração de EROs pudesse acelerar a germinação, diminuindo, consequentemente, o TMG. Estes dados indicam, novamente, a possível geração de um estresse oxidativo nas concentrações de MV escolhidas, que podem ter prejudicado a germinação.

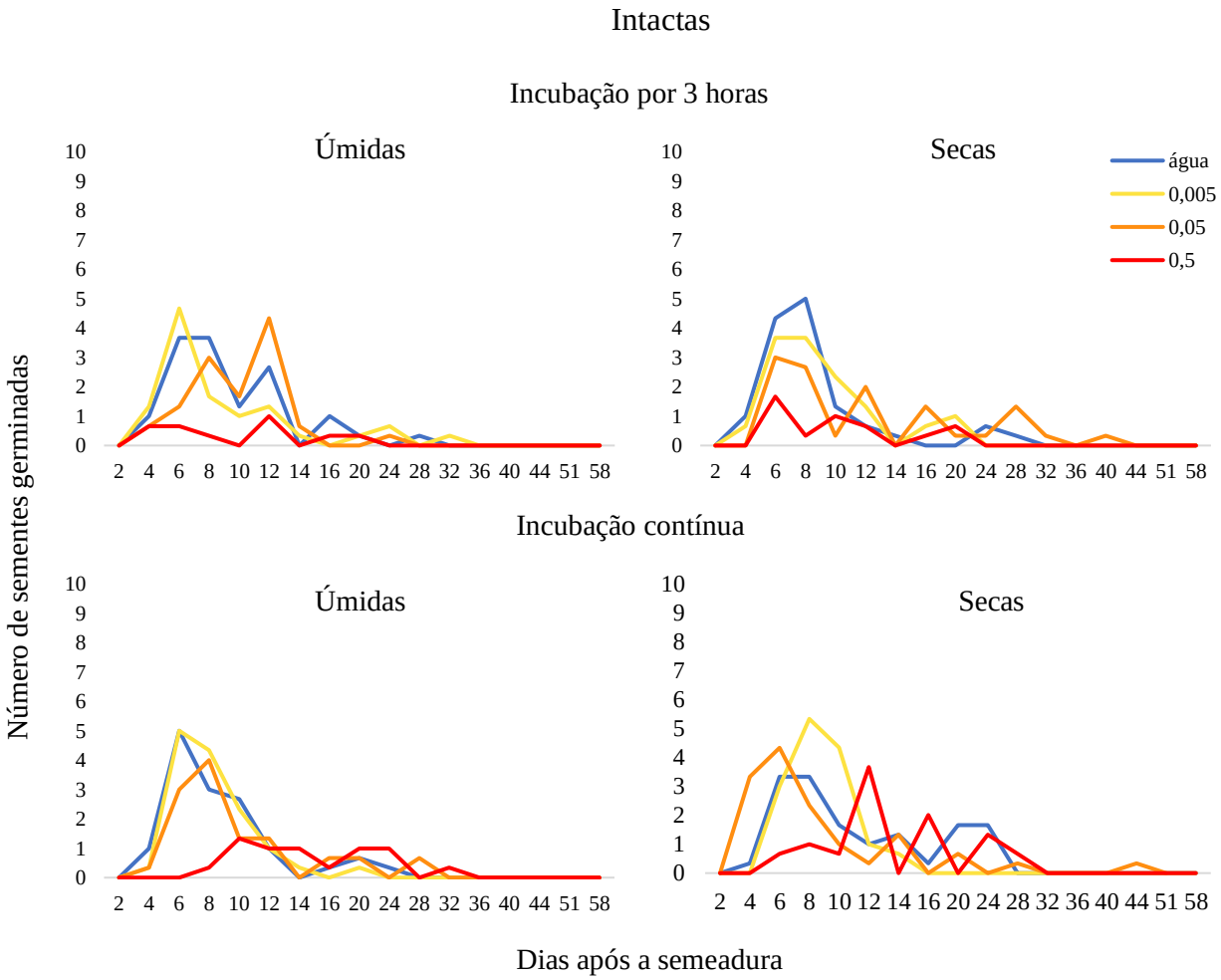


Figura 20. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes intactas de *E. involucrata* úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV.

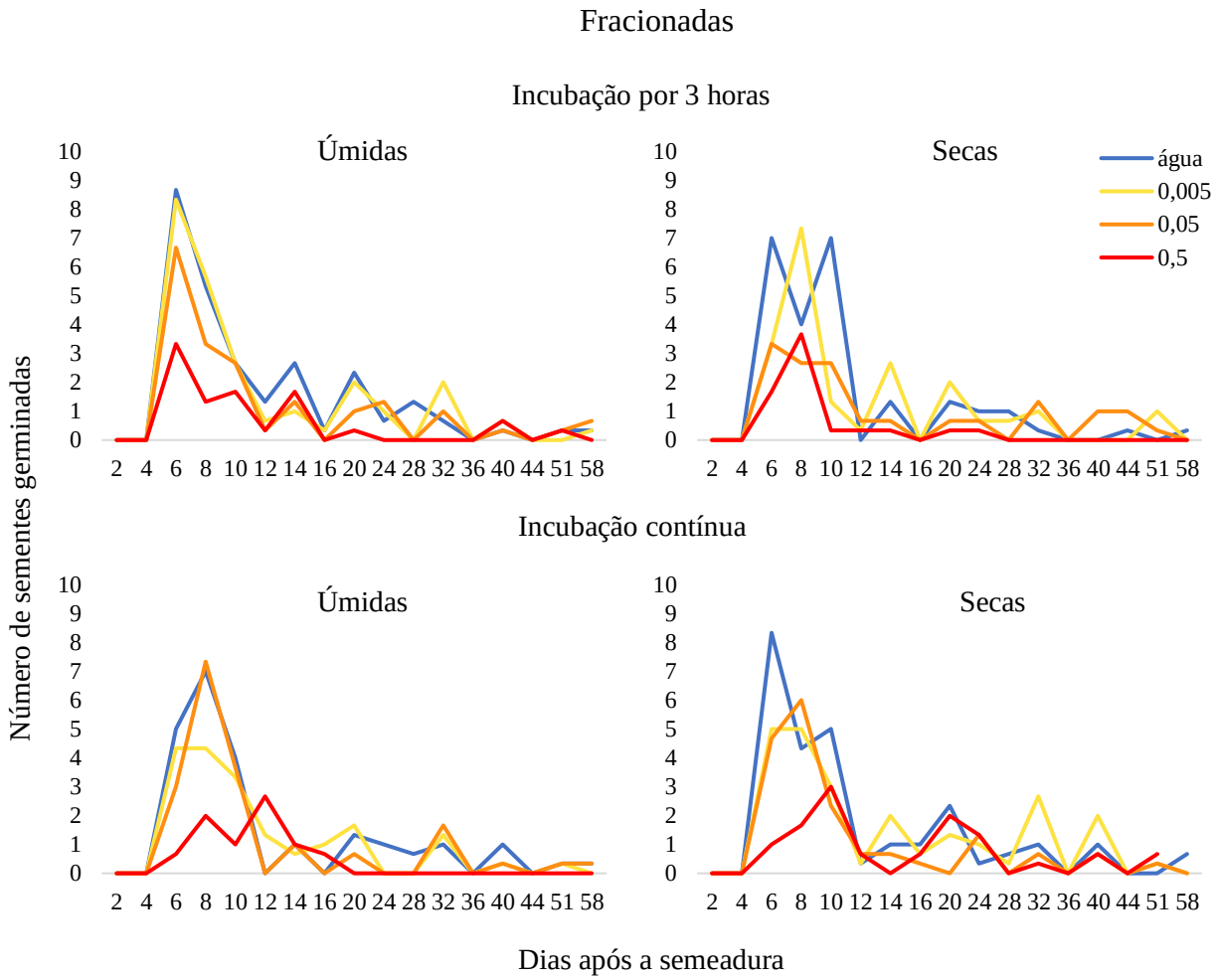


Figura 21. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes fracionadas de *E. involucrata* úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV.

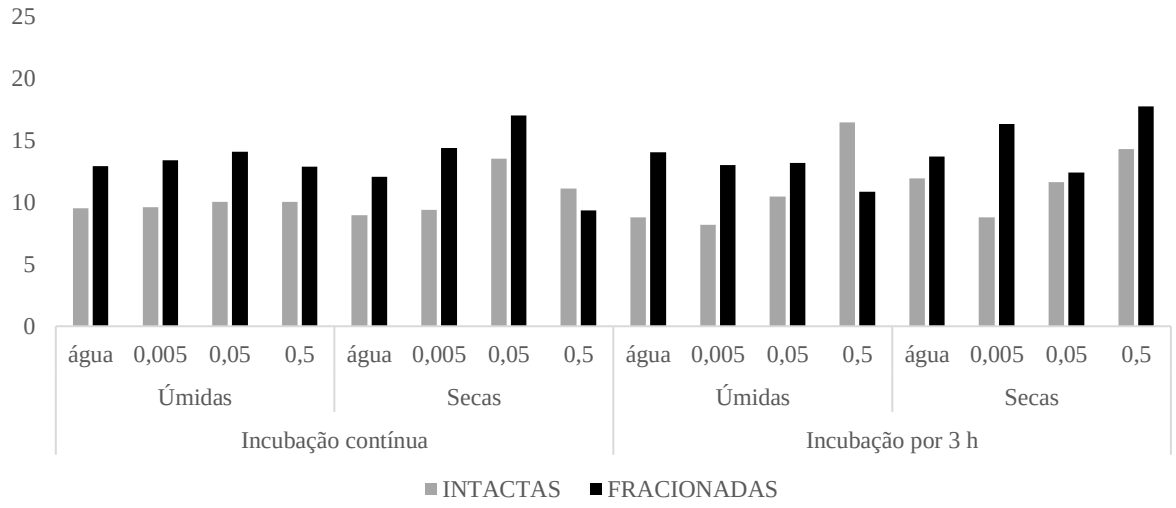


Figura 22. Tempo médio de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* intactas (colunas cinzas) e fracionadas (colunas pretas) incubadas continuamente e por 3 horas em água (0) e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV.

Quantificação de H_2O_2

Alguns tratamentos foram selecionados para a quantificação de H_2O_2, utilizando sementes que foram secas e as que foram mantidas úmidas em todos eles (tabela 4). Sementes intactas e fracionadas (sempre usadas após 3 horas de exposição ao ar, a fim de garantir algum tempo para que as reações de oxidação nas superfícies cortadas pudessem acontecer) constituíram o grupo controle (INT e FRAC). Sementes intactas e fracionadas incubadas por 3 horas em água foram denominadas INT H_2O e FRAC H_2O (1). Sementes fracionadas incubadas em água, FRAC H_2O (1), foram novamente expostas ao ar por 3 horas, constituindo o grupo FRAC H_2O (2). Por fim, sementes incubadas por 3 horas no MV constituíram os grupos INT MV e FRAC MV. Os resultados estão expressos em µmol H_2O_2/g MF (figura 23).

Tabela 4. Relação de siglas e descrições dos tratamentos utilizados para a quantificação de H_2O_2 em sementes de *Eugenia involucrata*.

SIGLA	DESCRIÇÃO DO TRATAMENTO
INT	Sementes intactas não submetidas a nenhum tratamento
FRAC	Sementes fracionadas e expostas ao ar por 3 horas
INT H_2O	Sementes intactas incubadas por 3 horas em água
FRAC H_2O (1)	Sementes fracionadas expostas ao ar por 3 horas e em seguida incubadas por 3 horas em água
FRAC H_2O (2)	Sementes fracionadas expostas ao ar por 3 horas, em seguida incubadas por 3 horas em água e posteriormente expostas ao ar por mais três horas
INT MV	Sementes intactas incubadas por 3 horas em MV a 0,5 mM
FRAC MV	Sementes fracionadas expostas ao ar por 3 horas e em seguida incubadas por 3 horas em MV a 0,5 mM

A quantificação de H_2O_2 sugere que a secagem e o fracionamento naturalmente produzem mais H_2O_2 do que o grupo controle (intactas e úmidas), e quando submetidas à incubação no MV, o aumento na produção de peróxido é muito sutil comparado aos outros grupos. Contudo, os resultados apresentaram desvios muito grandes, impossibilitando qualquer tipo de afirmação e evidenciando a necessidade de novos experimentos com mais repetições biológicas ou, ainda, a análise de outros compostos oxidantes, uma vez que o H_2O_2 possa não ser tão expressivo neste caso. De qualquer forma, o método utilizado foi desenvolvido para sementes ortodoxas, e adaptado para as recalcitrantes de *Eugenia*, o que também deve ter influenciado nos resultados.

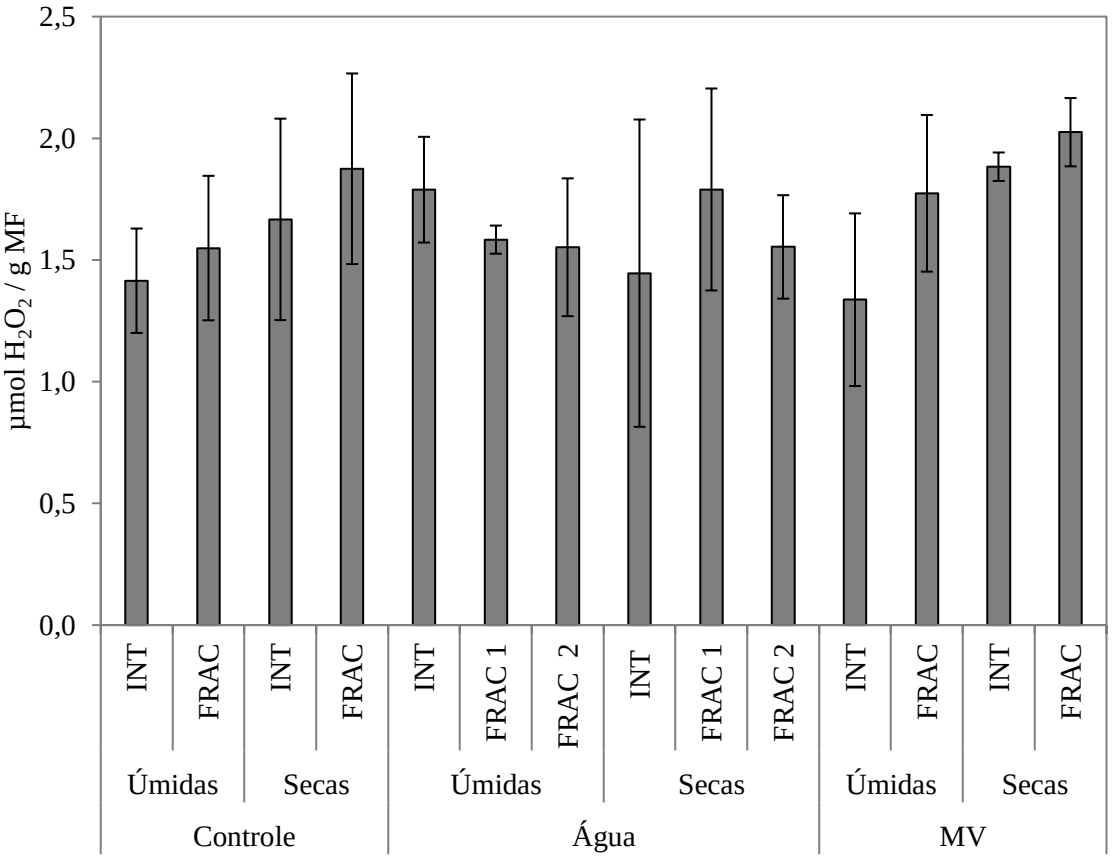


Figura 23. Quantificação de H_2O_2 (µmol H_2O_2/g MF) em sementes de *Eugenia involucrata* úmidas e secas, intactas e fracionadas, incubadas em água (0) e em soluções de 0,5 mM de MV.

Respiração

A respiração aeróbica é o processo biológico pelo qual compostos orgânicos reduzidos, como a glicose, são completamente oxidados a CO_2, gerando gradativamente energia e produzindo água. Eventualmente, desequilíbrios no número de elétrons transferidos ao oxigênio podem levar à formação de EROs, principalmente em situações de estresse. Em tecidos secos, como em sementes ortodoxas maduras, as baixas taxas respiratórias e, consequentemente, a formação de EROs pela cadeira respiratória também é menor, enquanto em sementes úmidas a intensa atividade respiratória favorece a formação de EROs.

A aplicação de compostos geradores de EROs, como o MV, também podem afetar a respiração das sementes, uma vez que atuam diretamente na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias. As sementes submetidas à incubação por 3 horas no MV foram avaliadas quanto às taxas respiratórias (figura 24), a fim de verificar a influência do reagente e possíveis danos no metabolismo respiratório. Quando comparada à água, a incubação em MV pareceu diminuir o consumo de O_2 e a liberação de CO_2, principalmente em sementes fracionadas. Mas na maior concentração de MV os valores voltaram a se aproximar aos da incubação em água.

