INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS – PPG-CFT

ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES RECALCITRANTES DE *Eugenia stipitata* MCVAUGH: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS

GEÂNGELO PETENE CALVI

Manaus, Amazonas
Março, 2015

GEÂNGELO PETENE CALVI

ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES RECALCITRANTES DE *Eugenia stipitata* MCVAUGH: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS

DRA. ISOLDE DOROTHEA KOSSMANN FERRAZ

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Florestas Tropicais, área de concentração em Silvicultura.

Manaus, Amazonas

Março, 2015

Relação da banca julgadora

Dra. Ângela Maria da Silva Mendes
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Manuel de Jesus Vieira Lima Junior
Universidade Federal do Amazonas

Dra. Maria Cristina de Figueiredo e Albuquerque
Universidade Federal do Mato Grosso

Dr. Sidney Alberto do Nascimento Ferreira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dra. Yêda Maria Boaventura Corrêa Arruda
Universidade Federal do Amazonas

C168 Calvi, Geângelo Petene
Armazenamento das sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: aspectos tecnológicos e fisiológicos / Geângelo Petene Calvi. --- Manaus: [s.n.], 2015.
xi, 89p. :il.

Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2015.
Orientadores: Isolde Dorothea Kossmann Ferraz.
Área de concentração: Ciências de Florestas Tropicais.

1. Germinação. 2. Glutationa. 3. Viabilidade. I. Título.

CDD 582.0467

Sinopse:

Estudou-se a fisiologia do estresse de dessecamento e aspectos práticos para o armazenamento úmido das sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh, uma espécie nativa da Amazônia, testando diferentes graus de umidade, temperaturas e a submersão em água corrente.

Palavras-chave: armazenamento de sementes, viabilidade, germinação, glutationa, compostos antioxidantes, sementes florestais, Myrtaceae, araçá-boi, Amazônia

Ao Dr. Rodrigo Neves dos Santos

(in memoriam)...

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Isolde Dorothea Kossmann Ferraz por ter abraçado a causa do meu estudo, sabendo ser um tema de importância e desafiador para a área da tecnologia de sementes. Ela sempre me transmitiu conhecimentos, segurança e tranquilidade para que eu pudesse alcançar todos os objetivos propostos e o total apoio em todas as etapas deste trabalho sem dúvida foi essencial para a finalização do mesmo.

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós-Graduação Ciências de Florestas Tropicais pela oportunidade do doutorado, infraestrutura e todo apoio recebido durante a realização deste curso.

Aos professores doutores Hugh Pritchard e Ilse Kranner e demais colaboradores do Seed Conservation Departament, do Millennium Seed Bank, Royal Botanical Gardens, Kew, da Inglaterra por todo apoio nas análises dos compostos antioxidantes, infraestrutura, discussões e ensinamentos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida por 28 meses e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do todas as atividades de pesquisa deste trabalho através do projeto CT-Amazônia (projeto nº 575889/2008-0) e ao Millennium Seed Bank (RBG-Kew) pelo financiamento das análises dos compostos antioxidantes e hospedagem.

Ao M.Sc. Antônio Mauro Guimarães dos Anjos pela disponibilização dos dados de submersão das sementes de *Eugenia stipitata* para uma reavaliação em conjunto com os dados coletados por mim durante o curso.

À toda equipe do Laboratório de Sementes do INPA que esteve presente durante a execução deste trabalho, em especial ao Raylton dos Santos Pereira que foi de grande importância no acompanhamento da germinação no viveiro, ao Felipe Coelho de Souza Petean e a Mariana Pires Franco, que auxiliaram em parte das atividades de laboratório e, de maneira especial, agradeço a Fabiana Ferraz Aud que me ajudou na coleta de dados do primeiro capítulo e nas análises dos compostos antioxidantes na Inglaterra.

Faço menção também à Dra Denise Santana pelo treinamento concedido nas análises estatísticas e ao Fábio Janoni Carvalho a quem agradeço pelo auxílio nas dúvidas das análises estatísticas e todo apoio nos momentos finais.

Aos meus amigos que apoiaram, diretamente ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, sejam eles do INPA, de Manaus, da área ou não. Estes são tantos que nem ouso listar os nomes para não cometer o erro de esquecer algum, mas sintam-se todos mencionados.

E por fim, porém jamais menos importante, agradeço a minha família, principalmente meus pais (Antônio e Elena) e meu irmão (Deângelys) que sempre me apoiaram em todas as etapas desta caminhada e sem tal apoio esta tese não teria sido terminada...

ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES RECALCITRANTES DE *Eugenia stipitata* MCVAUGH: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS

RESUMO

Eugenia stipitata tem ocorrência natural na Amazônia em áreas próximas a rios e produz frutos com potencial na indústria alimentícia. As sementes são grandes, altamente recalcitrantes e de curta longevidade, dificultando a propagação da espécie. Apresentam um conjunto de características únicas como a falta de diferenciação aparente do eixo embrionário e dos cotilédones e atividade meristemática em toda a semente que permite a germinação após danos físicos. Desta forma, sementes desta espécie foram selecionadas para estudar a fisiologia do estresse de dessecamento e o armazenamento úmido sob várias condições ambientais. Foram testadas a submersão em água ou o armazenamento em ambientes que permitissem a troca gasosa, determinando o limite de tolerância à dessecação e refrigeração, visando elaborar recomendações para produtores de sementes e de mudas da Amazônia. No primeiro capítulo as sementes de *E. stipitata* foram sugeridas como modelo para estudos fisiológicos com sementes recalcitrantes. A totipotência das sementes foi mostrada pela germinação de todas as frações/secções, quando cortada em quatro frações. Devido a esta característica e ao tamanho grande das sementes, vários estudos podem ser feitos com uma única semente. Baseada nesta possibilidade foi determinada com a mesma semente o teor de água (método de estufa) , os compostos antioxidantes do grupo tióis de baixo peso molecular e avaliada a viabilidade pela coloração com tetrazólio. Os resultados de viabilidade foram confirmados com testes de germinação. Os resultados permitiram uma distinção clara entre sementes viáveis e não viáveis. No segundo capítulo foi testado o armazenamento das sementes de *E. stipitata*, por até um ano, em diferentes condições de umidade e temperaturas. Sementes recém-beneficiadas com teor de água (TA) de 60% foram mantidas durante um ano em quatro condições de umidade à 25 ºC em sacos de plástico contendo vermiculita. Em outro experimento, as sementes foram misturadas em vermiculita com TA inicial de 23% e armazenadas por até um ano a 5, 10, 15, 20 e 25 ºC. A germinabilidade foi mantida após o armazenamento das sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* em sacos de plástico com vermiculita úmida (TA >25%) e temperaturas entre 10 e 15 ºC. O armazenamento das sementes 25 ºC com vermiculita umedecida na proporção de dois gramas de água por cada grama de vermiculita, manteve a viabilidade alta (92,5% após 12 meses) porém muitas sementes iniciarão o processo de germinação durante o armazenamento, a partir do terceiro mês. A possibilidade da submersão das sementes em água corrente como um método alternativo para o armazenamento foi discutido no Capítulo 3. Foram comparados dois métodos de submersão à 25 ºC, que diferiam na altura da coluna d'água (6 e 26 cm). Uma mangueira manteve o fluxo de água constante (0,01 $L.seg^{-1}$) durante todo o armazenamento. As sementes sobreviveram à submersão em água corrente, independente da altura da coluna d'água. O estresse causado pela submersão foi observado durante os primeiros 30 dias, com a redução na velocidade de germinação. Em seguida, as sementes se adequaram ao ambiente e iniciaram a germinação mesmo estando submersas. Sementes de *E. stipitata* são capazes de regenerar e formar plântulas normais, mesmo após a remoção total da raiz e da parte aérea. A submersão em água corrente pode ser recomendada para o armazenamento das sementes, pois a viabilidade foi mantida por até um ano. Entretanto, as sementes iniciaram a germinação a partir de dois meses de submersão. Em termos práticos, os resultados apresentados nesta tese mostraram diferentes possibilidades de armazenamento das sementes altamente recalcitrantes de *E. stipitata*, por até um ano. Os métodos de armazenamento podem ser também úteis para outras espécies com sementes recalcitrantes. As recomendações para o armazenamento das sementes de *E. stipitata* são de fácil execução e baixos custos, podendo ser transferidos diretamente aos produtores de sementes e de mudas da Amazônia.

RECALCITRANT SEED STORAGE OF *Eugenia stipitata* McVaugh: TECHNOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS

ABSTRACT

Eugenia stipitata is occurring in the Amazonian region in areas near to rivers and produces fruits with great potential for the food industry. The seeds are large, highly recalcitrant and have short longevity, making the propagation of the species difficult. They have a unique set of characteristics such as the apparent lack of differentiation of the embryonic axis and the cotyledons, and meristematic activity in the whole seed which allows germination even after injuries. Thus, seeds of this species were selected to study desiccation stress and moist seed storage under different environmental conditions. Moist storage possibilities were tested by submersion of the seeds in water or maintenance in conditions that allow gas exchange, to appoint the limits of desiccation tolerance and cooling, in order to make recommendations for local seed and seedling producers. In the first chapter *E. stipitata* seeds were suggested as a model species for studies on recalcitrant seed physiology. Seed totipotency was shown by the germination of all fractions, when the seed was cut in four parts. Due to this feature and large seed size , several studies can be done with a single seed. Using this possibility, the same seed was used for the determination of moisture content (oven method), antioxidant compounds of low molecular weight (thiols) and viability by tetrazolium staining . The viability results were confirmed with the germination tests. The results permitted a clear distinction between viable and non-viable seeds. In the second chapter seed storage in different humidity and temperatures conditions for up to one year was studied. After fruit extraction, seeds with moisture content (MC) of 60% were maintained during one year in four moisture conditions at 25 ° C in plastic bags containing vermiculite. In another experiment, the seeds were mixed with vermiculite with 23% of initial MC and stored for up to one year at 5, 10, 15, 20 and 25 ° C. Germinability was maintained after seed storage of *Eugenia stipitata* in plastic bags with moist vermiculite (MC > 25%) at temperatures between 10 and 15 ° C. Seed storage at 25 ° C with moistened vermiculite in the proportion of two grams of water per gram of vermiculite, maintained viability at 92,5% during 12 months, but seed germination during storage was observed after three months. The possibility of seed submersion in running water as an alternative storage method is discussed in Chapter 3. Two methods of submersion at 25 ° C, which differed in height of the water column (6 and 26 cm) were compared. A constant flow of water (0.01 L.seg-1) was kept during the storage. The seeds survived submersion in water, independently of the height of the water column. A stress of submersion was observed during the first 30 days, which caused a reduction of germination speed. Afterwards, the seeds adapted to the environment and initiated germination even when submerged. *E. stipitata* seeds are able to regenerate and form normal seedlings, even after complete removal of the root and the shoot. Seed submersion in running water can be recommended for seed storage, as no loss of viability was observed for up to one year. However the seeds start to germinate after two months of submersion. In practical terms, the results presented in this thesis showed different storage possibilities for the highly recalcitrant seeds of *E. stipitata,* for up to a year. The storage methods may be useful also for other species with recalcitrant seeds. The storage recommendations for E. stipitata seeds are easy to perform, with low costs and can be applied by seed and seedlings producers of the Amazonian region.

SUMÁRIO

Lista de Figuras ____ x
1. INTRODUÇÃO ____ 1
1.1. Classificação das sementes para fins de armazenamento ____ 1
1.2. Tolerância ao dessecamento em sementes ____ 3
1.3. Desafios para o armazenamento das sementes recalcitrantes ____ 5
1.4. Contextualização e apresentação dos capítulos ____ 8
2. OBJETIVOS ____ 10
2.1. Objetivo geral ____ 10
2.2. Objetivos específicos ____ 10
CAPÍTULO 1 - Totipotent germination and stress biology of recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh: a model species for desiccation sensitivity studies ____ 12
Abstract ____ 12
Introduction ____ 13
Material and Methods ____ 14
Seed collection and processing ____ 14
Germination of seed parts ____ 14
Single seed viability analysis during desiccation stress and storage ____ 15
Viability staining and sample preparation for the analyses of low-molecular-weight thiols ____ 15
HPLC analysis of thiols and disulphides ____ 16
Germination of whole seeds ____ 17
Data analysis ____ 17
Results ____ 17
Germination of seed sections ____ 17
Use of a single seed for viability analyses in response to desiccation stress and storage ____ 18
Discussion ____ 19
Use of a single seed for several seed quality tests ____ 21
Summary and conclusions ____ 22
References ____ 23
CAPÍTULO 2 - Armazenamento de sementes de *Eugenia stipitata* em diferentes temperaturas e umidade ____ 35
RESUMO ____ 35
INTRODUÇÃO ____ 36
MATERIAL E MÉTODOS ____ 38
Coleta e beneficiamento das sementes ____ 38
Armazenamento das sementes ____ 38
Viabilidade e determinação do teor de água das sementes ____ 39

Testes de germinação 39
Delineamento experimental e análise dos dados 40
RESULTADOS 40
Armazenamento em diferentes condições de umidade 40
Armazenamento em diferentes temperaturas 41
DISCUSSÃO 43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47
CAPÍTULO 3 - Submersão de sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: a ecologia apoiando a tecnologia de sementes 60
RESUMO 60
INTRODUÇÃO 61
MATERIAL E MÉTODOS 62
Coleta e beneficiamento das sementes 62
Armazenamento das sementes 62
Teste de germinação 63
Teste de viabilidade e determinação do teor de água das sementes 64
Capacidade de uma segunda germinação das sementes após a remoção das plântulas 64
Delineamento experimental e análise dos resultados 65
RESULTADOS 65
Capacidade de uma segunda germinação das sementes após a remoção das plântulas 66
DISCUSSÃO 66
Considerações finais 70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71
3. SÍNTESE 80
4. RFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

LISTA DE FIGURAS

Figure 1.1. Viability staining of *Eugenia stipitata* seeds.(A) Viable (B and C) partially stained and (D) dead seeds after staining with 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride solution for 24 h at 30 ºC in the dark. Dark purple staining indicates high cell viabiliy and no staining indicates dead tissue 29

Figure 1.2. Root and shoot development of *Eugenia stipitata* seed sections after cutting (A) longitudinally and (B) transversally. Scale bar = 0.5 cm. 30

Figure 1.3. Concentrations of GSH (white bars), GSSG (black bars) and $E_{GSSG/2GSH}$ (black triangles) of *Eugenia stipitata* seeds after storage for 15 (A) or 30 (B) days submerged in running water (SUB) or at different environmental moisture contents (MC) compared to control seeds (CON - sown immediately after harvest). Different letters denote significant differences in total glutathione concentration by Tukey's test (P < 0.05). Stars indicate differences in total glutathione (GSH+GSSG) between 15 and 30 days by Tukey's test (P<0.05).Data are means of five replicates of 20 seeds. 31

Figure 1.4. Concentrations of cysteine (white bars), cystine (black bars) and $E_{CySS/CYS}$ (black triangles) of *Eugenia stipitata* seeds after stress exposure for 15 (A) or 30 (B) days submerged in running water (SUB) or at different environmental moisture contents (MC) compared to control seeds (CON- sown immediately after harvest). Different letters denote significant differences in total glutathione concentration by Tukey's test (P < 0.05). Stars indicate differences in total cyst(e)ine(CYS + CySS) between 15 and 30 days by Tukey's test (P<0.05).Data are means of five replicates of 20 seeds. 32

Figure 1.5. Half-cell reduction potential of the glutathione/glutathione disulphide redox couple ($E_{GSSG/2GSH)}$ plotted against %GSSG (A) and half-cell reduction potential of the cysteine/cystine redox couple ($E_{CYSS/2CYS}$) plotted against %CYSS (B) of *Eugenia stipitata* seeds sorted according to TZ staining into viable (black circles: completely stained), partially stained (grey circles: some unstained areas) and dead (white circles: not stained). Data represent individual replicates. 33

Figura 2.1. Padrões de coloração das sementes de Eugenia stipitata pela solução de cloreto de tetrazólio a 1% de 2,3,5-trifenil durante 24 h a 30 ºC no escuro. (A) sementes viáveis completamente coradas, (B e C) sementes parcialmente coradas e (D) sementes mortas não coradas. Áreas coradas em roxo escuro indicam alta viabilidade celular e a falta de coloração indica a morte do tecido. 52

Figura 2.2. Porcentagem de germinação final (círculos fechados), viabilidade (círculos abertos) e teor de água (TA), expresso na base úmida, da vermiculita (x) e das sementes (triângulos fechados) de *Eugenia stipitata* armazenadas a 25 ºC em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 70% (V-$TA_{70\%}$), 40% (V-$TA_{40\%}$) ou 23%(V-$TA_{23\%}$) ao longo de um ano. Dados representam médias e desvio padrão. Asteriscos representam diferenças entre a porcentagem de germinação final e viabilidade pelo teste t (P<0.05).....53

Figura 2.3. Viabilidade aferida pela coloração com tetrazólio para as sementes *Eugenia stipitata* armazenadas a 25 ºC em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 70% (V-$TA_{70\%}$), 40% (V-$TA_{40\%}$) ou 23% (V-$TA_{23\%}$) ao longo de um ano. Sementes coloridas pelo tetrazólio (viáveis) estão representadas em verde escuro; as sementes parcialmente coloridas em amarelo e as não coloridas (mortas) em vermelho. Sementes germinadas durante o armazenamento estão indicadas em verde claro. Dados representam médias de cinco repetições de 20 sementes. Asteriscos representam percentual de sementes viáveis diferentes do controle pelo teste de Dunnett a 0.05 de significância. 54

Figura 2.4. Porcentagem de germinação final (círculos fechados), viabilidade (círculos abertos) e teor de água (TA), expresso na base úmida, da vermiculita (x) e das sementes

(triângulos fechados) de *Eugenia stipitata* armazenadas em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 40% (V-$TA_{40\%}$) a 10, 15, 20 ou 25 ºC ao longo de um ano. Dados representam médias e desvio padrão. Asteriscos representam diferenças entre a porcentagem de germinação final e viabilidade pelo teste t (P<0.05). 55

Figura 2.5. Resultados do teste de viabilidade pela coloração com tetrazólio para as sementes *Eugenia stipitata* armazenadas em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 40% (V-$TA_{40\%}$) a 5, 10, 15, 20 ou 25 ºC ao longo de um ano. Sementes coloridas pelo tetrazólio (viáveis) estão representadas em verde escuro; as sementes parcialmente coloridas em amarelo e as não coloridas (mortas) em vermelho. Sementes germinadas durante o armazenamento estão indicadas em verde claro. Dados representam médias de cinco repetições de 20 sementes. Asteriscos representam percentual de sementes viáveis diferentes do controle pelo teste de Dunnett a 0.05 de significância. 56

Figura 2.6. Teor de água das sementes de *Eugenia stipitata* armazenadas em diferentes condições de umidade e temperatura agrupadas de acordo com o teste de viabilidade pela coloração com tetrazólio em sementes completamente coradas e germinadas durante o armazenamento (n=343) ou não germinadas (n=1356), sementes parcialmente coradas e não germinadas (n=219) e sementes não coradas e mortas (n=501). A linha pontilhada representa o valor médio da amostra e os símbolos "x" representam os valores no 5º e no 95º percentil dentro de cada categoria. 57

Figura 2.7. Relação do teor de água (TA) da vermiculita utilizada para o armazenamento das sementes de *Eugenia stipitata* e o TA das sementes em equilíbrio. As sementes foram armazenadas em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água próximo a 70% (V-$TA_{70\%}$; círculos fechados), ou a um teor de água em torno de 40% e acondicionada a 10 ºC (losangos fechados), a 15 ºC (quadrados abertos), a 20 ºC (quadrados fechados) ou a 25 ºC (triângulos abertos) ou sem a adição de água (V-$TA_{23\%}$; triângulos fechados). Cada símbolo representam médias de quatro repetições de 20 sementes. Linha representa o modelo sigmoidal (y=9,73+49,48/(1+exp(-(x-0,104)/3,61))^108,94) com R^2 de 98,5%. 58

Figura 3.1. Esquema do método de submersão das sementes de *Eugenia stipitata* realizado para o Lote 1 (A) e o Lote 2 (B). 75

Figura 3.2. Padrão de coloração das sementes viáveis e mortas de *Eugenia stipitata* após 24 horas em solução de 1% de tetrazólio, a 30 ºC no escuro. 76

Figura 3.3. Germinação final em viveiro dez meses após a semeadura (barras) das sementes de *Eugenia stipitata* do Lote 1 (A) e Lote 2 (B) após o armazenamento pela submersão em água corrente em diferentes profundidades e períodos. Triângulos fechados (-▲-) representam porcentagem de sementes germinadas durante a submersão. Círculos fechados (-●-) representam a viabilidade das sementes do Lote 2 após os diferentes períodos de submersão pelo teste de tetrazólio. Médias seguidas por letras distintas, minúsculas para a porcentagem final de germinação de cada lote e maiúsculas para dados de viabilidade, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. Valores representam médias e desvio padrão. 77

Figura 3.4. Plântula de *Eugenia stipitata* com desenvolvimento normal em viveiro (A) e plântula desenvolvida abaixo da superfície da água (B). 78

Figura 3.5. Tempo médio de germinação (TMG) das sementes de *Eugenia stipitata* do Lote 1 (círculos) e Lote 2 (triângulos) após à submersão em água corrente por diferentes períodos. Médias seguidas por letras distintas, minúsculas para o Lote 1 e maiúsculas para o Lote 2, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0.05 de significância. Valores representam médias e desvio padrão. 79

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores gargalos para atender as demandas para a produção comercial de diversos produtos florestais e para a restauração e recuperação de ecossistemas é a indisponibilidade, em quantidade suficiente, de sementes de espécies florestais nativas no Brasil. Das 788 espécies de interesse econômico na Amazônia Ocidental, apenas 24% (n=187) foram listadas pelos produtores de sementes da Região cadastrados no RENASEM - Registro Nacional de Sementes e de Mudas (Calvi e Ferraz, 2014). E estes números, segundo os autores, devem ser superestimados, pois nem todas as espécies relacionadas no ato da inscrição dos produtores no RENASEM são, de fato, produzidas.

A reduzida oferta de sementes no mercado pode ser apenas um reflexo da falta de conhecimentos básicos sobre a produção e o manejo adequado da maioria das sementes nativas (Ferraz, 1991; Baskin e Baskin, 1998; Gonçalves *et al.*, 2004), o que, por sua vez, causa a perda de muito material coletado. Uma série de estudos sobre essa temática foi executada ou está em andamento, porém o conhecimento atual é muito escasso frente à alta biodiversidade amazônica e as informações existentes se encontram dispersas ou em publicações de difícil "acesso". Dentre as informações prioritárias sobre as sementes, a classificação para fins de armazenamento é uma das mais importantes, uma vez que, com base nesse conhecimento, o manejo correto das sementes pós-colheita será direcionado para caminhos distintos.

1.1. Classificação das sementes para fins de armazenamento

A classificação das sementes em ortodoxas e recalcitrantes foi criada por Roberts (1973). Ortodoxas foram chamadas as sementes que mantiveram a viabilidade, em uma forma matematicamente previsível, sob condições controladas de umidade e de temperatura. De maneira geral, esta equação mostra que, a viabilidade das sementes pode ser duplicada quando se reduz 1% do teor de água da semente (válido para teores de água entre 3 e 15 %) ou 5°C do ambiente de armazenamento (Ellis e Roberts, 1980). Sementes recalcitrantes, ao contrário, não se enquadraram na equação de longevidade. Uma das características marcantes, que distingue as ortodoxas das recalcitrantes, é a tolerância ao dessecamento. A capacidade das sementes ortodoxas de sobreviver à redução do teor de água (TA) intracelular até valores de 3 a 15% é o pré-requisito para manter os recursos genéticos por centenas (Daws *et al.*, 2007) ou até milhões de anos (Shenmiller *et al.*, 1995). Ao contrário, as sementes recalcitrantes

necessitam manter o metabolismo ativo e perdem a viabilidade quando secas, não tolerando, desta forma, o congelamento ou mesmo temperaturas positivas abaixo de 10 ºC. Portanto, as condições que prolongam a viabilidade das ortodoxas (mais seco e mais frio) são exatamente as condições que reduzem a viabilidade das recalcitrantes. Uma classe "intermediária" de sementes foi proposta por Ellis *et al*. (1990). Dependendo da espécie, as sementes podem ser secas a níveis de umidade entre 10 e 15%, sem perder a viabilidade, mas podem sofrer danos fisiológicos, se submetidas à secagem a valores inferiores àqueles e não toleram o congelamento por longos períodos.

Os conceitos de semente ortodoxa, intermediária e recalcitrante, que possuíam uma abordagem qualitativa, passaram a ter um enfoque mais quantitativo (Walters, 2000). Levando em consideração o nível de tolerância ao dessecamento, as sementes recalcitrantes podem ser ordenadas ao longo de um gradiente no qual tem-se, em um extremo, as sementes altamente sensíveis ao dessecamento e, no outro extremo tem-se as sementes intermediárias, que toleram certa secagem (Berjak e Pammenter, 2000). Para estas sementes "intermediárias", a denominação sub-ortodoxas foi sugerida anteriormente por Bonner (1990).

Assim, o conhecimento se uma semente é ortodoxa ou recalcitrante torna-se uma ferramenta primordial para o manejo das sementes desde a coleta até a comercialização e armazenamento a curto ou longo prazo. Porém, frente à alta diversidade biológica da região amazônica, poucas sementes foram classificadas com base na tolerância ao dessecamento. Em um levantamento sobre o conhecimento das espécies ocorrentes na Reserva Florestal Ducke, verificou-se que 2.114 espécies ocorrentes, somente 1,9% tiveram suas sementes classificadas quanto ao comportamento para fins de armazenamento (Corrêa *et al*., 1999). Durante a última década, foram publicados vários trabalhos com esse objetivo, por exemplo, Carvalho *et al.*, 2001; Vozzo, 2002; Carvalho *et al.*, 2006, 2008; José *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007). Porém, mesmo com todos os esforços, o número de espécies classificadas ainda é pequeno, como mostra o levantamento sobre 788 espécies de interesse econômico na Amazônia Ocidental realizado por Calvi e Ferraz (2014). Os autores observaram que as sementes de apenas 44% dessas espécies foram classificadas para fins de armazenamento.

Além do reduzido número de espécies com sementes classificadas para fins de armazenamento, outra dificuldade é encontrada quando se trabalha com espécies florestais tropicais. Nesses ambientes, o número de sementes recalcitrantes, ou seja, de difícil manejo, é elevado. Avaliando áreas de florestas tropicais, Tweedle *et al*. (2003) observaram 48% das espécies com sementes recalcitrantes. Na região de Manaus, das 60 espécies de interesse

madeireiro, 62% apresentaram sementes de difícil armazenamento (Ferraz *et al.*, 2004a). Considerando a Amazônia Ocidental, das 788 espécies levantadas por Calvi e Ferraz (2014), as sementes de difícil manejo representaram entre 11 e 35%, valor este bem similar às com sementes tolerantes ao dessecamento (entre 12 e 37%). Os autores mostraram ainda que, mesmo dentro das categorias de uso das espécies (madeireira, cosméticos, ornamental, etc.) não houve maior diferença na classificação e, mesmo para as espécies de maior valor econômico da Região, como o *Aniba rosaeodora*, *Carapa* sp., *Copaifera* sp., entre outras, não há conhecimentos sobre a maturação e/ou protocolos de armazenamento das sementes.

1.2. Tolerância ao dessecamento em sementes

A tolerância ao dessecamento é adquirida ainda durante o desenvolvimento das sementes, que, de acordo com Castro *et al.* (2004), ocorre em três fases distintas: a primeira é a embriogênese. Nesta fase, há intensa divisão celular e rápido aumento no peso fresco e no teor de água das sementes. A próxima fase é marcada pela expansão das células e a deposição das reservas. Durante esta fase, os vacúolos diminuem de tamanho à medida que os compostos de reserva se acumulam com consequente aumento da massa seca. No final do desenvolvimento, as sementes tolerantes ao dessecamento entram em dormência e passam por uma fase de secagem, com perda de água e diminuição do peso fresco (Bewley e Black, 1994), o que lhes garante a tolerância ao dessecamento. Porém, esta tolerância é perdida quando se inicia a germinação, geralmente após a protrusão da raiz (Castro e Hilhorst, 2004).

