

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

IARA VELOSO RODRIGUES

ESTRUTURA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PEQUIZEIRO ANTES E APÓS A DISPERSÃO

**Montes Claros
2017**

Iara Veloso Rodrigues

ESTRUTURA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PEQUIZEIRO ANTES E APÓS A DISPERSÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Paulo Sérgio Nascimento Lopes

Coorientador: Leonardo Monteiro Ribeiro

Montes Claros
Junho de 2017

Rodrigues, Iara Veloso.

R696e
2017 Estrutura e germinação de sementes de pequiheiro antes e após a dispersão / Iara Veloso Rodrigues. Montes Claros, 2017.
56 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Paulo Sérgio Nascimento Lopes.

Banca examinadora: Cristina de Paula Santos Martins, Hellen Cássia Mazzottini dos Santos, Marlon Cristian Toledo Pereira, Leonardo Monteiro Ribeiro, Paulo Sérgio Nascimento Lopes.

Inclui referências: por capítulo.

1. *Caryocar brasiliense*. 2. Sementes. 3. Germinação. 4. Tolerância à dessecação. I. Lopes, Paulo Sérgio Nascimento. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Estrutura e germinação de sementes de pequiheiro antes e após a dispersão.

CDU: 631.53

Iara Veloso Rodrigues

Estrutura e germinação de sementes de pequizeiro antes e após a dispersão

Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Pós-doutoranda Cristina de Paula Santos Martins
UFMG

Prof. Dr. Hellen Cássia Mazzottini dos Santos
Faculdades Prominas

Prof.Dr. Marlon Cristian Toledo Pereira
Unimontes

Prof.Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro
Unimontes

Prof. Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes
(Orientador)
UFMG

Montes Claros, 02 de Junho de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao amado Deus por sempre iluminar minha vida e guiar meu caminho.

À Maria Santíssima por sempre interceder junto ao seu filho Jesus Cristo pela minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes e aos meus coorientadores Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro e Profa. Dra. Maria Olívia Mercadante Simões por todas as orientações, conhecimentos transmitidos, competência, responsabilidade e respeito.

Ao corpo docente e aos funcionários do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao corpo docente e aos funcionários da Universidade Estadual de Montes Claros.

A CAPES pela bolsa de Mestrado concedida.

A minha família, namorado e amigos, em especial, meus amados pais por todo apoio e amor.

Aos meus amigos e colegas do GEFEN, LAM e LAV.

À banca examinadora, pelas sugestões e correções.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)

ESTRUTURA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PEQUIZEIRO ANTES E APÓS A DISPERSÃO

RESUMO GERAL

Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae), pequizeiro, é uma espécie arbórea com ampla distribuição no Cerrado. Os seus frutos são largamente coletados para alimentação humana, indústria farmacêutica e de cosméticos. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar aspectos biométricos, anatômicos e fisiológicos do desenvolvimento de frutos e sementes de *C. brasiliense*, bem como, avaliar o efeito dos tratamentos de superação de dormência sobre a qualidade fisiológica de suas sementes. No primeiro trabalho, ao longo do desenvolvimento do fruto, foram realizadas avaliações biométricas no pericarpo e na semente e avaliações anatômicas, histoquímicas, ultraestruturais e cultivo *in vitro* e *ex vitro* dos embriões. No segundo, foram avaliadas a germinabilidade, emergência de plântulas, IVE e mortalidade de sementes, em pirênios recém-dispersos (controle), tratados com GA₃ (375 mg/L), armazenados por 30 dias e por 120 dias. Além disso, foi quantificado o malondialdeído (MDA) de sementes recém-dispersas e armazenadas por 30, 120 e 480 dias. O desenvolvimento do fruto ocorreu em cerca de 90 dias e foi caracterizado por três fases: i) histodiferenciação ii) maturação do endocarpo; iii) maturação do mesocarpo e da semente. O endocarpo aculeado atingiu a maturidade precocemente, atuando como estrutura protetora do embrião. O mesocarpo e a semente apresentaram conteúdo de matéria seca crescente ao longo do desenvolvimento do fruto. Embriões apresentaram alto grau de diferenciação (primórdios foliares e feixes vasculares) e capacidade germinativa precocemente, aos 40 dias após a antese (DAA). O início da deposição de reservas embrionárias coincidiu com a aquisição de tolerância à desidratação, alcançada próximo aos 50 dias DAA. A pronunciada dormência seminal esteve relacionada aos tecidos adjacentes ao embrião. O armazenamento e o tratamento com GA₃ foram eficientes na superação da dormência e na promoção da germinação, porém aumentaram a deterioração das sementes. As sementes recém-dispersas (controle) apresentaram, inicialmente, uma germinação e emergência mais baixa, seguida de uma estabilização (entre maio e agosto), retomando a emergência com aumento da temperatura do ambiente. Um maior tempo de armazenamento de pirênios (120 dias) geraram altos índices de deterioração das sementes e baixa emergência; provavelmente em decorrência da elevação da produção de espécies reativas a oxigênio, verificado pelo aumento de MDA.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*. Deterioração. Germinabilidade. Tolerância à dessecação.

STRUCTURE AND GERMINATION OF *PEQUIZEIRO* SEEDS BEFORE AND AFTER DISPERSION

GENERAL ABSTRACT

Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae), *pequi*, is a tree species with wide distribution in the Cerrado. Its fruits are widely collected for human consumption, the pharmaceutical industry and cosmetics. The present work aimed to characterize biometric, anatomical and physiological aspects of the development of fruits and seeds of *C. brasiliense*, as well as to evaluate the effect of dormancy overcoming treatments on the physiological quality of its seeds. In the first work, during the development of the fruit biometric evaluations were carried out in the pericarp and in the seed and anatomical, histochemical, ultrastructural evaluations and in vitro and ex vitro culture of the embryos. In the second, germinability, seedling emergence, IVE and seed mortality in freshly dispersed (control), treated with GA₃ (375 mg/L), stored for 30 days and for 120 days. In addition, malondialdehyde (MDA) was quantified from freshly dispersed seeds and stored for 30, 120 and 480 days. The development of the fruit occurred in about 90 days and was characterized by three phases: i) histodifferentiation; ii) maturation of the endocarp; iii) mesocarp and seed maturation. The acaracled endocarp reached maturity early, acting as the protective structure of the embryo. The mesocarp and the seed presented increased dry matter content along the development of the fruit. Embryos showed a high degree of differentiation (early leaf and vascular bundles) and early germination capacity at 40 days after anthesis (DAA). The beginning of the deposition of embryonic reserves coincided with the acquisition of tolerance to dehydration, reached near the 50 days DAA. The pronounced seminal dormancy was related to the tissues adjacent to the embryo. The storage and treatment with GA₃ were efficient in breaking dormancy and promoting germination, but increased the deterioration of seeds. The newly dispersed seeds (control) initially presented a lower germination and emergence, followed by a stabilization (between May and August), resuming the emergence with increasing ambient temperature. A longer time of storage of the pyrenes (120 days) generated high rates of seed deterioration and low emergence; probably due to the increase in the production of reactive oxygen species, verified by the increase of MDA.

Keywords: *Caryocar brasiliense*. Deterioration. Germinability. Desiccation tolerance.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	4
GENERAL ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Formação e desenvolvimento da semente	11
3.2 Dormência	12
3.3 Germinação	13
3.4 Tolerância à dessecação.....	14
3.5 Referências	15
4 ARTIGOS	19
4.1 ARTIGO - 1 Desenvolvimento do fruto e Maturação da Semente de <i>Caryocar brasiliense</i> (<i>Caryocaraceae</i>)	19
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Coleta do material vegetal e avaliações biométricas	22
2.2 Capacidade germinativa dos embriões e tolerância à dessecação	22
2.3 Anatomia e histoquímica dos embriões.	23
2.4 Microscopia eletrônica.....	24
3 RESULTADOS	24
3.1 Desenvolvimento do fruto.....	24
3.2 Capacidade germinativa dos embriões e tolerância à dessecação	25
3.3 Anatomia da semente.....	25
3.4 Deposição de reservas.....	26
4 DISCUSSÃO	26
4.1 Desenvolvimento do fruto e peculiaridades do embrião	27
4.2 Desenvolvimento do embrião, capacidade germinativa, estabelecimento da dormência e tolerância à dessecação.....	28
5 CONCLUSÃO	29
6 REFERÊNCIAS	29
7 APÊNDICES	33
4.2 ARTIGO - 2 SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE PEQUIZEIRO	40
RESUMO	40
ABSTRACT	44
1 INTRODUÇÃO	45

2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Coleta e procedimentos iniciais.....	46
2.2 Germinação e qualidade fisiológica de sementes de pequi tratadas com GA ₃ e armazenadas.....	46
2.3 Germinação e qualidade fisiológica de sementes de pequi semeadas no outono	47
2.4 Quantificação de malondialdeído (MDA) em sementes de pequi	43
3 RESULTADOS	46
3.1 Germinação e qualidade fisiológica de sementes de pequi tratadas com GA ₃ e armazenadas.....	46
3.2 Emergência e qualidade fisiológica de sementes de pequi semeadas no outono.	47
3.3 Quantificação de malondialdeído (MDA) em sementes de pequi	47
4 DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÕES	50
6 REFERÊNCIAS	50
7 APÊNDICES	54

1 INTRODUÇÃO

É notável o interesse em relação às plantas do Cerrado, principalmente, as frutíferas, em razão dos seus múltiplos usos e intensa demanda nos mercados regionais (PINHAL *et al.*, 2011). Dentre essas frutíferas, destaca-se o Pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), pertencente à família Caryocaraceae (BARRADAS, 1973). A espécie possui ampla ocorrência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (LORENZI, 2008); os frutos são do tipo drupa, com mesocarpo rico em nutrientes (CARVALHO, 2008) e representam uma significativa fonte de renda para populações de comunidades rurais do Cerrado. Entretanto o pequiizeiro sofre ameaça de extinção pelo extrativismo intenso dos seus frutos, associado à dificuldade de obtenção de mudas. As sementes de pequiizeiro apresentam dormência (ARAÚJO, 1995), levando a uma baixa e desuniforme germinação (BERNARDES *et al.*, 2008), sendo um obstáculo, para a produção de mudas da espécie, em larga escala, que garantiria uma exploração mais racional e sua conservação.

A capacidade germinativa das sementes de algumas espécies pode ser adquirida bem cedo (BEWLEY *et al.*, 2013), durante a primeira metade do desenvolvimento; depois, essa capacidade de germinação é suprimida pela dormência primária (BEWLEY *et al.*, 2013; HILHORST, 1995). O ácido abscísico (ABA) desempenha uma função importante nesse processo, pois é o responsável pela instalação da dormência (NAMBARA *et al.*, 2010), que é uma incapacidade da semente viável germinar, em um determinado período de tempo sob qualquer combinação de fatores, tais como temperatura, umidade e oxigênio (BASKIN; BASKIN, 2004).

O tipo mais comum de dormência é a fisiológica (BASKIN; BASKIN, 2004), que, também, ocorre em semente de *C. brasiliense* (SOUSA *et al.*, 2017). A superação da dormência em sementes de *C. brasiliense* pode ser vencida, pelo menos em parte, com a aplicação de GA3 e/ou pelo isolamento da semente (MENDES, 2015; DOMBROSKI *et al.*, 2010; BERNARDES *et al.*, 2008; SOUSA, 2016), bem como por um período de armazenamento (MENDES, 2015; SOUSA, 2016). Contudo procedimentos utilizados para superar a dormência, como armazenamento e embebição, podem desencadear aumento de produção de espécies reativas ao oxigênio, levando à perda da viabilidade das sementes (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; ORACZ *et al.*, 2007), e esse aspecto ainda foi pouco estudado para a espécie.

Outra característica pouco conhecida em *C. brasiliense* é o desenvolvimento do pericarpo e da semente. É importante que se tenham trabalhos mais aprofundados nesse sentido, visto que, durante o desenvolvimento das sementes, ocorrem várias modificações, que podem determinar quando o embrião adquire capacidade germinativa, dormência e tolerância à dessecação (BEWLEY *et al.*, 2013). Conhecimentos dessa natureza podem contribuir para o entendimento da propagação, bem como ao processo de adaptação da espécie ao Cerrado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Relacionar aspectos biométricos do desenvolvimento dos frutos com aspectos anatômicos e fisiológicos do desenvolvimento das sementes de *C. brasiliense*. Além de avaliar o efeito dos tratamentos de superação de dormência, armazenamento e uso do ácido giberélico (GA₃), sobre a qualidade fisiológica de sementes de *C. brasiliense*.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as fases de desenvolvimento do fruto de *C. brasiliense*.
- Relacionar as fases de desenvolvimento fruto com a capacidade germinativa, estabelecimento da dormência e tolerância à dessecação das sementes de *C. brasiliense*.
- Analisar a influência do armazenamento e da aplicação de GA₃ sobre a germinação e a deterioração das sementes de *C. brasiliense* em diferentes tempos de avaliações após o plantio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Formação e desenvolvimento da semente

Os óvulos são precursores das sementes e possuem papel importante no processo reprodutivo das plantas. A partir do núcleo, uma célula subdérmica diferencia-se, para formar a célula-mãe do megásporo, o megasporocito, que sofre meiose, formando quatro células haploides, megásporos; três degeneram e o megásporo funcional realiza três mitoses originando o megagametofito ou saco embrionário, com 7 células e oito núcleos (HARTMANN *et al.*, 2010; MARCOS FILHO, 2005), o que ocorre na maioria das angiospermas (FRIEDMAN; WILLIAMS, 2003). Na região micropilar há duas sinérgides e a oosfera; na célula central dois núcleos e na extremidade chalazal três antípodas (BEWLEY *et al.*, 2013; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Os grãos de pólen são formados nos sacos polínicos ou microsporângios, que são encontrados nas anteras. A célula-mãe do micrósporo sofre meiose, origina tétrades haploides; cada uma das células haploides pode originar um grão de pólen, que, tipicamente, apresenta de uma a duas células generativas, que são relacionadas à fertilização, e uma célula vegetativa que forma o tubo polínico (HARTMANN *et al.*, 2010; MARCOS FILHO, 2005).

No processo de fertilização, duas células espermáticas são transmitidas para o óvulo por meio de um tubo polínico e liberadas no saco embrionário (TUCKER; KOLTUNOW, 2009). Uma se funde com a oosfera e a outra com os núcleos da célula central e da fertilização da célula central tem-se a formação do endosperma, enquanto a fertilização da oosfera formará o zigoto e, conseqüentemente, o embrião (BLECKMANN; ALTER; DRESSELHAUS, 2014). A dupla fertilização é uma característica das Angiospermas (TUCKER; KOLTUNOW, 2009).