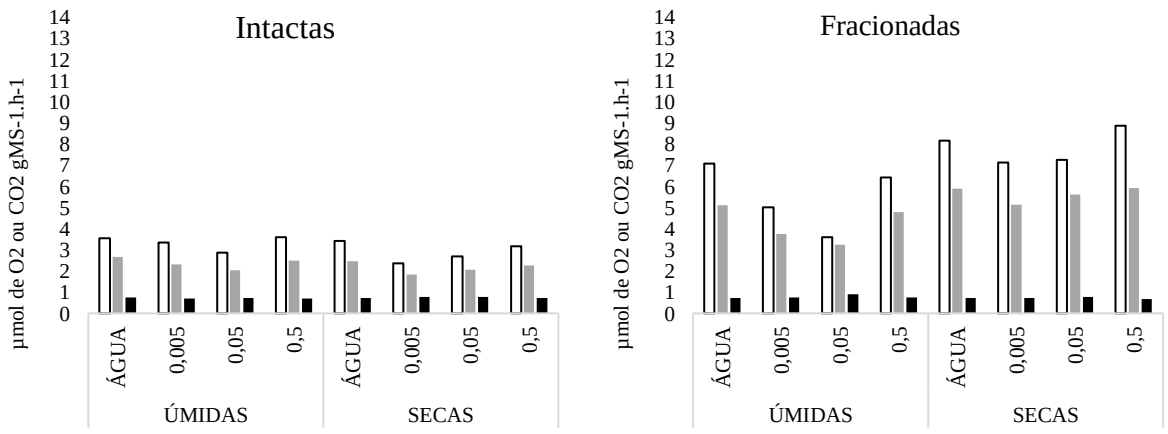


Figura 24. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia involucrata* intactas e fracionadas incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 0,005 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de MV. Colunas brancas representam o consumo de O_2, colunas cinzas a liberação de CO_2 e colunas pretas o QR.

A intensidade e a qualidade da respiração das sementes podem ser indicadas pela velocidade respiratória, que é avaliada através das taxas de eliminação de CO_2, consumo de O_2 ou pelo cálculo do quociente respiratório (QR), que é calculado pela quantidade de CO_2 liberado sobre o O_2 consumido (Kader & Saltveit 2002). O QR pode variar consideravelmente entre as sementes de diferentes espécies, especialmente entre sementes úmidas e secas, e as variações na velocidade respiratória dependem do substrato que está sendo oxidado. Ácidos orgânicos e carboidratos, por exemplo, são substratos mais oxidados que proteínas e lipídios, resultando, portanto, em um QR mais elevado (Popinigis 1985). Além disso, fatores como teor de água, temperatura, permeabilidade de membranas, tensão de oxigênio e luz também influenciam a velocidade respiratória das sementes (Popinigis 1985).

Logo após a disperção, as taxas respiratórias de sementes de *E. pyriformis* demonstram intensa atividade respiratória, que está associada ao teor de água das sementes (Lamarca 2013). O QR inferior a 1 pode indicar que, além da respiração, estão ocorrendo reações oxidativas (Labouriau 1983), uma vez que o consumo de O_2 é superior à liberação de CO_2. O QR foi inferior a 1 em todos os tratamentos, inclusive na incubação em água, e pode indicar que a incubação das sementes de *E. involucrata* por submersão em algum líquido, seja ele uma solução ou água pura, afeta seu metabolismo respiratório e induz processos oxidativos. De fato, as sementes recalcitrantes já possuem elevada atividade respiratória, que, naturalmente levam à produção de EROs. Em situações estressantes, como a submersão e, consequentemente, a falta de O_2, a produção de radicais livres pode ser potencializada.

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado o papel das EROs na sinalização de processos e sua importância no crescimento e desenvolvimento das plantas. O H_2O_2, por exemplo, tem sido apontado como responsável por diversos processos celulares, como a morte celular programada, a indução de embriogênese somática, repostas a ferimentos etc. (El-Maarouf-Bouteau & Bailly 2008). A produção de EROs em sementes foi por muito tempo considerada unicamente prejudicial, uma vez que estava quase sempre associada a dois processos especialmente danosos, o envelhecimento e a dessecação, ambos frequentemente levando ao estresse oxidativo (Bailly 2004).

Contudo, nas duas últimas décadas, diversos estudos têm focado nas relações entre as EROs e as sementes, e muitos deles têm demonstrado os papéis positivos desempenhado por essas moléculas em muitos eventos da vida das sementes, inclusive na germinação e quebra de dormência. Schopfer e colaboradores (2001) demonstraram que há um aumento na liberação de EROs no início da germinação, pouco antes da radícula se projetar através

do revestimento de sementes, indicando que a produção de EROs durante a germinação de sementes representa, de fato, uma reação biológica ativa e positiva, relacionada ao alto potencial germinativo e ao vigoroso desenvolvimento de mudas.

Infelizmente, o uso do MV como composto gerador de EROs nos trabalhos com sementes ainda está restrito à quebra de dormência em sementes ortodoxas. Os trabalhos têm relacionado a produção de EROs, principalmente de H_2O_2, com a carbonilação de proteínas específicas nos eixos dormentes e a consequente quebra da dormência (Oracz *et al.* 2007). Tratamentos com H_2O_2 exógeno ou MV demonstraram a indução da germinação em sementes dormentes de diversas espécies, como cevada (Fontaine *et al.* 1994), arroz (Naredo *et al.* 1998), *Zinnia elegans* (Ogawa & Iwabuchi 2001), maçã (Bogatek *et al.* 2003) e girassol (Oracz *et al.* 2007, 2009). A aplicação de EROs ou compostos geradores de EROs favoreceu a germinação de sementes de *Hedysarum scoparium*, que apresentavam apenas 21% de germinação em condições normais e, quando submetidas a tratamentos com 50 mM de H_2O_2 ou 1 mM de MV, tiveram sua taxa de germinação elevada para 79% e 84%, respectivamente (Su *et al.* 2016).

No entanto, as EROs são apontadas como moléculas que atuam como mensageiras celulares, podendo estar ligadas não só a sinalizações para a liberação da dormência, mas também favorecendo a germinação propriamente dita (Bailly 2004). A oxidação de proteínas de reserva pode estar relacionada ao estímulo da germinação exercido pelas EROs, pois em embriões de girassol, a produção de H_2O_2 e a carbonilação de proteínas foram desencadeadas e acompanhadas de um alto estímulo da germinação, semelhante àquele induzido por cianeto de hidrogênio (Oracz *et al.* 2009).

Neste estudo, as incubações de sementes de *Eugenia* spp. em MV não forneceram nenhuma evidência de que o composto estimula a germinação e que confirme a hipótese de que a germinação e a regeneração de sementes de *Eugenia* estariam relacionadas às EROs. As concentrações mais altas utilizadas foram prejudiciais a estas sementes e, provavelmente, levaram ao estresse oxidativo, uma vez que afetaram negativamente as taxas de germinação. Concentrações mais baixas parecem não ter surtido efeito sobre a germinação, e não demonstraram nenhuma alteração significativa sobre a capacidade germinativa. De acordo com o proposto por Bailly & El-Maarouf-Bouteau (2008), o papel sinalizador das EROs estaria dentro de uma janela oxidativa, na qual quantidades acima levam a um estresse oxidativo e abaixo não seriam suficientes para desempenhar um papel de sinalização. Provavelmente é por este motivo que as concentrações mais altas de MV, de 4 mM, 2 mM, 1 mM e até de 0,5 mM tenham prejudicado ou suprimido o processo germinativo nestes

ensaios, enquanto concentrações menores pareceram exercer pouca influência visível sobre as sementes de *Eugenia*.

Além disso, estudos com sementes ortodoxas durante o início do desenvolvimento (embriogênese) mostram que o conteúdo de H_2O_2 é elevado nesta etapa, provavelmente devido a maior umidade dos tecidos, que mantêm as sementes metabolicamente ativas durante esse período. Quando essas sementes entram na etapa de dessecação, o conteúdo de peróxido de hidrogênio diminuí e só volta a aumentar durante a embebição, resultando na reativação do metabolismo (Bailly *et al.* 2008). Tendo em vista que as sementes de *Eugenia* são recalcitrantes e mantêm altos níveis de umidade durante todo o seu desenvolvimento, é provável que os níveis de H_2O_2 também permaneçam elevados, tornando as concentrações de MV utilizadas em trabalhos com sementes ortodoxas mais danosas para as sementes de *Eugenia*, uma vez que elas naturalmente já possuem níveis mais altos de EROs. Soma-se a isso o fato dos principais sítios de ação do MV nas sementes serem as mitocôndrias e que, enquanto estas organelas se encontram em menor número e estruturalmente indiferenciadas nas sementes secas, e só com a reidratação elas são reparadas, reativadas ou produzidas novamente (Buchanan 2015), em sementes úmidas elas são muito mais abundantes, fornecendo uma quantidade maior de locais de ação para o MV.

A quantificação de peróxido de hidrogênio demonstrou que as sementes tratadas com MV não tiveram um aumento substancial na produção H_2O_2, quando comparadas aos outros grupos, pois o próprio fracionamento parece aumentar as quantidades de H_2O_2 nas sementes de *E. involucrata* (figura 23). No entanto, a aplicação de MV em sementes de *H. scoparium* parece aumentar principalmente o acúmulo de $O_2^{\bullet-}$ nas células (Su *et al.* 2016). Segundo os autores, a germinação de sementes de *H. scoparium* está claramente associada ao acúmulo de ânions superóxido e peróxidos de hidrogênio nos eixos embrionários. Portanto, é possível que a quantificação de outras EROs, ou de EROs totais, forneça maiores informações sobre os efeitos do MV em sementes de *Eugenia*.

Ainda, a quantificação de H_2O_2 em organismos submetidos a tratamentos com MV pode ser pouco precisa, uma vez que organismos inteiros demonstram grandes variações nas respostas ao reagente e, consequentemente, sua análise produz muitos erros estatísticos, os quais só podem ser calculados a partir de um número tão grande de indivíduos que dificilmente poderia ser manipulado em condições laboratoriais (Bowler *et al.* 1991). Contudo, ainda que a quantificação de H_2O_2 não tenha demonstrado diferenças entre os tratamentos, foram observados efeitos fisiológicos nas sementes incubadas em MV (que não foram observadas naquelas incubadas em água), indicando a atuação do reagente. Além disso, nessas sementes, o H_2O_2 pode não ter sido o causador, ou o único causador, do efeito

observado. E os efeitos também podem ser bem localizados, como no eixo embrionário, mas ao analisar as sementes inteiras, constituídas em sua maior parte pelos cotilédones, as alterações substanciais podem ter sido diluídas no resultado final.

As EROs são moléculas de efeitos e eliminação extremamente rápidos, portanto, ainda que não tenham sido observados aumento ou diminuição em suas quantidades no momento da quantificação, não significa que estes efeitos não tenham ocorrido em outros momentos. E ao trabalhar com espécies nativas, que são geneticamente muito diversas, as respostas podem ser bastante diferentes das encontradas nos modelos tradicionais de sementes ortodoxas selecionadas e pouco diversas geneticamente. Portanto, é provável que outros tipos de análises, como a quantificação de outras EROs ou análises anatômicas, possam fornecer maiores informações.

2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anjos, A.M.G. & Ferraz, I.D.K. 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Acta Amazonica 29: 337-348.

Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research 14: 93-107.

Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. & Corbineau, F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. Comptes Rendus Biologies 331: 806-814.

Bailly, C. & Kranner, I. 2011. Analyses of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Relation to Seed Longevity and Germination. In: Kermode, A.R. *Seed Dormancy: Methods and Protocols*. Springer, London.

Barbedo, C.J., Kohama, S., Maluf, A.M. & Bilia, D.A.C. 1998. Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. Revista Brasileira de Sementes 20(1): 184-188.

Bewley, J.D. & Black, M. 1985. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York.

Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn.. Cientifica: revista de agronomia 25(2): 379-391.

Bogatek, R., Gawronska, H. & Oracz, K. 2003. Involvement of oxidative stress and ABA in CN mediated elimination of embryonic dormancy in apple. In: Nicolas, G., Bradford, K.J., Come, D. & Pritchard, H.W. (Eds.). The Biology of Seeds: Recent Research Advances. CABI Publishing, Wallingford.

Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M. & Inze, D. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce

cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. The EMBO Journal 10(7): 1723-1732.

Brasil. 2009. Regras para análise de sementes. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. 2015. Biochemistry & Molecular Biology of plants. 2ed. American Society of Plant Physiologists, Rockville.

Castro, E.R. & Galetti, M. 2004. Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú *tupinambis merianae* (reptilia: teiidae). Pap. Avuls zool. 44(6): 91-97.

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 Braz. Arch. Biol. Technol 55(4): 583-590.

El-Maarouf-Bouteau, H. & Bailly, C. 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. Plant Signaling and Behavior 3: 175-182.

Ferreira, D.F. 2008. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium 6: 36-41.

Fontaine, O., Huault, C., Pavis, N. & Billard, J.P. 1994. Dormancy breakate of *Hordeum vulgare* seeds: effects of hydrogen peroxide and scarification on glutathione level and glutathione reductase activity. Plant Physiol. Biochem 32: 677-683.

Gressler, E., Pizo, M.A. & Morellato, P.C. 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. Revista Brasil. Bot. 29(4): 509-530.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical 219: 1-14.

Hell, A.F. 2016. Alterações metabólicas em função de variáveis ambientais e sua contribuição para a tolerância à perda de água em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.

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: 76-85.

Ishibashi,Y., Koda, Y., Zheng, S.H., Yuasa, T. & Iwaya-Inoue, M. 2013. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. Annals of Botany 111: 95-102.

ISTA. 2016. International rules for seed testing. The International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland. Disponível em: http://dx.doi.org/10.15258/istarules.2016.F (acesso em 20-VIII-2017).

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 Deckker, New York.

Kohama, S., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M. & Barbedo, C.J. 2006. Secagem de sementes de grumixama (*Eugenia brasiliensis*). Revista Brasileira de Sementes 28.

Koszo, C.R.R., Rinaldi M.C.S. & Barbedo, C.J. 2007. Germinação de sementes de *Erythrina speciosa* Andr., *Eugenia brasiliensis* Lam. e *Cucumis sativus* L. em meio ácido. Hoehnea 34(3): 271-282.

Laboriau, L.G. 1983. A germinação das sementes. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington.

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

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

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

Naredo, M.E.B., Juliano, A.B., Lu, B.R., Guzman, F.D. & Jackson, M.T. 1998. Responses to seed dormancy-breaking treatments in rice species (Oryza L.). Seed Sci. Technol. 26(3): 675-689.

Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F. & Bailly, C. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. The Plant Journal 50: 452-465.

Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F. & Bailly, C. 2009. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. Plant Physiol 150(1): 494-505.

Ogawa, K. & Iwabuchi, M. 2001. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. Plant and Cell Physiology 42: 286-291.

Pizo, M.A. 2002. The seed dispersers and fruit syndromes of Myrtaceae in Brazilian Atlantic forest. In: Levey, D.J., Silva, W.R. & Galetti, M. (eds.). Frugivores and seed dispersers ñ biodiversity and conservation perspectives. CABI Publishing, Wallingford, p.129-143.

Popinigis, F. 1985. Fisiologia da Semente. 2ed. AGIPLAN, Brasília.

Santana, D.G. & Renal, M.A. 2004. Análise de germinação: um enfoque estatístico. Universidade de Brasília, Brasília.

Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M. & Barbedo, C.J. 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). Revista Brasil. Bot. 26(2): 213-221.

Su, L., Lan, Q., Pritchard, H.W., Xue, H. & Wang, X. 2016. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds. Plant Physiology and Biochemistry 109: 406-415.

3. *CAPÍTULO 2:*

INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *EUGENIA* SPP. PELA APLICAÇÃO DE N-ACETIL-L-CISTEÍNA

3.1. INTRODUÇÃO

Ainda que muitos trabalhos venham demonstrando o papel positivo das EROs sobre a germinação das sementes, o efeito da eliminação dessas moléculas através da aplicação de antioxidantes ainda é incomum nestes estudos. Em 2013, Ishibashi e colaboradores, a fim de esclarecer melhor o papel positivo das EROs em sementes de soja, fizeram não só a aplicação de compostos indutores de EROs mas também de um composto que atua como um antioxidante nas células.

Para tanto, os autores usaram o n-acetil-l-cisteína (NAC), um precursor da glutationa que, ao ser aplicado exogenamente, reabastece os estoques deste antioxidante nos organismos (Ishibashi *et al.* 2013). A glutationa, ou um homólogo funcional de tiol, é um tripeptídeo com uma ligação peptídica entre o grupo carboxila da cadeia lateral do glutamato e a cisteína (White *et al.* 2003). A glutationa existe nos estados reduzido (GSH) e oxidado (GSSG), e é um metabólito essencial que desempenha inúmeras funções nas plantas. Entre suas funções fundamentais e reconhecidas há mais tempo, estão as interações tiol-dissulfeto, nas quais a GSH é continuamente oxidada a sua forma de dissulfeto (GSSG), que é reciclada para GSH pela glutationa redutase, dependente de NADPH (Noctor *et al.* 2012). Além disso, a glutationa protege as células animais e vegetais ao reduzir e, consequentemente, neutralizar as EROs.

Os resultados do estudo com soja mostraram que, de fato, enquanto o H_2O_2 promove a germinação das sementes, o NAC suprimi, estando relacionado à supressão da expressão de genes associados à biossíntese e produção de etileno e à diminuição do alongamento celular na ponta das raízes (Ishibashi *et al.* 2013). A aplicação de NAC parece inibir a produção de H_2O_2 no eixo embrionário após a embebição e diminuir a germinação de sementes, sendo este efeito ainda maior com o aumento de sua concentração (Ishibashi *et al* 2013).