Já as sementes sensíveis ao dessecamento não passam por esta fase de secagem ao final da maturação, sendo dispersas da planta mãe com teor de água alto, em geral, em torno de 60 a 70% de seu peso fresco e com o metabolismo ativo (Castro e Hilhorst, 2004). Tais sementes se apresentam como sensíveis ao dessecamento, pois perdem a viabilidade a teores de água inferiores a um nível critico mínimo, que varia com a espécie, devendo ser armazenadas com teores de água relativamente altos (Bewley e Black, 1994).

Baseado em propriedades calorimétricas, cinco níveis de hidratação foram identificados em sementes (Vertucci 1990). Cada um destes níveis apresenta propriedades físicas diferenciadas e está relacionado com o estado metabólico das sementes. No nível mais elevado de água (nível V que corresponde a um conteúdo de água maior que 0,55 $g.g^{-1}$), as sementes estão plenamente hidratadas, apresentam metabolismo em pleno funcionamento e podem germinar. No nível IV (0,35-0,55 $g.g^{-1}$) é possível que haja síntese de proteínas e de ácidos nucleicos, além da respiração, porém é provável que, neste nível, não haja água suficiente para o crescimento celular e germinação. O nível III (0,24-0,35 $g.g^{-1}$) impossibilita

a síntese de proteínas, porém ainda permite a respiração. Nos níveis de hidratação ainda mais baixos, apenas eventos catabólicos podem ocorrer, desde que as sementes sejam tolerantes a estes níveis de dessecamento (<0,24 $g.g^{-1}$) (Vertucci 1990).

O entendimento sobre a tolerância ao dessecamento foi aprofundado consideravelmente nas últimas décadas. Uma gama de mecanismos tem sido atribuída à aquisição da tolerância ao dessecamento em sementes ortodoxas, incluindo: *a)*"vitrificação", mecanismo proporcionado pela acumulação de açúcares não-redutores para manter o espaçamento entre e intra as macromoléculas, evitando uma aglomeração desordenada e o colapso de células, além de proteínas tipo LEA (*Late Embryonic Abundant Proteins*); *b)* redução no grau de vacuolização; *c)*possibilidade de eliminar substâncias com radicais livres por antioxidantes, como glutationa, ascorbato, tocoferol e enzimas específicas, e *d)* presença e operação de mecanismos de reparo durante a reidratação das sementes (Pammenter e Berjak, 1999;Kranner e Birtic, 2005; Faria, 2006).

Ao contrário, nas sementes recalcitrantes, a retirada da água ocasiona mudanças no pH intracelular e nas forças iônicas no citoplasma e estimulam a formação de ROS (*Reactive Oxygen Species* – espécies com oxigênio reativo) que tem efeitos potencialmente deletérios, pois muitas reações bioquímicas são executadas somente em uma estreita faixa de pH (Kranner e Birtic, 2005, Kranner *et al.*,2010, Roach *et al.*, 2010). A retirada da água também altera elementos responsáveis pela estrutura celular, especialmente as membranas, o que pode causar a perda da integridade celular e, consequentemente, o seu colapso (Kranner e Birtic, 2005).

Desta forma, nas sementes sensíveis ao dessecamento, a falta e/ou falha dos mecanismos de proteção após a retirada da água (normalmente no nível IV e/ou V) resultará em danos irreversíveis na estrutura celular ou a incapacidade de 'reviver' mesmo que o conteúdo de água tenha sido reestabelecido (Walters *et al.*, 2002). A extensão desses danos depende de diversos fatores, entre eles, a maturidade na colheita, histórico pós-colheita, velocidade de secagem, a capacidade de manutenção da atividade metabólica quando dessecadas e a existência e ativação dos mecanismos de proteção (Tompsett e Pritchard,1998; Pammenter e Berjak, 1999). Neste sentido é difícil medir a tolerância à dessecação das sementes de uma espécie, uma vez que se faz necessário analisar esta série de mecanismos programados para enfrentar as discretas (ou drásticas) mudanças que o dessecamento provoca às sementes (Walters, 2000). A utilização do conceito do contínuo de tolerância ao dessecamento das sementes foi considerada mais realista que a tentativa de classificação das

sementes de acordo com as respostas aos níveis de hidratação (Pammenter e Berjak, 1999). Neste sentido, em um extremo do gradiente encontram-se as sementes ortodoxas que toleram a secagem a níveis muito baixos (< 0,08 $g.g^{-1}$) e, no outro extremo, é possível agrupar as sementes altamente recalcitrantes que apresentam sinais de estresse e perda de viabilidade após pequena redução no teor de água.

1.3. Desafios para o armazenamento das sementes recalcitrantes

Embora os mecanismos que conferem a tolerância ao dessecamento sejam de grande interesse científico, em termos práticos, a longevidade limitada das sementes recalcitrantes é o fator mais importante no armazenamento destas sementes. As causas da perda de viabilidade de sementes recalcitrantes quando armazenadas úmidas é desconhecida, mas os resultados apresentados na revisão realizada por Berjak e Pammenter (2013) sugerem que se trata de uma consequência do metabolismo germinativo, uma vez que, plenamente hidratadas, as sementes irão germinar e, este armazenamento úmido se torna uma opção estritamente de curto prazo (Berjak e Pammenter, 2008).

Nenhuma relação entre a sensibilidade à dessecação (embora, conforme já discutido, isso seja difícil de quantificar) e longevidade das sementes parece existir. Pensa-se que ambos os fenômenos são uma consequência da atividade metabólica, mas a sensibilidade ao dessecamento pode ser amenizada por meio de mecanismos de proteção, que por sua vez, nem sempre afetam a longevidade no armazenamento (Pammenter e Berjak, 1999). Embora a relação (ou falta dela) entre sensibilidade ao dessecamento e vida útil de armazenamento não foi adequadamente explicada, na prática há alguns resultados encorajadores em prolongar a vida útil de armazenamento de algumas sementes recalcitrantes.

Para a maioria das espécies, é no momento da dispersão que as sementes apresentam sua máxima maturidade fisiológica, e com isso, seu vigor máximo (Marcos Filho, 2005). Após esse período, a qualidade fisiológica das sementes se reduz, iniciando o processo de deterioração, que envolve uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas e que, eventualmente, causam a morte das sementes. Dentre as principais alterações que ocorrem durante o processo de deterioração das sementes estão o esgotamento das reservas, alteração da composição química, como a oxidação de lipídios e a quebra parcial de proteínas, alteração nas membranas celulares com redução da integridade, aumento da permeabilidade e desorganização (Villela e Peres, 2004). Desta forma, a redução na velocidade de germinação das sementes e no desenvolvimento das plântulas e o aumento da susceptibilidade às condições adversas são indícios do processo de deterioração das sementes, sendo algumas das

causas da redução do potencial de armazenamento. A consequência final do processo será a perda da germinabilidade (Popinigis, 1977). As alterações degenerativas são progressivas e a velocidade do processo é determinada por fatores genéticos (intrínsecos à espécie), bióticos (insetos e microorganismos) e abióticos (as condições do ambiente, no qual, a umidade relativa e a temperatura são consideradas as mais importantes) (Villela e Peres, 2004). Uma vez que a qualidade das sementes não pode ser melhorada após a coleta, devido à genética e ao estágio de maturidade das sementes, a forma mais adequada para reduzir a velocidade de deterioração das sementes é evitar (ou minimizar) a contaminação por fatores bióticos e controlar as condições do ambiente de armazenamento (Popinigis, 1985).

Como afirmado anteriormente, para as sementes tolerantes ao dessecamento, o armazenamento pelos métodos convencionais (baixa umidade e baixa temperatura) pode ser realizado por longo período com pouca perda na qualidade das sementes. Porém, para as sementes sensíveis ao dessecamento, a manutenção da viabilidade está vinculada à permanência do metabolismo ativo. Esta característica peculiar das sementes sensíveis ao dessecamento faz com que a temperatura e umidade para o armazenamento devam ser mantidas em níveis mais elevados, condições estas propícias ao desenvolvimento de microorganismos, de insetos e da germinação durante o armazenamento (Harrington, 1972; King e Roberts, 1979).

Por estas razões, as sementes sensíveis ao dessecamento precisam ser armazenadas mantendo-se o fornecimento de água suficiente para evitar sua desidratação abaixo do teor de água crítico (Bewley e Black, 1994) e com metabolismo ativo, que normalmente é atingido mantendo a temperatura e umidade do ambiente de armazenamento mais elevadas que os convencionalmente utilizados para sementes tolerantes ao dessecamento. De maneira geral, temperaturas entre 7 e 17°C têm sido reportadas como apropriadas para armazenar sementes recalcitrantes de florestas tropicais (Hong e Ellis, 2002). Êxito no armazenamento em temperaturas próximas a estas foi reportado para algumas espécies como cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC; 8 ºC; Maluf *et al.*,2003 ou 12 ºC; Santana, 2007), grumixameira (*Eugenia brasiliensis* LAM; 7 ºC; Kohama *et al.*, 2006), uvaia (*Eugenia pyriformis*) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.*;* 12 ºC; Santana, 2007), araucária (*Araucaria angustifolia* Bert. O. Kuntze; 0 ou 10 ºC; Chaves *et al.*, 1999) e andiroba (*Carapa guianensis;* 12 e 14 ºC; Vianna, 1982).

Em termos de umidade, as metodologias empregadas para a manutenção da viabilidade das sementes sensíveis ao dessecamento são bem variadas, por exemplo, o

armazenamento das sementes em areia úmida (Kainer *et al.*, 1999), em vermiculita úmida (Camargo e Ferraz, 2004), submersas em água (presente trabalho), em carvão vegetal (Bewley e Black, 1994), utilizando substâncias osmoreguladoras, como polietileno glicol -PEG (Rossetto *et al.*, 2002) ou inibidores de germinação, como ácido abscísico -ABA (Goldbach, 1979). Porém, baseado no gradiente de tolerância ao dessecamento apresentado pelas sementes recalcitrantes (Berjak e Pammenter, 2000), é esperado que as sementes de cada espécie respondam mais favoravelmente a um ou outro método de armazenamento.

Mesmo nos limites mais baixos de temperatura e umidade, as condições de armazenamento permitem, geralmente, a germinação de algumas sementes durante o armazenamento. Esta germinação pode representar perdas significativas (King e Roberts, 1979). A presença de quaisquer tipos de dormência ou técnicas que reduzam o metabolismo germinativo das sementes pode promover o retardamento da germinação durante o armazenamento e, com isso, aumentar a longevidade das sementes. Desta forma, foi escolhida a espécie *Eugenia stipitata* McVaugh para a realização deste trabalho. A escolha foi baseada no interesse econômico da espécie para a região amazônica e nas características morfofisiológicas das sementes; são sensíveis ao dessecamento, com germinação prolongada devido à dormência mecânica imposta pelo tegumento fibroso e por apresentar características morfológicas peculiares (não há distinção entre o eixo embrionário e as reservas) o que facilita as avaliações e a obtenção de material embrionário. Maiores detalhes sobre a espécie são descritos a seguir.

Eugenia stipitata McVaugh (Myrtaceae) é também conhecida como araçá-boi. Possui porte arbustivo atingindo até quatro metros de altura e ocorre na região da Amazônia Ocidental (Clement, 1989). A espécie foi encontrada na região do alto rio Huallaga (San Martín, Peru), na confluência dos rios Beni e Madre de Díos (Beni, Bolívia), Villavicencio (Meta, Colombia) e no rio Envira (Amazonas, Brasil; McVaugh, 1956, 1958). É uma espécie pouco exigente a fertilidade do solo e adaptada a regiões com precipitação anual entre 1500 a 4000 mm (Villachica *et al.*, 1996). No Peru, a região de maior diversidade de araçá-boi silvestre são as áreas de selva baixa (Pinedo *et al.*, 1981).

Esta espécie produz flores e frutos de forma contínua durante o ano, com maior produção de frutos na estação chuvosa (Acevedo *et al.*, 1996). Seus frutos possuem alto valor nutritivo, são ricos em vitamina C(17.8 mmol g^{-1}, Hernández *et al.*,2007) e podem ser consumidos na forma de suco, geléias e sorvete e apresentam grande potencial econômico para a indústria local de processamento de polpa (FAO, 1987). O fruto é do tipo baga e

contém até 22 sementes (McVaugh, 1958; Ferreira, 1992; Gentil e Ferreira, 1999). As sementes maduras medem entre 0,6 e 2,8 cm (Ferreira, 1992; Anjos e Ferraz, 1999), não possuem endosperma (Flores e Rivera, 1989) e não há diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones (McVaugh, 1958). Suas sementes são classificadas como sensíveis ao dessecamento, perdendo a viabilidade com teores de água abaixo de 26% (Gentil e Ferreira, 1999). Após 10 dias sob condições de clima temperado subtropical sem embalagem, as sementes de *E. stipitata* perdem a capacidade de germinação (Pinedo *et al.*, 1981). A germinação das sementes leva mais que quatro meses e pode ser reduzida para dois meses removendo o tegumento fibroso que envolve as sementes e causa restrição mecânica à expansão do embrião (Anjos, 1998; Gentil e Ferreira, 1999). A possibilidade de que o embrião seja disperso ainda imaturo também foi sugerida (Anjos e Ferraz, 1999). O embrião é totipotente, possui potencial meristemático e pode germinar mesmo quando cortado em duas metades (Anjos e Ferraz, 1999; Mendes e Mendonça, 2012).

Devido à característica recalcitrante das sementes de *E. stipitata*¸ seu armazenamento em longo prazo é difícil. Pinedo *et al.* (1981) testaram, entre outros tratamentos, o armazenamento das sementes de *E. stipitata* por até 40 dias submersas em água à temperatura ambiente e sob refrigeração. Em ambas as condições, a germinabilidade foi reduzida para valores inferiores a 37%. A deterioração das sementes na água parada pode ter sido um dos fatores responsáveis pela redução da germinabilidade das sementes submersas. A lixiviação das sementes em água corrente por até 90 dias como tratamento pré-germinativo também provocou a redução da germinabilidade após 50 dias devido à deterioração das sementes **(**Mendes e Mendonça, 2012). Porém, os autores relataram que algumas sementes foram capazes de germinar durante a submersão, mostrando uma adaptabilidade potencial ao ambiente submerso.

1.4. Contextualização e apresentação dos capítulos

A ideia central do tema de estudo desta tese, o armazenamento das sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata,* nasceu através de um projeto desenvolvido em colaboração do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) com o Millennium Seed Bank Project, Royal Botanical Gardens, Kew, da Inglaterra. Este projeto, intitulado “Aspectos morfofisiológicos de sementes florestais da Amazônia e suas implicações para o armazenamento das sementes”, tinha como uma das grandes linhas de pesquisas, o objetivo de prolongar a longevidade das sementes de espécies florestais nativas da Amazônia de

importância econômica pela otimização das condições do armazenamento. Dentre estas, *E. stipitata* foi selecionada como uma das espécies chaves e objeto de estudo desta tese.

Com a execução deste projeto, foi possível o intercâmbio de pesquisadores ingleses para orientar algumas atividades do projeto desenvolvidas em Manaus, assim como a ida de pesquisadores brasileiros para a Inglaterra, onde receberam treinamentos e realizaram algumas das análises deste trabalho. A reunião dos resultados e avanços científicos desta linha de pesquisa desenvolvida pelo autor deu origem a esta tese. Além da parte introdutória de embasamento teórico a presente tese de doutorado está dividida em três capítulos.

O capítulo 1, intitulado 'Totipotent germination and stress biology of recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh: a model species for desiccation sensitivity studies', constitui a primeira etapa do projeto, com os resultados dos testes iniciais de viabilidade e análises dos compostos antioxidantes. Com os resultados, *E. stipitata* foi recomendada como uma espécie modelo para estudos de fisiologia de sementes recalcitrantes e os experimentos dos demais capítulos foi delineado.

O segundo capítulo possui como título 'Armazenamento de sementes de *Eugenia stipitata* em diferentes temperaturas e umidade' e o terceiro capítulo, com título 'Submersão de sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: a ecologia apoiando a tecnologia de sementes', são os que mostram os resultados dos experimentos de armazenamento das sementes por até um ano. Ao final destes dois capítulos são feitas as recomendações dos melhores ambientes para o armazenamento das sementes desta espécie, seja utilizando câmaras frias ou ainda um método mais inovador, por meio da submersão em água corrente, técnica esta que pode ser facilmente empregada pelos produtores de sementes e mudas na região amazônica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a fisiologia do estresse de dessecamento e aspectos práticos para o armazenamento úmido das sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata*, uma espécie nativa da Amazônia.

2.2. Objetivos específicos

Capítulo 1. Totipotent germination and stress biology of recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh: a model species for desiccation sensitivity studies

- Avaliar o estresse causado nas sementes de *E. stipitata* após a exposição a diferentes condições de umidade pela avaliação da germinabilidade, viabilidade e concentração de compostos antioxidantes;
- Avaliar a capacidade das sementes em emitir novas raízes após serem cortadas em duas ou em quatro partes;
- Avaliar a possibilidade de utilizar uma única semente para diversos testes de qualidade.

Capítulo 2. Armazenamento de sementes de *Eugenia stipitata* em diferentes temperaturas e umidade

- Acompanhar, por até um ano, a germinabilidade e a viabilidade das sementes de *Eugenia stipitata* armazenadas em diferentes condições de umidade;
- Determinar o teor de água mínimo da vermiculita para manter a germinabilidade das sementes de *E. stipitata;*
- Acompanhar, por até um ano, a germinabilidade e a viabilidade das sementes de *Eugenia stipitata* armazenadas em diferentes temperaturas e determinar a temperatura mínima tolerável.

Capítulo 3. Submersão de sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: a ecologia apoiando a tecnologia de sementes

- Acompanhar, por até um ano, a germinabilidade e a viabilidade das sementes de *Eugenia stipitata* submersas em água corrente em duas profundidades;
- Verificar se a submersão das sementes pode retardar o processo germinativo possibilitando um armazenamento a curto e médio prazo; e
- Avaliar a capacidade das sementes germinadas durante a submersão em emitir nova raiz e nova parte aérea após as primeiras serem cortadas.

CAPÍTULO 1

Calvi, G.P.; Aud, F.F.; Ferraz, I.D.K.F; Pritchard, H.W. & Kranner, I. (2015). Totipotent germination and stress biology of recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh: a model species for desiccation sensitivity studies. Submetido à *Plant Biology*.

CAPÍTULO 1

Totipotent germination and stress biology of recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh: a model species for desiccation sensitivity studies[1]

Geângelo P. Calvi[A*], Fabiana F. Aud[B], Isolde D.K. Ferraz[A], Hugh W. Pritchard[C] and Ilse Kranner[C,D]

[A] National Institute for Amazonian Research, PO Box 2223, Manaus, 69.080-971, AM, Brazil.
[B] Embrapa Cassava & Fruits, PO Box 007, Cruz das Almas, 44.380-000, BA, Brazil.
[C] Wellcome Trust Millennium Building, Royal Botanic Gardens, Kew, Wakehurst Place, Ardingly, West Sussex RH17 6TN, UK.
[D] Institute of Botany, and Centre of Molecular Biosciences (CMBI), University of Innsbruck, Sternwartestraße 15, A-6020 Innsbruck, Austria.

[*]Corresponding author: Address: National Institute for Amazonian Research, Biodiversity Coordination, PO Box 2223, Manaus, 69.080-971, AM, Brazil. Telephone: +55 92 36431825. Fax: +55 92 36431838. Email: **gpcalvi@inpa.gov.br**

Abstract
Eugenia stipitata has "recalcitrant" seeds that are highly desiccation sensitive. There is no apparent differentiation between the embryonic axis and the cotyledons, and the seeds also have meristematic potential and can germinate after physical damage. This set of characteristics makes it a good model for seed stress studies because one seed can be cut into sections, and these can be used for several seed quality tests. In this paper, the germination capacity of seed sections was assessed and, independent of the cut direction, all seed sections were able to develop roots and shoots. Seeds were stored at different environmental moisture contents to induce stress for 15 and 30 days. Seed moisture determination, viability staining using tetrazolium and analyses of the stress marker glutathione were conducted using one single seed and compared with germination tests. A clear distinction between viable and non-viable seeds was achieved on a single seed level, and *E. stipitata* is recommended as a model seed to study tissue and cell desiccation sensitivity.

Keywords: Amazon, germination test, glutathione, recalcitrant seeds, seed storage, tetrazolium, viability test

---

[1]Capítulo submetido à revista *Plant Biology*.

Introduction

Desiccation sensitive, also termed “recalcitrant”, seeds may occur in non-pioneer shrubs and trees and are found in up to 50% of species in evergreen forests (Tweddle *et al*. 2003), and some of these seeds have high economic importance, e.g. *Theobroma grandiflorum*. Recalcitrant tree seeds have short longevity and cannot be stored long-term, and are, in general, genetically heterogeneous. Mechanical harvest is rarely used and seed production may be restricted to a season and may not even be annual. Because of these difficulties in accessing and handling recalcitrant seeds, innovative approaches have been developed to study desiccation stress using orthodox (desiccation tolerant) seeds. Orthodox seeds progressively acquire desiccation tolerance during later stages of seed development and then become desiccation sensitive in a predictable manner during germination. Interestingly, desiccation tolerance can also be re-induced in a certain time window post-germination, which has been used to elucidate developmental, structural and biochemical attributes associated with desiccation tolerance and sensitivity (Sun, 1998). Consequently, the mechanisms of desiccation (in)tolerance can be studied in the same species. The major annual and biannual crops and vegetables possess desiccation tolerant seeds and several have been used as models to study recalcitrant seed behaviour, for example *Medicago truncatula* (Buitink *et al*., 2003; Boudet *et al*., 2006; Verdier *et al*., 2013), *Arabidopsis thaliana* (Maia *et al*., 2011; Maia, 2014) and *Cucumis sativus* (Bruggink and van der Toorn, 1995). Nonetheless, there is a need to validate these findings in relation to the responses of recalcitrant seeds unable to develop desiccation tolerance. To achieve a comprehensive view of desiccation sensitivity across taxa (Sun, 1998; Pammenter and Berjak, 1999; Berjak and Pammenter, 2000), several model species are needed for detailed studies and here we propose to include *Eugenia stipitata*.

E. stipitata spp. *sororia* (Myrtaceae) is a shrub up to 4 m height, occurring along the Amazon River and produces flowers and fruits continuously during the year, with higher fruit production in the rainy season (Acevedo *et al*., 1996). Ripe fruits are used by local communities for several purposes such as the production of juice, squash, marmalade and ice-creams. The berry-type fruit contains up to 22 recalcitrant seeds (McVaugh, 1958; Ferreira, 1992; Gentil and Ferreira, 1999) and seed size varies between 0.6 and 2.8 cm (Ferreira, 1992; Anjos and Ferraz, 1999). Mature seeds have no endosperm (Flores and Rivera, 1989) and there is no apparent differentiation between the embryonic axis and the fused cotyledons

(McVaugh, 1958). The embryo has totipotent, meristematic potential and can germinate even if cut into two halves (Anjos and Ferraz 1999; Mendes and Mendonça 2012).

Germination takes up to four months and can be reduced to two months by removal of the fibrous seed coat layer (Anjos, 1998; Gentil and Ferreira, 1999) and morphological immaturity of the embryo was suggested (Anjos and Ferraz, 1999). *E. stipitata* seeds are highly desiccation sensitive. Although recalcitrant seeds are metabolically active on dispersal, seeds of *E. stipitata* can be stored submersed under water for a year, with germination starting after about three months (Anjos, 1998). This species therefore represents an unusual ecological syndrome for a recalcitrant seed. Here, seed moisture content (MC), germination and viability, using germination tests and tetrazolium staining, respectively, and changes in the stress marker glutathione (γ-glutamy-cysteinyl-glycine; GSH) were measured in individual seeds. Glutathione is one of the major cellular antioxidants with a plethora of roles in stress response, cell differentiation, plant growth and development, and cells of different age and function contain different glutathione levels (Rennenberg *et al.*, 2007). We propose that *E. stipitata* is a valuable model species for single seed studies on recalcitrant seed physiology because of its unique combination of traits: large size, the capability of seed parts to germinate, and its capability of surviving under water.

Material and Methods

Seed collection and processing

E. stipitata ssp. *sororia* fruits were obtained from a farm the municipality of Manaus in Central Brazilian Amazonia. The climate in this region is tropical humid classified as *Am* according to Köppen. Annual rainfall varies between 1900 and 2300 mm, with a dry season from June to October when monthly rainfall is below 100 mm. Average annual temperature is 26 ºC, with daily temperature cycles between 19ºC and 39 ºC (Brasil, 1978). Immediately after fruit collection, the seeds were manually separated from the berry-type fruits and cleaned by friction with moist sand, followed by rinsing under running water (Gentil and Ferreira, 2000). After processing, the seed lot was used for experiments within about 24 hours.

Germination of seed parts

In the first set of experiments (EXPT1), the germinability of seed sections was tested after cutting the whole seeds in different directions: *1.* Uncut – intact seeds; *2.* Both poles were cut off, comprising 2-3mm of the radicle protrusion region and also at the opposite end; *3.* Longitudinal cuts divided the seed into two sections; *4.* Transversal cuts divided the seed into two sections and *5.* Double cuts divided the seed in four sections by a longitudinal and a

transversal cut. Five replicates of 20 seeds each were used for each treatment. The seeds or seed parts were placed above moistened vermiculite in a glass tray (25 x 17 x 4 cm) at 25 ± 2 ºC with 12 h light daily, protected with a transparent foil to avoid desiccation. Germination progress was scored over 210 days by assessing root development (≥ 5 mm) and expressed as percentage of total germination (TG), and increase in seedlings produced from one seed was calculated by dividing the sum of primary roots scored at each treatment by the sum of primary root developed by uncut seeds.

Single seed viability analysis during desiccation stress and storage

In the second set of experiments (EXPT2), seed viability was tested after storage for 15 or 30 days at 25 ± 2 ºC. Seeds were mixed with an equal weight of vermiculite at six different environmental MCs, assessed by vermiculite moisture contents. Seeds handled immediately after cleaning were used as a control (CON). Seeds were dried for three days above silica gel at 25 ± 2 ºC to maintain a MC of around 10% ($MC_{10\%}$) and for five days with a fan to maintain a MC of around 15% ($MC_{15\%}$). Seeds of these two low MCs were kept in hermetically closed glass jars. In three moisture conditions the seeds were maintained in plastic bags, punched six times with a needle (diameter of 1.6 mm) to permit gas exchange, and care was taken to keep the environmental MC stable. For MCs around 23% the fresh seeds were, without previous drying, mixed with vermiculite ($MC_{23\%}$); a MC around 40% ($MC_{40\%}$) was achieved by adding distilled water to the vermiculite at a proportion of 0.5 g of water per gram of vermiculite; and a MC of 70% ($MC_{70\%}$) by adding two grams of water per gram of vermiculite. A MC of 100% (SUB) was achieved by submerging the seeds in running tap water. Each treatment comprised five replicates of 45 seeds each, of which 20 were cut in seed quarters and used for viability staining, seed MC and low-molecular-weight thiols analyses; 20 seeds were used for germination tests (to compare with viability staining) and five seeds for MC determination of individual whole seeds, as described below.

Viability staining and sample preparation for the analyses of low-molecular-weight thiols

For viability staining, seed MC determination and analysis of low-molecular-weight thiols, each single seed was labelled, cut longitudinally into four sections and the seed coat was removed. One quarter was immediately frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for three days to prevent redox reactions prior to analysis. Two quarters were used for viability staining with 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (tetrazolium; TZ; Vetec, Brazil) at 30 ºC for 24 h in the dark, and photographed. One quarter was used for the determination of embryo MC (without seed coat), determined gravimetrically after drying at 105 ºC ± 3 ºC for 24 hours

and expressed on a percentage fresh weight basis (Brasil, 2009). Additionally, the whole seed MC (with seed coat) was determined on 25 seeds per treatment, comprising five replicates of five seeds measured individually.

After TZ staining, the seeds of each replicate were sorted into viable seeds (completely stained) and dead seeds (unstained; Figure 1.1). A third TZ staining pattern comprising 1 to 10% of the seeds in each treatment was termed "partially stained" (Figure 1.1) with some unstained areas. Seeds of each group were freeze-dried and then ground to a fine powder with a ball mill (Fritsch, Pulverisette 7, Germany). The powder was stored at -80 ^{o}C until it was sent by express mail to the Royal Botanic Gardens, Kew, Wakehurst Place, where thiols were measured.

