

WESLEY DIAS GOMES

Armazenamento e viabilidade com limitação hídrica em sementes de *Eugenia* spp. em diferentes temperaturas

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

SÃO PAULO 2023

WESLEY DIAS GOMES

Armazenamento e viabilidade com limitação hídrica em sementes de *Eugenia* spp. em diferentes temperaturas

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

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

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

G633a Gomes, Wesley Dias
Armazenamento e viabilidade com limitação hídrica em sementes de
Eugenia spp. em diferentes temperaturas / Wesley Dias Gomes - - São Paulo,
2023. 76p.; il.

Dissertação (Mestrado) - - Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de
Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 2023.

Bibliografia.

1. Conservação ex situ. 2. Condicionamento osmótico. 3. Sementes recalcitrantes.
I. Título.

CDU: 631.53.01

*À Anelita Pereira Dias, minha mãe,
e à Anésia Alves de Oliveira (in memorian), minha amada avó,
dedico*

*“A ciência é a aproximação
progressiva do homem
com o mundo real.”*
- Max Planck

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto,
é a coisa mais preciosa que temos.”*
- Albert Einstein

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Claudio José Barbedo, a princípio pela oportunidade concedida, pelas importantíssimas contribuições durante toda a execução do projeto, e pelos excelentes conselhos que levarei para além da esfera profissional e acadêmica.

À minha mãe, Anelita Pereira Dias, por proporcionar condições na qual permitiu-me dedicação total ao projeto e pelo incentivo.

À Dra. Marina C. Guardia por ter aberto as portas e me possibilitado acesso ao universo das sementes, bem como, ter me ensinado diversas atividades e ter me apoiado em diversas oportunidades.

À Monica V. Cachenco e à Lilian Asperti por todo os ensinamentos técnicos durante a rotina laboratorial que outrora foi de extrema importância para o desenvolvimento deste projeto.

Às amigas e colegas de trabalho, Camila R. Alonso e Janaina Pinheiro por toda a ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos amigos e colegas de trabalho, Santiago N. Alves, Gabriel F. Manoel, Natália Saneda e Márcia Santos, por todo o apoio, conversas e instruções.

Às amigas Gabriela Olmedo e Darah Pontes por todo o apoio e todas as figurinhas trocadas, bem como todas as conversas e incentivo que me motivaram muito.

À Maiara Iadwizak Ribeiro pela importante contribuição com as análises estatísticas e apoio.

À Dra. Rayana Martins de Sá pela amizade cultivada, por todos os ensinamentos sobre patologia de sementes, bem como a ajuda nas identificações dos gêneros de fungos.

Aos integrantes da Banca de Examinadora de Qualificação, Dra. Catarina Nievola, Dra. Carol Coelho Brandão e o Dr. Nelson Santos Junior, pelas importantes críticas, sugestões e correções.

Aos integrantes da Banca de Defesa, Carolina Coelho Brandão e Nelson A. dos Santos Junior por terem aceitado o convite.

À toda minha família que sempre esteve presente em momentos difíceis e sempre comemorou minhas conquistas.

Ao meu Ex-chefe e grande inspiração, João Carlos, que para além de ter me amparado e incentivado durante a graduação, participou de toda a minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao Francisco Gonçalves pelo suporte nas coletas, e a Danielle Fernandes pelo apoio no laboratório.

À Vilma, responsável pela comutação da biblioteca da ESALQ – USP, pela ajuda com a bibliografia.

Ao Instituto de Pesquisas Ambientais, Núcleo de Pesquisa em Sementes e ao Laboratório de Sementes, pela concessão do material de pesquisa e dos equipamentos que permitiram a conclusão desse projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela realização do presente estudo. À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado. À FAPESP pelo financiamento da pesquisa (Processo: 17/50341-0).

A todos que direto ou indiretamente contribuíram
para tornar possível a elaboração dessa pesquisa

Muito obrigado!

RESUMO

A conservação de sementes recalcitrantes *ex situ* tem sido um dos maiores desafios na tecnologia de sementes. Diferentes estratégias têm surgido nos últimos anos, e entre essas estratégias, o condicionamento osmótico em temperaturas controladas tem demonstrado ótimos resultados. Com isso, o objetivo deste trabalho foi armazenar sementes recalcitrantes de *Eugenia uniflora* e *E. involucrata* por intermédio do condicionamento osmótico, a fim de reduzir o metabolismo dessas sementes e estender o tempo de viabilidade. As sementes de *E. uniflora* foram armazenadas em câmaras climatizada (BOD) sob as temperaturas de 10 e 25 °C em soluções de PEG a -0,5, -1,0 -1,5 e -2,0 MPa, em água destilada (0,0 MPa) e sem umedecer (controle), durante o período de 3, 6 e 12 meses e avaliadas quanto o teor de umidade, potencial hídrico, sanidade, germinação e desenvolvimento de plântulas normais ao final de cada período. As de *E. involucrata* também foram armazenadas nas mesmas condições osmóticas, porém somente a 25 °C por 4 meses. Sementes de *E. uniflora* foram avaliadas, ainda, quanto às taxas respiratórias, simulando as condições de armazenamento descritas anteriormente. Após a avaliação e apuração dos resultados, observou-se redução do metabolismo nos tratamentos com PEG, sobretudo no tratamento a -2,0 MPa em ambas as temperaturas. Houve a manutenção da viabilidade das sementes de *E. uniflora* aos 12 meses com alto índice de germinação. O controle perdeu a viabilidade aos 6 meses em ambas as temperaturas. A temperatura foi determinante na redução do metabolismo, e em sementes armazenadas a 10 °C houve menor liberação de CO₂ se comparado a 25 °C. Contudo, as sementes apresentaram altas taxas de viabilidade em temperatura ambiente (25 °C) com 94 % de germinação e 88% de plântulas normais. Sementes de *E. involucrata* apresentaram resultados distintos de *E. uniflora*, com a maior taxa de viabilidade registrada no armazenamento em água destilada (0,0 MPa). Foi observado em ambas as espécies de *Eugenia* spp. maior incidência dos os gêneros *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp.. Entretanto, não foi possível atribuir a queda da viabilidade das sementes a esses fungos, pois apesar de atuarem no processo de deterioração de sementes, eles estavam presentes demasiadamente em tratamentos cujas sementes apresentavam elevadas taxas de viabilidade. Em suma, a redução do metabolismo permitiu armazenar as sementes de *E. uniflora* por 12 meses e *E. involucrata* por 4 meses em temperatura ambiente (25 °C).

Palavras-chave: conservação *ex situ*, controle do metabolismo, condicionamento osmótico, sementes recalcitrantes

ABSTRACT

The *ex situ* conservation of recalcitrant seeds has been one of the biggest challenges in seed technology. Different strategies have emerged in recent years and among these strategies, osmotic conditioning at controlled temperatures has demonstrated excellent results. Therefore, the objective of this work was to store recalcitrant seeds of *Eugenia uniflora* and *E. involucrata* through osmotic conditioning, in order to reduce the metabolism of these seeds and extend their storability. *E. uniflora* seeds were stored in air-conditioned chambers (BOD) at temperatures of 10 and 25 °C in PEG solutions at -0.5, -1.0 -1.5 and -2.0 MPa, in water distilled (0.0 MPa) and without moistening (control), during 3, 6 and 12 months and evaluated for moisture content, water potential, sanity, germination and normal seedling development at the end of each period. Those of *E. involucrata* were also stored under the same osmotic conditions, but only at 25 °C for 4 months. *E. uniflora* seeds were also evaluated for respiratory rates, simulating the storage conditions described previously. After evaluating and determining the results, a reduction in metabolism was observed in treatments with PEG, especially in the treatment at -2.0 MPa at both temperatures. The viability of *E. uniflora* seeds was maintained after 12 months with a high germination rate. The control treatment lost viability at 6 months at both temperatures. Temperature was decisive in reducing metabolism, and in seeds stored at 10 °C there was less release of CO₂ compared to 25 °C. However, the seeds showed high viability rates at room temperature (25 °C) with 94% germination and 88% normal seedlings. Seeds of *E. involucrata* showed different results from *E. uniflora*, with the highest viability rate recorded when stored in distilled water (0.0 MPa). It was observed in both species of *Eugenia* spp. higher incidence of the genera *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp.. However, it was not possible to attribute the drop in seed viability to these fungi, as despite acting in the seed deterioration process, they were too present in treatments whose seeds showed high rates of viability. In short, the reduction in metabolism allowed the seeds of *E. uniflora* to be stored for 12 months and *E. involucrata* for 4 months at room temperature (25 °C).

Key words: *ex situ* conservation, metabolism control, osmotic conditioning, recalcitrant seeds

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Detalhes da obtenção das sementes. A: matriz de *E. uniflora* com lona do tipo sombrite; B: frutos maduros; C: sementes extraídas.....26
- Figura 2.** Frasco hermético (600 ml) (A), tampa do frasco perfurada (B) tampa do frasco com o septo de silicone (C) Analisador de Gases 6600 (D) coleta de amostra do ar no interior dos frascos através de uma agulha hipodérmica (E).....28
- Figura 3.** Semente de *E. uniflora* germinada (A), plântula normal com parte aérea e raízes desenvolvidas (B), plântula anormal formada durante o armazenamento (C), plântula anormal retomando o desenvolvimento da parte aérea (D).....31
- Figura 4.** Sementes de *E. uniflora* distribuídas de forma equidistante em placa de *Petri* (A), vista de estereoscópio de uma semente de *E. uniflora* com incidência fúngica (B), vista de microscópio ópticos de estruturas dos conídios de *Alternaria* sp. isolada e destacada (C).....32
- Figura 5.** Sementes de *E. uniflora* recém retiradas das câmaras BOD após 12 meses de armazenamento a 10 °C (A) e 25° C (B), incubadas sem umedecer (controle) ou nos potenciais de 0,0 MPa, -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa.....33
- Figura 6.** Porcentagem de Germinação durante o armazenamento (GDA – barras azuis), germinação no teste após retirada (GR – barras laranjas) e desenvolvimento de plântulas normais (PN – barras verdes) de sementes de *E. uniflora* armazenadas por 3, 6 e 12 meses a 10 °C (A, C e E) e por 3, 6 e 12 meses a 25 °C (B, D e F respectivamente) nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos potenciais osmóticos de -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).....35
- Figura 7.** Consumo de O₂ e liberação de CO₂ em sementes incubadas de *E. uniflora* pelo período de 12 horas nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).....40
- Figura 8.** Consumo de O₂ e liberação de CO₂ em sementes incubadas de *E. uniflora* pelo período de 24 horas nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).....41
- Figura 9.** Consumo de O₂ e liberação de CO₂ em sementes incubadas de *E. uniflora* pelo período de 48 horas nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).....41
- Figura 10.** Quociente de respiração de sementes de *E. uniflora*, incubas pelo período de 12, 24 e 48 horas, avaliados em cada período nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).....43
- Figura 11.** Taxas oxidativas de sementes de *E. uniflora* incubadas por 12, 24 e 48 horas, nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG a -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa, a 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).....45

Figura 12. Germinação durante o armazenamento (GDA), durante o teste de germinação (GR) e desenvolvimento de plântulas normais (PN) de sementes de *E. involucrata* armazenadas por 4 meses nos tratamentos controle (sem umedecer), água (0,0), e PEG a -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa, a 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).....51

Figura 13. Teor de água de sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas durante 4 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a temperaturas de 25 °C.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores do teor de água e potencial hídrico (Ψ_w) das sementes de *E. uniflora* após a retirada das câmaras BOD, nos períodos de 3, 6 e 12 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0) e PEG nos potenciais de -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa, a 10 e 25 °C.....34

Tabela 2. Tamanho médio da parte aérea (PA) e da raiz (R) provenientes da germinação de *E. uniflora* após um ano de armazenamento nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 ° C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).39

Tabela 3. Incidência fúngica em sementes de *E. uniflora* armazenadas por 3 meses à 10 e 25 °C, em que *Clad.* (= *Cladosporium* sp.), *Alte.* (= *Alternaria* sp.), *Fusa.* (= *Fusarium* sp.), *Peni.* (= *Penicillium* sp.), *Cera.* (= *Ceratocystis* sp.) e *Phps.* (= *Phomopsis* sp.) e teor de água (TA), nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 ° C, letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey a 5%. (* dados não obtidos).....47

Tabela 4. Incidência fúngica em sementes de *E. uniflora* armazenadas por 6 meses à 10 e 25 °C, em que *Clad.* (= *Cladosporium* sp.), *Alte.* (= *Alternaria* sp.), *Fusa.* (= *Fusarium* sp.), *Peni.* (= *Penicillium* sp.), *Cera.* (= *Ceratocystis* sp.) e *Phps.* (= *Phomopsis* sp.) e teor de água (TA), nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 ° C, letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey a 5%.....48

Tabela 5. Incidência fúngica em sementes de *E. uniflora* armazenadas por 12 meses à 25 °C, em que *Clad.* (= *Cladosporium* sp.), *Alte.* (= *Alternaria* sp.), *Fusa.* (= *Fusarium* sp.), *Peni.* (= *Penicillium* sp.), *Cera.* (= *Ceratocystis* sp.), *Phps.* (= *Phomopsis* sp.) e *Botr.* (= *Botrytis* sp.), nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 ° C, letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey a 5%.....49

Tabela 6. Tamanho médio em centímetros da parte aérea (PA) e da raiz (R) provenientes da germinação de *E. involucrata* após 4 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a temperaturas de 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).....52

Tabela 7. Incidência fúngica em sementes de *E. involucrata* armazenadas por 4 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a temperaturas de 25 °C, em que *Peni.* (= *Penicillium* sp.), *Fusa.* (= *Fusarium* sp.), *Cer* (= *Ceratocystis* sp.), *Phps.* (= *Phomopsis* sp.) e *Rizh.* (= *Rizhopus* sp.), letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey a 5%.....53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Conservação <i>ex situ</i> de sementes sensíveis a dessecação.....	14
1.2. Técnicas de armazenamento de sementes recalcitrantes.....	16
1.3. Relações hídricas nas sementes.....	18
1.4. Sensibilidade à dessecação.....	19
1.5. Respiração de sementes.....	20
1.6. Características das espécies estudadas.....	21
1.7. Armazenamento de sementes <i>Eugenia</i> spp.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Obtenção do material biológico.....	26
3.2. Avaliação do armazenamento e das taxas de respiração.....	26
3.3. Determinações físicas e fisiológicas.....	29
3.4. Delineamento experimental e análise estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 <i>Eugenia uniflora</i>	31
4.2 <i>Eugenia involucrata</i>	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que as sementes surgiram há *ca.* 370 milhões de anos, no Devoniano. (Niklas, 1997). Essa estrutura, composta por um embrião, tecido de reserva e revestida por um tegumento, permitiu a ascensão e estabelecimento das plantas em ambientes terrestres e, desde então, as sementes desenvolveram diferentes estratégias adaptativas de acordo com o ambiente em que estão inseridas (Willis & McElwain 2002). Um dos grandes desafios para as sementes durante a migração das espécies vegetais para ambientes terrestres foi a superação da necessidade de água em demasia (Linkies *et al.* 2010). A evolução das sementes passou por sucessivas adaptações a ambientes com pouca disponibilidade de água, produzindo uma grande quantidade de diferentes comportamentos, alguns dos quais ainda são pouco compreendidos (Bewley & Black 1994, Marcos-Filho 2015).

O cultivo das sementes pelo homem, culminou no desenvolvimento da agricultura no final do Paleolítico, há cerca de 10 mil anos (Mazoyer & Roudart 2009). Sucessivamente, grandes movimentos foram registrados, como a agricultura nas margens do rio Nilo, no qual já era possível constatar o armazenamento de alimentos, especialmente grãos e frutos secos (Mazoyer & Roudart 2009, Fuller & Stevens 2019), e entre os rios Tigres e Eufrates, com estoques de sementes de algumas espécies (Riehl 2014, Fairbairn *et al.* 2006).

A relação homem-semente tem desempenhado um papel relevante na história, isso facilitou a domesticação vegetal, surgimento das primeiras plantações, e conseqüentemente, a ascensão da agricultura com o cultivo e a seleção de algumas espécies. Isso permitiu o assentamento em zonas estratégicas, resultando desde então, no desenvolvimento da civilização. É indissociável o desenvolvimento da agricultura e o progresso humano, sendo ela fundamental para o sucesso dos povos ao garantir alimentação, o que possibilitou a evolução do comércio que, com abundância de recursos, culminou na expansão de pequenos vilarejos à grandes impérios (Smith 1998). Parte do êxito dos nossos ancestrais no desenvolvimento da agricultura foi devido ao domínio de estratégias para armazenar sementes.

Dentre as principais condicionantes que tornaram possível o armazenamento das sementes

estão: a capacidade de permanecerem viáveis por longos períodos em ambientes secos e a capacidade de resistir a temperaturas baixas (Harrington 1960, Ellis 2022). Tolerar essas condições foi por muito tempo considerado como padrão para a maioria das sementes. Contudo, algumas espécies apresentam outro tipo de comportamento durante o armazenamento, principalmente em ambientes tropicais, com muita umidade e temperaturas altas (Roberts & King 1980). Essa diferença de comportamento entre as sementes foi identificada somente no final do século XIX e estudada desde o início do século passado (Van Thiegen & Bonnier 1882, Kidd 1914).

Em 1973, Roberts separou as sementes em dois grupos com base no comportamento de armazenamento, classificando-as como ortodoxas, quando tolerantes à dessecação, às baixas temperaturas e com potencial de armazenamento prolongado, e recalcitrantes, quando sensíveis à dessecação e com curta longevidade. Contudo, sementes de diversas espécies não se enquadravam nesses grupos e, em 1996, Hong e Ellis desenvolveram um protocolo, criando uma terceira categoria, com sementes denominadas intermediárias (Roberts 1973, Hong & Ellis 1996). Sucessivos estudos foram realizados desde então, nos quais foram identificadas mais especificidades nas sementes, constatando-se variações de comportamento não só entre espécies, mas também numa mesma espécie em diferentes locais ou em diferentes períodos de dispersão. Isso tornou difícil classificar e padronizar todas as sementes, evidenciando a enorme variedade de comportamentos (Daws *et al.* 2004, Daws *et al.* 2006, Lamarca *et al.* 2016, Barbedo 2018, Lamarca *et al.* 2020).

As sementes recalcitrantes estão comumente presentes em ambientes sazonais, isto é, com mudanças ambientais durante um determinado período anual. Portanto, com a necessidade de se adaptar a essas condições, muitas das vezes, tais sementes normalmente dispõem de mecanismos que não as limitam a serem dispersas já aptas a germinarem (Farrant *et al.* 1988, Pammenter & Berjak 1999, 2000). Recentemente, aventou-se a possibilidade de que as sementes recalcitrantes poderiam ser, na verdade, ortodoxas imaturas e, assim, uma das possibilidades de armazená-las dependeria do desenvolvimento uma forma de prolongar o momento de sua dispersão, permitindo um estágio mais avançado de maturação (Barbedo *et al.* 2013, Barbedo 2018). Contudo, ainda não há tecnologia que

permita o armazenamento a longo prazo dessas sementes e, portanto, para sua conservação *ex situ*, é necessário o desenvolvimento de métodos alternativos aos aplicados às sementes ortodoxas.

É constatável que sementes recalcitrantes são intolerantes a temperaturas congelantes e a relação hídrica parece ser o principal fator, pois quanto maior a quantidade de água presente nos tecidos, maior também será o dano causado pelo resfriamento (Chin *et al.* 1989, Pammenter & Berjak 1999). Há na literatura, inclusive, registro de sementes recalcitrantes que toleram temperaturas negativas, com algumas sementes sendo capazes de manterem-se viáveis nessas condições (Bonjovani & Barbedo 2008, 2019). Em temperaturas amenas, a umidade alta pode favorecer o processo de germinação das sementes ou, quando alguma condição limite essa germinação, pode ocorrer sua rápida deterioração (Harrington 1972, Marcos-Filho 2015).