Como a aplicação de antioxidantes em sementes ainda é pouco utilizada, usamos como base os poucos trabalhos que o fizeram (cf. Ishibashi *et al.* 2013, Su *et al.* 2016) e optamos por também usar o NAC como agente inibidor de EROs, pois seus efeitos em sementes já são parcialmente conhecidos.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de obtenção do material vegetal, determinações físicas e fisiológicas, armazenamento, secagem e fracionamento foram executadas exatamente como descritas anteriormente, no *capítulo 1*.

3.2.1. Diminuição nas concentrações de EROs

Experimento 1 (figura 25)

Sementes de *E. involucrata*, frescas e armazenadas por 60 e 120 dias, úmidas e secas, intactas e fracionadas, foram submetidas a dois tipos de incubação em NAC: (1) *incubação por 3 horas*, na qual as sementes foram colocadas em frascos de vidro e submersas em soluções de NAC de três diferentes concentrações (50 mM, 100 mM e 200 mM) e em água destilada (grupo controle). Após as 3 horas de incubação as sementes foram colocadas para germinar como descrito anteriormente; (2) *incubação contínua*, na qual as sementes foram colocadas para germinar diretamente no NAC, em papéis de germinação umedecidos com as soluções de mesmas concentrações citadas acima, além do grupo controle, umedecido apenas com água. Após as incubações temporárias e durante as incubações contínuas, as sementes foram avaliadas quanto a germinação, como descrito anteriormente. As sementes frescas submetidas a cada um dos tratamentos também foram incubadas em frascos herméticos para avaliar as mudanças das taxas respiratórias e oxidativas.

Experimento 2 (figura 26)

De posse dos dados do experimento 1, uma nova metodologia foi desenvolvida e novos experimentos foram montados com sementes frescas de *E. uniflora*, *E. brasiliensis* e, novamente, *E. involucrata*. As sementes das três espécies, úmidas e secas, intactas e fracionadas, foram submetidas apenas à *incubação temporária* por 3 horas, uma vez que a incubação contínua em NAC se mostrou muito agressiva e completamente letal nas 3 concentrações (como mostram as figuras 27, 28 e 29). As incubações temporárias foram feitas como descrito anteriormente, mas com soluções de NAC nas seguintes concentrações: 400 mM, 200 mM e 50 mM, e em água destilada. Após as incubações as sementes foram colocadas para germinar e avaliadas como descrito acima.

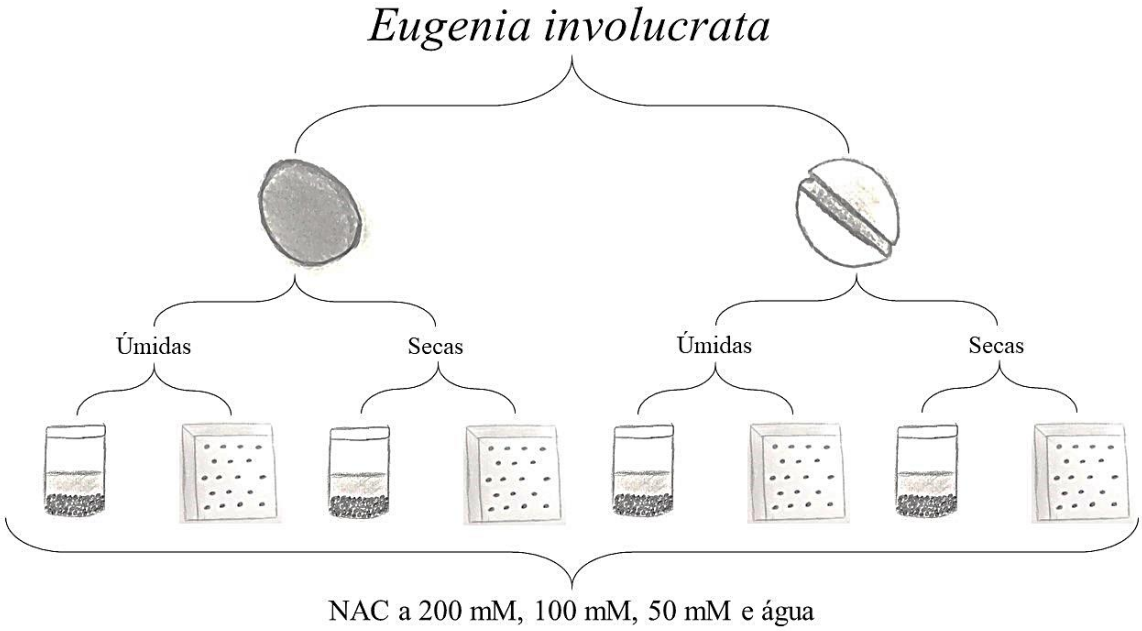


Figura 25. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata* incubadas em NAC em concentrações de 200 mM, 100 mM, 50 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de NAC dentro de frascos de vidro) e a incubações contínuas (em rolos de papel e em Gerbox com papel umedecidos com as soluções de NAC).

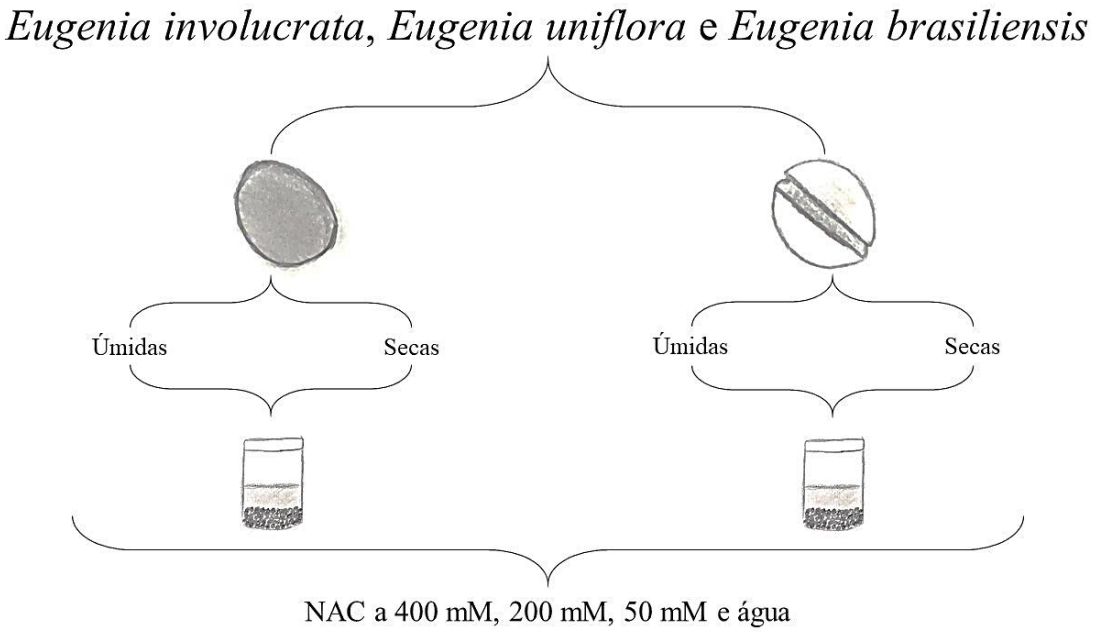


Figura 26. Esquema dos experimentos com sementes de *Eugenia involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*, incubadas em NAC em concentrações de 400 mM, 200 mM, 50 mM e em água. Sementes intactas (esquerda) e fracionadas (direita), úmidas e secas, foram submetidas a incubações por 3 horas (submersas nas soluções de NAC dentro de frascos de vidro).

3.2.2. Delineamento experimental e tratamento estatístico

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x4 (secagem x tipo de incubação x concentração do reagente) para sementes de *E. involucrata* frescas e armazenadas por 60 e 120 dias, intactas e fracionadas. Ou de 2x4 (secagem x concentração do reagente) para sementes de *E. involucrata*, *E. unfilora* e *E. brasiliensis* frescas, intactas e fracionadas. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando F foi significativo, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Ferreira 2008).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incubação contínua em NAC foi letal para as sementes de *E. involucrata* de quase todos os tratamentos e em todas as concentrações (experimento 1, figuras 27, 28 e 29).

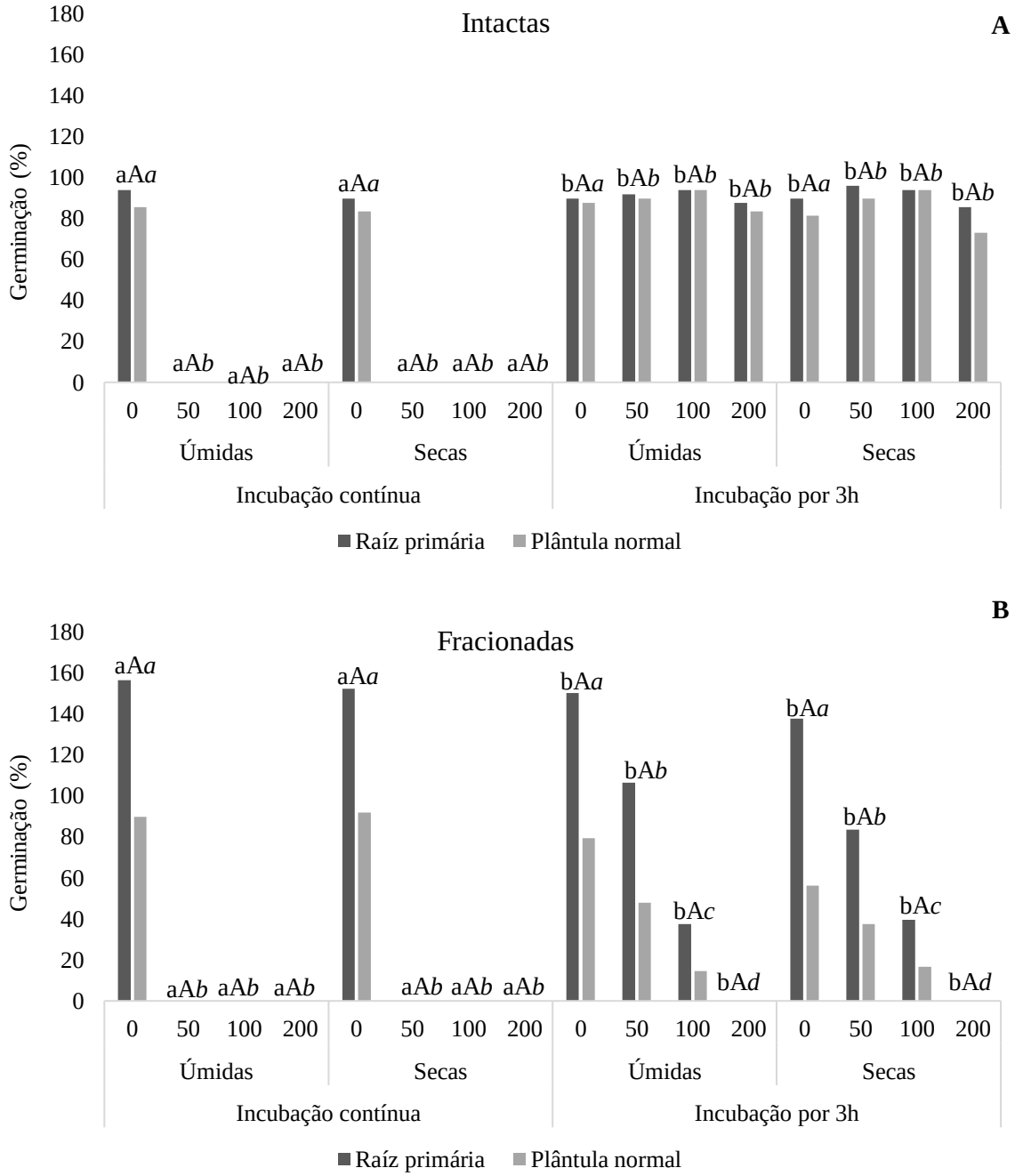


Figura 27. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes frescas de *Eugenia involucrata*, intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para secagem e itálico para concentração do reagente).

O contato permanente das sementes com as soluções deve ter potencializado os efeitos de inibição do reagente, e mesmo as concentrações mais baixas foram letais. Mas nas incubações temporárias os efeitos do NAC foram mais brandos, suprimindo progressivamente a germinação de acordo com o aumento das concentrações, e só a 200 mM que as sementes de quase todos os tratamentos tiveram sua germinação afetada.

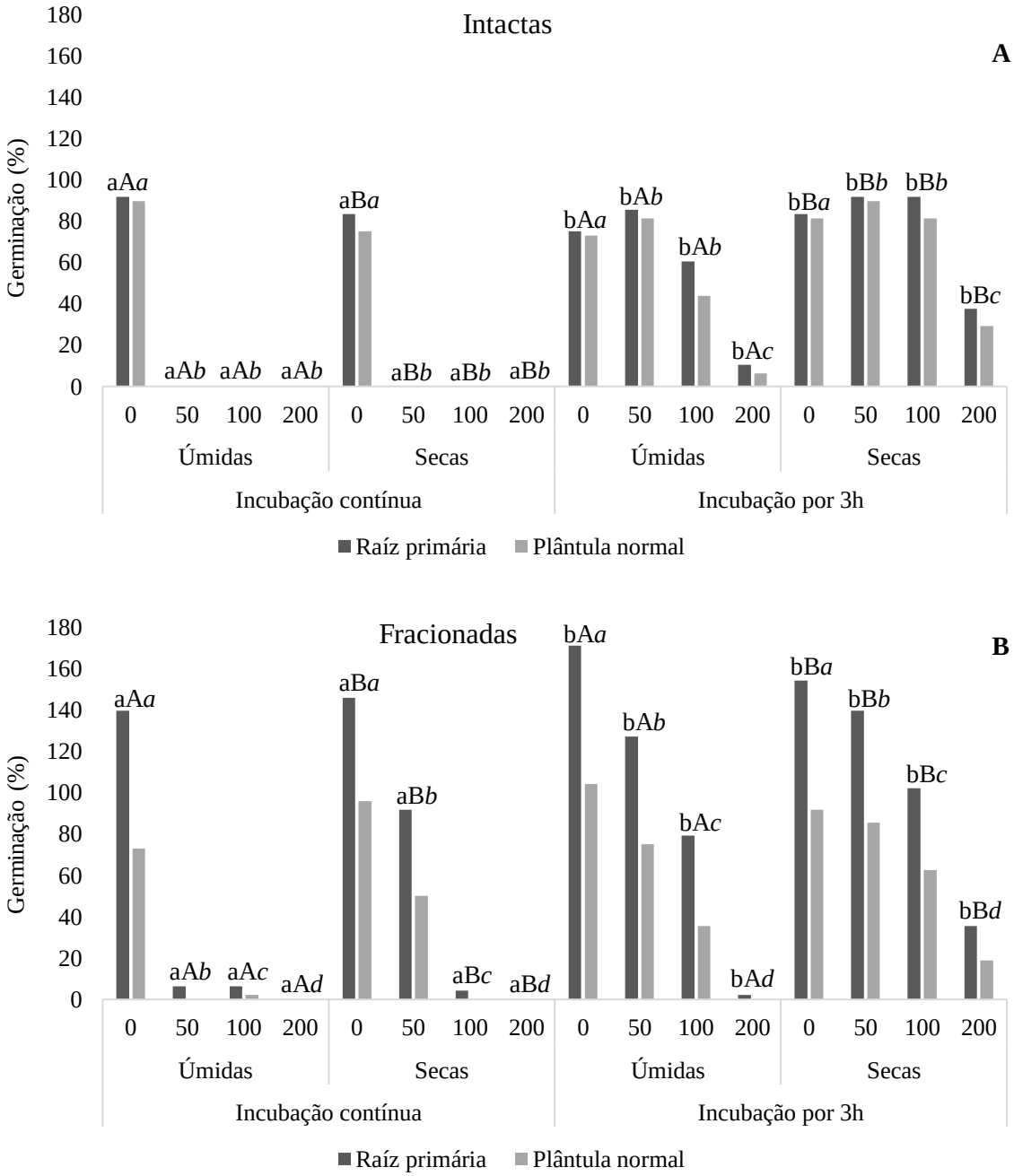


Figura 28. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas por 60 dias, intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para secagem e itálico para concentração do reagente).

Sementes fracionadas ficaram mais suscetíveis ao efeito inibitório do NAC e, mesmo nas concentrações mais baixas, tiveram a germinação afetada significativamente (figura 27B, 28B e 29B). Sementes frescas foram as menos afetadas pela pré-incubação no NAC, pois as intactas não demonstraram nenhuma perda significativa na germinação, que ficou entre 85,4% e 95,8% (figura 27).