HPLC analysis of thiols and disulphides

The extraction and quantification of the GSH/glutathione disulphide (GSSG) and cysteine (Cys)/cystine (CySS) redox couples followed the protocols of Kranner and Grill (1996) and Bailly and Kranner (2011). Low-molecular-weight thiols and disulphides were extracted from the freeze-dried seed powder using 50 ± 2 mg seed material (exact weight recorded) by the addition of 1 mL of 0.1 M HCl on ice, to minimize unwanted reactions. Briefly, the extracts were vortexed for 20 s, then centrifuged at 4°C for 40 min. Glutathione was separated from Cys and the dipeptide thiols γ-glutamyl-cysteine and cysteinyl-glycine by reversed-phase HPLC (Jasco) on a HiQsil RP18 column in combination with fluorescence detection (excitation wavelength = 380 nm, emission wavelength = 480 nm) after labelling of thiols with monobromobimane following the reduction of disulphides with dithiothereitol (DTT). For disulphide measurements, thiol groups were blocked with *N*-ethylmaleimide (NEM). The excess NEM was removed by extracting five times with toluene and the remaining disulphides reduced with DTT, labelled with monobromobimane and analysed as thiols.

The amounts of total thiols + disulphides were calculated using calibration curves based on standard solutions (Sigma–Aldrich, Germany). The half-cell reduction potential of the glutathione/glutathione disulphide redox couple ($E_{GSSG/2GSH}$) and that of the cysteine/cystine redox couple ($E_{CySS/2\ Cys}$) were calculated according to the Nernst equation as described by Kranner *et al*. (2006) and Birtić *et al*. (2011), using embryo MC to estimate molar concentration of thiols and disulphides, and an assumed cellular pH of 7.3.

Germination of whole seeds

Viability staining was compared with the germination test results using the same seed numbers as in the viability test (5 x 20). Seed germination was accelerated by removing the fibrous seed coat at the radicle protrusion region and at the opposite end (both poles cut). The seeds were sown at a depth of about 1.5 cm in vermiculite in plastic trays (36 x 55 x 18 cm). Germination progress was scored in a rain-protected nursery in Manaus over 250 days by counting the normal seedlings according to Anjos (1998).

Data analysis

The differences in the environmental MC conditions on seed MC, embryo MC, concentrations of thiols and disulphides, viability staining, TG, mean germination time (MGT) and germination speed index (GSI, Maguire, 1962) were analysed by one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. An independent-samples *t*-test was performed to test differences between viability staining and TG. All differences were considered significant at the 0.05 level.

Results

Germination of seed sections

Uncut (intact) seeds of *E. stipitata* achieved 62% TG and interestingly, mechanical injury by cutting off both poles increased TG to 94% (Table 1.1). Sectioning did not compromise germinability and seed sections were able to develop roots independently of the cut direction (Table 1.1; Figure 1.2A; Figure 1.2B). After longitudinal cuts, 113 seed sections resulting from a total of 100 seeds developed roots, which is a 1.82-fold increase in seedlings produced from one seed compared with uncut seeds (Table 1.1), whereby 43% developed a root on both halves and 27% on one only. Root development in transversally cut seeds was reduced in comparison to the longitudinal cut with a total of 64 seedlings produced from 100 seeds (not different from uncut seeds), and 19% of the seeds also developed roots on both halves (Table 1.1). When cut into four sections, root development of all four sections of the same seed was observed in 14% of all sections. In comparison to uncut seeds, double cuts increased the number of seedlings produced from one seed 2.06-fold (Table 1.1).

The remarkable regeneration capacity of *E. stipitata* seeds was also observed in a preliminary test where the emerging seedlings were cut off the seeds and subsequent germination was scored during 30 months. During this interval the emerging seedlings were cut off and regrew three times. Development of new shoots was also observed when the first shoot was injured or had died in the nursery (data not shown).

Use of a single seed for viability analyses in response to desiccation stress and storage

Fresh control seeds (CON) of EXPT 2 had a high initial seed MC (58.7%) and 95% TG; the first normal seedling was scored 69 days after sowing and the last after 248 days with a MGT of 119.6 days (Table 1.2).

Seeds kept for 15 or 30 days at high environmental MC ($MC_{23\%}$, $MC_{40\%}$, $MC_{70\%}$ and SUB treatments) maintained viability (90 to 99%) and there were no significant differences between viability staining and germination assessments (Table 1.2). In these treatments, MGT (103.5 to 141 days) and GSI (0.007 to 0.010) were not statistically different to the CON (Table 1.2). However, comparing MGT and GSI at $MC_{23\%}$ with the higher MC treatments showed that the germination process was slower (Table 1.2). As expected for recalcitrant seeds, none germinated or stained by TZ after desiccation to seed MCs of 9.4 to 8.2% ($MC_{15\%}$) and 5.0 to 3.7% ($MC_{10\%}$; Table 1.2).

In *E. stipitata* seeds, GSH was the most abundant low-molecular-weight thiol, followed by Cys. Cysteinyl-glycine and γ-glutamyl-cysteine were found in trace amounts only and were not considered further. Changes in the GSSG/GSH and cysteine/CySS redox couples reflected seed viability, and viable and dead seeds differed significantly ($P<0.05$; Table 1.2). Expressed as a percentage of total thiols + disulphides for each redox couple, %GSSG and %CySS rose from about 7% GSSG to over 43% GSSG and from 32% CySS to over 45% CySS on drying to MCs lower than 9.5%. Compared to the CON, total glutathione (GSH + GSSG) and total cyst(e)ine (cysteine + cysteine) contents were, at least, 1.2 and 1.9-fold higher, respectively, in seeds subjected to the SUB, $MC_{70\%}$ and $MC_{40\%}$ treatments (Figure 1.3 and Figure 1.4). Compared to live seeds, dead seeds ($MC_{15\%}$ and $MC_{10\%}$ treatments), had at least 9-fold lower GSH (Figure 1.3) and 2-fold lower cysteine (Figure 1.4). Both $E_{GSSG/2GSH}$ (Figure 1.3) and $E_{CySS/2CYS}$ (Figure 1.4) were also different in live and dead seeds. In seeds maintained at $MC_{23\%}$ total cysteine concentration decreased from 158 to 103.2 nMg^{-1} DW ($P=0.008$) between 15 and 30 days, and this was reflected in $E_{CySS/2CYS}$, which increased from -159.2 to -146.5 mV ($P=0.001$). At higher environmental MCs, total cysteine concentrations and $E_{CySS/2CYS}$ did not change significantly between 15 and 30 days (Figure 1.4).

The relationship between %GSSG and %CySS and their corresponding half-cell reduction potentials ($E_{GSSG/2GSH}$ and $E_{CySS/2CYS}$) and viability evaluation by TZ staining is shown in Figure 1.5. Viable and dead seeds clearly clustered and partially stained seeds had values between those of viable and dead seeds (Figure 1.5). Values for $E_{GSSG/2GSH}$ and %GSSG differed significantly between viable and dead seeds. In viable seeds, $E_{GSSG/2GSH}$ was more negative than -214.93 mV and % GSSG was below 7.2%. In contrast, dead seeds had

more positive $E_{GSSG/2GSH}$ values than -193.81 mV and a %GSSG greater than 38.8% (Figure 1.6A).

In contrast to $E_{GSSG/2GSH}$, values for $E_{CySS/2CYS}$ could not distinguish between the categories determined by TZ staining. Viable seeds had $E_{CySS/2CYS}$ values between -163.72 and -126.43 mV with values for %CySS lower than 35%. Dead seeds showed $E_{CySS/2CYS}$ values between -153.45 and -127.32 mV, although their %CySS was significantly higher than that of viable seeds (≥41.7%; Figure 1.6B).

Discussion

The embryos of *E. stipitata* are typical of the genus *Eugenia* and were denominated eugenoid. McVaugh (1958) described them as a massive cell mass with no apparent differentiation between the embryonic axis and the cotyledons, and termed them also pseudomonocotyledonous. The extraordinary capacity of *E. stipitata* seed sections to develop normal seedlings was reported by Anjos and Ferraz (1999), who found that the meristematic pole produced 89% of normal seedlings and the opposite half yielded another 20% after the seeds were cut transversely. In a recent study, transverse and longitudinal cuts were compared in favour of the latter with 95% of seedling development recorded for one seed half and 10% for the opposite seed half (Mendes and Mendonça, 2012). It possible explanation for this difference could be that the cuts were made asymmetrically through the meristematic region. In the present study, care was taken that the longitudinal cut divided the meristematic region equally, and 43% of the seeds showed germination of both halves. Furthermore, it was tested for the first time if seed quarters can be germinated and indeed, root development was observed in all four quarters. Independent of the cut direction, root and shoot development always occurred according to the polarity of the intact seeds. This response might have been caused by unipolar hormone transport similar to that observed in hardwood cuttings as suggested by Anjos and Ferraz (1999). Supporting this suggestion, we observed that further sprouting was inhibited and the development of more than one shoot or one primary root was not observed for intact seeds and hardly ever for seed sections.

Other *Eugenia* species were tested for the capability of seed sections to germinate after cuts in different directions and proportions, namely *E. pyriformis* (Silva *et al*., 2003), *E. involucrata*, *E. uniflora*, *E. brasiliensis* (Silva *et al*., 2005), *E. cerasiflora*, *E. umbelliflora* and *E. pruinosa* (Delgado *et al*., 2010). In general, seed sections germinated better than intact seeds and longitudinal seed sections performed best. All the species tested so far contain only one embryo per seed, although polyembryony has been described in the genus (Johnson, 1936; Gurgel and Soubihe Sobrinho, 1951; NicLughadha and Proença, 1996).

Germination comprises the events between the start of water uptake by a seed and the emergence of a part of the embryo, normally the radicle, through the seed coat (Black *et al*., 2006). Seed germination of *Eugenia* seed sections is somewhat different. Roots and shoots seem to develop from a meristematic zone or from certain tissues by dedifferentiation. Anatomical studies indicated cell dedifferentiation of parenchymatic perivascular tissue of the cotyledonary apex as the origin of the new root and shoot development in *E. cerasiflora*, *E. involucrate* and *E. uniflora* (Delgado, 2010). This enables the seed to regenerate and develop new roots and shoots after mechanical injuries. This regeneration capacity seems to be common in the genus and may be useful to increase plantlet production for commercial and/or conservational purposes, and as recommended here as a tool for physiological and molecular experiments.

The mechanisms that regulate seed reserve mobilization in *E. stipitata* are poorly understood. Carbohydrates, mainly starch, are the major seed reserves (76.7% Anjos, 1998; 71.1% Melo *et al*., 2009; and 43.5% Mendes, 2011). However no significant reserve consumption was observed in seedlings with up to 5 cm radicle length (Melo *et al*., 2009) nor in seedlings with about 5 cm of shoot length and five pairs of leaves (Mendes, 2011). In the present study, even after more than two years in the nursery, the seeds were still attached to the seedlings, with apparently unused seed reserves (i.e. the seed tissues were not completely shrivelled). The maintenance of reserves over a long period of time, together with the regeneration capacity of the seed, may be part of the survival strategy that evolved to combat mechanical damage and to enable recovery after exposure to unfavorable environmental conditions. Mechanical injury and shoot death in *E. stipitata* seeds could be stress factors responsible for the induction of genome reprogramming of somatic cells to embryogenic cells (Verdeil *et al*., 2007). Development of seedlings from seed fragments of five *Eugenia* species (*E. cerasiflora, E. pyriformis, E. involucrata, E. unifora and E. brasiliensis*) was also suggested as an important mechanism for these species survival (Teixeira and Barbedo, 2012).

The seed coat is the principal modulator of interactions between the seed's internal structures and the external environment. The fibrous seed coat of *E. stipitata* is water permeable (Anjos and Ferraz, 1999; Gentil and Ferreira, 1999) and, as a function of different chemical composition, probably yields a different MC than the embryo. Under moist conditions, it may retain more water than the embryo, as shown by the increased seed MC after submersion or in environmental MC higher than 40% in comparison to the CON. Without the seed coat, this increase was not observed (Table 1.2).

Any reduction of seed MC of the highly recalcitrant *E. stipitata* seeds (Pinedo *et al*., 1981) negatively affects germination and at an environmental MC below 26%, TG declined to less than 5% (Gentil and Ferreira, 1999). Accordingly, we observed viability loss in seeds dried to $MC_{10\%}$ and $MC_{15\%}$, which are below lethal MC values. In all other conditions, the embryo MC was maintained high (55- 60%), and germinability and viability were preserved for, at least, 30 days, offering an opportunity for short-term seed storage.

In comparison with other recalcitrant-seeded species (Daws *et al*., 2005), *E. stipitata* seeds or seed sections take a long time to germinate (c. 120 d MGT), likely due to the undifferentiated embryo. The MGT varies between *Eugenia* species, with 40 days for *E. dysenterica* seeds (radicle length ≥ 5 mm; Andrade *et al*., 2003); 45 days for *E. brasiliensis* (normal seedling development; Kohama *et al*., 2006); and 90 days for *E. pleurantha* seeds (Masetto *et al*., 2009) and *E. involucrate* (normal seedlings; Maluf *et al*., 2003).

Use of a single seed for several seed quality tests

A close correlation was found between the viability assessed through germination and TZ staining. Seed quality assessment by TZ staining was also recommended for *E. pleurantha* (Masetto *et al*., 2009). Staining can be completed in a few hours whereas many months are needed for a germination test. Although not the main objective of this study, TZ staining can be recommended as a useful tool for seed quality testing of *E. stipitata*.

Moreover, we tested if seed sections could be used for biochemical studies. We chose to analyse the redox state of GSH, which is one of the major water soluble antioxidants that scavenge reactive oxygen species (ROS), and metabolites of GSH synthesis or degradation, i.e. cysteine, γ-glutamyl-cysteine and cysteinyl-glycine. The formation of ROS can be enhanced by conditions that disturb seed metabolism, including desiccation (Roach *et al*., 2010), seed dissection (Roach *et al*., 2008), osmotic stress (Kellős *et al*., 2008), cold stress (Janská *et al*., 2009) and, flooding (Voesenek e Sasidharan, 2013), and an efficient antioxidant system to scavenge ROS is essential for survival. Hence, changes in the GSSG/GSH redox couple have previously been used as stress and seed viability markers (Kranner *et al*., 2006; 2010b). Total glutathione increased when *E. stipitata* seeds were stored at high environmental MCs (from SUB to $MC_{23\%}$), and this increase was attributable to a two- to threefold increase in GSH. Total glutathione then decreased at environmental MCs at which seed viability was lost. According to the seed stress concept proposed by Kranner *et al*., (2010b), which considers three phases, “alarm”, “resistance” and “exhaustion”, this transient increase in total glutathione could be interpreted as a response to the new

environmental conditions, corresponding to the resistance phase, in which protection and/or repair mechanisms (including antioxidant defence) are activated to maintain seed viability and germinability (Kranner *et al*., 2010b). Accordingly, the lowered total glutathione contents in *E. stipitata* seed stored at environmental MCs below 15% would correspond to the exhaustion phase that eventually leads to seed death.

The half-cell reduction potential of the GSSG/2GSH redox couple, $E_{GSSG/2GSH}$, was suggested to be a valuable seed viability marker (Kranner *et al*., 2006). Seed viability was reported to decrease with increasingly more positive values of $E_{GSSG/2GSH}$, and values between -180 and -160 mV were identified as the zone in which half of the population was alive and half was dead. To assess the values for this zone, seed populations comprising viable and nonviable seeds with decreasing percentages of viable seeds after artificial ageing were used, whereas in the present study, the use of individual seeds allowed a more fine-tuned assessment because redox changes could be related to viability staining in one and the same seed. In *E. stipitata*, dead seeds had $E_{GSSG/2GSH}$ values between -195 and -171 mV, and viable seeds had values between -235 to -215 mV, which suggests that the zone in which 50% of all seeds were alive and 50% dead could be broader. In addition, the zone in which 50% of all seeds were dead could have slightly shifted towards more negative values. However, $E_{GSSG/2GSH}$ values depend on the intracellular pH, which was assumed to be 7.3 but was not measured. As a response to stress treatments or environmental factor, for example, anaerobiosis and temperature, cytoplasmatic pH could have changed (Kurkdjian and Guern, 1989). A shift in pH of 0.1 would change the $E_{GSSG/2GSH}$ by 5.9 mV at 25 °C (Kranner *et al*., 2006). Whereas $E_{GSSG/2GSH}$ clearly correlated with seed viability (Figure 1.5A), the relationship between $E_{CySS/2CYS}$ was less pronounced (Figure 1.5B). Importantly, the approach to use seed sections enabled a direct correlation of biochemical parameters such as $E_{GSSG/2GSH}$ and $E_{CySS/2CYS}$ with seed viability in one and the same seed. Studies so far reported on the response of inseparable populations of viable and nonviable seeds in which the partitioning of analytes in seeds of differential quality is unknown (Kranner *et al*., 2010). Therefore, the possibility to use one individual seed for the analysis of several parameters that define seed viability widens the opportunity to refine critical thresholds for cell viability markers.

Summary and conclusions

Eugenia stipitata is an underutilized crop with potential for further agricultural development. However, seed storage is difficult due to their recalcitrant nature. We show that high seed quality, as assessed by viability staining, germination tests and the stress marker GSH can be maintained for at least 30 days when the environmental MC is kept at sufficiently

high levels. The seeds of *E. stipitata* display an unusual anatomy and, the whole seed can be considered as an embryo axis, and displays polarity with higher meristematic activity at one of the poles. If cut longitudinally into seed quarters, tissue variations are equally distributed between the seed sections. Seed MC determination with one quarter of the seeds gave a similar result as determination using whole seeds. Another quarter sufficed for LMW-thiols analyses, the third for TZ staining, and the last quarter could be used for any other analysis. Based on these characteristics, *E. stipitata* is proposed as a candidate recalcitrant seed model of which a single seed can be used for several tests as shown in this study.

References

Acevedo C.J.E., Pelaez J.J.Z., Martinez A. (1996) *El cultivo de arazá (Eugenia stipitata)*. CORPOICA – Fondo Amazonico, Florencia-Caquetá, Colombia: 7 pp.

Andrade A.C.S., Cunha R., Souza A.F., Reis R.B., Almeida K.J. (2003) Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree *Eugenia dysenterica* DC. *Seed Science and Technology*, **31**, 125-137.

Anjos A.M.G. (1998) *Morfologia e fisiologia da germinação de sementes de araçá-boi Eugenia stipitata* ssp. *sororia McVaugh, Myrtaceae), uma frutífera nativa da Amazônia Ocidental*. Master's dissertation, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil: 78pp.

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

Bailly C., Kranner I. (2011) Analyses of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Relation to Seed Longevity and Germination. In: Kermode A.R. (Ed.) *Seed Dormancy: Methods and Protocols. Vol. 773: Methods in Molecular Biology*. Springer Science and Business Media, New York, USA:343-367

Berjak P., Pammenter N. (2000) What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **12**, 22-55.

Birtić S., Colville L., Pritchard H.W., Pearce S.R., Kranner I. (2011) Mathematically combined half-cell reduction potentials of low-molecular-weight thiols as markers of seed ageing. *Free Radical Research*, **45,** 1093–1102.

Black M., Bewley J.D., Halmer P.L. (2006) Germination. In: Black M., Bewley J.D., Halmer P. (Eds) *The Encyclopedia of Seeds. Science, technology and uses*. CAB International, Wallingford, UK:258-260

Boudet J., Buitink J., Hoekstra F.A., Rogniaux H., Larré C., Satour P., Leprince O. (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology*, **140**, 1418–1436.

Brasil (1978) *Folha SA. 20 Manaus: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação, uso potencial da terra*. Projeto Radambrasil, Ministério das Minas e Energia, Rio de Janeiro, Brazil: 628pp.

Brasil (2009) *Regras para análise de sementes.* Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brazil: 399pp.

Bruggink T., van der Toorn P. (1995) Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. *Seed Science Research*, **5**, 1–4.

Buitink J., Ly Vu B., Satou P., Leprince O. (2003) The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. *Seed Science Research*, **13**, 273–286.

Daws M.I., Garwood N.C., Pritchard H.W. (2005) Traits of recalcitrant seeds in a semi-deciduous tropical forest in Panama: some ecological implications. *Functional Ecology*, **19**, 874-885.

Delgado L.F. (2010) *Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de Eugenia (Myrtaceae).* PhD thesis, Botanic Institute, São Paulo, Brazil: 96pp.

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.

Ferreira S.A.N. (1992) Biometria de frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Acta Amazonica*, **22**, 295-302.

Flores E.M., Rivera D.I. (1989) Criptocotilia em algunas dicotiledoneas tropicales. *Brenesia*, **32**, 19-26.

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

Gentil D.F.O., Ferreira S.A.N. (2000) Métodos de extração e limpeza de sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata*). *Acta Amazonica*, **30**, 23-30.

Gurgel J.T.A., Soubihe Sobrinho J. (1951) Poliembrionia em mirtáceas frutíferas. *Bragantia*, **11**, 141-163.

Janská A., Maršík P., Zelenková S., Ovesná J. (2010) Cold stress and acclimation–what is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*, **12**, 395-405.

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

Kellős T., Timar I., Szilágyi V., Szalai G., Galiba G., Kocsy, G. (2008) Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. *Plant Biology*, **10**, 563-572.

Kohama S., Maluf A.M., Bilia D.A.C., Barbedo C.J. (2006). Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes*, **28**, 72-78.

Kranner I., Birtić 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 Biology & Medicine*, **40**, 2155-2165.

Kranner I., Grill D. (1996) Determination of glutathione and glutathione disulphide in lichens: a comparison of frequently used methods. *Phytochemical Analysis*, **7**, 24-28.

Kranner I., Kastberger G., Hartbauer M., Pritchard H.W. (2010) Noninvasive diagnosis of seed viability using infrared thermography. *PNAS*, **107**, 3912-3917.

Kranner I., Minibayeva F.V., Beckett R.P., Seal C.E. (2010b) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science.*New Phytologist*, **188**, 655–673.

Kurkdjian A., Guern J. (1989) Intracellular pH measurement and importance in cell activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**, 271–303.

Maguire J.D. (1962) Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour.*Crop Science*, **2**, 176-177.

Maia J. (2014) *Unravelling desiccation tolerance in germinated Arabidopsis seeds.* Ph.D. thesis, Wageningen University,Wageningen, NL: 211pp.

Maia J., Dekkers B.J.W., Provart N.J., Ligterink W., Hilhorst H.W.M. (2011) The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. *PLoS ONE*, **6**, 1-11.

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

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

McVaugh R. (1958) Flora of Peru. *Botanical Series Field Museum of Natural History*, **13**, 569-818.

Melo Z.L.O., Gonçalvez J.F.C., Mazzafera P., Santos D.Y.A.C. (2009) Mobilization of seed reserves during germination of four tropical species of the Amazon Rainforest.*Seed Science and Technology*, **37**, 597-607.

Mendes A.M.S. (2011) *Eugenia stipitata* ssp. *sororia McVaugh (araçá-boi) - Myrtaceae: abordagem fisiológica e morfoanatômica da semente, germinação e plântula*. Ph.D. thesis, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil: 118pp.

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

NicLughadha E.N., Proença C. (1996). A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae).*Annals of the Missouri Botanical Garden*, **83**, 480-503.

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

Pinedo M.H.P., Ramírez F.N., Blasco M.L. (1981) *Notas preliminares sobre el arazá (Eugenia stipitata), frutal nativo de La Amazonia peruana*. INIA/IICA, Lima, Peru: 51pp.

Rennenberg H., Herschbach C., Haberer K., Kopriva S. (2007). Sulfur metabolism in plants: are trees different?. *Plant Biology*, **9**, 620-637.

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

Roach T., Ivanova M., Beckett R.P., Minibayeva F.V., Green I., Pritchard H.W., Kranner I. (2008). An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. *Physiologia plantarum*, **133**, 131-139.

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

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

Sun W.Q. (1998) Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: Marzalina M., Khoo K.C., Jayanthi N., Tsan F.Y., Krishnapillay B. (Eds) *IUFRO Seed Symposium 1998 Recalcitrant seeds: Proceedings of the Conference*. Forest Research Institute, Kuala Lumpur, Malaysia: 29-42.

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

Tweddle J.C., Dickie J.B., Baskin C.C., Baskin J.M. (2003) Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology*, **91**, 294–304.

Verdeil J.L., Alemanno L., Niemenak N., Tranbarger T.J. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy?. *Trends in Plant Science*, **12**, 245-252.

Verdier J., Lalanne D., Pelletier S., Torres-Jerez I., Righetti K., Bandyopadhyay K., Leprince O., Chatelain E., Ly Vu B., Gouzy J., Gamas P., Udvardi M.K., Buitink J. (2013) A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology*, **163**, 757–774.

Voesenek L.A.C.J., Sasidharan R. (2013). Ethylene–and oxygen signalling–drive plant survival during flooding. *Plant Biology*, **15**, 426-435.

Table 1.1. The effects of cut position and direction on total germination (TG, in %) of *Eugenia stipitata* seeds or seed sections, and increase in the number of seedlings produced by one seed due to seed sectioning in comparison with uncut seeds. Means (n= 5) ± SD.

Cut direction		TG Section 1	TG Section 2	TG Section 3	TG Section 4	Increase in seedlings produced from one seed (fold)
Uncut		62± 16.4	-	-	-	1.00
Both poles cut		94± 4.18	-	-	-	1.52
Longitudinal cuts		70± 10.2	43± 5.4	-	-	1.82
Transversal cuts		45± 15.7	19± 8.4	-	-	1.03
Double cuts		57± 10.6	35± 6.7	22± 6.2	14± 2.6	2.06

Table 1.2. Effects of stress exposure on *Eugenia stipitata* seeds after 15 or 30 days at six environmental moisture content (MC)on the seed moisture content, total germination (TG), mean germination time (MGT) and germination speed index (GSI) of whole seeds, and on MC, percentage of glutathione disulphide (%GSSG), percentage of cystine (%CySS) and viability (TZ) analyzed using one quarter of each seed. In the columns, different letters denote significant differences by Tukey's test (P < 0.05). Stars denote differences according to Tukey's test (P<0.05) between the MCs of whole seeds and of seed quarters. Means (n=5) ± SD.