A deterioração das sementes é um processo natural, que acontece de maneira implacável e irreversível (Delouche 1969), potencializada por agentes externos, como os microrganismos, e internos, como reações químicas e fisiológicas. Nestas últimas, pode-se destacar a produção de radicais livres no conteúdo celular, especialmente as espécies reativas de oxigênio (EROs), a mais presente, mas também as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), menos frequentes (Popinigis 1985, Andréo *et al.* 2006, Hoekstra 2005, Halliwell & Gutteridge 2007). Essas moléculas reativas prejudicam as enzimas, as membranas, causam a peroxidação de lipídeos, bem como o comprometimento genético e, com isso, são capazes de danificar praticamente todo o conteúdo celular (Silva & Ferraz 2015). A taxa de deterioração está intimamente ligada ao metabolismo, porém como contornar e/ou diminuir essa taxa tem sido o grande desafio dos fisiologistas de sementes, principalmente em sementes com alto índice de atividade metabólica, como as recalcitrantes.

1.1. Conservação *ex situ* de sementes sensíveis a dessecação

Em 1921, Vavilov estabeleceu o primeiro banco de sementes *ex situ*, localizado no Instituto da Indústria Vegetal, São Petersburgo, Rússia (Mitrofanova 2012, Riaz *et al.* 2016). Desde então, a conservação de sementes passou a ser de suma importância para a segurança alimentar, garantindo que muitas espécies tivessem suas sementes armazenadas, o que explica o aumento de bancos de

germoplasma, que já somam 1.750 no mundo (FAO, 2010).

Situado na Noruega, o Svalbard Seed Bank é considerado, hoje, o maior esforço para armazenar sementes e o mais importante. Contando com 6.120 espécies, (SGSV 2023). Outro importante banco de sementes é o Millenium Seed Bank Partnership (MSBP), fundado em 1995 e coordenado pelo Kew Garden, no Reino Unido. É responsável por atividades voltadas à conservação de sementes, unindo diversos países no compromisso de preservar a biodiversidade frente às mudanças climáticas e escassez de recursos (Liu *et al.* 2018, Breman *et al.* 2021).

Existe uma grande quantidade de espécies sobre as quais já se dispõe de conhecimento prévio acerca de suas sementes, como é o caso das espécies agrícolas. Contudo, há outras que necessitam de melhor conhecimento acerca de suas características, incluindo muitas espécies florestais com sementes sensíveis à dessecação (Barbedo *et al.* 2018). Estima-se que cerca de 8% de toda a flora é composta por espécies que possuem sementes sensíveis à dessecação, número que pode aumentar se considerarmos apenas as regiões tropicais e subtropicais, podendo chegar a 18,5% (Wyse & Dickie 2017).

A inclusão de sementes sensíveis à dessecação em bancos de germoplasma é um dos principais desafios na conservação de sementes, devido à incapacidade dessas sementes em manterem-se viáveis ao serem desidratadas e condicionadas em ambientes com temperatura congelante (Bonner 1990, Wyse *et al.* 2018). Apesar de desenvolvermos inúmeras técnicas de armazenamento na tentativa de adicioná-las aos bancos, todos os esforços são ainda insuficientes, e isso acontece em função do comportamento dessas sementes quanto ao armazenamento, pois podem variar de acordo com cada espécie, não existindo um método único capaz de contemplar todas elas (Breman *et al.* 2021, Daws *et al.* 2004, Lamarca *et al.* 2016).

A conservação *ex situ* das espécies com sementes recalcitrantes poderia salvaguardá-las do risco de extinção (Barbedo 2018). Além disso, pode gerar impacto imediato e direto na produção de mudas, já que o plantio dessas sementes se restringe a determinado período, não sendo possível produzir durante todo o ano, o que ocasiona em perdas econômicas frente a impossibilidade de

garantir a disponibilidade de tais sementes por longos períodos, dificultando sua utilização em programas de recuperação de áreas degradadas (Fonseca & Freire 2003). Além disso, há espécies com sementes recalcitrantes que tem elevado valor comercial, como por exemplo, o cacau (*Theobroma cacao* L.) responsável pela produção de chocolate e a seringueira (*Hevea brasiliensis* L.) responsável pela produção de borracha, entre outras. Há muitas espécies com sementes recalcitrantes que ainda nem foram exploradas de forma adequada e seus potenciais ecológicos e econômicos ainda são desconhecidos. Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias de armazenamento mais eficiente e eficaz para as sementes recalcitrantes.

1.2 Técnicas de armazenamento de sementes recalcitrantes

Existem diferentes maneiras para armazenar sementes e são utilizados para isso, diferentes recipientes e embalagens herméticas. Também são utilizadas diferentes condições ambientais com umidade e temperatura controladas (Davide *et al.* 2003, Bonner 2008, Ohse 2022). Em sementes recalcitrantes, é importante que durante o período de armazenamento a viabilidade não seja prejudicada com a queda no teor de água. Portanto, é recomendado o uso de saco plástico de polietileno, pois tal embalagem conserva a umidade e permite as trocas gasosas, o que não acontece em embalagens herméticas (Bonner 1978, King & Roberts 1979), como verificado para embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. (Bilia *et al.* 1999).

Goldbach (1979) visando armazenar sementes a 15 °C em solução de ácido abscísico (ABA), conseguiu conter a germinação, mantendo a viabilidade de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. por 6 meses. Resultados semelhantes também foram observados para sementes recalcitrantes de *Melicoccus bijuga* Jacq pelo mesmo autor. Em embriões de *Inga uruguensis* Hook. et Arn, Barbedo & Cicero (2000) conseguiram prolongar o período de armazenamento utilizando ABA para inibir a germinação. A inserção de inibidores pode, portanto, servir de potencializador de armazenamento de sementes sensíveis à dessecação, estabelecendo-se como uma técnica própria ou até mesmo complementar a outras técnicas.

A criopreservação de tecidos como eixo embrionário é outra técnica que vem angariando

estudos nos últimos anos (Engelmann 2004). Porém, a limitação tecnológica é o principal empecilho encontrado, pois o congelamento do tecido é condição imprescindível para a utilização dessa técnica. Contudo, devido à quantidade de água elevada presente nas células, ocorre a formação de cristais de gelo caso o congelamento seja feito de forma lenta e, se rápido, podem danificar a estrutura celular (Santos 2000, Engelmann 2011, Berjak & Pammenter 2013). A criopreservação tem sido estudada em espécies recalcitrantes e pode ser promissora a depender das futuras pesquisas (Engelmann 1997, Engelmann 2000, Wesley-Smith *et al.* 2014, Ballesteros *et al.* 2021).

O condicionamento osmótico como técnica de controle da mobilização de água em sementes também é bastante utilizado por fisiologistas vegetais, proporcionando bons resultados. Essa técnica pode ser uma alternativa eficaz para o armazenamento de sementes recalcitrantes, uma vez que o metabolismo pode diminuir e o tempo de viabilidade aumenta (King & Roberts 1982, Andréo *et al.* 2006, Camara 2011, Inocente & Barbedo 2019, Pereira *et al.* 2020b, Inocente & Barbedo 2021, Cécel & Barbedo 2023). É importante ressaltar que essa técnica leva em consideração as características das sementes da espécie a ser estudada, conseqüentemente, é necessário avaliar a solução osmótica, a temperatura e o período de condicionamento (Nascimento 2005). Posto isso, o próximo desafio é a adaptação e aprimoramento desta técnica.

O polietileno glicol 6000 (PEG 6000), um polímero inerte e biocompatível, tem sido muito utilizado para promover o condicionamento osmótico em sementes, sobretudo com o intuito de armazenar sementes recalcitrantes, com ótimos resultados em sementes de *I. vera* (Andréo *et al.* 2006, Camara 2011, Pereira *et al.* 2020), *Eugenia uniflora* L., *E. involucrata* DC., *E. pyriformis* Cambess. e *E. brasiliensis* (Inocente & Barbedo 2019, 2021, Cecél & Barbedo 2023). Outras pesquisas destacam o uso do PEG combinado com fungicidas (Oliveira *et al.* 2011, Françoso & Barbedo 2014) com inibidores como a giberelina (Botelho & Perez 2001, Lopes & Souza 2008) e o ABA (Pelissari 2022). Isso mostra o quanto esse polímero é versátil e o seu potencial de aplicação é muito amplo. Além disso, o PEG já é muito utilizado com os propósitos de acelerar a germinação (“Priming”) em sementes agrícolas (Heydreck *et al.* 1973).

O primeiro registro em literatura utilizando o PEG 6000 para controlar hídrico em semente recalcitrante foi feito por King & Roberts (1982). Os autores conseguiram inibir a germinação de cacau (*Theobroma cacao*) durante o armazenamento, o que abriu uma lacuna para utilização do PEG na promoção de condicionamento osmótico. Isso só é facilitado devido ao controle que esse polímero exerce durante a embebição, pois a solução pode ter seu potencial hídrico aferido previamente (Bradford 1986, Villela *et al.* 1991, Marcos-Filho 2015).

É necessário dizer que as sementes devem ser armazenadas com o máximo vigor e com suas capacidades fisiológicas não comprometidas. Sementes com baixa qualidade, danificadas durante a coleta, além de condições inadequadas de armazenamento são os principais problemas encontradas na tecnologia de armazenamento (Carvalho & Nakagawa 2012, Marcos-Filho 2015, Silva & Ferraz 2015). Sementes recalcitrantes enfrentam um outro dilema, pois ao mesmo tempo necessitam de elevadas taxas de umidade para manter a qualidade fisiológica, e esta mesma umidade mantém o metabolismo dessas sementes ativas, comprometendo a sua viabilidade ao serem armazenadas.

1.3. Relações hídricas nas sementes

Segundo Barbedo (2018), a água é insubstituível e indispensável para qualquer tipo vida que se baseie no carbono, sendo fundamental nas atividades metabólicas. O mesmo autor ressalta que em seres vivos, a dependência da água é o padrão esperado na natureza. Por ser um solvente biocompatível ideal, a água está presente em todos os organismos vivos existentes, diferindo em quantidade e atividade. Em sementes, pode estar associada a diversos processo fisiológicos, participando de todas as etapas de desenvolvimento e constitui um papel fundamental na germinação (Bewley & Black 1978, Barbedo *et al.* 2018).

A água atua no processo de embebição, onde há diferentes períodos, sendo estes denominado por Bewley & Black (1978) como padrão trifásico da embebição. Desta forma, as sementes apresentam a fase I, na qual se observa uma acentuada locomoção de água na semente, iniciando as principais atividade metabólicas; a fase II, com a diminuição na hidratação e assimilação, mobilização e consumo das reservas; e a fase III, retomando a aceleração na hidratação, no qual a semente

apresenta síntese e diferenciação dos tecidos, iniciando o processo de germinação (Bewley *et al.* 2013).

Esse padrão trifásico de embebição é bem característico nas sementes ortodoxas, mas nem sempre é verificado nas recalcitrantes. Sabe-se que, quando as sementes embebem e o potencial hídrico é maior que -2,0 MPa o processo de germinação ocorre, porém, quando os valores são próximos ou menores que -2,0 MPa, as sementes não chegam à fase III. Em sementes recalcitrantes, além do metabolismo alto, a presença elevada de água é uma das características durante a dispersão, o que naturalmente já as deixam prontas para germinarem (Bradford 1986, Berjak & Pammenter 2000).

Segundo Toledo & Marcos-Filho (1977), o equilíbrio higroscópico, ou seja, quando a umidade relativa do ar (UR) e a umidade da semente se equivalem, a longevidade das sementes pode ser estendida. Se conseguirmos limitar e controlar a água presente em sementes recalcitrantes, como as de espécies de *Eugenia* L. poderíamos conservar melhor essas sementes durante o armazenamento e, para tanto, devemos considerar um potencial hídrico próximo aos das sementes quando dispersas e, dessarte, garantir que a água presente nas sementes entre em equilíbrio, estendendo a sua viabilidade.

1.4. Sensibilidade à dessecação

A falta desse mecanismo de tolerância a dessecação em sementes recalcitrantes fez com que tais espécies desenvolvessem estratégias ecológicas, como a formação de bancos de plântulas, dispersão sazonal (Pammenter & Berjak, 2000) viviparidade (Farnsworth 2000) entre outras, que apesar de não serem exclusividades nesse tipo de sementes, a existência de tais estratégias contribuem para a permanência dessas espécies frente as intempéries ambientais.

O mecanismo envolvido na aquisição de tolerância à dessecação é mais bem compreendido em escala molecular, o acúmulo de açúcares solúveis e proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) nas células fazem parte desse mecanismo e atuam juntos na manutenção estrutural das membranas. Dentre os açúcares acumulados destacam-se sacarose e rafinose, e a relação de ambos

parece estar associada à formação do estado vítreo (vitificação) nas sementes em temperaturas acima de 0 °C. Isso torna possível a dessecação sem que ocorra cristalização e, conseqüentemente, a substituição da água por açúcares durante a dessecação (Williams & Leopold 1989, Koster 1991, Leopold *et al.* 1994, Leprince *et al.* 1993, Sun *et al.* 1994, Sun 1997).

Em sementes recalcitrantes não há a manutenção da viabilidade quando há a desidratação, pois a remoção da água dos tecidos ocasiona a desestabilidade estrutural das membranas, cristalização de solutos e desnaturação proteica. Além disso, a concentração de solutos pode gerar processos químicos prejudiciais, enquanto danos à integridade celular podem culminar na falha de reações químicas essenciais (Koster 1991, Karmas *et al.* 1992, Hoekstra *et al.* 2001). Em sementes, nos tecidos embrionários, os ácidos nucleicos (DNA e RNA) podem ser fragmentados tanto durante a desidratação (Faria *et al.* 2005, Kranner *et al.* 2006) e enquanto há reidratação (Kranner *et al.* 2010). Todos esses fatores impossibilitam a garantia da qualidade fisiológica das sementes recalcitrantes ao serem reidratadas (Barbedo & Marcos Filho 1998).

1.5. Respiração de sementes

As respostas fisiológicas das sementes podem ser compreendidas ao analisar suas taxas metabólicas, e a respiração celular mostra-se como uma excelente forma de inferir indiretamente sobre o metabolismo das sementes, pois através da análise metabólica, podemos descrever com mais precisão a situação em que uma semente se encontra antes e após o armazenamento. Apesar de escassa literatura, alguns estudos surgiram na tentativa de entender o metabolismo das sementes de algumas espécies florestais (Lamarca & Barbedo 2012, Lamarca & Barbedo 2015, Araujo & Barbedo 2015, Bragante *et al.* 2018, Bonjovani & Barbedo 2019, Parisi *et al.* 2019, Bonjovani & Barbedo 2020, Cécel & Barbedo 2021).

A respiração pode ser entendida como respiração aeróbica quando há presença de oxigênio (O₂). Nesse processo, a oxidação do substrato gera energia e a transforma em moléculas de ATPs, contudo, a ausência do O₂ pode resultar em respiração anaeróbica ou fermentação e, com isso, aumento do consumo de carboidratos e produção de substâncias tóxicas (Hopkins & Huner 2008,

Taiz *et al.* 2017). Necessariamente a respiração passa por 4 etapas: a glicólise, a rota oxidativa da pentose fosfato, o ciclo dos ácidos cítricos e a fosforilação oxidativa (Taiz *et al.* 2017). O balanço final, considerando o consumo de O₂ e liberação de dióxido de carbono (CO₂) possibilita a análise da respiração (Lamarca & Barbedo 2009). A divisão do valor de CO₂ liberado pelo de O₂ consumido resulta no quociente respiratório, ou QR (Kader & Saltveit 2002).

Cécel & Barbedo (2021), ao armazenar sementes de *E. brasiliensis* em atmosfera modificada com a injeção de CO₂, notaram considerável queda na respiração celular à medida que o nível de CO₂ aumentava, o que consequentemente resultou na desaceleração do metabolismo dessas sementes. Resultados semelhantes também foram notados por Bonjovani & Barbedo (2019) ao analisarem embriões de *I. vera* armazenadas com PEG, que mesmo em temperaturas altas tiveram queda na respiração.

Quanto à influência hídrica, Lamarca *et al.* (2020) estudaram as taxas respiratórias em sementes de *E. piryformis* Cambess e notaram que as taxas respiratórias aumentavam à medida que os teores de água eram maiores. Por possuírem umidade elevadas, quando mantidas em temperaturas altas, as sementes recalcitrantes normalmente apresentam altas taxas respiratória, retrato do seu metabolismo (Barbedo *et al.* 2013). Medidas que promovam a diminuição na respiração podem ser a chave para a conservação dessas sementes. Novas pesquisas com essa abordagem ajudarão a entender melhor o metabolismo das sementes, facilitando o seu controle, o que possivelmente tornará o seu armazenamento mais fácil.

1.6. Características das espécies estudadas

Possuindo atualmente *ca.* 6.079 espécies distribuídas em 134 gêneros, a família Myrtaceae Juss. está presente em todo o território terrestre, exceto na Antártida (Maurin *et al.* 2021). Ocorre predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (Souza & Lorenzi 2012, Maurin *et al.* 2021). No Brasil, o gênero *Eugenia* é o mais abundante nas mirtáceas e o maior dentro das angiospermas, atualmente possuindo 407 espécies catalogadas (BFG 2015, Mazine *et al.* 2023). As sementes de espécies de *Eugenia* já estudadas demonstraram sensibilidade à dessecação, ou seja, são recalcitrantes

(Delgado & Barbedo 2007). Além disso, essas sementes possuem algumas das mais peculiares características dentro do universo das sementes, como a capacidade de manter o poder germinativo a partir de sementes com reservas parcialmente removidas (Gurgel & Sobrinho 1951, Anjos & Ferraz 1999, Silva *et al.* 2003). Estudos com fracionamento com sementes de *Eugenia* spp. realizados na última década demonstraram que até mesmo após a germinação ter sido iniciada, essa característica se mantém (Delgado *et al.* 2010, Amador & Barbedo 2011, Teixeira & Barbedo 2012, Alonso & Barbedo 2020). Esse comportamento pode ser uma estratégia evolutiva que previne a perda da viabilidade por danos físicos como a predação por insetos e outros animais (Delgado *et al.* 2010, Alonso & Barbedo 2020).

Sementes de *E. uniflora* e *E. involucrata* são dispersas com alto teor de água, ocorrem em clima tropical e são sensíveis à dessecação e a temperaturas congelantes (Delgado & Barbedo, 2007, Mazine *et al.* 2023). Suas sementes possuem baixa longevidade, com perda da viabilidade entre 20 e 30 dias após a coleta (Longhi 1995, Lorenzi & Matos 2002).

E. uniflora, popularmente conhecida como pitanga, é nativa da Mata Atlântica, Cerrado e Pampa, não endêmica do Brasil, detém enorme importância, com frutos bem vistosos e chamativos, com coloração que vai desde o alaranjado ao vermelho escuro, formato globoso e tamanho variado (entre 1,5 e 3 cm). Suas árvores são de fácil adaptação, muito resistentes e podem atingir até 15 metros de altura, é bastante utilizada como ornamental (Silva 2016, Mazine *et al.* 2023). Seus frutos estão presentes em pomares e são bastante utilizados na produção de sucos, doces, geleia, vinhos, licores, xaropes e entre outros derivados, sendo ainda, bastante inserida em programas de arborização urbana (Villachica *et al.* 1996, Pepato *et al.* 2001, Bezerra *et al.* 2018). Com isso a espécie passou a chamar atenção de muitos pesquisadores nos últimos anos. Em revisão de literatura feita por Moura *et al.* (2018) foi possível encontrar estudos que comprovam a atividade antimicrobiana a partir dos extratos das folhas de *E. uniflora*, assim como outros potenciais bioativos, como atividades antioxidantes e inseticidas.

