CAMILA RIVERO ALONSO

A produção múltipla e sequencial de plântulas em sementes de *Eugenia candolleana*, *E. pyriformis*, *E. uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis* depende de seu estado fisiológico e da massa cotiledonar

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

SÃO PAULO
2023

CAMILA RIVERO ALONSO

A produção múltipla e sequencial de plântulas em sementes de *Eugenia candolleana*, *E. pyriformis*, *E. uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis* depende de seu estado fisiológico e da massa cotiledonar

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECAS E MAPOTECAS**

Alonso, Camila Rivero
A454p A produção múltipla e sequencial de plântulas em sementes de *Eugenia candolleana*, *E. pyriformis*, *E. uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis* depende de seu estado fisiológico e da massa cotiledonar / Camila Rivero Alonso - - São Paulo, 2023.
90p.; il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 2023.
Bibliografia.

1. Estratégia ecológica. 2. Predação. 3. Regeneração. I. Título.

CDU: 631.53.01

Banca examinadora

Dr. Claudio José Barbedo (orientador)
Instituto de Pesquisas Ambientais - IPA

Dra. Carolina Brandão Coelho
Centro Universitário da Fundação Santo André – CUFSA

Dra. Raquel Maria de Oliveira Pires
Universidade Federal de Lavras - UFLA

Dra. Elisangela Clarete Camili
Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Dr. Eduardo Pereira Cabral Gomes
Instituto de Pesquisas Ambientais - IPA

“Parábola do jardineiro”

Rubem Alves

"Todo jardim começa com uma história de amor, antes que qualquer árvore seja plantada ou um lago construído é preciso que eles tenham nascido dentro da alma.

Quem não planta jardim por dentro, não planta jardins por fora e nem passeia por eles".

"O que é que se encontra no início? O jardim ou o jardineiro? É o jardineiro. Havendo um jardineiro, mais cedo ou mais tarde um jardim aparecerá.

Mas, havendo um jardim sem jardineiro, mais cedo ou mais tarde ele desaparecerá. O que é um jardineiro? Uma pessoa cujo pensamento está cheio de jardins. O que faz um jardim são os pensamentos do jardineiro. O que faz um povo são os pensamentos daqueles que o compõem."

- "Entre a ciência e a sapiência: o dilema da educação" - Página 24, de Rubem A Alves - Publicado por Edições Loyola, 1999 ISBN

Agradecimentos

Aos meus pais, Sueli e Damacio, por transmitirem valores, segurança e suporte emocional para que eu pudesse realizar meus sonhos.

À minha irmã, Renata, pelas conversas, apoio emocional e espiritual.

Ao meu filho, Leonardo, pela companhia, pelo auxílio desde coletas de frutos, extração de sementes, até a correção dos abstracts e, principalmente por compreender que eu precisava estudar alguns finais de semana.

Ao meu orientador Dr. Claudio Barbedo, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa desde o mestrado, por tantos ensinamentos sobre diversos assuntos e também pelas conversas científicas, por me direcionar nos experimentos, na dissertação e na tese, pelas aulas, pelos cafés, pelos almoços, pela companhia, por todos artigos e livros incríveis que produziu, pelos vídeos e áudios gravados e, principalmente pela amizade...

À toda família Barbedo pelo incentivo e amizade.

Ao Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), ao diretor Nino Amazonas pela autorização e auxílio nas coletas de frutos do Jardim.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pelo suporte e infraestrutura fornecidos, à Shirlei e Iolane, Dra. Mutue Fujii, à Dra. Inês Cordeiro e aos alunos representantes discentes por todo auxílio e compreensão.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, que possibilitou a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo financiamento fornecido ao IPA através do Plano de Desenvolvimento Institucional - PDIP (processo 2017/50341-0), que contribuiu para a realização deste trabalho.

À Lucia do Núcleo de Bibliotecas e Mapoteca, pela atenção e auxílio na pesquisa desde o mestrado.

Aos professores das disciplinas cursadas.

Ao professor Dr. Domingos Rodrigues pelo incentivo e amizade.

Ao professor Dr. Shoey Kanashiro pelo incentivo e ensinamentos.

À Dra. Sonia Casari e Elton Popp, do Museu de Zoologia da USP, pela atenção e identificação de insetos.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Edmir Vicente Lamarca, Dra. Sandra Carmello e Dr. Eduardo Cabral Gomes, pelas valiosas sugestões.

Ao Núcleo de Pesquisa em Sementes, funcionários e pesquisadores: Nelson, José Marcos, Adriana, Waldete, Francisco, Dani, em especial à Lilian Asperti, Márcia Oliveiras e Marina Guardia, por me receberem no Núcleo de Sementes, pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

Aos amigos: Maiara Iadwizack, Janaína Pinheiro, Natalia Martarello, Yasmin Tavares, Roseli Betoni, Cibelle Françoso, Débora Molizane, Aline Testoni, Vera Lygia, Bárbara Zanini, Aline Lemos, Maria Gessi, Wesley Dias, Gabriel Manoel, Jhonnatan Santos, Matheus Casarini, Gustavo Arevalo, Santiago Noronha, pelo companheirismo e amizade.

Às amigas, Andréia, Micheli, Mônica, Michele e Patrícia, pela amizade e compreensão nos momentos de ausência.

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

Resumo

Sementes recalcitrantes são dispersas no ambiente em condições de germinar rapidamente, indicando que a pressão evolutiva ocorreu no sentido de direcionar a energia para a produção vegetal. Assim, estas sementes parecem ter adquirido estratégia de propagação no tempo e no espaço diferente da desenvolvida pelas sementes ortodoxas, quando entram em dormência. A germinação em condições desfavoráveis, letal para a maioria das sementes recalcitrantes, pode resultar na morte das primeiras plântulas produzidas por sementes de *Eugenia*, mas não da semente toda. Apresentam também, potencial para gerar novas raízes e até plantas inteiras mesmo após a remoção de grande parte de suas reservas, mas essa capacidade depende do tamanho das sementes. Há evidente interesse na compreensão dos fatores envolvidos nessa capacidade regenerativa que permitem a formação de novas plântulas também quando a semente é fracionada. Tais sementes são extremamente predadas por insetos e a intensidade da predação pode variar de um ambiente para outro, entre as espécies e entre os indivíduos de uma mesma espécie. O objetivo deste trabalho foi analisar o número de formações de novas estruturas (raízes e plântulas) em sementes de *Eugenia*. Frutos de *Eugenia* spp. foram coletados e tiveram suas sementes extraídas. Estas foram caracterizadas quanto ao teor de água através do método de estufa a 103 ± 2 °C. Em seguida, instalou-se testes de germinação (25°C e luz constante) e de regenerabilidade, com eliminações de raízes (ER) e eliminações de plântulas (EP) para todas as espécies. As sementes das espécies estudadas foram capazes de produzir novas raízes e formar plântulas normais, sucessivamente, mesmo após remoção da raiz e da parte aérea. Os resultados mostraram que essa capacidade regenerativa pode, efetivamente, ter proporcionado estratégia evolutiva, que por sua vez, manteve o potencial de propagação da espécie mesmo sendo recalcitrantes.

Palavras - chave: estratégia ecológica, predação, regeneração.

Abstract

Recalcitrant seeds are dispersed in the environment in conditions to quickly germinate, indicating that the evolutionary pressure occurred in order of directing the energy for the vegetal production. Thus, these seeds seem to have acquired a propagation strategy in time and space different from that developed by orthodox seeds, when they enter dormancy. Germination under unfavorable conditions, lethal to most recalcitrant seeds, can result in the death of the first seedlings produced by *Eugenia* seeds, but not the whole seed. They also have the potential to generate new roots and even whole plants even after removing most of their reserves, but this capacity depends on the size of the seeds. There is evident interest in understanding the factors involved in this regenerative capacity that allow the formation of new seedlings also when the seed is fractionated. Such seeds are extremely predated by insects and the intensity of predation can vary from one environment to another, between species and between individuals of the same species. The objective of this work was to analyze the number of formations of new structures (roots and seedlings) in *Eugenia* seeds. Fruits of *Eugenia* spp. were collected and had their seeds extracted. These were characterized for water content using the oven method at 103 ± 2 °C. Then, germination tests (25°C and constant light) and regenerability were installed, with root eliminations (ER) and seedling eliminations (EP) for all species. The seeds of the studied species were capable of producing new roots and forming normal seedlings, successively, even after removal of the root and aerial part. The results showed that this regenerative capacity may, effectively, have provided an evolutionary strategy, which, in turn, maintained the propagation potential of the species even though they were recalcitrant.

Key words: ecological strategy, predation, regeneration.

Lista de figuras

Capítulo I

Figura 1. Frutos e sementes de *E. candolleana*, separados em quatro estádios de maturação (A); frutos e das sementes de *E. candolleana*, totalmente maduras, armazenadas por seis meses (B) e semente inteira, indicando o hilo e a fracionada, no sentido longitudinal da semente (C). Escala 1cm 36

Figura 2. Fluxograma da sequência dos tratamentos de regenerabilidade aplicados às sementes de *E. candolleana* 36

Figura 3. Diâmetro dos frutos (A) e das sementes (B) expressos em milímetros (mm); teor de água (C) expressos em porcentagem (%), potencial hídrico expresso em mega-pascal (MPa) (D); massas fresca (E) e seca (F), expressas em g. semente^{-1}, de *E. candolleana* DC., de acordo com os diferentes estádios de maturidade fisiológica, em que, E II = estádio 2; E III= estádio 3; E IV= estádio 4 e E V= estádio 5. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%). 37

Figura 4. Regeneração de raízes em sementes inteiras de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação, descritos como: E II, E III, E IV, E V e SE, ER1, ER2, ER3 e ER4 os tratamentos de regenerabilidade de raízes (SE= sem eliminações; ER1= eliminação da primeira raiz; ER2= eliminação da segunda raiz; ER3= eliminação da terceira raiz e ER4= eliminação da quarta raiz) (A); regeneração de plântulas em sementes inteiras de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação (E II, E III, E IV e E V) e tratamentos de regenerabilidade de plântulas (SE, EP1 e EP2). Em que, SE= sem eliminações; EP1= eliminação da primeira plântula e EP2= eliminação da segunda plântula) (B); Letras minúsculas comparam as eliminações e as letras maiúsculas comparam os estádios de maturação. 38

Figura 5. Tempo (dias) de regeneração de novas raízes (A) e novas plântulas (B) em sementes inteiras de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação. 39

Figura 6. Regeneração de raízes em sementes fracionadas de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação, descritos como: E II, E III, E IV, E V e SE, ER1, ER2 e ER3, são tratamentos de regenerabilidade de raízes (SE= sem eliminações; ER1= eliminação da primeira raiz; ER2= eliminação da segunda raiz e ER3= eliminação da terceira raiz) (A); regeneração de plântulas em sementes fracionadas de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação (SE, EP1 e EP2) e tratamentos de regenerabilidade de plântulas (SE= sem eliminações; EP1= eliminação da primeira plântula; EP2= eliminação da segunda plântula) (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Letras minúsculas comparam as eliminações e as letras maiúsculas comparam os estádios de maturação..... 40

Figura 7. Tempo (dias) de regeneração de raízes (C) e plântulas (D), em sementes fracionadas de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação. 41

Figura 8. Regeneração de raízes em sementes inteiras e maduras de *E. candolleana*, armazenadas sob baixa temperatura por seis meses. Em que SE, ER1, ER2, ER3, ER4, ER5 e ER6 são tratamentos de regenerabilidade de raízes (SE= sem eliminações; ER1= eliminação da primeira raiz; ER2= eliminação da segunda raiz; ER3= eliminação da terceira raiz; ER4= eliminação da quarta raiz; ER5= eliminação da quinta raiz e ER6= eliminação da sexta raiz) (A) e SE, EP1 e EP2 são tratamentos de regenerabilidade de plântulas, (SE= sem eliminações; EP1= eliminação da primeira plântula e EP2= eliminação da segunda plântula) (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%). 42

Figura 9. Tempo (dias) de regeneração de raízes (A) e plântulas (B) em sementes inteiras e maduras de *E. candolleana*. 43

Capítulo II

Figura 1. Germinação (A) e desenvolvimento de plântulas (B), submetidas a eliminações de raízes (A) e eliminações plântulas (B) em sementes de *E. involucrata*, *E. brasiliensis* e *E. uniflora*, armazenadas e submetidas a eliminação de raízes (SE= sem eliminações; ER 1= eliminação de primeira raiz; ER 2 = eliminação de segunda raiz; ER 3= eliminação de terceira raiz; ER 4= eliminação de quarta raiz; ER 5= eliminação de quinta raiz; ER 6= eliminação de sexta raiz; ER 7= eliminação de sétima raiz e eliminação de plântulas (SE= sem eliminações; EP 1= eliminação de primeira plântula; EP 2= eliminação de segunda plântula e EP 3= eliminação de terceira plântula. Letras maiúsculas comparam espécies e letras minúsculas comparam eliminações de raízes (ER) ou plântulas (EP). 62

Figura 2. Tempo (dias) da regeneração de novas raízes (A) e plântulas (B), proveniente de sementes armazenadas de *Eugenia uniflora* (EU), *Eugenia brasiliensis* (EB) e *Eugenia involucrata* (EI). 63

Figura 3. Porcentagem de germinação de novas raízes em sementes de *E. involucrata*, submetidas ao teste de envelhecimento acelerado a 42 °C, pelo período de 6, 12, 24 e 48 horas. Posteriormente, submetidas ao teste de regenerabilidade em que SE= sem eliminações; ER 1= eliminação de primeira raiz; ER 2= eliminação de segunda raiz, ER 3= eliminação de terceira raiz; ER 4= eliminação de quarta raiz; ER 5= eliminação de quinta raiz e ER 6= eliminação de sexta raiz (A); Porcentagem de produção de novas plântulas em sementes de *E. involucrata*, submetidas ao teste do envelhecimento acelerado a 42 °C, pelo período de 6, 12, 24 e 48 horas e, após submetidas ao teste de regenerabilidade em que SE= sem eliminações; EP 1= eliminação de primeira plântula; EP 2= eliminação de segunda plântula e EP 3= eliminação de terceira plântula (B). Letras minúsculas comparam o tempo de incubação e letras maiúsculas comparam eliminações de raízes (ER) ou plântulas (EP). 64

Figura 4. Tempo (dias) da regeneração de novas raízes (A) e plântulas (B), proveniente de sementes de *E. involucrata*, após teste de envelhecimento acelerado..... 65

Capítulo III

Figura 1. Fluxograma da sequência dos tratamentos de regenerabilidade aplicados às sementes de *E. uniflora*, no primeiro experimento e *E. pyriformis*, no segundo experimento. 81

Figura 2. Esquema dos tratamentos aplicados as sementes de *E. uniflora*, para obtenção do peso seco das raízes (A) e plântulas (B) regeneradas. 81

Figura 3. Diferentes tipos de danos ocasionados naturalmente em frutos e sementes de *Eugenia* spp. (A) e artificialmente em sementes de *Eugenia pyriformis* (B). T1= sementes foram cortadas, eliminando as áreas periféricas; T2= com auxílio de um trado, as sementes foram perfuradas ao meio, atravessando-as; T3= as sementes foram cortadas, eliminando cerca de 1/4 da semente na lateral oposta ao eixo hipocótilo-radícula e T4= com auxílio de um trado e uma cureta, as sementes foram perfuradas e cavadas ao meio sem atravessá-las. 82

Figura 4. Distribuição das médias das massas fresca (A e C) e seca (B e D) (g. semente $^{-1}$), em amêndoas e raízes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos de eliminação de raízes (A e B) e em amêndoas e plântulas de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos de eliminação de plântulas (C e D). 83

Figura 5. Produção de novas raízes (A) e novas plântulas (B) em sementes de *Eugenia pyriformis* (T1, T2, T3 e T4), submetidas a redução de suas reservas. Em que, T1= as sementes foram cortadas, eliminando as áreas periféricas; T2= com auxílio de um trado, as sementes foram perfuradas ao meio, atravessando-as; T3= as sementes foram cortadas, eliminando cerca de 1/4 da semente na lateral oposta ao eixo hipocótilo-radícula e T4= com auxílio de um trado e uma cureta, as sementes foram perfuradas e cavadas ao meio sem atravessá-las. 84

Figura 6. Produção de novas raízes (A) e novas plântulas (B) em sementes de *Eugenia pyriformis* (T1, T2, T3 e T4), submetidas a redução de suas reservas. Em que, T1= as sementes foram cortadas, eliminando as áreas periféricas; T2= com auxílio de um trado, as sementes foram perfuradas ao meio, atravessando-as; T3= as sementes foram cortadas, eliminando cerca de 1/4 da semente na lateral oposta ao eixo hipocótilo-radícula e T4= com auxílio de um trado e uma cureta, as sementes foram perfuradas e cavadas ao meio sem atravessá-las. 85

Figura 7. Tempo (dias) da regeneração de novas raízes (A) e novas plântulas (B) em sementes de *Eugenia pyriformis*, submetidas a redução das reservas. Em que, T1= as sementes foram cortadas, eliminou-se as áreas periféricas; T2= com auxílio de um trado, as sementes foram perfuradas ao meio, atravessando-as; T3= as sementes foram cortadas, eliminando cerca de 1/4 da semente na lateral oposta ao eixo hipocótilo-radícula e T4= com auxílio de um trado e uma cureta, as sementes foram perfuradas e cavadas ao meio sem atravessá-las. Tempo (dias) entre a eliminação da raiz anterior e a próxima raiz regenerada (C) e entre a plântula anterior e a próxima plântula regenerada (D). 86

Lista de tabelas

Capítulo II

Tabela 1. Tabela 1. Teor (TA) e potencial (PH) de água, massa seca (MS), germinação (G) e desenvolvimento de plântulas normais (PN) de sementes de *E. uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis* antes (out, nov e dez/2018) e após (jul/2019) o armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5%..... 61

Tabela 2. Teor de água (TA), potencial hídrico (PH), massa seca (MS), germinação (G) e desenvolvimento de plântulas normais (PN), de sementes de *Eugenia involucrata*, antes (Inicial) e após os diferentes períodos (6, 12, 24 e 48h) do teste de envelhecimento acelerado. Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5%. 61

Sumário

Resumo..... 7

Abstract..... 8

Lista de figuras..... 9

Lista de tabelas..... 14

Sumário..... 15

Introdução Geral..... 16

CAPÍTULO I - Regeneration of roots and seedlings as a propagation strategy in seeds of *Eugenia candolleana* DC..... 20

Abstract..... 21

Resumo..... 22

Introdução..... 23

Material e métodos..... 25

Resultados e discussão 28

Conclusão..... 32

Agradecimentos..... 32

Referências..... 33

CAPÍTULO II - Viabilidade e regeneração em sementes de *Eugenia* spp. submetidas ao armazenamento..... 45

Resumo..... 46

Abstract..... 47

Introdução..... 48

Material e métodos..... 49

Resultados e discussão 52

Referências..... 57

CAPÍTULO III - Relação entre massa cotiledonar e regeneração de raízes e plântulas em sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae)..... 66

Resumo..... 67

Abstract..... 68

Introdução..... 69

Material e métodos..... 71

Resultados e discussão 73

Referências..... 77

Considerações finais 87

Referências bibliográficas da introdução e das considerações finais 88

Introdução geral

No domínio fitogeográfico Mata Atlântica, os locais onde se concentram as maiores áreas de remanescentes florestais estão usualmente associados às atuais unidades de conservação de proteção integral, localizadas principalmente na Mata Atlântica costeira dos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e região serrana do Espírito Santo. Na Serra do Mar, apesar de apresentar uma extensa rede de áreas protegidas, 98,69% dos remanescentes são menores que 100 ha. Este padrão de fragmentação se repete na região central da Mata Atlântica, entre o sul da Bahia e o Estado do Espírito Santo, onde 98,65% dos remanescentes possuem área menor ou igual a 100 hectares (Pinto *et al.*, 2006).

Dentre todos os biomas, a Mata Atlântica é considerada como um dos "hot spots" brasileiros. Compreende cerca de 15 Estados e abrange grande parte da costa brasileira. A área original chegou a atingir 1.315.460 km², ou seja, 15% do território brasileiro; contudo, o remanescente atual é de 102.012 km², sendo reduzida a 7,91% da extensão original (Lino, 2004; IESB, 2007; IBF, 2023).

Há duas maneiras de conservação das espécies: *in situ*, realizada dentro dos próprios ecossistemas e hábitats naturais conservados e *ex situ*, mantendo-se amostras de indivíduos fora de seu habitat natural na forma de indivíduos inteiros ou como sementes, pólen, propágulos vegetativos e cultura de células de tecidos. Dentre estes, a conservação de sementes é a forma mais comum de conservar *ex situ*, pois é um dispersor natural das plantas superiores (Santos e Salomão, 2010). Contudo, há dificuldades para a conservação de sementes sensíveis à secagem, denominadas recalcitrantes. Devido ao alto conteúdo de água, essas sementes são dispersas com metabolismo ainda elevado, diferente das tolerantes à dessecação, denominadas ortodoxas, que, por passarem por secagem ao final da maturação, são dispersas com metabolismo muito baixo. Essa diferença nos

comportamentos pode estar associada aos meios de regeneração natural e estabelecimento das espécies (Barbedo *et al.*, 2013).

Sementes das espécies estudadas do gênero *Eugenia* mostraram-se sensíveis à dessecação, por isso, quando são dispersas devem germinar rapidamente pois, se ficarem no ambiente e passarem por alguma secagem, podem perder rapidamente o poder germinativo. Uma outra característica dessas sementes, que também poderia prejudicar a conservação, é que são intensamente predadas (Delgado et al., 2010; Teixeira e Barbedo, 2012). A predação é caracterizada pelo consumo de um organismo vivo por outro organismo, sendo que as presas podem ser animais ou vegetais e podem ser consumidas em sua totalidade ou apenas partes delas (Begon *et al.*, 2007; Denno e Lewis, 2009). Para as sementes do gênero *Eugenia*, contudo, altos níveis de herbivoria (ou alta intensidade) podem ser tolerados. Sementes de *E. cerasiflora*, por exemplo, que se mostraram intensamente predadas por larvas de insetos, mostraram capacidade de germinar e de produzir plântulas normais mesmo quando grande parte do tecido de reserva foi removido, evidenciando que originalmente possuem certa quantidade de reservas nutritivas acima da necessária para germinar (Teixeira, 2009).