Treatments	Stress exposure	Whole seed (with seed coat)												Seed quarter (decoated)											
		MC			TG			MGT			GSI			MC			GSSG			CySS			TZ		
	(d)	(% fw)			(%)			(d)			(seed.d^{-1})			(% fw)			(%)			(%)			(%)		
Control (CON)	0	58.7	±1.03	Bc	95.0	±00.00	a	119.6	± 14.13	abc	0.008	± 0.0011	ab	58.7	±1.03	ab	6.5	±0.74	a	31.6	±2.06	b	93.0	±5.70	a
SUB	15	65.4	± 1.88	a*	92.0	±04.47	a	103.6	± 08.34	a	0.010	± 0.0008	a	60.3	± 1.73	a*	5.7	±1.83	a	22.0	±5.04	a	94.0	±6.52	a
$MC_{70\%}$	15	62.8	± 3.20	Ab	85.0	±08.66	a	114.3	± 09.63	ab	0.009	± 0.0007	ab	59.3	± 1.63	ab	4.6	±1.39	a	17.6	±1.68	a	99.0	±2.24	a
$MC_{40\%}$	15	61.1	± 2.02	Abc	92.0	±02.74	a	120.6	± 08.89	abc	0.008	± 0.0006	ab	59.9	± 1.55	ab	4.6	±1.07	a	16.3	±2.36	a	97.0	±2.74	a
$MC_{23\%}$	15	55.8	± 4.64	C	81.2	±9.46	a	141.0	± 14.28	c	0.007	± 0.0008	b	57.5	± 1.60	bc	4.5	±1.23	a	15.6	±1.67	a	93.0	±5.70	a
$MC_{15\%}$	15	9.4	± 0.38	D	0.0	±00.00	b	-	-	-	-	-	-	8.9	± 0.41	d	43.3	±1.50	b	45.0	±0.10	c	0.0	±0.00	b
$MC_{10\%}$	15	4.7	± 0.47	E	0.0	±00.00	b	-	-	-	-	-	-	5.0	± 0.25	e	45.3	±3.88	b	45.4	±1.83	c	0.0	±0.00	b
SUB	30	65.6	± 1.64	a*	84.0	±14.32	a	121.0	± 10.43	abc	0.008	± 0.0008	ab	60.0	± 1.59	ab*	5.9	±1.13	a	20.1	±0.99	a	95.0	±5.00	a
$MC_{70\%}$	30	65.1	± 2.67	a*	86.0	±08.22	a	104.9	± 15.39	a	0.010	± 0.0014	a	59.9	± 1.55	ab*	5.5	±2.03	a	19.4	±3.08	a	94.0	±5.48	a
$MC_{40\%}$	30	63.8	± 1.80	a*	95.0	±05.00	a	103.5	± 06.67	a	0.010	± 0.0006	a	59.6	± 0.75	ab*	5.1	±0.99	a	18.8	±1.99	a	96.0	±4.18	a
$MC_{23\%}$	30	58.0	± 1.54	c*	87.0	±11.51	a	132.6	± 15.12	bc	0.008	± 0.0010	b	55.4	± 1.33	c*	5.6	±1.84	a	23.4	±6.76	a	90.0	±6.12	a
$MC_{15\%}$	30	8.2	± 0.53	D	0.0	±00.00	b	-	-	-	-	-	-	8.6	± 0.40	d	42.8	±4.01	b	50.1	±6.84	c	0.0	±0.00	b
$MC_{10\%}$	30	3.7	± 1.06	E	0.0	±00.00	b	-	-	-	-	-	-	4.3	± 0.18	e	43.1	±3.67	b	47.5	±4.22	c	0.0	±0.00	b

Figure1.1. Viability staining of *Eugenia stipitata* seeds.(A) Viable(B and C)partially stained and (D) dead seeds after staining with 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride solution for 24 h at 30 ºC in the dark.Dark purple staining indicates high cell viabiliyand no staining indicates dead tissue

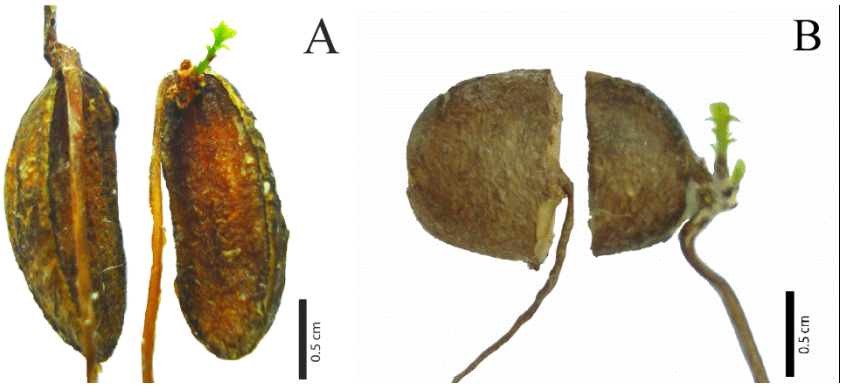

Figure 1.2. Root and shoot development of *Eugenia stipitata* seed sections after cutting (A) longitudinally and (B) transversally. Scale bar = 0.5 cm.

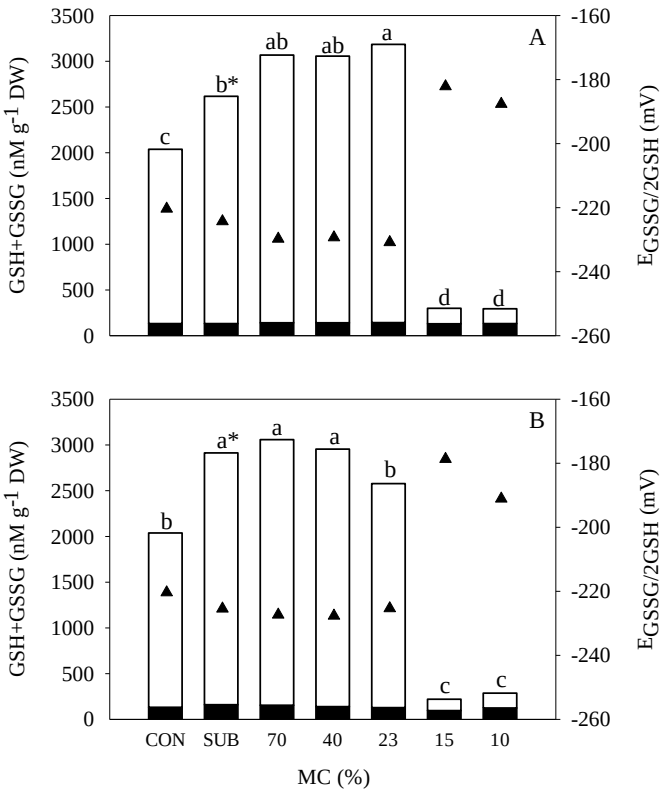

Figure 1.3. Concentrations of GSH (white bars), GSSG (black bars) and $E_{GSSG/2GSH}$ (black triangles) of *Eugenia stipitata* seeds after storage for 15 (A) or 30 (B) days submerged in running water (SUB) or at different environmental moisture contents (MC) compared to control seeds (CON - sown immediately after harvest). Different letters denote significant differences in total glutathione concentration by Tukey's test ($P < 0.05$). Stars indicate differences in total glutathione (GSH+GSSG) between 15 and 30 days by Tukey's test ($P<0.05$).Data are means of five replicates of 20 seeds.

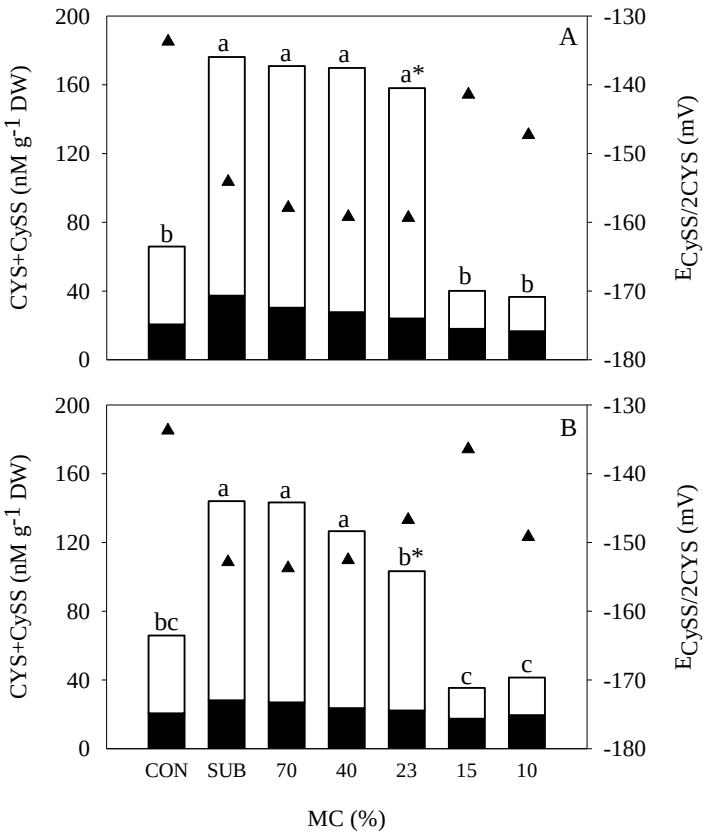

Figure 1.4. Concentrations of cysteine (white bars), cystine (black bars) and $E_{CySS/CYS}$ (black triangles) of *Eugenia stipitata* seeds after stress exposure for 15 (A) or 30 (B) days submerged in running water (SUB) or at different environmental moisture contents (MC) compared to control seeds (CON- sown immediately after harvest). Different letters denote significant differences in total glutathione concentration by Tukey's test ($P < 0.05$). Stars indicate differences in total cyst(e)ine (CYS + CySS) between 15 and 30 days by Tukey's test ($P<0.05$).Data are means of five replicates of 20 seeds.

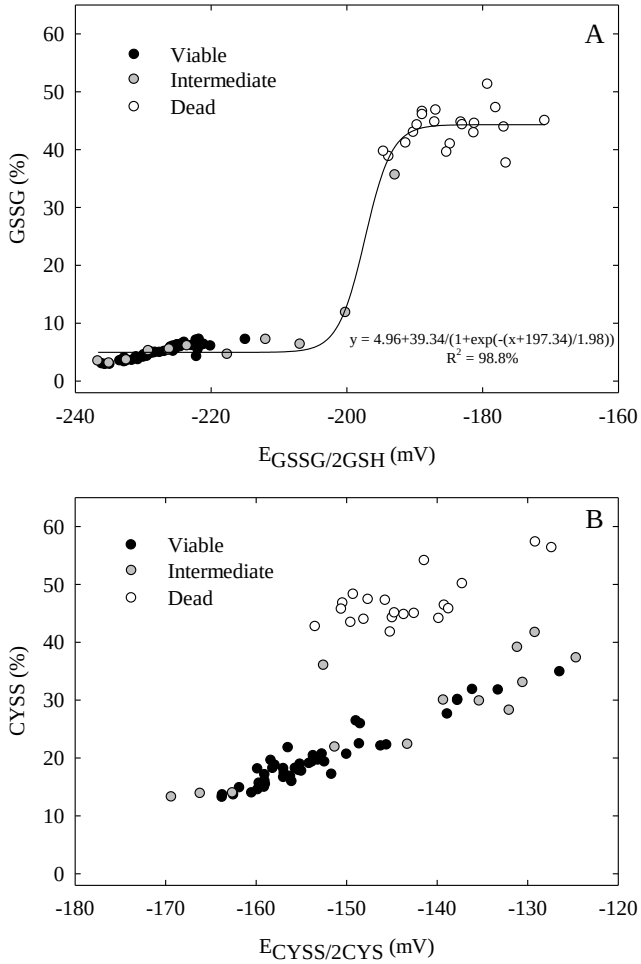

Figure 1.5. Half-cell reduction potential of the glutathione/glutathione disulphide redox couple ($E_{GSSG/2GSH}$) plotted against %GSSG (A) and half-cell reduction potential of the cysteine/cystine redox couple ($E_{CYSS/2CYS}$) plotted against %CYSS (B) of *Eugenia stipitata* seeds sorted according to TZ staining into viable (black circles: completely stained), partially stained (grey circles: some unstained areas) and dead (white circles: not stained). Data represent individual replicates.

CAPÍTULO 2

Calvi, G.P. & Ferraz, I.D.K.F. Armazenamento de sementes de *Eugenia stipitata* em diferentes temperaturas e umidade. Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*.

CAPÍTULO2

Armazenamento de sementes de *Eugenia stipitata* em diferentes temperaturas e umidade[2]

Geângelo P. Calvi[a*], Isolde D.K. Ferraz[a]

[a] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade. Caixa Postal 2223, Manaus, 69080-971, AM, Brasil. (**gpcalvi@inpa.gov.br**; **iferraz@inpa.gov.br**)

* Autor para correspondência: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade. Caixa Postal 2223, Manaus, 69080-971, AM, Brasil. Telefone: +55 92 36431825. Fax: +55 92 36431838. E-mail: **gpcalvi@inpa.gov.br**

RESUMO

Eugenia stipitata é uma espécie de ocorrência natural na Amazônia com grande potencial econômico. Produz sementes recalcitrantes, de curta longevidade, o que dificulta o manejo das mesmas. Desta forma, neste trabalho foi avaliado o armazenamento destas sementes por até um ano em diferentes condições de umidade e temperaturas, em dois experimentos. No primeiro, sementes recém-beneficiadas com teor inicial de água (TA) de 60% foram mantidas em quatro condições de umidade à 25 ºC em sacos de plástico contendo vermiculita em peso igual ao das sementes. As condições testadas foram: vermiculita (v) seca (V-$TA_{23\%}$), vermiculita umedecida com água na relação: 0,5 g água por grama vermiculita (V-$TA_{40\%}$) e umedecida com 2 g de água por grama de vermiculita (V-$TA_{70\%}$). Após um, três, seis, nove e doze meses, quatro repetições de 40 sementes foram retiradas. Destas, 20 sementes foram cortadas longitudinalmente e os cortes utilizados para determinação do TA e para teste de tetrazólio (TZ). Com as 20 sementes restantes de cada repetição, foram realizados testes de germinação em casa de vegetação. Em outro experimento, as sementes foram colocadas nas condições de umidade iguais ao tratamento V-$TA_{23\%}$, armazenadas por igual período a 5, 10, 15, 20 e 25 ºC e avaliadas pelos os testes descritos acima. As sementes mantidas em ambientes úmidos (V-$TA_{70\%}$) mantiveram alta viabilidade e germinabilidade por até 12 meses, porém, após três meses as sementes iniciaram o processo germinativo durante o armazenamento. Sementes mantidas nos tratamentos V-$TA_{40\%}$ e V-$TA_{23\%}$ sofreram dessecação durante o armazenamento para níveis de TA inferiores a 10% após seis meses e morreram. As sementes não toleram armazenamento a 5 ºC por mais de um mês. As temperaturas de 10 e 15 ºC preservaram a viabilidade e germinabilidade das sementes por até doze meses e mantiveram o TA constante. Apenas 12,5% das sementes germinaram durante o armazenamento a 15 ºC e nenhuma sob 10ºC. Sementes mantidas sob temperaturas de 20 ou 25 ºC secaram até TA menor que 10% e perderam a viabilidade após seis meses. Recomenda-se que o armazenamento das sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* seja realizado em vermiculita com teor de água acima de 25% e acondicionadas a 15 ou a 10 ºC. Caso o produtor de sementes não tenha possibilidade de utilizar uma câmara fria, o armazenamento destas sementes pode ser feita a 25 ºC com vermiculita umedecida na proporção de dois gramas de água por cada grama de vermiculita, porém, muitas sementes iniciarão o processo de germinação durante o armazenamento a partir do terceiro mês.

Palavras-chave: germinação, viabilidade, tetrazólio, araçá-boi, sementes recalcitrantes

---

[2]Capítulo redigido nas normas da revista Acta Amazônica

INTRODUÇÃO

A característica marcante que distingue sementes ortodoxas das recalcitrantes é a tolerância ao dessecamento. A capacidade das sementes ortodoxas de sobreviver após a redução a um teor de água (TA) intracelular muito baixo (3-15%), é o pré-requisito para mantê-las por centenas (Daws *et al*. 2007) ou até milhões de anos (Shenmiller *et al*. 1995). Em contraste, as sementes recalcitrantes possuem curta longevidade e são sensíveis ao dessecamento. Por não passar pela fase de secagem ao final da maturação, como as ortodoxas, são dispersas da planta mãe com teor de água alto, em geral, em torno de 60 a 70% de sua massa fresca e com o metabolismo ativo (Castro *et al.* 2004). A secagem destas sementes ocasiona mudanças no pH intracelular e nas forças iônicas no citoplasma e estimulam a formação de ROS (*Reactive Oxygen Species* – espécies com oxigênio reativo) que tem efeitos potencialmente deletérios, pois muitas reações bioquímicas são executadas somente em uma estreita faixa de pH (Kranner e Birtic 2005, Kranner *et al.* 2010, Roach *et al*. 2010). A retirada da água também altera elementos responsáveis pela estrutura celular, especialmente as membranas, o que pode causar a perda da integridade celular e, consequentemente, o seu colapso (Kranner e Birtic 2005).

Por estas razões, as sementes sensíveis ao dessecamento precisam ser armazenadas mantendo-se o fornecimento de água suficiente para evitar sua desidratação abaixo do teor de água crítico (Bewley e Black 1994) e com metabolismo ativo, que normalmente é atingido mantendo a temperatura e umidade do ambiente de armazenamento mais elevadas que as convencionalmente utilizadas para sementes tolerantes ao dessecamento. De maneira geral, temperaturas entre 7 e 17°C têm sido reportadas como apropriadas para armazenar sementes recalcitrantes de florestas tropicais (Hong e Ellis 2002). Êxito no armazenamento em temperaturas próximas a estas foi reportado para algumas espécies como cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC; 8 ºC; Maluf *et al.* 2003 ou 12 ºC; Santana 2007), grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam; 7 ºC; Kohama *et al.* 2006), uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.; 12 ºC; Santana 2007), araucária (*Araucaria angustifolia* Bert. O. Kuntze; 0 ou 10 ºC; Chaves *et al.* 1999) e andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.; 12 e 14 ºC; Vianna 1982).

Em termos de umidade, as metodologias empregadas para a manutenção da viabilidade das sementes sensíveis ao dessecamento são bem variadas, por exemplo, o armazenamento das sementes em areia úmida (Kainer *et al.* 1999), em vermiculita úmida (Camargo e Ferraz 2004), submersas em água (Calvi et al. 2015a), em carvão vegetal (Bewley e Black 1994), utilizando substâncias osmoreguladoras, como polietileno glicol -

PEG(Rossetto *et* al. 2002) ou inibidores de germinação, como ácido abscísico - ABA (Goldbach 1979). Porém, baseado no gradiente de tolerância ao dessecamento apresentado pelas sementes recalcitrantes (Berjak e Pammenter, 2000), é esperado que as sementes de cada espécie respondam mais favoravelmente a um ou outro método de armazenamento. Assim, visando prolongar a viabilidade das sementes durante o armazenamento a curto e/ou médio prazo, o conhecimento acerca dos limites de temperatura e umidade críticos para as sementes é primordial. Estes limites não foram definidos para as sementes de *Eugenia stipitata*, objeto deste estudo.

Eugenia stipitata spp. *sororia* (Myrtaceae; araçá-boi) possui porte arbustivo (até 4 m de altura) e ocorre na região ocidental da Amazônia (Clements, 1989). Produz fruto carnoso com polpa rica em vitamina C (17.8 mmol g^{-1}, Hernández *et al.*, 2007)e de grande potencial econômico, consumida na forma de suco, geléias e sorvete (FAO 1987). Os frutos possuem até 22 sementes (McVaugh 1958; Ferreira 1992; Gentil e Ferreira 1999),com comprimento entre 0,6 e 2,8 cm (Ferreira 1992; Anjos e Ferraz 1999), sem endosperma (Flores e Rivera 1989) e sem diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones (McVaugh 1958).

As sementes de *E. stipitata* são sensíveis ao dessecamento e possuem teor de água (TA) letal em torno de 26% e a secagem das sementes reduziu de maneira acentuada a germinabilidade (Gentil e Ferreira 1999). Porém, o TA de segurança para secagem e armazenamento das sementes desta espécie não foi determinado. Pinedo *et al.* (1981) testaram o armazenamento das sementes de *E. stipitata* em sacos de papel ou submersas em água à temperatura ambiente e sob refrigeração. Em todas as condições, a germinabilidade foi reduzida para valores inferiores a 37% em 40 dias. A lixiviação das sementes em água corrente por até 90 dias como tratamento pré-germinativo também provocou a redução da germinabilidade após 50 dias devido à deterioração das sementes **(**Mendes e Mendonça 2012). Porém, as sementes mantidas submersas em água corrente mantiveram alta viabilidade por até um ano e muitas foram capazes de germinar mesmo submersas (Calvi *et al.* 2015a).

Desta forma, o objetivo neste trabalho foi acompanhar a germinabilidade e a viabilidade das sementes de *Eugenia stipitata* armazenadas por até um ano em diferentes condições de umidade e temperatura visando indicar procedimentos para manter a germinabilidade das sementes por curto e médio prazo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e beneficiamento das sementes

Frutos maduros de *Eugenia stipitata* spp. *sororia* foram obtidos no plantio experimental do INPA/CPCA (Campus III,V8) em Manaus em maio de 2010. Imediatamente após a colheita, as sementes foram retiradas dos frutos e friccionadas manualmente com areia e água (2:1) para a remoção das fibras aderidas ao tegumento. As sementes foram então lavadas acima de uma peneira com água em abundância até a remoção completa da areia e das fibras soltas.

Para este trabalho, foram selecionadas apenas sementes com diâmetro maior ou igual a 10 mm por meio de uma peneira de classificação granulométrica. Em seguida as sementes foram colocadas em sacos de plástico (espessura de 20 µm) separando cada repetição de cada tratamento e mantidas a 15 ºC até o início do experimento (cerca de 24 h).

Armazenamento das sementes

As sementes foram submetidas ao armazenamento em diferentes condições de umidade e de temperatura por um, três, seis, nove e doze meses. Como controle (CON), foram utilizadas sementes imediatamente após o beneficiamento.

No primeiro experimento (armazenamento das sementes em diferentes condições de umidade), o armazenamento foi realizado em ambiente de laboratório (25 ±2ºC), em sacos de plásticos contendo a mesma massa das sementes em vermiculita de granulometria fina (Brasil Minérios®). Para criar diferentes condições de umidade (definidas pelo teor de água da vermiculita – V-TA), adicionou-se água destilada à vermiculita. Misturando as sementes com vermiculita, sem adição de água, foi estabelecido V-TA de aproximadamente 23% ($V\text{-}TA_{23\%}$); um TA de cerca de 40% ($V\text{-}TA_{40\%}$) foi alcançado após a adição de água destilada em uma proporção de 0,5 g de água por grama de vermiculita; e um TA de 70% ($V\text{-}TA_{70\%}$) pela adição de dois gramas de água por grama de vermiculita. Os sacos de plástico foram perfurados seis vezes com uma agulha (diâmetro de 0,7 mm) para permitir a troca gasosa.

Em outro experimento (armazenamento das sementes em diferentes condições de temperatura), as sementes, nas mesmas condições do tratamento $V\text{-}TA_{40\%}$, descrita acima, foram armazenadas a 5, 10, 15, 20 e 25 ºC. A escolha do tratamento $V\text{-}TA_{40\%}$foi baseada nos resultados obtidos por Calvi *et al.* (2015b) que mostraram que sementes mantidas nestas condições sob 25 ºC mantiveram a germinabilidade acima de 92% por até 30 dias sem sinais de estresse (definido pela concentração dos compostos antioxidantes, glutationa e cisteína).

Desta forma, esperou-se que, reduzindo a temperatura, a longevidade das sementes pode ser aumentada.

Após cada período de armazenamento, quatro sacos (cada um representou uma repetição de 40 sementes) foram retirados aleatoriamente de cada tratamento e as sementes utilizadas para os testes descritos a seguir.

Viabilidade e determinação do teor de água das sementes

A avaliação da viabilidade e determinação do TA das sementes foram realizadas segundo a metodologia proposta por Calvi et al. (2015b).Vinte sementes por repetição foram cortadas longitudinalmente em quatro secções e o tegumento foi removido. Dois quartos foram utilizados para a coloração com cloreto de tetrazólio 1% 2,3,5-trifenil (tetrazólio; TZ; Vetec®, Brasil) a 30 ºC por 24 h no escuro em tubos marrons de plástico de 2,0 ml (Eppendorf®, Brasil), e em seguida fotografados. O restante das sementes foi utilizado para a determinação individual do TA do embrião (sem tegumento), por meio da secagem a 105 ºC ± 3 ºC por 24 horas e expressa em percentual de massa fresca (Brasil, 2009).

Após a coloração com TZ, as sementes foram classificadas em sementes viáveis (completamente coradas) e em sementes mortas (não coradas; Figura 2.1). Um terceiro padrão de coloração que compreendeu entre 1 e 10% das sementes nos tratamentos foi as "parcialmente coloridas", sendo sementes com algumas áreas não coloridas pela solução de TZ (Figura 2.1).

Testes de germinação

Os resultados do teste de viabilidade foram comparados com os resultados do teste de germinação usando o mesmo número de sementes (n = 20) por repetição. A germinação foi acelerada pela remoção do tegumento fibroso na região da radícula e na extremidade oposta. As sementes foram semeadas a uma profundidade de cerca de 1,5 cm em vermiculita de granulação média, em bandejas de plástico perfuradas (36 x 55 x 18 cm). O teste de germinação foi conduzido em viveiro com telhas transparentes no INPA, em Manaus. Durante este período, a média da temperatura mínima foi de 25,6±2,5 ºC e a média da temperatura máxima de 37,9±2,6 ºC. A germinação foi avaliada por 14 meses e, ao final deste tempo foi calculada a porcentagem final de germinação avaliando como critério a emergência do epicótilo acima do substrato.

Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental para os experimentos sobre o efeito dos diferentes ambientes de armazenamento sobre a porcentagem final de germinação e a viabilidade das sementes, foi o de parcelas subdivididas, onde as parcelas foram os tratamentos de umidade ou de temperatura de armazenamento e as sub-parcelas foram os diferentes períodos de armazenamento avaliados. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e depois as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. O efeito do armazenamento das sementes nos diferentes ambientes de umidade ou de temperatura ao longo do tempo foi verificado por meio do teste de Dunnett comparando o controle com os períodos de armazenamento em cada um dos experimentos separadamente. Um teste t para amostras independentes foi realizado para verificar possíveis diferenças entre os resultados do teste de viabilidade com o teste de germinação. Todos os testes foram realizados a 0,05 de significância.

RESULTADOS

Armazenamento em diferentes condições de umidade

Sementes recém-beneficiadas de *Eugenia stipitata* possuíam cerca de 60% de TA. A viabilidade pela coloração com tetrazólio foi de 100%, porém, no teste de germinação, apenas 67,5% das sementes germinaram (Figura 2.2). Quando armazenadas sem a adição de água (V-$TA_{23\%}$), as sementes reduziram o TA para 40,3% já no primeiro mês, o que provocou uma diminuição significativa das sementes completamente coradas ($P<0,001$; Figura 2.3). Entretanto, aproximadamente 56,0% das sementes foram parcialmente coloridas pelo teste de tetrazólio, o que pode explicar a subestimação da viabilidade com o teste de TZ em comparação com os resultados de germinação de 48,8% das sementes (Figura 2.2 e 2.3). Em período de armazenamento maior ou igual a três meses, os sacos de plástico permitiram a evaporação da água e o TA da vermiculita e das sementes foi reduzido para valores abaixo de 10%, causando a morte das sementes (Figura 2.2 e 2.3).

Com a adição de 0,5 gramas de água por grama vermiculita (V-$TA_{40\%}$) a perda de umidade da vermiculita, e consequentemente das sementes, foi mais lenta em comparação ao resultado anterior (Figura 2.2). Nesta condição, o TA das sementes foi mantido acima de 56% durante o primeiro mês, preservando a capacidade de germinação e a viabilidade das sementes (Figura 2.2). Após três meses, o TA foi reduzido para 53% e sinais de estresse puderam ser observados pelo teste de viabilidade com 22,5% das sementes parcialmente coradas e 12,5%

já mortas (Figura 2.3). Entretanto, 17,5% das sementes apresentaram protrusão da raiz primária durante o armazenamento (Figura 2.3). Após seis meses, os sacos de plásticos permitiram a dessecação da vermiculita a um TA de 17,7% o que causou a morte das sementes (Figura 2.2 e 2.3).

O armazenamento das sementes de *Eugenia stipitata* em sacos de plástico com adição de dois gramas de água por grama de vermiculita (V-$TA_{70\%}$) manteve a viabilidade das sementes por até 12 meses ao mesmo nível que o controle ($P > 0.05$; Figura 2.3). O TA da vermiculita neste tratamento foi maior que o TA inicial das sementes (60%) e, ao longo do armazenamento, as sementes embeberam e entraram em equilíbrio com a vermiculita com TA em torno de 62,1%. O aumento do TA das sementes possibilitou, provavelmente, a germinação durante o armazenamento. Aos três meses de armazenamento, 27,5% das sementes estavam germinadas e, a partir de seis meses, mais de 60% das sementes emitiram a raiz primária (Figura 2.3).

Armazenamento em diferentes temperaturas

O efeito de diferentes temperaturas no armazenamento das sementes de *Eugenia stipitata* pode ser verificado nas Figuras 2.4 e 2.5. O armazenamento a 25 e 20 ºC manteve a germinabilidade e viabilidade das sementes apenas no primeiro mês de avaliação. Após este período, observou-se redução do TA da vermiculita e das sementes, causando assim a progressiva perda de viabilidade e a morte de todas as sementes já aos seis meses (Figura 2.4). Comparadas com as condições de 10 e 15 ºC, a redução no TA da vermiculita e das sementes a 20 e a 25 ºC foi muito mais pronunciada e rápida. Esse fato pode ser explicado pelas características físicas do ambiente de armazenamento. A umidade relativa (UR) média do ambiente de 25 e 20 ºC era em torno de 75 e 70%, respectivamente e, aproximadamente a 85% nas câmaras frias de 5, 10 e de 15 ºC. O conteúdo de umidade do ar seco para cada uma das condições testadas neste trabalho foi verificado em uma carta psicométrica. A 5, 10 e 15 ºC, este valor foi de, aproximadamente, 5, 7 e 9 g de água por quilo de ar seco, nas condições de armazenamento deste estudo. Já para as condições de 20 e 25 ºC, este valor foi de 11 e 15 gramas de água por quilo de ar seco, respectivamente. Assim, os sacos de plásticos (que foram escolhidos por permitir trocas gasosas) deixaram evaporar a umidade da vermiculita e das sementes nos ambientes de temperaturas mais elevadas. Como consequência, as sementes dessecaram abaixo do nível letal (26%, Gentil e Ferreira, 1999) e morreram após seis meses de armazenamento (Figura 2.4 e 2.5).