E. involucrata, conhecida popularmente como cereja da mata, também é nativa da Mata

Atlântica, Cerrado e Pampa, não endêmica do Brasil, mas ao contrário da espécie anterior, é menos popular. Seus frutos são chamativos, com formato elipsoide ou piriformes, tamanho entre 2 e 4 cm e coloração entre o vermelho a violáceo (cor de vinho) e suas árvores podem atingir a altura de 15 metros (Donadio 1983, Donadio *et al.* 2002, Donadio & Moro 2004, Lamarca *et al.* 2013, Mazine *et al.* 2023). Queiroz *et al.* (2015) chamam atenção para a ausência de estudos que visem explorar os potenciais farmacológicos dessa espécie e, em estudos recentes, abriu-se margem para tratamento antitumoral e antifúngico a partir do extrato de suas folhas (Sato *et al.* 2018, Munari *et al.* 2021). Além disso, não há a devida comercialização em pomares de seus frutos, e muito menos a produção em escala de derivados, haja visto que são frutos comestíveis e saborosos.

1.7. Armazenamento de sementes *Eugenia* spp.

Representado por mais de 1.000 espécies nas américas, as espécies de *Eugenia* são bem estudadas quanto ao armazenamento de suas sementes, como a utilização de sacos plásticos de polietileno pra armazenar sementes de *E. dyzenterica* DC., *E. involucrata* e *E. brasiliensis* e a inclusão em ambientes controlados para armazenar sementes de *E. uniflora*, *E. pyriformis* e *E. brasiliensis* (Neto *et al.* 1991, Barbedo & Marcos-Filho 1998, Andrade & Ferreira 2000, Maluf *et al.* 2003, Kohama *et al.* 2006, Cécel & Barbedo 2021).

A secagem leve vem mostrando resultados curiosos para algumas espécies de *Eugenia*, como demonstraram Cécel & Barbedo (2021) em sementes de *E. uniflora*, no qual apresentaram resultados melhores no armazenamento quando houve secagem em estufa com valores próximos a 45% de teor de água, e o contrário foi observado para *E. involucrata*, onde a secagem prejudicou, corroborando com Maluf *et al.* (2003). Já em temperaturas congelantes, as sementes de *E. pyriformes* perderam a viabilidade (Scalon *et al.* 2012).

Utilizando o PEG na tentativa de promover o estresse hídrico, Inocente & Barbedo (2019) perceberam que as sementes de *Eugenia* spp. submetidas a solução com valores menor de potencial hídrico (entre -2,0 e -5,0 MPa) tiveram taxa de germinação suprimida durante um curto período de armazenamento. Porém quando essas sementes foram reidratadas e colocadas em condições ideais,

retomaram o processo de germinação. Já em sementes de *E. involucrata*, a viabilidade das sementes foi mantida em condições de déficit hídrico em até -5,0 MPa (Inocente & Barbedo 2021).

Mais recentemente, Cécel & Barbedo (2023), na tentativa de armazenar sementes de *E. brasiliensis* incubadas em solução de PEG entre -1,0 e -2,0 MPa, em que os valores de teor de água de atingiram 52%, conseguiram preservá-las durante 540 dias. Isso é um indicativo de que existe um determinado nível de hidratação que mantém o metabolismo pouco ativo, retardando o processo de germinação, e tal nível não pode ser muito abaixo (secagem extrema) e nem muito acima (hidratação extrema), variando conforme a espécie estudada.

A presença de alguns gêneros fúngicos em sementes de espécies de *Eugenia* foi descrito em literatura, sendo presentes *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Ceratocystos* sp., *Phomopsis* sp., *Phoma* sp., *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *Mucor* sp. e *Nigrospora* sp. (Avila *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2011, Françoso & Barbedo 2014, 2016, Comin *et al.* 2014, Silva 2015). É importante investigar quais fungos acometem as sementes armazenadas, e quais suas características, pois de certa forma, eles atuam no processo de deterioração das sementes, produzindo micotoxinas e enzimas hidrofílicas (Silva & Ferraz 2015). Ainda há a necessidade de esclarecer qual o impacto que esses fungos podem causar em sementes armazenadas. Portanto, deve-se conter a proliferação de fungos através de tratamento químico, físico e biológico. No que diz respeito ao tratamento físico, há novas tendências no controle fúngico, como a utilização de tratamento térmicos (termoterapia) e tratamento osmótico (osmoterapia), obtendo bons resultados no controle de alguns (Oliveira *et al.* 2011, Françoso & Barbedo 2014). Vale ressaltar que ainda não se sabe ao certo como os tratamentos osmóticos e térmicos interagem com a incidência fúngica durante o armazenamento, podendo os fungos estarem apenas correlacionados.

Outro ponto é que alguns desses gêneros registrados em sementes de *Eugenia* spp. são classificados fungos de armazenamento, como é o caso dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.. Os fungos de armazenamento têm sido, em grande medida, se somados a outros fatores ambientais, grandes responsáveis por acelerar a deterioração de sementes durante o armazenamento. Além disso,

há aqueles que estão presentes em sementes desde a coleta, podendo a infecção estar associada as sementes desde a sua formação, sendo assim, denominados como fungos de campo, caso dos gêneros *Fusarium* e *Cladosporium* (Christensen 1974, Carvalho & Nakagawa 2012).

2. OBJETIVOS

- Avaliar a viabilidade durante o armazenamento as sementes recalcitrantes de *Eugenia uniflora* e *Eugenia involucrata*, condicionadas por intermédio de hidratação controlada em diferentes concentrações de polietileno glicol 6000 (PEG 6000) a 10 e 25 ° C, visando diminuir o seu metabolismo e estender o tempo de viabilidade.
- Avaliar as taxas respiratórias com o intuito de verificar o estado metabólico das sementes em condições de armazenamento.
- Avaliar a incidência fúngica na tentativa de entender quais impactos que esses agentes bióticos podem causar na viabilidade das sementes armazenadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material biológico

As coletas de frutos foram realizadas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo (23°38'30,7" S, 46°37'14,2"O) entre os dias 26 de outubro a 13 de novembro de 2021 para *Eugenia uniflora* em 10 matrizes e 20 de outubro de 2022 para *E. involucrata* em apenas uma matriz. Os frutos foram coletados no ponto máximo de maturação, imediatamente após serem dispersos (Figura 1B), utilizando-se lona do tipo Sombrite® que foi estendida abaixo das matrizes (Figura 1A). Após as coletas, os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), onde se procedeu triagem de modo que os frutos imaturos e abertos foram removidos. Em seguida, os frutos tiveram suas sementes extraídas manualmente sob água corrente, utilizando-se bandejas e peneiras. Após a lavagem, o excesso de umidade foi retirado utilizando papel filtro. As sementes assim obtidas foram, então, selecionadas visando a remoção das sementes com sinais de deterioração, das que tinham tamanho muito abaixo da maioria e das danificadas por injúrias mecânicas. Por fim, as sementes foram guardadas em sacos plásticos transparentes de polietileno (Figura 1C) a 8 °C, em câmara BOD (Biochemical Oxygen Demand), até o momento do uso.



Figura 1. Detalhes da obtenção das sementes. A: matriz de *E. uniflora* com lona do tipo sombrite; B: frutos maduros; C: sementes extraídas.

3.2. Avaliação do armazenamento e das taxas de respiração

Preparo das soluções osmóticas - Diferentes quantidades de cristais sólidos de polietileno glicol 6000 (PEG) foram dissolvidos em água destilada para compor as soluções. No processo de

preparo, utilizou-se o Agitador Magnético para homogeneizar a solução. Para o cálculo das quantidades de PEG utilizou-se a tabela proposta por Villela *et al.* (1991) seguindo (Michel & Kaufmann 1972), sendo utilizadas 202,130, 295,713, 367,667 e 428,375 g por litro de água, obtidos através de balanças semi-analíticas, respectivamente para as soluções de -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa. Todas as soluções foram preparadas levando em conta a temperatura de 25 °C.

Armazenamento das sementes - sementes de *E. uniflora* foram distribuídas equidistantemente sobre 2 folhas de papel Germitest® (28 x 19 cm, esterilizadas), cobertas por uma terceira folha, todas previamente umedecidas com 30 mL de água destilada (0,0 MPa) ou com as soluções de PEG previamente descritas. Em seguida, as folhas foram enroladas e acondicionadas em sacos de polietileno, que tiveram sua abertura fechada com amarrilhos e foram perfurados com agulha hipodérmica (10 furos) para permitir trocas gasosas. Após isso, foram dispostas em 2 câmaras BOD, uma a 10 °C e outra a 25 °C, em escuro contínuo. Aos tratamentos de embebição foi adicionado um tratamento controle, composto por sementes acondicionadas em sacos plásticos (perfurados) sem água ou soluções de PEG, por ser esta a forma usual de se armazenarem sementes dessa espécie. Todos os tratamentos foram armazenados por 12 meses e as sementes foram avaliadas quanto a germinação, sanidade e teor de água nos períodos de 3, 6 e 12 meses de armazenamento. Também foram avaliadas quanto ao seu potencial hídrico aos 6 meses de armazenamento.

Sementes de *E. involucrata* foram distribuídas equidistantemente sobre duas folhas de papel Germitest® e cobertas por uma terceira (28 x 38 cm, esterilizadas), todas previamente umedecidas com 60 mL de água ou das soluções de PEG previamente descritas. Em seguida, as folhas foram enroladas e acondicionadas em sacos de polietileno, que tiveram sua abertura fechada com amarrilhos e foram perfurados com agulha hipodérmica (10 furos) para permitir trocas gasosas. Após isso, foram dispostas em câmara BOD a 25 °C, em escuro contínuo. Aos tratamentos de embebição foi adicionado um tratamento controle, como descrito para *E. uniflora*. Após isso, foram armazenadas por 4 meses e avaliadas quanto a germinação, sanidade e teor de água. O potencial hídrico também foi avaliado após 4 meses de armazenamento.

Avaliação das taxas respiratórias das sementes - amostras das sementes de *E. uniflora* foram pesadas e distribuídas em 3 repetições de 20 sementes, colocadas sobre papel Germitest® umedecido com 30 mL de PEG nos potenciais hídricos de -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa, e água destilada (0,0 MPa) como descrito anteriormente, acrescidos do controle (sementes sem umedecimento). Todas foram inseridas em frascos de vidros transparentes e herméticos de 600 mL (respirômetros), com tampas vedadas por insulfilm, e incubadas em câmaras BOD a 10 e 25 °C, em escuro contínuo. O início do tempo do experimento foi considerado quando os frascos foram fechados (Lamarca & Barbedo 2012, Bonjovani & Barbedo 2019). A taxa de respiração das sementes foi analisada após 12, 24 e 48h de incubação, calculada de acordo com o consumo de O₂ e com a liberação de CO₂. Para tanto, amostras de ar dos respirômetros foram tomadas através de furos presentes na tampa, vedados por septo de borracha (Figura 2B, C), com o auxílio de uma agulha hipodérmica (Figura 2D) possibilitando o acesso aos gases contidos no interior dos frascos. Os gases coletados foram medidos com o Analisador de Gases 6600 (Illinois, USA).

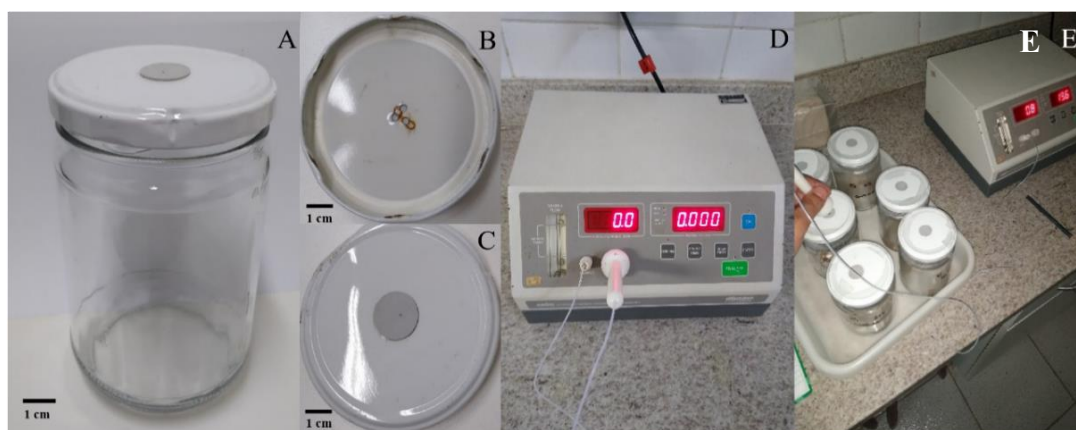


Figura 2. Frasco hermético (600 ml) (A), tampa do frasco perfurada (B) tampa do frasco com o septo de silicone (C) Analisador de Gases 6600 (D) coleta de amostra do ar no interior dos frascos através de uma agulha hipodérmica (E).

Os valores obtidos para consumo de O₂ e liberação de CO₂ foram convertidos para pressão parcial do gás.

$$\frac{P_1}{P_2} \times \frac{V_1}{V_2}, \text{ onde:}$$

P 1= pressão parcial do gás, em atm;

p_2 = pressão atmosférica (0,9 atm, em São Paulo);

V_1 = volume do O_2 consumido ou do CO_2 liberado, em porcentagem;

v_2 = volume total do gás (100 %).

Após a obtenção dos valores de pressão parcial dos gases (P_1) foi calculada a quantidade de mols consumidos (O_2) ou liberada (CO_2) do gás, pelas sementes dos frascos, pela equação de Clapayron $PV = nRT$, onde:

P = pressão parcial do gás (atm);

V = volume do frasco onde as sementes foram incubadas (0,6 L);

n = número de mols do gás;

R = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm . L . K^{-1} . mol^{-1});

T = temperatura (K).

O valor de número de mols, assim obtido, foi convertido para μ mols e dividido pela massa seca respirante (em gramas) e pelo tempo de incubação (em horas), obtendo-se os valores em $\mu mol \cdot gMS^{-1} \cdot h^{-1}$.

Após a obtenção dos valores referentes as taxas respiratórias, calculou-se o Quociente de Respiração (QR) pela divisão entre o CO_2 liberado e o O_2 consumido, ou seja, $Q = CO_2/O_2$. Calculou-se, ainda, a taxa oxidativa pela diferença entre o O_2 consumido e o CO_2 liberado, ou seja, $TO = O_2 - CO_2$ (Bragante *et al* 2018).

Ao final dos períodos de incubação, as sementes dos diferentes tratamentos foram retiradas dos frascos, lavadas para a remoção do PEG e colocadas para germinar.

3.3. Determinações físicas e fisiológicas

Teor de água e massa seca - determinados gravimetricamente pelo método de estufa com circulação fechada por 17 horas a 103 °C (ISTA, 2015). O teor de água foi expresso em base úmida, pela seguinte equação:

$$(\%U) = \frac{P_u - p_s}{P_u - p_t} \times 100,$$

Onde:

P_u = peso inicial, peso dos recipientes mais o peso das sementes frescas;

p_s = peso final, peso do recipiente mais o peso da semente seca;

p_t = tara, peso do recipiente vazio com a tampa.

Com as mesmas sementes utilizadas na determinação do teor de água, calculou-se também a massa seca, dividindo-se o peso úmido pelo total de sementes utilizadas. Os resultados foram expressos em $\text{mg} \cdot \text{semente}^{-1}$ (Brasil, 2009).

Potencial hídrico (Ψ_w) - foi medido por Potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Inc., Pullman, EUA). As amostras de sementes foram colocadas em cápsulas e inseridas no aparelho, condicionadas em câmara hermética, baseado na temperatura de condensação (ponto de orvalho) de água, cuja leitura do potencial hídrico foi feita quando a amostra e o ar dentro do aparelho atingiram equilíbrio (Delgado & Barbedo 2012).

Teste de germinação - A fim de determinar o potencial fisiológico, as sementes foram colocadas para germinar em papéis Germitest® umedecidos com água corrente, sendo então enroladas e colocadas em sacos plásticos de polietileno transparentes e perfurados (10 furos). Após isso, foram levadas para a sala climatizada (25 °C) com disponibilidade de luz contínua e semanalmente avaliadas de forma visual. Foram consideradas sementes germinadas, aquelas com a protrusão da radícula com 0,5 mm (Delgado & Barbedo 2007). Também foi avaliada a produção de plântulas normais, sendo consideradas aquelas com as raízes e parte aérea (eófilos desenvolvidos) sem defeitos.

Durante o armazenamento das sementes, algumas germinaram na própria embalagem. Para diferenciar a germinação que ocorreu durante o armazenamento, dentro das embalagens, da que ocorreu durante o teste de germinação, a contagem das sementes germinadas foi separada em duas categorias: as que germinaram durante o armazenamento, mas não retomaram a viabilidade durante o teste de germinação, foram denominadas GDA (Figura 3D), e as que germinaram após a instalação do teste de germinação foram denominadas GR. Nestas últimas incluíram-se as sementes que já haviam germinado durante o armazenamento e que, durante o teste de germinação, retomaram o desenvolvimento. As plântulas normais provenientes de *E. uniflora* armazenadas no período de um

ano e as de *E. incolucrata* no período de 4 meses foram avaliadas quanto ao tamanho das raízes e partes aéreas. As porcentagens de germinação e de plântulas normais foram calculadas com as fórmulas a seguir:

$$GDA = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de sementes germinadas (durante o armazenamento em câmara BOD)}}{\text{n}^\circ \text{ total de sementes}} \times 100$$

$$GR = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de sementes germinadas no teste de germinação}}{\text{n}^\circ \text{ total de sementes}} \times 100 *$$

$$PN = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de plântulas normais}}{\text{n}^\circ \text{ total de sementes}} \times 100$$

* incluindo-se as sementes que já haviam sido germinadas durante o armazenamento e que retomaram a germinação por brotamento (Figura 2D), somada às germinações de sementes que só ocorreram durante o teste de germinação (Figura 2A).

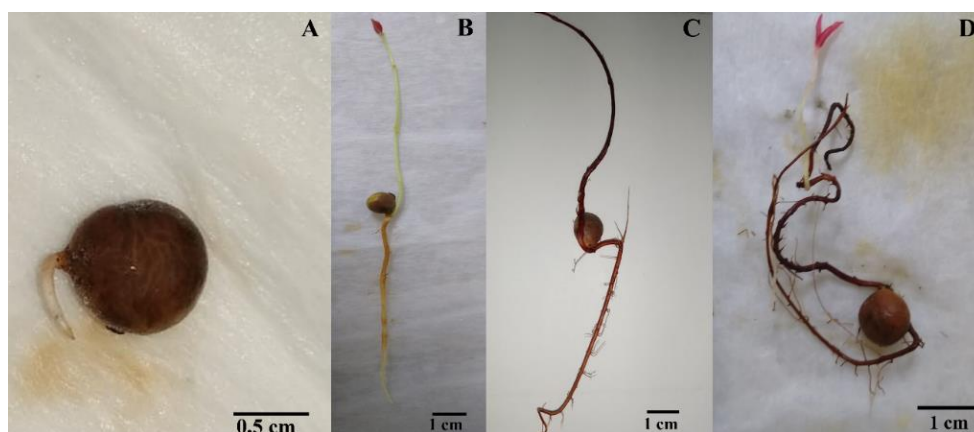


Figura 3. Semente de *E. uniflora* germinada (A), plântula normal com parte aérea e raízes desenvolvidas (B), plântula anormal formada durante o armazenamento (C), plântula anormal retomando o desenvolvimento da parte aérea (D).

Teste de sanidade - Inicialmente, todos os equipamentos foram previamente esterilizados com álcool etílico a 70% e durante a instalação do teste, fez-se o uso de lamparinas a álcool para auxiliar na esterilização dos equipamentos. Para as sementes recém-colhidas, utilizaram-se 4 repetições com 10 sementes distribuídas em duas placas de Pétri (5 sementes em cada), e em sementes armazenadas de *E. uniflora*, 4 repetições com 9 sementes, nos períodos de 3 e 6 meses e 3 repetições com 9 sementes para o período de 12 meses, distribuídas em 2 placas de Pétri, sendo placa A (5 sementes) e placa B (4 sementes). O mesmo foi realizado com sementes armazenadas de *E. involucrata* (3 repetições com 9 sementes) no período de 4 meses.