Provavelmente, essas relações ecológicas (semente - larvas e semente - aves) integram as estratégias de permanência desses indivíduos no meio, sugerindo que haja coevolução entre essas sementes e seus insetos predadores. Uma outra característica dessas sementes, que pode estar relacionada com a coevolução com seus predadores, é a capacidade de regenerar raízes ou mesmo plântulas inteiras quando uma germinação é perdida. A regeneração de novas raízes, após as sementes sofrerem danos provocados por predação, poderia ampliar o período de viabilidade da mesma no solo, contribuindo para preservação da espécie (Silva *et al.*, 2005; Teixeira, 2009; Teixeira e Barbedo, 2012; Tsan, 2023).

A diminuição da disponibilidade de reservas nos cotilédones das sementes pode ocorrer pelo ataque de insetos, mas também pelo menor recebimento de recursos durante a formação. Condições climáticas, estádio de maturação, genética da planta-mãe e seu estado nutricional são fatores que também podem influenciar na capacidade regenerativa e na viabilidade dessas sementes. Conforme apontado anteriormente, todas as espécies de *Eugenia* que tiveram as sementes estudadas quanto à tolerância à dessecação foram agrupadas dentre as recalcitrantes, ou seja, sensíveis à dessecação e com baixo potencial de armazenamento (Delgado e Barbedo, 2007; Sena *et al.*, 2010; Scalon *et al.*, 2012).

Tendo em vista o potencial regenerativo dessas sementes, associado à ampliação do tempo para que as mesmas permaneçam viáveis até a próxima safra e à sensibilidade à dessecação, é fundamental investigar se a regeneração das novas estruturas nas sementes está associada à intensa herbivoria e o quanto as sementes suportam perder suas reservas e ainda manterem o potencial germinativo.

Sendo assim, neste trabalho testou-se a hipótese de que a estratégia de sementes de *Eugenia* em controlar e produzir germinações sucessivas está associada à variação das reservas disponíveis nos cotilédones, decorrente da eficiência de translocação da planta-mãe para a semente e do consumo por insetos predadores.

O objetivo deste estudo foi analisar os limites para regenerações das novas estruturas (raízes e plântulas) em sementes de *Eugenia*, procurando associá-las a possíveis respostas dessas sementes ao ataque de insetos, o estudo foi organizado em três capítulos. No primeiro ("Regeneration of roots and seedlings as a propagation strategy in seeds of as *Eugenia candolleana* DC. (Myrtaceae)") procurou-se verificar a capacidade das sementes de *Eugenia* em regenerar raízes e a formação de plântulas por diversas vezes seguidas, associando-se essa capacidade com uma possível estratégia de que a mesma semente, sendo recalcitrante, possa permanecer no campo por longos períodos, sempre com potencial de

estabelecimento da espécie. No segundo capítulo ("Viabilidade e regeneração em sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) submetidas ao armazenamento") procurou-se investigar se após passado um período de deterioração, tais sementes ainda mantém a capacidade regenerativa. Finalmente, no terceiro capítulo ("Relação entre a massa cotiledonar e a regeneração de raízes e plântulas em sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae)") procurou-se verificar o quanto a redução do tecido de reserva influencia na capacidade de germinar e de formar novas plântulas. Face à dificuldade em se obter grande número de sementes de uma mesma espécie de *Eugenia* para todos os estudos, e considerando que os trabalhos com sementes de diferentes espécies de *Eugenia* têm mostrado similaridade de comportamento entre as diferentes espécies, em cada capítulo foi utilizada a espécie que produziu suficiente quantidade de sementes na safra de cada ano.

CAPÍTULO I

Regeneration of roots and seedlings as a propagation strategy in seeds of as *Eugenia candolleana* DC. (Myrtaceae)

Artigo submetido a Journal of Seed Science em 21-06-2023.

Título resumido: Regeneration of roots and seedlings in *Eugenia candolleana* seeds

Regeneration of roots and seedlings as a propagation strategy in seeds of *Eugenia candolleana* DC.

Camila Rivero Alonso[1], Maiara Iadwizak Ribeiro[1], Marina Crestana Guardia[1], Claudio José Barbedo[1*]

ABSTRACT – Seeds of the genus *Eugenia* have a high regenerative capacity, producing roots and seedlings from seeds that have reduced cotyledonary mass. Also, it was observed, for seeds of this genus, the regeneration of new roots and seedlings, when the first roots and seedlings are eliminated, yet, this characteristic is maintained when the seed had its reserves reduced by half. This study aimed to analyze the limits of regeneration of new roots and seedlings in whole and fractionated seeds of *Eugenia candolleana*, at different maturation stages. Additionally, the regenerative capacity of seeds stored for six months was also evaluated. The seeds were sown and when they produced the first roots and seedlings, these were eliminated, simulating a condition of herbivory. The results showed that, in addition to presenting a high regenerative capacity at different maturation stages, the seed reduced by half, root regeneration was maintained, even after the storage period, such information may indicate that seeds of the genus *Eugenia* are able to wait the next crop regenerating several times as a way to withstand or tolerate predation. This ability can be understood as a propagation strategy of the species.

Index terms: fractionation, maturation, recalcitrant seed

[1] Instituto de Pesquisas Ambientais. Avenida Miguel Stefano, 3687, São Paulo – SP.
*Corresponding author: cjbarbedo@yahoo.com.br

Regeneração de raízes e plântulas como estratégia de propagação em sementes de *Eugenia candolleana* DC. (Myrtaceae)

RESUMO - Sementes do gênero *Eugenia* apresentam alta capacidade regenerativa, produzindo raízes e plântulas a partir de sementes que tiveram redução da massa cotiledonar. Também, foi observado, para sementes deste gênero, a regeneração de novas raízes e plântulas, quando as primeiras raízes e plântulas são eliminadas, ainda, tal característica se mantém quando a semente teve suas reservas reduzidas pela metade. Este estudo teve como objetivo analisar os limites das regenerações de novas raízes e plântulas em sementes inteiras e fracionadas de *Eugenia candolleana*, em diferentes estádios de maturação. Adicionalmente, avaliou-se a capacidade regenerativa em sementes armazenadas por seis meses. As sementes foram semeadas e quando emitiram as primeiras raízes e plântulas, estas foram eliminadas, simulando uma condição de herbivoria. Os resultados mostraram que, além de apresentar alta capacidade regenerativa em diferentes estádios de maturação, a semente reduzida pela metade, a regeneração de raízes se manteve, inclusive após o período de armazenamento, tais informações podem indicar que sementes do gênero *Eugenia* são capazes de aguardar a próxima safra regenerando diversas vezes, como maneira de suportar ou tolerar a predação. Essa habilidade pode ser entendida como estratégia de propagação da espécie.

Palavras chave: fracionamento, maturação, semente recalcitrante

Introdução

O gênero *Eugenia* (Myrtaceae) compreende espécies florestais e frutíferas com alto potencial econômico, pois produzem frutos carnosos, adocicados ou não, próprios para consumo na forma natural ou para serem industrializados (Amador e Barbedo, 2015; Lamarca et al., 2020; Amorim et al., 2020). Tal gênero é o que apresenta mais espécies dentro da família mais rica da Mata Atlântica, das quase 6000 espécies de Myrtaceae 1100 são do gênero *Eugenia*, de longe o mais rico dentre aproximadamente 140 gêneros desta família (Wilson, 2011; Mazine et al., 2020; Fernandes et al., 2023).

Os frutos das espécies deste gênero, podem ser dispersos por animais (zoocoria), na maioria das vezes por aves e mamíferos, especialmente os macacos, mas também por repteis e peixes (Castro e Galetti, 2004; Christianini e Martins, 2015).

Observações de campo permitiram verificar que os frutos de *Eugenia* spp. são capturados por aves que se alimentam deles ou de suas sementes e, nessa captura, as sementes podem ser partidas ou fracionadas naturalmente. Além das aves, larvas de insetos também foram observadas em sementes, alimentando-se destas.

E. candolleana D.C. (ameixa-da-mata), ainda é pouco estudada, as sementes não toleram desidratação e, consequentemente, assim como ocorre com as sementes de outras espécies de *Eugenia*, não podem ser armazenadas por longos períodos (Barbedo, 2018; Amorim et al., 2020). Também como as sementes de outras espécies desse gênero, as de *E. candolleana* apresentam capacidade de regenerar novas raízes e plântulas após serem eliminadas as primeiras germinações e os primeiros desenvolvimentos (Alonso et al., 2019; Alonso e Barbedo, 2020). Essa capacidade de regenerar raízes, ou mesmo plântulas inteiras, também foi observada quando as sementes passaram por restrição hídrica, podendo regenerar novas raízes a partir de tecidos preservados úmidos no interior da semente de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* (Inocente e

Barbedo, 2019).

Sementes de *Eugenia* têm potencial para gerar novas raízes e até plantas inteiras mesmo após remoção de grande parte das reservas (Prataviera et al., 2015). Há evidente interesse na compreensão dos fatores envolvidos nessa capacidade regenerativa que permitem a formação de novas plântulas quando a semente é fracionada (Teixeira e Barbedo 2012, Prataviera et al. 2015, Calvi et al. 2017, Alonso et al. 2019). Após o fracionamento, a capacidade regenerativa em sementes foi observada também em *Garcinia*, da família Clusiaceae (Joshi et al., 2006; Asomaning et al., 2011).

Nas sementes de *Eugenia*, o fracionamento pode resultar em valores superiores a 100% de germinação, quando se considera o número de raízes obtidas nas frações em relação ao número de sementes colocadas para germinar, pois duas ou mais frações da mesma semente podem produzir raízes. Em outras palavras, uma mesma semente pode produzir mais de uma raiz, se cada fração germinar. Curiosamente, porém, a germinação dificilmente ultrapassa 100% quando essas sementes não são fracionadas, sugerindo algum mecanismo de controle interno da germinação, impedindo que as reservas sejam gastas em várias germinações simultâneas (Amador e Barbedo, 2015). A capacidade de regeneração de estruturas e de autocontrole de germinações simultâneas e a quantidade de reservas superior à necessária para a formação de uma plântula podem estar relacionadas com alguma pressão de seleção natural que garante o estabelecimento da plântula mesmo quando o ambiente não é favorável a isso nas primeiras germinações, como a predação ou condição de déficit hídrico. Estudos indicam que, para espécies do gênero *Eugenia*, mesmo quando uma semente é consumida quase totalmente por um inseto, ainda mantém reservas suficientes para produção de uma plântula, preservando sua capacidade de propagação e estabelecimento da espécie, por meio de sucessivas germinações (Teixeira e Barbedo 2012, Alonso et al., 2019).

Foi mostrado, ainda, para algumas espécies de *Eugenia*, que a capacidade regenerativa dessas sementes está presente durante um longo período, desde as sementes ainda imaturas até as que já iniciaram a germinação (Teixeira e Barbedo 2012; Delgado e Barbedo, 2020). Contudo, os limites de regeneração de novas estruturas e o tempo de cada regeneração, que poderiam aumentar a permanência e conservação dessas sementes no ambiente, ainda são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo neste estudo foi analisar os limites das regenerações de novas raízes e plântulas em sementes inteiras e fracionadas de *Eugenia candolleana,* em diferentes estádios de maturação e após o armazenamento.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal - No período de janeiro a maio de 2019, foram coletados frutos de *E. candolleana,* provenientes de matrizes localizadas no Jardim Botânico de São Paulo (JB, figura 1A), no município de São Paulo (23°38’27.38’’S e 46°37’34.57’’W) e em propriedade privada na cidade de Rio Claro (RC, figura 1B) (22°43’23’’S e 44°08’08’’W), ambos no Estado de São Paulo. Após as coletas, os frutos foram levados para o Laboratório de Sementes do Jardim Botânico para classificação e, em seguida, as sementes foram extraídas.

Após medição com auxílio de paquímetro digital, os frutos do JB foram separados em cinco estádios de maturação de acordo com a coloração do epicarpo. Frutos totalmente verdes, que constituíram o estádio 1 (E I), foram descartados por serem em número muito reduzido. Frutos que apresentaram 75% do epicarpo com coloração verde, foram considerados pertencentes ao estádio 2 (E II); os que tinham 75% de epicarpo de coloração vermelha, estádio 3 (E III); frutos totalmente vermelhos, estádio 4 (E IV); e frutos com 75 a 100% de coloração roxa, estádio 5 (E V) (figura 1A).

A extração das sementes dos frutos foi manual, retirando-se os resíduos de polpa com auxílio de peneira e água e o excesso de água com papel toalha. Em seguida, as

sementes foram armazenadas em sacos de polietileno, perfurados e sob baixa temperatura (10 ±2 °C), até a instalação dos experimentos, não excedendo o prazo de sete dias para JB.

Os frutos de RC foram coletados totalmente maduros (figura 1B), as sementes extraídas e armazenadas conforme descrito acima, por um período de seis meses.

Avaliações físicas e fisiológicas - o teor de água (em %, base úmida) e a massa seca (g. semente^{-1}) das sementes foram determinados pelo método da estufa a 105 °C por 24 horas (Brasil, 2009), com quatro repetições de dez sementes. O potencial de água das sementes foi obtido em potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Inc., Pullman) com base na temperatura do ponto de orvalho.

Os testes de germinação, com avaliações diárias, foram realizados em sala de germinação controlada, com luz branca contínua, a 25 °C. As sementes foram acondicionadas em caixas plásticas (gerbox) contendo uma camada de dois centímetros de vermiculita como substrato, previamente umedecida com água até o limite de saturação. Considerou-se germinada a semente com emissão de 0,5 cm de raiz primária; para o desenvolvimento de plântula, foi considerada a formação de plântula normal, sem defeitos (Inocente e Barbedo, 2021).

Limite da regenerabilidade de raízes e plântulas em sementes em diferentes estádios de maturação - sementes inteiras e fracionadas, de E II a E V, foram colocadas para germinar em vermiculita umedecida, conforme descrito anteriormente. Para o fracionamento, utilizou-se bisturi cirúrgico para cortá-las ao meio longitudinalmente, passando pelo hilo, avaliando-se apenas metade de cada semente, como forma de reduzir a massa cotiledonar (Figura 1C).

No momento em que as raízes primárias oriundas das sementes atingiram 1,5 cm, foram eliminadas com auxílio de bisturi cirúrgico. Após a eliminação, as sementes retornaram para as caixas plásticas para verificar a capacidade em regenerar novas raízes.

As sementes que regeneraram novas raízes, tiveram esta raiz novamente removida quando atingiu 1,5 cm e retornaram para a caixa de germinação. Este processo foi repetido até que as sementes produzissem a sétima raiz (ou seja, a sexta raiz regenerada). Dessa forma, foram conduzidos os seguintes tratamentos: SE = sem eliminação de raízes; ER1 = eliminação da raiz da primeira germinação; ER2 = eliminação da primeira raiz regenerada; ER3 = eliminação da segunda raiz regenerada; ER4 = eliminação da terceira raiz regenerada; ER5 = eliminação da quarta raiz regenerada; ER6 = eliminação da quinta raiz regenerada; ER7 = eliminação da sexta raiz regenerada (figura 2).

O mesmo procedimento foi realizado para avaliar a regeneração de plântulas inteiras, eliminando-se plântulas quando estas atingiram 2,5 cm de parte aérea. Esses tratamentos foram representados por SE, EP1, EP2 e EP3 (figura 2).

Limite da regenerabilidade de raízes e plântulas em sementes armazenadas - sementes inteiras de *E. candolleana*, oriundas de frutos totalmente maduros, foram mantidas armazenadas em sacos de polietileno semiperfurados sob baixas temperaturas (10 ±2 °C) por seis meses, até a instalação dos experimentos de regenerabilidade. Após esse período, foram colocadas para germinar como no experimento anterior e, foram submetidas aos mesmos tratamentos de SE a ER6 e de SE a EP2 (figura 2).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de vinte e cinco sementes para todos os testes. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

O diâmetro de frutos e das sementes, assim como o teor de água e o conteúdo de massa seca das sementes, não apresentaram diferenças entre os estádios de maturação estudados (Figura 3). A massa fresca das sementes foi ligeiramente maior em E III. Esses dados sugerem que há pouca diferença no grau de maturidade das sementes entre as oriundas dos frutos mais imaturos (E II) e dos mais maduros (E V), como já verificado também em outra espécie do gênero (Lamarca et al., 2013). Os dados de germinação e de formação de plântulas normais (figura 4, SE) reforçam essa pequena diferença entre os estádios de maturação. Apenas o potencial de água apresentou substancial diferença, especialmente entre as sementes de frutos mais imaturos em relação às demais (figura 3 D), cujo potencial foi bem menor, talvez por estarem no início da formação, recebendo maior quantidade de assimilados da planta mãe, tornando a água presente na semente com maior concentração de solutos e, portanto, com diminuição da fluidez do meio aquoso (Marcos-Filho, 2015; Alonso et al., 2019).

A regeneração de raízes em sementes inteiras ocorreu até a remoção da terceira raiz em todos os estádios de maturação e até a quarta raiz nos estádios II e IV (Figura 4A), mas foi menor para a regeneração de plântulas (Figura 4B). A capacidade regenerativa de novas raízes após eliminação das primeiras raízes, em sementes de *E. candolleana*, pode estar relacionada à uma pressão de seleção (evolutiva) em que se expressou através da grande quantidade de reservas que essas sementes possuem (Teixeira e Barbedo, 2012), bem como à capacidade de produzirem novas raízes a partir de células do cotilédone (Delgado et al., 2022), permitindo que essas sementes possam ser predadas e, ainda assim, continuem capazes de germinar.

Essa característica pode ser compreendida, também, como forma alternativa à secagem clássica do final da maturação, típica das sementes tolerantes à dessecação

(ortodoxas). Evolutivamente, cada espécie foi se adaptando às curvas de modificação das características durante a maturação conforme as condições do ambiente (Guardia et al., 2018; Barbedo, 2018; Barbedo, 2021). Em espécies de *Eugenia*, o grande acúmulo de reservas e a aquisição da capacidade regenerativa nas sementes ainda muito imaturas (Teixeira e Barbedo, 2012) pode ter permitido que a espécie se perpetuasse no ambiente por meio de sucessivas germinações a partir da mesma semente. A grande vantagem dessa estratégia é a permanência no ambiente, mesmo que adverso, por longos períodos. Em relação a isso, é curioso notar que a cada nova formação de raízes e/ou plântulas, quando alguma raiz/plântula é perdida, há aumento no tempo necessário para essa nova formação (figura 5). Portanto, quando há perda de uma raiz germinada ou plântula formada, não apenas há possibilidade de que uma nova raiz/plântula seja produzida como, ainda, o tempo para essa nova produção será maior que o tempo para a produção da anterior. Isso prolonga ainda mais o período em que a semente pode permanecer no ambiente em condições de estabelecer a espécie. Por serem sementes sensíveis à dessecação (recalcitrantes), não poderiam formar bancos de sementes no solo, como ocorre com muitas espécies com sementes ortodoxas, pois teriam que germinar prontamente ou se deteriorariam rapidamente (Barbedo, 2018). Contudo, a capacidade de produzir germinações sucessivas, associada aos mecanismos de tolerância a déficits hídricos do ambiente (Inocente e Barbedo, 2019) e, inclusive, de regenerar raízes e plântulas sob déficit hídrico (Inocente e Barbedo, 2021), produz efeito similar ao banco de sementes no solo, talvez até que a nova safra de sementes seja dispersa.

Quando uma fração da semente é eliminada, ou seja, quando suas reservas nutricionais são reduzidas pela metade, simulando um ataque herbívoro, como se um inseto ou ave tivesse consumido a metade das reservas da semente, ainda assim as sementes são capazes de regenerar novas raízes (Figura 6 A) e novas plântulas (Figura 6 B). A

regeneração ocorreu em sementes fracionadas, observando-se a produção de terceira raiz em todos os estádios de maturação e até a quarta raiz para E III, indicando que essas sementes possuem muito mais massa cotiledonar do que o necessário para somente uma germinação (Barbedo, 2018; Delgado e Barbedo, 2020). Teixeira e Barbedo (2012), destacaram a importância e influência que o estádio de maturação exerce sobre a capacidade regenerativa em sementes de *Eugenia*, porém a intensidade da influência depende da espécie e do grau de maturação, as maduras com maior capacidade regenerativa que as imaturas.

O tempo das regenerações em metade das sementes também foi ampliado. Após a primeira eliminação de raiz (ER1), a segunda raiz regenerou em 64, 61 e 60 dias para os estádios II, III e IV, respectivamente (Figura 7 A). Enquanto isso, na produção de plântulas (Figura 7 B), quando a primeira plântula foi eliminada, a segunda regenerou em 180 dias para os estádios II e III, 144 dias para o estádio IV e no estádio V nem houve regenerações de segunda plântula (Figura 7 B). Esses dados indicam que sementes de *E. candolleana* apresentam alta capacidade regenerativa, produzindo raízes e plântulas a partir de sementes com redução de sua massa cotiledonar, como verificado em outras espécies do gênero (Teixeira e Barbedo, 2012; Prataviera et al., 2015; Amorim et al., 2020; Delgado e Barbedo, 2020), podendo permanecer mais tempo no ambiente (Alonso et al., 2019; Alonso e Barbedo, 2020), possibilitando a sobrevivência sob condições ambientais desfavoráveis.

As sementes de *E. candolleana* do JB apresentaram valores iniciais de germinação e formação de plântulas normais abaixo dos normalmente encontrados para a espécie (Alonso et al., 2019). Isso pode ser resultado de condições desfavoráveis do ambiente durante a formação e maturação das sementes (Marcos-Filho, 2015; Guardia et al., 2018). Portanto, sementes com qualidade inicial mais elevada poderiam resultar em regeneração de raízes e plântulas ainda melhores. As de RC, por exemplo, mesmo após armazenamento

apresentaram valores elevados de germinação e produção de plântulas normais (figura 8). Após as eliminações de raízes e plântulas, essas sementes também apresentaram alta capacidade regenerativa, produzindo até a sétima raiz (Figura 8 A).