O armazenamento a 15, 10 e 5 ºC manteve o TA da vermiculita e das sementes constante por todo o período avaliado (Figura 2.4). As sementes apresentaram alta viabilidade e germinabilidade por até 12 meses de armazenamento a 15 ºC (Figura 2.4 e 2.5). Armazenadas a 10 ºC mantiveram a viabilidade ao mesmo nível que o CON por até nove meses (Figura 2.5). A germinabilidade das sementes após o armazenamento nesta condição foi de 72,5 a 92,5%, sendo estatisticamente superior ao CON após três meses de armazenamento ($P < 0.05$; Tabela 2.2; Figura 2.4). É importante ressaltar que a redução da temperatura de armazenamento para 10 e 15 ºC houve um retardo na germinação das sementes durante o armazenamento. Sementes com emissão de raiz foram observadas somente aos nove e doze meses de armazenamento a 15 ºC e,sob temperatura de 10 ºC não se observou germinação durante todo período avaliado (Figura 2.5). Durante a condução do teste de germinação, algumas bandejas de plástico onde o teste de germinação estava sendo conduzido quebraram, impossibilitando assim a determinação da porcentagem de germinação final das sementes armazenadas a 10 e a 15 ºC após 12 meses.

As sementes toleraram o armazenamento a 5 ºC por até um mês, porém, após o terceiro mês, 55% das sementes estavam mortas e cerca de 40% já apresentaram áreas de tecidos mortos (parcialmente coradas pelo tetrazólio), resultando na significativa redução da viabilidade (Figura 2.5).

De todas as condições testadas apenas os tratamentos V-$TA_{70\%}$ a 25 ºC e V-$TA_{40\%}$ a 10 e a 15 ºC mantiveram as sementes de *Eugenia stipitata* viáveis por 12 meses. Desta forma, apenas para estes três tratamentos (V-$TA_{70\%}$ a 25 ºC, V-$TA_{40\%}$ a 10 ºC e a15 ºC)foi possível realizar uma análise mais robusta para verificar a interação entre os ambientes e os tempos de armazenamento. Esta análise mostrou que a interação foi não significativa, ou seja, não são esperadas quaisquer diferenças na germinabilidade das sementes armazenadas nestes três ambientes em quaisquer períodos (Tabela 2.1). Porém, comparando a porcentagem de germinação final após cada período do armazenamento com o controle, foi possível observar que, a partir do terceiro mês, a germinabilidade das sementes foi significativamente maior que o controle ($P < 0,001$; Tabela 2.1).

A coloração com o tetrazólio e a determinação do TA das sementes foram realizadas individualmente para cada semente o que permite avaliar a distribuição do TA das sementes em cada classe de coloração (Figura 2.6). Os resultados mostraram que as sementes completamente coradas, porém ainda sem germinar, apresentaram um TA médio de 58,3%, com a metade das observações distribuída entre os valores de 54,7 e 62,2%. Quando as sementes germinaram, o TA médio aumentou para 61,5%, que pode ser justificado pelo maior

consumo de água das sementes durante o processo germinativo. Sementes mortas apresentaram grande variação no TA (entre 7,8 e 54,1%), porém observa-se que a mediana está em valore próxima a 10%, indicando que a maior parte das sementes morreu devido ao dessecamento a níveis abaixo do letal (26%; Gentil e Ferreira, 1999). Sementes com elevado TA e não coradas pelo TZ (mortas) foram aquelas mortas devido à baixa temperatura (5 ºC) e/ou eram sementes de baixa qualidade. As sementes parcialmente coradas apresentaram TA com distribuição intermediária entre as sementes completamente coradas e as mortas, com mediana de 52% (Figura 2.6).

Avaliando todos os resultados apresentados até o momento para fazer uma recomendação mais prática para o armazenamento de sementes de *E. stipitata* foi realizada uma correlação entre o TA da vermiculita e o respectivo TA das sementes ao final de cada período de armazenamento nos diferentes tratamentos testados. Analisando a Figura 2.7, percebe-se que, quando o TA da vermiculita foi mantido em valores maiores ou iguais a 24,9%, o TA das sementes foi sempre superior a 55%. Este valor pode ser considerado seguro para manutenção da viabilidade das sementes de *E. stipitata*, pois está dentro da faixa onde foi observada a metade dos valores de TA das sementes viáveis completamente coradas pelo TZ (54,7 a 62,2%) conforme mencionado anteriormente.

DISCUSSÃO

Por apresentarem sementes recalcitrantes (Pinedo *et al.* 1981) e serem dispersas com alto TA, as sementes de *E. stipitata* mostram sinais de perda de viabilidade com o dessecamento. O efeito da secagem sobre a germinabilidade das sementes mostrou que, quando secadas à sombra por um e três dias, o TA das sementes foi reduzido de 58,8% para 47,1%) e resultou em uma perda significativa de germinabilidade de 80% para 59% (Gentil e Ferreira 1999). Devido a falta de observações intermediárias, os autores concluíram que o TA onde as sementes iniciam a perda da viabilidade está situado em um teor de água entre 58,8 e 47,1%. Neste trabalho, a faixa do teor de água de segurança para a manutenção da viabilidade das sementes de *E. stipitata* pode ser estreitada para valores entre 54,7 e 62,2%, pois abaixo deste limite inferior muitas sementes estavam parcialmente coradas, sinais de perda de viabilidade. Com TA acima deste limite superior, a maioria das sementes germinou durante o armazenamento (Figura 2.6).

Outras espécies de *Eugenia* apresentam sensibilidade ao dessecamento, porém os níveis variam entre as espécies. Delgado e Barbedo (2007) estudaram o efeito da secagem sobre a germinabilidade de seis espécies e identificaram três grupos em relação à

sensibilidade ao dessecamento; sementes de *E. umbelliflora e E. cerasiflora* foram mais tolerantes e iniciaram a perda da viabilidade com TA em torno de 45%. *E. uniflora, E. brasiliensis*e *E. involucrata* situaram-se em posição intermediária, com início de perda da viabilidade com um TA entre 45 e 50%. *Eugenia pyriformis* apresentou as sementes mais sensíveis, com perda da viabilidade com TA próximo a 65%, embora, em um outro estudo, as sementes desta espécie começaram a perder a viabilidade apenas com a redução do TA de 40 para 30% (Scalon *et al.* 2012). Utilizando estes valores como referência, as sementes de *E. stipitata* podem ser enquadradas no grupo das sementes mais sensíveis ao dessecamento, pois a redução na área corada pelo tetrazólio foi abaixo de um TA de 54,7% (Figura 2.6).

Embora a determinação da sensibilidade ao dessecamento seja de interesse científico, em termos práticos, a reduzida longevidade das sementes recalcitrantes, mesmo no armazenamento úmido é mais importante para o manuseio das sementes. As causas da vida curta são desconhecidas, mas os resultados apresentados na revisão realizada por Berjak e Pammenter (2013) sugerem que se trata de uma consequência do metabolismo germinativo, uma vez que, plenamente hidratadas, as sementes irão germinar e, o armazenamento úmido se torna uma opção estritamente de curto prazo (Berjak e Pammenter 2008). Desta forma, a redução do metabolismo germinativo, seja pela redução da temperatura, da umidade ou outras técnicas como o uso de substâncias osmorreguladoras, pode ser um importante caminho para a conservação das sementes recalcitrantes a curto e médio prazo. Quando armazenadas em temperaturas de 10 e 15 ºC e misturadas com vermiculita a um TA inicial de 40%, as sementes recalcitrantes de *E. stipitata* se mantiveram viáveis por até um ano e com baixa taxa germinativa, mostrando a eficiência desta técnica na redução do metabolismo germinativo. No caso especifico desta espécie, a germinação durante o armazenamento pode não acarretar problemas no manuseio das sementes, uma vez que, mesmo raízes ou parte aérea danificadas ou cortadas, podem ser regeneradas (Calvi *et al.* 2015a).

Nos estudos sobre o potencial de armazenamento de sementes recalcitrantes tropicais (Ferraz e Sampaio, 1996; Barbedo *et al.*, 1998; Andrade e Ferreira, 2000; Garcia e Lima, 2000; Ferreira e Gentil, 2003; Maluf *et al.*, 2003; Scalon *et al.*, 2004; Kohama *et al.*, 2006; Justo *et al.*, 2007; Martins *et al.* 2007; Santana, 2007; Nascimento *et al*. 2010), os períodos mais longos que mantiveram pelo menos parte dos lotes viáveis foram de cinco a nove meses. Porém, menor perda de viabilidade foi obtida geralmente em períodos mais curtos (até três meses), quando as sementes foram mantidas sem secagem prévia ou sem redução do TA por um dessecamento. Por se tratar de sementes recalcitrantes, é de se esperar que a redução do teor de água por secagem ou pelo armazenamento em ambiente seco (baixa umidade relativa)

prejudique a longevidade das sementes. Neste trabalho foi realizado o contrário; ao invés de secar as sementes para o armazenamento, elas foram mantidas úmidas com vermiculita testando a adição de diferentes quantidades de água e, desta forma, foi possível manter a viabilidade das sementes por até um ano.

No estudo de armazenamento das sementes de *Euterpe oleracea* o teor de água foi mantido constante durante um ano, por selar as sementes em sacos de plásticos com espessura de 0,1 mm. O maior período de armazenamento foi de nove meses quando armazenadas sem secagem (TA de 43,4%) e a 20 ºC (Nascimento *et al.* 2010). A perda de viabilidade após este período pode ter sido causada pela falta de oxigenação. No presente trabalho, os sacos de plásticos estavam perfurados e os tratamentos que mantiveram o TA inicial da vermiculita constante, foram eficientes na preservação da viabilidade das sementes por todo o período estudado. Embora, quando mantidas a 25 ºC muito úmidas ($V\text{-}TA_{70\%}$) as sementes germinaram durante o armazenamento. A redução da temperatura para 10 ou 15 ºC e a redução da umidade da vermiculita ($V\text{-}TA_{40\%}$) reduziu a germinação durante o armazenamento e manteve a viabilidade inicial das sementes por até um ano, neste caso a umidade da vermiculita e o teor de água das sementes foram mantidos pela UR alta das câmaras (Figura 2.4 e 2.5).

Por ser uma espécie tropical, é surpreendente que as sementes de *Eugenia stipitata* toleraram condições de 5 ºC por um mês e de 10 ºC por até um ano, pois a grande maioria das espécies tropicais não tolera temperaturas abaixo de 15 °C (Baskin e Baskin 1998, Pammenter e Berjak 1999). Sementes de *E. pyriformis* também mostraram tolerância à 5 ºC quando armazenadas na geladeira por 1 mês, porém não toleraram armazenamento a -18 ºC (Scalon *et al.* 2012). Armazenadas a 8 ºC, as sementes de *E. involucrata* mantiveram 78% de germinabilidade após 4 meses (Barbedo *et al.* 1998) e 53% após 6 meses nesta mesma temperatura (Maluf *et al.* 2003).

A germinabilidade das sementes após três meses de armazenamento aumentou (em todos os tratamentos em que o TA das sementes foi mantido estável) em relação às sementes recém-beneficiadas. Resultados semelhantes foram obtidos com sementes de outras espécies do gênero, como *E. pyriformis* (Scalon *et al.* 2004) e *E. pleurantha* (Masetto *et al.* 2008). Os embriões das sementes de *Eugenia* são específicos e denominados eugenóides. McVaugh (1958) os descreveu como um conjunto massivo de células sem aparente diferenciação entre o eixo embrionário e os cotilédones. Outros autores classificam ainda os embriões de *Eugenia* como conferruminado, ou seja, os cotilédones apresentam-se aderidos, sem vestígio de eixo hipocótilo-radícula, sugerindo a presença de tecido meristemático não diferenciado (Barroso

et al. 1991). Foi proposto que os embriões deste gênero possuem imaturidade morfológica, necessitando de um período de pós-maturação para completar o seu desenvolvimento, justificando o longo período até iniciar a germinação das sementes (Andrade *et al* 2003, Maluf *et al*. 2003, Masetto *et al*. 2009, Kohama *et al*. 2006, Calvi *et al*. 2015a, Calvi *et al*. 2015b). Neste sentido, o armazenamento úmido das sementes de *E. stipitata* testado neste trabalho possibilitou que as mesmas completassem a maturação. No caso específico de *E. stipitata*, o complemento da maturação e a germinação das sementes pode ocorrer até mesmo quando estão submersas em água corrente em um período de, no mínimo, 60 dias (Calvi *et al.* 2015a).

Embora não seja o objetivo principal deste trabalho, vale ressaltar que os resultados do teste de germinação e do teste de viabilidade foram semelhantes para todas as condições de armazenamento testadas neste trabalho, exceto o tratamento V-$TA_{70\%}$ e para as sementes armazenadas por menos do que um mês (Figura 2.2 e 2.4). Supõe-se que esta discrepância apenas nos períodos iniciais está mais relacionada à imaturidade do embrião do que à metodologia dos testes de germinação e viabilidade adotados. A semente imatura foi corada, entretanto não apresentou ainda alta percentagem de germinação. Após período de maturação os resultados dos testes de viabilidade com os correspondentes testes de germinação não apresentaram diferença estatística.

A morfologia das sementes de *E. stipitata*, especificamente o embrião indiferenciado facilitou a avaliação do teste de TZ, e, considerando que o resultado do teste de viabilidade pode ser obtido em poucas horas, em comparação aos muitos meses necessários para a conclusão do teste de germinação. Calvi *et al.* (2015b) também não observaram diferenças significativas entre a avaliação da germinabilidade e da viabilidade e recomendaram o teste de viabilidade pela coloração com tetrazólio como uma ferramenta útil para a avaliação da qualidade das sementes de *E. stipitata.* Neste trabalho as sementes foram classificadas somente em três categorias: completamente, parcialmente ou não coradas. A subdivisão das sementes parcialmente coradas, de acordo com o percentual da área tingida, pode refinar os resultados em pesquisas futuras.

Em linhas gerais os resultados deste trabalho mostraram a possibilidade prática de manter a viabilidade inicial das sementes altamente recalcitrantes de *Eugenia stipitata* por até um ano. É importante que as sementes sejam mantidas com um teor de água entre 54,7% e 62,2%, o que pode ser obtido, misturando as sementes com vermiculita com um teor de água maior ou igual a 25%. As sementes desta espécie são tolerantes à refrigeração mínima de até 10 ºC. Recomenda-se o armazenamento em sacos de plástico com vermiculita umedecida em

temperaturas entre 10 e 15 °C. Estas condições, além de retardar o metabolismo germinativo, possibilitam a maturação dos embriões, aumentando a porcentagem final de germinação, em comparação às sementes recém-beneficiadas. Há ainda a possibilidade de armazenar as sementes em temperaturas mais elevadas (25 ºC), porém, faz-se necessário aumentar a umidade do ambiente o que acarreta maior germinabilidade das sementes durante o armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, A.C.S.; Cunha, R.; Souza, A.F.; Reis, R.B.; Almeida, K.J. 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree *Eugenia dysenterica* DC. *Seed Science and Technology*, 31: 125-137.

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

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

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.

Barroso, G.M.; Morim, M.P.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F. 1991. *Sistemática de angiospermas do Brasil.* Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 443 p.

Baskin, C.C.; Baskin, J.M. 1998. *Seeds. ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. San Diego: Academic Press. 666p

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

Berjak, P.; Pammenter, N.W. 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in perspective. *Annals of Botany*,101: 213-228.

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

Bewley, J.D.; Black, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*, New York: Plenum Press, 445p.

Brasil. 2009. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 399p.

Calvi, G.P.; Aud, F.F.; Ferraz, I.D.K.; Pritchard, H.W; Kranner, I. 2015b.Capítulo 1. Totipotent germination and stress biology of recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh: a model species for desiccation sensitivity studies. Presente trabalho. Submetido à *Plant Biology* em 06/02/2015.

Calvi, G.P.; Anjos, A.M.G; Ferraz, I.D.K. 2015a. Capítulo 3. Submersão de sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: a ecologia apoiando a tecnologia de sementes. Presente trabalho.

Camargo, J.L.C; Ferraz, I.D.K. 2004. Acariquara-roxa, *Minquartia guianensis* Aubl, Olacaceae. *In*: Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C. (Ed.) *Manual de Sementes da Amazônia*. f.4. Manaus, INPA. 8p.

Castro, R.D.K.; Hilhorst, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. p. 149-162. *In:* A.G. Ferreira; F. Borghetti (eds.) *Germinação – do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Editora Artmed. 323p.

Chaves, A.; Mugredgei, A.; Fassola, H.; Alegranza, D.; Fernández, R. 1999. Conservación refrigerada de semillas de *Araucaria angustifolia*. Bosque 20,117-124. *Apud*: Floriano, E.P. 2004. *Armazenamento de sementes florestais.* Cadernos didáticos nº1, 1ª ed. Santa Rosa. 10p.

Clement, C.R. 1989.A center of crop genetic diversity in western Amazonia. *BioScience*, 39: 624-631.

Daws, M.I.; Davies, J.; Vaes, E.; van Gelder, R.; Pritchard, H.W. 2007. Two-hundred year seed survival of *Leucospermum* and two other woody species from the Cape floristic region, South Africa. *Seed Science Research*, 17:73- 79.

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

FAO 1987. *Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos 3. Ejemplos de America Latina*. FAO, Roma. 241p.

Ferraz, I.D.K.; Sampaio, P.T.B. 1996. Métodos simples de armazenamento das sementes de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C. – Meliaceae). *Acta Amazonica*. 26: 137-144.

Ferreira, S.A.N. 1992. Biometria de frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Acta Amazonica*,22: 295-302.

Ferreira, S.D.N.; Gentil, D.D.O. 2003. Armazenamento de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) com diferentes graus de umidade e temperaturas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 440-442.

Flores, E.M.; Rivera, D.I. 1989. Criptocotilia en algunas dicotiledoneas tropicales. *Brenesia*, 32: 19-26.

Garcia, L.C.; Lima, D. 2000. Comportamento de sementes de *Copaifera multijuga* durante o armazenamento. *Acta Amazonica*, 30: 369-375

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

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.

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

Hernández, M.S.; Martínez, O.; Fernández-Trujillo, J.P. (2007) Behavior of arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening. *Scientia Horticulturae*, 111:220-227.

Hong, T.D.; Ellis, R.H. 1998.Contrasting seed storage behavior among different species of Meliaceae. *Seed Science and Technology* 26: 77–95.

Hong, T.D.; Ellis, R.H. 2002. Storage. p. 125-136 *In*: Vozzo, J.A. (org.) *Tropical tree seed manual*. USDA/United States Department of Agriculture: Forest Service. Agriculture Handbook 721, 899 pp.

Kainer, K.A.; Duryea, M.L.; Malavasi, M.M.; Silva, E.R.; Harrison, J. 1999. Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery mangement. *Forest Ecology and Management*, 116: 207-217.

Kohama, S.; Maluf, A.M.; Bilia, D.A.C.; Barbedo, C.J. 2006.Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes*, 28: 72-78.

Kranner, I.; Birtic, S. 2005.A modulating role for antioxidants in dissection tolerance.*Integr. Comp. Biol.*, 45: 734-740.

Kranner, I.; Minibayeva, F.V.; Beckett, R.P.; Seal, C.E. 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science.*New Phytologist*,188: 655–673.

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

Martins, C.C.; Bovi, M.L.A.; Nakagawa, J. 2007. Qualidade fisiológica de sementes de palmiteiro-vermelho em função da desidratação e do armazenamento. *Horticultura Brasileira* 25: 188-192.

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

Masetto, T.E.; Faria, J.M.R.; Davide, A.C.; Silva, E.A.A. 2008. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg.(Myrtaceae) seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 30: 51 -56.

McVaugh, R. 1958. Flora of Peru. *Botanical Series Field Museum of Natural History*, 13: 569-818.

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

Nascimento, W.M.O.; Cicero, S.M.; Novembre, A.D.L.C. 2010. Conservação de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).*Revista Brasileira de Sementes*, 32: 24-33.

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

Pinedo, M.; Ramírez, F.; Blasco, M. 1981. *Notas preliminares sobre El arazá (Eugenia stipitata), frutal nativo de La Amazonia peruana*. INIA/IICA, Lima. 58p.

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

Rossetto, C.A.V.; Lima, T.M. e Nakagawa, J. 2002. Qualidade fisiológica e potencial de armazenamento de sementes de tomate submetidas ao condicionamento osmótico. *Hortic. Bras.*, vol.20, n.4, pp. 630-634.

Santana, P.J.A. 2007. Maturação, secagem e armazenamento de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) Dissertaçao de Mestrado, Intituto de Botânica, São Paulo. 80p.

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

Scalon, S.P.Q.; Scalon Filho, H.; Rigoni, M.R. 2004. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. *Ciência e Agrotecnologia*, 28: 1228-1234.

Shenmiller,J.; Mudgett, M.B.; Schopf, J.W.; Clarke, S.; Berger, R. 1995. Exceptional seed longevity and robust growth – ancient sacred lotus from China. *American Journals of Botany*, 82:1367-1380.

Vianna, N.G. 1982. Conservação de sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). Circular técnica, 34. Embrapa-CPATU, Belém, PA.10 p.

Tabela 2.1. Germinação (%) das sementes de *Eugenia stipitata* recém-coletadas (Controle), armazenadas em vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 40% a 10 ou 15 ºC por zero, um três seis e nove meses. Dados representam médias ± desvio padrão.

Tratamento	Tempo de armazenamento (meses)				
	0	1	3	6	9
Controle	67,5 ± 15,00	-	-	-	-
V-TA$_{70\%}$ - 25ºC	-	83,8 ±10,31	90,0 ± 4,08 *	95,0 ± 4,08 *	100,0 ±0,00 *
V-TA$_{40\%}$ - 15 ºC	-	83,8 ±13,31	90,0 ± 7,07 *	83,8 ± 7,50	85,0 ± 10,00*
V-TA$_{40\%}$ - 10 ºC	-	72,5 ± 6,46	86,3 ± 6,29 *	86,3 ± 8,54 *	92,5 ±5,00 *
CV$_{tratamento}$ = 8,67%;CV$_{tempo}$ = 8,17%; F$_{Interação}$ = **1,815**; W$_{Interação}$ = **0,979**; F$_{Dunnett}$ = **2,945**; W$_{Dunnet}$ = **0,980**					

Não foi aplicado o teste de comparação de médias, pois o F de interação tratamento *vs* tempo (1,767) não foi significativo; W;F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a 0,05 de significância; * médias diferentes do controle pelo teste de Dunnett a 0.05 de significância.

Figura 2.1. Padrões de coloração das sementes de *Eugenia stipitata* pela solução de cloreto de tetrazólio a 1% de 2,3,5-trifenil durante 24 h a 30 ºC no escuro. (A) sementes viáveis completamente coradas, (B e C) sementes parcialmente coradas e (D) sementes mortas não coradas. Áreas coradas em roxo escuro indicam alta viabilidade celular e a falta de coloração indica a morte do tecido.

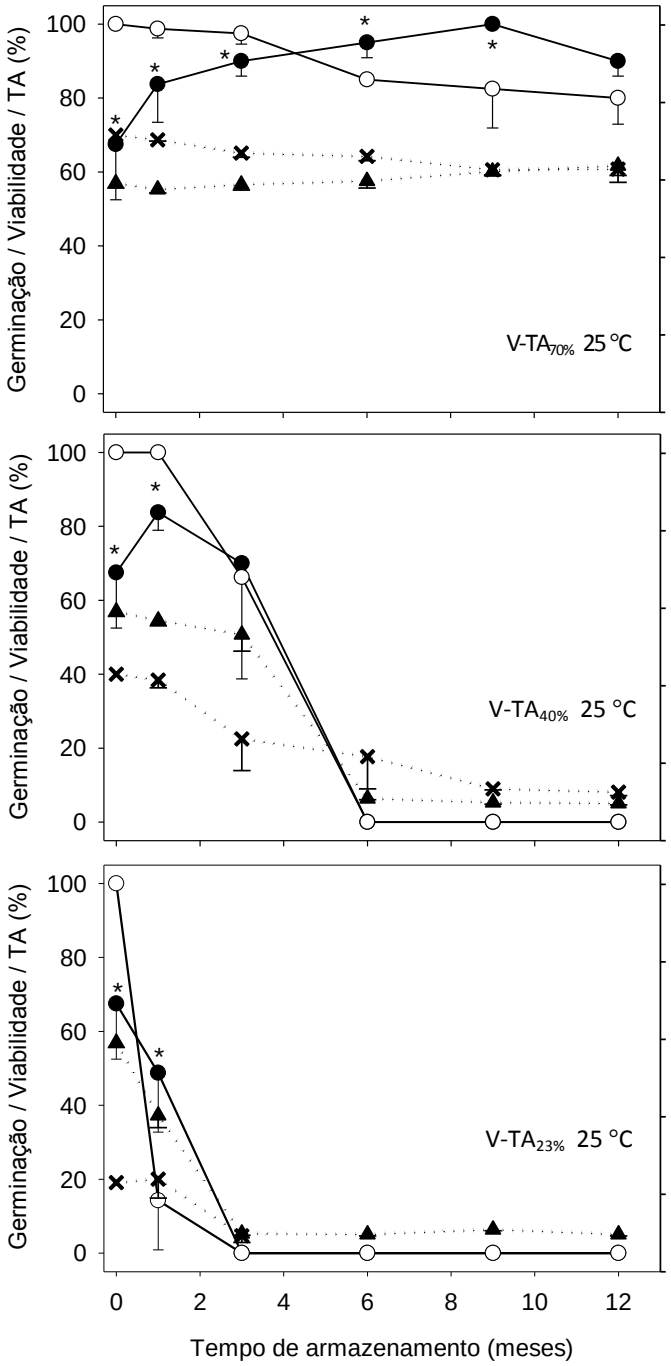

Figura 2.2. Porcentagem de germinação final (círculos fechados), viabilidade (círculos abertos) e teor de água (TA), expresso na base úmida, da vermiculita (x) e das sementes (triângulos fechados) de *Eugenia stipitata* armazenadas a 25 ºC em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 70% ($V\text{-}TA_{70\%}$), 40% ($V\text{-}TA_{40\%}$) ou 23%($V\text{-}TA_{23\%}$) ao longo de um ano. Dados representam médias e desvio padrão. Asteriscos representam diferenças entre a porcentagem de germinação final e viabilidade pelo teste t ($P<0.05$).

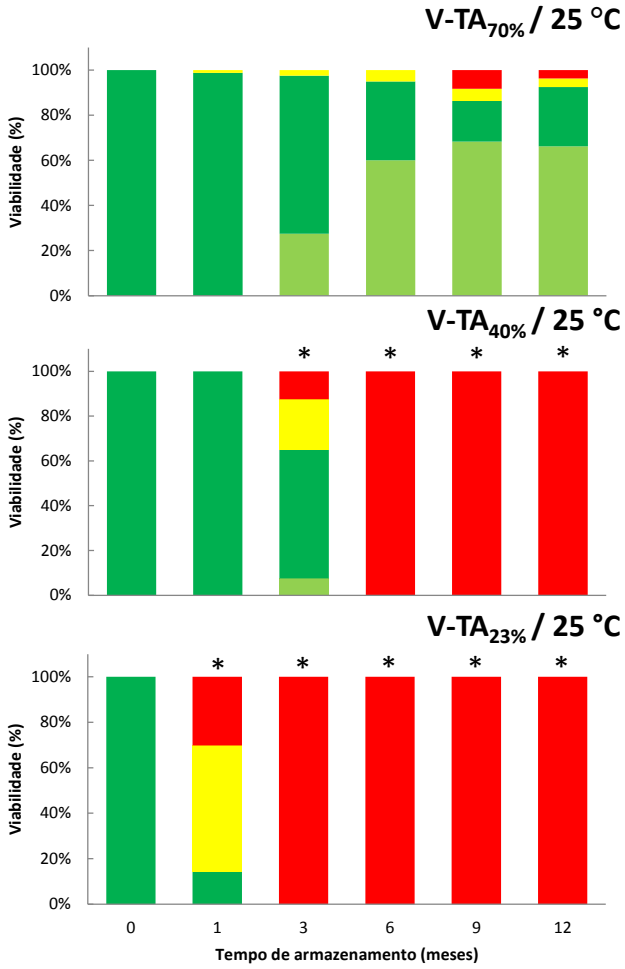

Figura 2.3. Viabilidade aferida pela coloração com tetrazólio para as sementes *Eugenia stipitata* armazenadas a 25 ºC em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 70% (V-$TA_{70\%}$), 40% (V-$TA_{40\%}$) ou 23% (V-$TA_{23\%}$) ao longo de um ano. Sementes coloridas pelo tetrazólio (viáveis) estão representadas em verde escuro; as sementes parcialmente coloridas em amarelo e as não coloridas (mortas) em vermelho. Sementes germinadas durante o armazenamento estão indicadas em verde claro. Dados representam médias de cinco repetições de 20 sementes. Asteriscos representam percentual de sementes viáveis diferentes do controle pelo teste de Dunnett a 0.05 de significância.