O desenvolvimento da semente é um processo complexo que envolve vias genéticas, fisiológicas e interação ambiental (DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014). Nesse processo, ocorrem diferentes e sucessivas fases para assegurar a formação de uma unidade de reprodução funcional (SABELLI *et al.*, 2012). O padrão de desenvolvimento de sementes, para a maioria das espécies, compreende três fases: histodiferenciação, maturação e secagem.

Na primeira fase, há diferenciação histológica e morfogênese do embrião (DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014; HARTMANN *et al.*, 2010); o zigoto passa por divisões mitóticas e as células resultantes diferenciam-se no plano básico do corpo do embrião e, simultaneamente, em angiospermas, existe a formação do endosperma (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002). Durante a embiogênese em eudicotiledôneas, identifica-se uma série de estádios pelos quais o embrião em formação deve passar: proembrião, globular, transição (trapezoidal), cardiforme, torpedo e embrião maduro (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Na fase de proembrião, há diferenciação da célula basal e célula apical, que irão formar o suspensor e o embrião, respectivamente. Nas fases globular, transição e coração, há diferenciação dos tecidos meristemáticos primários, nos quais o embrião torna-se bilateralmente simétrico e inicia-se o desenvolvimento dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radicular, com diferenciação da radícula. Nas

fases de torpedo e embrião maduro, ocorre ampliação dos cotilédones e diferenciação do meristema apical do caule (GOLDBERG; PAIVA; YADEGARI, 1994).

Na segunda fase, maturação, há expansão celular, em virtude do acúmulo de reservas, levando ao incremento de peso seco (BEWLEY *et al.*, 2013; DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014; KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002). Na terceira fase, secagem, ocorre maior perda de água dos tecidos (HARTMANN *et al.*, 2010; KERMODE, FINCH-SAVAGE, 2002). Apesar de existir um modelo no processo de formação da semente, pode existir variação nesse padrão (BEWLEY *et al.*, 2013) e, para o *C. brasiliense*, esse aspecto é pouco conhecido.

3.2 Dormência

Uma semente dormente é aquela que não germina em um determinado período, mesmo estando exposta sob qualquer combinação de fatores em que uma semente não dormente germinaria (BASKIN; BASKIN, 2014; BASKIN; BASKIN, 2004). A dormência é determinada pela genética e influenciada pelo ambiente (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006), sendo considerada uma característica importante para a evolução adaptativa em populações de plantas (POSTMA; AGREN, 2016). A dormência permite a dispersão no tempo (BEWLEY *et al.*, 2013), assegurando a persistência de uma espécie em ambientes e tempos desfavoráveis (FORBIS; FLOYD; QUEIROZ, 2012). Portanto é o resultado de uma adaptação que foi adquirida por algumas espécies para sobreviverem a situações estressantes (BEWLEY *et al.*, 2013), sincronizando a germinação com o momento ideal para o estabelecimento das plântulas (FOOTITT *et al.*, 2011). Contudo é uma característica indesejável, quando se precisa de uma germinação rápida, como na agricultura (TEDESCO *et al.*, 2001), além de gerar problemas como desuniformidade entre mudas e dificultando a produção em viveiros.

Dormência e germinação de sementes são processos complexos, influenciados por hormônios (KUCERA *et al.*, 2005). A indução, manutenção e superação da dormência são eventos regulados, principalmente, pela relação entre o ácido abscísico (ABA) e giberelinas (GAs) (DEKKERS; BENTSINK, 2015), esses hormônios antagônicos (BEWLEY *et al.*, 2013). O ABA é um regulador positivo na instalação e manutenção da dormência (BEWLEY *et al.*, 2013; KUCERA *et al.*, 2005; NAMBARA *et al.* 2010). Durante o desenvolvimento da semente, o ABA inibe a germinação precoce e induz a dormência primária (HILHORST, 1995; NAMBARA *et al.*, 2010). Já as giberelinas (GAs) aumentam o potencial de crescimento do embrião e enfraquece tecidos que circundam o embrião, levando à superação da dormência e promoção da germinação (BEWLEY *et al.*, 2013; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

Dormência em sementes pode ser dividida em cinco classes: fisiológica, morfológica, física, morfofisiológica e a combinação entre física e fisiológica (BASKIN; BASKIN, 2004). Na dormência fisiológica, existe um mecanismo de inibição fisiológica que impede a germinação, esse mecanismo está presente no embrião, bem como nos tecidos adjacentes (DEKKERS; BENTSINK, 2015). É caracterizada pela incapacidade do embrião em romper as estruturas que o circundam (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006). Essa classe de dormência distingue-se em três níveis: profundo, intermediário e não

profundo. Na dormência profunda, o embrião excisado não germina ou, ao germinar, gera plântulas anormais; quando submetido a tratamento pré-germinativo com ácido giberélico, a dormência não é superada e faz-se necessário um longo período de estratificação a quente ou a frio, para que a germinação ocorra. Já o nível de dormência intermediária e não profunda, de maneira geral, embriões excisados produzem plântulas normais, e algumas espécies germinam em resposta à aplicação de giberelina; a estratificação é eficiente, contudo, na dormência não profunda, o armazenamento a seco pode promover a germinação (BASKIN; BASKIN, 2004). A dormência morfológica ocorre em sementes com embrião pequeno, porém com suas estruturas bem diferenciadas; normalmente é necessário que o embrião cresça ainda dentro da semente para que depois germine. Sementes que apresentam dormência física são totalmente impermeáveis à água. A dormência morfofisiológica é a união entre a morfológica e fisiológica. Por fim, existem sementes que possuem uma combinação entre dormência fisiológica com a física (BASKIN; BASKIN, 2004).

A dormência fisiológica é a mais encontrada em sementes de Angiospermas (BASKIN; BASKIN, 2014; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006). No bioma Cerrado, há ocorrência de várias espécies que apresentam dormência fisiológica, tais como *Attalea vitrivir* (NEVES *et al.*, 2013) e *Acrocomia aculeata* (CARVALHO *et al.*, 2015). Em *C. brasiliense*, a dormência foi evidenciada como fisiológica não profunda, sendo sua classificação proposta por Baskin e Baskin (2004), controlada, em parte, pelo endocarpo, que dificulta o crescimento do embrião (SOUSA, 2016) e por um desbalanço hormonal no embrião, fazendo com que as sementes de pequiizeiro permaneçam dormentes (MENDES, 2015).

Tratamentos utilizando giberelina (DOMBROSKI *et al.*, 2010; MENDES, 2015) e armazenamento (SOUSA, 2016) são eficientes na superação da dormência em sementes de pequiizeiro. O armazenamento seco, à temperatura ambiente, é um método utilizado na superação de dormência (KUCERA *et al.*, 2005), um vez que pode diminuir a concentração e sensibilidade ao ABA e aumentar a sensibilidade ao GA (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

Entretanto, além de promover a germinação, há indícios de que esses tratamentos aumentam a deterioração das sementes, sendo, ainda, necessários mais estudos relacionados ao uso de GA₃ e o armazenamento no processo de germinação e deterioração de sementes de *C. brasiliense*.

3.3 Germinação

A transição entre a dormência e a germinação é um processo essencial no ciclo de vida de plantas (HOLDSWORTH; BENTSINK; SOPPE, 2008). Germinação é um processo complexo (NONOGAKI *et al.*, 2010), que consiste na retomada do crescimento do embrião; é um processo que, geralmente, inicia-se com a embebição e termina com o surgimento do eixo embrionário e, em muitos casos, a embebição apresenta um padrão trifásico (BEWLEY *et al.*, 2013), como ocorre em *C. brasiliense* (MENDES, 2015).

A fase I é uma etapa física, caracterizada pela absorção rápida de água pelas sementes até que todo conteúdo celular seja hidratado. Em seguida, ocorre a fase II, que é um período de absorção de água bem limitado e, nessa fase, há o reparo da integridade celular, membranas, DNA, organelas e

mitocôndrias, síntese de mRNAs, enzimas, hormônios e há mobilização de reservas. Na terceira fase, há um retorno da absorção de água e conclusão da germinação, com emissão, geralmente, da raiz primária (BEWLEY *et al.*, 2013). No processo germinativo, em uma semente dormente, podem ocorrer quase todas as etapas metabólicas, para completar a germinação, contudo não ocorre o alongamento do eixo embrionário (BEWLEY, 1997). O equilíbrio entre a força de expansão do embrião e a contenção física dos tecidos adjacentes determina se e quando a germinação será concluída (BEWLEY *et al.*, 2013).

Para ocorrer a germinação de uma semente, deve-se ter uma janela temporal com condições ambientais (umidade, oxigênio, temperatura, luz) que irão proporcionar a emergência e sobrevivência da planta (LONG *et al.*, 2014). Para grande parte das espécies, o período de germinação é sempre o mesmo e, em sementes que possuem germinação durante todo ano, existe um pico de germinação (BASKIN; BASKIN, 2014), visto que o processo germinativo é controlado para evitar condições desfavoráveis no estabelecimento e crescimento das plântulas (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006). No Cerrado, algumas espécies como *Attalea vitrivir* (NEVES *et al.*, 2013) e *C. brasiliense* (MENDES *et al.*, 2015), o período da germinação coincide com o período de maior precipitação e temperatura.

3.4 Tolerância à dessecação

O conhecimento da capacidade de tolerância à dessecação e ao armazenamento das sementes é importante, pois viabiliza estratégias para a manutenção da viabilidade das sementes. Conforme a habilidade à dessecação e ao armazenamento sob baixas temperaturas, as sementes são classificadas em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias (COSTA, 2009). Sementes ortodoxas são tolerantes à dessecação e, em geral, são dispersas com teor de água que varia de 20 a 50%, permanecem viáveis a 5% de conteúdo de água e toleram baixas temperaturas. Sementes de comportamento recalcitrantes, no momento da dispersão, apresentam teor de água elevado, 30 a 70%, não toleram redução de 10% de conteúdo de água e nem baixas temperaturas. E, ainda, existem sementes que apresentam comportamento intermediário, pois toleram a dessecação, mas não suportam baixas temperaturas durante período de tempo prolongado (HONG; ELLIS, 1996).

A capacidade de tolerância à desidratação aumenta progressivamente durante o desenvolvimento da semente (BEWLEY *et al.*, 2013). Para que a semente consiga sobreviver, no estado seco, é necessário que se tenha um amplo sistema de proteção e desintoxicação celular (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008). Sementes tolerantes à dessecação se preparam, para esse processo tardiamente, durante o seu desenvolvimento (HARTMANN *et al.*, 2010), pois é quando ocorre a síntese da proteína abundante com a embriogênese tardia (LEA) e a produção de açúcares, que são responsáveis por manter a integridade das membranas, evitando danos celulares (BEWLEY *et al.*, 2013; PAMMENTER; BERJAK, 1999). O ABA possui um papel muito importante na tolerância à dessecação, pois induz a síntese da LEA (BEWLEY *et al.*, 2013; HARTMANN *et al.*, 2010). Sementes que suportam a desidratação possuem mecanismos antioxidantes eficientes (NAMBARA *et al.*, 2010; PAMMENTER;

BERJAK, 1999), como tocoferóis (BARRETO *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2005) e ação de algumas enzimas especializadas em remover espécies reativas de oxigênio: glutathione redutase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase (ROSA *et al.*, 2005), que atuam, principalmente, durante a embebição, quando o metabolismo das sementes é reativado (PAMMENTER; BERJAK, 2000). Contudo sementes que não suportam a dessecação não apresentam, ou os mecanismos antioxidantes são ineficientes (MARCOS FILHO, 2005).

A tolerância à dessecação, geralmente, está associada ao ambiente de cultivo das espécies; sementes adaptadas ao ambiente seco, geralmente, são tolerantes à desidratação (RAJJOU *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2012; VICI *et al.*, 2010). A espécie *C. brasiliense* ocorre no Cerrado (FLORA DO BRASIL, 2016) e há indícios de que suas sementes são tolerantes à dessecação (MENDES, 2015), mas possuem uma característica peculiar, que é alto teor de água, no momento da dispersão, próximo de 40% (SOUSA, 2016), mais comum de sementes recalcitrantes (LONG *et al.*, 2014).

3.5 Referências

- ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable of central Brazilian Cerrados. **Economic Botany, Bronx**, v. 49, p. 40-48, 1995.
- BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p. 806-814.2008. Disponível em:< 10.1016/j.crv.2008.07.022.> Acesso em: 04 abr. 2016.
- BARRADAS, M. M. Morfologia do fruto e da semente de *Caryocar brasiliense* (piqui) em várias fases de desenvolvimento. **Revista de Biologia**, [S.l.], v. 9, p. 69-84, 1973.
- BARRETO, L. C.; GARCIA, Q. S.; MORALES, M.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Vitamin E and defense-related phytohormones are reliable markers of embryo growth in macaw palm fruits exposed to various storage conditions. **Plant Cell, Tiss Organ Cult**, Amsterdam, v. 118, p. 203-213, 2014.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 2014. 1600 p.
- BERNARDES, T. G.; NAVES, R. V.; REZENDE, C. F. A.; BORGES J. D.; CHAVES, L. J. Propagação sexuada do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) estimulada por ácido giberélico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 2, p.71-77, 2008.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3 ed. New York: Springer, 2013.
- BEWLEY, J.D. **Seed germination and dormancy**. *The Plant Cell*, v. 9, p. 1055-1066, 1997.
- BLECKMANN, A.; ALTER, S.; DRESSELHAUS, T. The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization. **Front Plant Sci**, v. 5, p.1-11. Disponível em: < 10.3389/fpls.2014.00452>. Acesso em: 05 maio. 2015.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v.3. 593p.
- CARVALHO, V. S.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; AGOSTINHO, C. O.; MATIAS, L. J.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; CORREIA L. N. F. Dormancy is modulated by seed structures in palms of the cerrado biome. **Australian Journal of Botany**, v. 63, n. 5, p. 444-454, 2015.
- COSTA, C. J. Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado. Distrito Federal: **Embrapa Cerrados**, 30.p, 2009.
- DANTE, R. A.; LARKINS, B. A.; SABELLI, P. A. Cell cycle control and seed development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p.493, 2014. Disponível em: <10.3389/fpls.2014.00493>. Acesso em: 18 abr. 2017.
- DEKKERS, B. J.; WBENTSINK, L. Regulation of seed dormancy by abscisic acid and DELAY OF GERMINATION 1. **Seed Science Research**,v.25,p. 82–98, 2015.
- DOMBROSKI, J. L. D.; PAIVA, R.; ALVES, J. M. C.; SANTOS, B. R.; NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P. D. O.; BARBOSA, S. Métodos para superação da dormência fisiológica de *Caryocar brasiliense* Camb. **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 2, p. 131-135, abr./jun. 2010.
- FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v.171, p.501-523, 2006. Disponível em: <10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>. Acesso em: 07 set. 2016.
- FLORA DO BRASIL. Lista de espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/>> Acesso em: 04 abr. 2017.
- FOOTITT, S.; DOUTERELO-SOLER, I.; CLAY, H.; FINCH-SAVAGE, W. E. Dormancy cycling in Arabidopsis seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,v.108, p. 20236–20241, 2011.
- FORBIS,T. A.; FLOYD, S. K.; QUEIROZ, A. The Evolution of Embryo Eize in Engiosperms and Other Seed Plants: Implications for the Evolution of Seed Dormancy. **Evolution**, v. 56, n.11, p. 2112–2125, 2012.
- FRIEDMAN, W. E.; WILLIAMS, J. H. Modularity of the angiosperm female gametophyte and its bearing on the early evolution of endosperm in flowering plants. **Evolution**, v. 57, p. 216–230, 2003.
- GOLDBERG, R. B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis zygote to seed.Science, v. 266, n. 5185, p. 605-614,1994. Disponível em: < 10.1126/science.266.5185.605>. Acesso em: 08 set. 2016.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: Principles and practices**. 8. ed. Printice hall: Upper Sadd River, 2010. 928p.
- HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. 1. Primary dormancy. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 61-73, 1995.
- HOLDSWORTH, M. J.; BENTSINK, L.; SOPPE, W. J. J. Molecular aspects of seed dormancy. **PlantBiology**, v. 59, n. 1, p. 387, 2008. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/eprint/xPNuIdqaFdbEpZJGwhxA/full/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740> >. Acesso em: 27 out. 2016.
- HONG, T. D., ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Technical Bulletin n. 1, Italy, International Plant Genetic Resources Institute, 1996.