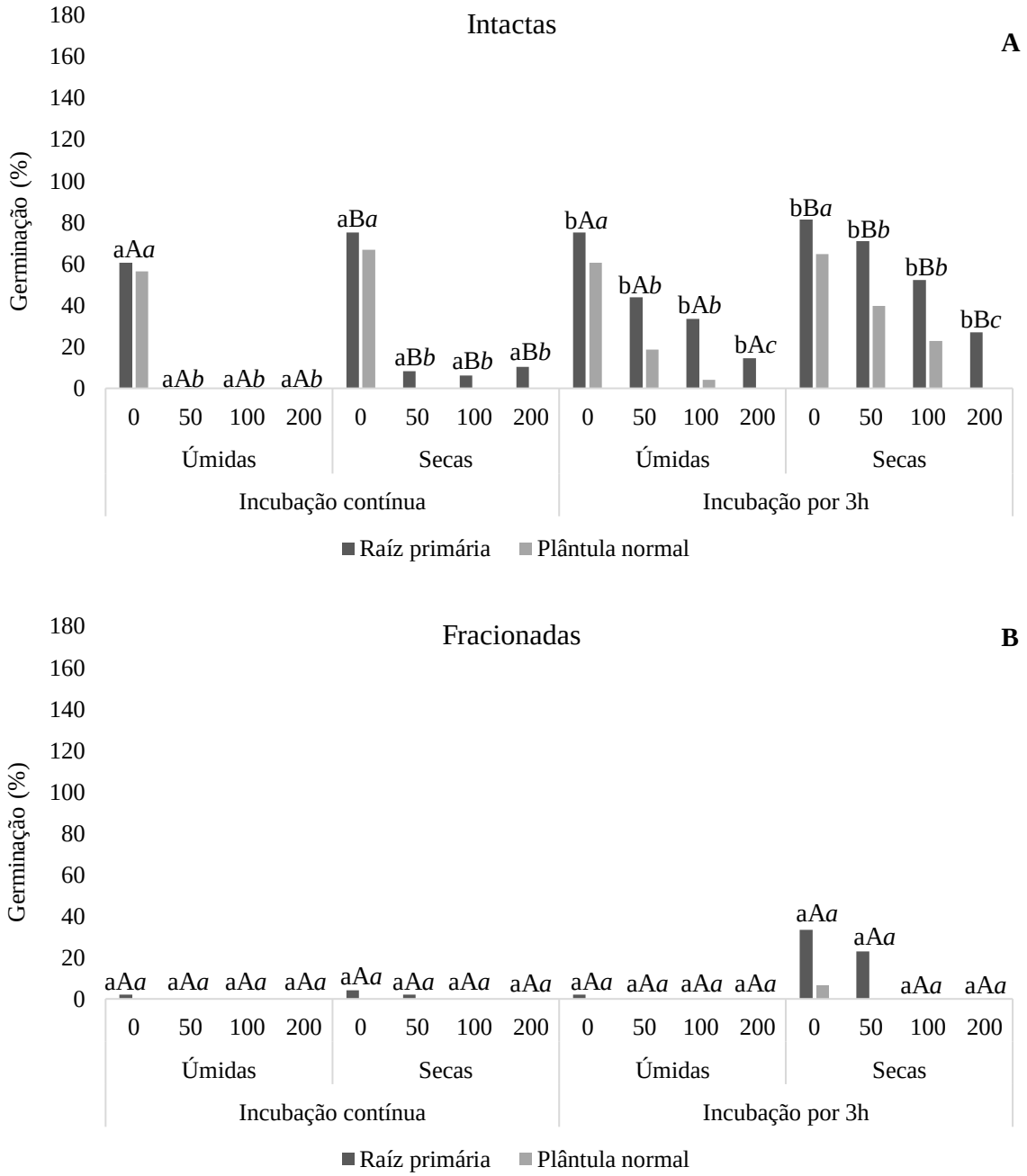


Figura 29. Germinação (emissão de raiz primária e formação de plântula normal), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas por 120 dias, intactas (A) e fracionadas (B), úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para período de incubação, maiúsculas para secagem e itálico para concentração do reagente).

Após o armazenamento por 60 dias, as sementes intactas já foram afetadas pela pré-incubação em NAC. A germinação de sementes do grupo controle (que foram incubadas em água) permaneceu em 91,7%, enquanto aquelas incubadas em soluções de 200 mM de NAC germinaram entre 10,4% e 37,5%, úmidas e secas, respectivamente (figura 28A). Com 120 dias de armazenamento, as sementes que já apresentavam uma viabilidade reduzida, com 60% de germinação inicial, foram ainda mais afetadas pela pré-incubação, diminuindo progressivamente a germinação de acordo com o aumento das concentrações do reagente (figura 29A). Quando fracionadas, as sementes armazenadas ficaram ainda mais suscetíveis a ação do NAC, e foram bastante afetadas pelo antioxidante (figuras 28B e 29B), potencializando o efeito com o aumento das concentrações.

Curiosamente, as sementes do lote de 2018, que tinham o menor valor de germinação inicial quando comparadas com os lotes de 2017 e 2019 (87%, 95% e 94%, respectivamente), apresentaram as maiores taxas de regeneração (aproximadamente 170%) e uma maior resistência aos danos causados pelo NAC quando fracionadas (figura 28B).

A incubação de sementes frescas de *E. involucrata* (figura 30), *E. uniflora* (figura 31) e *E. brasiliensis* (figura 32) por 3 horas em NAC também afetou mais as fracionadas. E mesmo com o aumento das concentrações até 400 mM, as sementes intactas das três espécies foram pouco afetadas (experimento 2).

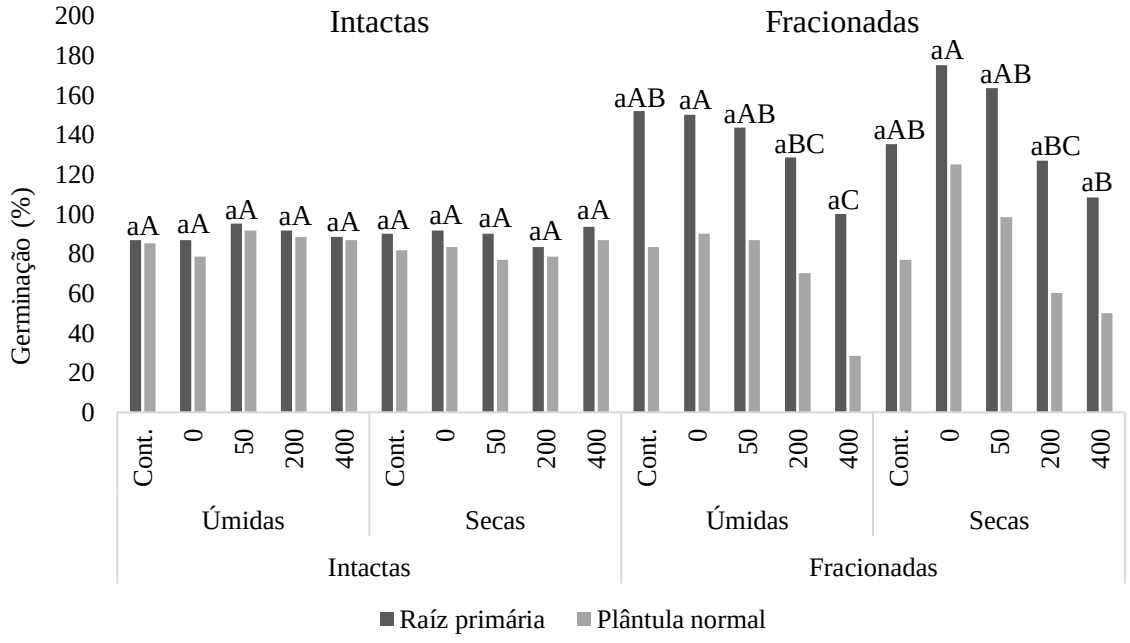


Figura 30. Sementes de *Eugenia involucrata* úmidas e secas, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 200 mM e 400 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para secagem e maiúsculas para concentração do reagente).

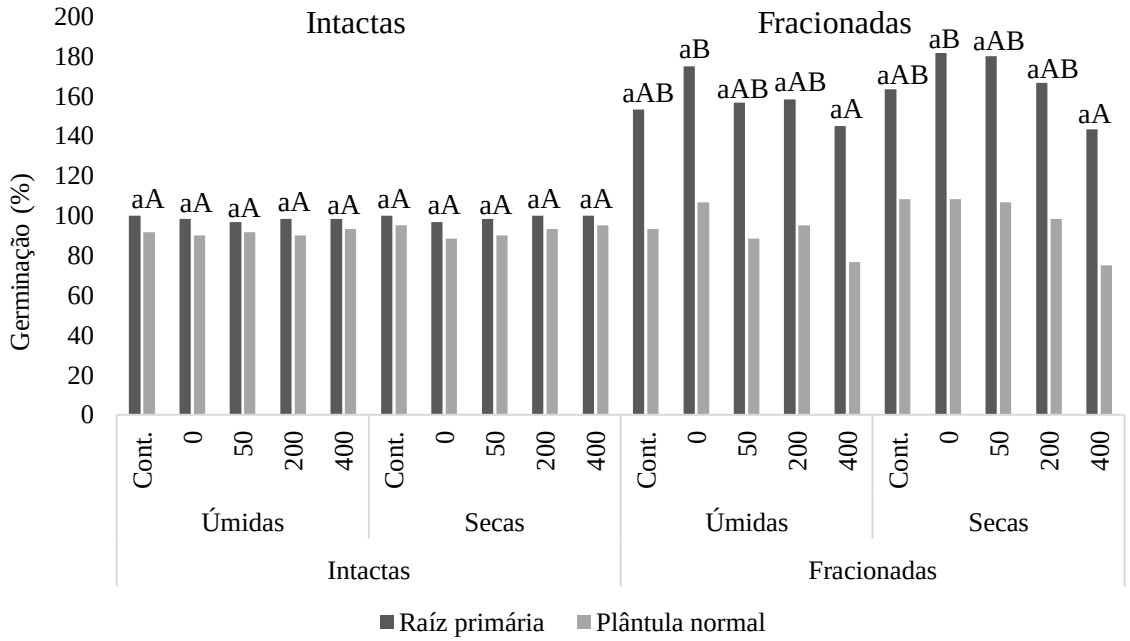


Figura 31. Sementes de *Eugenia uniflora* úmidas e secas, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 200 mM e 400 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para secagem e maiúsculas para concentração do reagente).

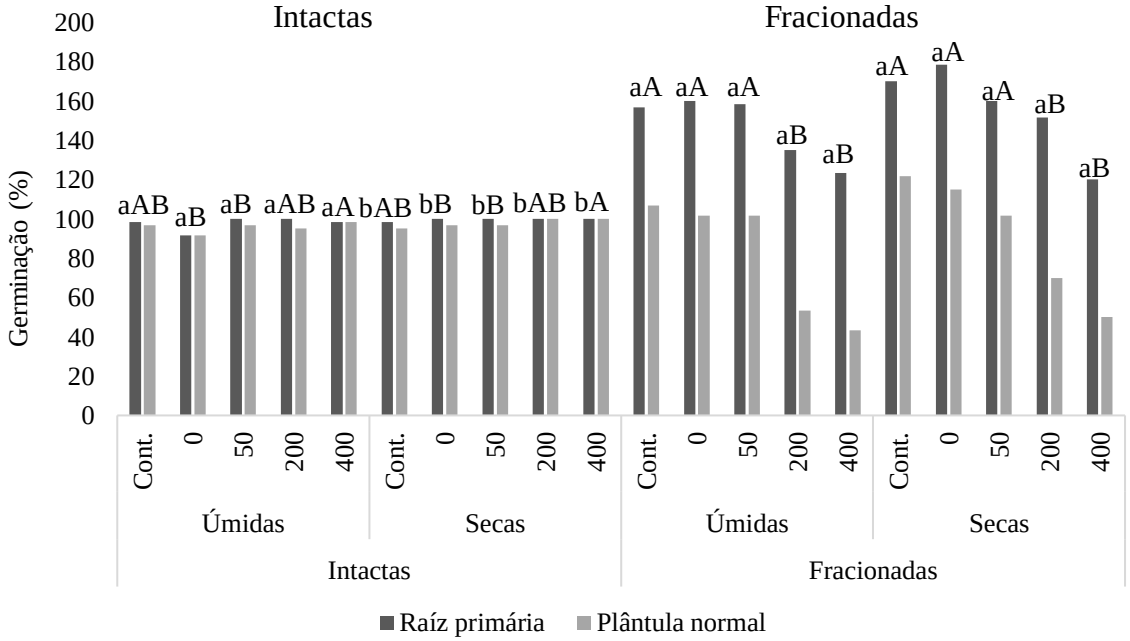


Figura 32. Sementes de *Eugenia brasiliensis* úmidas e secas, intactas (à esquerda) e fracionadas (à direita), incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 200 mM e 400 mM de NAC. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para secagem e maiúsculas para concentração do reagente).

As sementes de *E. uniflora* (figura 31) parecem ter sido menos afetadas pelo NAC, pois mantiveram as maiores taxas de regeneração e formação de plântulas em sementes fracionadas, mesmo quando incubadas a 400 mM. Essa resistência maior ao reagente pode estar relacionada ao fato de que, dentro do gênero, a espécie é uma das mais domesticadas pelo homem, e deve ter se tornado mais resistente.

Além da inibição da germinação, as sementes incubadas em NAC se mostraram mais suscetíveis à contaminação por microrganismos. Visualmente, as sementes incubadas no antioxidante parecerem bem mais contaminadas por fungos do que o grupo controle ou aquelas que foram incubadas apenas em água (figura 33).

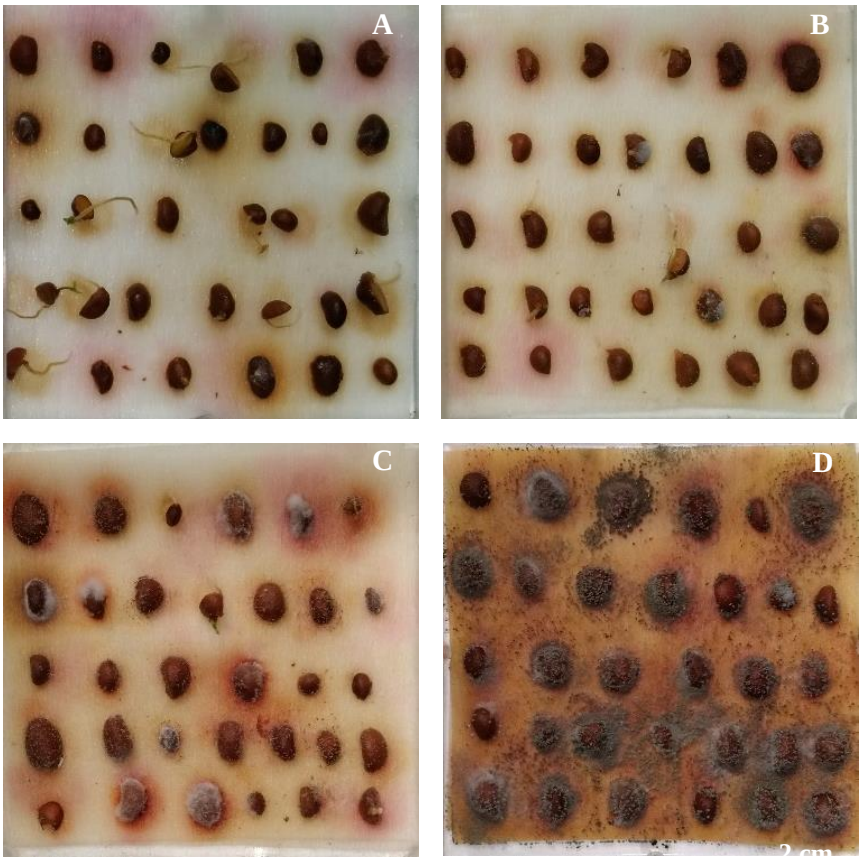


Figura 33. Testes de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* fracionadas, incubadas por 3 horas em água (A) e em soluções de 50 mM (B), 100 mM (C) e 200 mM (D) de NAC.

A incubação em NAC, além de inibir, também atrasou a germinação das sementes intactas, como observado nos gráficos de distribuição temporal de frequência da germinação (figuras 34 e 35) e pelos resultados de TMV (figura 36). É interessante observar que apesar do atraso do processo germinativo ocorrer nas sementes intactas devido ao NAC, isso não ocorreu nas sementes fracionadas. O fracionamento, que deve induzir a produção de EROs, pode ter superado o atrasado na germinação causado pelo NAC. Os efeitos de inibição do NAC já eram esperados, pois já haviam sido relatados para sementes de outras espécies (Ishibashi *et al.* 2013, Su *et al.* 2016) e os efeitos da aplicação de outras substâncias antioxidativas em sementes de *Eugenia* também (Amador 2015).