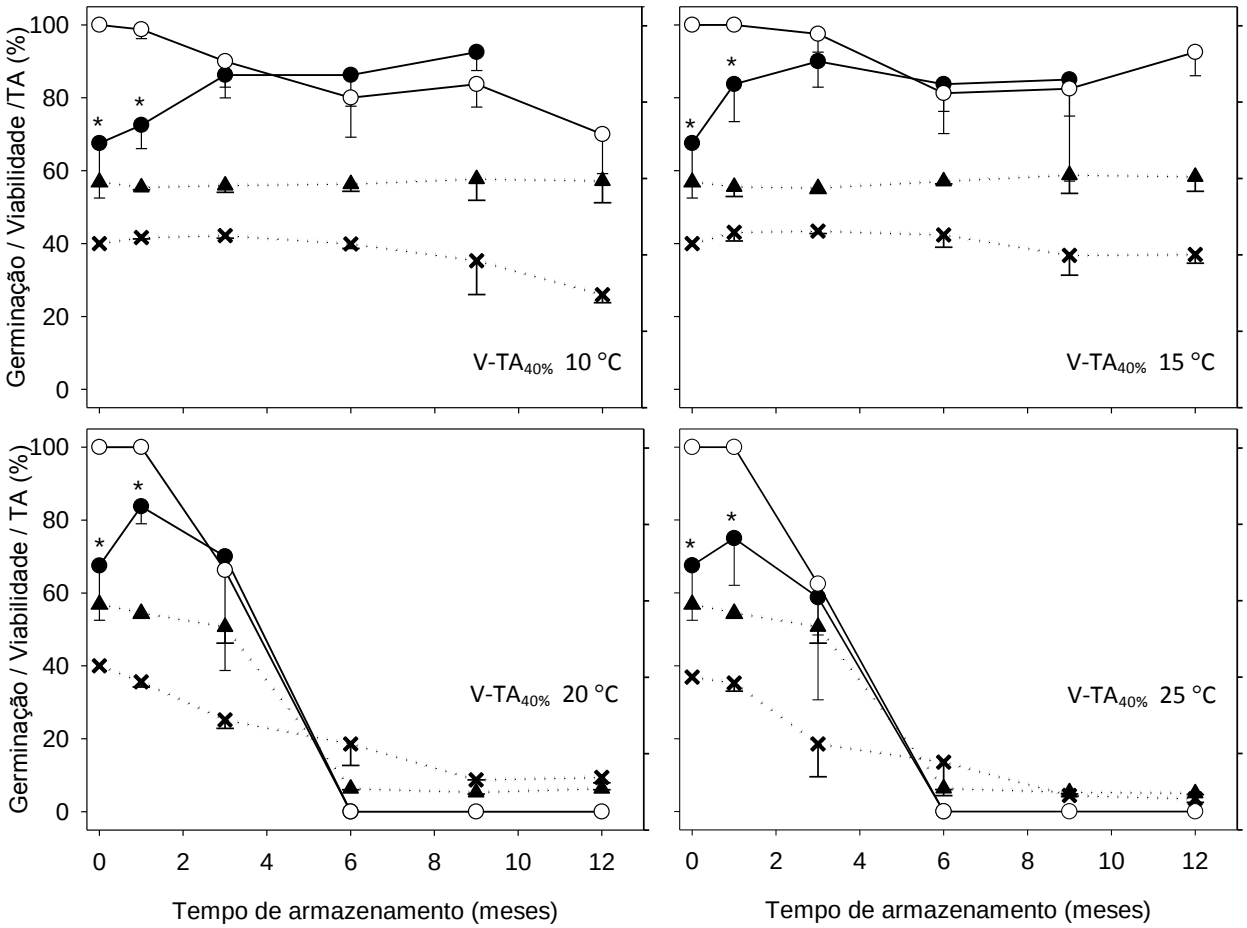

Figura 2.4. Porcentagem de germinação final (círculos fechados), viabilidade (círculos abertos) e teor de água (TA), expresso na base úmida, da vermiculita (x) e das sementes (triângulos fechados) de *Eugenia stipitata* armazenadas em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 40% (V-$TA_{40\%}$) a 10, 15, 20 ou 25 ºC ao longo de um ano. Dados representam médias e desvio padrão. Asteriscos representam diferenças entre a porcentagem de germinação final e viabilidade pelo teste t ($P<0.05$).

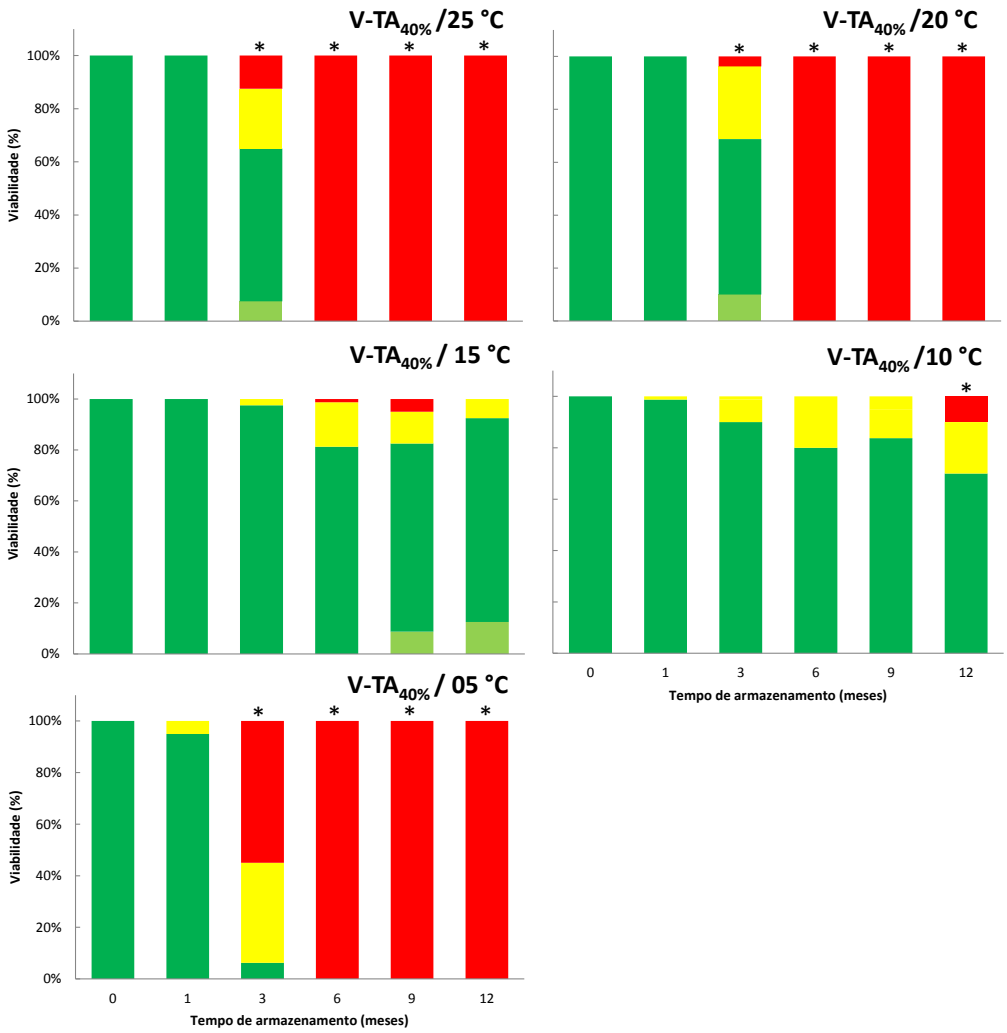

Figura 2.5. Resultados do teste de viabilidade pela coloração com tetrazólio para as sementes *Eugenia stipitata* armazenadas em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água em torno de 40% (V-TA$_{40\%}$) a 5, 10, 15, 20 ou 25 ºC ao longo de um ano. Sementes coloridas pelo tetrazólio (viáveis) estão representadas em verde escuro; as sementes parcialmente coloridas em amarelo e as não coloridas (mortas) em vermelho. Sementes germinadas durante o armazenamento estão indicadas em verde claro. Dados representam médias de cinco repetições de 20 sementes. Asteriscos representam percentual de sementes viáveis diferentes do controle pelo teste de Dunnett a 0.05 de significância.

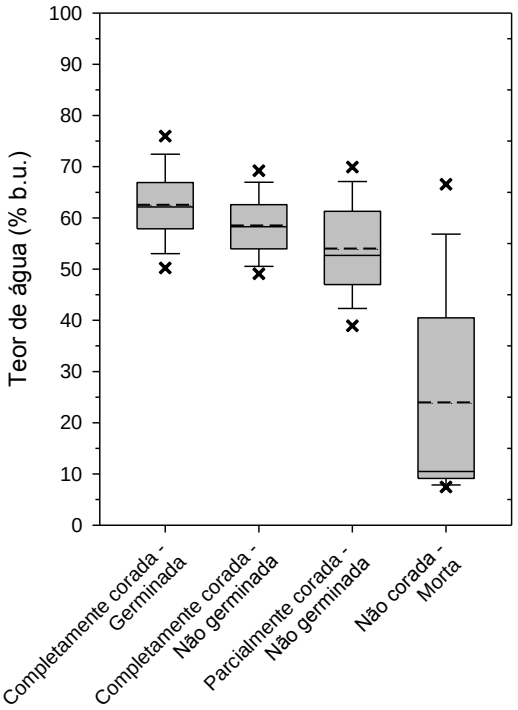

Figura 2.6. Teor de água das sementes de *Eugenia stipitata* armazenadas em diferentes condições de umidade e temperatura agrupadas de acordo com o teste de viabilidade pela coloração com tetrazólio em sementes completamente coradas e germinadas durante o armazenamento (n=343) ou não germinadas (n=1356), sementes parcialmente coradas e não germinadas (n=219) e sementes não coradas e mortas (n=501). A linha pontilhada representa o valor médio da amostra e os símbolos "x" representam os valores no 5º e no 95º percentil dentro de cada categoria.

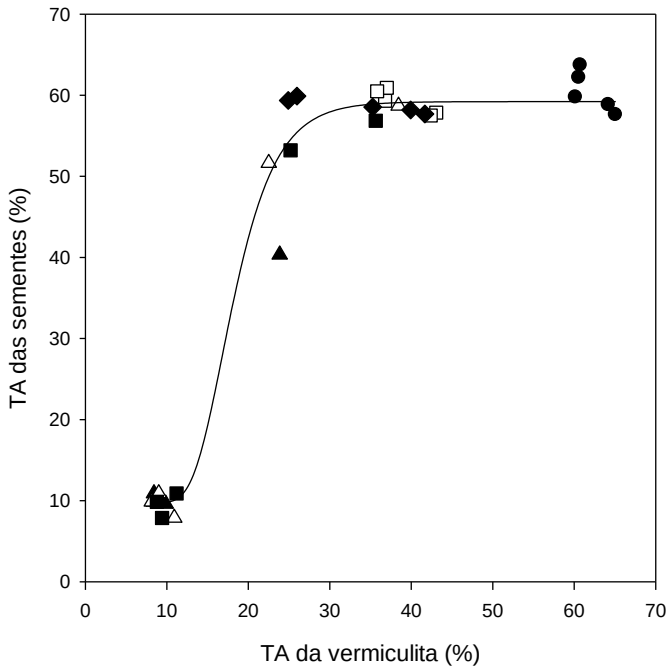

Figura 2.7. Relação do teor de água (TA) da vermiculita utilizada para o armazenamento das sementes de *Eugenia stipitata* e o TA das sementes em equilíbrio. As sementes foram armazenadas em sacos de plástico contendo vermiculita umedecida inicialmente a um teor de água próximo a 70% (V-$TA_{70\%}$; círculos fechados), ou a um teor de água em torno de 40% e acondicionada a 10 ºC (losangos fechados), a 15 ºC (quadrados abertos), a 20 ºC (quadrados fechados) ou a 25 ºC (triângulos abertos) ou sem a adição de água (V-$TA_{23\%}$; triângulos fechados). Cada símbolo representam médias de quatro repetições de 20 sementes. Linha representa o modelo sigmoidal (y=9,73+49,48/(1+exp(-(x-0,104)/3,61))^108,94) com R^2 de 98,5%.

CAPÍTULO 3

Calvi, G.P.; Anjos, A.M.G & Ferraz, I.D.K.F. Submersão de sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: a ecologia apoiando a tecnologia de sementes. Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*.

CAPÍTULO 3

Submersão de sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: a ecologia apoiando a tecnologia de sementes[3]

Geângelo P. CALVI[A*], Antônio Mauro Guimarães dos ANJOS[B], Isolde D.K. FERRAZ[A]

[A] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade. Caixa Postal 2223, Manaus, 69080-971, AM, Brasil. (**gpcalvi@inpa.gov.br**; **iferraz@inpa.gov.br**)
[B] Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Flona de Açú. Caixa Postal 40, Assú, 59650-000, RN, Brasil. (**mauro.anjos@icmbio.gov.br**)

* Autor para correspondência: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade. Caixa Postal 2223, Manaus, 69080-971, AM, Brasil.. Telefone: +55 92 36431825. Fax: +55 92 36431838. E-mail: **gpcalvi@inpa.gov.br**

RESUMO
Eugenia stipitata é uma espécie de ocorrência natural em áreas próximas a grandes rios e que apresenta grande potencial econômico. Produz sementes recalcitrantes e de curta longevidade, dificultando o manejo das sementes. Desta forma, este trabalho testou a possibilidade de utilizar a tolerância à submersão apresentada pelas sementes desta espécie como um método alternativo para o armazenamento a curto ou médio prazo. Foram testados dois métodos de submersão que diferem na altura da coluna d'água. Sementes do Lote 1 foram submersas em recipientes de plástico perfurados a 6 cm de altura e, as do Lote 2, em vasilhames de vidro com altura de 26 cm. Uma mangueira manteve o fluxo de água constante durante todo o teste. As sementes dos dois lotes foram mantidas nestas condições por até um ano e tiveram a germinação avaliada periodicamente. Para as sementes do Lote 2 também foram avaliadas a viabilidade com tetrazólio e a capacidade de regeneração das sementes germinadas após a remoção da plântula, simulando possíveis danos causados pelo manejo das sementes. As sementes sobreviveram à submersão em água corrente, independente da altura da coluna d'água. O estresse causado pela submersão foi observado durante os primeiros 30 dias, com a redução na velocidade de germinação. Porém as sementes se adequam ao ambiente e podem até germinar enquanto submersas. Sementes de *E. stipitata* são capazes de se recuperar e produzir novas raízes e formar plântulas normais, mesmo após a remoção da raiz e da parte aérea. A submersão das sementes em água corrente pode ser recomendada sem prejuízos à viabilidade por até um ano, porém as sementes iniciam a germinação a partir dos dois meses de submersão.

Palavras-chaves: Sementes recalcitrantes; Tetrazólio; Teste de germinação; Armazenamento; Teste de viabilidade.

[3] Capítulo redigido nas normas da revista Acta Amazônica

INTRODUÇÃO

Em contraste com as sementes tolerantes ao dessecamento, sementes sensíveis ao dessecamento (também chamadas de recalcitrantes) não adquirem no final do desenvolvimento mecanismos para tolerar ou se recuperar de um dessecamento (Berjak e Pammenter 2008). Como são dispersas com alto teor de água e metabolismo ativo, o armazenamento das sementes recalcitrantes pelos métodos convencionais não é possível. Técnicas que conseguiram aumentar a longevidade a curto e médio prazo visam reduzir o metabolismo pela redução do teor de água das sementes ou pela redução da temperatura e/ou oxigênio do ambiente, observando o nível mínimo tolerado pela espécie (Ferreira e Gentil 2003; Maluf *et al*. 2003; Santana, 2007; Araújo *et al*. 2008; Ribeiro *et al*. 2010). Desta forma, estudos detalhados para definir estes limites precisam ser realizados para cada espécie.

Eugenia stipitata spp. *sororia* (Myrtaceae), também conhecida como araçá-boi, é um arbusto de até quatro metros de altura que ocorre na região da Amazônia Ocidental (Clement 1989). A espécie foi encontrada na região do alto rio Huallaga (San Martín, Peru), na confluência dos rios Beni e Madre de Díos (Beni, Bolívia), Villavicencio (Meta, Colombia) e no rio Envira (Amazonas, Brasil; McVaugh 1956, 1958). É uma espécie pouco exigente a fertilidade do solo e adaptada a regiões com precipitação anual entre 1500 a 4000 mm (Villachica *et al.* 1996). No Peru, a região de maior diversidade de araçá-boi silvestre está em áreas de selva (Pinedo *et al.* 1981).

A espécie produz flores e frutos de forma contínua durante o ano, com maior produção de frutos na estação chuvosa (Acevedo *et al*. 1996). Seus frutos possuem grande potencial econômico para a indústria local de processamento de polpa (FAO 1987). O fruto é do tipo baga e contém até 22 sementes (McVaugh 1958; Ferreira 1992; Gentil e Ferreira 1999). As sementes maduras medem entre 0,6 e 2,8 cm (Ferreira 1992; Anjos e Ferraz 1999), não possuem endosperma (Flores e Rivera 1989) e não há diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones (McVaugh 1958). Suas sementes são classificadas como sensíveis ao dessecamento, perdendo a viabilidade com teores de água abaixo de 26% (Gentil e Ferreira 1999). Após 10 dias sob condições de clima temperado subtropical sem embalagem, as sementes de *E. stipitata* perdem a capacidade de germinação (Pinedo *et al*. 1981). A germinação das sementes leva mais que quatro meses e pode ser reduzida para dois meses removendo o tegumento fibroso que envolve as sementes e causa restrição mecânica à expansão do embrião (Anjos 1998; Gentil e Ferreira 1999). A possibilidade de que o embrião seja disperso ainda imaturo também foi sugerida (Anjos e Ferraz 1999). O embrião é totipotente, possui potencial meristemático e pode germinar mesmo quando cortado em duas

metades (Anjos e Ferraz 1999; Mendes e Mendonça 2012) ou quatro pedaços (Calvi et al. 2015).

Devido à característica recalcitrante das sementes de *E. stipitata*¸ seu armazenamento em longo prazo é difícil. Pinedo *et al.* (1981) testaram entre outros tratamentos o armazenamento das sementes de *E. stipitata* por até 40 dias submersas em água à temperatura ambiente e sob refrigeração. Em ambas as condições, a germinabilidade foi reduzida para valores inferiores a 37%. A deterioração das sementes na água parada pode ter sido um dos fatores responsáveis pela redução da germinabilidade das sementes submersas. A lixiviação das sementes em água corrente por até 90 dias como tratamentos pré-germinativo também provocou a redução da germinabilidade após 50 dias devido à deterioração das sementes **(**Mendes e Mendonça 2012). Porém, os autores relataram que algumas sementes foram capazes de germinar durante a submersão, mostrando uma adaptabilidade potencial ao ambiente submerso.

Desta forma, o objetivo neste trabalho foi acompanhar por até um ano a germinabilidade e a viabilidade das sementes de *Eugenia stipitata* submersas em água corrente em duas profundidades e verificar se a submersão das sementes pode retardar o processo germinativo possibilitando um armazenamento a curto e médio prazo. Também se objetivou avaliar a capacidade das sementes germinadas em emitir nova raiz e nova parte aérea após as primeiras serem retiradas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e beneficiamento das sementes

Frutos maduros de *Eugenia stipitata* foram obtidos no plantio experimental do INPA/CPCA (Campus III, V8) em Manaus, em novembro de 1995 (Lote 1) e em maio de 2010 (Lote 2). As sementes foram retiradas dos frutos carnosos e friccionadas manualmente com areia e água (2:1) por cerca de 40 minutos para a remoção das fibras aderidas ao tegumento. As sementes foram então lavadas acima de uma peneira com água em abundância até a remoção completa da areia e das fibras soltas. A tolerância à submersão das sementes foi testada utilizando duas metodologias distintas para cada lote, conforme descrito a seguir.

Armazenamento das sementes

No Lote 1, cerca de 1.000 sementes com dimensões maiores ou iguais a 10 mm de diâmetro foram colocadas em uma cuba de plástico branco (33 x 28 x 8 cm), perfurada na altura de 6 cm para manter o nível de água constante. Uma mangueira perfurada e fechada na

ponta com uma rolha foi conectada a uma torneira que escoava permanentemente água corrente dentro da cuba (Figura 3.1A). Uma vez por semana as sementes eram movidas dentro da caixa e, após um, dois, três, quatro, cinco, seis e doze meses de submersão, 100 sementes foram retiradas aleatoriamente para o teste de germinação.

Para o Lote 2, cerca de 2000 sementes (diâmetro ≥ 10 mm) foram divididas em cinco vasilhames redondos de vidro (altura de 26 cm e diâmetro de 13 cm) separando cada uma das repetições. Uma mangueira conectada a uma torneira foi posta no fundo de cada vasilhame e escoava água permanentemente durante todo experimento (Figura 3.1B). As sementes foram submetidas à submersão por meio, um, dois, três, seis, nove e doze meses e, após cada período, uma amostra de 45 sementes foi retirada de cada vasilhame e utilizada nos testes de germinação, teste de viabilidade pela coloração com tetrazólio e determinação do teor de agua, conforme descritos nos itens seguintes.

Em ambos experimentos, a vazão de água nos recipientes foi de, aproximadamente, 0,01 L seg^{-1}. As sementes foram submersas em ambiente de laboratório, com média da temperatura máxima da água durante a submersão do Lote 1 de 25 ºC e do Lote 2, de 27 ºC e a média da temperatura mínima foi de 21 ºC (Lote 1) e 22 ºC (Lote 2). No período de submersão o pH da água foi de 5,7 e o oxigênio dissolvido 6,3 mg L^{-1}.

Teste de germinação

Após os diferentes períodos de submersão, as sementes de ambos os lotes foram semeadas em caixas de plástico (33 x 28 x 8 cm) contendo vermiculita de granulometria média, a 2 cm de profundidade. Como tratamento pré-germinativo, o tegumento fibroso foi removido na região da protrusão da radícula e na extremidade oposta, com auxílio de um bisturi (Anjos, 1998). O delineamento experimental foi em DIC com parcelas subdivididas no tempo, com quatro repetições de 25 sementes no Lote 1 e cinco repetições de 20 sementes para o Lote 2. Como controle, as sementes foram semeadas nas mesmas condições descritas acima imediatamente após o beneficiamento.

Para ambos os lotes, o teste de germinação foi conduzido em casa de vegetação, coberta por telhas de fibra transparentes do INPA (campus V8) em Manaus, sendo regado sempre que necessário. Durante o período do teste, a média da temperatura mínima foi de 25,6±2,5 ºC e a média da temperatura máxima de 37,9±2,6 ºC. Os testes foram avaliados de duas a três vezes por semana por dez meses quando a germinação foi estabilizada. Adotou-se como critério de germinação, a emergência do epicótilo na superfície do substrato. Ao final

desse período foi então avaliada a porcentagem de germinação e o tempo médio de germinação (TMG).

Teste de viabilidade e determinação do teor de água das sementes

A viabilidade das sementes do Lote 2 foi avaliada pela coloração com tetrazólio. Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes para cada período de submersão. As sementes foram cortadas longitudinalmente e colocadas em solução de 1,0% de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio; Vetec®, Brasil) e condicionadas a 30 ºC por 24 horas no escuro (Calvi et al. 2015). Após este período, as sementes foram classificadas em viáveis (sementes coloridas pelo sal de tetrazólio) ou mortas (sementes sem coloração), conforme a Figura 3.2.

Para determinação do teor de água das sementes foram utilizadas cinco sementes individuais por repetição. As sementes foram cortadas ao meio e, após a aferição da massa fresca, foram secadas em estufa a 105 ± 3ºC, por 24 horas (Brasil 2009) e o teor de água expresso em porcentagem da base úmida.

Capacidade de uma segunda germinação das sementes após a remoção das plântulas

As sementes recém-beneficiadas foram semeadas sobre vermiculita de granulometria média em pirex de vidro (25 x 15 x 5 cm) e acondicionadas a 25 e 15 ºC. Em um terceiro tratamento as sementes foram submersas em água corrente conforme o método descrito acima para o Lote 2. Foram utilizadas duas repetições de 15 sementes para cada dos três tratamentos (Vermiculita à 15ºC, Vermiculita à 25ºC e Submersão) arranjadas em um delineamento inteiramente casualizado.

Após seis meses nestas condições as plântulas desenvolvidas (raiz juntamente com a parte aérea) foram removidas das sementes. As plântulas foram repicadas para sacos de polietileno contendo uma mistura de igual proporção de terra, vermiculita e fibra de coco, e colocadas na casa de vegetação mencionada acima e avaliada a sobrevivência após 90 dias. Após a remoção das plântulas, as sementes foram novamente colocadas nos respectivos ambientes (sobre vermiculita a 15 ou a 25 ºC ou submersas em água corrente) e permaneceram nestas condições por mais nove meses. Após este período, foi avaliada a porcentagem de formação de nova raiz (≥ 5 mm) e novas plântulas normais (desenvolvimento do segundo par de folhas após os catafilos com área foliar ≥ 2 mm²; Anjos 1998). Para efeito deste trabalho, a formação de novas raízes e plântulas foi funcionalmente uma segunda germinação e assim foi denominada, sem considerar a origem destas estruturas.

Delineamento experimental e análise dos resultados

O delineamento utilizado para avaliar o armazenamento das sementes por meio da submersão foi inteiramente causalizado, com parcelas subdivididas no tempo, onde as parcelas foram os métodos de submersão e as sub-parcelas os períodos avaliados. O efeito de cada método de submersão sobre a porcentagem final de germinação e o TMG foi avaliado através da análise de variância (ANOVA) com comparação das médias pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. Esta mesma análise foi realizada para os dados de viabilidade e o TA das sementes do Lote 2, que seguiram os mesmos arranjos experimentais. Para avaliar a sobrevivência das plântulas retiradas das sementes e a capacidade de uma segunda germinação foi realizado um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 0,05 de significância.

RESULTADOS

As sementes de *Eugenia stipitata* sobreviveram por um período de armazenamento submersas em água corrente de até 12 meses, independente da altura da coluna de água(Figura 3.3). Sementes colocadas para germinar imediatamente após o beneficiamento (controle) do Lote 1 apresentaram alta porcentagem de germinação (97%) e este percentual foi mantido durante todo o período de submersão testado. Já as sementes recém-coletadas do Lote 2 apresentaram menor potencial de germinação (63%), porém, a germinabilidade foi aumentada ao longo da submersão das sementes, sendo estatisticamente superior ao controle já após dois meses de submersão.

A tolerância das sementes à submersão foi verificada também pela coloração com tetrazólio. As sementes viáveis do Lote 2 representaram entre 80 e 100% durante os dozes meses de submersão, sem diferença estatística entre os valores (P = 0,457; Figura 3.3). O teor de água inicial das sementes do Lote 2 foi de 59,2% e variou entre 57,7 e 64,0% durante todo o período de armazenamento, sem diferença significativa (P = 0,256).

Independente da altura da coluna d'água, as sementes de *E. stipitata* de ambos os lotes iniciaram a germinação ainda submersas após dois meses. Ao final de um ano, todas as sementes submersas vivas (87% Lote 1 e 96% Lote 2) apresentavam protrusão da radícula e muitas tinham a parte aérea desenvolvida (Figura 3.3). As sementes que não apresentaram sinais de germinação estavam mortas de acordo com o teste de corte, pois apresentaram tecidos enegrecidos.