Utilizou-se o método de Papel Filtro (Blotter Test), placas de Pétri distribuídas de forma equidistante sobre 2 folhas de papel filtro e umedecidas com água destilada e seladas com plástico filme PVC para assegurar a umidade durante a incubação por 7 dias sob a temperatura 20°C com fotoperíodo de 12 horas (Brasil 2009). Após o período de incubação, as sementes foram analisadas visualmente por intermédio de uma lupa (estereoscópio) (Figura 4B), e as estruturas dos fungos visualizados foram destacadas, removidas das sementes com o auxílio de uma agulha hipodérmica e colocadas em lâmina, no qual muitas das vezes, a fim de facilitar a visualização das estruturas fúngicas, eram acrescidos o corante azul de metileno e levadas ao microscópio óptico para identificar e avaliar com mais precisão (Figura 4C). Através de guias de identificações, os fungos foram identificados apenas ao nível de gênero.

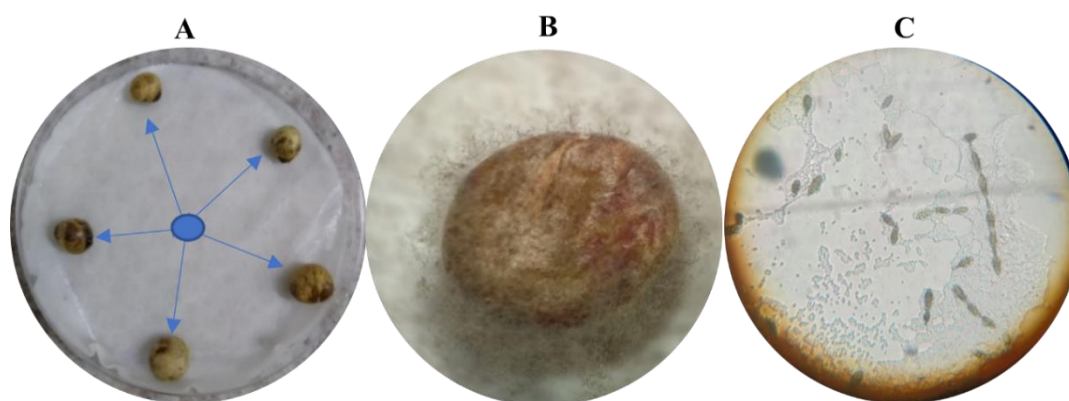


Figura 4. Sementes de *E. uniflora* distribuídas de forma equidistante em placa de Petri (A), vista de estereoscópio de uma semente de *E. uniflora* com incidência fúngica (B), vista de microscópio óptico de estruturas dos conídios de *Alternaria* sp. isolada e destacada (C).

3.4. Delineamento experimental e análise estatística

Para o armazenamento e a respiração, o delineamento foi inteiramente casualizado. No armazenamento foi 2 x 6 x 3 (temperatura x potencial osmótico x período de armazenamento) para *E. uniflora*, seguindo o mesmo esquema para *E. involucrata*, porém somente com uma temperatura, e na respiração 2 x 6 x 3 (temperatura x potencial osmótico x período de incubação). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey (5%). Quando necessário, os dados foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, a fim de possibilitar a normalidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Eugenia uniflora*

As sementes recém-coletadas apresentaram 95% de germinação, 92% de plântulas normais, 52,4% de água, 0,17 g. semente⁻¹ de massa seca e potencial hídrico de -2,56 MPa. Quanto à sanidade, foram registrados 4 gêneros fúngicos: *Cladosporium* sp. (100%), *Fusarium* sp. (55%), *Alternaria* sp. (35%) e *Penicillium* sp. (12%).

E. uniflora apresentou sementes germinadas durante o armazenamento (GDA) (Figuras 5 e 6) e houve diferenças na germinação conforme a mudança de temperatura e potencial osmótico. Quando submetidas a 10 °C, apenas as incubadas a 0,0 e -1,0 MPa tiveram suas sementes germinadas ainda em armazenamento durante todo o período, a -1,0, -1,5 e -2,0 MPa a germinação foi contida (exceto no sexto mês, no tratamento a -1,0 MPa, no qual 22% das sementes germinam). Já a 25 °C houve germinação nas incubadas a 0,0, -0,5, -1,0 e -1,5 MPa durante todo o período. A -2,0 MPa, apenas 8% das sementes germinaram aos 3 meses de armazenamento, e nos períodos de 6 e 12 meses não houve germinação. No controle, as sementes não germinaram durante o período de armazenamento em ambas as temperaturas.

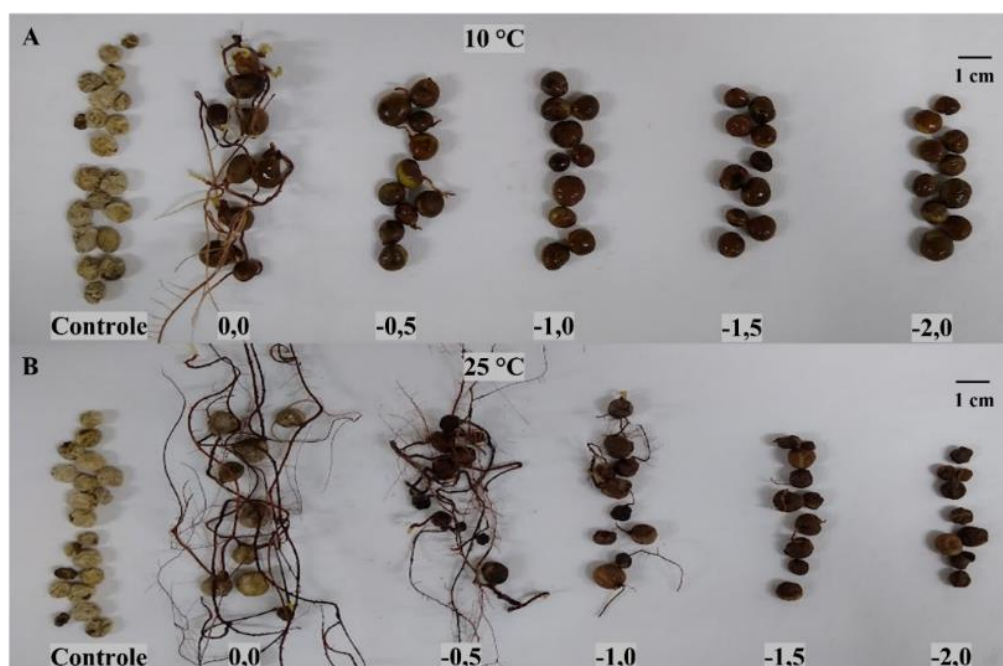


Figura 5. Sementes de *E. uniflora* recém retiradas das câmaras BOD após 12 meses de armazenamento a 10 °C (A) e 25° C (B), incubadas sem umedecer (controle) ou nos potenciais de 0,0 MPa, -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa.

Quanto a disponibilidade de água durante o armazenamento (Tabela 1), foi possível notar que as sementes com teor de água superior a 56% apresentaram germinação sob a temperatura de 10 °C, e acima de 58,5% sob 25 °C nos 3 primeiros meses, ambos os valores de teor de água são superiores ao das sementes recém-colhidas.

Tabela 1. Valores do teor de água e potencial hídrico (Ψ_w) das sementes de *E. uniflora* após a retirada das câmaras BOD, nos períodos de 3, 6 e 12 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0) e PEG nos potenciais de -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa, a 10 e 25 °C.

Temperatura	Tratamentos	Teor de água (%)			Ψ_w (MPa)
		3	6	12	6
10 °C	0	57	55	64	-1,2
	-0,5	56	53	58	-2,1
	-1	49	51	56	-3,4
	-1,5	56	55	52	-4,2
	-2	52	51	47	-4,6
	C	26	13	12	-70,5
25 °C	0	65	71	58	-1,1
	-0,5	60	65	51	-2,6
	-1	58	63	55	-5,1
	-1,5	63	56	31	-5,3
	-2	58	47	44	-5,9
	C	19	20	15	-44,9

Dentre os tratamentos que germinaram nas câmaras, é possível deduzir que a maior parte dessas sementes germinaram ainda no início de armazenamento (3 meses), uma vez que apenas os tratamentos com PEG a -0,5 MPa sob 10 °C e a -1,5 MPa sob 25 °C constaram um aumento significativo na quantidade de sementes germinadas nos períodos subsequentes. O teor de água no controle diminuiu com passar do tempo, o que explica a perda total da viabilidade.

Outra forma de explicar isso é através do potencial hídrico (Tabela 1), no qual pode-se observar que as sementes que não germinaram a 10 °C, o potencial hídrico decorrente foi abaixo de -3,4 MPa quando avaliadas no sexto mês, valor próximo aos das sementes recém-colhidas (-2,56 MPa). A 25 °C a inibição só ocorreu a -5,9 MPa. Contudo, nos controles cujo potencial hídrico avaliado constaram-se menores, as sementes perderam a viabilidade a partir dos 6 meses de armazenamento.

Viabilidade de sementes armazenadas

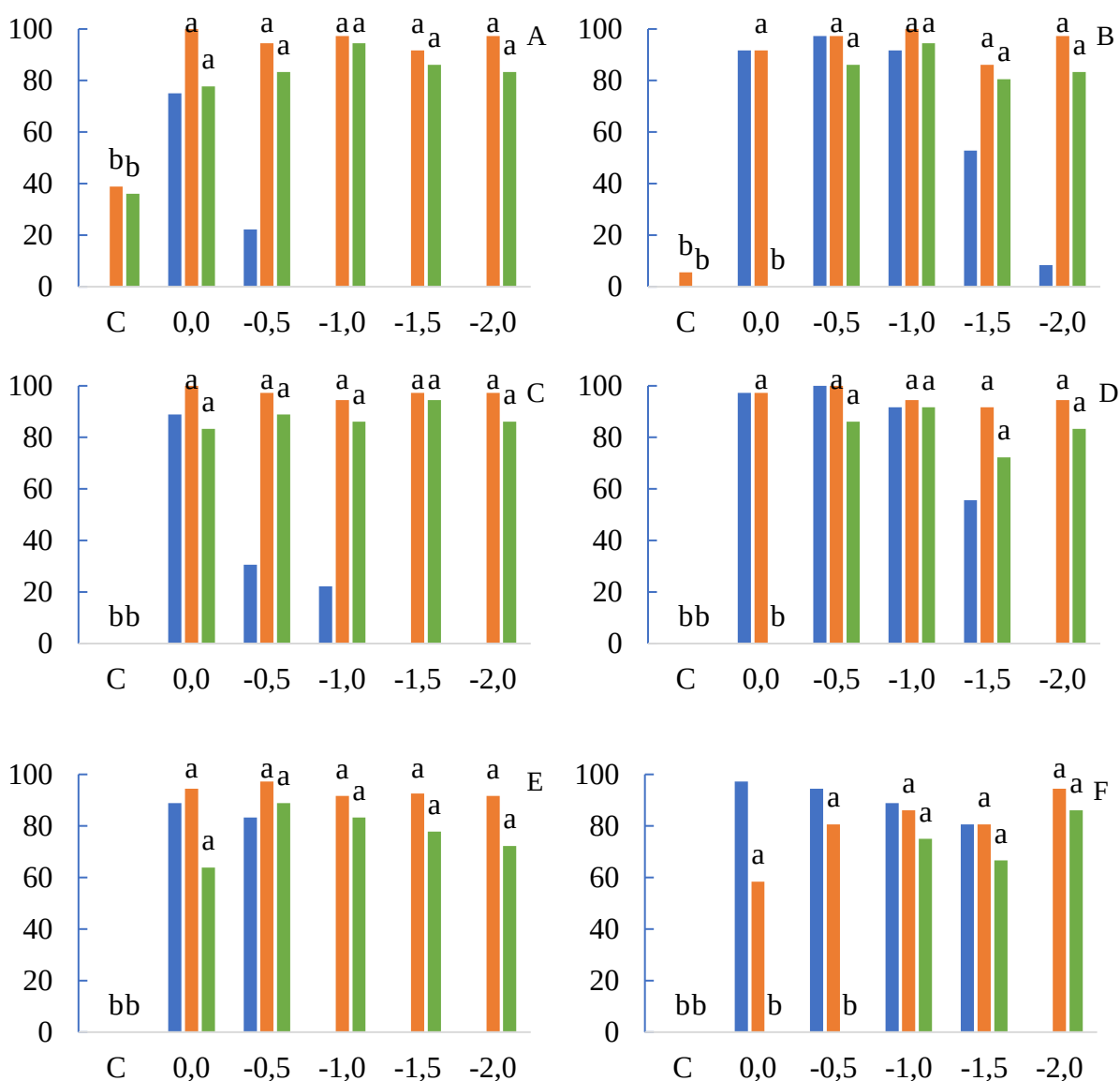


Figura 6. Porcentagem de Germinação durante o armazenamento (GDA – barras azuis), germinação no teste após retirada (GR – barras laranjas) e desenvolvimento de plântulas normais (PN – barras verdes) de sementes de *E. uniflora* armazenadas por 3, 6 e 12 meses a 10 °C (A, C e E) e por 3, 6 e 12 meses a 25 °C (B, D e F respectivamente) nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos potenciais osmóticos de -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

As sementes de *E. uniflora* são fotoblásticas neutras (Cremasco *et al.* 2017), o que explica a existência de germinação durante o armazenamento, e evidencia altos índices metabólicos dessas sementes (Roberts & King 1980, Pammenter *et al.* 1994). Apesar de muitos tratamentos germinarem no armazenamento, o nível dessa germinação não foi totalmente homogêneo (Figura 5), à medida que os tratamentos se aproximavam da água (0,0 MPa), o desenvolvimento de raízes e parte aérea eram

maiores, bem evidente nas sementes a 25 °C entre os tratamentos a 0,0 e -2,0 MPa.

A temperatura considerada ótima para a germinação de sementes na maioria das espécies florestais, sobretudo de Mata Atlântica, é a 25 °C (Brancalion *et al.* 2010, Ferraz & Calvi 2011, Figliola 2015). Isso também é realidade para as de *Eugenia* spp. (Larmarca *et al.* 2011, Gomes *et al.* 2016). Em sementes recalcitrantes, temperaturas abaixo de 15 °C reduzem o metabolismo das sementes e tal estratégia tem sido muito utilizada no armazenamento de sementes recalcitrantes nos últimos anos (Andréo *et al.* 2002, Bonjovani & Barbedo 2008). É importante salientar, contudo, que muitas sementes recalcitrantes não toleram temperaturas congelantes (Bonner 1990, Bewley *et al.* 2013). Em temperaturas baixas, a mobilidade das moléculas de água e os processos metabólicos são reduzidos (Goldfarb & Queiroga 2013). Provavelmente isso pode ser uma das possíveis explicações para a diminuição da germinação durante o armazenamento a 10 °C, como também observado por Inocente & Barbedo (2019) e Cécel & Barbedo (2021).

O conteúdo de água nas sementes de *E. uniflora* pode elucidar o seu comportamento em armazenamento, em tratamentos cuja água do tipo III (Marcos-Filho 2015) estava presente (i.e. -4,0 a -11,0 MPa e entre 20 e 33 % de teor em base úmida), e nos quais a germinação foi contida. A presença elevada de água e o acúmulo de reservas em sementes em estágio avançado de maturação resulta na germinação e a remoção da água das sementes faz com que haja o aumento dos solutos e por conseguinte a diminuição do metabolismo (Bewley *et al.* 2013, Marcos-Filho 2015). Com isso, a disponibilidade ou não da água nas sementes, de acordo com os tratamentos, explica a expressão metabólica durante o armazenamento.

Durante o período de 3 meses, a germinação de sementes de *E. uniflora* não apresentou diferenças entre os tratamentos de armazenamento em solução de PEG e água destiladas (0,0 MPa), o mesmo acontecendo para a porcentagem plântulas normais, exceto em 0,0 MPa (Figura 6A e B). Notou-se elevadas taxas de germinação, chegando a 100% no tratamento a 0,0 MPa e a -1,0 MPa, a 10 e 25 °C respectivamente. O controle a 10 °C, apesar de apresentar sementes germinadas (39%) e plântulas normais (36%), já demonstra queda significativa da viabilidade, ficando mais evidente a 25

°C, com 6% de germinação e nenhuma plântula normal, o que pode ser explicado pela queda abrupta no teor de água, como já havia sido demonstrado por Delgado & Barbedo (2007) para essa espécie.

Na avaliação do armazenamento aos 6 meses, notou-se que as sementes perderam totalmente a capacidade germinativa no tratamento controle (Figura 6C e D), o que já havia sido notado em sementes de *Eugenia* spp. nessas condições (Cécel & Barbedo 2021). Ademais, em praticamente todos os outros tratamentos notou-se alto índice de germinação e plântulas normais. Apenas o armazenamento a 0,0 MPa sob a temperatura de 25 °C não apresentou o desenvolvimento de plântulas normais. Apesar de 97% das sementes germinarem, deve-se salientar que todas já haviam germinado durante o armazenamento e rebrotaram no teste de germinação. Com isso há o consumo demasiado de reservas e que pode explicar a inviabilidade nesse tratamento (Floriano, 2004). É possível que o metabolismo estava muito alto enquanto as sementes estavam armazenadas, pois apesar de não ser o único tratamento que germinou antes da retirada da BOD, foi o que apresentou maior teor de água (Tabela 1) e potencial hídrico de -1,17 MPa, valor acima dos -2,57 MPa das sementes recém-colhidas.

Com 12 meses de armazenamento (Figura 6E e F) podemos observar melhor o efeito do armazenamento no tempo. Nesse período a temperatura de 10 °C ainda manteve altas taxas de viabilidade das sementes de *E. uniflora* nos tratamentos com PEG e a 0,0 MPa. Apesar do poder germinativo ser mantido nas sementes armazenadas em água, tais sementes apresentaram uma queda na produção de plântulas normais. Outro detalhe nos tratamentos com PEG, foi que à medida que a umidade nas sementes foi diminuiu (Tabela 1), coincidiu com a diminuição das soluções dos tratamentos, resultou em queda viabilidade, diminuindo a formação plântulas normais.

Já no armazenamento sem refrigeração (25 °C), com exceção do controle, todos os tratamentos apresentaram germinação, porém apenas os tratamentos com PEG mantiveram a viabilidade das sementes (exceto a -0,5 MPa). Os tratamentos cujo PEG promoveu o condicionamento, de certa forma diminuíram a deterioração. Essa deterioração pode estar relacionada com a alta atividade metabólica em sementes armazenadas, pois nas condições de temperaturas de 25 °C, se somado aos altos índices de umidade, são condições ideais para que as sementes de *E. uniflora*

possam germinar (Popinigis 1985, Berjak & Pammenter 2008).

As sementes armazenadas apresentaram taxas elevadas de viabilidade, mesmo após 12 meses de armazenamento, no qual os dados mostraram alto índice de sementes germinadas e plântulas normais, com valores próximos das sementes recém coletadas. O resultado mais curioso ficou por conta das sementes armazenadas a 25 °C, em que foi possível estender a viabilidade até o fim do armazenamento, haja vista que sementes de *Eugenia* spp. se tornam inviáveis mais rápido em temperaturas ambiente (Silva *et al.* 2019) e isso piora à medida que as temperaturas são elevadas. Portanto, todas as recomendações anteriores de armazenamento apontam para a diminuição da temperatura (Floriano 2004, Bonjovani & Barbedo 2008), desde que tal temperatura não seja congelante (Pammenter & Berjak 1999). O sucesso na mobilidade de água em manter a viabilidade dessas sementes em temperatura ambiente, isto é, sem refrigeração, torna essa condição imprescindível para a conservação *ex situ*.