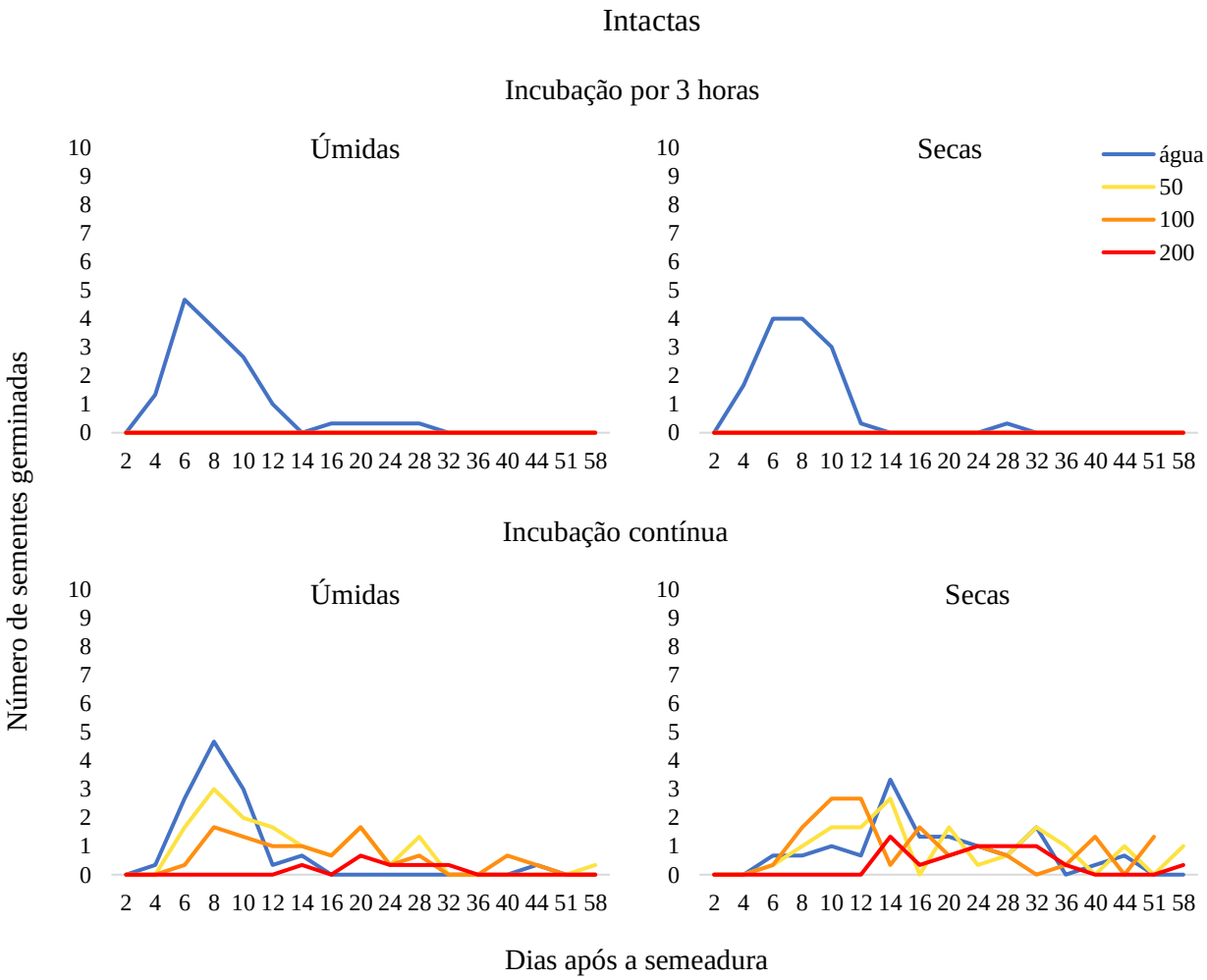


Figura 34. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes intactas de *E. involucrata* úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC.

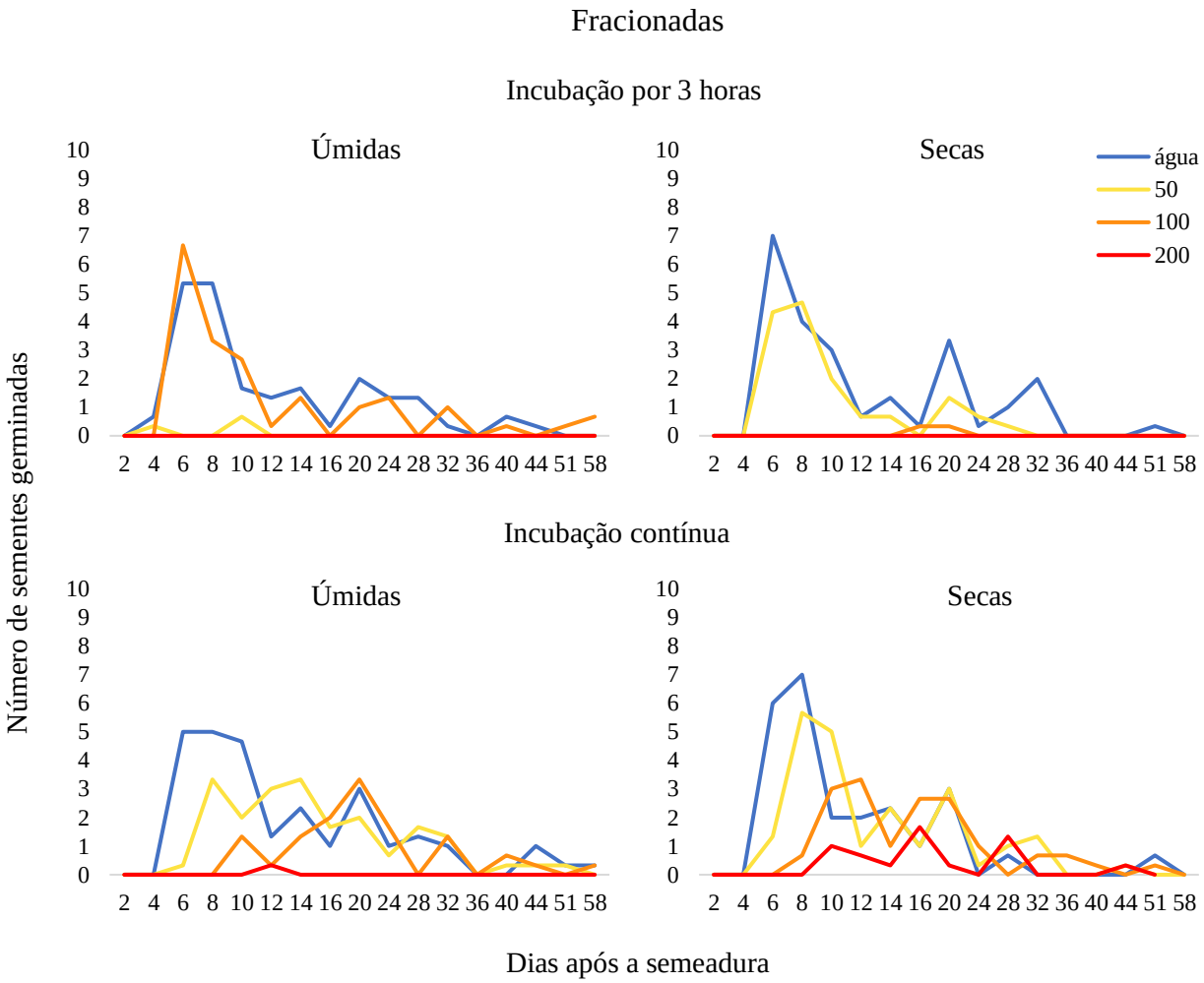


Figura 35. Distribuição temporal de frequência da germinação de sementes fracionadas de *E. involucrata* úmidas e secas, incubadas por 3 horas e continuamente em água e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC.

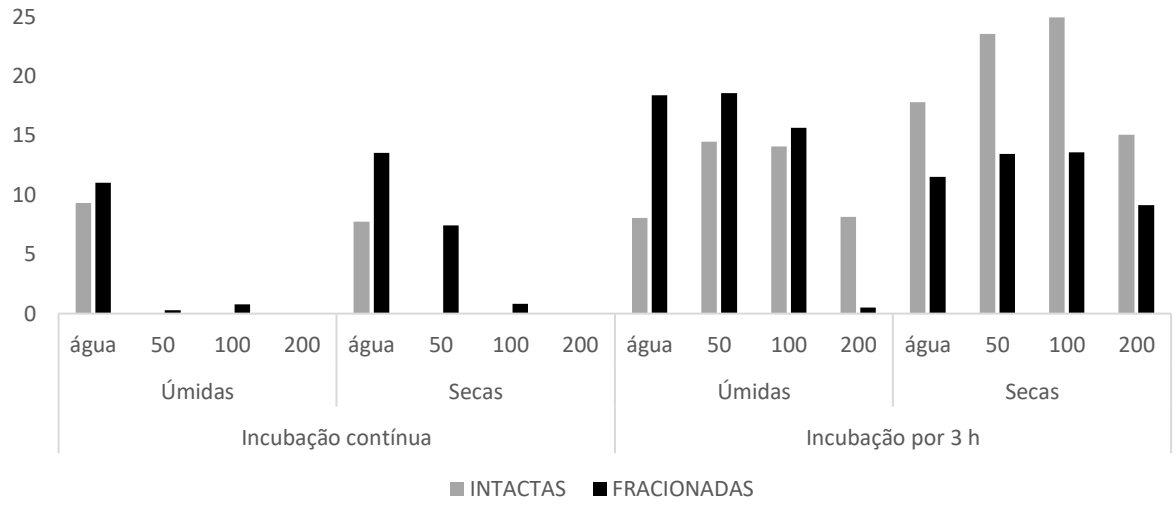


Figura 36. Tempo médio de germinação de sementes de *Eugenia involucrata* intactas (colunas cinzas) e fracionadas (colunas pretas) incubadas continuamente e por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC.

Quantificação de H_2O_2

Os tratamentos selecionados para a quantificação de H_2O_2 nas sementes incubadas em NAC estão expostos na tabela 5. Sementes intactas e fracionadas (após 3 horas de exposição ao ar) constituíram o grupo controle (INT e FRAC). Sementes intactas e fracionadas incubadas por 3 horas em água foram denominadas INT H_2O e FRAC H_2O (1). Sementes fracionadas incubadas em água, FRAC H_2O (1), foram novamente expostas ao ar por 3 horas, constituindo o grupo FRAC H_2O (2). Sementes incubadas por 3 horas no NAC constituíram os grupos INT NAC, FRAC NAC (1) e FRAC NAC (2) (para aquelas que, após a incubação, foram novamente expostas ao ar por 3 horas). Os resultados estão expressos em µmol H_2O_2/g MF (figura 37).

Tabela 5. Relação de siglas e descrições dos tratamentos utilizados para a quantificação de H_2O_2 em sementes de *Eugenia involucrata*.

SIGLA	DESCRIÇÃO DO TRATAMENTO
INT	Sementes intactas não submetidas a nenhum tratamento
FRAC	Sementes fracionadas e expostas ao ar por 3 horas
INT H_2O	Sementes intactas incubadas por 3 horas em água
FRAC H_2O (1)	Sementes fracionadas expostas ao ar por 3 horas e em seguida incubadas por 3 horas em água
FRAC H_2O (2)	Sementes fracionadas expostas ao ar por 3 horas, em seguida incubadas por 3 horas em água e posteriormente expostas ao ar por mais 3 horas
INT NAC	Sementes intactas incubadas por 3 horas em NAC a 200 mM
FRAC NAC (1)	Sementes fracionadas expostas ao ar por 3 horas e em seguida incubadas por 3 horas em NAC a 200 mM
FRAC NAC (2)	Sementes fracionadas expostas ao ar por 3 horas, em seguida incubadas por 3 horas em NAC a 200 mM e posteriormente expostas ao ar por mais 3 horas

Os resultados da quantificação de H_2O_2 sugerem que as incubações em NAC reduziram as quantidades de H_2O_2 nas sementes (figura 37). Sementes fracionadas, por exemplo, produziram mais H_2O_2 do que intactas, mesmo quando incubadas em NAC, contudo, quando expostas ao ar por mais 3 horas, parecem ter tido uma redução nas quantidades desta ERO quando comparadas com o tratamento FRAC H_2O (2). É possível que o reagente que foi absorvido pela semente tenha continuado agindo mesmo quando estas foram retiradas da incubação, diminuindo as concentrações de peróxido. É possível que a atuação do NAC nas sementes seja mais precisa e restrita, uma vez que os resultados foram mais uniformes que os resultados de incubação no MV. A secagem, por exemplo, produziu resultados mais variáveis, podendo indicar a variação do material biológico e suas diferentes respostas aos tratamentos aplicados.

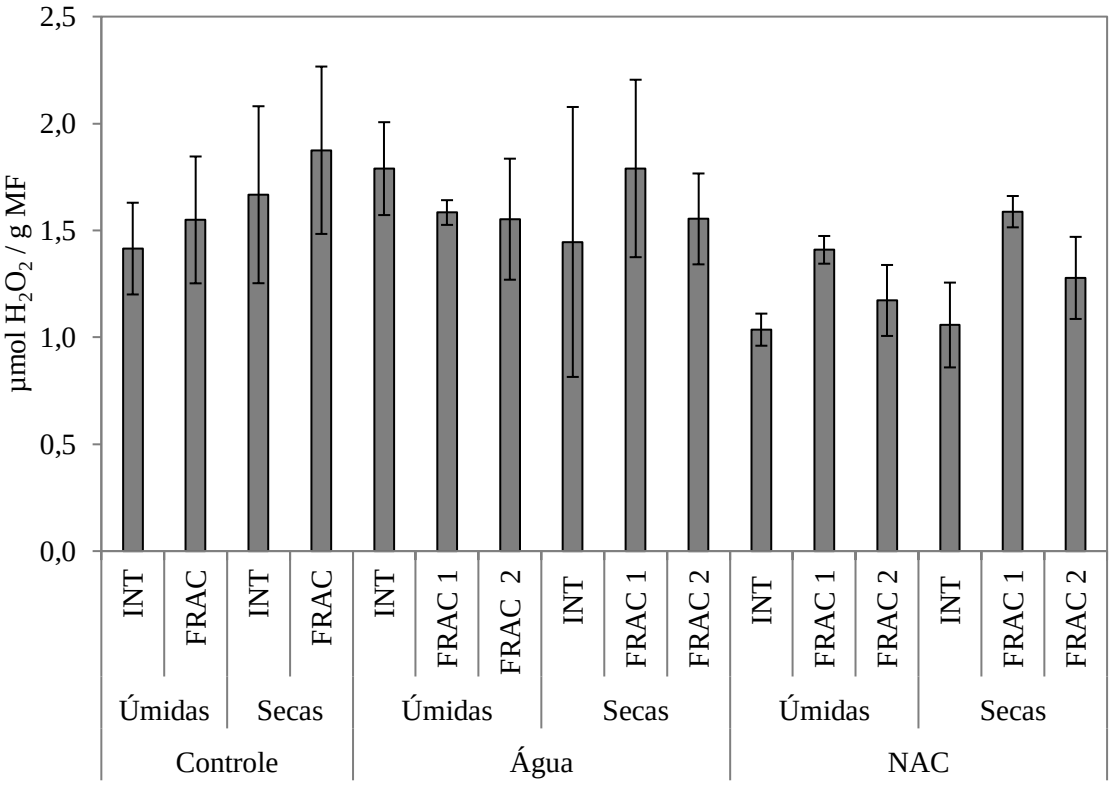


Figura 37. Quantificação de H_2O_2 (µmol H_2O_2/g MF) em sementes de *Eugenia involucrata* úmidas e secas, intactas e fracionadas, incubadas em água (0) e em soluções de 200 mM de NAC.

Respiração

A incubação das sementes em NAC também pareceu afetar sua respiração (figura 38) e, diferente dos resultados com o MV, quando comparada à água, a incubação em NAC demonstrou um aumento no consumo de O_2 e na liberação de CO_2 em sementes fracionadas. E, novamente o QR foi inferior a 1, podendo indicar que a incubação das sementes de *E. involucrata* por submersão afeta seu metabolismo respiratório e induz processos oxidativos.

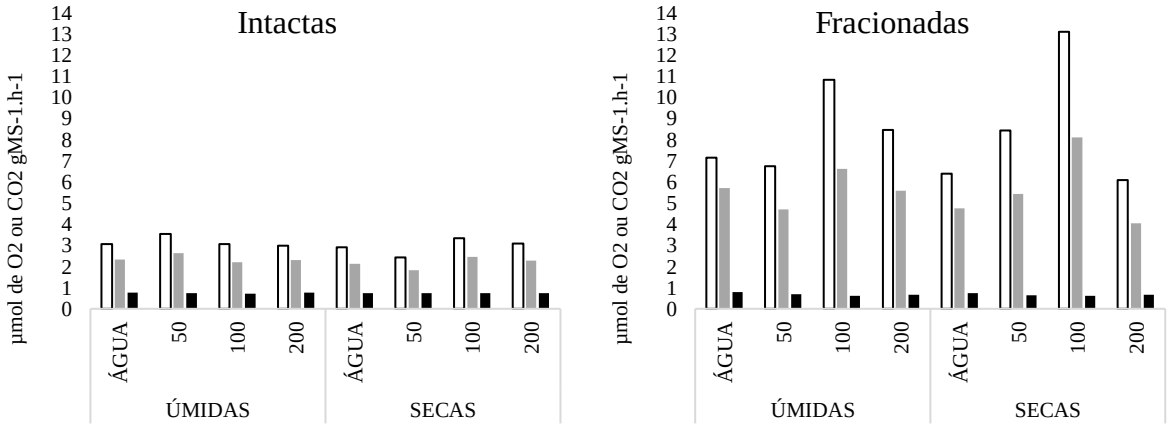


Figura 38. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia involucrata* intactas e fracionadas incubadas por 3 horas em água (0) e em soluções de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NAC. Colunas brancas representam o consumo de O_2, colunas cinzas a liberação de CO_2 e colunas pretas o QR.