KERMODE, A.; FINCH-SAVAGE, B. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. Desiccation and Survival in Plants, Drying without Drying. Wallingford: CAB International, 2002.p. 149-184.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Sci Research**. v15, p. 281–307, 2005.

LONG, R. L.; GORECKI, M. J.; RENTON, M.; SCOTT, J. K.; COLVILLE, L.; GOGGIN, D. E.; COMMANDER, L. E.; WESTCOTT, D. A.; CHERRY, H.; FINCH-SAVAGE, W. E. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. **Biological Reviews Cambridge Philosophical Society**, 2014.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v. 1. 384 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MENDES, D. S. Dormência, germinação e longevidade em sementes de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) 2015. 50p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2015.

NAMBARA E., OKAMOTO M., TATEMATSU K., YANO R., SEO M., KAMIYA Y. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 230, n. 2, p. 55–67, 2010.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; CUNHA, I. R. G.; PIMENTA, M. A. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N. Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*), Flora, v. 208, p. 68-78, 2013.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination – Still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.

ORACZ, K.; BOUTEAU, H. E. M.; FARRANT, J. M.; COOPER, K.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; JOB, D.; CORBINEAU, F.; BAILLY, C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. **Plant Journal, Oxford**, v. 50, p. 452-465, 2007. Disponível em:< doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03063.x>. Acesso em 21 fev. 2017.

PAMMENTER N.W., BERJAK P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, v.10, p.301–306, 2000.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, p.13-37, 1999.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P. ; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v.41, n.7, p.1136-1142, 2011.

POSTMA, F. M.; AGREN, J. Maternal environment affects the genetic basis of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 785 – 797, 2015.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 796-805, 2008.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. Annual **Review of Plant Biology**, v.63, p. 507-533, 2012. Disponível em < 10.1146/annurev-arplant-042811-105550>. Acesso em 21 fev. 2017.

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, T. G. S.; CARVALHO, V. S.; SILVA, P. de O.; NEVES, S. da C.; GARCIA, Q. S. The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. **Seed Science and Technology**, v. 40, 2012.

ROSA, S.D.V.F. da; PINHO, E.R.V.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

SABELLI P.A. Seed development: a comparative overview on biology of morphology, physiology, and biochemistry between monocot and dicot plants. In: AGRAWAL, G. K; RAKWAL, R. **Seed development: OMICS technologies toward improvement of seed quality and crop yield**. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 2012. p. 3-25.

SOUSA, A. M. S. Estrutura, Qualidade Fisiológica e Armazenamento de Sementes de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) 2016. 89p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2016.

SOUSA, M. S.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; ANDRADE, M. S.; MERCADANTE SIMÕES, M. O. Structural aspects of germination control in pyrenes of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). **Trees**, v.31, n.1, p. 1-16, 2017. Disponível em: <10.1007/s00468-016-1514-2>. Acesso em: 17 fev. 2017.

TEDESCO, S.B.; STEFANELLO, M.O.; SCHIFINOWITTMANN, M.T.; BATTISTIN, A.; DALL'AGNOL, M. Superação da dormência em sementes de espécies de *Adesmia* D.C. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, n. 2, p.89-92, 2001.

TUCKER, M.R.; KOLTUNOW, A.M.G. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. **Functional Plant Biology**, v.36, p.490-504, 2009.

VICI, R. A.; GALILI, G.; FERNIE, A. R.; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v.15, n. 4, p. 1360-1385, 2010.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1- Desenvolvimento do fruto e maturação da semente de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)

Resumo

Caryocar brasiliense, pequizeiro, é uma espécie arbórea endêmica do Cerrado. Os frutos, fonte de renda para populações tradicionais, são utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. Objetivou-se relacionar as fases do desenvolvimento do pericarpo e da semente com a capacidade germinativa, estabelecimento da dormência, deposição de reservas e tolerância à dessecação no embrião. Ao longo do desenvolvimento do fruto, foram realizadas avaliações biométricas no pericarpo e na semente e avaliações anatômicas, histoquímicas, ultraestruturais e cultivo *in vitro* e *ex vitro* dos embriões. O desenvolvimento do fruto ocorreu em cerca de 90 dias e foi caracterizado por três fases: i) histodiferenciação; ii) maturação do endocarpo; iii) maturação do mesocarpo e da semente. O endocarpo aculeado atingiu a maturidade, precocemente, atuando como estrutura protetora do embrião. O mesocarpo e a semente apresentaram conteúdo de matéria seca crescente ao longo do desenvolvimento do fruto. Embriões apresentaram alto grau de diferenciação (primórdios foliares e feixes vasculares) e capacidade germinativa precocemente, aos 40 dias após a antese (DAA). O início da deposição de reservas embrionárias coincidiu com a aquisição de tolerância à desidratação, alcançada próximo aos 50 dias DAA. A pronunciada dormência seminal esteve relacionada aos tecidos adjacentes ao embrião. O fruto de *C. brasiliense* desenvolve um conjunto de características morfofisiológicas peculiares como endocarpo rígido e incrustado de acúleos, semente contendo embriões com hipocótilos expandidos, que armazenam reservas e são tolerantes à dessecação, além da dormência seminal, as quais contribuem para adaptação da espécie ao ambiente de clima sazonal do bioma Cerrado.

Palavras-chave: Dormência. Embrião. Germinação. Pericarpo. Tolerância à dessecação.

4.1 Article 1-Development of fruit and maturation of the *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) seed

Abstract

Caryocar brasiliense, pequiizeirois an arboreal species endemic of the Cerrado. The fruits, source of income for traditional populations, are used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. The objective of this study was to relate the phases of pericarp and seed development with germinative capacity, establishment of dormancy, deposition of reserves and tolerance to desiccation in the embryo. During the development of the fruit, biometric evaluations were performed in the pericarp and in the seed and anatomical, histochemical and ultrastructural evaluations and in vitro and ex vitro culture of the embryos. The development of the fruit occurred in about 90 days and was characterized by three phases: i) histodifferentiation; ii) maturation of the endocarp; iii) mesocarp and seed maturation. The acaracled endocarp reached maturity early, acting as the protective structure of the embryo. The mesocarp and the seed presented increased dry matter content along the development of the fruit. Embryos showed a high degree of differentiation (early leaf and vascular bundles) and early germination capacity at 40 days after anthesis (DAA). The beginning of the deposition of embryonic reserves coincided with the acquisition of tolerance to dehydration, reached near the 50 days DAA. The pronounced seminal dormancy was related to the tissues adjacent to the embryo. The *C. brasiliense* fruit Develops a set of peculiar morphophysiological characteristics as a rigid and acrid encrusted endocarp, seed containing embryos with expanded hypocotyls, which store reserves and are desiccant tolerant, in addition to seminal dormancy, which contribute to the adaptation of the species to the environment of the biome's seasonal climate Cerrado.

Keywords: Dormancy. Embryo. Germination. Pericarp. Desiccation tolerance.

1 INTRODUÇÃO

Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae), pequiizeiro, é uma espécie arbórea endêmica e com ampla distribuição no Cerrado (FLORA DO BRASIL, 2016). Os frutos oleaginosos da espécie proporcionam renda para populações tradicionais, uma vez que são utilizados para extração de óleo comestível e à fabricação de conservas, licores e sorvetes (ARAÚJO, 1995; BARRADAS, 1973; ASCARI *et al.*, 2013). Os frutos possuem, ainda, potencial de uso na indústria farmacêutica e de cosméticos, pelas suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas (AMARAL *et al.*, 2014; MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2013; ROESLER *et al.*, 2008). No entanto o desmatamento e o extrativismo intenso dos frutos de *C. brasiliense* vêm ameaçando a sobrevivência das populações naturais (ARAÚJO, 1995). Além disso, as sementes apresentam baixa germinabilidade (BERNARDES *et al.*, 2008; DOMBROSKI *et al.*, 2010), dificultando a produção de mudas em larga escala para plantios comerciais e conservação.

A baixa germinabilidade comumente está associada à dormência, que é a incapacidade de uma semente completar a germinação, mesmo sob condições favoráveis (BASKIN; BASKIN, 2004; BEWLEY *et al.*, 2013). As sementes de *C. brasiliense* apresentam dormência fisiológica (DOMBROSKI *et al.*, 2010; MENDES, 2015; SOUSA *et al.*, 2017), ocasionada pela incapacidade do embrião em superar a resistência imposta pelos tecidos adjacentes (um conceito de BASKIN; BASKIN, 2014).

O estabelecimento da dormência e da tolerância à dessecação, além da deposição das reservas, ocorre, ao longo do desenvolvimento das sementes, que, para a maioria das espécies, envolve as fases de histodiferenciação, acúmulo de reservas e dessecação (BEWLEY *et al.*, 2013; HARTMANN *et al.*, 2010). No entanto existe uma grande diversidade na distribuição temporal das fases entre as espécies e um número considerável de variações quanto ao padrão geral (BEWLEY *et al.*, 2013; WERKER, 1998).

C. brasiliense possui um diásporo peculiar (BARRADAS, 1973; SOUSA, *et al.*, 2017) e não existem relatos na literatura abordando a associação entre o desenvolvimento do pericarpo e características morfofisiológicas da semente, como a capacidade germinativa, tolerância à dessecação e a anatomia e ultraestrutura dos embriões. Estes estudos poderão contribuir, para a ampliação dos conhecimentos sobre o desenvolvimento dos frutos, em geral e sobre as estratégias reprodutivas desta importante espécie do bioma Cerrado.

Objetivou-se, no presente trabalho, relacionar aspectos biométricos do desenvolvimento dos frutos com aspectos anatômicos e fisiológicos do desenvolvimento das sementes de *C. brasiliense*. Procurou-se responder às seguintes perguntas: I) Quais as fases de desenvolvimento do fruto? II) Como estão relacionadas as fases de desenvolvimento do fruto com a capacidade germinativa, estabelecimento da dormência e tolerância a dessecação?

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal e avaliações biométricas

Foram selecionadas 29 plantas de *C. brasiliense*, com, aproximadamente 10 anos de idade, em um pomar experimental, localizado no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, município de Montes Claros, Norte do Estado de Minas Gerais, Brasil. A partir do mês de setembro, as datas da antese das flores foram registradas. Foram realizadas coletas semanais dos frutos em desenvolvimento até os 90 DAA dias, após a antese, ocasião da abscisão.

O exocarpo, juntamente com mesocarpo externo, foram retirados com auxílio de faca. Até os 40 DAA, as sementes foram retiradas do endocarpo com o auxílio de uma faca e, nos demais tempos, utilizou-se torno manual de bancada, alicate, motoesmeril e pinça, conforme metodologia proposta por Mendes (2015). Para cada período, em quatro repetições de cinco frutos, foram mensurados o comprimento, a largura e espessura do fruto e da semente. Para o exocarpo + mesocarpo, endocarpo e semente, foram determinadas as massas frescas e as massas secas, após a desidratação em estufa a 105°C por 24 horas, sendo calculado o teor de água (BRASIL, 2009). Os frutos de *C. brasiliense* podem desenvolver de uma a cinco sementes (BARRADAS, 1973); as avaliações foram realizadas apenas em frutos monospérmicos, identificados precocemente pela morfologia esfereiforme, a fim de favorecer a definição das fases de desenvolvimento.

2.2 Capacidade germinativa dos embriões e tolerância à dessecação

Aos 40, 50, 60, 80 e 90 DAA, foi avaliada a capacidade germinativa *in vitro* dos embriões. As sementes foram retiradas dos frutos, conforme descrito anteriormente, desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos, lavadas três vezes em água destilada e conduzidas para a câmara de fluxo laminar. Os embriões foram retirados dos tegumentos, com auxílio de bisturis e estiletos, depositados em solução de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, para evitar oxidação e foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, por 10 minutos, seguido por tripa lavagem em água destilada e autoclavada (121° C por 20 minutos). A inoculação foi realizada em tubos de ensaio (20 x 3 cm), contendo 20 mL do meio de cultura previamente autoclavado, contendo sais MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) com 75% de sua concentração original, suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de tiamina, 1mg L⁻¹ piridoxina, 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 30 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de carvão ativado e 6 g L⁻¹ de ágar, com o pH ajustado para 5,7 (RIBEIRO *et al.*, 2011). Os embriões foram conduzidos para câmara de germinação à temperatura de 30 °C e ausência de luz, por 30 dias.