Importante mencionar que o fato de as sementes germinarem ainda em condições de armazenamento não comprometeu totalmente a viabilidade àquelas armazenadas em tratamentos com PEG, pois a retomada da germinação por brotamento culminou em plântulas normais, como também notado por Cécel & Barbedo (2023) durante o armazenamento de sementes de *E. brasiliensis*. Entretanto, à medida que o armazenamento se prolongou, foi possível notar queda na viabilidade, algo que também ocorreu no presente estudo. E tal retomada em sementes condicionadas em PEG já havia sido demonstrado por Inocente & Barbedo (2021) em sementes de *E. involucrata*.

Apesar de algumas sementes apresentarem bons resultados à secagem ou estresse hídrico, há aquelas que sofrem perdas significativas em sua integridade fisiológica, quando submetidas à desidratação (Walters *et al.* 2013). Esse panorama estar presente nas sementes de *E. uniflora*, onde a secagem demasiada foi prejudicial. Porém, as sementes dessa espécie podem se manter viáveis com até 40% de umidade e perdem a capacidade fisiológica abaixo de 30% (Delgado & Barbedo 2012, Oliveira *et al.* 2011, Inocente & Barbedo 2019). Além disso, condicionamento de embriões de *I. vera*, também sensíveis a dessecação e pouco tolerantes a temperaturas baixas, mostrou redução do

metabolismo quando colocados sob condições de limitação hídrica com PEG (Andréo & *et al.* 2006, Bonjovani & Barbedo 2014, 2020, Pereira *et al.* 2020b).

De acordo com Marcos-Filho (2015) em muitos casos, quando a desidratação atinge a água do tipo 3 (20 a 33% de teor de água), há uma intensa atividade metabólica nas sementes, o que pode resultar na ineficácia dos mecanismos de reparo. Outro fator que preserva a viabilidade após a secagem é a forma em que a secagem é feita: se lenta, é maior a probabilidade dessa viabilidade ser mantida, como proposto por Farrant *et al.* (1986). A desidratação promovida pelo PEG só ocorre quando a potencial hídrico das sementes é menor que o da solução, com isso a semente perde água para o ambiente por osmose (Labouriau 1983). A retirada da água ocasiona o desregulamento do metabolismo com a perdas das funções de membranas em sementes sensíveis (Vertucci & Farrant 1995). Além disso, em sementes de *Quercus robur* L., a desidratação aumentou a produção de radicais e livres e diminuiu as atividades de enzimas protetoras no eixo embrionário (Hendry *et al.* 1992). Tal fato pode estar presentes em sementes de *E. uniflora*.

Tabela 2. Tamanho médio da parte aérea (PA) e da raiz (R) provenientes da germinação de *E. uniflora* após um ano de armazenamento, nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 ° C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

Tratamentos	Tamanho das plântulas (cm)			
	10 °C		25 °C	
	PA	R	PA	R
C	*	*	*	*
0,0	12,6 a	11,2 b	*	*
- 0,5	8,9 b	13,3 ab	*	*
- 1,0	8,4 b	13,8 a	11 a	13,2 a
- 1,5	8,7 b	13,1 ab	9,9 a	12,4 a
- 2,0	9,4 b	14 a	9,2 a	13,1 a

O tamanho das plântulas normais resultantes das sementes que germinaram após um ano de armazenamento não respondeu muito sobre o vigor dessas sementes, haja visto que os tamanhos de plântulas e raízes não seguiram um padrão (Tabela 2). Apesar das maiores raízes nos tratamentos com PEG, foi em sementes armazenadas em água que o resultado da parte aérea se sobressaiu.

A redução do metabolismo, talvez isso tenha ocorrido devido a limitação hídrica

provenientes desses tratamentos, cuja sementes não atingiriam valores muito superiores a 40% de água, ficando entre a água dos tipos 4 e 5 (Vilella & Marcos-Filho 1998) o que não acontece em sementes totalmente hidratadas, já que nessa condição não há limitação bioquímica (Bewley *et al.* 2013). Em condições de baixa umidade há a diminuição da fluidez da matriz celular, e com isso, as atividades enzimáticas também reduzem (Leopold & Vertucci 1989). Essa redução das atividades metabólicas de certa forma também diminuiu a deterioração nas sementes de *E. uniflora* e tornou possível manter essas sementes viáveis por mais tempo.

Atividades metabólicas em sementes de E. uniflora

A diferença de temperatura e potenciais osmóticos resultou em diferentes taxas respiratórias as 12 horas de incubação (Figura 7). Nos tratamentos em que as sementes foram incubadas em PEG, à medida que os potenciais ficavam menores, a liberação de CO₂ foi diminuindo, apesar das altas taxas de consumo de O₂. Menores valores de liberação de CO₂ foram registrados a 10 °C em PEG a -1,0 e -1,5 MPa e no controle, já o O₂ foi maior nos tratamentos a -1,0, -1,5 e -2,0 MPa. A maior liberação de CO₂ foi em sementes incubadas a 25 °C, no controle com 7,1 $\mu\text{mol CO}_2\text{.gMS}^{-1}\text{.h}^{-1}$. Nessa temperatura, o consumo de O₂ aumentou nos tratamentos com PEG de menores potenciais hídricos.

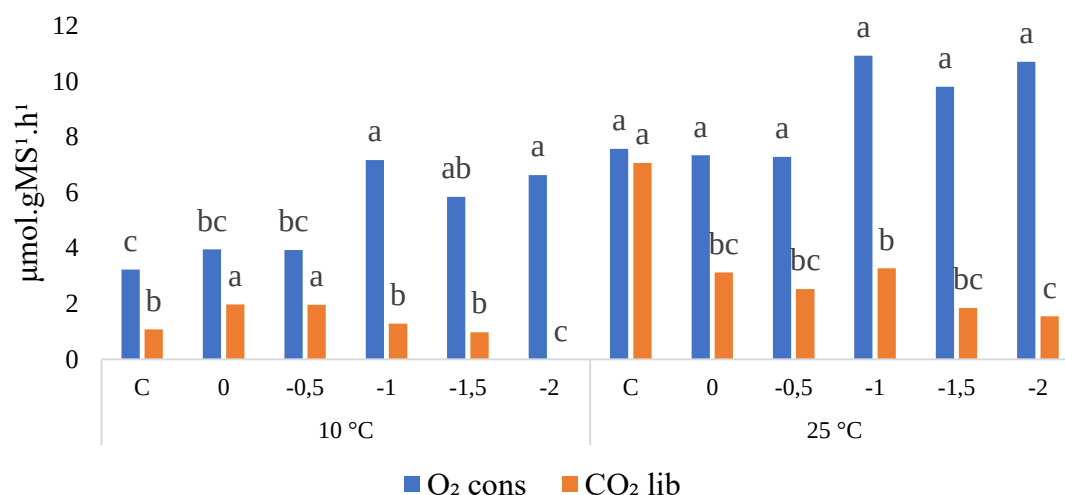


Figura 7. Consumo de O₂ e liberação de CO₂ em sementes incubadas de *E. uniflora* pelo período de 12 horas nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob as temperaturas de 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

Após 24 e 48 horas de incubação (Figuras 8 e 9), os dados de liberação CO_2 não demonstraram muita diferença, porém, quando comparado as temperaturas, foi possível observar as maiores taxas de consumo de O_2 e liberação de CO_2 a 25 °C. Em todos os períodos de incubação o controle mostrou menores taxas de consumo de O_2 se comparado com as sementes incubadas nos tratamentos com PEG e em água destilada (0,0 MPa), exceto no período de 12 horas sob 25 °C.

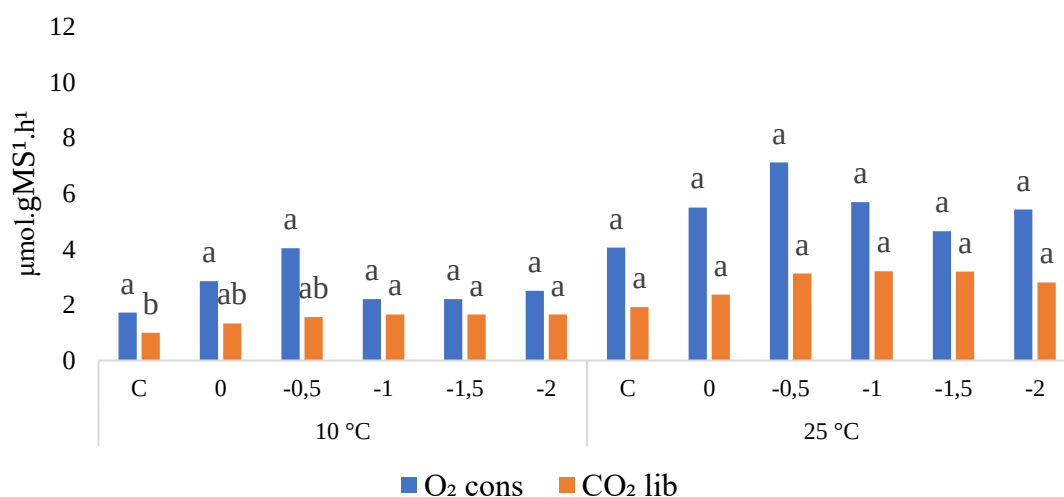


Figura 8. Consumo de O_2 e liberação de CO_2 em sementes incubadas de *E. uniflora* pelo período de 24 horas nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

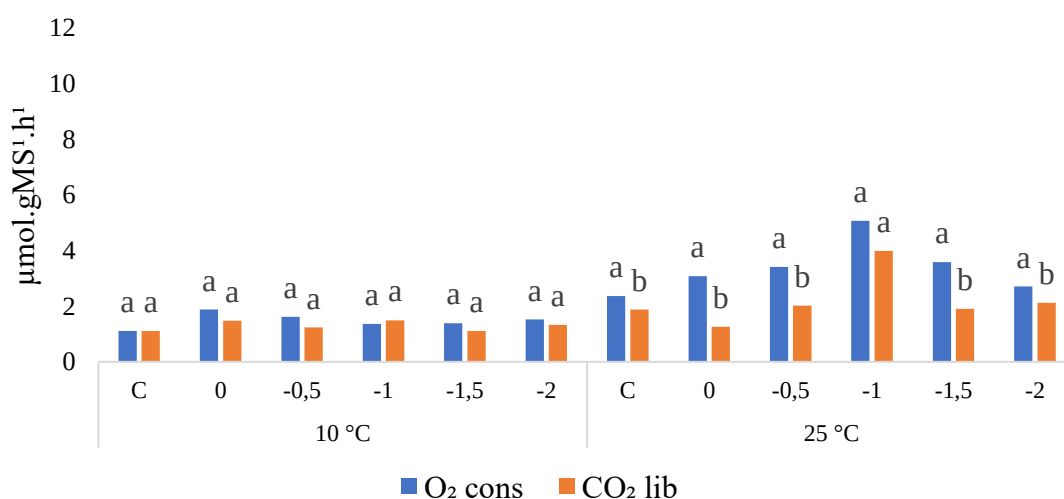


Figura 9. Consumo de O_2 e liberação de CO_2 em sementes incubadas de *E. uniflora* pelo período de 48 horas nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

As sementes de *E. uniflora* que foram incubadas nos frascos, independente da temperatura e do tratamento, mostraram altos índices de germinações ao encerramento do experimento de respiração, em média com 94% de germinação, valor bem próximo ao 95% que ocorreram em sementes recém-colhidas, apenas nas sementes incubadas a 25 °C no tratamento a -2,0 MPa, houve queda, cujo 82% das sementes tiveram a protrusão da radícula, porém não apresentaram diferenças estatística significativa.

As diferentes condições durante os períodos de incubação de *E. uniflora* nos fornecem uma pista de como essas sementes se comportam em condições de armazenamento. Os valores demasiados no controle as 12 horas a 25 °C, podem ser resultados de estresse com proporcional respiração celular devido a pouca disponibilidade hídrica em um ambiente com mais alta temperatura. Assim como Silva *et al.* (2019) registraram um acentuado aumento das taxas de respiração após a secagem em sementes de *E. dysenterica* DC.

De forma geral, as sementes tiveram menores taxas de respiração a 10° C, se comparado a temperatura de 25 °C como constatado em sementes de *E. pyriformes* e *E. brasiliensis* (Lamarca *et al.* 2020, Cécel & Bardedo 2021, 2023). Em sementes de *E. brasiliensis*, a temperatura a 25 °C, manteve o metabolismo mais ativo em detrimento de sementes incubadas a 8 °C. Já em *E. pyriformes*, as taxas de respiração aumentavam à medida que o a sementes apresentavam maiores teores de água a 25 °C, semelhante ao que Guardia *et al.* (2020) observaram em sementes de *Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand.

Bonjovani e Barbedo (2014) notaram a diminuição das taxas metabólicas em sementes armazenadas de *I. vera* no qual foi possível também desacelerar o metabolismo, porém, com o ônus das sementes apresentarem elevadas taxas oxidativas durante a respiração. Bragante *et al.* (2018), com sementes de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz frescas e imaturas notaram acentuadas taxas de consumo de O₂ após um ano de armazenamento a 18 e 25 °C. Esse aumento do metabolismo pode culminar na queda da viabilidade das sementes em condições de armazenamento (Bonjovani & Barbedo 2020). Em contrapartida, a diminuição da respiração em temperatura baixa (10 °C) o

preserva (Andreo *et al.* 2006). Porém, nos tratamentos em que as sementes de *E. uniflora* estavam com altas taxas de liberação de O₂, como se observou, não necessariamente perderam a viabilidade, apresentando altas taxas de viabilidade no teste de germinação a partir das sementes incubadas, e no experimento de armazenamento com os respectivos potenciais osmóticos e temperatura.

A redução da liberação de CO₂ nos tratamentos com PEG proporcionou a queda da taxa de respiração durante as 12 horas em ambos os períodos, e consequentemente a redução do metabolismo. O quociente de respiração (QR) concede informações sobre o tipo de respiração, podendo essa ser resultados de processos oxidativos, com valores de QR abaixo de -0,5, e acima disso, entre 0,6 e 0,7 o substrato é lipídeos. Quando a proporção é de uma para um, ou seja, QR = 1, a respiração utiliza carboidratos, e quando superior a esse valor, valores acima de 1 é resultante da respiração anaeróbia ou fermentação (Labouriau 1983, Kader & Saltveit 2002). Contudo, esses valores de QR podem oscilar entre 0,97 e 1,17 se o principal substrato utilizado na respiração é o carboidrato (Hopkins & Huner 2008).

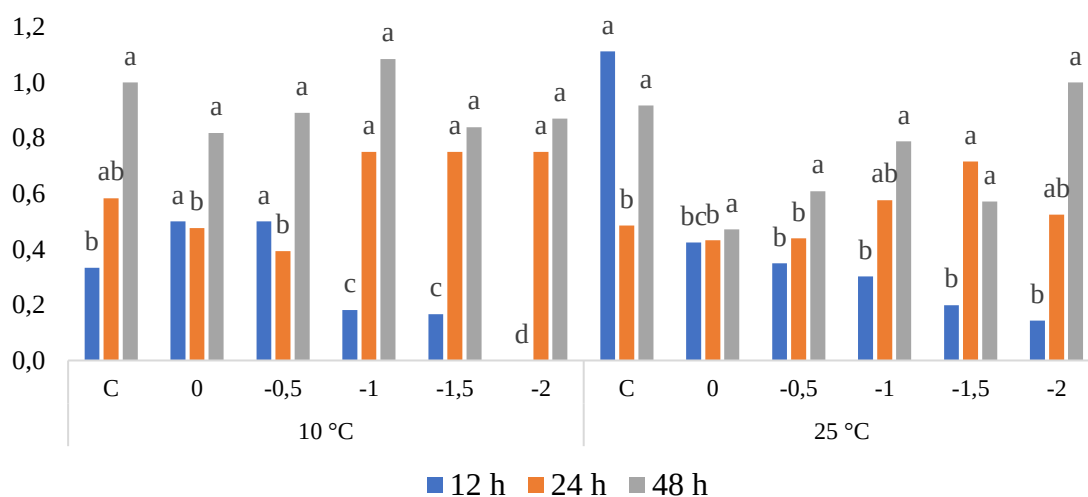


Figura 10. Quociente de respiração de sementes de *E. uniflora*, incubas pelo período de 12, 24 e 48 horas, avaliados em cada período nos tratamentos controle, água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a as temperaturas de 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

Os valores de QR obtidos no presente trabalho (Figura 10), demonstram um padrão para as sementes incubadas a 12 horas, com o QR diminuindo à medida que os tratamentos na solução de PEG ficavam mais negativos, com valores abaixo de 0,5, o que indica que houve processos

oxidativos, e consequentemente baixa atividade metabólica nas sementes. Durante a incubação a 12 horas o maior valor foi registrado do controle a 25 ° C, no qual o QR foi igual a 1,1, somente nos períodos de 12 horas. Não houve registro em sementes incubadas a 10 ° C em PEG a - 2,0 MPa.

A tendência de diminuição do QR não se manteve nos demais períodos de incubação (24 e 48 horas), ao invés disso, QR dos tratamentos ficaram em entre 0,5 e 0,8 durante a incubação por 24 horas, o que novamente evidencia o consumo de ácidos graxos e apenas os tratamentos a 0,0 MPa sob 10 °C e a -0,5 MPa a 25 °C, com valores de QR menores que 0,5, desta vez, sugerindo a existência de atividades oxidativas. Por fim, no período de 48 horas de incubação, os valores de QR estavam entre 5,7 e 9,3, apenas o controle a 10 °C e o tratamento com PEG a -2,0 MPa a 25 °C apresentaram QR igual a 1,0 e acima disso, somente o tratamento com PEG a -1,0 MPa a 10 °C, com o QR de 1,1.

A utilização de ácidos graxos na respiração das sementes incubadas traduz-se com menor produção de moléculas de CO₂ para de O₂ consumido. Isso ocorre em quadros com a respiração menos intensa, pois o O₂ está sendo utilizado em outros mecanismos bioquímicos que não a respiração (Vertucci 1989, Leopold & Vetucci 1989). O substrato principal das sementes de *E. uniflora* é o carboidrato, com cerca 80 % das reservas (Luzia *et al.* 2010), que é consumido na fase inicial da germinação, desencadeando maior intensidade respiratória, com altas taxas de CO₂ (Buckeridge *et al.* 2004). A redução da produção de CO₂ registrado *E. uniflora* pode indicar queda no metabolismo. O controle da temperatura resulta na diminuição das ações enzimáticas (Ruelland & Zackowski 2010), assim como o controle hídrico (Marcos-Filho 2015).

As taxas oxidativas (TO) das sementes incubadas por 12 horas apresentaram maiores valores em sementes com o PEG, aumentando quanto menor os potenciais hídricos dos tratamentos. Ainda, a 10 °C apresentaram menores TOs (Figura 10). Contudo, os valores foram ainda elevados nos tratamentos a -1,0, -1,5 e -2,0 MPa, com este último chegando a 6,6. A 25 °C, as TOs foram superiores, com os valores crescendo de forma gradual nas sementes incubadas entre o controle e -2,0 MPa. Se comparadas com a incubação em 12 horas, os demais períodos (24 e 48 horas) foram inferiores em ambas as temperaturas. Porém, se comparados entre si, as sementes incubadas na temperatura a 25

°C apresentaram maiores TOs que a 10 °C.

Houve diminuição das TOs nos tratamentos com PEG a -1,0 -1,5 -2,0 e no controle a 10 °C; já nas sementes incubadas por 48 horas os valores das taxas foram ínfimos e ficaram entre 0,2 e 04. Não houve registro de taxas oxidativas no controle e a -1,0 MPa. Nas sementes incubadas a 25 °C, notou-se a queda nas taxas oxidativas no mesmo tratamento à medida que as sementes ficaram mais tempo incubadas. As sementes de *Eugenia stipitata* McVaugh, armazenadas com baixa disponibilidade de O₂ (hipoxia), mantiveram-se viáveis (Calvi *et. al.* 2017), o mesmo ocorreu para sementes sensíveis de *I. vera* (Okamoto & Joly 2000). A presença de O₂ nas sementes é importante para manter a viabilidade e com isso a germinação, de modo que a falta de O₂ (anoxia) resulta na perda de tal capacidade (Okamoto & Joly 2000).