Embora a coluna de água sobre as sementes não influenciou na capacidade de germinação, foram observadas variações morfológicas nas plântulas. Com a submersão de 6 cm, as plântulas ultrapassaram a superfície da água e expandiram as folhas e tiveram

crescimento normal. Com a submersão a uma profundidade de 26 cm, as sementes continuaram submersas e resultou em plântulas com entrenós curtos e eófilos sem expansão foliar (Figura 3.4B), bem distintas das plântulas com desenvolvimento normal no viveiro (Figura 3.4A).

O TMG após a semeadura no viveiro é apresentado apenas para os cinco primeiros meses de armazenamento (Figura 3.5). A partir deste período, mais de 50% das sementes já estavam germinadas debaixo da água em ambos os lotes (Figura 3.3) o que impossibilitou o cálculo do TMG.

Durante os primeiros 30 dias de armazenamento pela submersão, o TMG para ambos os lotes apresentou uma tendência de aumento (Figura 3.5), o que pode indicar um período de estresse devido à hipóxia. Após 30 dias, o TMG foi reduzido em ambos os lotes e a germinabilidade foi aumentada no Lote 2 (Figura 3.3 e 3.5), indicando a superação do estresse inicial e adequação à submersão.

Capacidade de uma segunda germinação das sementes após a remoção das plântulas

Sementes germinadas de *E. stipitata* apresentaram grande capacidade de regeneração, ou seja, uma segunda germinação após o corte das plântulas. Este fenômeno foi observado em diferentes ambientes e as condições ambientais não afetaram a regeneração de novas raízes (P = 0,333) e nem a formação de plântulas normais (P= 0,067). Sementes "ressemeadas" em vermiculita a 15 ºC apresentaram 96,7% de novas raízes e 86,7% de novas plântulas e as mantidas submersas em água corrente apresentaram 83,3% de regeneração das raízes e 76,7% de plântulas normais; acondicionadas a 25 ºC apresentaram 76,7% de raízes e 46,7% de plântulas normais. A sobrevivência das plântulas cortadas após 90 dias da transferência para o viveiro foi alta (acima de 85%) e independente do ambiente de desenvolvimento anterior (P= 0,800; Tabela 1).

DISCUSSÃO

Pinedo *et al.* (1981) foram os pioneiros a testar o armazenamento de sementes de *E. stipitata* na água em temperatura de ambiente natural e sob refrigeração, sendo que, em ambos os casos, a água estava parada e as sementes sofreram decomposição. Períodos maiores que 50 dias de submersão também reduziram significativamente a germinabilidade devido à deterioração das sementes durante a submersão (Mendes e Mendonça 2012). Estes dois resultados parecem indicar que a hipóxia tornou as condições inadequadas para o armazenamento das sementes. Porém, no presente estudo, as sementes foram mantidas submersas em água corrente por até 12 meses e não foram observados sinais de deterioração

que prejudicassem a germinabilidade e a viabilidade das sementes (Figura 3.3) indicando que o fluxo de água de, aproximadamente 0,01 L seg^{-1}, foi suficiente para a sobrevivência das sementes por um período maior, proporcionando a germinação das mesmas.

Os resultados obtidos neste trabalho não corroboram com os resultados encontrados por Mendes e Mendonça (2012), que relataram uma redução significativa da germinação no viveiro após 60 dias de submersão em água corrente. Embora as condições climáticas dos trabalhos foram semelhantes, o substrato utilizado pelos autores nos testes de germinação foi serragem decomposta. Neste trabalho foi utilizada vermiculita para os dois lotes o que pode ter favorecido a germinabilidade. Outro fator que poderia explicar as diferenças entre os resultados pode estar ligado ao número de sementes por repetição. Mendes e Mendonça (2012) utilizaram somente 10 sementes por repetição e, desta forma, uma semente que não germinasse representa grande variação na porcentagem final de germinação, o que pode explicar as baixas taxas germinativas encontradas pelos autores. Neste trabalho foram utilizadas 20 ou 25 sementes por repetição, que fornecem resultados mais robustos que podem representar melhor as respostas das sementes aos tratamentos.

A capacidade de regeneração e totipotência das sementes de *E. stipitata* foi previamente relatada (Anjos e Ferraz 1999; Mendes e Mendonça 2012; Calvi *et al*. 2015). Também outras espécies do mesmo gênero já tiveram a capacidade de regeneração testada após sofrerem cortes em diferentes direções e proporções, como por exemplo, *E. involucrata*, *E. uniflora*, *E. brasiliensis*(Silva *et al*. 2005), *E. cerasiflora*, *E. umbeliflora*, *E. pruinosa* (Delgado *et al*. 2010) e *E. pyriformis* (Silva *et al*. 2003). Porém, a possibilidade de utilizar esta capacidade de regeneração para produzir mais de um evento germinativo em uma mesma semente, conforme relatado neste trabalho, não havia sido testado. Esta característica é mais um argumento para recomendar esta espécie como modelo para estudos em tecnologia e fisiologia de sementes sensíveis ao dessecamento (Calvi *et al*. 2015). Para fins de propagação, esta característica reduz a perda de material durante o manejo das sementes. Mesmo após a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas, os danos causados pelo manejo, podem ser recuperados e as sementes “ressemeadas”, pois possuem a capacidade de uma segunda germinação.

A estocagem de sementes recalcitrantes de *Eugenia brasiliensis* utilizando inibidores da germinação foi sugerida por (Goldbach 1979); permitindo a troca gasosa, as sementes embebidas em solução 10^{-4} M de ácido abscísico (ABA) sobre papel a 15 ºC mantiveram 89% de germinação por seis meses Este autor sugere que pode ser um método promissor no armazenamento de sementes recalcitrantes. Porém, para armazenar as sementes de *E.*

stipitata, a simples submersão em água corrente pelos métodos propostos neste trabalho preservou a viabilidade das sementes por até um ano.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a sugestão de que os embriões das sementes de *Eugenia stipitata* são dispersos sem que tenham atingido a completa maturidade (Anjos e Ferraz 1999), visto que as sementes recém-coletadas e submersas por 15 e 30 dias apresentaram baixa germinação, porém alta viabilidade (Figura 3.3B). Portanto, um aumento no vigor é esperado com a maturação dos embriões e, há evidências que os processos fisiológicos de maturação e germinação das sementes desta espécie são contínuos após a dispersão (Mendes e Mendonça 2012). A observação de eventos germinativos nas sementes de *E. stipitata* ainda submersas em água corrente neste estudo mostrou que estes processos de maturação/germinação podem ocorrer mesmo sob condições de hipóxia. Os resultados sugerem ainda que o período mínimo necessário para que as sementes completassem a maturação foi de 60 dias, visto que os primeiros eventos germinativos foram observados somente após este tempo (Figura 3.3). Após 60 dias, também foi observado um aumento na velocidade de germinação durante os testes no viveiro (Figura 3.5), o que pode caracterizar maior maturação das sementes. Porém, este incremento na velocidade de germinação no viveiro nos tempos subsequentes pode também ser apenas um reflexo do avanço no processo germinativo debaixo d'água.

O estresse causado pela submersão das sementes de *E. stipitata* e sua recuperação foi relatado por Calvi *et al*. (2015). Segundo os autores, a submersão das sementes de *E. stipitata* por 15 dias reduziu a concentração total de glutationa, um dos principais compostos antioxidantes presentes nos sistemas biológicos (Foyer e Noctor 2011). Porém, após 30 dias de submersão as sementes recuperaram a concentração deste composto, mostrando adequação ao ambiente. Avaliando os dados obtidos neste trabalho segundo o modelo de estresse proposto por Kranner *et al*. (2010), que consiste em três fases (alarme, resistência e exaustão), as sementes de *E. stipitata* submetidas à submersão em água corrente, parecem inicialmente entrar na fase de alarme pela mudança no ambiente. Como consequência, houve uma ligeira redução na germinabilidade/viabilidade e uma tendência de redução na velocidade de germinação. Com o prolongamento da submersão, alguns mecanismos de proteção e/ou reparos (incluindo o sistema de antioxidantes) podem ter sido ativados, possibilitando que as sementes atingissem a fase de resistência e, assim, toleraram as condições de submersão. Durante os 12 meses de armazenamento, as sementes de *E. stipitata* não atingiram a fase de exaustão, pois continuaram a apresentar alta viabilidade e germinabilidade (Figura 3.3).

O embrião das sementes de *E. stipitata* apresenta cerca de 3,5% de compostos fenólicos em sua composição e, no tegumento fibroso, esses compostos representam 1,6% (valores expressos na base seca; Anjos 1998). Análises histoquímicas mostraram que os compostos fenólicos presentes no tegumento das sementes são de natureza diversa, principalmente tanino, além de terpenóides com grupo carbonila e que, na epiderme adaxial do embrião são encontrados numerosos idioblastos fenólicos que podem ser inibidores da germinação, contribuindo assim para a lenta germinação (Mendes 2011). A lixiviação desses inibidores de germinação, principalmente os fenóis localizados no tegumento, poderia também ter contribuído para o aumento da velocidade de germinação, porém, estudos mais detalhados precisam ser realizados. Além da possível atuação na inibição da germinação, os fenóis podem estar atuando como mecanismos de proteção contra ferimentos e/ou ataque de patógenos.

Carboidratos, principalmente amido, são as principais reservas das sementes de *E. stipitata* (76,7 % Anjos 1998; 71,1 % Melo *et al.* 2009 e 43,5 % Mendes 2011) e esta pode ser uma característica importante para a tolerância à submersão das sementes desta espécie, visto que os carboidratos não-estruturais são os geradores de energia primários e de rápido consumo. Os carboidratos atuam como uma das características chave sobre a germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Himatanthus sucuuba* em resposta a inundações sendo observadas mudanças significativas nos processos metabólicos durante a fase inicial de estabelecimento da plântula (Ferreira *et al.* 2009). Segundo os autores, raízes de plântulas de *H. sucuuba* apresentaram maior concentração de amido quando estavam sob condições de inundação.

A tolerância à hipóxia de ambiente aquático sugere uma adaptação da espécie às inundações sazonais comuns no seu habitat natural. A avaliação da capacidade de germinação das sementes de *H. sucuuba* provenientes de áreas de terra-firme (áreas de florestas que não sofrem inundações sazonais na Amazônia) e de várzea (áreas sazonalmente inundadas) quando submersas em água mostrou que, independente da procedência, as sementes são capazes de germinar durante a submersão, porém, as sementes provenientes de terra-firme apresentaram germinação menor (30%) que as sementes provenientes da várzea (95%, Ferreira *et al.* 2009). Desta forma, a procedência das sementes parece afetar a tolerância ao alagamento e, consequentemente, sua longevidade durante o armazenamento por meio da submersão em água corrente.

Diferentemente do observado neste estudo, as sementes de 12 espécies tipicamente de várzea e igapós não apresentaram emergência da parte aérea quando estavam submersas em

água (sementes de quatro espécies apresentaram apenas emissão de raiz; Parolin 2001). Segundo o autor, as sementes das demais espécies somente germinam quando não estão submersas e são as plântulas dotadas de possíveis adaptações morfológicas para tolerar as inundações. De maneira geral estas adaptações podem ser a redução da taxa de crescimento, senescência e abscisão precoce das folhas (Carmo 2013), formação de raízes adventícias (Parolin 2001; Voesenek e Sasidharan 2012), hipertrofia de lenticelas (Kolb *et al.* 1998; Marques e Joly 2000; Ferreira *et al*.,2006; Medri *et al*. 2007), aumento dos espaços intercelulares e do comprimento total das plantas (Davanso-Fabro *et al*. 1998; Parolin 2001; Voesenek e Sasidharan 2012), entre outros. Neste trabalho não foram feitas avaliações morfoanatômicas das sementes de *E. stipitata* germinadas em condições de submersão, porém, observou-se que as plântulas apresentaram entrenós pouco alongados (Figura 3.4B). A não utilização aparente das reservas e lento crescimento das plântulas pode ser uma adaptação ecológica da espécie para tolerar os alagamentos sazonais na região amazônica. Comportamento semelhante foi observado comparando o crescimento de plântulas de espécies de várzea e igapó de porções altas e baixas do relevo, em que as espécies das regiões mais baixas apresentaram menor crescimento (Parolin 2002). A estratégia que parece ser mais vantajosa para a espécie é reduzir o metabolismo e esperar condições propícias para o crescimento, visto que essas plântulas dificilmente atingiriam a superfície da água que, em média, pode ser de até 11 m e durar mais de 130 dias na região próxima à Manaus (Marinho et al. 2013).

Considerações finais

Sementes de *Eugenia stipitata* sobreviveram à submersão por até um ano e, independente da profundidade de submersão, as sementes continuaram o processo de maturação e começaram a germinar após cerca de dois meses. Para fins de armazenamento, o início da germinação poderia ser adiada pela redução da temperatura da água a níveis não prejudiciais à viabilidade das sementes, porém, estudos mais detalhados devem ser realizados.

A submersão das sementes de *E. stipitata* em água corrente por até 30 dias retardou a germinação das sementes provavelmente devido ao estresse provocado pela hipóxia. Após este período, o tempo médio de germinação foi reduzido de 68 para 59 dias (Lote 1) e de 90 para 57 dias, no Lote 2. Esta redução pode ter sido proporcionada pela maturação do embrião, mostrando a capacidade das sementes se adequarem ao ambiente de submersão após o período de estresse inicial. O armazenamento das sementes submersas em água corrente pode também

ter lixiviado substâncias inibidoras da germinação presentes no tegumento das sementes e/ou afrouxado as fibras que causam restrição mecânica à germinação das sementes desta espécie.

Em termos práticos, a submersão das sementes altamente recalcitrantes de *E. stipitata* em água corrente pode ser recomendada, sem prejuízos à viabilidade, por até um ano. Vale ressaltar que, após três meses, as sementes começam a emitir raiz e parte aérea. A germinação das sementes poderia ser um complicador para o manejo das sementes após o armazenamento, porém as sementes desta espécie apresentam um grande potencial de regeneração e podem formar novas plântulas normais após danos causados à raiz ou da parte aérea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo, C.J.E.; Pelaez, J.J.Z.; Martinez, A. 1996. *El cultivo de arazá (Eugenia stipitata)*. CORPOICA – FondoAmazonico, Florencia-Caquetá. 1996. 7p.

Anjos, A.M.G. 1998. *Morfologia e fisiologia da germinação de sementes de araçá-boi (Eugenia stipitata* ssp. *sororia McVaugh, Myrtaceae), uma frutífera nativa da Amazônia Ocidental*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 78p.

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.

Araujo, R.F.; Araújo, E.F.; Cecon, P.R.; Sofiatti, V. 2008. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despolpado e não despolpado. *Revista Brasileira de Sementes*, 30: 71-78.

Berjak, P.; Pammenter, N.W. 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in perspective. *Annals of Botany,*101: 213-228.

Brasil. 2009. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 399p.

Calvi, G.P.; Aud, F.F.; Ferraz, I.D.K.; Pritchard, H.W; Kranner, I. 2015.Chapter 1. Totipotent germination and stress biology of recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh: a model species for desiccation sensitivity studies. Presente trabalho. Submetido à *Plant Biology* em 06 de Fevereiro de 2015.

Carmo, W.S. 2013. *Respostas morfoanatômicas e bioquímicas em plântulas de espécies de áreas alagáveis submetidas a longos períodos de submersão*. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Brasilia. 83p.

Clement, C.R. 1989. A center of crop genetic diversity in western Amazonia. *BioScience*, 39: 624-631.

Davanso-Fabro, V.M.; Medri, M.E.; Bianchini, E.; Pimenta, J.A. 1998. Tolerância à inundação: aspectos da anatomia ecológica e do desenvolvimento de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41: 475-482.

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.

FAO 1987. *Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos 3. Ejemplos de America Latina*. FAO, Roma. 241p.

Ferreira, C.S.; Piedade, M.T.F.; Bonates, L.C. 2006. Germinação de sementes e sobrevivência de plântulas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Wood. em resposta ao alagamento, nas várzeas da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 36: 413-418.

Ferreira, C.S.; Piedade, M.T.F.; Tiné, M.A.S.; Rossatto, D.R.; Parolin, P.; Buckeridge, M.S. 2009. The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus sucuuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. *Annals of Botany,*104: 1111–1119.

Ferreira, S.A.N. 1992. Biometria de frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Acta Amazonica,*22: 295-302.

Ferreira, S.D.N.; Gentil, D.D.O. 2003. Armazenamento de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) com diferentes graus de umidade e temperaturas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 440-442.

Flores, E.M.; Rivera, D.I. 1989. Criptocotilia en algunas dicotiledoneas tropicales. *Brenesia*, 32: 19-26.

Foyer, C.H.; Noctor, G. 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, 155: 2–18.

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

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.

Kolb, R.M.; Medri, M.E.; Bianchini, E.; Pimenta, J.A.; Giloni, P.C.; Correa, G.T. 1998. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. *Brazilian Journal of Botany*, 21.

Kranner, I.; Minibayeva, F.V.; Beckett, R.P.; Seal, C.E. 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science.*New Phytologist,*188: 655–673.

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

Marinho, T.A.S.; Lopes, A.; Assis, R.L.; Ramos, S.L.F.; Gomes, L.R.P.; Wittmann, F.; Schöngart, J. 2013. Distribuição e crescimento de *Garcinia brasiliensis* Mart. e He*vea spruceana* (Benth.) Müll. Arg. em uma floresta inundável em Manaus, Amazonas. *Ciência Florestal*, 23: 223-232.

Marques, M.C.M.; Joly, C.A. 2000. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. *Acta Botanica Brasilica*, 14: 113-20.

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

McVaugh, R. 1958. Flora of Peru. *Botanical Series Field Museum of Natural History*, 13: 569-818.

Medri, M.E.; Ferreira, A.C.; Kolb, R.M.; Bianchini, E.; Pimenta, J.A.; Davanso-Fabro, V.M.; Medri, C. 2007. Alterações morfoanatômicas em plantas de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. submetidas ao alagamento. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 29: 15-22.

Melo, Z.L.O.; Gonçalvez, J.F.C.; Mazzafera, P.; Santos, D.Y.A.C. 2009. Mobilization of seed reserves during germination of four tropical species of the Amazon Rainforest. *Seed Science and Technology*, 37: 597-607.

Mendes, A.M.S. 2011. *Eugenia stipitata ssp. sororia McVaugh (araçá-boi) - Myrtaceae: abordagem fisiológica e morfoanatômica da semente, germinação e plântula* Tese de doutorado, Universidade do Amazonas, Manaus. 117p.

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

Pinedo, M.H.P.; Ramírez, F.N.; Blasco, M.L. 1981 *Notas preliminares sobre El arazá (Eugenia stipitata), frutal nativo de La Amazonia peruana*. INIA/IICA, Lima. 58p.

Parolin, P. 2001.Seed germination and early establishment of 12 tree species from nutriente-rich and nutriente-poor Central Amazonian floodplains. *Aquaticbotany*, 70: 89-103.

Parolin, P. 2002 Submergence tolerance vs. escape from submergence: two strategies of seedling establishment in Amazonian floodplains. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 177- 186.

Ribeiro, M.D.S.; Steffens, C.A.; Amarante, C.V.T.; Pikart, T.G.; Oliveira, L.M. 2010. Armazenamento de sementes de palmiteiro sob atmosfera modificada. *Bragantia*, 69: 989-994.

Santana, P.J.A. 2007. Maturação, secagem e armazenamento de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) Dissertaçao de Mestrado, Intituto de Botânica, São Paulo. 80p.

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

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

Villachica, H.; Carvalho, J.E.U.; Müller, C.H.; Diaz S.C.; Almanza, M. 1996. *Frutales y hortalizas promissorios de la Amazonia*. Lima: Tratado de Cooperacion Amazonica. Secretaria Pro-tempore, 367p.

Voesenek, L.A.C.J.; Sasidharan, R. 2013. Ethylene–and oxygen signalling–drive plant survival during flooding. *Plant Biology*, 15: 426-435.

Tabela 3.1. Porcentagem de germinação de sementes de *Eugenia stipitata* semeadas sobre vermiculita a 15 e a 25 ºC ou submersas em água corrente após seis meses (1ª Germinação), sobrevivência das plântulas separadas das sementes (%) após 90 dias e porcentagem de formação de raiz e plântulas normais das sementes de após a ressemeadura sobre vermiculita a 15 e a 25 ºC ou submersas em água corrente após nove meses (2ª Germinação). Dados representam médias ± DP.

Tratamento	1ª Germinação após 6 meses (%)		Sobrevivência das plântulas separadas (%)		2ª Germinação			
					Raiz (%)		Plântulas normais (%)	
Vermiculita 15 ºC	100 ± 0,00	a	87,0 ±2,83	a	96,7 ±4,74	a	86,7 ± 9,41	a
Vermiculita 25 ºC	100 ± 0,00	a	91,5 ±6,36	a	76,7 ± 23,55	a	46,7 ± 9,41	a
Submersão 25 ºC	100 ± 0,00	a	85,5 ± 13,44	a	83,3 ±4,67	a	76,7 ± 4,74	a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 0.05 de significância.

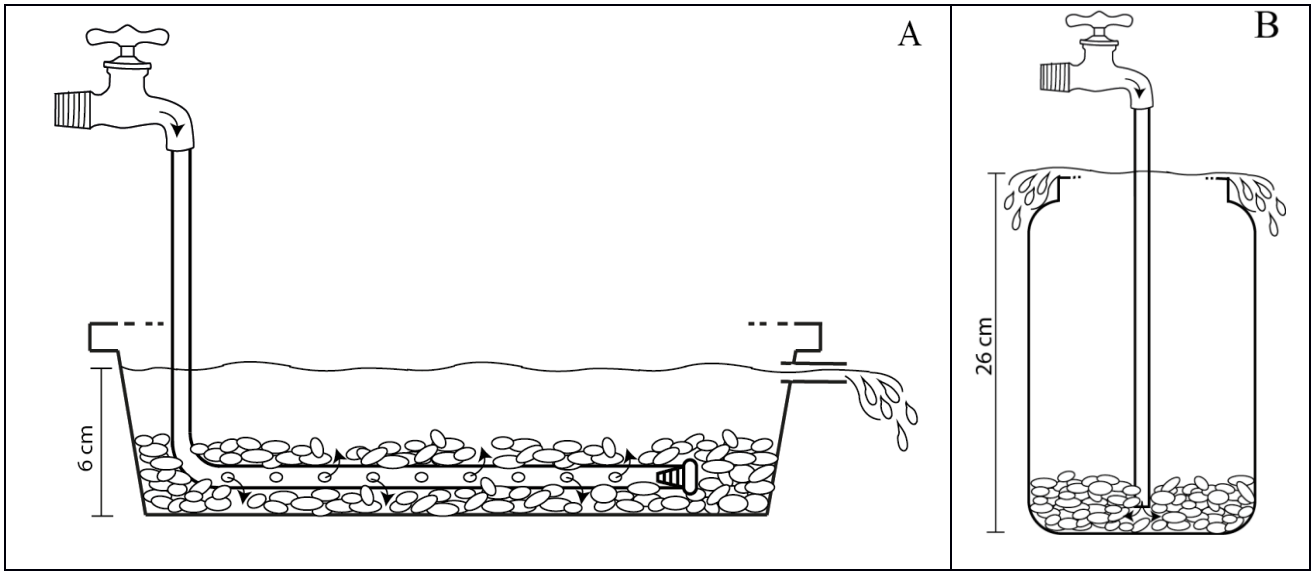

Figura 3.1. Esquema do método de submersão das sementes de *Eugenia stipitata* realizado para o Lote 1 (A) e o Lote 2 (B).

Figura 3.2. Padrão de coloração das sementes viáveis e mortas de *Eugenia stipitata* após 24 horas em solução de 1% de tetrazólio, a 30 ºC no escuro.

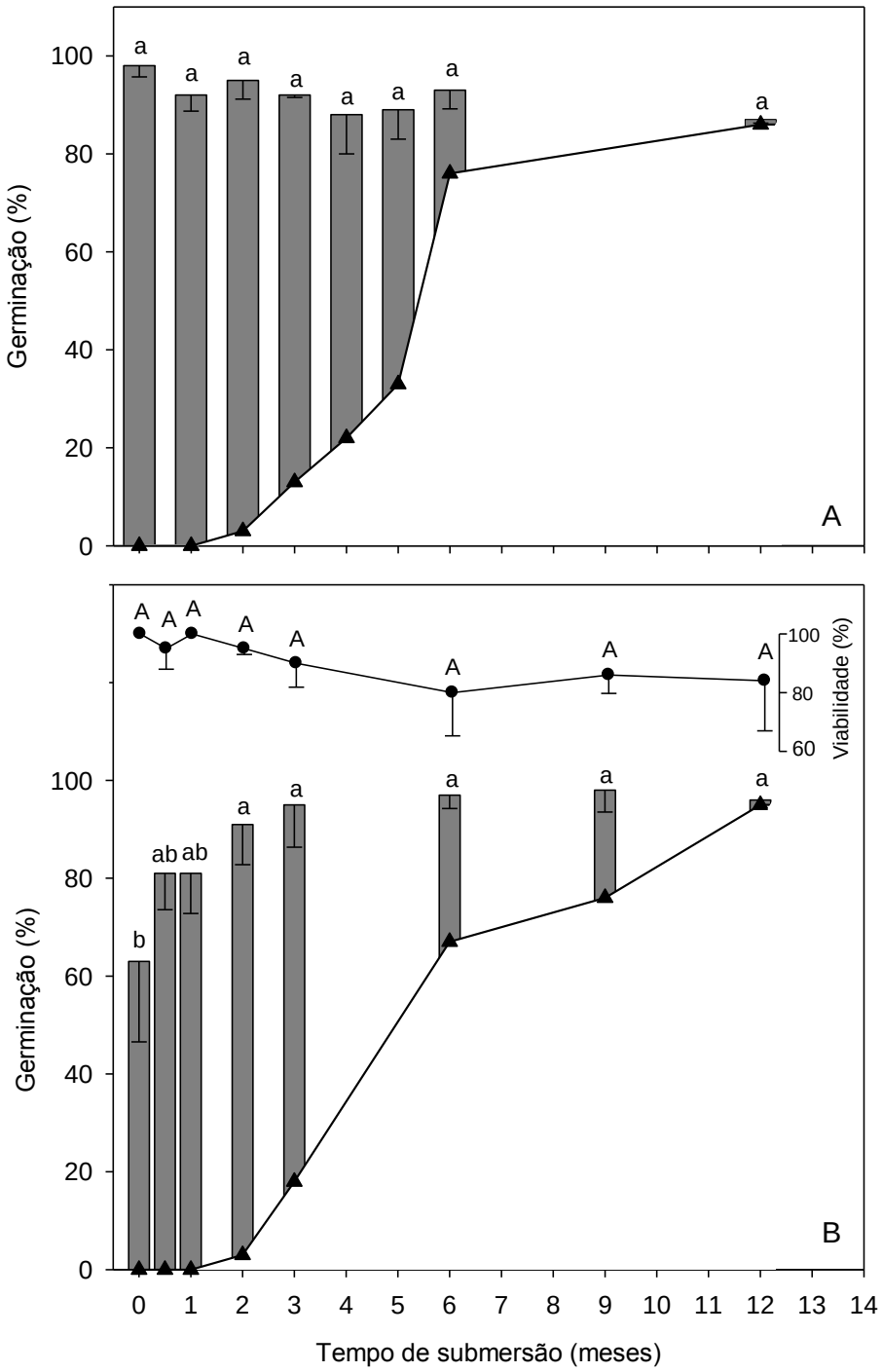

Figura 3.3. Germinação final em viveiro dez meses após a semeadura (barras) das sementes de *Eugenia stipitata* do Lote 1 (A) e Lote 2 (B) após o armazenamento pela submersão em água corrente em diferentes profundidades e períodos. Triângulos fechados (-▲-) representam porcentagem de sementes germinadas durante a submersão. Círculos fechados (-●-) representam a viabilidade das sementes do Lote 2 após os diferentes períodos de submersão pelo teste de tetrazólio. Médias seguidas por letras distintas, minúsculas para a porcentagem final de germinação de cada lote e maiúsculas para dados de viabilidade, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. Valores representam médias e desvio padrão.