Embriões foram inoculados, nas mesmas condições descritas acima, após a desidratação por cinco dias, em recipientes de vidro (previamente autoclavados e selados com papel), mantidos em caixas de polietileno com sílica gel. A sílica foi previamente desidratada em estufa, a 130° C por 8 horas e foi substituída quando foram observadas alterações na cor. Utilizou-se quantidade de sílica equivalente

à massa dos recipientes mais as sementes. Em ambas as avaliações, foram considerados germinados os embriões que emitiram a raiz primária (5 mm) ou que apresentaram plúmulas com comprimento superior a 10 mm. Foram classificados como mortos aqueles embriões amolecidos e atacados por microrganismos que não apresentaram germinação.

Nos mesmos períodos, foi avaliada a capacidade germinativa dos embriões em condição *ex vitro*, utilizando caixas plásticas gerbox transparentes (11x 11x 3,5 cm). Os embriões foram colocados para germinar sobre duas folhas de papel filtro autoclavadas e umedecidas com água destilada e autoclavada na proporção de 2,5 vezes a massa do substrato (BRASIL, 2009). Foram utilizados embriões hidratados (retirados diretamente das sementes) e desidratados, sendo os demais procedimentos e avaliações realizadas conforme descrito anteriormente.

Ambos os experimentos (condição *in vitro* e *ex vitro*) foram estabelecidos, em delineamento inteiramente casualizados, considerando-se esquema fatorial 5 (tempos) x 2 (embriões hidratados ou desidratados) e quatro repetições de cinco embriões. Os dados foram tomados por contagem de embriões germinados, transformados em percentuais e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

2.3 Anatomia e histoquímica dos embriões

Aos 35, 40, 50, 60, 80 e 90 DAA, embriões foram retirados dos frutos, conforme descrito anteriormente e foram fragmentados sob lupa, com auxílio de lâmina de barbear, em cubos com arestas de, aproximadamente, 3 mm nas seguintes regiões: polo radicular, região mediana do hipocótilo e epicótilo. O material foi fixado em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) por 24 horas em vácuo, desidratado em série etílica e incluído em 2-hidroxi-etil-metacrilato (PAIVA *et al.*, 2011). Secções longitudinais (5 µm de espessura) foram obtidas com utilização de micrótomo rotativo (Atago, Tóquio, Japão). As secções foram coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (modificado de O'BRIEN *et al.*, 1964) e montadas em lâminas com resina acrílica (Itacril, Itaquaquecetuba, Brasil).

Foram realizados testes histoquímicos com reagente de Lugol (JENSEN, 1962), para identificação de amido; ácido periódico e reagente de Schiff (PAS) (FEDER; O'BRIEN, 1968), para identificação de polissacarídeos; Sudan Black (PEARSE, 1980), para lipídios totais e Xylidine Ponceau (VIDAL, 1970), para proteínas totais.

2.4 Microscopia eletrônica

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram obtidas amostras da plúmula aos 35, 40, 50, 60, 80 e 90 DAA. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky vácuo (KARNOVSKY, 1965) por 24 horas, desidratadas em série etílica, secas ao ponto crítico (utilizando-se CO₂), em equipamento apropriado (CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), preparadas em suportes de alumínio, metalizadas com ouro em aparelho (MED. 010– Balzers, Balzers, Leichtenstein) e analisadas em

microscópio eletrônico de varredura Quantum 200 (FEI Company, Eindhoven, Holanda), com captura de imagem digital, em 12-20 kV (ROBARDS, 1978).

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram obtidas amostras da região do nó cotiledonar de embriões com 40, 50 e 90 DAA, secções de aproximadamente 0,4 mm de espessura. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky por 24 horas a vácuo (KARNOVSKY, 1965), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2), desidratadas em série acetônica e infiltradas em resina Araldite. Secções ultrafinas (50 nm) foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As secções foram examinadas utilizando microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100 (Philips/FEI Corporation, Eindhoven, Holanda) a 80 kV (ROBARDS, 1978; ROLAND, 1978).

3 RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento do fruto

O desenvolvimento do fruto de *C. brasiliense* ocorreu em cerca de 90 dias e foi caracterizado por três fases, considerando a variação de características biométricas de suas estruturas: i) histodiferenciação; ii) maturação do endocarpo e iii) maturação do mesocarpo e da semente (Fig. 2 a-d).

A fase de histodiferenciação ocorreu até os 40 DAA e foi caracterizada pelos maiores conteúdos de água e pela maior parte das alterações nas dimensões das estruturas, aspectos que são associados à histogênese (Fig. 1a-d; 2 a-d). Após a fecundação, ocorreu, em cerca de três dias, a abscisão da maior parte das estruturas florais, sendo possível, aos 10 DAA, a identificação do fruto, cujo exocarpo apresentava coloração marrom (Fig. 1b). Aos 30 DAA, a coloração do exocarpo havia se alterado para verde e foi possível identificar visualmente, tomando como referência os estudos anatômicos sobre o desenvolvimento do pericarpo, realizados por Barradas (1973), as principais estruturas do fruto (Fig. 1c). Nesta ocasião, o endocarpo ainda não se apresentava lenhoso e não tinha acúleos desenvolvidos e o embrião, de pequenas dimensões, estava restrito à região micropilar. Aos 40 DAA, os acúleos já estavam presentes, porém não lignificados, e o embrião ocupava, aproximadamente, a metade da cavidade seminal (Fig. 1d).

A fase de maturação do endocarpo ocorreu entre 41 a 60 DAA e foi caracterizada pelos valores máximos de massa seca alcançados pela estrutura, o que esteve associado à expressiva redução no conteúdo de água (Fig. 2a-d). Ao final desta fase, as dimensões do fruto e da semente alcançaram valores próximos dos máximos, o endocarpo apresentava-se lenhoso e rígido, com numerosos acúleos lignificados e embrião ocupava toda a cavidade seminal (Fig. 2a-b; 1e).

A maturidade da semente e do mesocarpo (máximos de massa seca) foram alcançadas cerca de 90 DAA, momento da dispersão do fruto (Fig. 1g-h; 2c-d). Ao final da fase, o mesocarpo interno, macio, aromático e com uma coloração amarelada encontrava-se aderido ao endocarpo, constituindo o pirênio (Fig. 1h). A semente que apresentou teor de água próximo a 40%, no momento da dispersão, era reniforme, com tegumento de coloração marrom, radícula inconspícua e plúmula evidente (Fig. 1i; 2d).

3.2 Capacidade germinativa dos embriões e tolerância à dessecação

Os embriões de *C. brasiliense*, hidratados e cultivados *in vitro*, apresentaram capacidade germinativa precoce, aos 40 DAA, ao final da fase de histodiferenciação (Fig. 3a). Aos 50 DAA, a germinabilidade dos embriões decresceu, voltando a apresentar valores acima de 70%, a partir dos 80 DAA. Os embriões, submetidos à dessecação, aos 40 DAA, não apresentaram capacidade germinativa, sendo a tolerância à dessecação adquirida, a partir dos 50 DAA e presente na maior parte dos embriões, a partir dos 60 DAA.

No cultivo *ex vitro* dos embriões não ocorreu diferença significativa decorrente das condições de hidratação (Fig. 3b). Aos 40 DAA, os embriões não apresentaram capacidade germinativa, evidenciando que, nesse estágio de desenvolvimento, os embriões, além de não suportarem a dessecação (como evidenciado pelo cultivo *in vitro*), não possuíam reservas suficientes para germinar. Nos demais tempos, parte dos embriões foram tolerantes à dessecação e germinaram.

3.3 Anatomia da semente

Aos 35 DAA, os embriões apresentaram plúmula em início de desenvolvimento com o domo meristemático apical, primeiros primórdios foliares e cotilédones (Fig. 4a-b). Eram evidentes a protoderme, com disposição periférica, procâmbio, organizado em cordões com disposição concêntrica, meristema fundamental predominante e com células maiores e meristema apical caulinar, com células pequenas e justapostas (Fig. 4b). Na região mediana do hipocótilo, as células do meristema fundamental eram maiores e mais vacuoladas (Fig. 4c) e os cordões procambiais formavam um cone que se afunilava em direção ao polo radicular, em que está presente uma zona meristemática adjacente à protoderme (Fig. 4d). Aos 40 DAA, a plúmula apresentou cotilédones alongados e numerosos primórdios foliares (Fig. 4e-f). Na região mediana do hipocótilo com elementos traqueais e crivados, em início de diferenciação, foram identificados nos cordões procambiais (Fig. 4g). No polo radicular, o promeristema estava diferenciado e a zona meristemática periférica ativa e expandida (Fig. 4h). Aos 50 DAA, os cotilédones apresentavam-se mais alongados e eram evidentes novos primórdios foliares imbricados sobre o meristema apical (Fig. 4i). Feixes vasculares diferenciados foram identificados nos cotilédones e primórdios foliares, além de acúmulo de reservas nas células do meristema fundamental (Fig. 4j). A região mediana do hipocótilo apresentava-se bastante expandida, principalmente, pela proliferação e expansão das células do meristema fundamental, as quais apresentavam acúmulo de compostos de reserva (Fig. 4k). Diferenciação de feixes vasculares, também, eram evidentes no polo radicular (Fig. 4l). Aos 60 DAA, os cotilédones haviam cessado seu alongamento; não havia indícios de emissão de novos primórdios foliares e aqueles emitidos anteriormente apresentavam significativo alongamento (Fig. 4m-n). Ao longo de todo o hipocótilo, havia feixes vasculares diferenciados (Fig. 4o) e, no polo radicular, as células dispostas externamente, produzidas pela zona meristemática periférica, haviam acumulado compostos fenólicos e se encontravam justapostas ao tegumento, o qual também apresentava acúmulo

de fenólicos (Fig. 4p). Aos 80 DAA, observou-se a continuidade do aumento das dimensões dos primórdios foliares associado à deposição de reservas nas células do meristema fundamental (Fig. 4 q-r). Todo o hipocótilo encontrava-se aderido ao tegumento, o qual apresentava algumas camadas de células pequenas e justapostas e camadas de células expandidas com distribuição periférica; todas as células do tegumento apresentavam significativo acúmulo de compostos fenólicos (Fig. 4s). No polo radicular, tanto o meristema apical quanto a zona meristemática periférica apresentavam grande atividade (Fig. 4t). Na ocasião da dispersão, a expansão celular na plúmula havia proporcionado aumento no diâmetro e conformação cilíndrica à estrutura (Fig. 4u-v). As células do hipocótilo apresentavam significativa expansão (comparar Fig. 4k e Fig. 4w). No polo radicular, as células produzidas pela atividade do meristema apical haviam se diferenciado em células do meristema fundamental, as quais haviam acumulado reservas e células procambiais organizadas em cordões, com disposição cônica (Fig. 4x). Na extremidade do polo radicular, estavam justapostas a camada de células embrionárias periféricas e o tegumento, ambos com significativo acúmulo de compostos fenólicos (Fig. 4x).

3.4 Deposição de reservas

Aos 40 DAA, na região do nó cotiledonar e da plúmula, a reserva proteica e de amido estava ausente nas células do meristema fundamental (Fig. 5a-c) e havia discreto acúmulo de polissacarídeos de paredes (Fig. 5b) e lipídios (Fig. 5d). Aos 50 DAA, observou-se o início de acúmulo de proteína e amido (Fig. 5e-g) e aumento da reserva lipídica (Fig. 5h). Entre os 60 e os 90 DAA, observou-se um aumento gradual na quantidade e volume dos corpos proteicos, grãos de amido e corpos lipídicos (Fig. 5i-t).

Após 40 DAA, as células da região do nó cotiledonar apresentaram parede celular delgada, núcleo volumoso, citoplasma denso, rico em organelas, especialmente mitocôndrias e retículos endoplasmáticos; foram observados pequena quantidade de corpos lipídicos e raros plastídios com acúmulo de amido (Fig. 6 a-b). Aos 50 DAA, as células apresentaram significativa expansão, espessamento da parede celular e proliferação de corpos lipídicos no citoplasma; ampliou-se a formação de plastídios com deposição de amido e ocorreu proliferação dos corpos proteicos, com pequenas dimensões, envolvidos por membranas (Fig. 6 c-d). No final do desenvolvimento, 90 DAA, as células apresentaram-se completamente carregadas com numerosos corpos lipídicos, corpos proteicos com dimensões variadas contendo inclusões e plastídios contendo amido (Fig. 6e-f).

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos frutos é, normalmente, complexo e variável entre as espécies, envolvendo fases de alterações morfofisiológicas (GILLASPY; BEN-DAVID; GRUISSEM, 1993; MCATEE *et al.*, 2013; OZGA; REINECKE, 2003). No caso do fruto de *C. brasiliense*, esse processo apresentou peculiaridades quanto ao padrão de desenvolvimento de suas estruturas a características do embrião.

4.1 Desenvolvimento do fruto e peculiaridades do embrião

O desenvolvimento do fruto de *C. brasiliense* ocorreu em cerca de 90 dias e pôde ser dividido em três fases, baseado em características biométricas: i) histodiferenciação; ii) maturação do endocarpo e iii) maturação do mesocarpo e da semente. A fase de histodiferenciação constitui, tipicamente, a primeira etapa do desenvolvimento dos frutos que, em geral, é caracterizada pela intensa atividade de divisão e diferenciação celular, acarretando a formação dos tecidos (DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014). A histodiferenciação em *C. brasiliense* demandou quase metade do tempo total de desenvolvimento do fruto, o que destoia do padrão mais comum (GILLASPY; BEN-DAVID; GRUISSEM, 1993). A maturação do endocarpo foi precoce e anterior à fase de maior deposição das reservas no mesocarpo e no embrião. Esse evento, juntamente com o fato de que o embrião só ocupou toda a cavidade seminal, após a completa formação e lignificação dos acúleos, indica papel importante da estrutura na proteção do embrião contra predadores, conforme relatado para esta espécie (SOUSA *et al.*, 2017) e outras, típicas do bioma Cerrado (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS *et al.*, 2015; MONTOYA *et al.*, 2016).

O mesocarpo de *C. brasiliense* apresentou aumento progressivo da massa seca até o momento da dispersão, o que aconteceu sem redução acentuada do teor de água. A não estabilização da matéria seca é um padrão encontrado em frutos climatéricos, os quais apresentam uma fase de amadurecimento após a dispersão, aspecto ainda não completamente elucidado para a espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2015).