De modo geral, tanto as sementes quanto suas frações colocadas para germinar em soluções de NAC, demonstraram uma evidente inibição no desenvolvimento de raízes e plântulas. As sementes intactas demonstraram uma maior resistência ao antioxidante e foram menos afetadas que as fracionadas. As sementes fracionadas não só foram afetadas pelas incubações em NAC, como tiveram sua capacidade regenerativa prejudicada, apresentando taxas de germinação abaixo ou pouco acima de 100%. Os resultados de incubação em NAC evidenciaram, de maneira indireta, que não só a germinação, como a formação de novas raízes em sementes fracionadas de *Eugenia* spp., estão ligadas a processos oxidativos, uma vez que a eliminação de EROs, através da aplicação de antioxidantes, reduziu significativamente a germinação e regeneração dessas sementes.

Ainda, os dados de respiração também forcem evidência positiva entre a germinação das sementes *E. involucrata* e a produção de EROs, uma vez que, quando incubadas em soluções de NAC, ainda que a germinação tenha sido inibida, a respiração não foi bloqueada, demonstrando seu efeito específico sobre a germinação. Estes resultados se assemelham àqueles de Moothoo-Padayachie e colaboradores (2016), nos quais sementes recalcitrantes de *A. marina* e *T. dregeana*, quando expostas a *diphenylene iodonium*, um potente inibidor da NADPH oxidase, e a *dimethylthiourea*, um eliminador de H_2O_2, a respiração das sementes não foi bloqueada, mas a germinação foi inibida.

Nas sementes de *E. involucrata* tratadas com NAC, o antioxidante também pode ter interferido na síntese de etileno, que pode não estar diretamente relacionado à germinação dessas sementes, mas à produção de novas raízes em sementes fracionadas, como resposta ao estresse e à produção de EROs no local da lesão. Dado isso, as sementes frescas intactas quase não seriam afetadas pela pré-incubação em NAC, enquanto as fracionadas perderiam gradativamente sua capacidade regenerativa à medida que as concentrações seriam aumentadas. De fato, quando fracionadas, as sementes de *Eugenia* ficaram mais suscetíveis a ação do NAC (figuras 26 a 28 e 30 a 32).

O tratamento com NAC induz a expressão de genes que atuam na sinalização de etileno (Ishibashi *et al.* 2013), enquanto tratamentos com H_2O_2 parecem aumentar significativamente a produção deste hormônio, o qual, entre outros efeitos, está relacionado ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas, incluindo a quebra da dormência de sementes de algumas espécies, a germinação e o aumento na emergência da radícula em condições desfavoráveis (Buchanan *et al.* 2015). Além disso, a síntese de etileno também é elevada pelas condições de estresse, inclusive de ferimentos mecânicos, e está envolvido no início das respostas ao estresse, como na regeneração de lesões (Taiz & Zeiger 2013).

Enquanto a produção de EROs parece reduzir os níveis de ABA nos eixos embrionários, o NAC, por sua vez, parece reverter essa inibição (Su *et al.* 2016). E, além do ABA, o ácido giberélico (GA) também desempenha um papel significativo na germinação de sementes, como na quebra de dormência e estímulo à germinação, enquanto o ABA atua de maneira oposta (Taiz & Zeiger 2013). Durante a germinação, existe uma interação (ou "*cross-talk*") entre as EROs e os hormônios vegetais. Em sementes de *Arabidopsis*, por exemplo, o conteúdo de ABA diminuiu com o aumento na biossíntese de GA após a aplicação de H_2O_2 e, consequentemente, houve um estímulo na germinação (Liu *et al.* 2010). Ainda que essa interação entre as EROs e os hormônios não seja totalmente compreendida, muitos estudos vêm demonstrando a importância de esclarecer essa relação e o papel das EROs na regulação da germinação. O *cross-talk* entre as EROs, etileno e ABA em sementes

também vem sendo estudado, mostrando que tratamentos que induzem a geração de EROs no eixo embrionário, produzem efeitos benéficos na germinação de sementes de girassol, e que o aumento na produção de EROs causada pelo MV suprime o efeito inibitório do ABA (El-Maarouf- Bouteau *et al.* 2014).

Como a concentração de 200 mM de NAC não foi completamente letal às sementes de todos os tratamentos, as doses foram aumentadas para 400 mM para os experimentos com *E. involucrata*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*, a fim de encontrar uma concentração letal para sementes frescas de *Eugenia* sob qualquer condição. Contudo, mesmo com o aumento das concentrações, as sementes intactas das três espécies foram pouco afetadas, e as sementes de *E. uniflora* parecem ter sido as mais resistentes aos efeitos do NAC, pois mantiveram as maiores taxas de regeneração e formação de plântulas em sementes fracionadas, mesmo quando incubadas a 400 mM. A exposição ao peróxido de hidrogênio pode resultar na ativação de enzimas de biossíntese de etileno e levar a um aumento no acúmulo deste hormônio, e a produção de etileno em sementes pode ser afetada pela geração ou aplicação de EROs e suprimida pela ação do NAC (Ishibashi *et al.* 2013).

Experimento final (figura 39)

A fim de comprovar o efeito inibitório do NAC sobre a germinação das sementes de *Eugenia*, um último experimento foi desenvolvido, no qual sementes intactas (armazenadas por 60 dias) de *E. involucrata* foram incubadas em soluções de 200 mM de NAC por 3 horas e colocas para germinar. Após três dias (tempo aproximado do início da germinação de sementes de *E. involucrata*), as sementes foram fracionadas (e mantidas intactas) e divididas em três grupos: (1) foram novamente incubadas por 3 horas em NAC e em seguida coladas de volta para germinar em água; (2) foram incubadas por 3 horas em MV e em seguida coladas de volta para geminar em água; (3) foram incubadas por 3 horas em água e em seguida coladas para geminar. Foi mantido um grupo controle, no qual sementes intactas e fracionadas foram coladas para germinar em água e permaneceram até o fim o experimento.

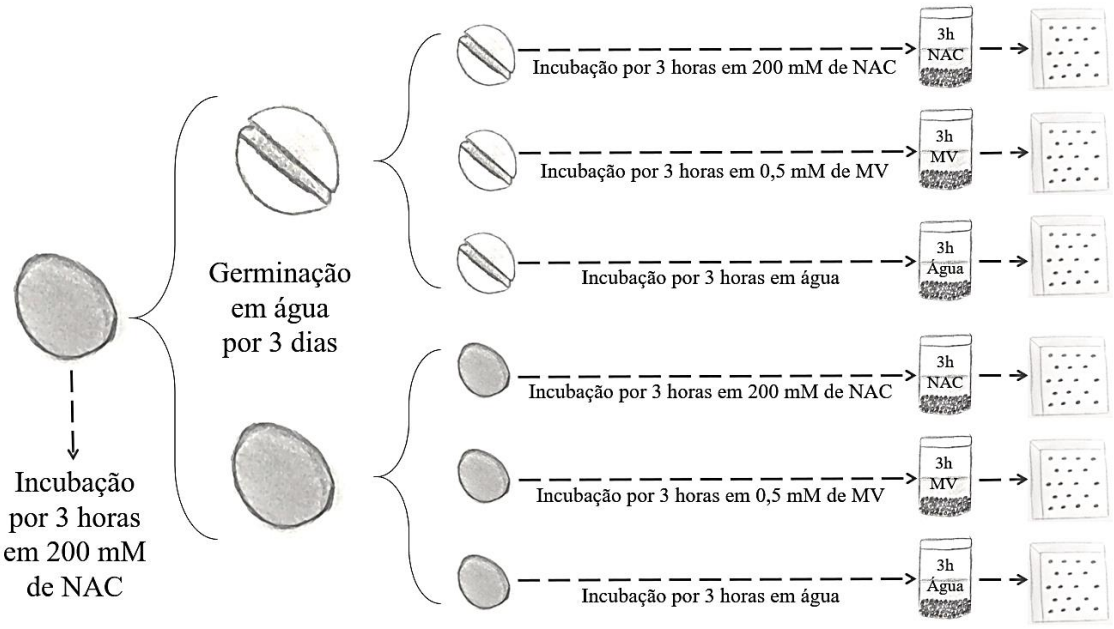


Figura 39. Esquema do experimento com sementes de *Eugenia involucrata* pré-incubadas por 3 horas em NAC (200 mM) e submetidas a novos tratamentos de incubação em NAC (200 mM), MV (0,5 mM) e água.

As sementes que foram novamente incubadas em NAC (1) demonstraram taxas de germinação extremamente baixas, enquanto aquelas que passaram pela incubação em MV (2) ou em água (3), tiveram suas taxas de germinação elevadas a taxas próximas do grupo controle (tabela 6).

Tabela 6. Germinação (G) e formação de plântula normal (PN), em porcentagem, de sementes de *Eugenia involucrata* pré-incubadas por 3 horas em NAC (200 mM) e submetidas a novos tratamentos de incubação em NAC (200 mM), MV (0,5 mM) e água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (minúsculas para corte e maiúsculas para incubação).

(%)	**Intactas**				**Fracionadas**			
	Cont.	**NAC**	**MV**	**Água**	**Cont.**	**NAC**	**MV**	**Água**
G	85,4 aA	56,2 aB	85,4 aC	89,6 aC	152,1 bA	4,2 bB	37,5 bC	47,9 bC
PN	77,1 aA	37,5 aB	79, 2 aC	87,5 aC	93,7 bA	4,2 bB	22,9 bC	31,2 bC

Os resultados evidenciam a inibição da germinação causada pelo NAC, que foi superada nos grupos que, posteriormente, passaram pelas incubações em MV ou em água. As novas incubações em MV e em água devem ter produzido EROs em quantidades suficientes para superar a inibição causada pelo NAC. Além disso, experimentos anteriores mostraram que sementes intactas de *E. involucrata*, também armazenadas por 60 dias e incubadas por 3 horas em 0,5 mM de MV (figura 13) germinaram apenas 39,5%, enquanto estas que passaram primeiro pela incubação em NAC e só depois pelo MV, germinaram 85,4%. Estes dados sugerem que a indução da germinação em sementes de *Eugenia* está relacionada com a produção de EROs, mas dentro de uma estreita janela oxidativa, como proposto por Bailly & El-Maarouf-Bouteau (2008), e a produção de EROs em quantidades acima ou abaixo do necessário, levam ao estresse oxidativo ou não são suficientes para causar efeitos positivos sobre a germinação.

A produção de etileno em resposta a geração de EROs está ligada à germinação de sementes, e a primeira resposta ao etileno durante a germinação, é o estímulo à expansão radicular (Kucera *et al.* 2005, Ishibashi *et al.* 2013). Portanto, as incubações em NAC podem ter levado à supressão do etileno e, consequentemente, à inibição da germinação, principalmente em sementes fracionadas, que seriam mais dependentes deste processo. Enquanto as reincubações em MV e em água (experimento final) podem ter reposto as EROs eliminadas pelo NAC e, consequentemente, os estoques de etileno.

3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amador, T. S. 2015. Estudos fitoquímicos e fisiologicos dos processos de indução e inibição da regeneração de plântulas de sementes de *Eugenia*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. 2015. Biochemistry & Molecular Biology of plants. 2ed. American Society of Plant Physiologists, Rockville.

El-Maarouf-Bouteau, H. & Bailly, C. 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. Plant Signaling and Behavior 3: 175-182.

El-Maarouf-Bouteau, H., Sajjad, Y., Bazin, J., Langlade, N., Cristescu, S.M., Balzergue, S., Baudouin, E. & Bailly, C. 2014. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. Plant Cell Environ 38(2): 364-374.

Ferreira, D.F. 2008. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium 6: 36-41.

Ishibashi, Y., Koda, Y., Zheng, S.H., Yuasa, T. & Iwaya-Inoue, M. 2013. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. Annals of Botany 111: 95-102.

Kucera, B., Cohn, M.A. & Leubner-Metzger, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research 15: 281–307.

Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M. & Zhang, J. 2010. H_2O_2 mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. J. Exp. Bot. 61(11): 2979-2990.

Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. & Foyer, C.H. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. Plant, Cell and Environment 35: 454–484.

Su, L., Lan, Q., Pritchard, H.W., Xue, H. & Wang, X. 2016. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds. Plant Physiology and Biochemistry 109: 406-415.

Taiz, L & Zaiger, E. 2013. Fisiologia vegetal. 5ed. Artmed, Porto Alegre.

White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D. & Kavanagh, T.J. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. Analytical Biochemistry 318(2): 175–80.

4. DISCUSSÃO GERAL

Ainda que os resultados com MV não tenham demonstrado qualquer efeito positivo sobre a germinação dessas sementes, a inibição causada pelo NAC reforça a ideia de que existe uma relação positiva entre a geração de EROs e a germinação de sementes de *Eugenia*, pois as incubações das sementes de *E. involucrata* em NAC suprimiram progressivamente sua germinação de acordo com o aumento das concentrações. As incubações contínuas chegaram a ser letais para todas as sementes, mesmo nas concentrações mais baixas, sugerindo que o NAC não perde seu efeito a curto prazo e que continua agindo ao longo do tempo, de modo que o contato permanente das sementes com as soluções potencializou seu efeito inibitório, tornando letal a permanência sua permanência em qualquer uma das concentrações utilizadas. E, ainda que os efeitos tenham sido menos severos na incubação temporária, a germinação também foi progressivamente suprimida de acordo com o aumento das concentrações.

Contudo, poucos trabalhos têm sido feitos buscando entender os efeitos das EROs propriamente ditas em sementes recalcitrantes (e.g. Roach *et al.* 2010, Varghese *et al.* 2011, Moothoo-Padayachie 2016). Mas a relação entre a inibição da germinação de sementes recalcitrantes e os antioxidantes já foi estudada por Amador (2015), para sementes de *Eugenia*. Tendo em vista que as lesões nessas sementes expõem partes internas ao ar, induzindo a formação de EROs e desencadeando processos oxidativos, é possível que a formação de EROs esteja associada à indução de novas raízes e plântulas em sementes de *Eugenia*, e o rápido escurecimento da superfície lesionada exposta ao ar pode ser resultado da ação da polifenoloxidase, que oxida os compostos fenólicos e produz substâncias escuras, resultando na formação de EROs (Amador 2015).

O trabalho de Amador (2015) buscou verificar se sementes fracionadas de *Eugenia* submetidas a aplicações exógenas de ácido ascórbico (AA) e polivinilpirrolidona (PVP), mantinham sua capacidade de produzir raízes. O ascorbato é a forma biologicamente ativa da vitamina C, considerada uma das principais substâncias fitoquímicas com propriedades antioxidantes, e é extremamente importante na intercepção dos radicais livres oriundos de processos oxidativos (Kitts 1997). O AA é a forma não ionizada do ascorbato, já o PVP é capaz de adsorver substâncias fenólicas e seus produtos da oxidação (Teixeira 2004). Sementes e frações de sementes de *E. cerasiflora* colocadas para germinar em soluções de PVP demonstraram uma evidente inibição no desenvolvimento das plântulas (Amador 2015). Sementes inteiras e fracionadas de *E. brasiliensis* imersas nas soluções de AA e PVP (a fim de se evitar o contato com o ar e a possível formação de EROs) também demonstraram que a formação de novas raízes depende de processos oxidativos, uma vez que estes causaram grande redução na germinação (Amador 2015). A princípio, a aplicação do AA foi

letal para as sementes, sugerindo que as concentrações utilizadas tenham sido muito elevadas. Mas reajustes nas concentrações evidenciaram os efeitos da oxidação sobre a produção de raízes em sementes de *E. uniflora*, pois a aplicação de AA foi diminuindo a porcentagem de germinação de acordo com o aumento da concentração.

Os resultados da aplicação de AA e PVP são semelhantes àqueles da aplicação do NAC, e aumentos nas concentrações também aumentaram o efeito inibitório sobre a germinação. A aplicação do PVP suprimiu substancialmente a formação de raízes em sementes de *E. brasiliensis*, que caiu de 70% para menos de 20% (Amador 2015). Ao inibir os processos oxidativos em sementes de *Eugenia*, principalmente *E. uniflora*, que passaram por algum tipo de lesão (como o fracionamento), é provável que a sinalização dos hormônios envolvidos na germinação também tenha sido inibida, uma vez que sementes fracionadas e tratadas com AA não tiveram sua capacidade regenerativa destacada (Amador 2015). Novamente, a germinação e a formação de novas raízes em sementes intactas e fracionadas de *Eugenia*, se mostram dependentes de processos oxidativos, principalmente aqueles que ocorrem na superfície das sementes fracionadas.

Existem outras evidências indiretas da influência das EROs no processo germinativo de sementes de *Eugenia*. Já foi demonstrado, por exemplo, a existência de mecanismos de autorregulação que controlam a germinação nessas sementes, produzindo substâncias que inibem novas germinações assim que a primeira se inicia. Extratos de *E. uniflora* se mostraram potencialmente inibidores, inibindo a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de alface e de feijão (Delgado & Barbedo 2011). Quando fracionadas, a produção de novas raízes em sementes de *E. pyriformis* que já haviam germinado foi inferior àquelas não-germinadas, e houve também um atraso no início da emissão de novas raízes nas sementes germinadas (Amador & Barbedo 2011). Quando sementes não-germinadas foram apenas fissuradas (incisão parcial), os valores de formação de raízes foram superiores a 1,0, mas nas sementes germinadas isso não aconteceu, evidenciando a existência de processos de inibição do desenvolvimento de novas raízes e, ao mesmo tempo, o estímulo causado pelo corte (Amador & Barbedo 2011). Quando sementes de *E. uniflora* e *E. brasiliensis* que haviam sido apenas fissuradas, foram completamente fracionadas, com a total separação das metades, as frações opostas àquelas com protrusão radicular formaram uma nova raiz em 28% a 75 %, enquanto as sementes que foram mantidas apenas fissuradas nunca produziram mudas ou raízes na outra metade (Amador & Barbedo 2015). Outro aspecto interessante é que sementes de *E. uniflora* que foram fracionadas parcialmente apresentaram taxas de germinação maiores do que as sementes intactas (i.e., grupo controle que não passou por nenhum tipo de corte), sugerindo

que a fissura tenha induzido a diferenciação de tecidos que produzem raízes e mudas, uma vez que as sementes intactas apenas emitiriam a raiz primária (Amador & Barbedo 2015).