Considerando as múltiplas e sucessivas germinações, as sementes de RC seriam capazes de permanecer maior tempo no campo, como estratégia de propagação para essa espécie (Barbedo, 2018; Alonso et al., 2019), como verificado pelos resultados de tempo necessário para cada regeneração (figura 9). Quando se avaliou a produção de plântulas, a regeneração pode ser observada apenas até a terceira plântula. E, quando se observou o período das regenerações de novas raízes, percebeu-se que o tempo de cada regeneração de raiz foi aumentando à medida que cada eliminação de raiz ocorria. Assim, a primeira raiz precisou de 4 dias para ser produzida, entretanto, a sétima raiz foi produzida em 245 dias, ou seja, 241 dias distanciaram a primeira raiz da última raiz regenerada neste experimento. Essas sementes passaram cerca de oito meses tentando produzir uma nova raiz (Figura 9 A), este tempo somado aos seis meses de armazenamento, totaliza 14 meses que a semente sobreviveu e ultrapassou o período até a próxima safra (Barbedo, 2018; Alonso e Barbedo, 2020).

Com relação à produção de novas plântulas, as sementes de *E. candolleana* armazenadas, também apresentaram ampliação do tempo das regenerações. Após a primeira eliminação de plântula, a semente precisou de 75 dias para produzir a segunda plântula e 167 dias para produzir a terceira, equivalente a quase 5 meses e meio em que a semente permaneceu tentando produzir uma nova plântula (Figura 9 B). Estes dados mostram também que, mesmo após terem sido armazenadas por seis meses, ainda preservaram a capacidade em regenerar novas raízes por sucessivas vezes.

Neste estudo, observou-se que a capacidade regenerativa pode ter ampliado o tempo de permanência dessas sementes no solo, regenerando sucessivas vezes, podendo dessa

maneira, produzir novas raízes ou plântulas à medida que fossem perdidas através da predação (Barbedo 2018; Alonso e Barbedo, 2020).

Conclusão

As sementes de *Eugenia candolleana* mostraram que regeneram raízes e plântulas mesmo com redução de sua massa cotiledonar pela metade, mantendo a capacidade de germinar sucessivas vezes, quando as primeiras raízes produzidas são perdidas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o senhor José Guardia pela doação de sementes e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pela bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor, e ao Instituto de Pesquisas Ambientais, pela permissão para as coletas.

Referências

ALONSO, C.R.; BARBEDO, C.J. Germinações sucessivas em sementes de *Eugenia* spp. *Hoehnea*, v.47, e412019, 2020. https://doi.org/10.1590/2236-8906-41/2019

ALONSO, C.R.; ASPERTI, L.M.; GUARDIA, M.C.; BARBEDO, C.J. Cutting and regeneration of roots and seedlings from seeds of *Eugenia candolleana* DC. at different maturity stages. *Journal of Seed Science*, v.41, n.2, p.160-167, 2019. http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v41n2200571

AMADOR, T.S.; BARBEDO, C.J. Germination inhibits the growth of new roots and seedlings in *Eugenia uniflora* and *Eugenia brasiliensis*. *Journal of Seed Science*, v.37, p.241-247, 2015. http://www.scielo.br/pdf/jss/v37n3/2317-1537-jss-37-03-2317_1545v37n3150595.pdf

AMORIM, I.P.; SILVA, J.P.N.; BARBEDO, C.J. As sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) e seus novos conceitos sobre propagação. *Hoehnea*, v.47, e292020, 2020. http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-29/2020

ASOMANING, J.M.; OLYMPIO, N.S.; SACANDE, M. Desiccation sensitivity and germination of recalcitrant *Garcinia kola* Heckel seeds. *Research Journal of Seed Science*, v.4, p.15-27, 2011. http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/rjss/2011/15-27.pdf

BARBEDO, C.J. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science*, v.40, n.3, p.221-236, 2018. https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n3207201

BARBEDO, C.J. *A recalcitrância da semente*. São Paulo: Archangelus, 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA, 2009. 395p. http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-paraanalise-de-sementes.pdf/view

CALVI, G.P.; AUD, F.F.; FERRAZ, I.D.K.; PRITCHARD, H.W.; KRANER, I. Analyses of several seed viability markers in individual recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh with totipotent germination. *Plant Biology*, v.19, p.6-13, 2017. https://doi.org/10.1111/plb.12466

CASTRO, E.R.; GALETTI, M. Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú *Tupinambis merianae* (Reptilia: Teiidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, v.44, p.91-97, 2004. https://doi.org/10.1590/S0031-10492004000600001

CHRISTIANINI, A.V.; MARTINS, M.M. Frugivoria e dispersão de sementes. In: PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B.; SILVA, A. (orgs.) Sementes Florestais Tropicais. Londrina: ABRATES, p.83-101, 2015.

DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Regeneração de raízes e plântulas de sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) de diferentes estádios de maturação. *Hoehnea*, v.47, e042020, 2020. https://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-04/2020

DELGADO, L.F.; TEIXEIRA, S.P.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; BARBEDO, C.J. The origin of new roots from cut seeds of *Eugenia* species. *Journal of Seed Science*, v.44, e202244014, 2022. http://dx.doi.org/10.1590/ 2317-1545v44260855

FERNANDES, T.; MACHADO, DNS.; SOUZA, MC.; BÜNGER, M.; BARROS, AAM.; PRIETO, PV.; BRAGA, J.M.A. Two new species of *Eugenia* (Myrtaceae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Kew Bulletin*, v.78, p. 95-105, 2023. https://www.researchgate.net/publication/367805097 DOI 10.1007/S12225-022-10070-Z

GUARDIA, M.C.; ASPERTI, L.M.; FIDALGO, A.O.; GARCIA, V.A. Produção e obtenção de sementes. In: BARBEDO, C.J.; SANTOS-JUNIOR, N.A. (orgs.) Sementes do Brasil: produção e tecnologia para a flora brasileira. São Paulo: Instituto de Botânica, p.41-62, 2018.

INOCENTE, M.C.; BARBEDO, C.J. Germination of *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*,

E. pyriformis, and *E. uniflora* (Myrtaceae) under water-deficit conditions. *Journal of Seed Science*, v.41, p.76-85, 308. 2019. https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n1212109

INOCENTE, M.C.; BARBEDO, C.J. Regeneration of roots and seedlings from *Eugenia involucrata* seeds under water deficit conditions. *Journal of Seed Science*, v.43, e202143015. 2021. https://doi.org/10.1590/2317-1545v43248394

JOSHI, G.; KUMAR, A.N.A.; GOWDA, B.; SRINIVASA, Y.B. Production of supernumerary plants from seed fragments in *Garcinia* gummi-gutta: evolutionary implications of mammalian frugivory. *Current Science*, v.91, p.372-376, 2006. https://www.jstor.org/stable/24094148

LAMARCA, E.V.; OLIVEIRA-JUNIOR, C.J.F.; BARBEDO, C.J. Etnobotânica na conservação de espécies com sementes sensíveis à dessecação: o exemplo da *Eugenia brasiliensis* Lam. *Hoehnea*, v.47, e372019, 2020. https://doi.org/10.1590/2236-8906-37/2019

LAMARCA, E.V.; PRATAVIERA, J.S.; BORGES, I.F.; DELGADO, L.F.; TEIXEIRA, C.C.; CAMARGO, M.B.P.; FARIA, J.M.R.; BARBEDO, C.J. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.85, p.223-233, 2013. http://www.scielo.br/pdf/aabc/v85n1/0001-3765-aabc-85-01-223.pdf

MARCOS-FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Londrina: ABRATES, 2015.

MAZINE, F.F., VALDEMARIN, K.S., BÜNGER, M., FARIA, J.E.Q., FERNANDES, T., GIARETTA, A., SANTANA, K.C., SOBRAL, M. & SOUZA, M.A.D. 2020. *Eugenia* in Flora do Brasil 2020 em construção. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro.* http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB36910

PRATAVIERA, J.S., LAMARCA, E.V., TEIXEIRA, C.C.; BARBEDO, C.J. The

germination success of the cut seeds of *Eugenia pyriformis* depends on their size and origin. *Journal of Seed Science*, v.37, p.47-54. 2015. https://doi.org/10.1590/2317-1545v37n1141425

TEIXEIRA, C.C.; BARBEDO, C.J. The development of seedlings from fragments of monoembryonic seeds as an important survival strategy for *Eugenia* (Myrtaceae) tree species. Trees, Structure and Function, v.26, p.1069-1077, 2012. http://dx.doi.org/10.1007/s00468-011-0648-5

WILSON, P.G. Myrtaceae. *In*: K. Kubitzki (Ed.) The Families and Genera of Vascular Plants, *Flowering Plants - Eudicots Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae*, vol. 10. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 212–271, 2011.

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-14397-7_14

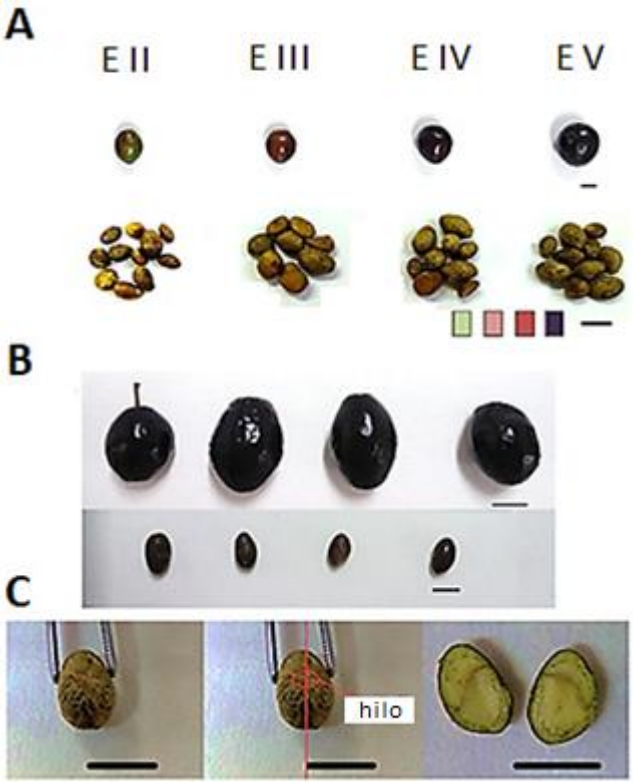

Figura 1: Frutos e sementes de *E. candolleana*, separados em quatro estádios de maturação (A); frutos e das sementes de *E. candolleana*, totalmente maduras, armazenadas por seis meses (B) e semente inteira, indicando o hilo e o local a ser fracionada, no sentido longitudinal da semente (C). Escala 1cm

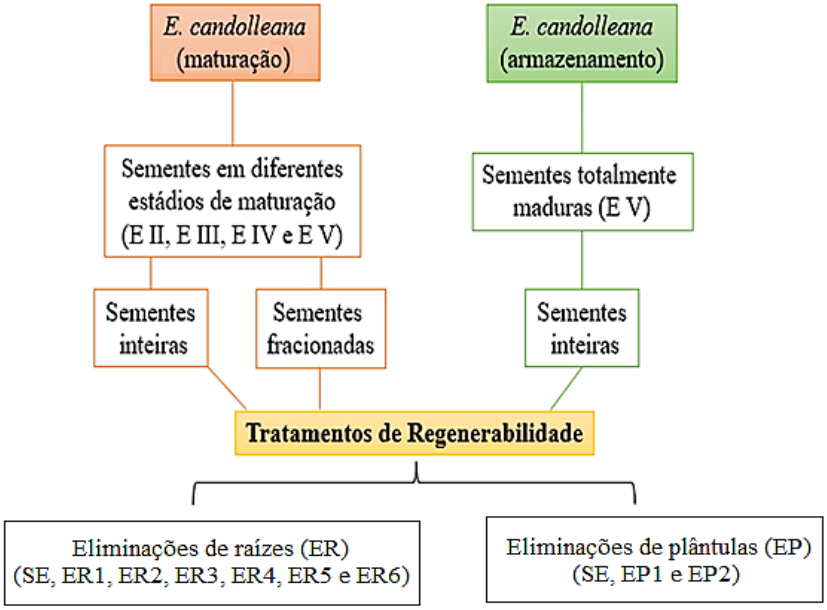

Figura 2. Fluxograma da sequência dos tratamentos de regenerabilidade aplicados às sementes de *E. candolleana.*

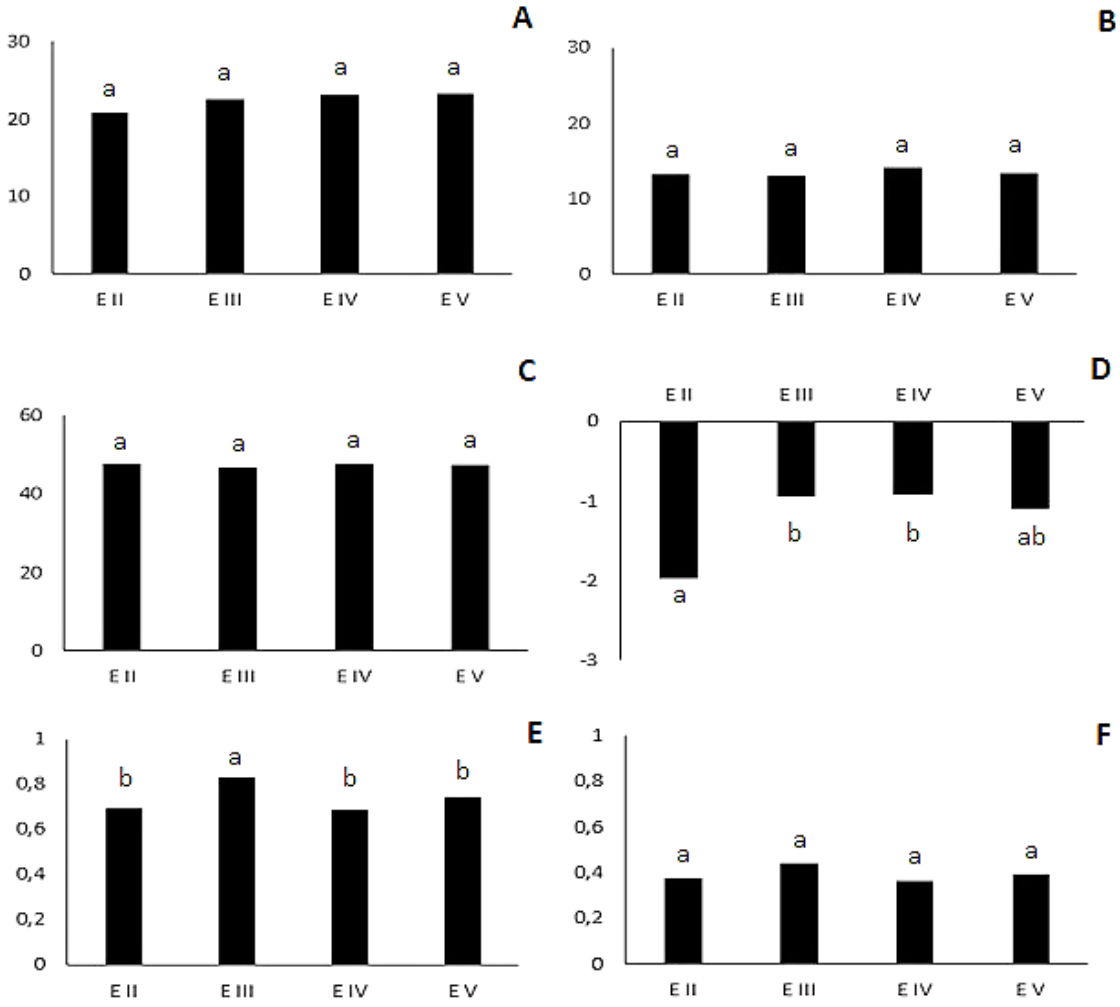

Figura 3. Diâmetro dos frutos (A) e das sementes (B) expressos em milímetros (mm); teor de água (C) expressos em porcentagem (%), potencial hídrico expresso em megapascal (MPa) (D); massas fresca (E) e seca (F), expressas em g. semente^{-1}, de *E. candolleana* DC., de acordo com os diferentes estádios de maturidade fisiológica, em que, E II = estádio 2; E III= estádio 3; E IV= estádio 4 e E V= estádio 5. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

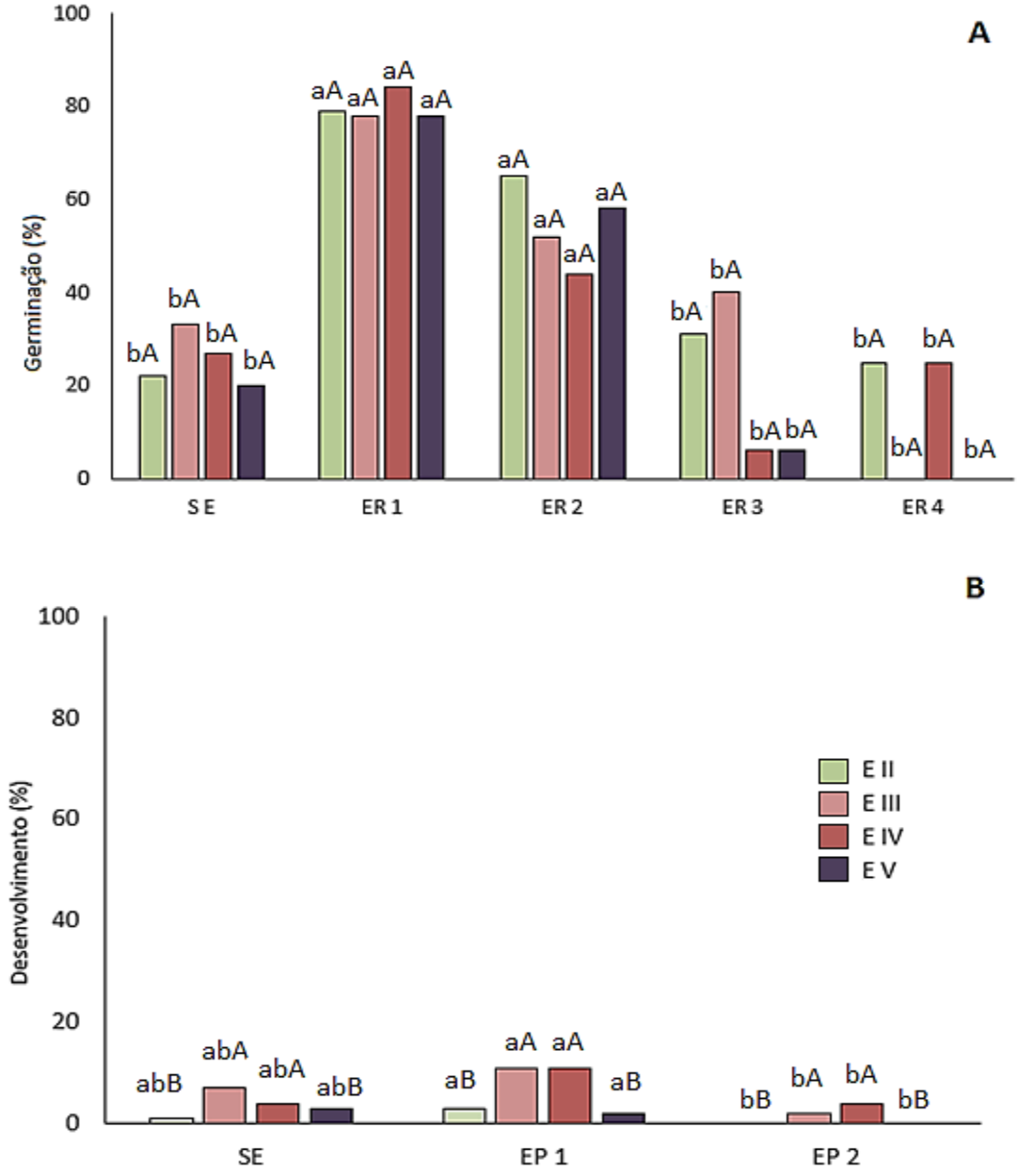

Figura 4. Regeneração de raízes em sementes inteiras de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação, descritos como: E II, E III, E IV e E V. SE, ER1, ER2, ER3 e ER4 referem-se aos tratamentos de regenerabilidade de raízes (SE= sem eliminações; ER1= eliminação da primeira raiz; ER2= eliminação da segunda raiz; ER3= eliminação da terceira raiz e ER4= eliminação da quarta raiz) (A); regeneração de plântulas em sementes inteiras de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação (E II, E III, E IV e E V) e tratamentos de regenerabilidade de plântulas (SE, EP1 e EP2, SE= sem eliminações; EP1= eliminação da primeira plântula e EP2= eliminação da segunda plântula) (B); Letras minúsculas comparam as eliminações e as letras maiúsculas comparam os estádios de maturação.