A semente de *C. brasiliense* demonstrou diversas peculiaridades em seu desenvolvimento. Foram identificadas apenas as fases de histodiferenciação e maturação, sem ocorrência de uma fase específica de dessecação após a maturação fisiológica (ponto em que é atingido o máximo de massa seca). Ao contrário, ocorreu acúmulo progressivo de reservas no embrião, até o final do desenvolvimento, e a semente foi dispersa com teor de água próximo a 40%. Em geral, o padrão de desenvolvimento de sementes compreende três etapas: histodiferenciação, maturação e dessecação (BEWLEY *et al.*, 2013; HARTMANN *et al.*, 2010; KERMODE, FINCH-SAVAGE, 2002). A fase de dessecação, que resulta na diminuição dos teores de água abaixo de 20%, é de ocorrência típica em sementes com comportamento ortodoxo ou intermediário, as quais são tolerantes à dessecação (BEWLEY *et al.*, 2013). Apesar da semente de *C. brasiliense* não passar por uma fase de dessecação drástica, ela apresenta características que sugerem comportamento ortodoxo ou intermediário, como tolerância à desidratação (a qual, inclusive, é alcançada precocemente), embriões ricos em reservas proteicas e lipídicas e dormência (SOUSA *et al.*, 2017). Além disso, espécies com ocorrência, em ambientes de clima seco ou sazonal, frequentemente, apresentam sementes com comportamento ortodoxo, o que favorece a dispersão e a formação de bancos de sementes (RAJJOU *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2012).

O embrião de *C. brasiliense* representa quase a totalidade da semente, o que é considerado uma característica derivada (FORBIS, FLOYD, QUEIROZ, 2002). O hipocótilo é a região mais desenvolvida do embrião e a maior parte das reservas são depositadas nessa estrutura. Os cotilédones são rudimentares e a radícula indiferenciada, conforme identificado nos trabalhos de Barradas (1973) e Sousa *et al.* (2017). O embrião apresenta vários primórdios foliares, o que indica alto nível de

diferenciação. A vascularização ocorreu precocemente, aspecto peculiar, pois sistema vascular diferenciado raramente é encontrado em embriões (WERKER, 1997). É possível sugerir que o estabelecimento da vascularização, antes da maturação do embrião, possa facilitar a translocação de reservas, o que poderá ser demonstrado em trabalhos futuros. O tegumento externo da semente é rico em compostos fenólicos compostos que são conhecidos pelo papel tanto na proteção do embrião quanto na restrição da germinação, contribuindo, assim, para a interação da semente com o ambiente (BEWLEY *et al.*, 2013). No entanto o papel do tegumento, no controle da germinação na semente de *C. brasiliense*, ainda, não está definido, o que também constituiu um interessante tema para investigação.

4.2 Desenvolvimento do embrião, capacidade germinativa, estabelecimento da dormência e tolerância à dessecação

A capacidade germinativa de embriões de *C. brasiliense* foi adquirida precocemente. Houve germinação de embriões excisados de sementes imaturas, ainda na primeira fase de desenvolvimento dos frutos. A germinação de embriões, com 40 DAA, só foi possível em condições *in vitro*, uma vez que os embriões necessitaram de reservas para a germinação e nessa fase só havia ocorrido a deposição parcial de lipídeos. Normalmente, após a fase de histodiferenciação, o embrião já possui a capacidade de germinar (BEWLEY *et al.*, 2013; HILHORST, 1995; REN; BEWLEY, 1999; KERMODE, 1990), uma vez que, no início do desenvolvimento, o conteúdo de ABA é baixo (TAYLOR *et al.*, 2005). No entanto, comumente, o ambiente da semente mantém o embrião em modo de desenvolvimento e previne a germinação (KERMODE, 1990; KERMODE, BEWLEY, 1998). O ABA, por sua vez, tem um papel primordial, durante a fase de maturação, mantendo o embrião em modo de desenvolvimento até a sua completa formação (KERMODE, 2005).

Aos 50 DAA, houve uma diminuição da germinabilidade dos embriões hidratados e cultivados *in vitro*. Durante o desenvolvimento, a capacidade de germinação é, em sementes de diversas espécies, suprimida pela instalação da dormência primária, que coincide com a elevação dos níveis de ABA durante a fase de maturação (BEWLEY *et al.*, 2013). O ABA sintetizado no embrião é responsável pela dormência (FREY *et al.*, 2004); contudo os tecidos circundantes da sementes têm importante atuação no incentivo ou manutenção da biossíntese de ABA pelo embrião em desenvolvimento (KERMODE, 2005). É importante ressaltar que, além da concentração, deve-se levar em consideração a sensibilidade ao ABA, pois sementes com alto teor de ABA apresentam variações, no nível de dormência e, inclusive, podem não ser dormentes (HILHORST, 1995). Aparentemente, a retirada dos tecidos circundantes dos embriões de *C. brasiliense* contribuiu para a superação parcial da dormência, o que corrobora os resultados obtidos por Sousa *et al.* (2017).

A deposição de reservas e a aquisição da tolerância à dessecação pelos embriões também ocorreu a partir dos 50 DAA. Esses eventos, da mesma forma, podem ser relacionados ao ABA, pois, além da indução à dormência primária, esse hormônio desencadeia a síntese de proteínas de reserva e promove a tolerância à dessecação (BEWLEY *et al.*, 2013). Tanto a tolerância à dessecação quanto a dormência são fatores importantes na adaptação da espécie às condições do bioma Cerrado, por

favorecerem a sobrevivência dos embriões em bancos de sementes em um ambiente tipicamente associado ao clima sazonal e com período de precipitação irregular.

5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do fruto de *C. brasiliense* ocorre em cerca de 90 dias e pode ser caracterizado por três fases: i) histodiferenciação, ii) maturação do endocarpo e iii) maturação do mesocarpo e da semente. A maturação precoce do endocarpo contribui para a proteção do embrião em desenvolvimento. O mesocarpo e a semente apresentam conteúdo de matéria seca crescente ao longo do desenvolvimento do fruto. As sementes não apresentam fase de dessecação e são dispersas com teores de água próximo a 40%. Os embriões apresentam capacidade germinativa, ao final da fase de histodiferenciação e desenvolvem estruturas especializadas como hipocótilo hiperdesenvolvido, vários primórdios foliares e feixes vasculares. A aquisição da tolerância à dessecação coincide com a deposição de abundantes reservas, o que, possivelmente, está relacionado ao papel do ABA no desenvolvimento seminal. A retirada dos tecidos adjacentes ao embrião contribui para a superação parcial da dormência. O desenvolvimento do fruto de *C. brasiliense* é peculiar e as características morfofisiológicas do pericarpo e da semente contribuem para adaptação da espécie ao clima sazonal do bioma Cerrado.

6 REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. F. B.; MORIEL, P.; FOGGIO, M. A.; MAZZOLA, P.G. *Caryocar brasiliense* supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n. 1, p. 73, 2014.
- ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable of central Brazilian Cerrados. *Economic Botany*, Bronx, v. 49, p. 40-48, 1995.
- ASCARI, J.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M. A. D. The Phytochemistry and Biological Aspects of Caryocaraceae Family. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Campinas, v.15, n.2, p.293-308, 2013.
- BARRADAS, M. M. Morfologia do fruto e da semente de *Caryocar brasiliense* (pequi) em várias fases de desenvolvimento. **Revista de Biologia**, [S.l.], v. 9, p. 69-84, 1973.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, 2 edition, Academic Press, 2014, 1600 p.
- BERNARDES, T. G.; NAVES, V. N.; REZENDE, C. F. A.; BORGES, J. D.; CHAVES, J. Propagação sexuada do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) estimulada pelo ácido giberélico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.38, n. 2, p.71-77, 2008.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. 3 ed. New York: Springer, 392 p., 2013.

BRASIL. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

DANTE, R. A.; LARKINS, B. A.; SABELLI, P. A. Cell cycle control and seed development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p.493, 2014. Disponível em: <10.3389/fpls.2014.00493>. Acesso em: 18 abr. 2017.

DOMBROSKI, J. L. D.; PAIVA, R.; ALVES, J. M. C.; SANTOS, B. R.; NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P. D. O.; BARBOSA, S. Métodos para superação da dormência fisiológica de *Caryocar brasiliense* Camb. **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 2, p. 131-135, abr./jun. 2010.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v.5, n.1, p.123-142, 1968.

FLORA DO BRASIL. Lista de espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/>> Acesso em: 15 jun. 2016.

FORBIS, T. A.; FLOYD, S. K.; QUEIROZ, A. The Evolution of Embryo Size in Angiosperms and Other Seed Plants: implications for the evolution of seed dormancy. **Evolution**, v, 56, n. 11, p. 2112-2125, 2002.

FREY, A.; GODIN, B.; BONNET, M.; SOTTA, B.; MARION-POLL, A. Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. **Planta**, v. 218, p.958-964.2004. Disponível em <10.1007/s00425-003-1180-7>. Acesso em: 15 jun. 2016.

GUILLASPY, G.; BEN-DIVID, H.; GRUISSEM W. Fruits: a developmental perspective. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1439, 1993.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. Plant propagation: Principles and practices. 8. ed. Printice hall: Upper Sadd River, 2010. 928p.

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. 1. Primary dormancy. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 61-73, 1995.

JENSEN W. A. Botanical histochemistry: principles and practice, San Francisco: W. H. Freeman & Company, 1962.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KERMODE, A.; BEWLEY, J.D. The Role of Maturation Drying in the Transition from Seed Development to Germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 39, n. 201, p. 487-497, 1988.

KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 9, n. 2, p. 155-195, 1990.

KERMODE, A.; FINCH-SAVAGE, B. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. Desiccation and Survival in Plants, Drying without Drying. Wallingford: CAB International, 2002. p. 149-184.

KERMODE, A.R. Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 24, p.19-344, 2005. Disponível em < 10.1007/s00344-005-0110-2>.

MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 450-457, 2013.

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS H. C.; RIBEIRO L. M.; MERCADANTE-SIMÕES M. O.; SANT'ANNA-SANTOS B. F. Ontogenesis of the pseudomonomerous fruits of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new

- approach to the development of pyrenarium fruits. **Trees**, v. 29, p. 199-214. 2015. Disponível em:< 10.1007/s00468-014-1104-0>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- MCATEE. P.; KARIM. S.; SCHAFFER. R.; DAVID. K. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. **Frontiers in Plant Science**. v, 4, p. 79. 2013. Disponível em <10.3389/fpls.2013.00079>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- MENDES, D. S. Dormência, germinação e longevidade em sementes de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) 2015. 50p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2015.
- MONTOYA, S. G.; MOTOIKE, S. Y.; KUKI, K. N.; COUTO A. D. Fruit development, growth, and stored reserves in macauba palm (*Acrocomia aculeata*), an alternative bioenergy crop. **Planta**, v. 244, p. 927-938. 2016. Disponível em:< 10.1007/s00425-016-2558-7>. Acesso em: 18 abr. 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, M. N. S.; LOPES, P. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; PEREIRA, E. G.; RIBEIRO, L. M. Post-harvest Quality of Pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB.) Collected from the Plant or After Naturally Falling off and Subjected to Slow and Quick Freezing. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, p. e-768, 2017. Disponível em:< 10.1590/0100-29452017>. Acesso em: 15 abr.2017.
- OLIVEIRA, M. N. S.; MERCADANTE-SIMÃO, M. O. ; GUSMÃO, E.; LOPES, P. S.N.; RIBEIRO, L. M.; DIAS, B. A. S. Estádio de Maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 380-386, 2006.
- OZGA, J. A.; REINECKE, D. M. Hormonal Interactions in Fruit Development. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 22, p.73–81, 2003. Disponível < DOI: 10.1007/s00344-003-0024-9>. Acesso em: 15 abr. 2017.
- PAIVA, E.A.S.; PINHO, S.Z.; OLIVEIRA, D.M.T.. Large plant samples: how-to process for GMA embedding. In: CHIARINI-GARCIA, H.; MELO, R.C.N. (Eds.), *Light Microscopy: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, p. 37-49, 2011.
- PEARSE, A. G. E. Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology. 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1980. 439 p.
- RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 507-533, 2012. Disponível em <10.1146/annurev-arplant-042811-105550>. Acesso em 21 fev. 2017
- REN, C.; BEWLEY, J. D. Developmental and germinative events can occur concurrently in precociously germinating Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*) seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 1751-1761, 1999.
- RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. C.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, v. 58, p. 133-139, 2011.
- RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, T. G. S.; CARVALHO, V. S.; SILVA, P. de O.; NEVES, S. da C.; GARCIA, Q. S. The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. **Seed Science and Technology**, v.40, p. 345-353, 2012.
- ROBARDS, A. W., An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. (Ed.). **Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells**. New York: Elsevier, 1978. p. 343-403.

RODRIGUES, L.J.; PAULA, N.R.F.; PINTO, D.M.; VILAS BOAS, E.V.B. Growth and maturation of pequi fruit of the Brazilian cerrado. *Food Science and Technology*, Campinas, v.35, n.1, p.11-17, 2015.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, v.110, n.3, p.711-717, 2008.

ROLAND, A.M. General preparations and staining of thin sections. In: HALL, J.L. (Ed.). **Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells**. New York: Elsevier, 1978.

SOUSA, M. S.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; ANDRADE, M. S.; MERCADANTE SIMÕES, M. O. Structural aspects of germination control in pyrenes of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Trees*, v. 31, n.1, p. 1-16, 2017. Disponível em: <10.1007/s00468-016-1514-2>. Acesso em: 17 fev. 2017.

TAYLOR, I, B.; SONNEVELD, K.; BUGG, T. D. H.; THOMPSON, A. J. Regulation and Manipulation of the Biosynthesis of Abscisic Acid, Including the Supply of Xanthophyll Precursors. *Journal Plant Growth Regulation*,v. 24, p.253-273, 2005. Disponível em: < 10.1007/s00344-005-0070-6>. Acesso em: 15 abr. 2017.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Ann. Histochem.* v. 15, p. 289-296, 1970.

WERKER, E. Seed anatomy. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1997. 428p.