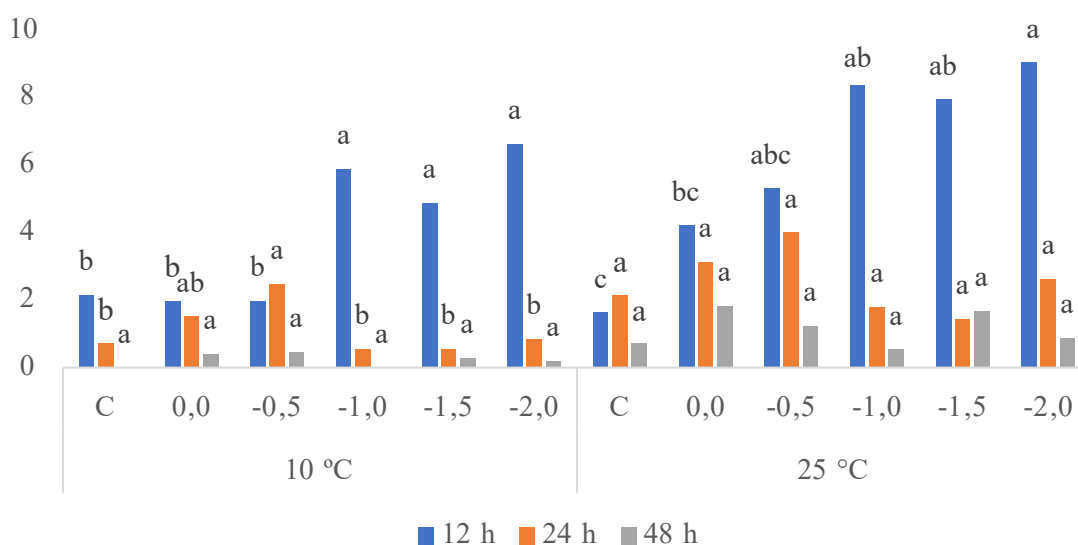


Figura 11. Taxas oxidativas de sementes de *E. uniflora* incubadas por 12, 24 e 48 horas, nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG a -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa, a 10 e 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser danosas à qualidade fisiológica das sementes, pois aceleram o processo de deterioração. Porém, também são associados a atividade metabólicas funcionais nas sementes, como a própria germinação (Sarath *et al.* 2007). Em estudo recente de Amorin *et al.* (2023), ao incubarem sementes de *E. involucrata* em N-acetyl-L-cysteine (NAC), conseguiram reduzir a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o que culminou na

inibição da germinação, evidenciando essa dualidade de comportamento das EROs.

Os antioxidantes são fundamentais na preservação da qualidade fisiológica, tanto os de via enzimática como a superóxido dismutase, catalase, peroxidase, entre outras, e não enzimática, como as substâncias antioxidantes (Mittler 2002, Johnston *et al.* 2006). Em espécies com sementes recalcitrantes de *Quercus robur* L. (carvalho-vermelho) e *Theobroma cocoa* (cacau), a queda dos potenciais antioxidantes estava associada à perda da viabilidade nessas sementes (Finch-Savage & Blake 1994, Li & Sun 1999). A falta de tal mecanismo faz com que as espécies reativas de oxigênio promovam o estresse oxidativo (Marx 1987)

Mesmo com os altos valores de taxas oxidativas (Figura 11) nos tratamentos durante a incubação, as sementes de *E. uniflora* mantiveram-se viáveis durante o experimento de armazenamento por 12 meses. Tem-se relatado em pesquisas com extratos de sementes de *E. uniflora* a capacidade antioxidante destas devido à presença de compostos fenólicos (Baggueti *et al.* 2009, Luzia *et al.* 2010 Pereira *et al.* 2020a). Isso pode ser o motivo de tais sementes permanecerem viáveis, mesmo com taxas oxidativas exorbitantes.

Incidência fúngica em sementes de E. uniflora armazenadas

A incidência fúngica em sementes de *E. uniflora* aos 3 meses de armazenamento (Tabela 3) demonstrou que tanto a temperatura quanto os tratamentos com diferentes potenciais osmóticos foram fatores importantes. A 10 °C os gêneros *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp. mostraram-se mais adaptados. Contudo, *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. tiveram melhor adaptação em temperatura baixa (10 °C) enquanto o *Penicillium* sp. foi mais presente em temperatura sem refrigeração (25 °C). Nesta temperatura houve a inibição de *Alternaria* sp.. *Ceratocystis* sp. e *Phomopsis* sp. também estavam presentes nas duas temperaturas, porém com menor incidência.

A quantidade de água presente no substrato foi determinante. No controle a 10 °C (sementes mais desidratadas) foi observado maior incidência para maior parte dos fungos avaliados, com *Cladosporium* chegando a 100 %, seguidos de *Fusarium* sp. (97%), *Penicillium* sp. (50%) e *Alternaria* 31%. Com exceção para o gênero *Phomopsis*, os tratamentos com PEG conseguiram

reduzir a incidência dos fungos em temperatura baixa. A 25 °C, mais uma vez, a incidência foi superior no controle para *Penicillium* sp. (100%) e *Cladosporium* sp. (78%). O armazenamento em água destilada diminui a incidência de *Fusarium* sp., cujo substrato continha teor de água de 69,8%; os demais tratamentos e o controle elevaram as taxas de incidência para o gênero.

Tabela 3. Incidência fúngica em sementes de *E. uniflora* armazenadas por 3 meses à 10 e 25 °C, em que *Clad.* (= *Cladosporium* sp.), *Alte.* (= *Alternaria* sp.), *Fusa.* (= *Fusarium* sp.), *Peni.* (= *Penicillium* sp.), *Cera.* (= *Ceratocystis* sp.) e *Phps.* (= *Phomopsis* sp.) e teor de água (TA), nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob as temperaturas de 10 e 25 °C, letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey a 5%. (* dados não obtidos).

Temperatura	Tratamentos	3 meses						
		<i>Clad.</i>	<i>Alte.</i>	<i>Fusa.</i>	<i>Peni.</i>	<i>Cera.</i>	<i>Phps.</i>	TA
10 °C	C	100 a	31 a	97 a	50 a	3 b	0 b	51,92
	0,0	81 abc	14 a	89 ab	0 b	11 a	0 b	55,74
	-0,5	97 ab	8 a	89 ab	0 b	11 a	0 b	57,25
	-1,0	94 ab	8 a	89 ab	0 b	6 ab	0 b	53,62
	-1,5	81 bc	3 a	67 bc	3 b	0 b	36 a	49,30
	-2,0	72 c	6 a	56 c	3 b	0 b	19 ab	51,63
25° C	C	78 a	0 a	75 a	100 a	0 a	3 a	45,31
	0,0	28 b	0 a	22 b	17 b	8 a	3 a	69,87
	-0,5	17 b	0 a	64 a	44 ab	8 a	3 a	57,56
	-1,0	17 b	0 a	78 a	11 b	6 a	0 a	*
	-1,5	17 b	0 a	69 a	19 b	3 a	0 a	*
	-2,0	14 b	0 a	83 a	14 b	0 a	0 a	51,81

Em sementes armazenadas por 6 meses (Tabela 4), notou-se a incidência elevada de *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp., em todos os tratamentos. A incidência de *Ceratocystis* sp. foi insignificante em ambas as temperaturas. A 25 °C, nos tratamentos com PEG notou-se uma diminuição da incidência de *Penicillium* sp. enquanto o *Phomopsis* sp. se sobressaiu. A temperatura também foi fundamental para *Cladsporium* sp., que apesar de ocorrer em ambas, adaptou-se melhor em temperatura baixa (10 °C).

Penicillium sp. mostrou-se mais adaptado em sementes mais desidratadas (controle) independente da temperatura de armazenamento. Apesar de baixa incidência, *Alternaria* sp. não apresentou diferença entre os tratamentos em ambas as temperaturas de armazenamento. *Phomopsis* sp. foi contido no controle cuja sementes estavam mais desidratadas, mostrando-se mais adaptado a sementes mais úmidas independente da temperatura de armazenamento.

Tabela 4. Incidência fúngica em sementes de *E. uniflora* armazenadas por 6 meses à 10 e 25 °C, em que *Clad.* (= *Cladosporium* sp.), *Alte.* (= *Alternaria* sp.), *Fusa.* (= *Fusarium* sp.), *Peni.* (= *Penicillium* sp.), *Cera.* (= *Ceratocystis* sp.) e *Phps.* (= *Phomopsis* sp.) e teor de água (TA), nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob as temperaturas de 10 e 25 °C, letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Temperatura	Tratamentos	6 meses						TA
		<i>Clad.</i>	<i>Alte.</i>	<i>Fusa.</i>	<i>Peni.</i>	<i>Cera.</i>	<i>Phps.</i>	
10 °C	C	100 a	8 a	94 a	83 a	0 a	0 b	22,32
	0,0	92 ab	14 a	94 a	2 b	0 a	8 ab	60,91
	-0,5	86 ab	3 a	100 a	0 b	0 a	0 b	56,49
	-1,0	75ac	0 a	97 a	0 b	6 a	0 b	55,97
	-1,5	50 c	0 a	100 a	3 b	0 a	36 a	51,66
	-2,0	61 ab	6 a	100 a	8 b	0 a	19 ab	59,70
25° C	C	0 a	6 a	50 a	100 a	0 a	0 c	19,20
	0,0	28 a	8 a	69 a	42 a	6 a	0 c	45,35
	-0,5	6 a	3 a	92 a	94 a	0 a	78 a	52,02
	-1,0	28 a	0 a	69 a	69 a	0 a	28 b	52,23
	-1,5	3 a	0 a	83 a	53 a	3 a	39 ab	51,35
	-2,0	3 a	0 a	89 a	50 a	0 a	11 bc	33,95

No último período, aos 12 meses de armazenamentos (Tabela 5), os gêneros *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. tiveram altas taxas de incidência em ambas as temperaturas. Em temperatura baixa, a 10 °C, *Cladosporium* sp. mais uma vez se adaptou, houve baixa incidência de *Alternaria* sp., *Ceratocystis* sp., *Phomopsis* sp. e *Botrytis* sp.. Já a 25 °C, *Phomopsis* sp. se sobressaiu nos tratamentos com PEG, os demais (*Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Ceratocystis* sp. e *Botrytis* sp.) tiveram sua incidência diminuída ou controladas nessas condições.

Quanto à incidência a 10 °C, em controle, contendo sementes mais secas, houve a inibição de *Cladosporium* sp., diminuição de *Fusarium* sp., enquanto o *Penicillium* sp. foi favorecido nessa condição, com 100% de incidência. Curiosamente, a 25 °C, *Penicillium* sp. de maneira geral, foi mais incidente em sementes mais úmidas. O gênero ocorreu em todas as sementes cujo armazenamento foi em água destilada (0,0 MPa), contrariando as condições descritas anteriormente. Nos tratamentos com PEG e a 0,0 MPa, foi notada a presença de *Phomopsis* sp.. Além dos que haviam sido registrados com sementes recém-colhidas (*Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Alteraria* sp. e *Penicillium* sp), após o armazenamento surgiram os gêneros *Ceratocystis* sp. e *Phomopsis* sp. durante as avaliações nos períodos de 3, 6 e 12 meses, e *Botrytis* sp. no último período (12 meses), apesar da baixa incidência.

Tabela 5. Incidência fúngica em sementes de *E. uniflora* armazenadas por 12 meses à 25 °C, em que *Clad.* (= *Cladosporium* sp.), *Alte.* (= *Alternaria* sp.), *Fusa.* (= *Fusarium* sp.), *Peni.* (= *Penicillium* sp.), *Cera.* (= *Ceratocystis* sp.), *Phps.* (= *Phomopsis* sp.) e *Botr.* (= *Botrytis* sp.), nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob as temperaturas de 10 e 25 °C, letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey a 5%. (o teor de água é o mesmo presente na Tabela 1 aos 12 meses) *

Temperatura	Tratamentos	12 meses							*
		<i>Clad.</i>	<i>Alte.</i>	<i>Fusa.</i>	<i>Peni.</i>	<i>Cera.</i>	<i>Phps.</i>	<i>Botr.</i>	
10 ° C	C	0 b	0 b	30 b	100 a	0 a	0 a	0 a	
	0,0	44 ab	0 b	78 a	48 ab	0 a	4 a	4 a	
	-0,5	63 a	0 b	96 a	4 b	15 a	4 a	0 a	
	-1,0	19 ab	0 b	89 a	0 b	0 a	4 a	4 a	
	-1,5	37 ab	0 b	100 a	15 ab	0 a	4 a	0 a	
	-2,0	44 ab	15 a	100 a	33 ab	0 a	4 a	7 a	
25° C	C	0 a	0 a	26 ab	59 b	0 b	0 b	0 a	
	0,0	0 a	11 a	26 ab	100 a	0 b	4 ab	0 a	
	-0,5	0 a	0 a	93 a	78 ab	22 a	56 a	0 a	
	-1,0	0 a	0 a	100 a	74 ab	4 b	41 ab	0 a	
	-1,5	4 a	4 a	11 b	96 ab	0 b	22 ab	0 a	
	-2,0	4 a	0 a	59 ab	85 ab	0 b	22 ab	0 a	

Apesar dos fungos não serem os principais responsáveis por deteriorar as sementes, eles fazem parte deste processo, somando-se a outros fatores, como a ocorrência de outros microrganismos e processos bioquímicos promovidos pelo próprio metabolismo das sementes (Berjak 1996, Carvalho & Nakagawa 2015, Parisi *et al* 2019). Ambientes com temperaturas elevadas e com umidade alta são condições nas quais os fungos predominam (Schmidt 2007). Em sementes que necessitam ser armazenadas em condições cuja proliferação de fungos é favorecida, podem antecipar ainda mais o processo de deterioração (Goldbach 1979).

Resultados interessantes foram encontrados para as sementes de *Eugenia* spp. em diferentes condições osmóticas com PEG e diferentes temperaturas, reduzindo a incidência de *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., e *Botrytis* sp. (Oliveira *et al.* 2011, Françoso & Barbedo 2014, Françoso & Barbedo 2016). Oliveira *et al.* (2011), notaram que, apesar da alta incidência de *Cladosporium* sp., as sementes de *E. brasiliensis* não tiveram a germinação comprometida após 60 dias de armazenamento. No mais, há registro em literatura de sementes acometidas por fungos desses mesmos gêneros, e com altas taxas de germinação em sementes de *E. calycina* (Bülow *et al.* 1994). Contudo, em sementes de *E. pyrifomes* houve presença

de *Aspergillus* spp., que prejudicou a germinação (Andrade & Ferreira 2000), o que não ocorreu no presente trabalho.

O *Penicillium* sp., fungo de campo, tem sido associado como fungo patogênico em sementes, produzindo micotoxinas, causando podridão e prejudicando a qualidade durante o armazenamento (Carvalho & Nakagawa 2012). Junto ao *Fusarium* sp., que é responsável pela podridão de raízes e tombamento de mudas (Santos *et al* 2015, Bruschet *et al.* 2022), ambos foram os fungos que mais acometeram as sementes de *E. uniflora* e se adaptaram em ambas as temperaturas aos 12 meses de armazenamento. Na última década, esses dois gêneros têm sido mais abundantes em sementes de espécies florestais (Martins *et al.* 2022). *Cladosporium* sp. apresentou alta incidência aos 12 meses, porém somente a 10 °C. É provável que essa alternância de incidência nos diferentes períodos seja decorrente da competição. Contudo, avaliações mais específicas, como o teste de severidade devem ser empregadas para se concluir isso.

No presente trabalho, os gêneros fúngicos que ocorreram em sementes de *E. uniflora* durante o armazenamento pouco explicam a perda da viabilidade. Apenas os tratamentos a 0,0 MPa em ambas as temperaturas foi possível notar uma queda na viabilidade a partir do período de 6 meses. Apesar das sementes no controle apontarem queda significativa aos 3 meses, e sementes totalmente inviáveis aos 6 meses de armazenamento, tal fato se deve a queda demasiada do teor de água nessas sementes, ainda no início do armazenamento, o que já se observa em sementes dessa espécie outrora, cujo a viabilidade se perdem com menos de 30 % de teor de água (Comin *et al.* 2014).

4.2 *Eugenia involucrata*

As sementes de *E. involucrata* apresentaram inicialmente 92% de germinação e 90% de plântulas normais, 52,5% de água e 0,17 g.semente⁻¹ de massa seca; o potencial hídrico foi de -2,56 MPa. A sanidade inicial também foi avaliada e os gêneros encontrados foram *Fusarium* sp. (97,5%), *Cladosporium* sp. (77,5%), *Ceratocistys* sp. (35%), *Penicillium* sp. (25%) e *Phomopsis* sp. (15%).

Armazenamento e viabilidade em sementes de E. involucrata armazenadas

As sementes de *E. involucrata* apresentaram resultados interessantes durante o

armazenamento. O controle e o tratamento com água destilada (0,0 MPa) apresentaram os melhores índices de germinação, respectivamente 94% e 92%, enquanto os tratamentos com PEG apresentaram valores menores. Contudo, apenas o tratamento com PEG a -2,0 MPa conseguiu inibir completamente a germinação durante o período em que as sementes estavam na câmara BOD. Tal fato não se apresentou favorável a essas sementes, com queda na viabilidade no teste de germinação.

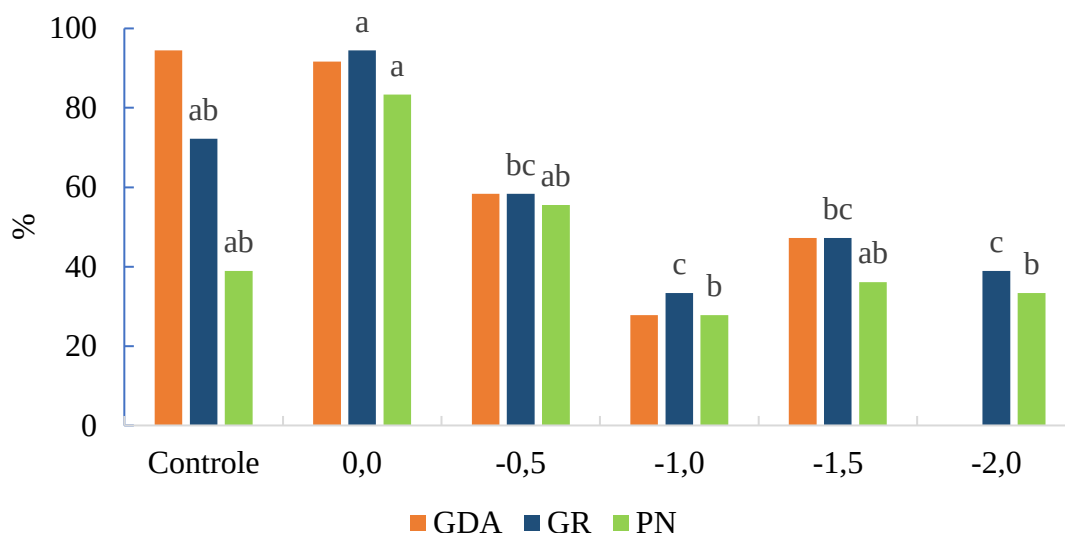


Figura 12. Germinação durante o armazenamento (GDA), durante o teste de germinação (GR) e desenvolvimento de plântulas normais (PN) de sementes de *E. involucrata* armazenadas por 4 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG a -0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa, a 25 °C. Colunas com a mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

Armazenar sementes de *E. involucrata* tem tido pouco sucesso, como demonstrado (Figura 12), pois possuem baixa longevidade devido a sensibilidade à dessecação (Roberts 1973, Lorenzi 1992, Delgado & Barbedo 2007), perdendo rapidamente a viabilidade ao serem armazenadas (Maluf *et al.* 2003, Pirola *et al.* 2013). Em tentativas anteriores, Barbedo *et al.* (1998) já evidenciaram a perda da viabilidade ao secarem as sementes de *E. involucrata*. Porém, esses mesmos autores obtiveram êxito em armazenar as sementes em condições de câmara fria (8 °C) por até 4 a 6 meses (Maluf *et al.* 2003), tempo 4 a 6 vezes maior do que o obtido por Alegretti *et al.* (2015) a 5 °C em sacos plásticos a vácuo com biofilme de fécula, pré-tratadas com hidrocondicionamento.