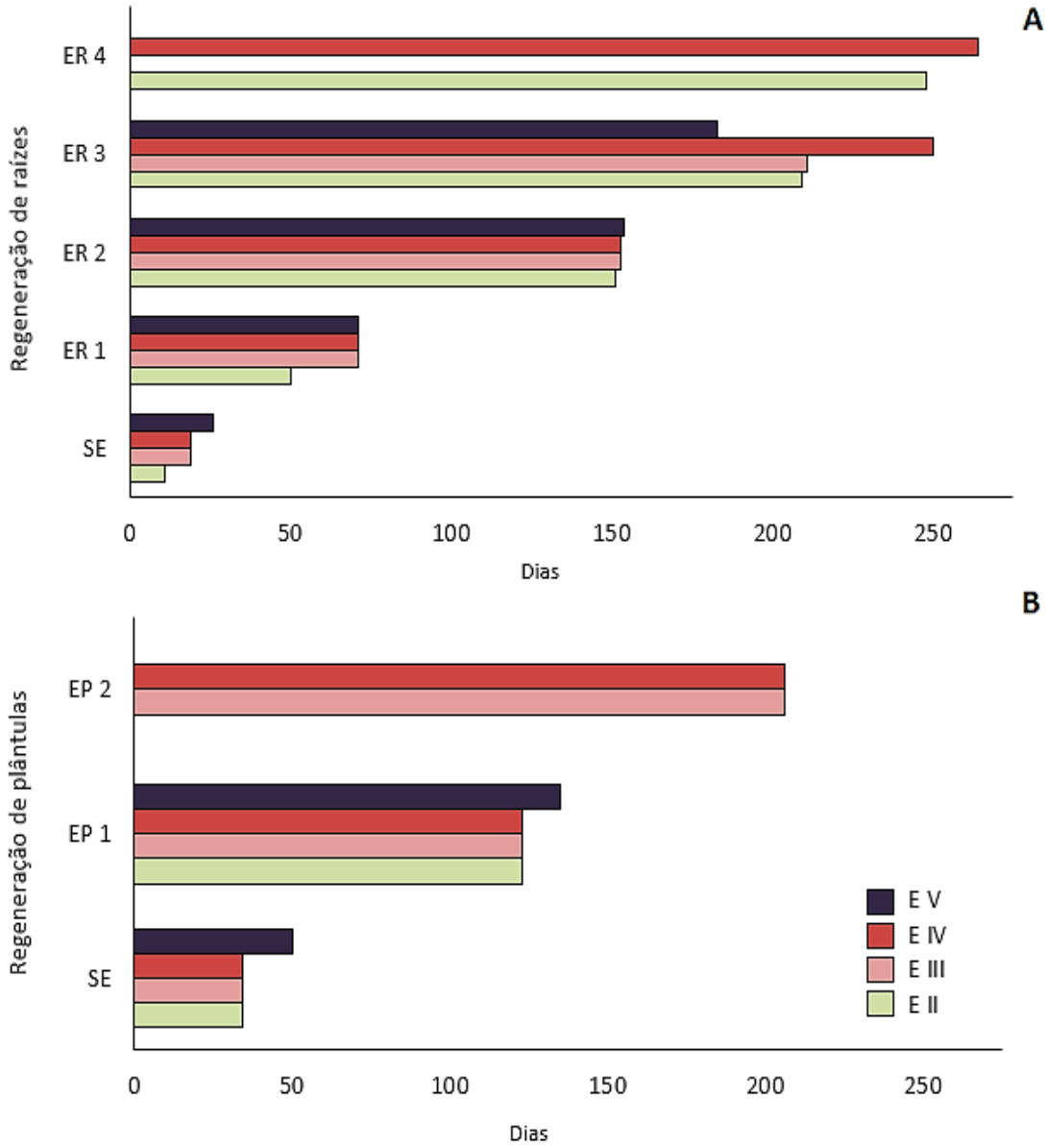

Figura 5. Tempo (dias) para regeneração de novas raízes (A) e novas plântulas (B) em sementes inteiras de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação.

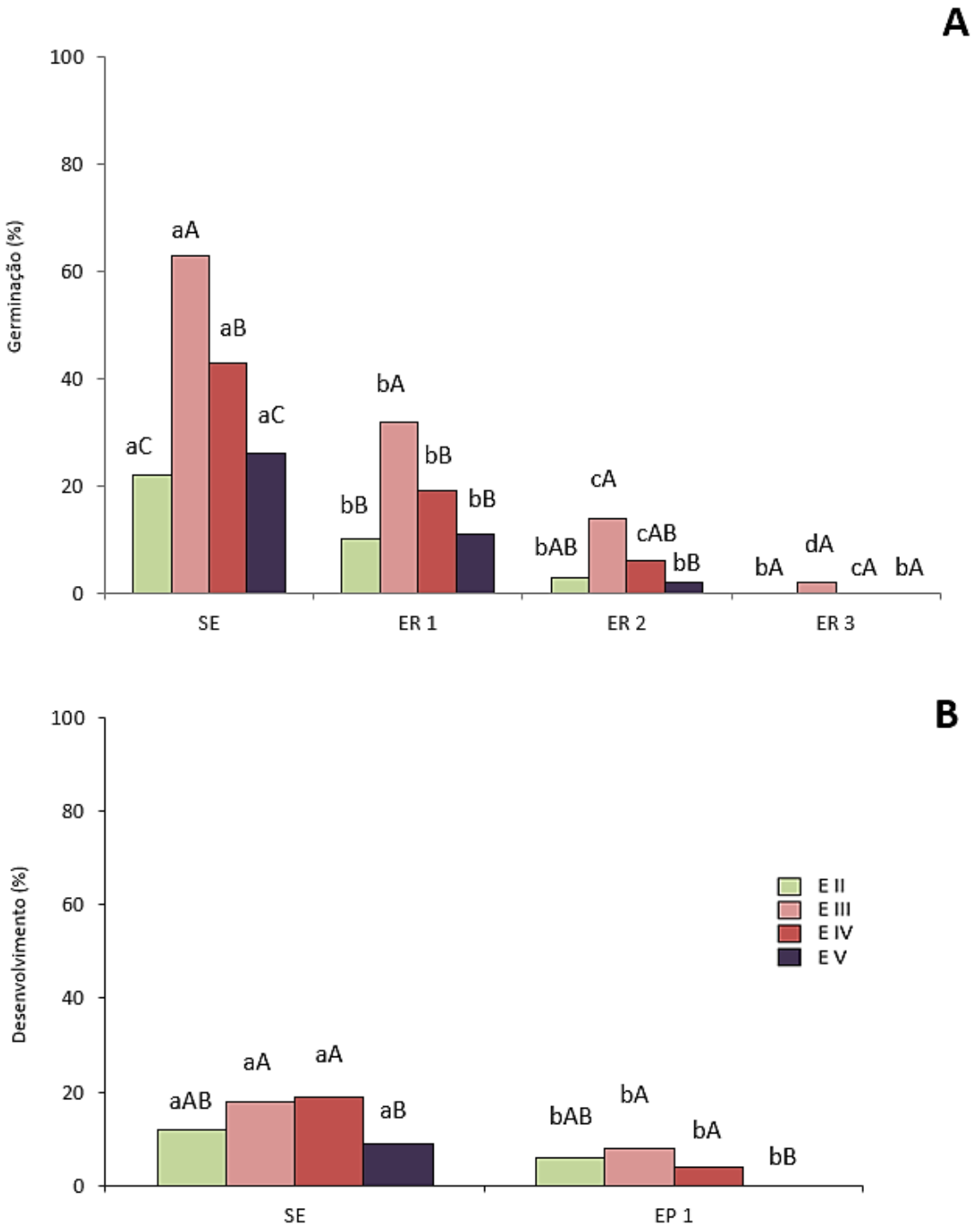

Figura 6. Regeneração de raízes em sementes fracionadas de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação, descritos como: E II, E III, E IV, E V e SE, ER1, ER2 e ER3, referem-se aos tratamentos de regenerabilidade de raízes (SE = sem eliminações; ER1 = eliminação da primeira raiz; ER2 = eliminação da segunda raiz e ER3 = eliminação da terceira raiz) (A); regeneração de plântulas em sementes fracionadas de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação (SE, EP1 e EP2, em que SE= sem eliminações; EP1= eliminação da primeira plântula e EP2= eliminação da segunda plântula) (B). Médias seguidas pela

mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Letras minúsculas comparam as eliminações e as letras maiúsculas comparam os estádios de maturação.

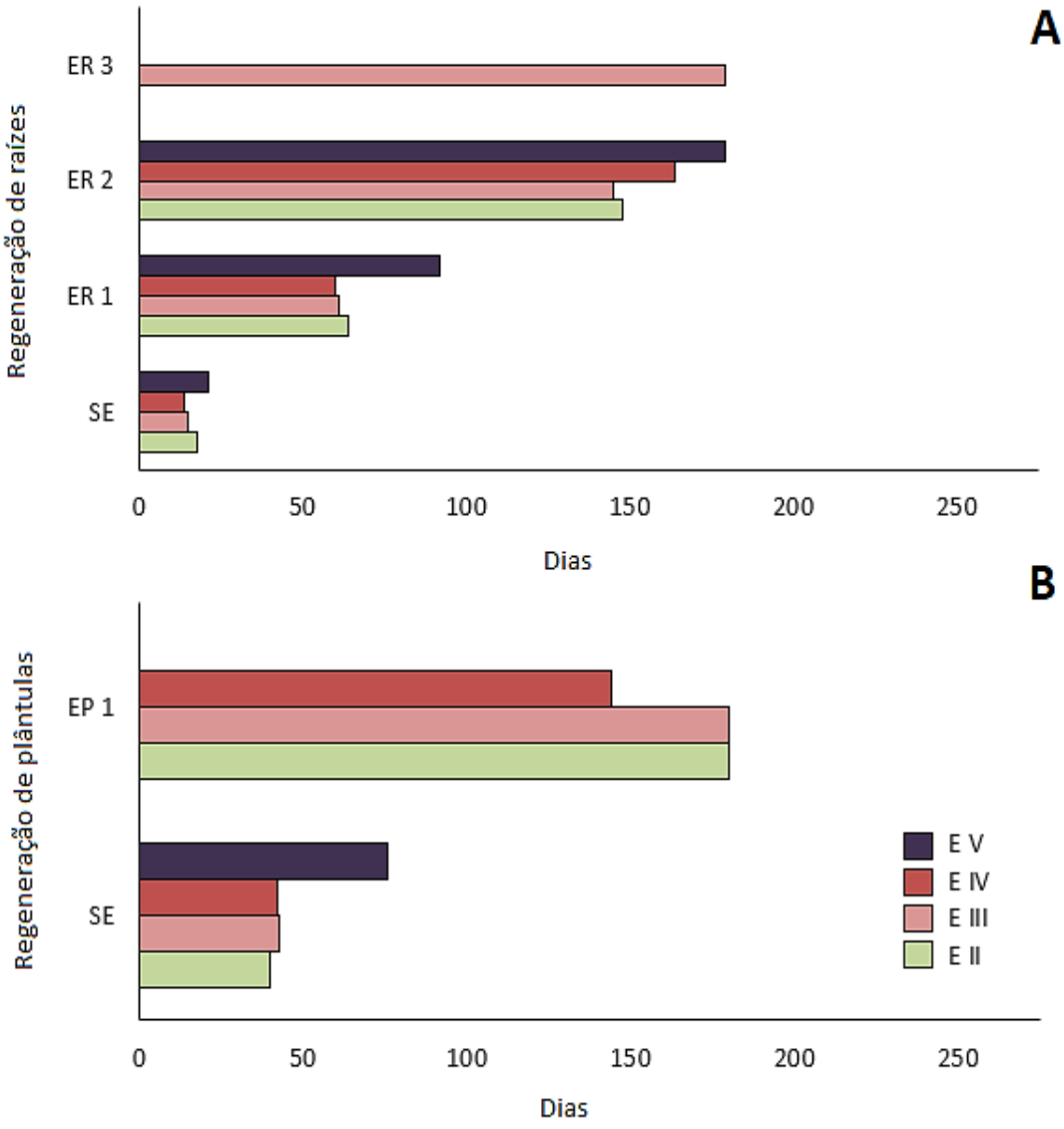

Figura 7. Tempo (dias) para regeneração de raízes (A) e plântulas (B), em sementes fracionadas de *E. candolleana*, em diferentes estádios de maturação.

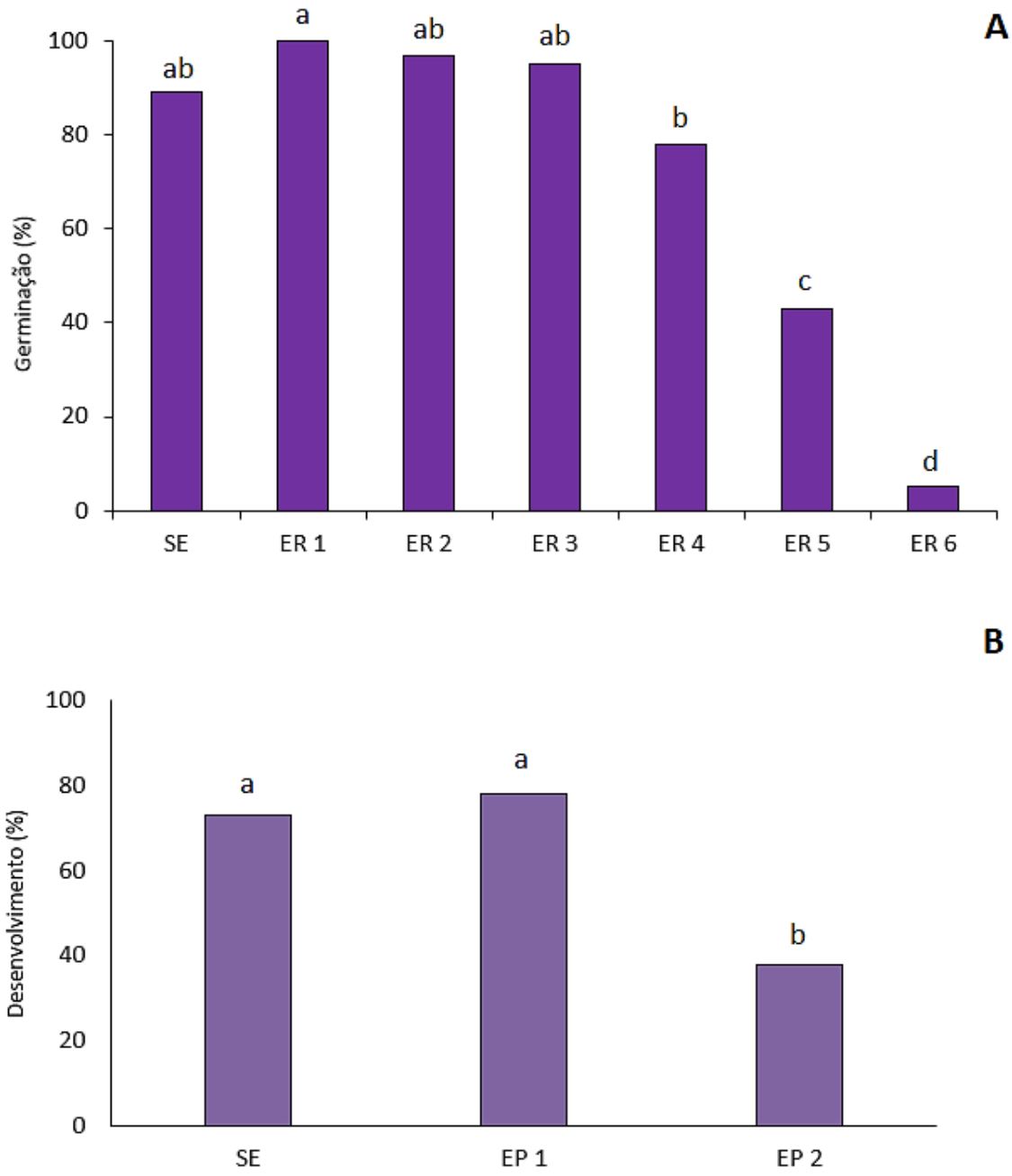

Figura 8. Regeneração de raízes em sementes inteiras e maduras de *E. candolleana*, armazenadas sob baixa temperatura por seis meses. SE, ER1, ER2, ER3, ER4, ER5 e ER6 são tratamentos de regenerabilidade de raízes (SE= sem eliminações; ER1= eliminação da primeira raiz; ER2= eliminação da segunda raiz; ER3= eliminação da terceira raiz; ER4= eliminação da quarta raiz; ER5= eliminação da quinta raiz e ER6= eliminação da sexta raiz) (A) e SE, EP1 e EP2 são tratamentos de regenerabilidade de plântulas (SE= sem eliminações; EP1= eliminação da primeira plântula e EP2= eliminação da segunda plântula) (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%)

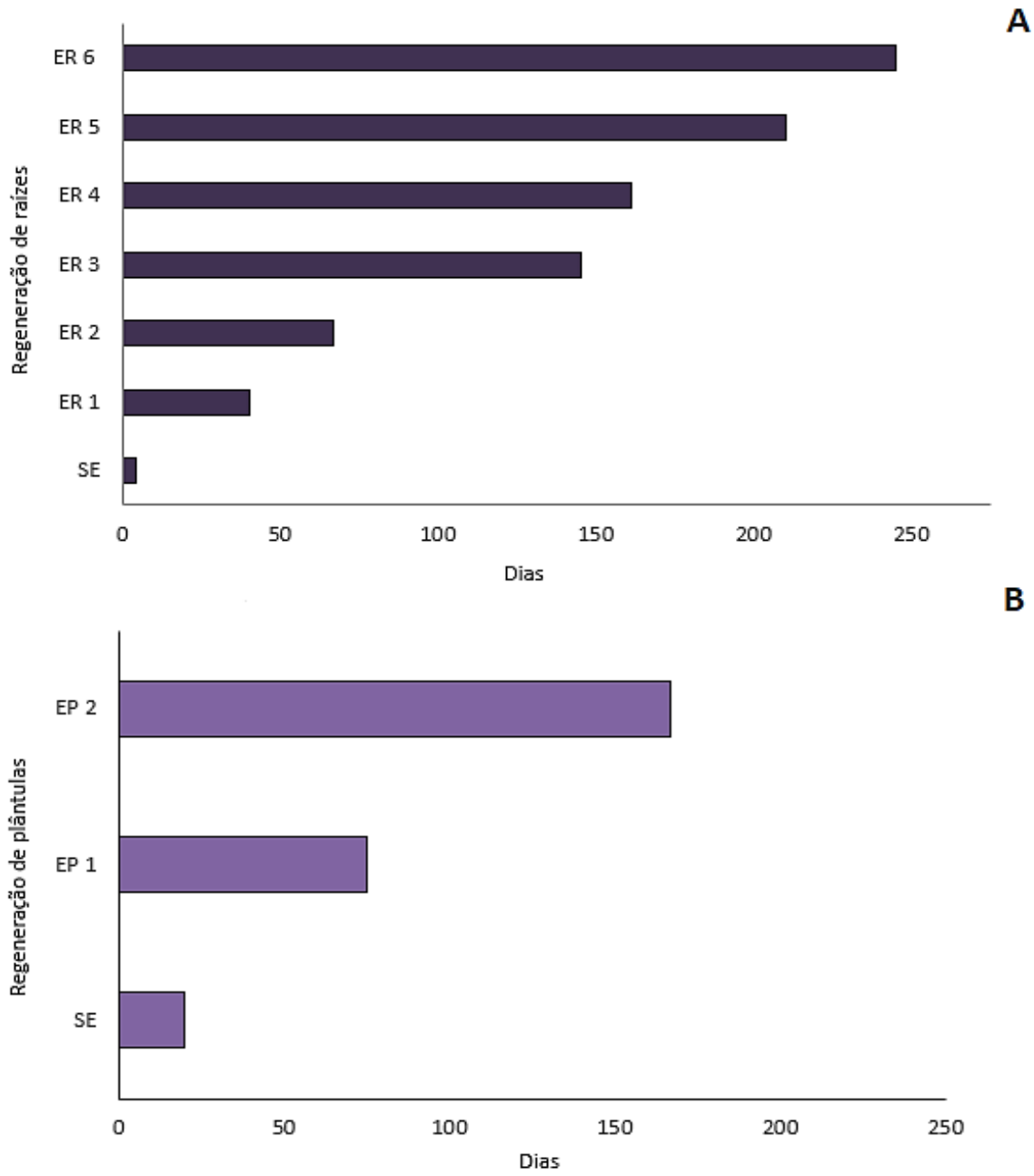

Figura 9. Tempo (dias) para regeneração de raízes (A) e plântulas (B) em sementes inteiras e maduras de *E. candolleana*.

CAPÍTULO II

Viabilidade e regeneração em sementes de *Eugenia* spp. submetidas ao armazenamento

Viabilidade e regeneração em sementes de *Eugenia* spp. submetidas ao armazenamento

Camila Rivero Alonso [(1)]; Claudio José Barbedo [(1)]

Resumo - As sementes do gênero *Eugenia* apresentam baixa longevidade em armazenamento, pois não toleram dessecação a níveis que reduzam o metabolismo e impeçam o início da germinação. Em estudos anteriores verificou-se que a maior parte dessas sementes perde a viabilidade após nove meses sob condições de refrigeração. Neste estudo avaliou-se a manutenção da regenerabilidade em sementes de *Eugenia* spp. após armazenamento, visando a prolongar a longevidade das sementes, aumentando a conservação *ex situ*. A princípio, sementes de *Eugenia uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis* foram armazenadas a 10 ± 1 °C por nove, oito e sete meses, respectivamente; após o período de armazenamento, realizou-se extração das primeiras raízes e plântulas. Em outro experimento, sementes de *E. involucrata* foram submetidas ao teste do envelhecimento acelerado a 42 ± 1 °C por 6, 12, 24 e 48 horas; após esses períodos, avaliou-se a capacidade regenerativa das sementes para raízes e plântulas. O tempo das novas raízes e plântulas também foi avaliado para ambos experimentos. O armazenamento não impediu a regeneração de novas raízes e plântulas, porém, parece ter atrasado a quantidade de regenerações e aumentado o tempo de regeneração de uma raiz. Provavelmente, essa capacidade permitiu que as sementes pudessem passar por sucessivas germinações, garantindo a propagação e resistindo à herbivoria. Essa característica pode ser compreendida, ecologicamente, como forma alternativa à secagem, permitindo que a espécie se perpetue no ambiente por meio de sucessivas germinações a partir da mesma semente.

Palavras-chave: estratégia ecológica, Myrtaceae, semente recalcitrante.

Abstract - Seeds of the genus *Eugenia* have low longevity in storage, as they do not tolerate desiccation at levels that reduce their metabolism and prevent the beginning of germination. In previous studies it was found that most of these seeds lose viability after nine months even under refrigerated conditions. In this study, the maintenance of regenerability in seeds of *Eugenia* spp. that went through storage, aiming to prolong the longevity of the seeds, increasing the *ex-situ* conservation. At first, seeds of *Eugenia uniflora*, *E. involucrata* and *E. brasiliensis* were stored at 10 (±1 °C) for nine, eight and seven months, respectively. After the storage period, the first roots and seedlings were extracted. In another experiment, seeds of *E. involucrata* were submitted to the accelerated aging test at 42 (±1 °C) for 06, 12, 24 and 48 hours, after these periods, the regenerative capacity of the seeds for roots and seedlings was evaluated. The time of new roots and seedlings was also evaluated for both experiments. In general, storage did not prevent the regeneration of new roots and seedlings, however, it seems to have delayed the number of regenerations, as observed in *E. involucrata*, and also increased the regeneration time from one root to the next. Probably, such seeds adopted this ability to allow passing through successive germinations as a form of propagation, resisting herbivory and also due to the large amount of reserves they have. This characteristic can also be understood, ecologically, as an alternative to drying, allowing the species to perpetuate itself in the environment through successive germinations from the same seed.