7 APÊNDICES

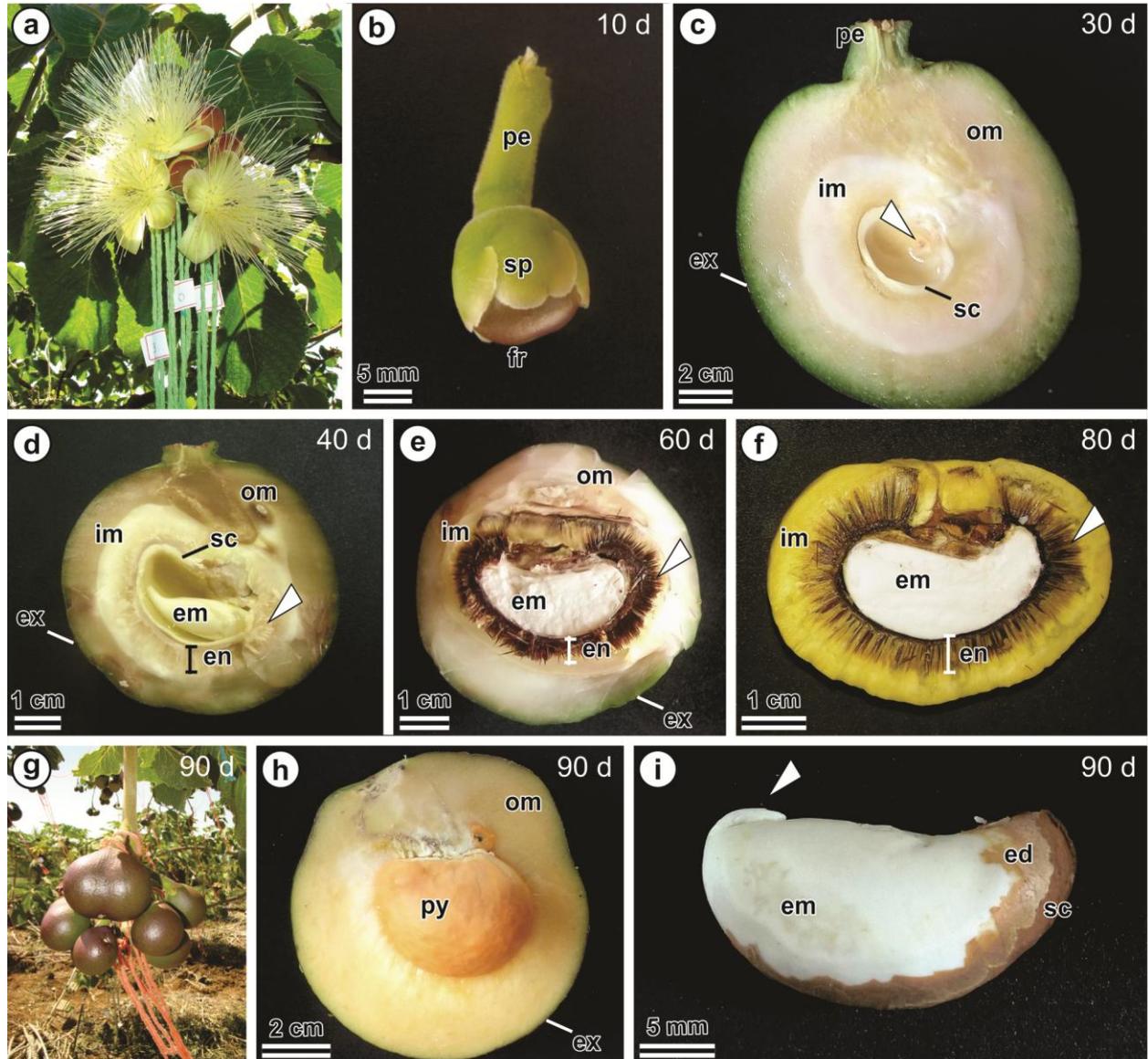


Fig. 1 Morfologia da flor, após a antese e fruto de *Caryocar brasiliense*. Secções longitudinais (c-f,h-i). (a) Flores em antese (b) Fruto, 10 DAA. (c) Fruto, 30 DAA, destacando o embrião (ponta de seta). (d) Fruto, 40 DAA, mostrando acúleos não lignificados (ponta de seta). (e) Fruto, 60 DAA, mostrando acúleos já lignificados (ponta de seta). (f) Fruto, 80 DAA, destacando acúleos totalmente desenvolvidos (ponta de seta). (g) Frutos, 90 DAA. (h) Fruto, 90 DAA. (i) Embrião, 90 DAA, destacando a plúmula (ponta de seta). ed: tegumento interno, em: embrião, en: endocarpo, ex: exocarpo, fr: fruto, im: mesocarpo interno, om: mesocarpo externo, pe: pedúnculo, py: pirênio, sc: tegumento externo, sp: sépala

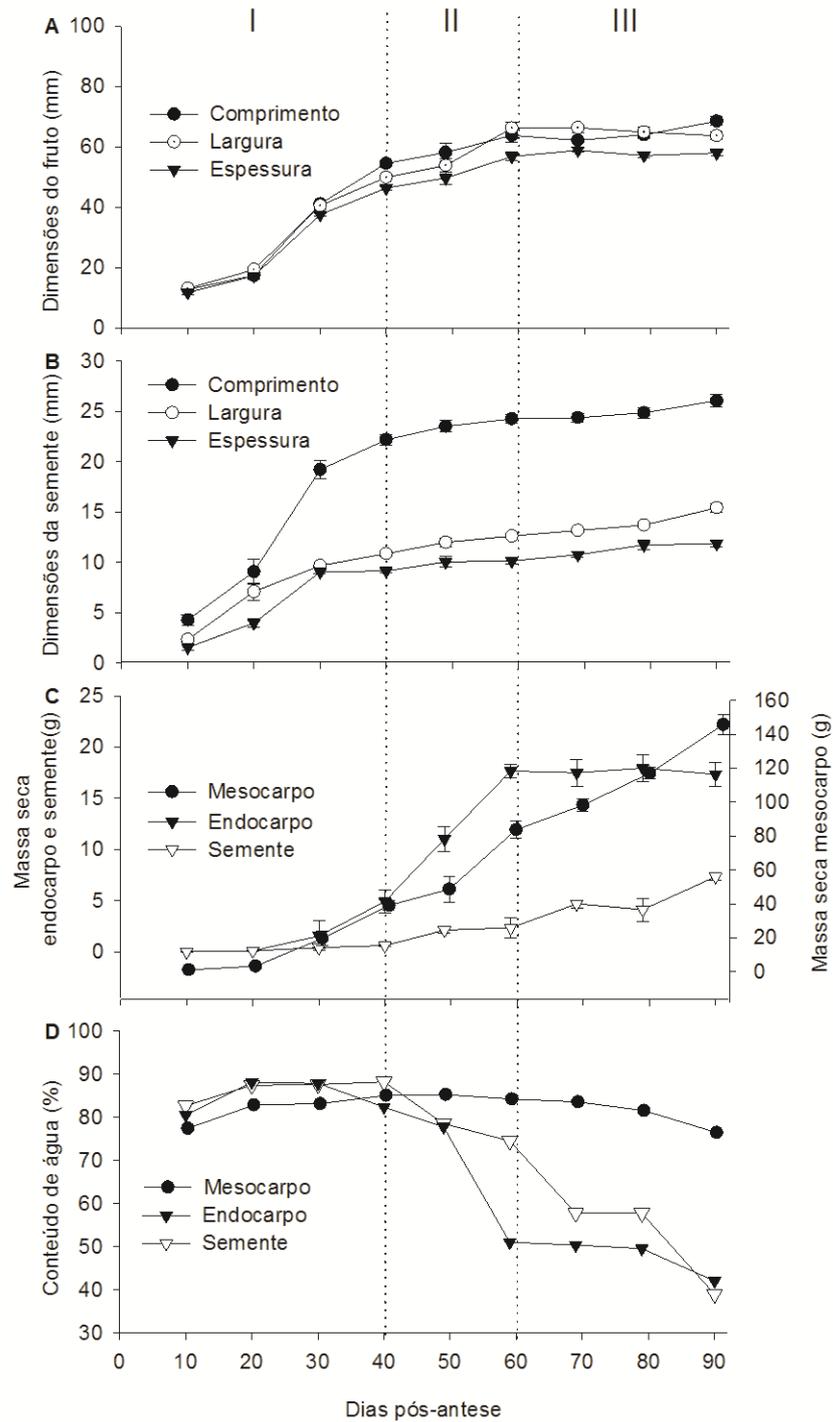


Fig. 2 Características biométricas definidoras do desenvolvimento do fruto de *C. brasiliense*. Dimensões do fruto (a) dimensões da semente (b) massa seca das estruturas do fruto e da semente (c) e conteúdo de água (d). As linhas pontilhadas delimitam as fases de desenvolvimento: I - histodiferenciação; II - maturação do endocarpo; III - maturação do mesocarpo e da semente. As barras verticais indicam o erro padrão da média.

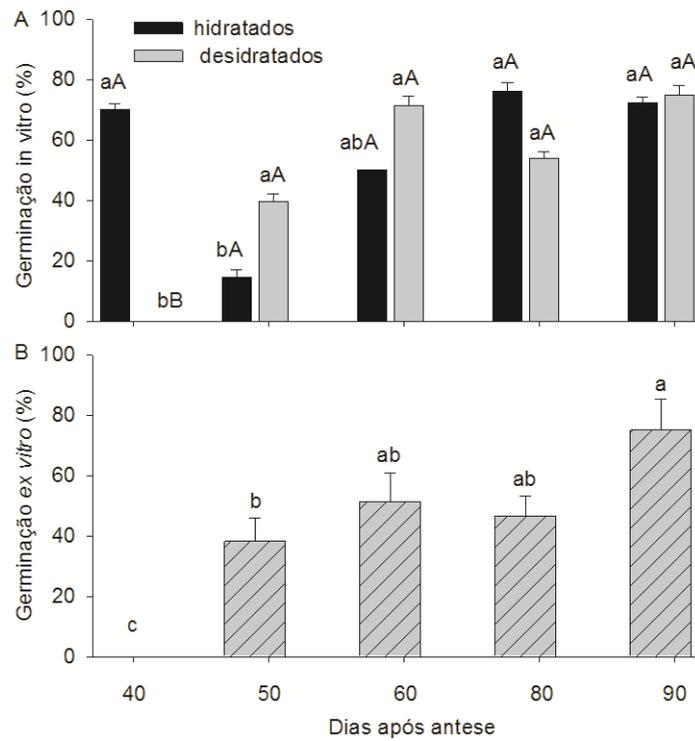


Fig. 3 Germinabilidade de embriões de *C.brasiliense* em diferentes estádios de desenvolvimento. Embriões cultivados *in vitro* (a) embriões cultivados *ex vitro* (b). Letras minúsculas comparam médias entre os tempos de desenvolvimento do embrião. Letras maiúsculas comparam médias entre embriões hidratados e embriões desidratados. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras verticais indicam o erro padrão da média.

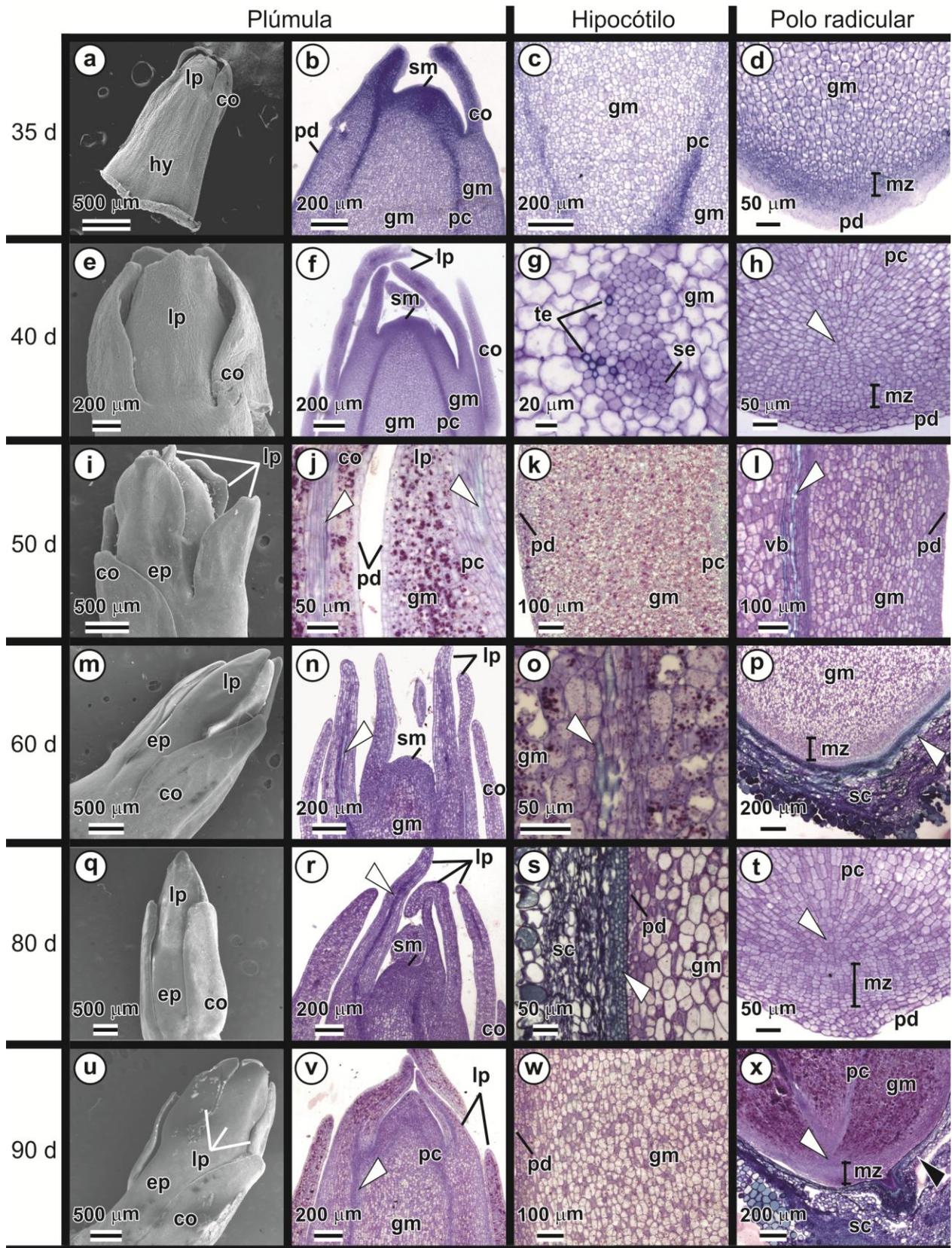


Fig. 4 Morfoanatomia de embriões de *Caryocar brasiliense* em diferentes fases de desenvolvimento. (b-d,f,h,j,l,n,p,r,t,v,x) seções longitudinais.(g,k,o,s,w) seções transversais. (a-d) 35 DAA (a-d): (a) Plúmula, (b) Epicótilo destacando os cotilédones e meristema apical em atividade, (c) Hipocótilo, (d) Polo radicular

mostrando a zona meristemática. (e-h) 40 DAA: (e-f) Plúmula, destacando cotilédones e primórdios foliares, (g) Hipocótilo evidenciando elementos traqueais diferenciados, (h) Polo radicular destacando o promeristema radicular (ponta de seta). (i-l) 50 DAA: (i) Plúmula destacando o aumento no número de primórdios foliares, (j) Plúmula evidenciando feixes vasculares diferenciados (ponta de seta), (k) Hipocótilo, evidenciando células do meristema fundamental volumosas e com acúmulo de reservas, (l) Polo radicular evidenciando feixes vasculares diferenciados (ponta de seta). (m-p) 60 DAA: (m) Plúmula destacando epicótilo, cotilédones e primórdios foliares alongados, (n-o) Plúmula e hipocótilo detalhando elementos traqueais diferenciados (ponta de seta), (p) Polo radicular evidenciando revestimento interno aderido ao embrião (ponta de seta) e zona meristemática. (q-t) 80 DAA: (q) Plúmula evidenciando epicótilo, cotilédones e primórdios foliares alongados. (r) Plúmula evidenciando elementos traqueais diferenciados (ponta de seta). (s) Hipocótilo evidenciando o tegumento interno da semente aderido ao embrião (ponta de seta). (t) Polo radicular evidenciando o promeristema da raiz bem diferenciado (ponta de seta). (u-x) 90 DAA: (u-v) Plúmula evidenciando epicótilo com diâmetro expandido. (v) Plúmula evidenciando elementos traqueais diferenciados (ponta de seta). (w) Hipocótilo evidenciando a protoderme pavimentosa. (x) Radícula evidenciando o revestimento interno aderido ao embrião (ponta de seta preta) e o promeristema da raiz diferenciado (ponta de seta branca). co: cotilédone, ec: epicótilo, gm: meristema fundamental, hy: hipocótilo, lp: primórdios foliares, pc: procâmbio, pd: protoderme, sc: revestimento, se: elementos crivados, sm: promeristema caulinar, te: elementos traqueais, vb: feixe vascular, mz: zona meristemática.