Esse autocontrole da germinação mostra-se intimamente relacionado às EROs, pois ao analisar os materiais vegetais provenientes de sementes de *Eugenia*, o composto majoritário encontrado, que parece estar relacionado à inibição de novas raízes, foi o ácido elágico, que tem recebido muita atenção por seu potencial nutricional e farmacológico, em especial sua atividade antioxidante e antiviral (Amador 2015). Além disso, o ácido elágico, é considerado um antioxidante fenólico, que auxilia a resposta antioxidante da célula, atuando como modulador redox na eliminação de radicais livres (Vattem & Shetty 2005). O segundo composto em evidência foi o ácido gálico (Amador 2015), que também exibe uma ampla variedade de funções biológicas, em especial sua atividade antioxidante primária (Fiuza *et al.* 2004). Essas análises indicam que as substâncias envolvidas na inibição de uma segunda raiz em sementes de *Eugenia* são o ácido elágico e o ácido gálico, pois esses compostos atuam na atividade enzimática que disponibiliza energia para iniciar a germinação (Amador 2015). Tanto o ácido gálico quanto o elágico são conhecidos na literatura como inibidores seletivos da atividade da α-glucosidase. A α-glucosidase converte o amido em maltose, sendo muito importante para o início do processo germinativo, e sua inibição poderia inibir novas germinações (Amador 2015). Além disso, os flavonoides, que são fenóis como os ácidos gálico e elágico, são conhecidos como poderosos antioxidantes, e parecem atuar primeiramente como inibidores da germinação e do sistema de transferência de energia dentro da célula (Amador 2015).

Finalmente, ainda que essas sementes demonstrem a capacidade de germinar e se regenerar já nos primeiros estágios de desenvolvimento (Teixeira & Barbedo 2012), não há registros de germinação dessas sementes dentro do próprio fruto, como acontece com sementes de outras espécies recalcitrantes e germináveis ainda imaturas (Bonjovani & Baarbedo 2014). Logo, é provável que os inibidores também estejam presentes nos frutos, impedindo a germinação dentro destes. Extratos da polpa de frutos de *Eugenia* sempre apresentaram ácido elágico em sua composição, e demonstram que antioxidantes são responsáveis pela inibição da germinação enquanto a semente ainda está no fruto (Amador 2015). A polpa de *E. brasiliensis* apresenta capacidade inibitória contra alguns microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* devido à presença de compostos fenólicos, que contribuem para a capacidade antioxidante desse fruto (Zola *et al.* 2019). A polpa de frutos de *E. uniflora* também é rica em diversos compostos com atividade antioxidante, como licopeno, β criptoxantina e β-caroteno, compostos fenólicos e antocianinas (Bagerri *et al.* 2011). Diversos trabalhos também

revelam o potencial antioxidante da polpa de frutos de *Eugenia*, em *E. stipitata* (Garzon *et al.* 2012, Neri-Numa *et al.* 2013), *E. uniflora* (Celli *et al.* 2011), *E. involucrata* (Nicácio *et al.* 2017), *E. jambolana* (Sultana *et al.* 2007).

Portanto, se considerarmos que as sementes de *Eugenia* já estão prontas para germinar logo no início de seu desenvolvimento, uma vez que possuem quantidades de água suficientes e estão em um *continuum* de maturação-germinação, com o metabolismo completamente ativo em todas as etapas, e que as EROs desempenham papel fundamental na sua germinação, a planta-mãe deve controlar essa germinação de alguma forma. Este controle pode ser desempenhado pelas substâncias antioxidantivas contidas nos frutos, resultado de uma complexa relação entre as EROs e os hormônios relacionados à germinação. Quando o fruto é disperso e a semente extraída, a redução do contato da semente com os antioxidantes da polpa deve permitir um aumento no acúmulo de EROs decorrente da própria respiração, dando início à germinação, uma vez que, a princípio, a água disponível no ambiente não representa um fator limitante para essas sementes, pois sua quantidade interna é suficiente para permitir o início do próprio processo germinativo.

Em síntese, as EROs e os sistemas antioxidativos, que desempenham diversos papéis importantes sobre a vida das sementes, parecem atuar com a mesma intensidade na fisiologia de sementes de *Eugenia*, ainda que neste caso essas relações sejam pouco conhecidas. A quantificação peróxido de hidrogênio demonstrou, por exemplo, que sementes fracionadas produziram mais H_2O_2 do que as intactas, mesmo quando incubadas em NAC. Os dados de respiração também forcem evidências positivas sobre a relação entre a germinação das sementes *E. involucrata* e a produção de EROs, uma vez que, quando incubadas em soluções de NAC, ainda que a germinação tenha sido inibida, a respiração não foi bloqueada, mostrando seu efeito específico sobre a germinação. O último experimento com NAC também mostra, além da inibição causada pelo antioxidante, que a reincubação em MV ou em água (dois processos que parecem produzir EROs) pode reverter o efeito inibitório do antioxidante.

Diferente das sementes ortodoxas, nas quais os níveis de ascorbato tornam-se mínimos ou ausentes ao final da maturação, em sementes recalcitrantes os níveis do antioxidante mantêm-se elevados após a dispersão (Tommasi *et al.* 1999). Tendo em vista que o metabolismo dessas sementes se mantém alto ao longo de todo o processo desenvolvimento-germinação, levando à constante formação de EROs, é provável que um eficiente sistema antioxidativo seja necessário para controlar os processos oxidativos a níveis benéficos. Além disso, os tratamentos com NAC também parecem ter prejudicado a proteção dessas sementes contra microrganismos, pois quando tratadas com este reagente elas ficaram

visualmente mais contaminadas por fungos do que o grupo controle, e a intensidade das contaminações parece aumentar junto com as concentrações. De fato, a liberação de EROs já é considerada uma reação de defesa contra a infecção por microrganismos (Schopfer *et al.* 2001), e o H_2O_2 pode ser diretamente tóxico aos patógenos (Buchanan 2015). A secagem das sementes, por outro lado, parece ter resultado em um leve efeito positivo sobre a germinação. Principalmente naquelas incubadas em NAC, a secagem demonstrou taxas de germinação ligeiramente mais elevadas. Talvez uma breve secagem torne as sementes menos susceptíveis ao ataque por patógenos, ou a geração de EROs, em níveis baixos, causada pela secagem, seja benéfica para a germinação.

Nossos experimentos forneceram evidências indiretas da atuação das EROs sobre a germinação dessas sementes, ainda que os resultados não tenham sido constantes nos diferentes lotes e condições. Muitos fatores podem ser responsáveis pelas variações comportamentais em indivíduos de uma mesma espécie ou grupo. Durante seu desenvolvimento, as condições ambientais interferem ativamente em inúmeras características da semente, e ainda que, geneticamente, sementes de uma mesma espécie sejam muito semelhantes, fenotipicamente elas podem apresentar comportamentos bastante variados, principalmente quando pertencem a lotes e/ou períodos diferentes (Barbedo 2018). Tão importante quanto as condições ambientais é o estádio de maturação da semente, que exerce influência sobre seus diversos aspectos fisiológicos (Barbedo 2018).

Ainda assim, em todos os grupos, pelo menos em algum nível, houve uma inibição causada pela aplicação do antioxidante, indicando que alguma característica genética do gênero estabelece relações com as EROs. Evidentemente, os complexos caminhos metabólicos das plantas, especialmente das sementes, dificultam seu entendimento completo, e embora tenha se descoberto indicações de que EROs desempenhem diversos papéis sobre a germinação de sementes de *Eugenia*, há um longo caminho para se percorrer e desvendar os pormenores envolvidos nessa relação.

5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DA DISCUSSÃO GERAL

Abe, L.T., Lajolo, F.M. & Genovese, M.I. 2012. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). Journal of the Science of Food and Agriculture 92: 1679-1687.

Ahmad, P. 2014. Oxidative damage to plants: Antioxidant networks and signaling. San Diego: Elsevier.

Ahmad, P., Sarwat, M. & Sharma, S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. Journal of Plant Biology 5: 167-173.

Airaki, M., Leterrier, M., Valderrama, R., Chaki, M., Begara-Morales, J.B., Barroso, J.B., Del-Río, L.A., Palma, J.M. & Corpas, F.J. 2015. Spatial and temporal regulation of the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species during the early development of pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. Annals of Botany 116: 679-693.

Alonso, C.R. & Barbedo, C.J. 2020. Germinações sucessivas em sementes de *Eugenia* spp. Hoehnea 47: e412019.

Alonso, C.R., Asperti, L.M., Guardia, M.C. & Barbedo, C.J. 2019. Cutting and regeneration of roots and seedlings from seeds of *Eugenia candolleana* DC. at different maturity stages. Journal of Seed Sciences 41: 160-167.

Amador, T.S. 2015. Estudos fitoquímicos e fisiologicos dos processos de indução e inibição da regeneração de plântulas de sementes de *Eugenia*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

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.

Amador, T.S. & Barbedo, C.J. 2015. Germination inhibits the growth of new roots and seedlings in *Eugenia unifora* and *Eugenia brasiliensis*. Journal of Seed Science 37: 241-247.

Andrade, R.N.B. & Ferreira, A.G. 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes 22: 118-125.

Anderson, L.S. & Mansfield, T.A. 1979. The effect of nitric oxide pollution on growth of tomato. Environmental Pollution 20: 113-121.

Anjos, A.M.G. & Ferraz, I.D.K. 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Acta Amazonica 29: 337-348.

Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

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.

Arrigoni, O., De Gara L., Tommasi F. & Liso R. 1992. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. Plant Physiology 99: 235-238.

Asomaning, J.M., Olympio, N.S. & Sacande, M. 2011. Desiccation sensitivity and germination of recalcitrant *Garcinia kola* Heckel seeds. Research Journal of Seed Science 4: 15-27.

Atkins, P. & Jones, L. 2012. Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5ed. Bookman, Porto Alegre.

Bagerri, M., Facco, E.M.P., Piccolo, J., Hirsch, G.E., Rodriguez-Amaya, D., Kobori, C.N., Vizzotto, M. & Emanuelli, T. 2011. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). Ciênc. Tecnol. Aliment. 31(1): 147-154.

Bailey-Serres, J. & Mittler, R. 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. Plant Physiology 141: 311.

Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research 14: 93-107.

Bailly, C. 2019. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. Biochemical Journal 476: 3019-3032.

Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. & Côme, D. 1998. Free radical scavenging as affected by accelerated aging and subsequent priming in sunflower seeds. Physiologia Plantarum 104: 646-652.

Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. & Corbineau, F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. Comptes Rendus Biologies 331: 806-814.

Bailly, C. & Kranner, I. 2011. Analyses of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Relation to Seed Longevity and Germination. In: Kermode, A.R. Seed Dormancy: Methods and Protocols. Springer, London.

Barba-Espin G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M.J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., Pérez-Alfocea, F. & Hernández, J. A. 2010. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. Plant Cell and Environment 33: 981-994.

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.

Barroso, G. M.; Morim, M. P.; Peixoto, A. L. & Ichaso, C. L. F. 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Editora UFV, Viçosa.

Bartosz, G. 1997. Oxidative stress in plants. Acta Physiologiae Plantarum 19(1): 47-64.

Beech, E., Rivers, M., Oldfield, S. & Smith, P.P. 2017. GlobaTreeSearch: the first complete global database of tree species and country distributions. Journal of Sustainable Forestry 36: 454–489.

Benson, E.E. 1990. Free radical damage in stored plant germplasm. Roma: International Board for Plant Genetic Resources.

Berg, O. 1855. Revisio Myrtacearum Americae. Linnaea 27: 1-128.

Berg, O. 1856. Revisio Myrtacearum Americae. Linnaea 27: 129-384.

Berg, O. 1857. Myrtaceae. In: C.P.F. Martius (ed.). Flora Brasiliensis 14: 1-468.

Berg, O. 1858. Myrtaceae. In: C.P.F. Martius (ed.). Flora Brasiliensis 14: 469-528.

Berg, O. 1859. Myrtaceae. In: C.P.F. Martius (ed.). Flora Brasiliensis 14: 529-656.

Berg, O. 1861. Revisio Myrtacearum Americae. Linnaea 30: 647 – 713.

Berg, O. 1862. Mantissa III. ad Revisionem Myrtacearum Americae. Linnaea 31: 247 – 262.

Berner, R.A. 1999. Atmospheric oxygen over Phanerozoic time. Proceedings of the National Academy of Science 96: 10955-10957.

Berner, R.A. & Canfield, D.E. 1989. A new model for atmospheric oxygen over Phanerozoic time. American Journal of Science 289: 333-361.

Besson-Bard, A., Pugin, A. & Wendehenne, D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. Annual Review of Plant Biology 59: 21-39.

BFG (Brazil Flora Group). 2015. Growing knowledge: An overview of seed plant diversity in Brazil. Rodriguésia 66: 1085–1113.

Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany 91: 179-194.

Bogatek, R., Gawronska, H. & Oracz, K. 2003. Involvement of oxidative stress and ABA in CN-mediated elimination of embryonic dormancy in apple. In: Nicolas, G., Bradford, K.J., Come, D. & Pritchard, H.W. (Eds.), The Biology of Seeds: Recent Research Advances. CABI Publishing, Wallingford.

Borisjuk, L. & Rolletschek, H. 2009. The oxygen status of the developing seed. New Phytologist 182: 17-30.

Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M. & Inze, D. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. The EMBO Journal 10(7): 1723-1732.

Breusegem, F.V., Vranova, E., Dat, J.F. & Inze, D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Science 161: 405-414.

Brown, T.L., LeMay, H.E., Bursten, B.E., Murphy, C.J. & Woodward, P.M. 2012. Chemistry, the central science. 12ed. Pearson Prentice Hall, Nova Jersey.

Cadeias, M.O.R. 2019. Agroalimentares sob o enfoque da soberania e segurança alimentar e nutricional: uma construção a partir do estudo de cadeias de frutas nativas da mata atlântica. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. Annual Review of Biochemistry 58: 79-110.

Calvi, G. P. 2015. Armazenamento das sementes recalcitrantes de *Eugenia Stipitata* mcvaugh: aspectos tecnológicos e fisiológicos. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas, Manaus.

Calvi, G.P., Aud, F.F., Ferraz, I.D.K., Pritchard, H.W. & Kraner, I. 2016. Analyses of several seed viability markers in individual recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh with totipotent germination. Plant Biology 19: 6-13.

Castro, E.R. & Galetti, M. 2004. Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú *tupinambis merianae* (reptilia: teiidae). Pap. Avuls Zool. 44(6): 91-97.

Celli, G.B., Pereira-Netto, A.B. & Beta, T. 2011. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of

Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. Food Research International 44: 2442-2451.

Chance, B., Boveris, A., Oshino, N. & Loschen, G. 1973. The nature of catalase intermediate and its biological function. In: King, T.E., Mason, H.S., Morrison, M. Oxidases and related redox systems. University Park Press, Baltimore. p. 350–353.

Chattopadhyaya, R. 2012. Oxidative damage to DNA constituent by iron-mediated fenton reactions: the thymidine family. Journal of Biomolecular.Structure and Dynamics 32: 155-169.

Cheng, H.Y. & Song, S.Q. 2008. Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensitivity of *Antiaris toxicaria* seeds and axes. Journal of Integrative Plant Biology 50: 1549–1556.

Coelho, A.B., Aguiar, D.R.D. & Fernandes, E.A. 2009. Padrão de consumo de alimentos no Brasil. Revista de Economia e Sociologia Rural 47: 335-62.

De Candolle, A.P. 1828. Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis. Parte 3. Parisiis: Sumptibus Sociorum Treuttel et Würtz.

De Gara, L., De Pinto, M.C., Moliterni, V.M.C. & Egidio, M.G.D. 2003. Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. Journal of Experimental Botany 54: 249-258.

Del Río, L.A. & Puppo, A. 2009. Reactive oxygen species in plant signaling. Springer, Berlin.

Delgado, L.F. 2010. Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de *Eugenia* (Myrtaceae). Tese de Doutorado. São Paulo, Instituto de Botânica.

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. & Barbedo, C.J. 2011. Atividade inibidora da germinação em extratos de sementes *Eugenia uniflora* L. Revista Brasileira de Sementes 33: 463-471.

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.

Desikan, R., Hancock, J. & Neill, S. 2005. Reactive oxygen species as signaling molecules. In: Smirnoff, N. (ed.) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Oxford: Blackwell, pp. 169-196.

El-Maarouf-Bouteau, H. & Bailly, C. 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. Plant Signaling and Behavior 3: 175-182.