Keywords: ecological strategy, Myrtaceae, recalcitrant seed.

Introdução

O armazenamento de sementes é considerado um grande desafio na conservação *ex situ* das sementes recalcitrantes. De maneira geral, o principal objetivo do armazenamento é a preservação da qualidade fisiológica das sementes, durante o período que permaneceram armazenadas (Ferreira e Borghetti, 2004; Carvalho e Nakagawa, 2012; Barbedo e Santos Junior, 2018).

Sementes recalcitrantes não suportam a dessecação, por isso são difíceis de serem armazenadas, pois, podem deteriorar rapidamente (Barbedo et al., 2013; Barbedo, 2018). A deterioração é um processo inevitável, que ocorre de maneira contínua e irreversível, não sendo possível recuperar a qualidade individual da semente (Delouche, 1963).

A literatura relata que sementes recalcitrantes de *Eugenia brasiliensis* puderam ser armazenadas por até 180 dias, em câmara fria a 7 °C (Kohama et al., 2006); já em outros estudos, foi possível preservar a viabilidade de sementes da mesma espécie em soluções de polietilenoglicol (PEG), a -1 e -2 MPa, por até 540 dias (Cécel et al., 2023).

Em geral, sementes tiveram que, com o decorrer da evolução, desenvolver estratégias que as mantivessem vivas por mais tempo, até que as condições fossem favoráveis para o desenvolvimento de novas plântulas. Contudo, por não passarem por secagem natural na planta-mãe as sementes recalcitrantes são dispersas com alto teor de água, dificultando a permanência no campo por longos períodos (Barbedo e Marcos-Filho, 1998). Além disso, particularmente para as espécies do gênero *Eugenia*, as sementes têm grande quantidade de predadores. Dessa maneira, é possível que a capacidade de regeneração de raízes e plântulas nessas sementes tenha sido uma adaptação como estratégia compensatória a tolerância à dessecação, com sementes que germinam por um longo período no ano.

A germinação em condições desfavoráveis, letal para a maioria das sementes recalcitrantes, pode resultar na morte das primeiras plântulas produzidas por sementes de *Eugenia*, mas não da semente toda. Isso porque tais sementes apresentam duas importantes características que permitem germinações sucessivas: 1) tecidos e células capazes de se diferenciar em novas plântulas (Delgado et al., 2022); 2) reservas suficientes para nutrir várias plântulas nos estádios iniciais de desenvolvimento (Alonso e Barbedo, 2020).

As sementes de *Eugenia* podem ter adotado estratégia de propagação no tempo e no espaço diferente da desenvolvida pelas sementes ortodoxas (Silva et al., 2003, 2005; Delgado et al., 2010). É provável que a capacidade regenerativa das sementes de *Eugenia* spp. associadas ao armazenamento possa ampliar a durabilidade das mesmas que se tornariam inviáveis em poucos meses.

O presente trabalho objetivou determinar a capacidade regenerativa de raízes e plântulas em sementes do gênero *Eugenia* spp. armazenadas sob baixa temperatura e, após teste de envelhecimento acelerado.

Material e métodos

Coleta de frutos e extração de sementes - frutos recém-dispersos de *E. uniflora* (EU), *E. involucrata* (EI) e *E. brasiliensis* (EB) foram coletados de matrizes localizadas no Jardim Botânico de São Paulo, município de São Paulo (23°38’S e 46°37’W), de outubro a dezembro de 2018. Frutos de EI forma coletados também de outubro a novembro de 2021.

Após as coletas os frutos foram encaminhados ao Laboratório de Sementes para extração das sementes, que foi realizada manualmente, retirando-se os resíduos de polpa com auxílio de peneira e água. O excesso de água foi removido com papel toalha.

Avaliações físicas e fisiológicas - o teor de água, com base na massa seca das sementes, foi determinado segundo o procedimento recomendado pelas regras

internacionais, utilizando-se estufa com circulação de ar, por 24 horas a 105 °C (ISTA, 1996), com quatro repetições de dez sementes. O potencial de água das sementes foi medido por equipamento Decagon WP4 (USA) com base na temperatura de ponto de orvalho (Decagon Devices, 2001).

O teste de germinação foi conduzido em câmara climatizada, com luz branca na temperatura constante de 25 °C. As sementes foram acondicionadas em caixas do tipo gerbox, contendo uma camada de dois centímetros de vermiculita como substrato, umedecida com água de torneira (Brasil, 2009) até o limite de saturação. Para as três espécies estudadas, a germinação considerada foi a protrusão de 0,5 cm de raiz primária, enquanto o desenvolvimento foi considerado quando houve formação de plântula normal, sem defeitos, como descrito por Delgado e Barbedo (2007). As avaliações foram diárias.

Teste de regenerabilidade de novas raízes e desenvolvimento de plântulas - sementes foram colocadas para germinar como descrito no teste de germinação. Ao emitir a primeira raiz com cerca de 1,0 cm, esta foi eliminada com auxílio de bisturi cirúrgico e a semente retornou para a caixa gerbox. O processo foi repetido até a eliminação da sétima raiz, compondo os seguintes tratamentos: SE, quando não houve qualquer eliminação; ER1, quando houve eliminação da primeira germinação; ER2, quando houve eliminação da segunda germinação; ER3, quando houve eliminação da terceira germinação; ER4, quando houve eliminação da quarta germinação; ER5, quando houve eliminação da quinta germinação; ER6, quando houve eliminação da sexta germinação e ER7, quando houve eliminação de sétima germinação. O mesmo procedimento foi realizado para eliminação de plântulas, ou seja, plântulas medindo cerca de 3,0 cm de parte aérea, foram eliminadas e a semente retornou para o gerbox. As eliminações de plântulas foram até a terceira eliminação, compondo os tratamentos EP1, EP2 e EP3. Os valores registrados para porcentagem de germinação ou de desenvolvimento de plântulas normais foram calculados

sempre em relação ao total de sementes colocadas para germinar após cada eliminação de raiz ou plântula, e não em relação ao total inicial de sementes colocadas para germinar. Quando uma semente não apresentava regeneração de raiz ou plântula, não retornava para o teste de germinação na fase seguinte, ou seja, após a eliminação de raiz ou parte aérea das sementes que haviam regenerado. Portanto, o total de sementes utilizado para o cálculo das porcentagens, após as eliminações de raiz ou parte aérea, poderia ser igual ou inferior ao total inicial.

Deterioração natural - neste estudo as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno e mantidas em baixa temperatura (10 °C) até a instalação dos experimentos que se iniciaram em julho de 2019. Sementes de *E. uniflora* ficaram armazenada por nove meses, de *E. involucrata* por oito e de *E. brasiliensis* por sete meses. Ao final do período de armazenamento, realizou-se novamente o teste de regenerabilidade de novas raízes e desenvolvimento de plântulas, conforme descrito anteriormente.

Deterioração artificial - sementes de *E. involucrata* foram submetidas a prévia deterioração por meio do envelhecimento acelerado como comparativo à deterioração natural. Amostras contendo 200 sementes foram distribuídas formando uma camada única sobre a superfície da tela metálica, acoplada a caixa plástica transparente do tipo gerbox, em que foi adicionado 40 mL de água, garantindo, dessa maneira, nível de umidade relativa do ar próximo de 100% no interior. Cada mini câmara foi tampada e mantida em estufa a 42 °C por quatro períodos diferentes: 6, 12, 24 e 48 horas (Marcos-Filho, 2015). Em seguida, avaliou-se novamente o teor de água e o potencial hídrico das sementes e instalou-se o teste de regenerabilidade de novas raízes e desenvolvimento de plântulas, conforme descrito anteriormente.

Delineamento experimental e análises estatísticas - o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os valores foram submetidos à

análise de variância (teste F), ao nível de 5%. As médias foram comparadas entre si pelo teste Tukey, também ao nível de 5% (Santana e Ranal, 2004), empregando-se o programa Sisvar.

Resultados e discussão

Durante o período de armazenamento (deterioração natural) não houve variação no teor de água das sementes para as três espécies estudadas, mas curiosamente, para *E. uniflora* e *E. brasiliensis* o potencial de água diminui (tabela 1). Isso indica que, ainda que a quantidade de água nestas sementes tenha sido a mesma, essa água provavelmente estava ligada mais fortemente e, consequentemente, mais difícil de ser removida. A maior retenção de água nessas sementes pode ser uma vantagem por se tratarem de sementes sensíveis à dessecação (Delgado e Barbedo, 2007).

Com relação à massa seca, não houve diferença entre os períodos em que cada espécie foi armazenada. A germinação foi reduzida em sementes de *E. brasiliensis* e a formação de plântulas diminuiu em *E. brasiliensis* e em *E. involucrata* (tabela 1). As diferenças observadas indicam que pode haver níveis distintos de recalcitrância entre as espécies de sementes estudadas, esses níveis podem ser identificados e estabelecidos através de testes de tolerância à dessecação e pela capacidade de armazenamento dessas sementes, podendo ocorrer inclusive entre sementes da mesma espécie, sob influência genética e fatores ambientai**s** (Walters, 2000; Pammenter et al., 2003; Barbedo et al., 2013; Lamarca e Barbedo, 2015).

A redução tanto da capacidade germinativa das sementes de *E. brasiliensis* (de 100% para 42%) quanto de formação de plântulas (de 93% para 13%) pode ter contribuído para a baixa capacidade regenerativa dessas sementes (figura 1). Tais dados indicam que essas sementes podem ser mais sensíveis ao armazenamento, desenvolvendo alterações

fisiológicas e bioquímicas, o que pode diminuir o vigor e consequentemente comprometer a produção das plântulas (Farrant et al., 1986; Marcos-Filho, 2015).

No decorrer da história evolutiva algumas sementes desenvolveram diferentes níveis de tolerância à dessecação, assim, é possível que exista também um gradiente de regenerabilidade entre as sementes das diferentes espécies de *Eugenia*, ou até mesmo entre populações dentro da mesma espécie, como verificado para níveis de sensibilidade à dessecação entre populações ou anos de produção (Lamarca e Barbedo, 2015).

Neste trabalho, a regeneração de novas raízes foi melhor observada em sementes de *E. uniflora*, quando comparada com *E. brasiliensis* e *E. involucrata* (figura 1 A). Sementes de *E. uniflora* apresentaram regeneração até a oitava raiz, indicando que o período do armazenamento parece não ter influenciado a capacidade regenerativa. Tais dados corroboram com estudos anteriores em que a regeneração de novas raízes pode ocorrer independente do tamanho, da espécie e de grau de maturação de frutos e sementes (Alonso et al., 2019; Alonso e Barbedo, 2020).

Observou-se formação de novas plântulas (figura 1 B), para as três espécies estudadas. Entretanto, a regeneração se mostrou mais lenta e com número de regenerações de plântulas reduzido. Sementes de *E. uniflora* regeneraram até a quarta plântula, *E. involucrata* até a terceira e *E. brasiliensis* não passou da segunda. Provavelmente, o investimento energético da semente (quantidade de reservas disponíveis) para formar uma nova plântula seja muito maior do que formar uma nova raiz e não tão vantajoso quanto formar raízes sucessivas vezes (Buckeridge et al., 2004; Alonso et al., 2019; Alonso e Barbedo, 2020**)**. A quantidade e a qualidade das reservas energéticas das sementes estão positivamente associadas à morfologia funcional do cotilédone em monocotiledôneas ou dos cotilédones em eudicotiledôneas, podendo afetar diretamente o estabelecimento e o desenvolvimento das plântulas (Melo et al., 2004).

Em trabalhos anteriores, a perda da viabilidade durante o armazenamento foi observada em sementes armazenadas por sete meses, o período do armazenamento acarretou a desestruturação do conteúdo citoplasmático nas células do meristema fundamental. Estas sementes foram armazenadas com seu alto teor de água, mas as sementes foram perdendo umidade durante o armazenamento (Berjak e Pammenter, 2000). A secagem e o armazenamento aplicados a sementes de *E. pyriformis* promoveram danos ultraestruturais (Justo et al., 2007) que poderiam impedir ou dificultar a germinação. É provável que esses mesmos processos influenciem na regeneração de novas plântulas, quando essas sementes forem submetidas a secagem e armazenamento por longos períodos.

Com relação ao tempo das regenerações, quando foi avaliado o tempo para regeneração de novas raízes, observou-se que a oitava raiz regenerada em sementes de *E. uniflora* demorou 244 dias para ser produzida, período que somado ao armazenamento (9 meses) totaliza 523 dias. Portanto, próximo a um ano e meio a semente tentou oito vezes produzir uma nova planta (figura 2 A). Quanto ao desenvolvimento de plântulas, como já mencionado, *E. uniflora* regenerou mais vezes novas plântulas quando comparado com *E. involucrata* e *E. brasiliensis* e, aos 214 dias da semeadura, *E. uniflora* produziu até a quarta plântula (figura 2 B).

A produção inicial de plântulas ocorreu em 10 dias após a semeadura, mas a produção de novas plântulas, quando as primeiras foram eliminadas, necessitou de períodos cada vez maiores. Essa característica pode ser entendida como importante estratégia de sobrevivência da espécie, produzindo plântulas que aguardam condições ambientais favoráveis para se estabelecerem (Alonso e Barbedo, 2020).

Na deterioração artificial de sementes de *E. involucrata*, pelo teste de envelhecimento acelerado, houve pequena variação no teor de água após o período de 48 horas, assim como para o potencial hídrico que, ao final das 48 horas, foi reduzido em mais

de 5 vezes (tabela 2). A massa seca das sementes teve discreta variação, mas, tanto a porcentagem de germinação quanto a de formação de plântulas normais tiveram grande redução após 48 horas de deterioração (tabela 2). Lamarca et al. (2009) também observaram queda na porcentagem de germinação de sementes de *Paubrasila echinata* após 48 horas de envelhecimento acelerado, indicando avanço no estado de deterioração, uma vez que a germinação é considerada uma das últimas etapas no processo de deterioração das sementes (Popinigis, 1977; Labouriau, 1983).

Os processos de deterioração das sementes envolvem diversas etapas bioquímicas. Algumas reações são desencadeadas quando, a qualidade das sementes é reduzida, essas reações químicas podem danificar moléculas e causar peroxidação dos lipídios, esse processo tem sido considerado a principal causa da deterioração de sementes (Kumar et al., 2015; Gutteridge e Halliwell, 1990; McDonald, 1999). A biossíntese de lipídios envolve diversas organelas, com destaque para as mitocôndrias. Portanto, o colapso das mitocôndrias nas regiões de crescimento da plântula, principalmente do eixo embrionário nas dicotiledôneas e da extremidade da radícula nas monocotiledôneas, resultam no baixo desempenho fisiológico da semente (Marcos-Filho, 2015; Barbedo e Santos Junior, 2018; Krzyzanowski et al., 2022).

Neste trabalho, pode-se observar que a deterioração das sementes parece não ter influenciado totalmente a capacidade regenerativa de novas raízes, as sementes apresentaram até a sétima regeneração de raiz, mas a partir da quarta raiz regenerada, a porcentagem de regeneração declinou, a semente pode ter iniciado algum processo de deterioração, que ocorreu a diminuição da capacidade regenerativa. (figura 3 A).

Quanto à produção de novas plântulas, o envelhecimento das sementes não afetou completamente a capacidade regenerativa das sementes em produzir plântulas (figura 3 B),

como nos experimentos de regenerabilidade anteriores deste estudo, a produção de novas plântulas ocorreu até a quarta plântula, mas também em baixa porcentagem (8%).

A quantidade de dias para regenerar raízes se estendeu para as sementes submetidas ao menor período de envelhecimento acelerado (6 horas) que, após 315 dias, foram capazes de produzir a sétima raiz regenerada (figura 4 A). Para regeneração de plântulas, sementes que permaneceram por 6 horas no envelhecimento produziram a segunda plântula em 83 dias; já as que foram envelhecidas por 12 e 24 horas necessitaram 240 e 252 dias para regenerarem uma nova plântula, respectivamente (figura 4 B).

No que se refere aos tipos de armazenamento das sementes (deterioração natural, através do tempo e deterioração artificial, através do teste de envelhecimento acelerado), foi possível observar que, em ambos, as sementes puderam regenerar raízes a plântulas várias vezes, mesmo apresentando baixa longevidade e dificuldades de armazenamento. A capacidade em regenerar novas raízes e plântulas após serem eliminadas as primeiras germinações, em sementes de *Eugenia* (Teixeira e Barbedo, 2012; Delgado e Barbedo, 2020), pode ser considerada como estratégia que as sementes adotaram para permitir passar por sucessivas germinações tentando minimizar a herbivoria (Alonso et al., 2019; Alonso e Barbedo, 2020). Essa capacidade parece evidenciar vantagem evolutiva para essas espécies, garantindo novas maneiras de estabelecerem e propagarem, mesmo quando as sementes se apresentam em fases de deterioração.

Referências

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 Science 41: 160-167.

Alonso, C.R.; Barbedo, C.J. Germinações sucessivas em sementes de *Eugenia* spp. Hoehnea, v.47, e412019, 2020. https://doi. org/10.1590/2236-8906-41/2019

Barbedo, C.J., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2013**.** Do recalcitrant seeds really exist? Hoehnea 40: 583-593.

Barbedo, C.J.; Santos-Junior, N. A. Sementes do Brasil. Produção e tecnologia para espécies da flora brasileira. Instituto de Botânica: São Paulo. 2018.

Barbedo, C.J.; Marcos-Filho, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. Acta Bot. Bras. 12(2): 145-164.

Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA. 395p. http://www.agricultura.gov.br/ assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-paraanalise-de sementes.pdf/view

Berjak, P.; Pammenter, N.W. 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Londrina, v. 12, p. 22-55. Edição Especial.

Buckeridge, M.S.; Aidar, M.P.M.; Santos, H.P.; Tiné, M.A.S. 2004. Acúmulo de reservas. *In:* Ferreira, A. G.; Borghetti, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. p. 323.

Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. Sementes. Ciência, tecnologia e produção. Funep - Jaboticabal – SP. 2012.

Cécel, A.T.; Barbedo, C.J. 2023. Storage of recalcitrant seeds of *Eugenia brasiliensis* Lam. under control of water availability. Journal of Seed Science, v.45, e202345009.

Decagon Devices, Inc. 2001. WP4 Dewpoint Potent a Meter Operator's Manual, Pullman, WA, Decagon Devices.

Delgado, L.F.; Barbedo, C.J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, p.265-272, 2007. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000200016

Delgado, L.F.; Barbedo, C.J. 2020. Regeneração de raízes e plântulas de sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) de diferentes estádios de maturação. Hoehnea, v.47, e042020. https://old.scielo.br/pdf/hoehnea/v47/2236-8906-hoehnea-47-e042020.pdf

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, v.38, p.624-634. https://doi.org/10.15258/sst.2010.38.3.10

Delgado, L.F.; Teixeira, S.P.; Carmello-Guerreiro, S.M.; Barbedo, C.J. 2022.The origin of new roots from cut seeds of *Eugenia* species. Journal of Seed Science, v.44, e202244014. http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v44260855

Delouche, J.C. 1963. Seed deterioration. Seed World, v.92, p.14-15.

Farrant, J. M.; Pammenter, N. W.; Berjak, P. 1986. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. Physiol. Plant., 67:291-298.

Ferreira, A. G.; Borghetti, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

Gutteridge, J. M. C.; Halliwell, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends in Biochemical Sciences, v. 15, p. 129-135.

Ista. 1996. International rules for seed testing. Seed Science and Technology, v. 13, p.356-513.

Justo, C.F.; Alvarenga, A.A.; Alves, E.; Guimarães, R.M.; Strassburg, R.S. 2007. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. Acta Botanica Brasílica, v.21, p.539-551.

Kohama, S.; Maluf, A.M.; Bilia, D.A.C.; Barbedo, C.J. 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). Revista Brasileira de Sementes, v.28, p.72-78. https://doi.org/10.1590/S0101-31222006000100010

Kumar, J. S. P.; Prasad, S. R.; Banerjee, R.; Thammineni, C. 2015. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. Annals of Botany, v. 116, n. 4, p. 663- 668.

Krzyzanowski, F.C.; Dias, D.C.F.S.; França-Neto, J.B. 2022. Deterioração e vigor da semente. Circular técnica. Londrina, PR.

Labouriau, L.G. 1983. A germinação das sementes. Washington: Organização dos Estados Americanos p.170. (monografias científicas).

Lamarca. E.V.; Barbedo, C.J. 2015. Sensibilidade à dessecação de embriões de *Inga vera* Willd. formados sob diferentes condições ambientais. Revista Árvore, Viçosa-MG, v.39, n.6, p.1083-1092. https://doi.org/10.1590/0100-67622015000600011

Lamarca, E. V.; Leduc, S. N. M.; Barbedo, C. J. 2009. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil - Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. Revista Brasileira de Botânica, v. 32, n. 4, p. 793-803.

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

McDonald, M. B. 1999. Seed deterioration: physiology. Seed Science and Technology, v. 27, n. 1, p. 177-237.

Melo, F. P. L.; Aguiar Neto, A. V.; Tabarelli, M. S. 2004. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. p.237-241.

Pammenter, N.W., Naidoo, S.; Berjak, P. 2003. Desiccation rate, desiccation response and damage accumulation: can desiccation sensitivity be quantified? In The biology of seeds: recent research advances (G. Nicolás, K.J. Bradford, D. Côme & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, Oxon/Cambridge. p.319-325.

Popinigis, F. 1977. Fisiologia da semente. Ministério da Agricultura / Agiplan, Brasília.

Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science & Technology 1: 499-514.

Santana, D.G.; Ranal, M.A. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília.

Silva, C. V.; Bilia, D. A. C.; Barbedo, C. J. 2005. Fracionamento e germinação de sementes de Eugenia. Revista Brasileira de Sementes, v. 27, n. 1, p. 86-92.

Silva, C. V.; Bilia, D. A. C.; Maluf, A. M.; Barbedo, C. J. 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). Revista Brasileira de Botânica, v. 26, n. 2, p. 213-221.

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.

Walters, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. Rev. Bras. Fisiol. Veg., 12 (Edição Especial) p. 7-21.

Tabela 1. Teor (TA) e potencial (PH) de água, massa seca (MS), germinação (G) e desenvolvimento de plântulas normais (PN) de sementes de *E. uniflora, E. involucrata* e *E. brasiliensis* antes (out, nov e dez/2018) e após (jul/2019) o armazenamento.