Assim, as sementes armazenadas em água destilada apresentaram maior viabilidade, com 94% de sementes germinadas e 83% de plântulas normais, após a retirada da câmara. A resposta para o sucesso no armazenamento pode, portanto, estar na disponibilidade da água, pois a quantidade, vista

pelo teor de água, praticamente não se alterou entre os tratamentos (Figura 13). É importante salientar que os elevados teores de água permitiriam o elevado metabolismo dessas sementes, especialmente nas temperaturas mais elevadas. O intenso metabolismo dessas sementes no início do armazenamento pode ser uma das possibilidades, necessitando de água durante o armazenamento para manter o metabolismo, como um ponto de “não retorno”, e a diminuição dessa disponibilidade pode ter causado danos ao estado metabólico, como notado por Inocente & Barbedo (2019). Apesar dos tratamentos com PEG terem menores valores de germinação, o tamanho da parte aérea e das raízes provenientes das plântulas normais, não apresentaram diferenças significativa (Tabela 6).

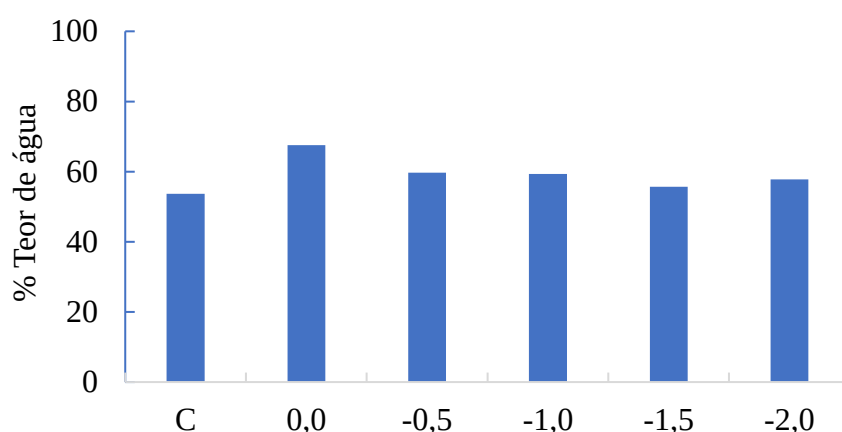


Figura 13. Teor de água de sementes de *Eugenia involucrata* armazenadas durante 4 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a temperatura de 25 °C.

Tabela 6. Tamanho médio em centímetros da parte aérea (PA) e da raiz (R) provenientes da germinação de *E. involucrata* após 4 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a temperatura de 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).

Tratamentos	Tamanho das plântulas (cm)	
	PA	R
C	6,7 a	9,1 a
0,0	9,5 a	12,1 a
- 0,5	8,4 a	10,3 a
- 1,0	8,1 a	9,6 a
- 1,5	7 a	10,2 a
- 2,0	7 a	11,1 a

Incidência fúngica em sementes de E. involucrata armazenadas

O teste de sanidade permitiu a identificação de incidência de 5 gêneros fúngicos: *Penicillium*

sp., *Fusarium* sp., *Ceratocystis* sp., *Phomopsis* sp. e *Rizhopus* sp. (Tabela 7). A temperatura de 25 °C proporcionou elevada incidência, e nenhum tratamento praticamente foi capaz de inibir completamente a presença de fungo. Contudo, deve-se salientar a não existência de diferença significativa mesmo entre valores tão amplos quanto 96% e 37%, para *Penicillium* sp., e 78% e 15%, para *Phomopsis* sp.. Isso deve estar relacionado com a grande variação de resultados entre as repetições do mesmo tratamento, o que pode ter sido consequência de um tamanho amostral insuficiente. Futuramente, para a análise de sanidade é importante que se utilizem tanto um maior número de sementes por repetição, quanto um maior número de repetições por tratamento.

Tabela 7. Incidência fúngica em sementes de *E. involucrata* armazenadas por 4 meses nos tratamentos controle (C), água (0,0), e PEG nos respectivos potenciais osmóticos (-0,5, -1,0, -1,5 e -2,0 MPa), sob a temperaturas de 25 °C, em que *Peni.* (= *Penicillium* sp.), *Fusa.* (= *Fusarium* sp.), *Cer.* (= *Ceratocystis* sp.), *Phps.* (= *Phomopsis* sp.) e *Rizh.* (= *Rizhopus* sp.), letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos	4 meses				
	<i>Pen.</i>	<i>Fus.</i>	<i>Cer.</i>	<i>Phps.</i>	<i>Rizh.</i>
C	96 a	67 a	85 a	15 a	4 a
0,0	37 a	52 a	56 ab	67 a	0 a
-0,5	74 a	56 a	48 ab	78 a	0 a
-1,0	82 a	15 a	52 ab	70 a	0 a
-1,5	70 a	37 a	22 b	56 a	11 a
-2,0	70 a	78 a	37 ab	22 a	0 a

Os resultados permitem inferir que o armazenamento com controle da mobilização hídrica, apesar de promissor para sementes recalcitrantes, pode requerer maiores investigações, dependendo da espécie. Ao contrário das sementes de *E. uniflora*, no qual a viabilidade nos tratamentos com PEG foi assegurada, em sementes de *E. involucrata*, tais tratamentos apresentaram resultados opostos, com a viabilidade sendo perdida e asseguradas em tratamentos mais úmidos (0,0 MPa). O gênero *Penicillium* sp. apresentou alta incidência, exceto no tratamento a 0,0 MPa, cuja sementes estavam com maior viabilidade, podendo esse fungo estar relacionado com baixa viabilidade nos demais tratamentos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, é possível notar a queda no metabolismo das sementes em tratamentos em que se reduziu a disponibilidade de água, preservando a viabilidade durante o armazenamento, como visto nos tratamentos com soluções de PEG de menores potenciais hídricos. Porém, quando a disponibilidade de água foi muito alta, a exemplo do tratamento a 0,0 MPa, houve queda da viabilidade. A combinação entre temperatura e disponibilidade de água resultou no controle do metabolismo dessas sementes. O condicionamento promovido pelo PEG assegurou a viabilidade das sementes de *E. uniflora* durante todo o período de armazenamento (12 meses), exceto no tratamento a -0,5 MPa a 25 °C. O controle hídrico nas células pode ter diminuído atividades enzimáticas fundamentais para o funcionamento apropriado, diminuindo não só a germinação, como a própria deterioração. A temperatura de armazenamento foi um fator determinante, com temperatura a 10 °C controlando melhor a germinação durante o período de armazenamento. Contudo a germinação foi sessada a 25 °C no tratamento com PEG a -2,0 MPa.

Na respiração, a produção de CO₂ foi diminuída nos tratamentos com PEG, à medida que os potenciais ficavam menores, com valores ínfimos nos tratamentos. Apesar das altas taxas de O₂ consumido nas sementes incubadas, os fatores antioxidantes podem ter alguma relação com o controle de potenciais reações oxidativas prejudiciais, como os radicais livres. E, de certa forma, isso pouco influenciou na qualidade das sementes armazenadas, haja visto que tais sementes apresentaram uma elevada taxa de germinação.

Entretanto, apesar dos ótimos resultados para *E. uniflora*, a aplicação do PEG em sementes intolerantes com intuito de armazená-las precisa ser analisado com cautela, pois quando tal aplicação também foi feita para sementes de *E. involucrata*, não se obteve o mesmo sucesso, apesar de ter reduzido o metabolismo durante o armazenamento, indicando que o metabolismo pode ter algumas características não padronizáveis, com sementes apresentadas sensibilidades a diferentes fatores.

Em sementes de *E. uniflora*, a incidência de *Fusarium* sp, *Penicilium* sp. e *Cladosporium* sp. foi elevada e não foi possível notar relação com a queda da viabilidade ao final do

armazenamento. Já em *E. involucrata* notou-se a relação da incidência de *Penicillium* sp. com a queda da viabilidade das sementes, o que pode indicar que tais sementes tem maior sensibilidade a algumas das micotoxinas produzidas por esse gênero. No entanto, a incidência do *Penicillium* sp. não mostrou variação significativa nos tratamentos, necessitando futuramente de análises mais acuradas e precisas.

Com isso, conclui-se que o armazenamento de sementes de *Eugenia* spp. sob diferentes potenciais osmóticos pode ser uma técnica eficaz em estender a viabilidade das sementes, permitindo armazenar as sementes de *E. uniflora* por 12 e *E. involucrata* em por 4 meses mesmo em sem refrigeração, a 25 °C. Apesar dos resultados positivos, ainda se faz necessário investigar mais a fundo o comportamento destas sementes quanto ao armazenamento sob controle hídrico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegretti, A.L., Wagner Júnior, A., Bortolini, A., Hossel, C., Zanela, J. & Citadin, I.** 2015. Armazenamento de sementes de cerejas-do-mato (*Eugenia involucrata*) DC. submetidas ao recobrimento com biofilmes e embalagem a vácuo. *Revista Ceres* 62:124-127.
- Alonso, C.R. & Barbedo, C.J.** 2020. Germinações sucessivas em sementes de *Eugenia* spp. *Hoehnea* 47. 1-11.
- Anjos, A.M.G. & Ferraz, I.D.K.** 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. sororia). *Acta Amazonica* 29: 337-348.
- Amador, T.S. & Barbedo, C.J.** 2011. Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de *Eugenia pyriformis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 814-821
- Amorim, I. P., Silva, J.P.N. & Barbedo, J.C.** 2023. Germination and regeneration of *Eugenia involucrata* (Myrtaceae) seeds correlated with reactive oxygen species. *Journal of Seed Science* 45:1-11.
- Andrade, R.N.B., & Ferreira, A.G.** 2000. Germinação e Armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) Myrtaceae. *Revista Brasileira de Sementes, Pelotas* 22:118-125.
- Andréo, Y., Nakagawa, J., & Barbedo, C.J.** 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.)T. D. Pennington), *Revista Brasil. Botucatu-SP*, 29: 309-318.
- Araujo, A.C.F.B. & Barbedo, C.J.** 2017. Changes in desiccation tolerance and respiratory rates of immature *Caesalpinia echinata* Lam. seeds. *Journal of Seed Science* 39: 123-132.
- Avila, A.L., Argenta, M. S., Poletto, I. & Blume, E.** 2009. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga), Santa Maria, Rs, *Ciência Florestal*, Santa Maria-RS

19: 61-68.

Bagetti, M., Facco, E.M.P., Rodrigues, D.B., Vizzotto, M., & Emanuelli, T. 2009. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. *Ciência Rural* 39: 2504–2510

Ballesteros, D., Fanega-Sleziak, N., & Davies, R.M. 2021. Cryopreservation of seeds and seed embryos in orthodox-, intermediate-, and recalcitrant-seeded species. In: Wolkers W.F.; Oldenhof H. (Ed.) *Cryopreservation and FreezeDrying Protocols. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana 2180: 663-682.

Barbedo, C.J. 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science* 40: 221-236.

Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes, *Acta Botanica Brasilica*, Piracicaba-SP 12:145-164.

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

Barbedo, C.J. & Cicero, S.M. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. *Seed Sci Technol* 28:793–808.

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

Barbedo C.J. & Lamarca. E. V. 2015. Teor de água e dessecação, cap. 5 análise de sementes. In: Piña-Rodrigues, F. C. M., Figliola, M. B. Silva, A. *Sementes Florestais Tropicais: da ecologia à produção*.

Barbedo, C. J., Silva, J.P.N., Françoso, C.F. & Parisi, J.J.D. 2018. Armazenamento de

sementes. In Barbedo, C.J. & Santos Junior, N.A. (orgs.) Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 81-108..

Berjak, P. 1996. The role of micro-organisms in deterioration during storage of recalcitrant and intermediate seeds. In: A.S. Quedraogo, N.K. Poulsen & F. Stubsgaard (eds.). Workshop on Improved Methods for Handling and Storage of Intermediate/Recalcitrant Tropical Forest Tree Seeds. IPGRI, Rome, pp.121-126

Berjak, P. & Pammenter, N.W. 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seed. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12:22-55.

Berjak, P. & Pammenter, N.W. 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance. Perspective, *Annals of Botany* 101: 213–228.

Berjak, P. & Pammenter, N.W. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers. Plants Science* 4: 1-9.

Bewley, J.D.; Black, A.M. 1978. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination.. Springer-Verlag. New York 1: 306.

Bewley, J.D.; Black, A.M. 1994. Seeds Physiology of Development and Germination. 3rd Edition, Plenum Press, New York, pp.445.

Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. Nonogaki, H. 2013. Germination. In: Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. 3rd Edition, Springer, New York. pp.133-181.

Bezerra, J.E.F., Júnior, J.S.L., Júnior, J.F.S., 2018. *Eugenia uniflora* (piranga). Plantas para o Futuro - Região Nordeste, p. 1-14.

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

Bilia, D.A.C., Marcos Filho, J., Novembre, A.D.L.C. 1999. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis*. Seed and Science and Technology, v. 27, n.1, p. 77-89.

Bonjovani, M.R., Barbedo, C.J. 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. toleram temperatura subzero. Revista Brasileira de Botânica 31:345-356.

Bonjovani, M.R. & Barbedo, C.J. 2014. Induction of tolerance to desiccation and to subzero temperatures in embryos of recalcitrant seeds of inga. Journal of Seed Science 36: 419-426.

Bonjovani, M.R. & Barbedo, C.J. 2019. Respiration and deterioration of *Inga vera* ssp. *affinis* embryos stored at different temperatures. Journal of Seed Science 41:44-5.

Bonjovani, M.R. & Barbedo, C.J. 2020. Respiração de embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington sob diferentes temperaturas, potenciais osmóticos e aplicação de ABA. Hoehnea 47:1-17.

Bonner, F. T, Karrfalt, R.P., United States Forest Service. 2008. The Woody Plant Seed Manual. Washington, D.C.. U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service.

Bonner, F.T. 1978. Storage of hardwood seeds. Forest Genetic Resources Information, Rome 7:10-17.

Bonner, F.T. 1990. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. Forest Ecology and Management, 35:35-43.

Botelho, B.A. & Perez, S.C.J.G.A. 2001. Estresse Hídrico e Reguladores de Crescimento na Germinação de Sementes de Canafístula. Scientia Agricola, 58:43-49

Bradford, K.J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. HortScience 21:1105-1112.

Brancalion, P.H.S., Novembre, A.D.L.C. & Rodrigues, R.R. 2010. Temperatura ótima de

germinação de sementes de espécies arbóreas brasileiras. *Revista Brasileira de Sementes* 32: 15-21.

Bragante, R.B., Hell, A.F., Silva, J.P.N., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, RCL, & Barbedo C.J. 2018. Physiological and metabolic responses of immature and mature seeds of *Libidibia ferrea* ((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) under contrasting storage temperatures. *Brazilian Journal of Botany* 41:43-55

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS. pp.398.

Breman, E., Ballesteros, D., Castillo-Lorenzo, E., Cockel, C., Dickie, J., Faruk, A., O'Donnell, K., Offord, C.A., Pironon, S., Sharrock, S., Ulian, T. 2021. Plant Diversity Conservation Challenges and Prospects—The Perspective of Botanic Gardens and the Millennium Seed Bank. *Plants*, 10:1-35.

Bruschet, M.J.A.L., Junior, A.F.C., Chargas, L.F.B., Silva, P.T., Morais, C.B., Santos, G.R. 2022. Etiology, transmission and pathogenicity of fungi associated with Cagaita (*Eugenia dysenterica*) and Tingui (*Magonia pubescens*). *Research, Society and Development* 11:1-12.

Buckeridge, M.S.; Tiné, M.A.S.; Minhoto, M.J.; Lima, D.U. 2004. Respiração. In: G.K. Kerbauy, (ed.). *Fisiologia vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 198-216.

Bülow, J.F.W. Von Carmona, R., Parente, T. V. 1994. Armazenamento e tratamento de sementes de pitanga-vermelhado-cerrado (*Eugenia calycina*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.6, p.961-970.

Calvi, G.P., Aud, F.F., Ferraz, I.D.K., Pritchard, H.W. and Kranner, I. (2017), Analyses of several seed viability markers in individual recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh with totipotent germination. *Plant Biol J* 19: 6-13

Camara, A.T.R. 2011. Armazenamento de sementes pré-germinadas de *Inga vera* Willd. São Paulo. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas.

Carvalho, N. M.; Nakagawa, J. 2012 Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP.

Cécel A.T. & Barbedo C.J. 2021. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob atmosferas modificadas. Hoehnea 48, pp.1-8.

Cécel A.T. & Barbedo C.J. 2023. Storage of recalcitrant seeds of *Eugenia brasiliensis* Lam. under control of water availability. v45, pp.1-9.

Chin, H.F., Krishnapillay, B. and Stanwood, P.C. 1989. Seed Moisture: Recalcitrant vs. Orthodox Seeds. In: Stanwood, P.C. and Mcdonald, M.B., Eds., Seed Moisture, Crop Science Society of America, Madison, 15-22.

Christensen, C.M. 1974 Storage of cereal grains and their products. 2ed. Minnesota: American Association of Cereal Chemists.

Comin, A., Pereira, L.D., Maciel, C.G., Chies, J., & Muniz, M.F.B. 2014. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia uniflora* L., Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife-PE 9:84-90.

Corinto G.L. 2018. Cultivation as Taking Care of Plant Diversity and Global Commons: Nikolai Ivanovich Vavilov's Legacy. International Journal of Anthropology 33:203-217

Cremasco, J.P.G., Souto, A.G.L., Maitan, M.Q., Cordeiro, M.H.M., Moraes, K.D.B., Santos, C.E.M. 2017. Emergência de plântulas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob diferentes fotoperíodos. Revista Agropecuária Técnica, Areia-PB 38:104-108

Davide, A.C., Carvalho, L.R, Carvalho, M.L.M. & Guimarães, R.M. 2003. Classificação

fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. *Cerne*, Lavras 9:29-35.

Daws, M. I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C.

A. & Pritchard, H. W. 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157-166.

Daws, M.I.; Cleland, H.; Chemielarz, P.; Gorin, F.; Leprince, O.; Matthews, S.; Mullins, C.E.; Thanos, C.A.; Vandivick, V.; Pritchard, H.W. 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology* 33:59-66.

Delgado, F.L. & Barbedo, C.J. 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*., *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília-DF 42:265-272.

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

Delgado, L.F. & Barbedo, C.J. 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55:583-590.

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.

Delouche, J. C. 1969. Seed germination. In: *Proceedings of the Short Course for Seedsmen*, Mississippi State: Mississippi State University, Seed Technology Laboratory. p. 59- 76.

Donadio, L.C. 1983. Fruticultura para pomares domésticos UNESP-FCAV. Jaboticabal, São

Paulo.

Donadio, L.C., Môro, F.V., Servidone, A.A. 2002. Frutas Brasileiras. Ed. Novos Talentos. Jaboticabal, São Paulo.

Donadio, L.C. & Moro, F.V. 2004 Potential of Brazilian Eugenia (Myrtaceae) - as ornamental and as a fruit crop. *Acta Horticulturae*, v.632, p.65-68.

Engelmann, F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletter* 112:9-18

Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *In: Cryopreservation of tropical plant germoplasm*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 8-20.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies. *In: Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40:427–433.

Engelmann F. 2011. Cryopreservation of embryos: an overview. *Methods Mol Biol* 710:155-84.