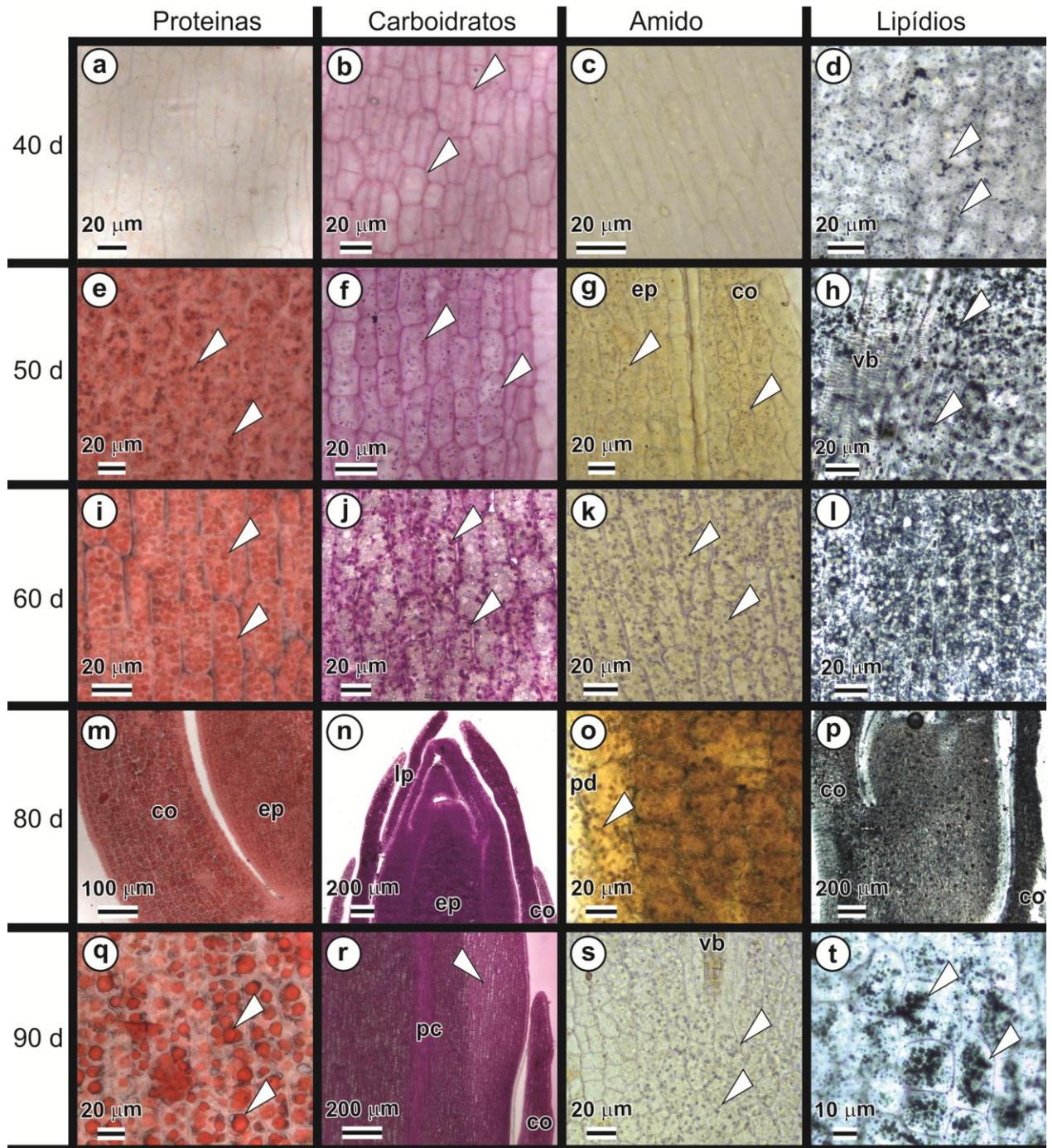


Fig. 5 Testes histoquímicos em plúmula de embriões de *Caryocar brasiliense* em diferentes fases de desenvolvimento. (a,e,i,m,q) Xylidine-ponceau (XP), coloração vermelha indicativa de proteína. (b,f,j,n,r) Ácido periódico e reagente de Schiff (PAS), coloração rosa indicativa de polissacarídeos neutros. (c,g,k,o,s) reagente de Lugol, coloração negra indicativa de amido. (d,h,l,p,t) Sudan Black, coloração preta indicativa de lipídios. Pontas de seta indicam o composto acumulado. (a-d) 40 DAA: (a) Ausência de acúmulo de proteína e amido. (d) Início de deposição de lipídios. (e-h) 50 DAA: (e-g) Início de acúmulo de proteína e amido. (h) Aumento do acúmulo de lipídios. (i-l) 60 DAA. (m-p) 80 DAA. (q-t) 90 DAA. (i-t) Entre 60 e 90 DAA observa-se um aumento gradual na quantidade e volume dos corpos proteicos, grãos de amido e gotas lipídicas. co: cotilédone, ep: epicótilo, pc: procâmbio, pd: protoderme, vb: feixe vascular.

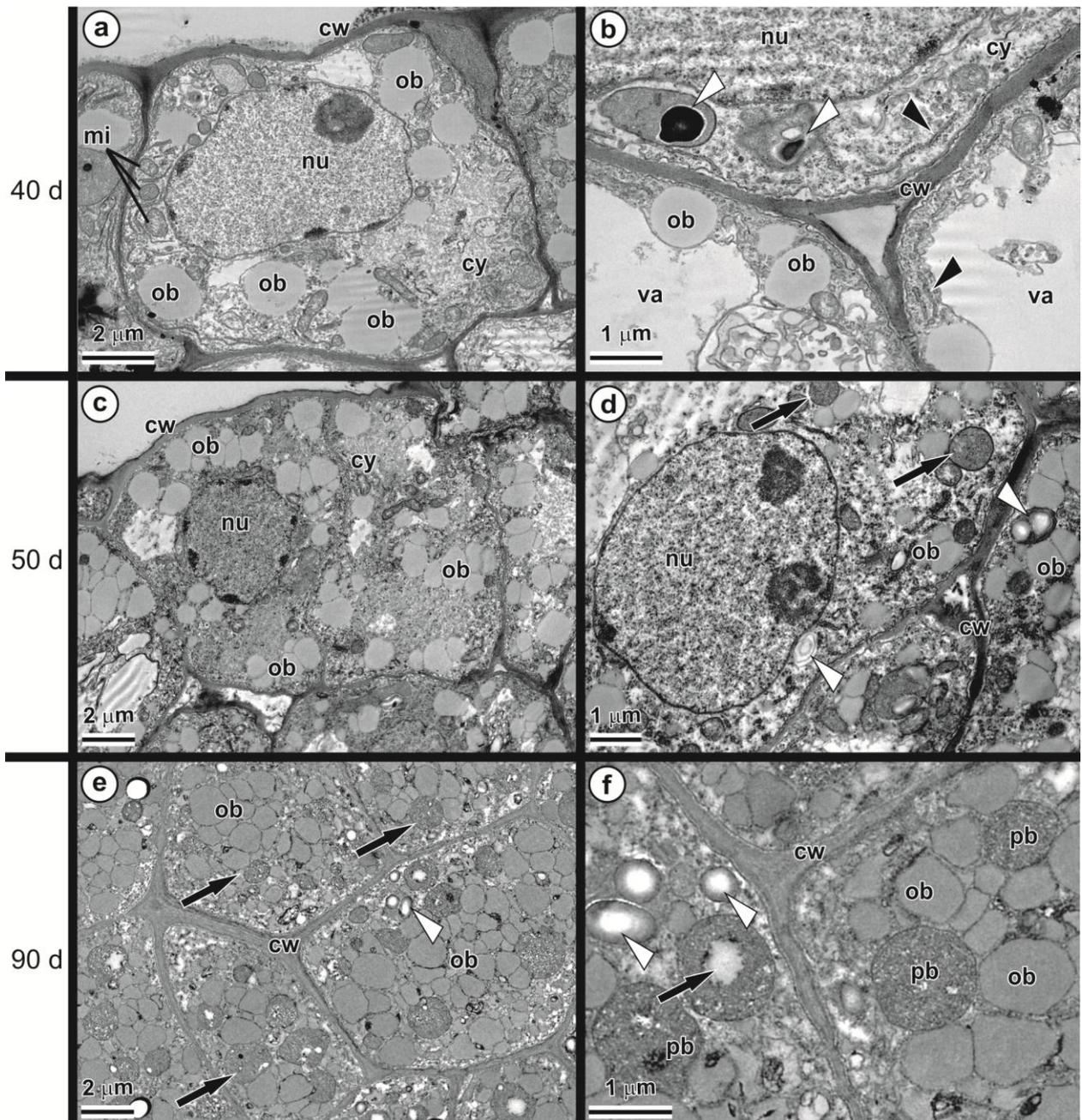


Fig. 6 Imagens obtidas por MET de células do meristema fundamental do epicótilo de embriões de *Caryocar brasiliense* em diferentes fases de desenvolvimento. (a-b) 40 DAA. (c-d) 50 DAA. (e-f) 90 DAA. (a) Célula com presença de corpos lipídicos. (b) Plastídios com grãos de amido (ponta de seta branca) e retículo endoplasmático (ponta de seta preta). (c) Célula com proliferação de corpos lipídicos. (d) Células com numerosos corpos proteicos (seta preta) contendo inclusões (ponta de seta branca). (e) Corpos proteicos com dimensões variadas (seta preta) e plastídios contendo amido (ponta de seta branca). (f) Detalhe da periferia de células adjacentes corpo proteico com inclusão (seta preta) e plastídios contendo amido (pontas de setas brancas).cy:citoplasma; cw: parede celular, ob: corpos lipídicos, pb: corpos proteicos, mi:mitocôndrias; nu: núcleo; va: vacúolo.

4.2 Artigo 2- Superação de dormência e qualidade fisiológica de sementes de pequi

Resumo

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae), pequi, é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro e possui elevada importância ecológica, econômica e social. Suas sementes possuem dormência o que limita sua propagação em larga escala e impede uma exploração mais intensiva da espécie. Algumas técnicas para superação de dormência vêm sendo utilizadas, porém as suas relações com a qualidade fisiológica das sementes ainda não foram completamente elucidadas, o que pode aprimorar o processo de propagação. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito dos tratamentos de superação de dormência, armazenamento e uso do ácido giberélico (GA_3) sobre a qualidade fisiológica de sementes de *C. brasiliense*. Utilizaram-se pirênios armazenados por 30 dias, embebidos em solução de GA_3 375mg/L e recém- dispersos sem nenhum tratamento (controle). Esses pirênios foram semeados em canteiros a pleno sol e irrigados diariamente, sendo, em seguida, desenterrados e avaliados aos 30, 60, 210 e 300 dias pós-plantio, quanto à percentagem de germinação, de sementes não germinadas, de mortalidade de sementes, de emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência (IVE). Outro experimento foi montado, na mesma condição do anterior, mas com pirênios armazenados por 120 dias e tratados com 125mg/L de GA_3 e avaliados aos 60, 90, 120 e 210 dias pós-plantio. As características avaliadas, também, foram as mesmas do primeiro experimento, à exceção da germinação. A estocagem e o uso de GA_3 foram eficientes na promoção da germinação, porém, após 30 dias do plantio, a maior parte das sementes não germinadas apresentava-se deterioradas. As sementes de pirênios recém-dispersos (controle) tiveram, inicialmente, uma germinação e emergência mais baixa, seguida de uma estabilização entre (maio e agosto), retomando a emergência com aumento da temperatura do ambiente, no início da estação chuvosa do ano seguinte a dispersão. Entretanto, diferentemente dos demais tratamentos, boa parte das sementes não germinadas não estavam deterioradas, indicando a capacidade da espécie em formar banco de sementes, mesmo que temporário. Um maior tempo de armazenamento de pirênios (120 dias) e tratados com GA_3 geraram altos índices de deterioração das sementes e baixa emergência; provavelmente em decorrência da elevação da produção de espécies reativas a oxigênio, verificado pelo aumento de MDA em tecido embrionário de sementes armazenadas neste período. Portanto o armazenamento e o tratamento com GA_3 foram eficientes, na promoção da germinação de sementes de pirênios de *C. brasiliense*, porém aumentaram a sua deterioração. Sementes expostas por tempo prolongado ao armazenamento apresentaram baixa emergência e alta deterioração, em decorrência do aumento da peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Armazenamento. *Caryocar brasiliense*. Deterioração. Germinabilidade. GA_3 .