	E. uniflora		*E. involucrata*		*E. brasiliensis*	
	out/2018	jul/2019	nov/2018	jul/2019	dez/2018	jul/2019
TA (%)	54 b	55 b	62 a	65 a	47 c	48 c
PH (MPa)	- 0,86 a	- 2,23 b	- 0,70 a	- 0,74 a	- 0,83 a	- 2,14 b
MS (g. semente^{-1})	0,12 b	0,13 b	0,11 b	0,11 b	0,24 a	0,22 a
G (%)	100 a	96 a	98 a	90 a	100 a	42 b
PN (%)	93 a	93 a	80 a	58 b	93 a	13 c

Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5%.

Tabela 2. Teor de água (TA), potencial hídrico (PH), massa seca (MS), germinação (G) e desenvolvimento de plântulas normais (PN), de sementes de *Eugenia involucrata*, antes (Inicial) e após os diferentes períodos (6, 12, 24 e 48h) do teste de envelhecimento acelerado.

	Inicial	6 h	12 h	24 h	48 h
TA (%)	59 a	55 ab	56 ab	53 b	43 c
PH (MPa)	-1,00 a	-1,88 ab	-1,06 a	-2,99 b	-5,43 c
MS (g. semente^{-1})	0,117 b	0,159 ab	0,172 a	0,171a	0,193 a
G (%)	91 a	93 a	89 a	93 a	53 b
PN (%)	81 a	59 a	76 a	70 a	28 b

Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5%.

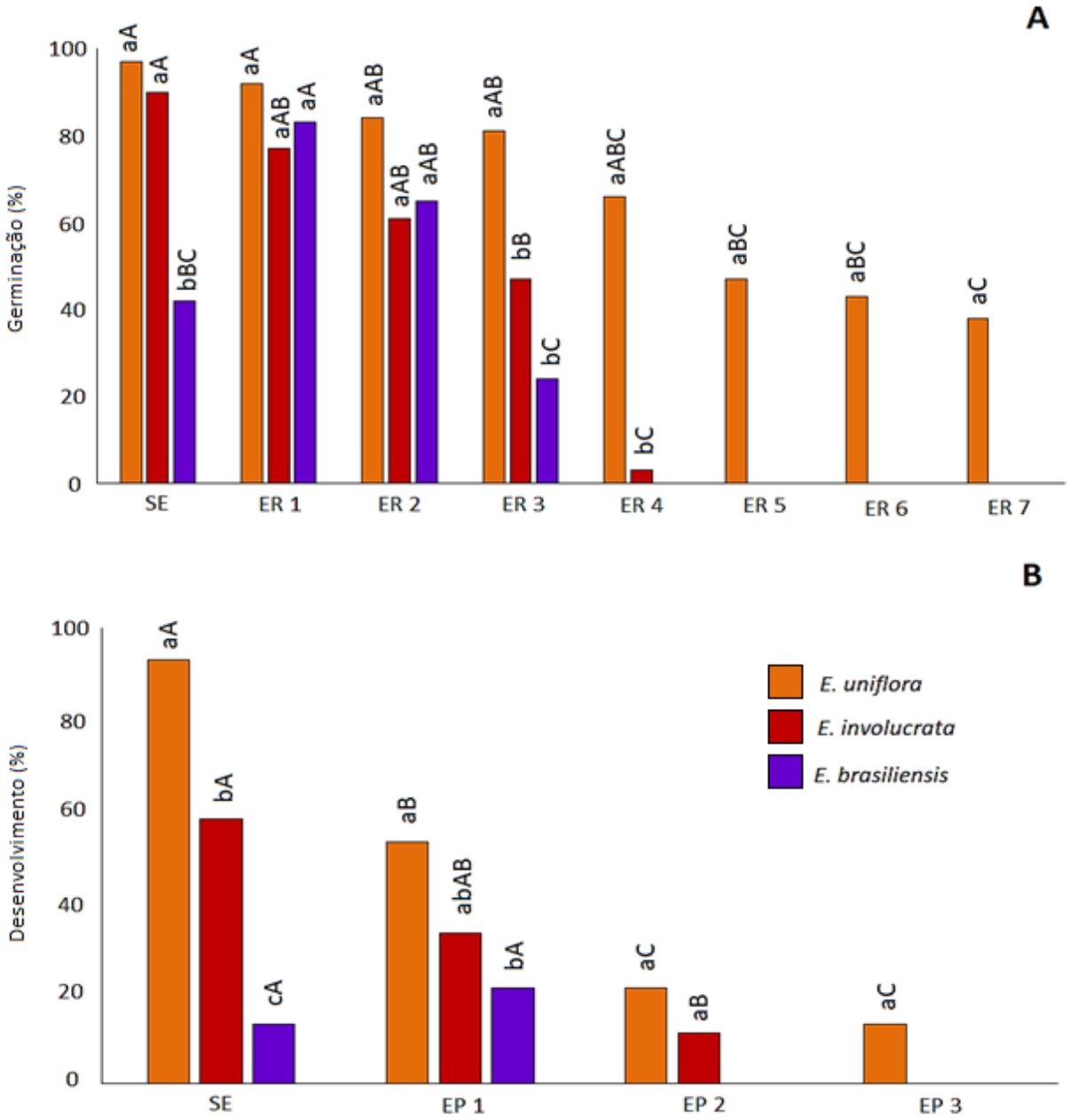

Figura 1. Germinação (A) e desenvolvimento de plântulas (B), submetidas a eliminações de raízes (A) e eliminações de plântulas (B) em sementes de *E. uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis*, armazenadas e submetidas a eliminação de raízes (SE= sem eliminações; ER 1= eliminação de primeira raiz; ER 2 = eliminação de segunda raiz; ER 3= eliminação de terceira raiz; ER 4= eliminação de quarta raiz; ER 5= eliminação de quinta raiz; ER 6= eliminação de sexta raiz; ER 7= eliminação de sétima raiz) e eliminação de plântulas (SE= sem eliminações; EP 1= eliminação de primeira plântula; EP 2= eliminação de segunda plântula e EP 3= eliminação de terceira plântula). Letras maiúsculas comparam espécies e letras minúsculas comparam eliminações de raízes (ER) ou plântulas (EP).

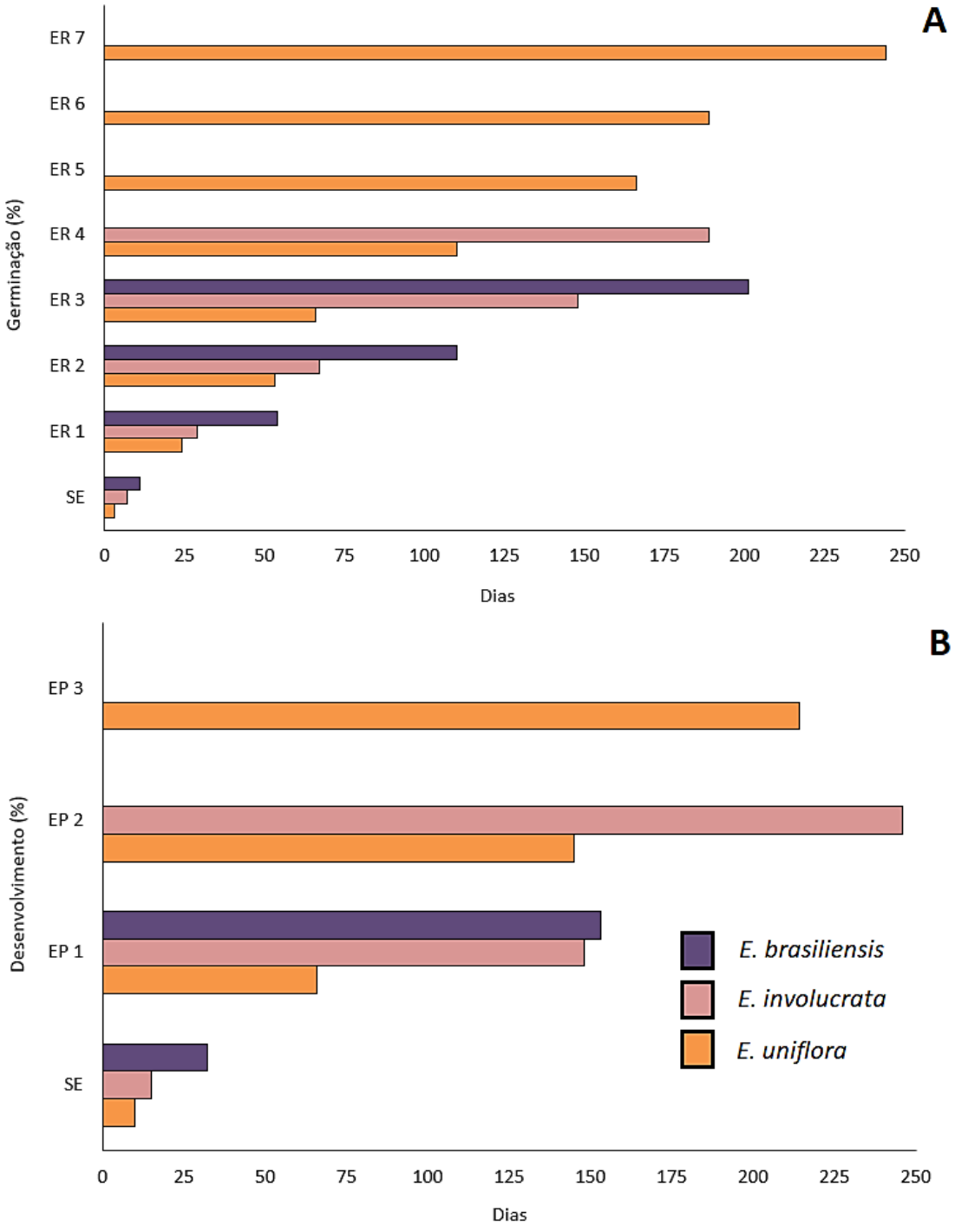

Figura 2. Tempo (dias) para a regeneração de novas raízes (A) e plântulas (B), proveniente de sementes armazenadas de *E. uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis*.

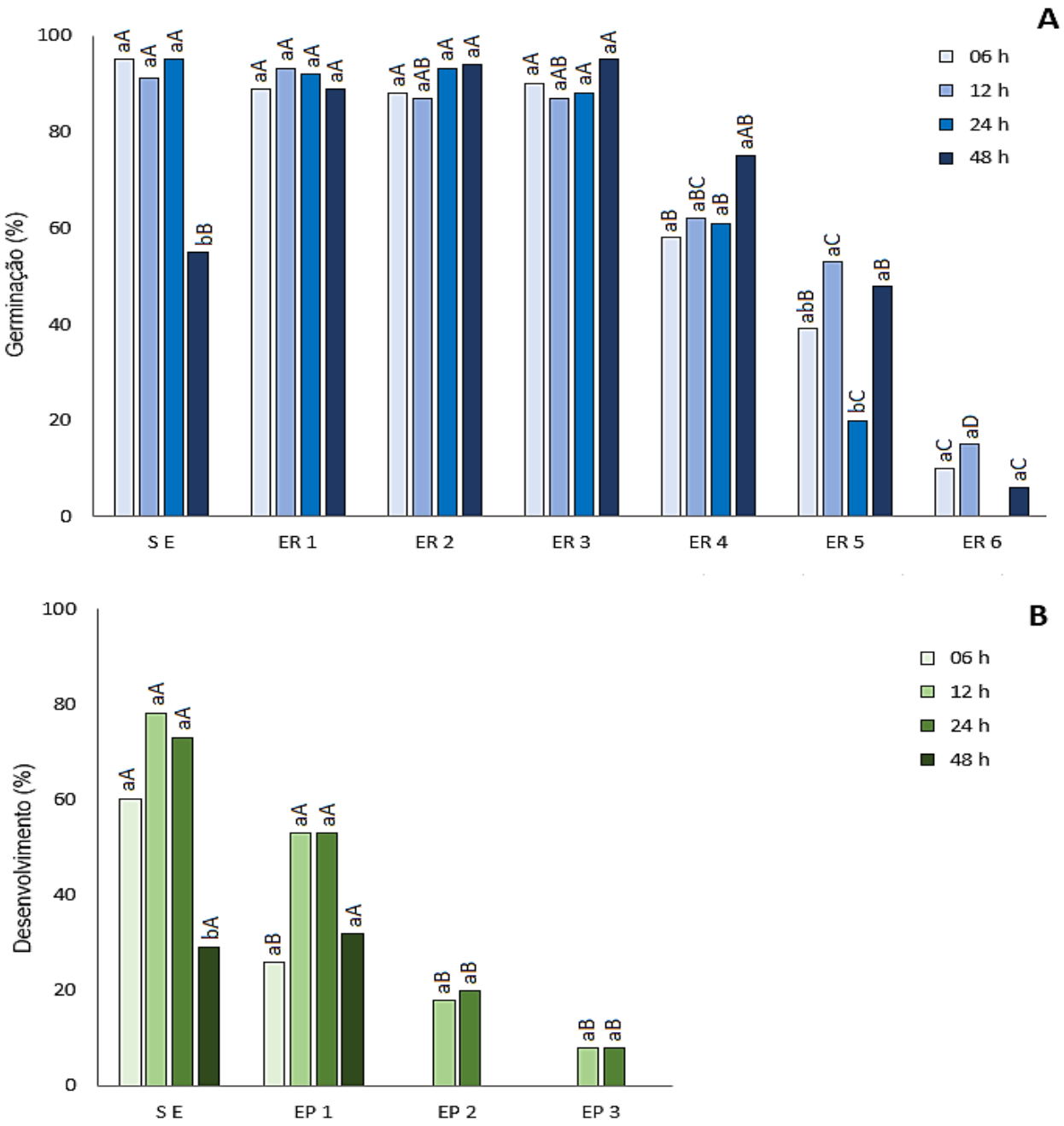

Figura 3. Porcentagem de produção de novas raízes em sementes de *E. involucrata*, submetidas ao teste de envelhecimento acelerado a 42 °C, pelo período de 6, 12, 24 e 48 horas, submetidas ao teste de regenerabilidade em que SE= sem eliminações; ER 1= eliminação de primeira raiz; ER 2= eliminação de segunda raiz, ER 3= eliminação de terceira raiz; ER 4= eliminação de quarta raiz; ER 5= eliminação de quinta raiz e ER 6= eliminação de sexta raiz (A); Porcentagem de produção de novas plântulas em sementes de *E. involucrata*, submetidas ao teste do envelhecimento acelerado a 42 °C, pelo período de 6, 12, 24 e 48 horas submetidas ao teste de regenerabilidade em que SE= sem eliminações; EP 1= eliminação de primeira plântula; EP 2= eliminação de segunda plântula e EP 3= eliminação de terceira plântula (B). Letras minúsculas comparam o tempo de incubação e letras maiúsculas comparam eliminações de raízes (ER) ou plântulas (EP).

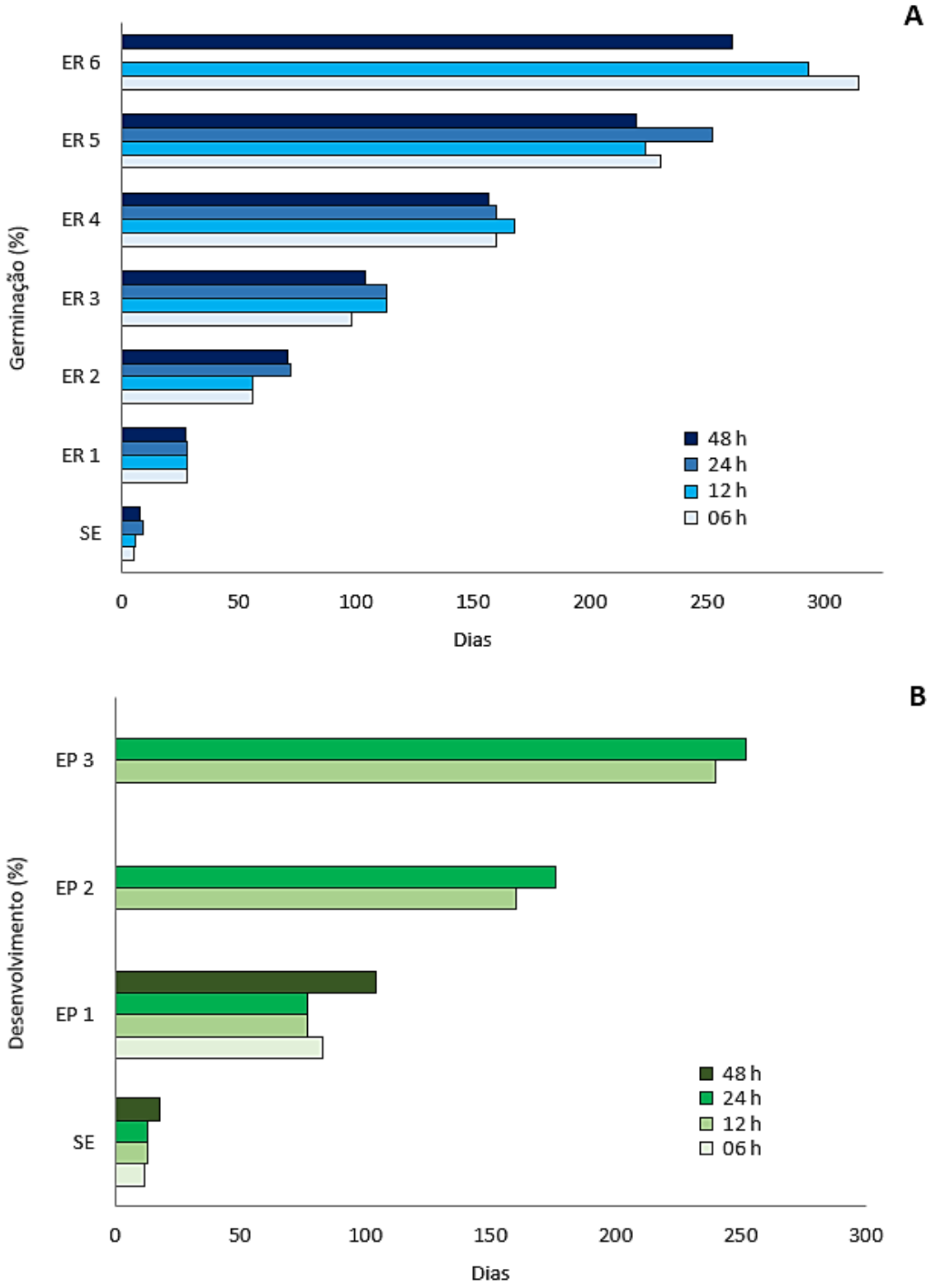

Figura 4. Tempo (dias) para a regeneração de novas raízes (A) e plântulas (B), proveniente de sementes de *E. involucrata*, após teste de envelhecimento acelerado.

CAPÍTULO III

Relação entre massa cotiledonar e regeneração de raízes e plântulas em sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae)

Relação entre massa cotiledonar e regeneração de raízes e plântulas em sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae)

Camila Rivero Alonso [(1)]; Claudio José Barbedo [(1)]

Resumo - As sementes do gênero *Eugenia* são recalcitrantes e apresentam alta capacidade em regenerar novas raízes e plântulas, múltiplas e sucessivas vezes. São sementes capazes de germinar mesmo perdendo grande parte da massa cotiledonar. Entretanto, não há informações sobre a relação entre a massa cotiledonar e a capacidade em regenerar novas raízes e plântulas. Com o objetivo de elucidar esta possível relação, sementes de *E. uniflora* foram colocadas para germinar e, a cada eliminação de raízes ou plântulas, as massas fresca e seca de raízes ou plântulas e cotilédones foram analisados. Em um segundo experimento, sementes de *E. pyriformis* foram danificadas artificialmente em diferentes formas e avaliadas quanto à produção de novas raízes e plântulas. Os resultados mostraram que houve aumento da massa fresca total após as sucessivas germinações, mas não da massa seca. Observa-se que após a aplicação artificial de danos às sementes, as regenerações de novas raízes se mantiveram até a sexta regeneração. Quanto ao desenvolvimento de plântulas, houve diminuição da regeneração a partir da primeira eliminação de plântulas. Considerando as sucessivas germinações, a grande quantidade de reservas presentes nas sementes, o controle em não desperdiçar material de reserva e a possível resistência à predação, essas sementes podem permanecer por longos períodos no ambiente em que são dispersas, mantendo o potencial de propagação da espécie mesmo sendo recalcitrantes.

Palavras chave: Estratégia ecológica, predação, semente recalcitrante.

Relationship between cotyledonary mass and regeneration of roots and seedlings in seeds of *Eugenia* spp. (Myrtaceae)

Abstract- The recalcitrant seeds of the genus *Eugenia* have a high capacity to regenerate new roots and seedlings, multiple and successively. They are also capable of germinating despite losing much of their cotyledonary mass. However, there is no information about the relationship between cotyledonary mass and the ability to regenerate new roots and seedlings, which was the objective of this study. For this, *E. uniflora* seeds were placed to germinate and, at each root (or seedling) elimination, the fresh and dry mass of roots (or seedlings) and cotyledons were analyzed. In a second experiment, seeds of *E. pyriformis* were artificially damaged in different ways and evaluated for the production of new roots and seedlings. The results showed that there was an increase in total fresh mass after successive germinations, but not in dry mass. It was also possible to observe that even after the artificial application of damage to the seeds, the regeneration of new roots was maintained until the sixth regeneration. As for the development of seedlings, there was a decrease in regeneration after the first elimination of seedlings. Considering the successive germinations, the large number of reserves present in the seeds, the control not to waste reserve material and the possible resistance to predation, these seeds can remain for long periods in the environment in which they are dispersed, maintaining the potential for propagation of the species even if they are recalcitrant.

Key words: Ecological strategy, predation, recalcitrant seed.

Introdução

Sementes de *Eugenia* têm potencial para gerar novas raízes e plantas inteiras após a remoção de grande parte de suas reservas, mas essa capacidade depende do tamanho das sementes (Prataviera et al., 2015). Há evidente interesse na compreensão dos fatores envolvidos nessa capacidade regenerativa que permitem a formação de novas plântulas quando a semente é fracionada (Teixeira e Barbedo, 2012; Prataviera et al., 2015; Calvi et al., 2017; Alonso et al., 2019).