Ellis, R.H. 2022. Invited Review: Seed ageing, survival and the improved seed viability equation; forty years on. *Seed Sci. Tech.* 50:1–20.

Ethmane Kane, C.S., Kouhila, M., Lamharrar, A., Idlimam, A. & Mimet, A., 2008. Moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of two mints: *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia*. *Rev. Energ. Renouv.* 11, 181–195.

Fairbairn, A., Martinoli, D., Butler, A. & Hillman, G. 2006. Wild plant seed storage at Neolithic Çatalhöyük East, Turkey. *Vegetation History and Archaeobotany* 16:467–479.

Farrant, J. M., Pammenter, N. W. & Berjak, P. 1986. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. *Physiologia Plantarum* 67:291–

- Farrant, J.M., Pammenter, N.W. & Berjak, P.** 1988 Recalcitrance - A Current Assessment. *Seed Science and Technology*, 16:155-166
- Faria, J.M.R., Buitink, J. van Lammeren, A.A.M. & Hilhorst, H. W. M.** (2005) Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *J Exp Bot* 56:2119–2130.
- Farnworth, E.** 2000. The Ecology and Physiology of Viviparous and Recalcitrant Seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32:107-138.
- FAO.** 2010. The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources. FAO. Rome, Italy.
- Ferraz, I.D.K. & Calvi, G.P.** 2011. Teste de germinação. In: Lima Júnior, M.J.V. (Ed.). Manual de procedimentos de análise de sementes florestais. Abrates. Londrina. PR.
- Figliolia, M. B.** 2015. Teste de germinação, cap. 5 análise de sementes. In: Piña-Rodrigues, F. C. M., Figliolia, M. B. Silva, A. Sementes Florestais Tropicais: da ecologia à produção.
- Finch-Savage, W., & Blake, P.** 1994. Indeterminate development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robur* L. *Seed Science Research* 4:127-133
- Floriano, E. P.** 2004. Armazenamento de sementes florestais. Anorgs, Série cadernos didáticos.
- Françoso, C.F. & Barbedo, C.J.** 2014. Tratamentos osmóticos e térmicos para controle de fungos em sementes de grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), Hoehnea, São Paulo-SP 41: 541-552.
- Françoso, C.F. & Barbedo, C.J.** 2016. Osmotic and heat treatments on control of fungi associated with seeds of *Eugenia brasiliensis* and *E. pyriformis* (Myrtaceae). *Journal of Seed Science*

38:195-203.

Fonseca, S.C.L. & Freire, H.B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia*, Campinas 62:297-303.

Fuller D.Q. & Stevens, C.J. 2019. Between domestication and civilization: the role of agriculture and arboriculture in the emergence of the first urban societies. *Vegetation History and Archaeobotany*. 28:263-282.

Guardia, M.C., Asperti, L.M., Cancian, G.M., & Barbedo, C.J. 2020. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand (Myrtaceae). *Hoehnea*. 47:1-9.

Goldbach, H. 1979. Imbibed storage of *Melicoccus bijugatus* and *Eugenia brasiliensis* using abscisic acid as a germination inhibitor. *Seed Science and Technology* 7:403-406.

Goldfarb, M. & Queiroga, V.P. 2013. Considerações sobre o armazenamento de sementes. *Tecnologia e Ciência Agropecuária* 7:71-74.

Gomes, J. P., Oliveira, L. M, Ferreira, P. I & Batista, F. 2016. Substrato e temperatura para teste de germinação em sementes de Myrtaceae. *Ciência Florestal*, Santa Maria 26: 285-293.

Gurgel, J.T.A. & Sobrinho, J. S. 1951. Poliembryonia em mirtáceas frutíferas. *Bragantia* 11: 141-163.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4 ed., Oxford University Press, Oxford.

Harlan, J.R. 1951. Anatomy of gene centers. *American Naturalist* 85:97103.

Harrington, J.F. 1960. Thumb rules of drying seed. *Crops Soils*. 13:16–17

Harrington, J. F. 1972. Seed Storage and Longevity. Insects, and Seed Collection, Storage,

Testing, and Certification, 145–245.

Hendry, G.A.F., Finch-Savage, W.E., Thorpe, P.C., Atherton, N.M., Buckland, S.M., Nilsson, K.A. & Seel, W.E. 1992. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L.. New Phytologist, 122: 273-279

Heydecker, W., Higgins, J. & Gulliver, R.L. 1973. Accelerated germination by osmotic seed treatment. Nature, London 246:42-44.

Hoekstra F.A, Golovina E.A. & Buitink J. 2001 Mechanisms of plant desiccation tolerance, Trends Plant Sci. 6.:431-438

Hoekstra F.A. 2005. Differential longevities in desiccated an hydrobiotic plant systems. Integr Comp Biol 45:725-733

Hong, T.D. & Ellis, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behavior Rome: IPGRI, (Technical Bulletin,1).

Hopkins, W. G. & Huner M. P. A. 2008. Introduction to plant physiology. 4 ed. John Wiley & Sons.

Inocente, M.C. & Barbedo J.C. 2019. Germination of *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis* and *E. uniflora* (Myrtaceae) under water-deficit conditions, Journal of Seed Science, São Paulo-SP. 41:076-085.

Inocente, M.C. & Barbedo J.C. 2021. Regeneration of roots and seedlings from *Eugenia involucrata* seeds under water deficit conditions. Journal of Seed Science 43:1-14

ISTA. 2015. International rules for seed testing. Seed Science and Technology 13: 356-513.

Johnston, J.W., Dussert, S., Gale, S., Nadarajan, J., Harding, K., Benson, E.E. 2006. Optimisation of the azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid radical scavenging assay for physiological studies of total antioxidant activity in woody plant germplasm, Plant Physiology

and Biochemistry 44:193-201

Karmas, R.; Buera, M. P.; & Karel, M. 1992. Effect of Glass Transition on Rates of Nonenzymatic Browning in Food Systems. *J. Agric. Food Chem* 40:873-879.

Kader, A.A. & Saltveit, M.E. 2002. Respiration and gas exchange. *In*: Bartz, J.A., Brecht, J.K. & Weichmann, J. (orgs.) Postharvest physiology and pathology of vegetables. Marcel Dekker, New York.

Kidd, F. 1914. The controlling influence of carbon dioxide in the maturation, dormancy and germination of seeds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 7:408-421.

King, M.W. & Roberts, E.H. 1979. The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches. IBPGR. Rome.

King, N.W. & Roberts, E.H. 1982. The imbibed storage of cocoa (*Theobroma cacao*) seeds. *Seed Science and Tecnology* 10:535-540.

Kranner, I., Birtic', S., Anderson, K.M. & Pritchard, H.W. 2006. Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radical Bio Med* 40:2155–2165

Kranner, I; Chen, H.; Pritchard, H. W.; Pearce, S. R.; Birtic, S. 2010. Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. *Plant Growth Regul* (2011) 63:63–72

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, Pelotas* 28:72-78.

Koster, K.L. 1991 Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 96.

pp. 302-304.

Labouriau, L.G. 1983. A germinação das sementes. Washington: Secretaria da OEA, 173p.

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

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

Lamarca, E.V., Baptista, W., Rodrigues, D.S & Oliveira Júnior, C.J.F. 2013. Contribuições do conhecimento local sobre o uso de *Eugenia* spp. em sistemas de policultivos e agroflorestas. Revista Brasileira de Agroecologia 8: 119-130.

Lamarca, E. V. & Barbedo, C. J. 2015. Sensibilidade à dessecação de embriões de *Inga vera* Willd. formados sob diferentes condições ambientais. Revista Árvore 39: 1083-1092.

Lamarca, E. V., Camargo, M. B. P., Teixeira, S. P., Silva, E. A. A., Faria, J. M. R., Barbedo, C. J. 2016. Variations in desiccation tolerance in seeds of *Eugenia pyriformis*: dispersal at different stages of maturation. Revista Ciência Agronômica 47:118-126.

Lamarca, E.V., Parisi, J.J.D. & Barbedo, C.J. 2020. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. dispersas em diferentes estádios de maturação. Hoehnea 47:1-12.

Leopold, A.C. & Vertucci, C.W. 1989. Moisture as a regulator of physiological reactions in seeds in: Stanwood, P.C. (Ed.) Seed moisture. CSSA Special Publication 14, Madison. Crop Science Society of America.

Leopold, A. C., Sun, W. Q., & Bernal-Lugo, I. 1994. The glassy state in seeds: analysis and function. Seed Science Research, 4:297-274.

Leprince, O., Hendry, G.A.F., & McKersie, B.D. 1993. The mechanisms of desiccation

tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3: 231-246.

Linkies, A., Graeber, K., Knight, C. & Leubner-Metzger, G. 2010. The evolution of seeds. *New Phytologist*, Cambridge 186: 817-831.

Li, C., & Sun, W.Q. 1999. Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. *Seed Science Research*, 9:209-217.

Liu, U., Breman, E., Cossu, T.A. & Kenney, S. 2018. The conservation value of germplasm stored at the Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK. *Biodivers Conserv.* 27:1347–1386.

Longhi, R. A. 1995. Livro das árvores: árvores e arvoretas do Sul. Porto Alegre.

Lopes, H.M. & Souza, C.M. 2008. Efeitos da giberelina e da secagem no condicionamento osmótico sobre a viabilidade e o vigor de sementes de mamão (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 30:181-189.

Lorenzi, H. & Matos, F.J.A. 2002. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum. São Paulo.

Luzia, D.M.M., Bertanha, B.J. & Jorge, N. 2010 Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 69:175-180.

Maluf, A.M.; Bilia, D.A.C.; Barbedo, C.J. 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. *Scientia Agricola*, v.60, p.471-475.

Marcos-Filho, J. 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. 2. ed., ABRATES. Londrina.

Martins, R.D.S., Santos Junior, N.A.D., & Barbedo, C.J. 2022. Seed pathology of non-domesticated species of tropical ecosystems. *Journal of Seed Science*, 44.

Marx, J.L. 1987. Oxygen Free Radicals Linked to Many Diseases: The oxygen free radicals, although made as by-products of normal oxygen-using reactions, nevertheless have a wide potential for causing cell injury. *Science* 235:529-531.

Maurin, O., A. Anest, S., B ellot, E., Biffin, G., Brewer, T., Charles-Dominique, R.S., Cowan, S., Dodsworth, et al. 2021. A nuclear phyloge-nomic study of the angiosperm order Myrtales, exploring the potential and limitations of the universal Angiosperms, probe set. *American Journal of Botany* 108:1087-1111.

Mazine, F.F., Bünger, M., Faria, J.E.Q., Fernandes, T., Giaretta, A., Valdemarin, K.S., Santana, K.C., Souza, M.A.D., Sobral, M. 2023. *Eugenia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10338>>. Acesso em: 28 dez. 2023

Mazoyer, M. & Roudart, L. 2009. História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea. Editora UNESP. São Paulo.

Michel, B.E & Kaufmann, M.R. 1972. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiol* 51:914-916

Mitrofanova, O. P. 2012. Wheat Genetic Resources in Russia: Current Status and Prebreeding Studies. *Russian Journal of Genetics: applied research* 2:277-285

Mittler, R. 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410

Moura, G.C., Oliveira, J.I., Bonome, L.T.S. & Franzene, G. 2018. *Eugenia uniflora* L.: potential uses as a bioactive plant. *Arq. Inst. Biol.* 85:1-9,

Munari, E.L., Girardelo, J.R., Cechinel, G.G., Soldi, C., Conterato, G., M.M., Benech, J.C. & Winter E. 2021. Potencial antitumoral de extratos de *Eugenia involucrata* DC: uso de produtos regionais para tratar um problema mundial. *UFSC* 1-8.

Nascimento, W.M. 2005. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando a germinação em condições de temperaturas baixas. *Horticultura Brasileira*, Brasília 23:211-214.

Neto, A.L.F., Fonseca, C.E.L., Gomide, C.C.C., & Silva, J.A. 1991. Armazenamento de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 13:55-62.

Niklas K.J. 1997. 'The evolutionary biology of plants.' (University of Chicago Press: Chicago.

Okamoto, J.M. & Joly, C.A. 2000. Ecophysiology and respiratory metabolism during the germination of *Inga sessilis* (Vell.) Mart. (Mimosaceae) seeds subjected to hypoxia and anoxia. *Revista Brasileira de Botânica*, 23: 51-57

Oliveira, C. F., Oliveira, D.C., Parisi, J. J. D. & Barbedo, C. J. 2011. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos, *Revista Brasileira de Sementes* 33:520-532.

Ohse, S. 2022. Sementes Recalcitrantes: Um Apanhado. *Visão Acadêmica*, Curitiba 23:14-48

Pammenter, N.W., Berjak, P., Farrant, J.M., Smith, M.T., & Ross, G. 1994. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? *Seed Science Research*, 4:187-191;

Pammenter, N.W. & Berjak, P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research*. Res 9:13-37.

Pammenter, N.W. & Berjak, P. 2000. Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds. *Plant Species Biology* 15:153-156.

Pammenter, N.W. & Berjak, P. 2014. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. *International Journal of Plant Sciences*. 175:21-28.

Parisi, J.J.D., Biagi, J.D., Barbedo, C.J.; Medina, P.F.; Lamarca, E.D. 2019. Respiratory

Rates of *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC.) T. D. Penn. Seeds Floresta e Ambiente 26:1-10.

Pelissari, F., Pereira, W.V.S., Pereira, T.M., Santos, H.O., Faria, J.M.R., José, A.C. 2022. Effect of PEG and ABA on desiccation tolerance and storage of *Magnolia ovata* (A.St.-Hil.) Spreng. seeds. Journal of Seed Science 44:1-11.

Pepato, M.T., Folgado, V.B.B., Kettelhut, I.C. & Brunetti, I.L. 2001. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Araraquara-SP, 34: 389-395.

Pereira, D. M., Oliveira, K. Árabe R. de, Chantelle, L., Sant'Ana, A. M. da S., Guedes, J. P. de S., Carvalho, C. T. de, Azerêdo, G. A., & Brito, I. de L. 2020a. Caracterização da composição nutricional e do teor de pigmentos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) nas variedades vermelha e roxa / Characterization of nutritional composition and content of pitanga pigments (*Eugenia uniflora* L.) in red and purple varieties. Brazilian Journal of Development, 6:58026–58038

Pereira, L.C.V., Rafaella, C.M, Carolina, R. Z., Anderson C. J & Faria J.M.R. 2020b. Storage of short-lived seeds of *Inga vera* subsp. *affinis* in osmotic medium. Seed Science Research 30:156-160.

Pirola, K. 2013. Caracterização fisiológica e conservação de sementes de oito fruteiras nativas do bioma floresta com araucária. Dissertação de Mestrado Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.

Popinigis, F. 1985. Fisiologia de sementes. Ministério da Agricultura/Agriplan, 2ed. Brasília. DF.

Queiroz, J.M.G., Suzuki, M.C.M., Motta, A.P.R., Nogueira, J.M.R. & Carvalho, E M. 2015. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. Revista Fitos, Rio de Janeiro 9:73-159.

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

Roberts, E.H. & King, M.W. 1980. The characteristics of recalcitrant seeds *in*: "Recalcitrant Crop Seeds", H.F. Chin and E.H. Roberts, eds, Tropical Press SDN.BDH, Kuala Lumpur.

Riaz, A., Hathorn, A., Dinglasan, E., Ziems, L., Richard, C., Singh, D., Mitrofanova, O., Afanasenko, O., Aitken, E., Godwin, I. & Hickey L. 2016. Into the vault of the Vavilov wheats: old diversity for new alleles. *Genet Resour Crop Evol* 64:531–544.

Riehl, S. 2014. Agriculture in the Ancient Near East In: *Encyclopaedia of the History of Science, Technology, and Medicine in Non-Western Cultures* (ed. H. Selin), 1–15.

Ruelland, E. & Zachowski, A. 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 69:225-232

Santos, I. R. 2000. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12:70-84.

Santos, A.F., Parisi, J.J.D., Menten, J.O.M. 2015. *Patologia de Sementes Florestais*. Embrapa Floresta. Colombo, Paraná.

Sarath, G.; Hou, G.; Baird, L. M.; Mitchell, R.B. 2007. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C (4)-grasses. *Planta* 226:697-708.

Sato, T. S.; Medeiros, T. M.; Hoscheid, J.; Prochnau, I. S. 2018. Proposta de formulação contendo extrato de folhas de *Eugenia involucrata* e análise da atividade antimicrobiana. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, 2018; 12(1): 68-82

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

Schmidt, L. 2007. Seed testing. Tropical Forest Seed.

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

Silva, A. & Ferraz, I.D.K. 2015. Armazenamento de sementes. In: F.C.M. Pinã-Rodrigues, M.B. Figliosa; A. Silva. Sementes Florestais: da ecologia à produção. Londrina: ABRATES, pp. 276-307.

Silva, E. C. C. 2015. Secagem e Armazenamento de Sementes de *Eugenia dysenterica* Dc. Sete Lagoas, Minas Gerais. Dissertação de mestrado.

Silva, S. M. 2016. Pitanga. Revista Brasileira de Fruticultura 28:1-159

Silva, H. W., Vale, L. S. R., Silva, C. F., Velasco, M. F., & Monfort, L. H. F. (2019). Qualidade de Sementes de *Eugenia dysenterica* DC. Durante o Armazenamento. Revista Engenharia na Agricultura - REVENG 27:12–21.

Smith, B. D. 1998. The emergence of agriculture_in search of origins. 1 ed. W H Freeman & Co. New York.

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

Svalbard Global Seed Bank. 2023. Disponível em ><https://www.seedvault.no/>

Sun, W.Q., Irving, T.C. & Leopold, A. C. 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. Physiologia Plantarum 90:621-628.

Sun. W.Q., Leopold, A.C. 1997. Cytoplasmic Vitrification and Survival of Anhydrobiotic Organisms. Comp. Biochem. Physiol. 117:327–333

Sun, W. Q. 1997. Glassy State and Seed Storage Stability: The WLF Kinetics of Seed Viability Loss at $T = T_g$ and the Plasticization Effect of Water on Storage Stability, *Annals of Botany* 79:291–297

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M. & Murphy, A. 2017. *Plant Physiology and Development*. 6 ed. Artmed, Porto Alegre.

Toledo, F.F. & Marcos-Filho, J. 1977. Armazenamento das sementes. *In*: Toledo. F.F, Marcos-Filho, J. (ed): *Manual das sementes – Tecnologia da produção*, São Paulo, Ed. Agronômica Ceres. pp. 175-186.

Van Thiegen; Bonnier, G. 1882. Recherches sur la vie latente des graines. *Bulletin de la Société Botanique de France* 29: 25-29.

Vertucci, C.W. 1989. The effects of low water contents on physiological activities of seeds. *Physiologia Plantarum* 77: 172-176

Vertucci, C.W. & Farrant, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In*: G. Galili & J. Kigel (eds.). *Seed development and germination*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 701-746.

Villachica, H., Carvalho, J.E.U., Müller, C.H., Diaz, S., C. & Almanza, M. 1996. *Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia*. Lima: Tratado de Cooperación Amazonica.

Villela, F.A., Doni-filho, L. & Sequeira, E.L. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 26:1957-1968,

Villela, F.A. & Marcos-Filho, J. 1998. Estados energéticos e tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília 20:317-321.

Walters, C., Berjak, P., Pammenter, N., Kennedy, K. & Raven, P. 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science* 339: 915-916.

Wesley-Smith, J., Berjak, P., Pammenter, N., Walters, C. 2014. Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*: An ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. *Annals of Botany* 113:695-709.

Williams R.J. & Leopold A.C. 1989. The glassy state in corn embryos, *Plant Physiol* 89:977-981

Willis, K.J & McElwain, J.C. 2002. *The Evolution of Plants*. Oxford, University Press

Wyse S.V. & Dickie, J.B. 2017. Predicting the global incidence of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology* 105:1082–1093

Wyse S.V., Dickie, J.B & Willis, K.J. 2018. Seed banking not an option for many threatened plants. *Nature Plants* 4:848–850.