El-Maarouf-Bouteau, H., Sajjad, Y., Bazin, J., Langlade, N., Cristescu, S.M., Balzergue, S., Baudouin, E. & Bailly, C. 2014. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. Plant Cell Environ. 38(2): 364-374.

Elstner, E.F. 1991. Oxygen radicals: biochemical basis for their efficacy. Klin Wochenschr 69: 949-956.

Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 2014. *Raven: Biologia Vegetal*. 8ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Fenton, H. J. H. 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. Journal of the Chemical Society, Transactions 65: 899-910.

Fiuza, S.M., Gomes, C., Teixeira, L.J, Girão da Cruz, M.T., Cordeiro, M.N.D.S., Milhazes, N., Borgesa, F. & Marques, M.P.M. 2004. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties— a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. Bioorganic & Medicinal Chemistry 12: 3581-3589.

Flores, C.W.B. & Clement, C.R. 1984. Considerações sobre o araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh, Myrtaceae) na Amazônia brasileira. Anais do 7º Congresso Brasileiro de Fruticultura. Soe. Bras. Frutic., Florianópolis. p. 167-177.

Flores, E.M. & Rivera, D.I. 1989. Criptocotilia em algunas dicotiledôneas tropicales. Branesia 32: 19-26.

Fontaine, O., Huault, C., Pavis, N. & Billard, J.-P. 1994. Dormancy breakate of *Hordeum vulgare* seeds: effects of hydrogen peroxide and scarification on glutathione level and glutathione reductase activity. Plant Physiol. Biochem 32: 677-683.

Fracassetti, D., Costa, C., Moulay, L. & Tomás-Barberán, F.A. 2013. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). Food Chemistry 139: 578-588.

Franzon, R.C., Carpenedo, S., Viñoly, M.D. & Raseira, M.C.B. 2018. Pitanga - *Eugenia uniflora* L. In: Rodrigues, S., Silva, E. & BRito E. (orgs.) Exotic Fruits Reference Guide. Washington, Academic Press. p. 333-338.

Fukahori, M., Ichimori, K., Ishida, H., Nakagawa, H. & Okino, H. 1995. Nitric oxide reversibly suppresses xanrhine oxidase activiry. Free Radicals Research 21: 203-212.

Garzon, G.A., Narvaez-Cuenca, C.E., Kopec, R.E., Barry, A.M., Riedl, K.M. & Schwartz, S.J. 2012. Determination of Carotenoids, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian Fruit. J. Agric. Food Chem. 60: 4709-4717.

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

Gondim, F.A., Gomes-Filho, E., Lacerda, C.F., Prisco, J.T., Neto, A.D.A. & Marques, E. C. 2010. Pretreatment with H_2O_2 in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. Brazilian Journal of Plant Physiology 22: 103-112.

Green, M.J. & Hill, H.A.O. 1984. Chemistry of dioxygen. Methods Enzymol 105: 3-22.

Greetham D., Kritsiligkou P., Watkins R.H., Carter Z., Parkin J. & Grant C.M. 2013. Oxidation of the yeast mitochondrial thioredoxin promotes cell death. Antioxidants & Redox Signaling 18(4): 376-385.

Gressler, E., Pizo, M.A. & Morellato, L.P.C. 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. Revista Brasil. Bot. 29(4): 509-530.

Gurgel, J.T.A. & Soubihe Sobrinho, J. 1951. Poliembrionia em mirtáceas frutíferas. Bragantia 11: 141-163.

Ha, C.O., Sands, V.E., Soepadmo, E. & Jong, K. 1988. Reproductive patterns of selected understorey trees in the Malaysian rain forest: the apomictic species. Botanical Journal of the Linnean Society 97: 317–331.

Hajiboland, R. 2014. Reactive oxygen species and photosynthesis. In: Ahmad, P. Oxidative damage to plants: Antioxidant networks and signaling. Elsevier, San Diego.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology 141: 312-322.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press.

Halliwell, B., Zhao, K. & Whiteman, M. 1999. Nitric oxide and peroxynitrite: the ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. Free Radicals Research 31: 651-669.

Hendry, G.A.F. 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. Seed Science Research 3: 141-153.

Huang, Y.T., Lowe, D.J., Churchman, G.J., Schipper, L.A., Rawlence, N.J. & Cooper, A. 2012. Carbon storage and DNA adsorption in allophanic soils and paleosols. In: Hartemink, A.E. & McSweenry, K. (eds.). Soil carbon. Springer, New York. pp.163-172.

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: 76-85.

Ishibashi, Y. & Iwaya-Inoue, M. 2006. Ascorbic acid suppresses germination and dynamic states of water in wheat seeds. Plant Production Science 9: 172-175.

Ishibashi, Y., Tawaratsumida, T., Kondo, K., Kasa, S., Sakamoto, M., Aoki, N., Zheng, S.H., Yuasa, T. & Iwaya-Inoue, M. 2012. Reactive oxygen species are involved in gibberellin/abscisic acid signaling in barley aleurone cells. Plant Physiology 158: 1705-1714.

Ishibashi, Y., Tawaratsumida, T., Zheng, S.H., Yuasa, T. & Iwaya-Inoue, M. 2010. NADPH oxidases act as key enzyme on germination and seedling growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Production Science 13: 45-52.

Ishibashi,Y., Koda, Y., Zheng, S.H., Yuasa, T. & Iwaya-Inoue, M. 2013. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. Annals of Botany 111: 95-102.

Johnson, A.M. 1936. Polyembryony in *Eugenia hookeri*. American Journal of Botany 23:83- 88.

Joshi, G., Kumar, A.N.A., Gowda, B. & Srinivasa, Y. B. 2006. Production of supernumerary plants from seed fragments in *Garcinia gummi-gutta*: evolutionary implications of mammalian frugivory. Current science 91: 372-376.

Justo, C.F., Alvarenga, A.A., Alves, E., Guimarães, R.M. & Strassburg, R.C. 2007. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de Eugenia pyriformis Camb. Acta Botanica Brasilica 21: 539-551.

Kasecker, T.P., Ramos-Neto, M.B., Silva, J.M.C. & Scarano, F.R. 2017. Ecosystembased adaptation to climate change: defining hotspot municipalities for policy design and implementation in Brazil. Mitigation and Adaptation Strategies to Global Change.

Keple, A.W. 2014. O estado da segurança alimentar e nutricional no Brasil: um retrato multidimensional. FAO, Brasília.

Kibinza, S., Vinel, D., Côme, D., Bailly, C. & Corbineau, F. 2006. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. Physiologia Plantarum 128: 496-506.

Kitts, D.D. 1997. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. Trends in Food Science and Technology 8(6): 198-203.

Kucera, B., Cohn, M.A. & Leubner-Metzger, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research 15: 281-307.

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

Landrum, L.R. & Kawasaki, M.L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. Brittonia 49: 508-536.

Lane, N. 2002. Oxygen: The molecule that made the world. Oxford University Press, New York.

Larcher, W. 2004. Ecofisiologia vegetal. RiMa, São Carlos.

Leprince, O., Hendry, G.A.F. & McKersie, B.D.; 1993. Mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. Seed Science Research 3: 231-246.

Leshem, Y.Y. & Haramaty, E. 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. Journal of Plant Physiology 148: 258-263.

Lughadha, E.N. & Proença, C. 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). Ann. Missouri Bot. Gard. 83: 480-503.

Liochev, S.I. 1999. The mechanism of 'Fenton-like' reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. Metal Ions in Biological Systems 36: 1-39.

Litz, R.E. 1984. *In vitro* responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. HortScience 19: 720–722.

Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M. & Zhang, J. 2010. H_2O_2 mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. J. Exp. Bot. 61(11): 2979-2990.

Lorenzi, H. 2016. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v.1. Plantarum: Nova Odessa.

Lucas, E.J., Belsham, S.R., Nic Lughadha, E.M., Orlovich, D.A., Sakuragui, C.M., Chase, M.W. & Wilson, P.G. 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae - preliminary molecular evidence. Plant Systematics and Evolution 251: 35-51.

Malik, S. K., Chaudhury, R. & Abraham, Z. 2005. Desiccation–freezing sensitivity and longevity in seeds of *Garcinia indica*, *G. cambogia* and *G. xanthochymus*. Seed Science and Technology 33: 723-732.

Malik, S.K., Chaudhury, R. & Kalia, R.K. 2005. Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. Scientia Horticulturea 106: 539-553.

Marcos-Filho, J. 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. ABRATES, Londrina.

Mazine, F.F., Faria, J.E.Q., Giaretta, A., Vasconcelos, T., Forest, F. & Lucas, E. 2018. Phylogeny and biogeography of the hyper-diverse genus *Eugenia* (Myrtaceae: Myrteae), with emphasis on E. sect. Umbellatae, the most unmanageable clade. Taxon 67: 752-769.

Mendes A.M.S. & Mendonça M.S. 2012. Tratamentos pré-germinativos em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata*). Revista Brasileira de Fruticultura 34: 921-929.

McVaugh, R. 1956. Tropical american Myrtaceae: notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. Fieldiana Botany 29: 145-228.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Breusegem, F.V. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. TRENDS in Plant Science 9: 490-498.

Møller, I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 561–591.

Møller, I.M., Jensen, P.E. & Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology 58: 459-481.

Moothoo-Padayachie, A., Varghese, B., Pammenter, N.W. & Sershen, P.G. 2016. Germination associated ROS production and glutathione redox capacity in two recalcitrant-seeded species differing in seed longevity. Botany 94: 1103-1114.

Naredo, M.E.B., Juliano, A.B., Lu, B.R., Guzman, F.D. & Jackson, M.T. 1998. Responses to seed dormancy-breaking treatments in rice species (*Oryza* L.). Seed Sci. Technol. 26(3): 675-689.

Neighbour, E.A., Pearson, M. & Mehlhorn, H. 1990. Purafil filrration prevents the developmenr of ozone-induced frost injury: a potenrial role for nitric oxide. Atmospoheric Environment 24: 711-715.

Neri-Numa, I.A., Carvalho-Silva, L.B., Morales, J.P., Malta, L.G., Muramoto, M.T., Ferreira, J.E.M., Carvalho, J.E., Ruiz, A.L.T.G., Junior, M.R.M. & Pastore, G.M. 2013. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh – Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. Food Research International 50: 70-76.

Nicácio, A.E., Rotta, E.M., Boeing, J.S., Barizão, E.O., Kimura, E., Visentainer, J.V. & Maldaner, L. 2017. Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds from *Eugenia involucrata* DC. Fruits by UHPLC-MS/MS.

Nooden, L.D. 2003. Plant cell death processes. Academic Press, Cambridge.

Nultsch, W. 2000. Botânica Geral. 10ed. Artmed, Porto Alegre.

Ofori, D.A., Asomaning, J.M., Peprah, T., Agyeman, V.K., Anjarwalla, P., Tchoundjeu, Z., Mowo, J.G. & Jamnadass, R. 2015. Addressing constraints in propagation of Allanblackia spp. through seed sectioning and air layering. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 3: 89-96.

Ogawa, K. & Iwabuchi, M. 2001. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. Plant and Cell Physiology 42: 286-291.

Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Yazaki, K. & Ashida, M. 1982. Ellagitannins of the Casuarinaceae, Stachyuraceae and Myrtaceae. Phytochemistry 21: 2871-2874.

Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F. & Bailly, C. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. The Plant Journal 50: 452-465.

Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F. & Bailly, C. 2009. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. Plant Physiol. 150(1): 494-505.

Pereira, M.C., Boschetti, W., Rampazzo, R., Celso, P.G., Hertz, P.F., Rios, A.O., Vizzotto, M. & Flores, S.H. 2014. Mineral characterization of native fruits from the southern region of Brazil. Food Science and Technology 34: 258-266.

Pereira, M.C., Steffens, R.S., Jablonski, A., Hertz, P.F., Rios, A.O., Vizzotto, M. & Flôres, S.H. 2012. Characterization and antioxidant potential of brazilian fruits from the Myrtaceae family. Journal of Agriculture and Food Chemistry 60: 3061-3067.

Pizo, M.A. 2002. The seed dispersers and fruit syndromes of Myrtaceae in Brazilian Atlantic forest. In: Levey, D.J., Silva, W.R. & Galetti, M. (eds.). Frugivores and seed dispersers ñ biodiversity and conservation perspectives. CABI Publishing, Wallingford.

Prataviera J.S., Lamarca E.V., Teixeira C.C. & Barbedo, C.J. 2015. The germination success of the cut seeds of *Eugenia pyriformis* depends on their size and origin. Journal of Seed Science 37: 47-54.

Pukacka, S. & Ratajczak, E. 2006. Antioxidative response of ascorbate–glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. Journal of Plant Physiology 163: 1259-1266.

Puntarulo, S.; Sánchez, R.A. & Boveris, A. 1988. hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. Plant Physiol 86: 626-630.

Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. & Freeman, B.A. 1991. Peroxylnitrite induced membrane lipid peroxidation: cytotoxic potenrial of superoxide and nitric oxide. Archives of Biochemistry and Biophysics 228: 481-487.

Ratnam, D., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D. & Kumar, M. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. Journal of Controlled Release 113: 189-207.

Raven, J.A. 1991. Plant responses to high O_2 concentrations: relevance to previous high O_2 episodes. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 97: 19-38.

Reynertson, K.A., Yang, H., Jiang, B., Basile, M.J. & Kennelly, E.J. 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. Food Chemistry 109: 883-890.

Rizzini, C.T. 1970. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). Revista Brasileira de Biologia 30: 381–402

Roach T., Beckett R.P., Minibayeva, F.V., Colville, L., Whitaker, C., Chen, H., Bailly, C. & Kranner, I. 2010. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds. Plant Cell Environ 33:59–75.

Robinson, J.M. 1989. Phanerozoic O_2 variation, fire and terrestrial ecology. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 75: 223-240.

Schopf, J.W. (ed.) 1992. Major events in the history of life. Jones and Bartlett Publishers, Boston.

Schopfer, P., Plachy, C. & Frahry, G. 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. Plant Physiology 125: 1591–1602.

Sies, H. 1991. Oxidative stress-oxidants and antioxidants. Academic Press, New York.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiologv 82: 291-295.

Silva, A.P.G., Freitas, T.P., Morais, V.S.P. & Jacomino, A.P. 2018. Uvaia - *Eugenia pyriformis* Cambess. In: Rodrigues, S., Silva, E. & Brito E. (orgs.) Exotic Fruits Reference Guide. Washington, Academic Press. pp. 435-438.

Silva, C.V., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J. 2005. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. Revista Brasileira de Sementes 27: 86-92.

Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M. & Barbedo, C.J. 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). Revista Brasileira de Botânica 26: 213-221.

Smirnoff, N. 2005. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell, Oxford.

Souza, L. A. 2006. Anatomia do fruto e da semente. UEPG, Ponta Grossa.

Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2012. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa.

Steinmetz, K.A. & Potter, J.D. 1996. Vegetables, fruits, and cancer prevention: a review. Journal of the Academy Nutrition and Ditetics 96: 1027-1039.

Su, L., Lan, Q., Pritchard, H.W., Xue, H. & Wang, X. 2016. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds. Plant Physiology and Biochemistry 109: 406-415.

Sultana, B., Anwar, F. & Przybylski, R. 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. Food Chemistry 104: 1106-1114.

Taiz, L & Zaiger, E. 2013. Fisiologia vegetal. 5ed. Artmed, Porto Alegre.

Talapatra, S.K. & Talapatra, B. 2015. Chemistry of Plant Natural: Products Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine. Springer, New York.

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

Teixeira, J. B. 2001 Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas. Embrapa, Brasília.

Teixeira, L.L., Hassimotto, N.M.A. & Lajolo, F.M. 2018. Grumixama - *Eugenia brasiliensis* Lam. In: Rodrigues, S., Silva, E. & Brito E. (orgs.) Exotic Fruits Reference Guide. Washington, Academic Press. p. 219-224.

Tommasi, F., Paciolla, C. & Arrigoni, O. 1999. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. Physiologia Plantarum 105: 193-198.

Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol: 15: 335-44.

Van Wyk, A.E. & Botha, R. 1984. The genus *Eugenia* (Myrtaceae) in southern Africa: ontogeny and taxonomic value of the seed. South African Journal of Botany 3: 63-80.

Varghese, B., Sershen, Berjak, P., Varghese, D., & Pammenter, N.W. 2011. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. Physiol Plant 142: 326-338.

Vattem, D.A. & Shetty, K. 2005. Biological functionality of ellagic acid: a review. Journal of Food Biochemistry 29: 234-266

WCSP (World Checklist of Selected Plant Families). 2017. World checklist of selected plant families. http://www.kew.org/wcsp/myrtaceae (acesso em 10 de fevereiro de 2020).

Ye, N., Zhu, G., Liu, Y., Zhang, A., Li, Y., Liu, R., Shi, L., Jia, L. & Zhang, J. 2012. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. J. Exp. Bot 63(5): 1809-1822.

Zola, F.G., Rodrigues, A.C., Oliveira, B.D.A., Sacremento, N.T.B., Taylor, J G., Pinto, U.M. & Bertoldi, M.C. 2019. Mineral and centesimal contents, antioxidant activity and antimicrobial action of phenolic compounds from *Eugenia Brasiliensis* Lam. Pulp. Food Sci. Technol, Ahead of Print.