Tais sementes são extremamente predadas por insetos (Ribeiro, 2004; Silva e Pinheiro, 2009; Masetto et al., 2009; Teixeira, 2009; Rodrigues, 2013) e a intensidade de predação pode variar de um ambiente para outro, entre as espécies e entre os indivíduos de uma mesma espécie (Janzen, 1971; Bu et al., 2019).

A predação sofre influência do tamanho das sementes e algumas fêmeas de insetos preferem sementes maiores no momento da oviposição, assim, garantindo maior taxa de sobrevivência para os seus descendentes (Cope e Fox, 2003, Refsnider e Janzen, 2010). Em alguns casos, larvas de insetos se alimentam de mais de uma semente dentro do mesmo fruto durante o desenvolvimento (Szentesi e Jermy, 1995) e consomem a maioria do conteúdo de reserva dos cotilédones como observado em sementes de *Eugenia punicifolia* (Senra, 2012).

No caso do gênero *Eugenia* esta ação parece não ser prejudicial, pois sementes de *E. cerasiflora* que se mostraram intensamente predadas por larvas de insetos, ainda que reduzidas devido à predação, mostraram capacidade de germinar e de produzir plântulas normais, evidenciando que originalmente possuem uma quantidade de reservas nutritivas acima da necessária para uma única germinação (Teixeira, 2009).

Em estudos anteriores, sementes graúdas de *E. involucrata* foram capazes de regenerar até a quarta raiz e plântula, indicando que a quantidade e qualidade das reservas

nas sementes podem afetar diretamente o desenvolvimento das plântulas; provavelmente as sementes graúdas pudessem produzir maior número de germinações e plântulas, se submetidas a mais eliminações, pois ao final do experimento, apresentavam-se firmes e vigorosas, diferente das miúdas que estavam ocas e deterioradas (Alonso e Barbedo 2020).

Klein et al (2007) observaram que após 60 dias da semeadura, as plântulas de *E. uniflora* originadas de sementes médias e grandes apresentaram maiores médias para comprimento médio de caule e raiz, diâmetro de caule e área foliar média, quando comparadas às plantas originadas de sementes pequenas.

Foi mostrado também, que sementes de uvaias (*E. pyriformis*) fracionadas, tanto as posições de corte quanto o tamanho da semente influenciaram no sucesso da obtenção de mudas jovens. A massa resultante após o fracionamento parece afetar o sucesso na produção de mudas por semente e um dos fatores que influenciam o tamanho das sementes é o número de sementes por fruto, pois as sementes são menores quando mais numerosas por fruto (Justo et al., 2007). As condições ambientais sob as quais as sementes se desenvolvem também podem promover diferenças no tamanho das sementes produzidas (Prataviera et al., 2015).

Em algumas espécies de *Eugenia*, a capacidade regenerativa está presente durante um longo período e pode ser vista desde as sementes mais imaturas até as que já iniciaram a germinação (Teixeira e Barbedo 2012; Delgado e Barbedo, 2020).

Contudo, os limites de regeneração de novas estruturas e o tempo de cada regeneração, que poderiam aumentar a permanência e conservação dessas sementes no ambiente, ainda são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo neste estudo foi caracterizar a quantidade de massa cotiledonar utilizada pela semente, a cada desenvolvimento de novas raízes ou plântulas, e avaliar a regeneração de novas raízes e plântulas em sementes danificadas, simulando a possível predação na dispersão.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal - em novembro de 2021 foram coletados frutos recém dispersos de *E. uniflora* (pitanga) de matrizes localizadas no Jardim Botânico de São Paulo, no município de São Paulo (23°38’27.38’’S e 46°37’34.57’’W). De setembro a outubro de 2022, na mesma localidade, coletaram-se frutos maduros de *E. pyriformis* (uvaia).

O processo de extração das sementes foi realizado manualmente, retirando-se os resíduos de polpa com auxílio de peneira e água e o excesso de umidade com papel toalha. As sementes foram armazenadas em sacos de polietileno e mantidas em baixa temperatura (10 °C) cerca de 10 dias, até a instalação dos experimentos (figura 1).

Avaliações físicas e fisiológicas - o teor de água (em %, base úmida) e a massa seca (g. semente^{-1}) das sementes foram determinados pelo método da estufa a 105 °C por 24 horas (Brasil, 2009), com quatro repetições de dez sementes.

Os testes de germinação, com avaliações diárias, foram mantidos em sala de germinação, com luz branca contínua, a 25 °C. As sementes foram acondicionadas em caixas plásticas (gerbox) contendo uma camada de dois centímetros de vermiculita como substrato, previamente umedecida com água até o limite de saturação. Foi considerada germinada a semente com emissão de 0,5 cm de raiz primária; para o desenvolvimento de plântula normal, foi considerada a formação de uma plântula normal, sem defeitos (Inocente e Barbedo, 2021).

Massa cotiledonar e regenerabilidade de raízes e plântulas em sementes de *E. uniflora* – as sementes foram separadas com auxílio de bisturi cirúrgico. Após separação, aferiu-se a massa fresca das sementes e raízes; as sementes retornaram para a caixa de germinação e as raízes removidas foram secas em estufa a 65 °C, por 80 horas, com circulação de ar, até massa constante da amostra para obtenção da massa seca das raízes regeneradas (Gomes, et al. 2018; Benincasa, 2003). Este processo foi repetido até que as

sementes produzissem a quinta raiz (a sexta raiz regenerada). Dessa forma, conduziu-se os seguintes tratamentos: SE = sem eliminações de raízes; ER1 = eliminação da raiz da primeira germinação; ER2 = eliminação da primeira raiz regenerada; ER3 = eliminação da segunda raiz regenerada; ER4 = eliminação da terceira raiz regenerada e ER5 = eliminação da quarta raiz regenerada (figura 2A). O mesmo procedimento foi seguido para avaliar a regeneração de plântulas inteiras, eliminando-se plântulas quando estas atingiram 3,0 cm de parte aérea. Esses tratamentos foram representados por SE, EP1, EP2 e EP3 (figura 2B).

Redução das reservas e regenerabilidade de raízes e plântulas em sementes de *E. pyriformis* – as sementes foram danificadas de quatro diferentes formas, simulando o consumo da massa cotiledonar que ocorre naturalmente por insetos ou aves (figura 3 A). Assim os quatro tratamentos foram: T1 = as sementes foram cortadas com auxílio de bisturi cirúrgico, eliminando as áreas periféricas; T2 = as sementes foram perfuradas ao meio, com auxílio de trado metálico, atravessando-as; T3 = as sementes foram cortadas, eliminando cerca de 1/4 da semente na lateral oposta ao eixo hipocótilo-radícula e; T4 = com auxílio de um trado e uma cureta, as sementes foram perfuradas e cavadas ao meio sem atravessá-las. Posteriormente, as sementes danificadas foram colocadas para germinar e, submetidas aos tratamentos de regenerabilidade de raízes SE, ER1, ER2, ER3, ER4 e ER5 e de plântulas, SE, EP1, EP2 e EP3, como descrito anteriormente (figura 3B). As avaliações foram realizadas a cada três dias para raízes e semanalmente para plântulas.

Nestes experimentos utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de vinte e cinco sementes para todos os testes. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% (Santana e Ranal, 2004), e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), através do programa Sisvar.

Resultados e Discussão

As sementes do gênero *Eugenia*, apresentaram na caracterização inicial, altos teores de água (51 e 68%, para *E. uniflora* e *E. pyriformis*, respectivamente), pequena diferença entre as massas fresca (0,333 e 0,490 g. semente $^{-1}$) e seca (0,161 a 0,157 g. semente $^{-1}$), germinação 95 e 100% e produção de plântulas normais 80% para ambas espécies.

O acompanhamento da massa cotiledonar (figura 4) associada às regenerações de raízes, mostraram que a massa fresca e seca de sementes e novas raízes (figuras 4 A e 4 B), aumentou proporcionalmente, quando as raízes foram eliminadas (figura 5 A); entretanto, quando se eliminou as plântulas (figura 5 B), apenas a massa fresca aumentou. A massa seca de plântulas se manteve após a primeira e segunda eliminação de plântulas, porém, ao eliminar a terceira plântula, pode se observar a diminuição da porcentagem de regeneração (figuras 4 C e 4 D). Desse modo, foi possível notar certa equivalência entre os gráficos de acompanhamento das massas das raízes (figura 4 A e B) com os gráficos de eliminações e regeneração de raízes (figura 5 A), e o mesmo ocorreu quando se observou as massas das plântulas (figura 4 B e D), em relação aos gráficos de eliminações e regeneração de plântulas (figura 5 B).

A diferença observada nas massas fresca e seca das plântulas parece estar relacionada com a média da massa das sementes que sobraram em cada repetição, pois a massa individual das sementes não é uniforme e pode ter sido descartada uma semente de maior massa. Outros estudos identificam que o tamanho das sementes influencia diretamente na capacidade das mesmas em gerar novas plântulas e que tal capacidade reduz concomitante à redução no tamanho da semente (Prataviera et al., 2015).

Quanto ao aumento da massa fresca observado em plântulas, este parece ter relação com a absorção de água pelas sementes, pois não há esse aumento proporcional quando se observa a massa fresca das raízes. Milberg et al. (1996), estudando a germinação de

sementes de diferentes espécies, da família Boraginaceae que diferem em quantidade de massa, observaram que a taxa de germinação variou com a massa da semente entre as espécies testadas; os autores separaram previamente as sementes em grupos por massas similares e, então, identificaram que essas diferenças podem ter relação com à variação fenotípica e/ou genotípica e, ainda, devido a diferentes posições na planta mãe, resultando nas diferenças no enchimento de sementes.

Resultados semelhantes foram encontrados por Favarin et al. (2003), que estudaram as características de sementes em relação ao potencial fisiológico e qualidade de mudas em cafeeiro *(Coffea arabica* L.). Os autores identificaram que a altura da planta foi significativamente diferente dependendo do tamanho das sementes, e sementes com massas maiores produziram plantas maiores. Silva et al. (2010) constataram que mudas de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) originárias de sementes extragrandes tiveram brotos mais longos. Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), as sementes maiores têm embriões bem desenvolvidos com maior quantidade de substâncias de reserva, produzindo, portanto, plântulas mais vigorosas.

Com relação ao experimento das sementes danificadas artificialmente, a regeneração de raízes pode ser observada até a sexta raiz regenerada (tratamento de eliminação da quinta raiz - ER5) (Figura 6 A). A regeneração de raízes ocorreu nos quatro tipos de danos aplicados nas sementes; entretanto, nos tratamentos SE, ER1, ER2 e ER3, a regeneração de raízes se manteve acima de 50%, mas após ER4, reduziu a porcentagem da regeneração.

Provavelmente, a partir da quarta raiz regenerada, algum processo bioquímico de inibição seja acionado nas sementes, promovendo certa economia de recursos, que limita, mas não impede a produção de novas raízes (Delgado e Barbedo, 2011; Amador e Barbedo, 2011; 2015). Estudos anteriores indicam que a produção de ácido gálico tem forte relação

com a produção de novas raízes e plântulas, sugerindo a presença deste inibidor na área danificada das sementes (Amador e Barbedo, 2015).

Outro fator a considerar é que quando as sementes produziram a quarta regeneração de raízes, foram novamente semeadas já tendo transcorridos 120 dias da primeira semeadura, tempo em que os processos de deterioração das sementes podem ter se iniciado; possivelmente, as sementes ficaram com algumas partes dos cotilédones expostas, suscetíveis a processos oxidativos capazes de inibir ou atrasar a nova regeneração (Amorim et al., 2022).

Quanto a eliminação das plântulas, a regeneração ocorreu até a eliminação da segunda plântula (EP2), ou seja, a regeneração da terceira plântula nos tratamentos T3 e T4, porém nos dois tipos de danos, T1 e T2, não houve regeneração de uma nova plântula (Figura 6 B). É possível que, para a formação e desenvolvimento de uma nova plântula, o gasto energético das reservas da semente seja muito maior do que para a produção de raízes e por essa razão plântulas não apresentam regenerações tão expressivas quanto as raízes.

O total de reservas disponíveis para uma plântula não é determinado somente pela massa da semente, mas também é influenciado por sua composição química provendo energia e nutrientes para que possam crescer em ambientes com baixa disponibilidade luminosa, induzir a produção de compostos secundários de defesa e propiciar substituição de tecidos mortos ou removidos pela ação de herbívoros (Melo et al., 2004).

Com relação ao tempo em dias para as regenerações, a princípio quando se observou o tempo total acumulado das regenerações de raízes, os dados apresentados parecem seguir uma tendência que se estende a quase 200 dias para formar a sexta raiz (figura 7 A); mas ao observar o período adicional, em que se considerou apenas o período entre a eliminação e a regeneração (figura 7 C), o mesmo diminuiu e não passou de 30 dias, seguindo uma tendência, porém não observada quando se eliminou as plântulas (7 B e D).

De modo geral, os diferentes tipos de danos não impediram a capacidade regenerativa de sementes de *E. pyriformis*, que puderam germinar sucessivas vezes.

Em sementes de *E. uniflora* os dados de massa fresca e seca, de raízes e sementes e de plântulas e sementes indicam que foi possível acompanhar a redução da massa cotiledonar da semente, à medida que as sementes foram regenerando novas raízes e novas plântulas através da massa total. As raízes regeneraram por seis vezes e as plântulas foram capazes de regenerar por três vezes.

Referências

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 Science 41: 160-167.

Alonso, C.R., Barbedo, C.J. 2020. Germinações sucessivas em sementes de *Eugenia* spp. Hoehnea, v.47, e412019. https://doi. org/10.1590/2236-8906-41/2019

Amador, T.S.; Barbedo, C.J. 2011**.** Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de *Eugenia pyriformis.* Pesq. agropec. bras., Brasília, v.46, n.8, p.814-821.

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

http://www.scielo.br/pdf/jss/v37n3/2317-1537-jss-37-03-2317_1545v37n3150595.pdf

Amorim, I.P.; Silva, J.P.N.; Barbedo, C.J. 2022. Germination and regeneration of *Eugenia involucrata* (Myrtaceae) seeds correlate with reactive oxygen species.

Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA, 395p.

Benincasa, M. M. P., 2003. Análise de crescimento de plantas: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 42 p.

Bu, H.Y.; Zhnag, Y.M.; Zhao, D.; Su-Yu Wang, S. Y.; Jia, P.; Qi; Liu, K; Hui Xu, D.; Ge, W.J.; Wang, X. J. 2019. The evolutionary correlation associated with seed mass and altitude on nutrient allocation of seeds. Seed Science Research. 29, 38-43.

Calvi, G.P.; Aud, F.F.; Ferraz, I.D.K.; Pritchard, H.W.; Kraner, I. 2017**.** Analyses of several seed viability markers in individual recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata*

McVaugh with totipotent germination. Plant Biology, v.19, p.6-13, https://doi.org/10.1111/plb.12466

Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. 2000**.** Sementes: Ciência tecnologia e produção. 4. Ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 588p.

Cope, J. M.; Fox, C. W. 2003. Oviposition decisions in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): effects of seed size on superparasitism. Journal of Stored Products Research 39: 355–365.

Delgado, L.F.; Barbedo, C.J. 2011. Atividade inibidora da germinação em extratos de sementes de *Eugenia uniflora* L. Revista Brasileira de Sementes, v.33, p.463-471,

Delgado, L.F.; Barbedo, C.J. 2020. Regeneração de raízes e plântulas de sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) de diferentes estádios de maturação. Hoehnea, v.47, e042020. https://old.scielo.br/pdf/hoehnea/v47/2236-8906-hoehnea-47-e042020.pdf.

Favarin, J.L.; Costa, J.D.; Novembre, A.D.C.; Fazuoli, L.C.; Favarin, M.G.G.V. 2003. Características da semente em relação ao seu potencial fisiológico e a qualidade de mudas de café (*Coffea arabica* L.). Revista Brasileira Sementes, Pelotas, 25 (2): 2-11.

Gomes, F. H. F.; Cunha, F. N. Lopes Filho, L. C. Soares, F. A. L.; Teixeira, M. B.; Morais, W. A. 2018. Análise de crescimento do milho safrinha em diferentes épocas de aplicação de zinco. Nativa, Sinop, v. 6, n. 3, p.557-562. DOI: http://dx.doi.org/10.31413/nativa.v6i6.5576

Inocente, M.C.; Barbedo, C.J. 2021. Regeneration of roots and seedlings from *Eugenia involucrata* seeds under water deficit conditions. Journal of Seed Science, v.43, e202143015. https://doi.org/10.1590/2317-1545v43248394

Janzen, D. H. 1971. Seed predation by animals. Annual Review of Ecology and Systematics 2: 465-492.

Justo, C.F.; Alvarenga, A.A.; Alves, E.; Guimarães, R.M.; Strassburg, R.S. 2007. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. Acta Botanica Brasílica, v.21, p.539-551.

Klein, J.; Zucareli, V.; Kestring, D.; Camili, L.; Rodrigues, J. D. 2007. Efeito do tamanho da semente na emergência e desenvolvimento inicial de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 861-863.

Masetto, T. E.; Davide, A. C.; Faria, J. M. R.; Silva, E. A. A.; Rezende, R. K. S. 2009. Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia pleurantha* (MYRTACEAE) pelos testes de germinação e tetrazólio. Agrarian, v.2, n.5, p.33-46.

Melo, F. P. L.; Aguiar Neto, A. V.; Tabarelli, M. S. 2004. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. p.237-241.

Milberg, P.; Andersson, L.; Elfverson, C.; Regnér, S. 1996. Germination characteristics of seeds differing in mass. Seed Science Research, 6, p.191- 198.

Prataviera, J. S., Lamarca, E. V., Teixeira, C. C., Barbedo, C. J. 2015**.** The germination success of the cut seeds of *Eugenia pyriformis* depends on their size and origin. Journal of Seed Science, v. 37, n.1, p. 047-054.

Refsnider, J.; Janzen, F.J. 2010. Putting Eggs in One Basket: Ecological and Evolutionary Hypotheses for Variation in Oviposition-Site Choice. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics. 41:39 - 57. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-102209-144712.

Ribeiro, L.F. 2004. Dispersão e predação de grandes sementes por *Sciurus aestuans* L. em fragmentos de Floresta Atlântica Montana no estado do Espírito Santo, Brasil. Tese de doutorado apresentada a Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife - PE. 177p.

Rodrigues, L.M.S. 2013. Insetos predadores de sementes e suas relações com a qualidade e a morfologia de frutos e sementes. Tese apresentada ao Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu – SP. 117p.

Santana, D.G.; Ranal, M.A. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília.

Senra, T. V. 2012. Ocorrência da broca (Coleoptera: Curculionidae) em frutos de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (pedra-ume-caá) em uma área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas – UFAM / Manaus. 40f.

Silva, A. L. G.; Pinheiro, M. C. B.; 2009. Reproductive success of four species of Eugenia L. (Myrtaceae) Acta Bot. Bras. 23(2): 526-534.

Silva, K.S.; Mendonça, V.; Medeiros, L.F.; Freitas, P.S.C.; Góis, G.B. 2010**.** Influência do tamanho da semente na germinação e vigor de mudas de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Revista Verde, Mossoró/RN,5 (4): 217-221.

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

Teixeira, C. C. 2009. Regeneração de embriões em sementes fracionadas de espécies brasileiras de *Eugenia*: influência do estádio de maturação, do armazenamento e da fase de germinação. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu – SP. 70p.

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

Figura 1. Fluxograma da sequência dos tratamentos de regenerabilidade aplicados às sementes de *E. uniflora*, no primeiro experimento e *E. pyriformis*, no segundo experimento.

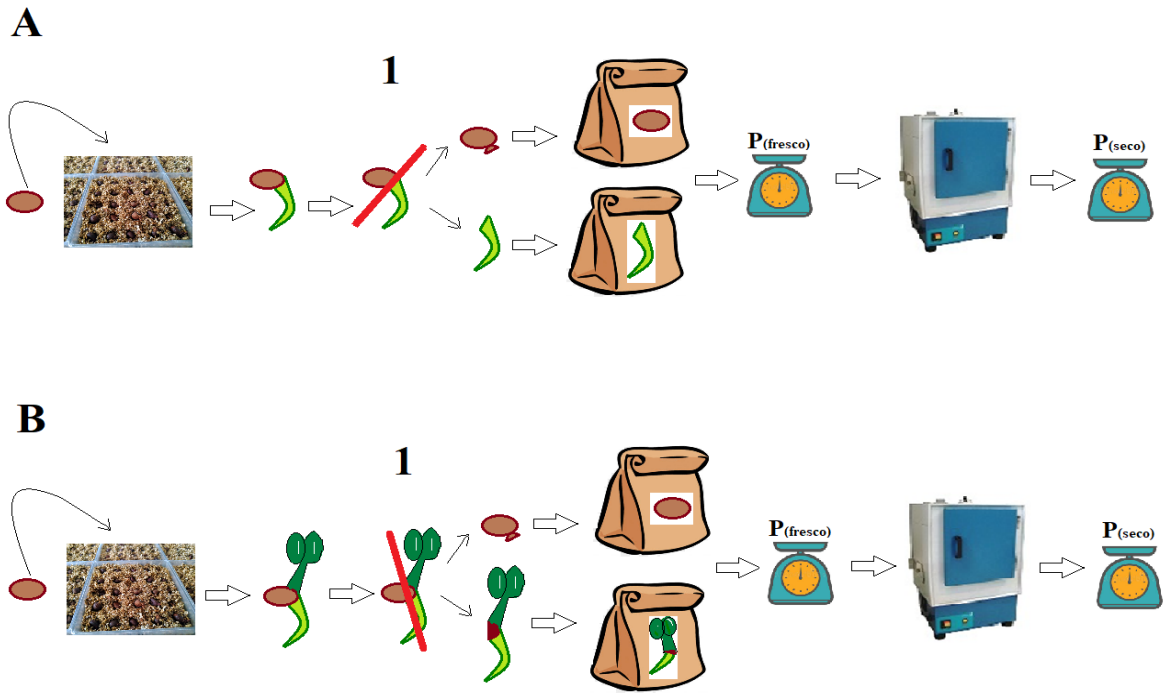

Figura 2. Esquema dos tratamentos aplicados as sementes de *E. uniflora*, para obtenção do peso seco das raízes (A) e plântulas (B) regeneradas.