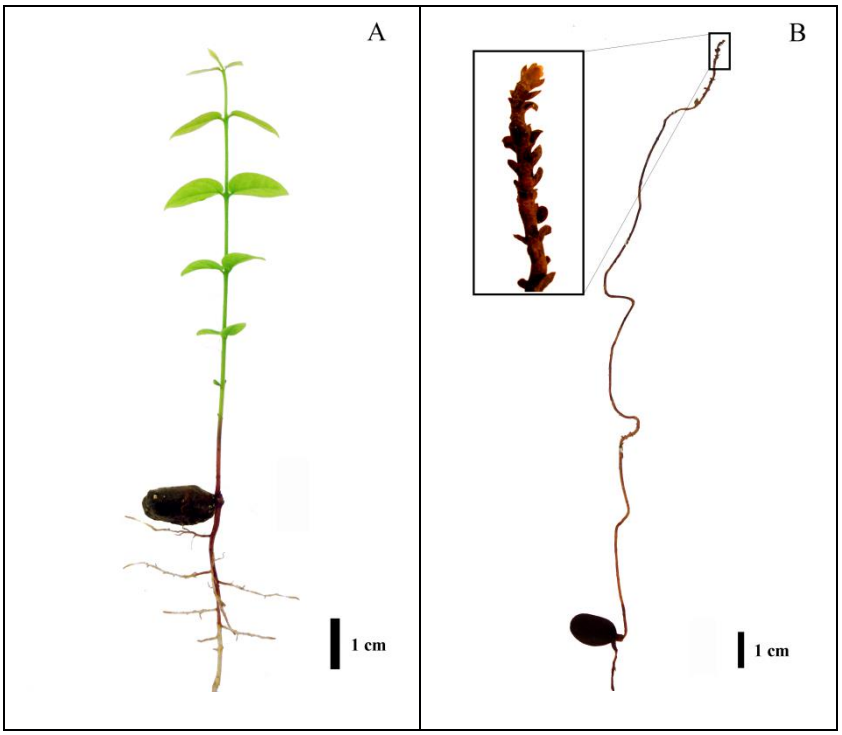

Figura 3.4. Plântula de *Eugenia stipitata* com desenvolvimento normal em viveiro (A) e plântula desenvolvida abaixo da superfície da água (B).

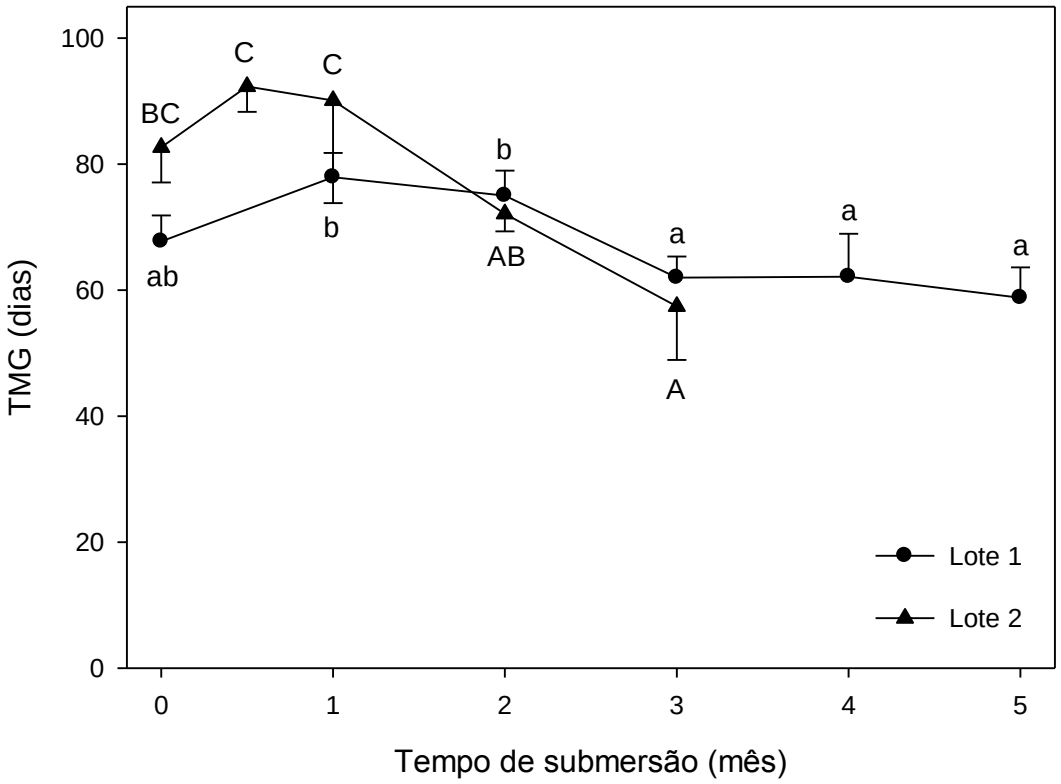

Figura 3.5. Tempo médio de germinação (TMG) das sementes de *Eugenia stipitata* do Lote 1 (círculos) e Lote 2 (triângulos) após à submersão em água corrente por diferentes períodos. Médias seguidas por letras distintas, minúsculas para o Lote 1 e maiúsculas para o Lote 2, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0.05 de significância. Valores representam médias e desvio padrão.

3. SÍNTESE

Eugenia stipitata é uma planta subutilizada na região amazônica, apesar do seu potencial para um desenvolvimento na agricultura local, o armazenamento das sementes é difícil devido à sua natureza recalcitrante, o que pode dificultar a maior utilização da espécie. Além disso, suas sementes são grandes e apresentam características morfológicas únicas, o eixo embrionário e os cotilédones não são diferenciados e a semente tolera fracionamento, apresentando polaridade com maior atividade meristemática em um dos polos.

Os resultados apresentados no Capítulo 1 mostraram que toda a semente pode ser considerada como eixo embrionário. Quando cortada em quatro partes, todas as partes podem germinar. Se cortada longitudinalmente em quatro partes, as variações dos tecidos são distribuídas igualmente entre as seções de sementes. Desta forma, para estudos comparativos, vários testes podem ser realizados com a mesma semente, conforme mostrado neste estudo. A determinação do teor de água pode ser realizada com um quarto das sementes, pois apresentou resultados semelhantes à determinação utilizando sementes inteiras. O segundo quarto das sementes foi suficiente para as análises dos compostos antioxidantes do grupo tióis de baixo peso molecular. O terceiro quatro foi utilizado para a coloração com tetrazólio e, o último quatro poderia ainda ser utilizado para quaisquer outras análises. Com base nessas características, a espécie *E. stipitata* foi proposta como modelo para estudos de sementes recalcitrantes.

As análises durante estresse de dessecamento e de submersão em água mostraram que a germinabilidade das sementes avaliadas por meio dos testes de germinação, da coloração de viabilidade com tetrazólio e da análise de marcadores de estresse como a glutationa (GSH) pode ser mantida elevada por pelo menos 30 dias, quando a umidade do ambiente em que as sementes estão armazenadas for mantida em níveis suficientemente elevados.

No segundo capítulo, os resultados mostraram a possibilidade prática de armazenar as sementes altamente recalcitrantes de *Eugenia stipitata* por até um ano, sem perda de viabilidade. É importante que as sementes sejam mantidas com um teor de água alto (entre 54,7 e 62,2%), o que pode ser obtido misturando as sementes com vermiculita umedecida com teor de água maior ou igual a 25%. Foi observado que as sementes desta espécie são tolerantes a refrigeração até 10 ºC, incomum para sementes da região. Recomenda-se o armazenamento em sacos de plástico com vermiculita umedecida em temperaturas entre 10 e 15 °C. Estas condições, além de retardar o metabolismo germinativo, possibilitam a

maturação dos embriões e aumentam a porcentagem final de germinação em comparação com sementes recém-beneficiadas. Há ainda a possibilidade de armazenar as sementes em temperaturas mais elevadas (25 ºC), porém, faz-se necessário aumentar a umidade da vermiculita o que acarreta germinabilidade das sementes durante o armazenamento.

A possibilidade de armazenamento das sementes de *Eugenia stipitata* submersas em água corrente foi testada no terceiro capítulo. A submersão das sementes desta espécie retardou, nos primeiros 30 dias, a germinação das sementes, provavelmente devido ao estresse provocado pela hipóxia. Após este período, o tempo médio de germinação foi reduzido de 68 para 59 dias (Lote 1) e de 90 para 57 dias, no Lote 2. Esta redução pode ter sido proporcionada pela maturação do embrião, mostrando a capacidade das sementes se adequarem ao ambiente de submersão após o período de estresse inicial.

As sementes sobreviveram à submersão por até um ano, independente da profundidade de submersão (6 e 26 cm de coluna d'água). O processo de pós-maturação continuou na água e as sementes começaram a germinar após cerca de dois meses. Para o manuseio das sementes, a germinação poderia ser um complicador, porém as sementes desta espécie apresentam um grande potencial de regeneração e podem formar novas plântulas normais, mesmo após danos causados à raiz ou à parte aérea. Para fins de prolongar o tempo até o início da germinação, a água poderia ser refrigerada porém, estudos mais detalhados devem ser realizados.

Em termos práticos, os resultados apresentados nesta tese mostraram diferentes possibilidades de armazenamento das sementes altamente recalcitrantes de *Eugenia stipitata* por até um ano. Os resultados mostram possibilidades de armazenamento que possam ser aplicadas em outras espécies de interesse econômico na região. Os métodos propostos aqui são de fácil execução e baixos custos. Desta forma, podem ser transferidos diretamente aos produtores de sementes e de mudas da Amazônia.

4. RFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo, C.J.E.; Pelaez, J.J.Z.; Martinez, A. 1996. *El cultivo de arazá (Eugenia stipitata)*. CORPOICA – FondoAmazonico, Florencia-Caquetá. 1996. 7p.

Andrade, A.C.S.; Cunha, R.; Souza, A.F.; Reis, R.B.; Almeida, K.J. 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree *Eugenia dysenterica* DC. *Seed Science andTechnology*, 31: 125-137.

Anjos, A.M.G. 1998. *Morfologia e fisiologia da germinação de sementes de araçá-boi (Eugenia stipitata ssp. sororia McVaugh, Myrtaceae), uma frutífera nativa da Amazônia Ocidental*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 78p.

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.

Araujo, R.F.; Araújo, E.F.; Cecon, P.R.; Sofiatti, V. 2008. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despolpado e não despolpado. *Revista Brasileira de Sementes*, 30: 71-78.

Bailly, C., Kranner I. (2011) Analyses of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Relation to Seed Longevity and Germination. In: Kermode A.R. (Ed.) *Seed Dormancy: Methods and Protocols. Vol. 773: Methods in Molecular Biology*. Springer Science and Business Media, New York, USA:343-367

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.

Barroso, G.M.; Morim, M.P.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F. 1991. *Sistemática de angiospermas do Brasil.* Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 443 p.

Baskin, C.C.; Baskin, J.M. 1998. *Seeds.ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. San Diego: Academic Press. 666p

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

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

Berjak, P.; Pammenter, N.W. 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in perspective. *Annals of Botany,*101: 213-228.

Bewley, J.D.; Black, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*, New York: Plenum Press, 445p.

Birtić S., Colville L., Pritchard H.W., Pearce S.R., Kranner I. (2011) Mathematically combined half-cell reduction potentials of low-molecular-weight thiols as markers of seed ageing. *Free Radical Research*, 45, 1093–1102.

Black M., Bewley J.D., Halmer P.L. (2006) Germination. In: Black M., Bewley J.D., Halmer P. (Eds) *The Encyclopedia of Seeds. Science, technology and uses*. CAB International, Wallingford, UK:258-260

Bonner, F.T. 1990. Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. *Forest*

Boudet J., Buitink J., Hoekstra F.A., Rogniaux H., Larré C., Satour P., Leprince O. (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology*, 140, 1418–1436.

Brasil (1978) *Folha SA. 20 Manaus: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação, uso potencial da terra*. Projeto Radambrasil, Ministério das Minas e Energia, Rio de Janeiro, Brazil: 628pp.

Brasil. 2009. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 399p.

Bruggink T., van der Toorn P. (1995) Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. *Seed Science Research*, 5, 1–4.

Buitink J., Ly Vu B., Satou P., Leprince O. (2003) The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. *Seed Science Research*, 13, 273–286.

Calvi, G.P.; Aud, F.F.; Ferraz, I.D.K.; Pritchard, H.W; Kranner, I. 2015b.Capítulo 1. Totipotent germination and stress biology of recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh: a model species for desiccation sensitivity studies. Presente trabalho. Submetido à *Plant Biology* em 06/02/2015.

Calvi, G.P.; Ferraz, I.D.K. 2014. Levantamento das espécies florestais de interesse econômico e o cenário da produção de sementes e mudas na Amazônia Ocidental. *Informativo Abrates*, 24: 24-75.

Calvi, G.P.; Ferraz, I.D.K. 2015a. Capítulo 3. Submersão de sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: a ecologia apoiando a tecnologia de sementes. Presente trabalho.

Camargo, J.L.C; Ferraz, I.D.K. 2004. Acariquara-roxa, *Minquartia guianensis* Aubl, Olacaceae. *In*: Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C. (Ed.) *Manual de Sementes da Amazônia*. f.4. Manaus, INPA. 8p.

Carmo, W.S. 2013. *Respostas morfoanatômicas e bioquímicas em plântulas de espécies de áreas alagáveis submetidas a longos períodos de submersão*. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Brasilia. 83p.

Carvalho, J.E.U.; Mueller, C.H.; Nascimento, W.M.O. 2001. Classificação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia de acordo com o comportamento no armazenamento. Embrapa Amazônia Oriental. *Comunicado Técnico* n° 60. 4p.

Carvalho, L.R.; Davide, A.C.; Silva, E.A.A.; Carvalho, M.L.M. 2008. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 30: 01-09.

Carvalho, L.R.; Silva, E.A.A.; Davide, A.C. 2006. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 28: 15-25.

Castro, R.D.K.; Bradford, J.; Hilhorst, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. p. 51-67. *In:* A.G. Ferreira; F. Borghetti (eds.) *Germinação – do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Editora Artmed. 323p.

Castro, R.D.K.; Hilhorst, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. p. 149-162. *In:* A.G. Ferreira; F. Borghetti (eds.) *Germinação – do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Editora Artmed. 323p.

Chaves, A.; Mugredgei, A.; Fassola, H.; Alegranza, D.; Fernández, R. 1999. Conservación refrigerada de semillas de *Araucaria angustifolia*. Bosque 20,117-124. *Apud*: Floriano, E.P. 2004. *Armazenamento de sementes florestais.* Cadernos didáticos nº1, 1ª ed. Santa Rosa. 10p.

Clement, C.R. 1989.A center of crop genetic diversity in western Amazonia. *BioScience*, 39: 624-631.

Corrêa, E.A.C.; Ferraz, I.D.K.; Prado, M.C.O.; Camargo, J.L. C. 1999. Conhecimento sobre o comportamento das sementes para fins de armazenamento das 2.114 espécies que ocorrem na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus - Amazonas. *In*: *VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.Resumo*. Brasília/DF. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 11 (suplemento): 133.

Davanso-Fabro, V.M.; Medri, M.E.; Bianchini, E.; Pimenta, J.A. 1998. Tolerância à inundação: aspectos da anatomia ecológica e do desenvolvimento de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41: 475-482.

Daws M.I., Garwood N.C., Pritchard H.W. (2005) Traits of recalcitrant seeds in a semi-deciduous tropical forest in Panama: some ecological implications. *Functional Ecology*, 19, 874-885.

Daws, M.I.; Davies, J.; Vaes, E.; van Gelder, R.; Pritchard, H.W. 2007. Two-hundred year seed survival of *Leucospermum* and two other woody species from the Cape floristic region, South Africa.*Seed Science Research*, 17:73- 79.

Delgado L.F. (2010) *Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de Eugenia (Myrtaceae).* PhD thesis, Botanic Institute, São Paulo, Brazil: 96pp.

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

Delgado, L.F.; Mello, J.I.O.; Barbedo, C.J. 2010. Potential for regeneration and propagation from cut seeds of *Eugenia* (Myrtaceae) tropical tree species. *Seed Science and Technology*, 38: 624-634.

Ellis, R.H.; Hong, T.D.; Roberts, E.H. 1990.An intermediate category of seed storage behaviour I Coffee.*Journal of Experimental Botany*, London, v.41, n.230, p.1167-1174.

Ellis, R.H.; Roberts, E.H. 1980.Improved equations for the prediction of seed longevity.*Annals of Botany*, v. 4, n.45, p. 13-30.

FAO 1987. *Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos 3. Ejemplos de America Latina*. FAO, Roma. 241p.

Faria, J.M.R. 2006. *Desiccation tolerance and sensitivity in Medicago truncatula and Inga vera seeds*. Tese (Doutorado) Wageningen University, Wageningen.145 p.

Ferraz, I.D.K. 1991. Germinação e armazenamento de sementes florestais de interesse econômico na Amazônia: problemas e necessidades de atuação. In: A.L. Val; R. Figliuolo; E. Feldberg (eds.). *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia: Fatos e Perspectivas.* Vol. 1. Secretaria de Ciências e Tecnologia. Manaus: INPA, p. 225-229.

Ferraz, I.D.K.; Leal Filho, N.; Imakawa, A.M.; VARELA, V.P.; Piña-Rodrigues, F.C.M. 2004. Características básicas para um agrupamento ecológico preliminar de espécies madeireiras da floresta de terra firme. *Acta Amazonica*, v.34: 621-633.

Ferraz, I.D.K.; Sampaio, P.T.B. 1996. Métodos simples de armazenamento das sementes de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C. – Meliaceae). *Acta Amazonica*. 26: 137-144.

Ferreira, C.S.; Piedade, M.T.F.; Bonates, L.C. 2006. Germinação de sementes e sobrevivência de plântulas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Wood. em resposta ao alagamento, nas várzeas da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 36: 413-418.

Ferreira, C.S.; Piedade, M.T.F.; Tiné, M.A.S.; Rossatto, D.R.; Parolin, P.; Buckeridge, M.S. 2009. The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus sucuuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. *Annals of Botany,*104: 1111–1119.

Ferreira, S.A.N. 1992. Biometria de frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Acta Amazonica,*22: 295-302.

Ferreira, S.D.N.; Gentil, D.D.O. 2003. Armazenamento de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) com diferentes graus de umidade e temperaturas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 440-442.

Flores, E.M.; Rivera, D.I. 1989. Criptocotilia en algunas dicotiledoneas tropicales. *Brenesia,* 32: 19-26.

Foyer, C.H.; Noctor, G. 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, 155: 2–18.

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

Gentil, D.F.O.; Ferreira, S.A.N. 2000. Métodos de extração e limpeza de sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata*). *Acta Amazonica*, 30: 23-30.

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.

Gonçalves, J.F.C.; Vieira, G.; Barbosa, A.P.; Ferraz, I.D.K. 2004.Transferência de Tecnologia no Setor Florestal da Amazônia. *Comunicações técnicas florestais*. Universidade de Brasília, v.6: 33-45.

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

Harrington, J.F. 1972. Seed storage and longevity.*In*: Kozlowski, T.T., Ed. *Seed Biology.*v.3. Academic, New York, p.145-241.

Hernández, M.S.; Martínez, O.; Fernández-Trujillo, J.P. (2007) Behavior of arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening. *Scientia Horticulturae*, 111:220-227.

Hong, T.D.; Ellis, R.H. 1998.Contrasting seed storage behavior among different species of Meliaceae.*Seed Science and Technology* 26: 77–95.

Hong, T.D.; Ellis, R.H. 2002. Storage. p. 125-136 *In*: Vozzo, J.A. (org.) *Tropical tree seed manual*. USDA/United States Department of Agriculture: Forest Service. Agriculture Handbook 721, 899 pp.

Janská A., Maršík P., Zelenková S., Ovesná J. (2010) Cold stress and acclimation–what is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*, 12, 395-405.

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

José, A.C.; Da Silva, E.A.A.; Davide, A.C. 2007. Classificação fisiológica de sementes de cinco espécies arbóreas da mata ciliar quanto à tolerância a dessecação e ao armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 29: 171-178.

Kainer, K.A.; Duryea, M.L.; Malavasi, M.M.; Silva, E.R.; Harrison, J. 1999. Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery mangement. *Forest Ecology and Management*, 116: 207-217.

Kellős T., Timar I., Szilágyi V., Szalai G., Galiba G., Kocsy, G. (2008) Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. *Plant Biology*, 10, 563-572.

King, M.W.; Roberts, E.H. 1979.*The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches*. Rome: IBPGR, 96p.

Kohama, S.; Maluf, A.M.; Bilia, D.A.C.; Barbedo, C.J. 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes*, 28: 72-78.

Kolb, R.M.; Medri, M.E.; Bianchini, E.; Pimenta, J.A.; Giloni, P.C.; Correa, G.T. 1998. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. *Brazilian Journal of Botany*, 21.

Kranner I., Birtić 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 Biology & Medicine*, 40, 2155-2165.

Kranner I., Grill D. (1996) Determination of glutathione and glutathione disulphide in lichens: a comparison of frequently used methods. *Phytochemical Analysis*, 7, 24-28.

Kranner I., Kastberger G., Hartbauer M., Pritchard H.W. (2010) Noninvasive diagnosis of seed viability using infrared thermography. *PNAS*, 107, 3912-3917.

Kranner, I.; Birtic, S. 2005.A modulating role for antioxidants in dissection tolerance.*Integr. Comp. Biol.*, 45: 734-740.

Kranner, I.; Minibayeva, F.V.; Beckett, R.P.; Seal, C.E. 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science.*New Phytologist*,188: 655–673.

Kurkdjian A., Guern J. (1989) Intracellular pH measurement and importance in cell activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 271–303.

Maguire J.D. (1962) Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour.*Crop Science*, 2, 176-177.

Maia J. (2014) *Unravelling desiccation tolerance in germinated Arabidopsisseeds*. Ph.D. thesis, Wageningen University,Wageningen, NL: 211pp.

Maia J., Dekkers B.J.W., Provart N.J., Ligterink W., Hilhorst H.W.M. (2011) The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. *PLoS ONE*, 6, 1-11.

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

Marcos Filho, J. 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas.* Piracicaba: Fealq. 495p.

Marinho, T.A.S.; Lopes, A.; Assis, R.L.; Ramos, S.L.F.; Gomes, L.R.P.; Wittmann, F.; Schöngart, J. 2013. Distribuição e crescimento de *Garcinia brasiliensis* Mart. e He*vea spruceana* (Benth.) Müll. Arg. em uma floresta inundável em Manaus, Amazonas. *Ciência Florestal*, 23: 223-232.

Marques, M.C.M.; Joly, C.A. 2000. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. *Acta Botanica Brasilica*, 14: 113-20.

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

Masetto, T.E.; Faria, J.M.R.; Davide, A.C.; Silva, E.A.A. 2008. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg.(Myrtaceae) seeds.*Revista Brasileira de Sementes*, 30: 51 -56.

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

McVaugh, R. 1958. Flora of Peru.*Botanical Series Field Museum of Natural History*, 13: 569-818.

Medri, M.E.; Ferreira, A.C.; Kolb, R.M.; Bianchini, E.; Pimenta, J.A.; Davanso-Fabro, V.M.; Medri, C. 2007. Alterações morfoanatômicas em plantas de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. submetidas ao alagamento. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 29: 15-22.

Melo, Z.L.O.; Gonçalvez, J.F.C.; Mazzafera, P.; Santos, D.Y.A.C. 2009. Mobilization of seed reserves during germination of four tropical species of the Amazon Rainforest. *Seed Science and Technology*, 37: 597-607.

Mendes, A.M.S. 2011. *Eugenia stipitata ssp. sororia McVaugh (araçá-boi) - Myrtaceae: abordagem fisiológica e morfoanatômica da semente, germinação e plântula* Tese de doutorado, Universidade do Amazonas, Manaus. 117p.

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

NicLughadha E.N., Proença C. (1996). A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae).*Annals of the Missouri Botanical Garden*, 83, 480-503.

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

Parolin, P. 2001.Seed germination and early establishment of 12 tree species from nutriente-rich and nutriente-poor Central Amazonian floodplains.*Aquaticbotany*, 70: 89-103.

Parolin, P. 2002 Submergence tolerance vs. escape from submergence: two strategies of seedling establishment in Amazonian floodplains. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 177- 186.

Pinedo, M.; Ramírez, F.; Blasco, M. 1981 *Notas preliminares sobre El arazá (Eugenia stipitata), frutal nativo de La Amazonia peruana*. INIA/IICA, Lima. 58p.

Popiginis, F. 1985. *Fisiologia da semente*. AGIPLAN, Brasília, 289p.

Popinigis, F. 1977. *Fisiologia da semente*. AGIPLAN, Brasília, 289 p.

Rennenberg H., Herschbach C., Haberer K., Kopriva S. (2007). Sulfur metabolism in plants: are trees different?.*Plant Biology*, 9, 620-637.

Ribeiro, M.D.S.; Steffens, C.A.; Amarante, C.V.T.; Pikart, T.G.; Oliveira, L.M. 2010.Armazenamento de sementes de palmiteiro sob atmosfera modificada. *Bragantia*, 69: 989-994.

Roach T., Ivanova M., Beckett R.P., Minibayeva F.V., Green I., Pritchard H.W., Kranner I. (2008). An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. *Physiologia plantarum*, 133, 131-139.

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

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

Rossetto, C.A.V.; Lima,T.M. e Nakagawa, J. 2002. Qualidade fisiológica e potencial de armazenamento de sementes de tomate submetidas ao condicionamento osmótico. *Hortic. Bras.*, vol.20, n.4, pp. 630-634.

Santana, P.J.A. 2007. Maturação, secagem e armazenamento de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) Dissertaçao de Mestrado, Intituto de Botânica, São Paulo. 80p.

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

Scalon, S.P.Q.; Scalon Filho, H.; Rigoni, M.R. 2004. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. *Ciência e Agrotecnologia*, 28: 1228-1234.

Shenmiller,J.; Mudgett, M.B.; Schopf, J.W.; Clarke, S.; Berger, R. 1995. Exceptional seed longevity and robust growth – ancient sacred lotus from China.*American Journals of Botany*, 82:1367-1380.

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

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

Silva, E.A.A.; José, A.C.; Davide, A.C. 2007. Classificação fisiológica de cinco espécies arbóreas de mata ciliar quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 29: 171-178.

Sun W.Q. (1998) Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: Marzalina M., Khoo K.C., Jayanthi N., Tsan F.Y., Krishnapillay B. (Eds) *IUFRO Seed Symposium 1998 Recalcitrant seeds: Proceedings of the Conference*. Forest Research Institute, Kuala Lumpur, Malaysia: 29-42.

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

Tompsett, P.B.; Pritchard, H.W. 1998.The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanum* L. seed. *Annals of Botany*, 82: 249-261.

Tweddle J.C., Dickie J.B., Baskin C.C., Baskin J.M. (2003) Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology*, 91, 294–304.

Verdeil J.L., Alemanno L., Niemenak N., Tranbarger T.J. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy?. *Trends in Plant Science*, 12, 245-252.

Verdier J., Lalanne D., Pelletier S., Torres-Jerez I., Righetti K., Bandyopadhyay K., Leprince O., Chatelain E., Ly Vu B., Gouzy J., Gamas P., Udvardi M.K., Buitink J. (2013) A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology*, 163, 757–774.

Vertucci, C.W. 1990. Calorimetric studies of the state of water in seed tissues. *Biophysical journal*, 58: 1463-1471.

Vianna, N.G. 1982. Conservação de sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). Circular técnica, 34. Embrapa-CPATU, Belém, PA.10 p.

Villachica, H.; Carvalho, J.E.U.; Müller, C.H.; Diaz S.C.; Almanza, M. 1996. *Frutales y hortalizas promissorios de la Amazonia*. Lima: Tratado de Cooperacion Amazonica. Secretaria Pro-tempore, 367p.

Villela, F.A.; Peres, W.B. 2004. Coleta, Beneficiamento e armazenamento. p.265- 281 *In:* A.G. Ferreira; F. Borghetti (eds.) *Germinação – do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Editora Artmed. 323p.

Voesenek, L.A.C.J.; Sasidharan, R. 2013. Ethylene–and oxygen signalling–drive plant survival during flooding. *Plant Biology*, 15: 426-435.

Vozzo, J.A. 2002. *Tropical tree seed manual*. USDA/United States Department of Agriculture: Forest Service. Agriculture Handbook 721. 899p.

Walters, C. 2000.Levels of recalcitrance in seeds.*Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (Edição especial): 7-21.

Walters, C; Farrant, J.M; Pammenter, N.W.; Berjak, P. 2002. Desiccation Stress and Damage.*In:* M. Black; H.W. Pritchard (eds). Desiccation and Plant Survival. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 263-291.