Figura 3. Danos ocasionados naturalmente em frutos e sementes de *Eugenia* spp. (A) e artificialmente em sementes de *Eugenia pyriformis* (B). T1 = sementes cortadas, eliminando-se as áreas periféricas; T2 = com auxílio de um trado, as sementes foram perfuradas ao meio, atravessando-as; T3 = as sementes foram cortadas, eliminando cerca de 1/4 da semente na lateral oposta ao eixo hipocótilo-radícula; T4 = com auxílio de um trado e uma cureta, as sementes foram perfuradas e cavadas ao meio sem atravessá-las.

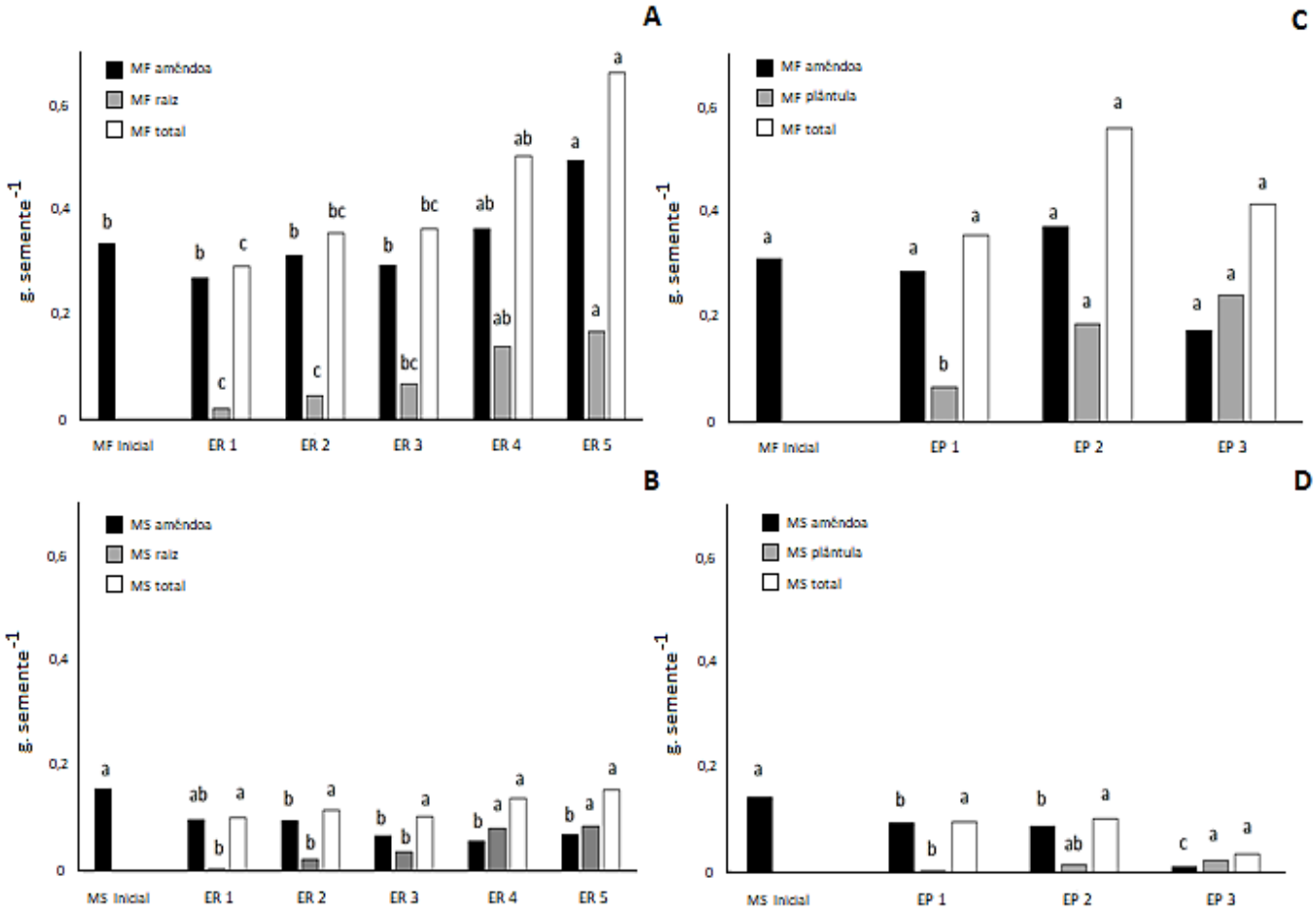

Figura 4. Distribuição das médias das massas fresca (A e C) e seca (B e D) (g. semente $^{-1}$), de amêndoas e raízes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos de eliminação de raízes (ER) (A e B) e de amêndoas e plântulas de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos de eliminação de plântulas (EP) (C e D). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5%.

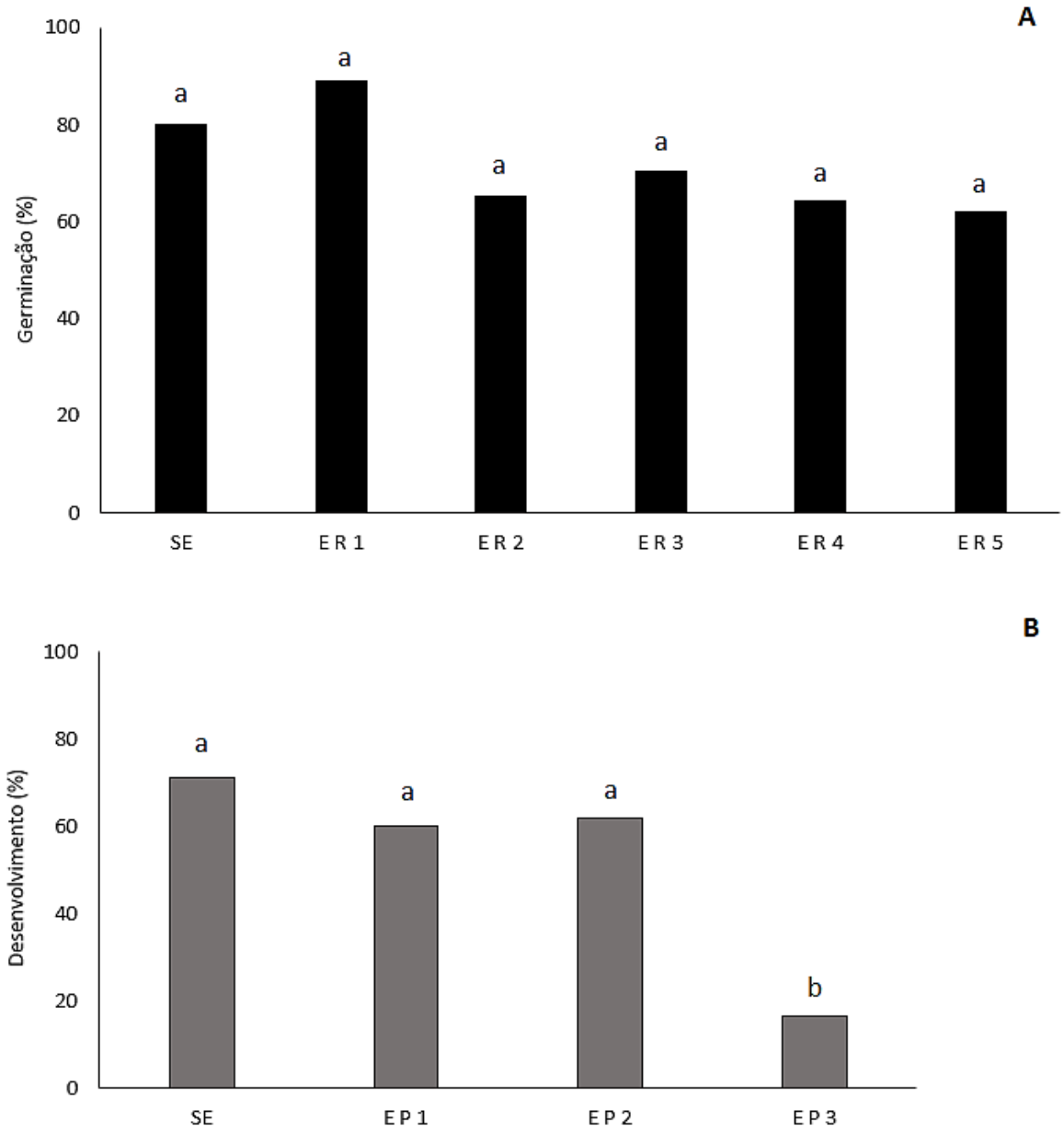

Figura 5. Germinação (A) e desenvolvimento de plântulas (B), em sementes de *E. uniflora*, submetidas a eliminação de raízes (ER) em que, SE = sem eliminações; ER 1 = eliminação de primeira raiz; ER 2 = eliminação de segunda raiz; ER 3 = eliminação de terceira raiz; ER 4 = eliminação de quarta raiz e ER 5 = eliminação de quinta raiz e eliminação de plântulas (EP) em que, SE = sem eliminações; EP 1 = eliminação de primeira plântula; EP 2 = eliminação de segunda plântula e EP 3 = eliminação de terceira plântula. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5%.

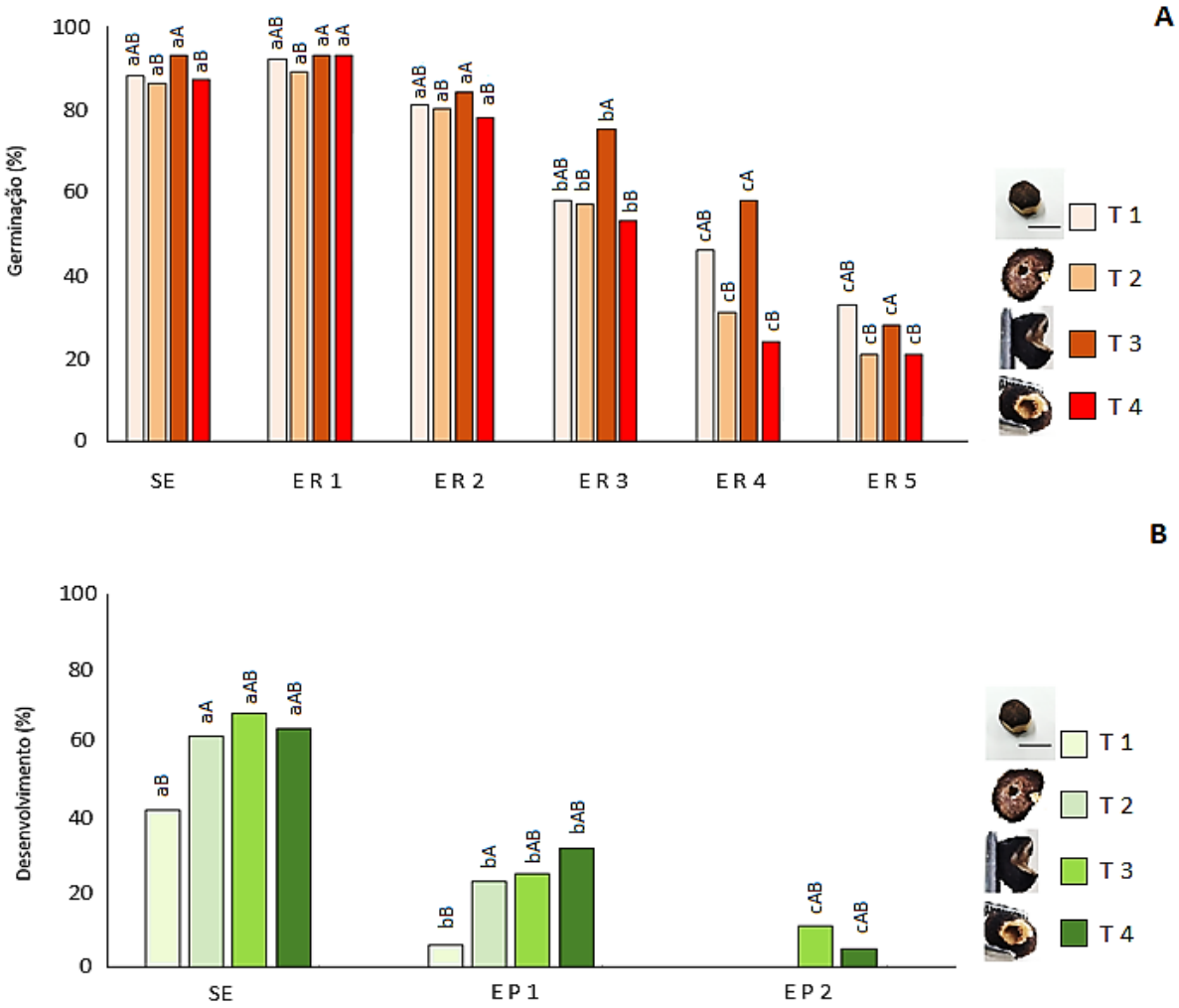

Figura 6. Produção de novas raízes (A) e novas plântulas (B) em sementes de *Eugenia pyriformis* (T1, T2, T3 e T4), submetidas à redução de suas reservas e eliminação de raízes (ER) e eliminação de plântulas (EP). T1 = as sementes foram cortadas, eliminando as áreas periféricas; T2 = com auxílio de um trado, as sementes foram perfuradas ao meio, atravessando-as; T3 = as sementes foram cortadas, eliminando cerca de 1/4 da semente na lateral oposta ao eixo hipocótilo-radícula e T4 = com auxílio de um trado e uma cureta, as sementes foram perfuradas e cavadas ao meio sem atravessá-las. Letras maiúsculas comparam os tipos de danos e letras minúsculas comparam eliminações de raízes (ER) ou plântulas (EP).

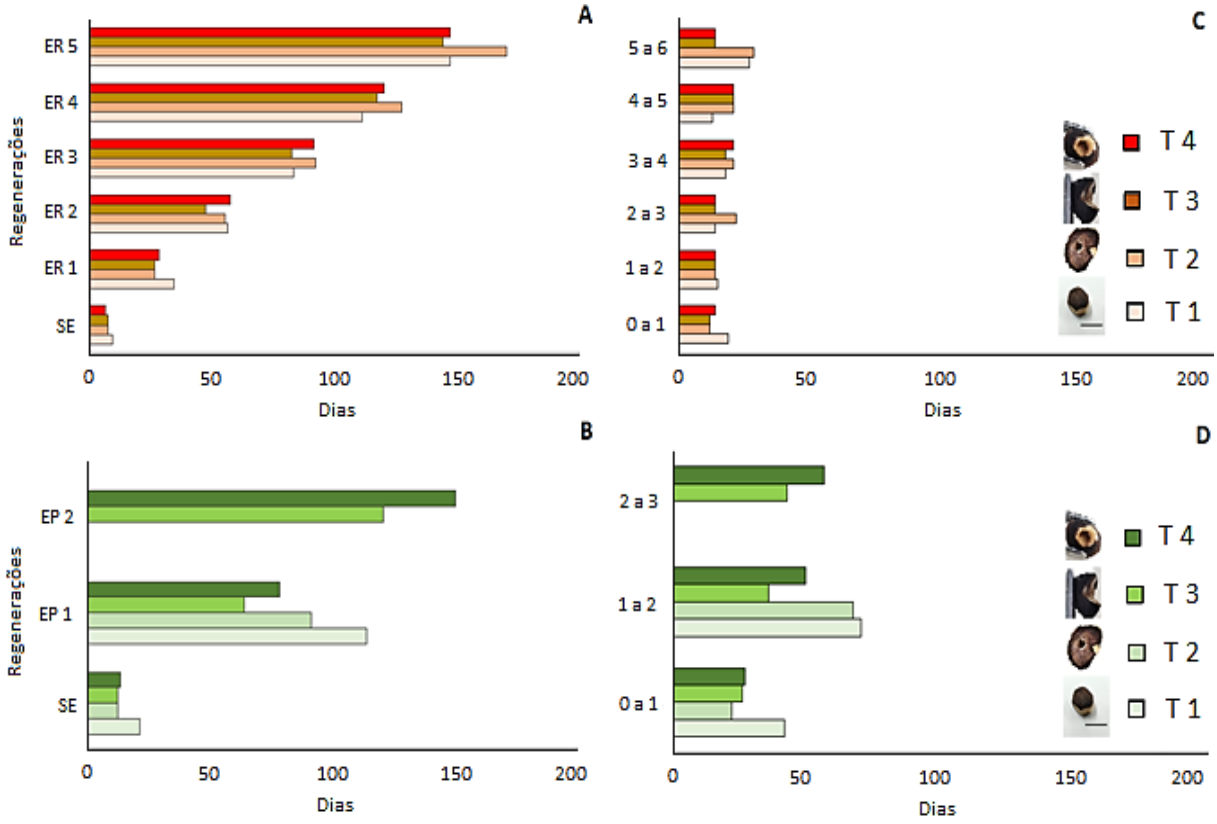

Figura 7. Tempo (dias) para regeneração de novas raízes (A) e novas plântulas (B) a partir de sementes de *Eugenia pyriformis*, submetidas a redução das reservas e eliminação de raízes (ER) e eliminação de plântulas (EP). T1 = as sementes cortadas, eliminou-se as áreas periféricas; T2 = com auxílio de um trado, as sementes foram perfuradas ao meio, atravessando-as; T3 = as sementes foram cortadas, eliminando cerca de 1/4 da semente na lateral oposta ao eixo hipocótilo-radícula e T4 = com auxílio de um trado e uma cureta, as sementes foram perfuradas e cavadas ao meio sem atravessá-las. Tempo (dias) entre a eliminação da raiz anterior e a próxima raiz regenerada (C) e entre a plântula anterior e a próxima plântula regenerada (D).

Considerações finais

O estabelecimento, o desenvolvimento, e a sobrevivência de plântulas são afetados por diversos fatores morfofisiológicos e abióticos e por interações biológicas. A forma como as espécies respondem a esses fatores determina o sucesso ou a falha no estabelecimento de um conjunto de plântulas capazes de se desenvolver e atingir os próximos estádios de vida. Nomeia-se estratégia de regeneração ao conjunto de atributos morfofisiológicos que conferem às espécies vegetais a capacidade de estabelecer novos indivíduos no ambiente (Swaine e Whitemore, 1988), mais especificamente, estas características fazem parte das sementes e indivíduos jovens.

Através de estratégias ecológicas, espécies do gênero *Eugenia* foram estabelecendo no ambiente e a capacidade regenerativa de formar novas raízes e plântulas pode ser considerada uma grande vantagem evolutiva para propagação e permanência para estas espécies (Vaz, 2011).

As interações inseto-semente quando as sementes são predadas e pássaro-semente quando as sementes são dispersas, também parecem contribuir para o estabelecimento e propagação das sementes de *Eugenia*, ora consumindo grande parte da reserva cotiledonar, ora carregando as sementes para longe da planta-mãe (Dracxler e Kissling, 2022).

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam e corroboram com trabalhos realizados anteriormente, que a capacidade regenerativa das sementes de *Eugenia* estudada, ocorre mesmo que se variassem a espécie, o grau de maturação, local de coleta, tipos de fracionamento, tipos de danos e tipos de armazenamento, em todos os experimentos realizados foi possível observar a capacidade regenerativa de raízes e plântulas sucessivas vezes. As raízes regeneraram mais vezes em relação às plântulas.

Referências bibliográficas da introdução e das considerações finais

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.

Begon, M.; Townsend, C. R.; Harper, J. L. 2007. Ecologia: De Indivíduos a Ecossistemas. Artmed, Porto Alegre. 740 p.

Delgado, L. F.; Barbedo, C. J. 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, p.265-272.

Delgado, L.F., 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.

Denno, R. F.; Lewis, D. 2009. Predator-prey interactions. In: Levin S. A. (ed.), The Princeton guide to ecology. Princeton University Press, New Jersey. 202-212.

Dracxler, C.M.; Kissling, W. D. 2022. The mutualism–antagonism continuum in Neotropical palm–frugivore interactions: from interaction outcomes to ecosystem dynamics. Biol. Rev., 97, pp. 527–553. 527 doi: 10.1111/brv.12809

IBF, 2023. Instituto Brasileiro de Florestas. Disponível em: <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html> Acesso em 10/05/2023.

IESB, 2007. Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia. Levantamento da Cobertura Vegetal Nativa do Bioma Mata Atlântica. Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica brasileira – Probio.

Lino, C. F. O. 2004. Bioma Mata Atlântica. *In*: Lino, C.F.; Dias, H. (Org.). Água e floresta da mata atlântica: por uma gestão integrada São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 132p. (Caderno da RNBMA: série política pública, 27).

Pinto, L. P., Bedê, L., Paese, A., Fonseca, M. Paglia, A.; Lamas, I. 2006. Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um *hotspot* mundial. Pp. 91-118. In*:* C.F.D. Rocha, H.G. Bergallo, M.V. Sluys, & M.A.S. Alves (eds.). Biologia da Conservação: essências. São Carlos, RiMa.

Santos, I.R.I.; Salomão, A. N. 2010. Manual de curadores de Germoplasma Vegetal: Criopreservação. EMBRAPA, BRASÍLIA - DF.

Scalon, S. P. Q.; Neves, E. M. S.; Masetto, T. E.; Pereira, Z. V. 2012. Sensibilidade à dessecação e ao armazenamento em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia). Revista Brasileira de Fruticultura, v.34, n.1, p.269-276.

Sena, L. H. M; Matos, V. P.; Ferreira, E. G. B.S.; Sales, A. G. F. A.; Pacheco, M. V. 2010. Qualidade fisiológica de sementes de pitangueira submetidas a diferentes procedimentos de secagem e substratos - parte 1. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.14, n.4, p.405-411.

Swaine, M.D.; Whitemore, T.C. 1988. On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. Vegetatio., v.75, p. 81-86.

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

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

Tsan, F.Y. 2023. Regeneration of *Syzygium myrtifolium* Walp. from Seed Fragments – Evidence of Polyembryony? Malaysian Applied Biology (2023) 52(1): 101-107 https://doi.org/10.55230/mabjournal.v52i1.2446

Vaz, M. C. 2011. Diversidade de estratégias ecológicas das espécies de árvore dominantes de uma floresta de erra firme da Amazônia Central. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da USP. 109p.