4.2 Article 2- Overcoming of dormancy and physiological quality of seeds of pequiizeiro

Abstract

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae), pequiizeiro, is a native species of the Brazilian Cerrado and has high ecological, economic and social importance. Its seeds have dormancy which limits large-scale propagation and prevents more intensive exploitation of the species. Some techniques for overcoming dormancy have been used, but their relationship with the physiological quality of the seeds has not yet been fully elucidated, which may improve the propagation process. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of treatments for dormancy, storage and use of gibberellic acid (GA₃), on the physiological quality of *C. brasiliense* seeds. They were used stored pyrenes for 30 days, embedded in solution of GA₃ 375mg/L and recently dispersed without any treatment (control). These pyrenes were sown in beds in full sun and irrigated daily, and then unearthed and evaluated at 30, 60, 210 and 300 days post-planting, in relation to the percentage of germination, non-germinated seeds, seed mortality, seedling emergence index and emergency speed index (IVE). Another experiment was set up in the same condition as in the previous one, but with pyrenes stored for 120 days and treated with 125mg/L of GA₃ and evaluated on 60, 90, 120 and 210 days post-planting. The evaluated characteristics were also the same as the first experiment, with the exception of germination. The storage and use of GA₃ were efficient in promoting germination, but after 30 days of planting, most of the non-germinated seeds were deteriorated. Freshly dispersed (control) seeds of germination initially had a lower germination and emergence, followed by a stabilization between May and August, returning to the emergency with increasing ambient temperature, at the beginning of the rainy season of the following year to the dispersion. However, unlike the other treatments, most of the non-germinated seeds were not deteriorated, indicating the ability of the species to form a seed bank even if temporary. A longer time of storage of pyrénios (120 days) and treated with GA₃ generated high rates of seed deterioration and low emergence; Probably due to the increase in the production of reactive oxygen species, verified by the increase of MDA in the embryonic tissue of seeds stored in this period. Therefore, the storage and treatment with GA₃ were efficient in promoting the germination of *C. brasiliense*'s pyrene seeds, but increased the deterioration of the seeds. Seeds exposed for a long time to storage presented low emergence and high deterioration, due to the increase of lipid peroxidation.

Keywords: Storage. *Caryocar brasiliense*. Deterioration. Germinability. GA₃.

1 INTRODUÇÃO

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae), conhecido popularmente como pequizeiro, é uma espécie nativa dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Paraná (FLORA DO BRASIL, 2017). É considerada uma das espécies mais importantes do bioma Cerrado (VIEIRA *et al.*, 2006), pela sua importância ecológica, econômica e social (SANTOS *et al.*, 2013). A espécie tem potencial para uso em recuperação de áreas degradadas (CAMARGO *et al.*, 2014), na indústria farmacêutica e de cosmético, mas a maior utilização é no setor alimentício (ARAÚJO, 1995). Apesar de sua importância, o baixo índice de agentes dispersores (COLLEVATTI, 2009), a expansão agropecuária (GIROLDO; SCARIOT *et al.*, 2015), a quantidade cada vez menor de indivíduos jovens encontrados em condições naturais (LEITE *et al.*, 2012) e o isolamento de populações deixam a espécie em risco de extinção (MELO JUNIOR *et al.*, 2012). Além disso, as sementes apresentam baixa germinabilidade (DOMBROSKI *et al.*, 2010) e, quando passam por um processo de armazenamento mais longo, perdem a viabilidade (MENDES, 2015). Esses fatores dificultam a produção de muda, sendo um obstáculo para conservação e uso mais intensivo da espécie.

As sementes de *C. brasiliense* apresentam dormência fisiológica (DOMBROSKI *et al.*, 2010; MENDES, 2015), que é determinada pelo baixo potencial de crescimento do embrião associado à resistência mecânica ocasionada pelo endocarpo (SOUSA *et al.*, 2017). Já existem alguns avanços, no processo de propagação do *C. brasiliense*, dentre eles a utilização do armazenamento e o uso hormônios como o ácido giberélico (GA_3) (DOMBROSKI *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2017; MENDES, 2015) para promover a germinação da espécie.

Os hormônios são compostos químicos que atuam no crescimento e desenvolvimento das plantas e têm um papel chave na manutenção ou superação da dormência, em particular, o ácido abscísico (ABA) e as giberelinas (GAs), respectivamente (BEWLEY *et al.*, 2013). O ABA é um regulador positivo para indução e manutenção da dormência, impedindo a germinação. Já as GAs são responsáveis pelo alongamento de células embrionárias e enfraquecimento de tecidos adjacentes ao embrião, promovendo a germinação e superando a dormência (KUCERA *et al.*, 2005). Em sementes de *C. brasiliense*, o ácido giberélico (GA_3) permite uma maior embebição, aumento das dimensões das sementes (SOUSA *et al.*, 2017) e da germinação (MENDES, 2015; SOUSA *et al.*, 2017).

Outro processo utilizado para superar a dormência em sementes é a pós-maturação. As sementes de muitas espécies apresentam uma diminuição no teor de ABA, ao serem submetidas ao armazenamento; há também uma alteração da sensibilidade das sementes ao ABA (BEWLEY *et al.*, 2013). Entretanto, depois da pós-maturação, há um acúmulo de espécies reativas a oxigênio (ROS) que pode levar à deterioração da semente (NONOGAKI *et al.*, 2010; ORACZ *et al.*, 2007). Portanto existe uma “janela oxidativa” relacionada aos níveis de ROS nas células, que primeiro atuam como moléculas sinalizadoras e depois ocasionam danos celulares oxidativos, levando à deterioração e à perda da viabilidade das sementes (BAILLY *et al.*, 2004; BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). Os processos que podem levar à superação da dormência ou à deterioração são aspectos importantes da semente (WEITBRECH; MULLER; LEUBNER-METZGER, 2011) e que devem

ser melhor entendidos. Trabalhos já relataram o processo de deterioração em sementes de *C. brasiliense* após o plantio (MENDES, 2015; SOUSA, 2016), contudo ainda é necessário esclarecimento do comportamento germinativo e da deterioração de sementes de pirênios recém-dispersos e tratados para superar a dormência, semeados em canteiros a pleno sol.

Objetivou-se avaliar o efeito dos tratamentos de superação de dormência, armazenamento e uso do ácido giberélico (GA_3) sobre a qualidade fisiológica de sementes de *C. brasiliense*. Procurou-se responder às seguintes perguntas: qual a influência do armazenamento e da aplicação de GA_3 sobre a germinação e a deterioração das sementes em diferentes tempos de avaliações após o plantio? Pirênios submetidas ao maior armazenamento (120 dias) e tratados com GA_3 têm maior taxa de deterioração?

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e procedimentos iniciais

Pirênios (endocarpo+semente), estrutura de dispersão do pequiheiro, recém-dispersos foram coletados em Dezembro de 2015, no município de São João da Lagoa, Norte de Minas Gerais, Brasil ($16^{\circ}46'42''S$; $44^{\circ}18'24''W$). As sementes foram extraídas dos pirênios, conforme a metodologia de Mendes (2015), quantificadas e descartadas aquelas que estavam danificadas por insetos, fungos, apodrecidas, murchas e vazias. Ao final da extração, calculou-se a percentagem de sementes inviáveis. Já as sementes, aparentemente sem danos, foram avaliadas quanto ao teor de água e germinabilidade do lote.

Cinco repetições de 20 sementes foram utilizadas, para determinar o teor de água, pelo método da estufa a $105^{\circ} C$ por 24 horas (BRASIL, 2009) e a germinabilidade do lote. Para a germinação, as sementes previamente tratadas com fungicida Vitavax-tiram® (50%) foram semeadas, em bandejas de polietileno transparente, contendo vermiculita irrigada com água destilada e autoclavada a 80% da capacidade de retenção e mantidas em câmara de germinação (BOD), a $30^{\circ}C$, com fotoperíodo de 12 horas de luz, por 30 dias. A germinação das sementes foi avaliada, diariamente e, ao fim dos 30 dias, calculada a percentagem de germinação do lote.

2.2 Germinação e qualidade fisiológica de sementes de pequiheiro tratadas com GA_3 e armazenadas

Parte dos pirênios do lote descrito acima foi embebida em solução de GA_3 (Progibb 400), na concentração de $375mg/L$ por quatro dias, enquanto a outra parte foi tratada com Gastoxin®, por cinco dias, na dose de 6 pastilhas/ m^3 e armazenado em galpão aberto, seco e arejado por 30 dias.

Cinco repetições de dez pirênios, após os tratamentos de embebição em solução de GA_3 e armazenamento, foram seccionados transversalmente com o auxílio de uma guilhotina, retirando-se a semente, para determinação do teor de água, de acordo com Brasil (2009). Também, após esses tratamentos, sementes intactas foram extraídas, conforme a metodologia de Mendes (2015), semeadas

em bandejas e colocadas em câmara de germinação, a 30°C conforme descrito anteriormente, utilizando cinco repetições de 20 sementes.

Pirênios, submetidos à embebição em GA₃, ao armazenamento, além dos recém-dispersos e sem nenhum tratamento (controle), foram semeados em canteiro a pleno sol e irrigados diariamente. Para cada um dos três tratamentos, foram utilizados 16 parcelas de 100 pirênios alocadas ao acaso no canteiro. Após 30, 60, 210 e 300 dias do plantio retiraram-se quatro parcelas por tratamento para realização de avaliações.

Os pirênios foram avaliados, quanto à percentagem de germinação, de não germinação e de mortalidade, bem como à percentagem de emergência de plântulas e ao índice de velocidade de emergência (IVE). Foram considerados germinados, os pirênios, na ocasião da época de desenterrio (30, 60, 210 e 300 dias do plantio), que apresentavam rachadura na região do hilo, emissão da raiz e/ou da parte aérea. Por outro lado, classificados como pirênios não germinados aqueles que tiveram suas sementes extraídas, conforme a metodologia de Mendes (2015) e que eram capazes de absorver água e intumescer, mas que não apodreceram e que possuíam, após a retirada do tegumento, coloração branca típica de semente viável (BRASIL, 2009). Já pirênios mortos, os que continham sementes amolecidas, atacadas por microorganismos e que não apresentam nenhum sinal de germinação. A emergência foi avaliada diariamente, sendo considerada quando os pirênios possuíam plântulas que emitiram 0,5 cm da parte aérea acima do solo. O percentual de germinação, não germinação, mortalidade e emergência foram determinados, respectivamente, pelo número de pirênios germinados, não germinados, mortos e plântulas emergidas, dividido pelo número total de pirênios da parcela em cada época (100) e multiplicado por 100. O IVE foi calculado pelo somatório da divisão do número de plântulas emergidas por dia pelo número de dias após a semeadura (MAGUIRRE, 1962).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 (tratamento de pirênios) x 4 (tempo de permanência no solo: 30, 60, 210 e 300 dias), com quatro repetições de 100 pirênios. Os dados de germinação de pirênios não germinados, mortalidade, emergência e IVE foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de emergência de plântulas foram apresentados, na forma de emergência acumulada mensal, para somente o tempo 300 dias pós-plantio. Os dados de temperatura (máxima, mínima e média), durante o período, foram coletados no banco de dados do INMET, estação 83437, sediado na UFMG / Campus Montes Claros (Fig. 1).

2.3 Germinação e qualidade fisiológica de sementes de pequi em semeadas no outono

Foi utilizada parte dos pirênios do lote do experimento anterior, porém armazenados por 120 dias sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após esse período de estocagem, os pirênios foram imersos em água por 10 dias, trocando-a diariamente, para atingir a fase II da embebição (MENDES, 2015), depois por mais quatro dias em solução de GA₃ (Progibb 400) na concentração de 125 mg/L.

Cinco repetições de dez pirênios, antes da embebição e logo após o tratamento com GA₃, foram seccionados transversalmente com o auxílio de uma guilhotina, para determinação do teor de água, de

acordo com Brasil (2009). A germinabilidade do lote, após o armazenamento (120 dias) e após o uso do GA₃, foi mensurada, utilizando tanto a semente isolada como o pirênio. Em ambas as estruturas de propagação, foram usadas cinco repetições de 20 sementes ou pirênios, semeados em bandejas e colocados em câmara de germinação a 30°C, conforme relatado anteriormente. Quando se utilizaram pirênios, foi avaliada a germinação até 120 dias pós-plantio, enquanto semente isolada até 30 dias.

Os pirênios, após a embebição em GA₃, foram semeados no mês de abril, em canteiro a pleno sol e irrigados diariamente. Foram utilizadas 16 parcelas de 300 pirênios alocadas ao acaso no canteiro. Após 60, 90, 120 e 210 dias do plantio, retiraram-se quatro parcelas para realização de avaliações.

Os pirênios foram avaliados quanto à percentagem de emergência de plântulas, ao índice de velocidade de emergência (IVE) e à percentagem de pirênios com sementes deterioradas. Os critérios de avaliação e mensuração dessas características foram os mesmos adotados no experimento anterior. É importante mencionar que não foi verificado o percentual de germinação e nem de não germinados como no primeiro experimento, uma vez que, no momento das épocas de avaliação, todos os pirênios germinados já apresentavam plântulas emergidas e os não germinados possuíam sementes deterioradas.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (época de avaliação pós-plantio: 60, 90, 120 e 210 dias) e quatro repetições de 300 pirênios. Os dados de emergência, IVE, mortalidade foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

2.4 Quantificação de malondialdeído (MDA) em sementes de pequi

Para a estimativa da peroxidação de lipídios, por meio da quantificação do malondialdeído (MDA), utilizou-se a metodologia adaptada de Health e Packer (1968). Amostras de 200 mg de tecido embrionário de sementes de pirênios recém-dispersos, armazenados por 30, 120 e 480 dias, foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizado em ácido trifluoroacético (TCA) 0,1% (m/v), na proporção de 0,1 g mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, adicionando-se 1 mL de solução contendo TCA 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (m/v) em 250 µL do sobrenadante. As reações foram incubadas em banho-maria a 95°C, por 30 minutos, seguidas de resfriamento em gelo por 10 minutos e uma nova centrifugação, 10 minutos a 10000 rpm, com o objetivo de eliminar resíduos e bolhas. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 535 e 600 nm. A concentração do complexo entre MDA/TBA foi calculada, usando-se o coeficiente de 1,55 mM/cm e expressa em nmol MDA por grama de massa fresca.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (sementes de pirênios recém-dispersos e armazenados por 30, 120 e 480 dias) e quatro repetições de 200 mg de tecido embrionário. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Germinação e qualidade fisiológica de sementes de pirênios de pequi tratado com GA₃ e armazenados

As sementes de pirênios recém-dispersos apresentaram uma percentagem de inviabilidade de 13%, teor de água de 40,53% e germinabilidade de 38%. Já nos tratamentos que utilizaram sementes oriundas de pirênios, que foram imersos em solução de GA₃ e armazenados por 30 dias, respectivamente, tiveram uma germinação média de 68% e 53% e um conteúdo de água de 43% e 8,56%.

O uso do GA₃ e o armazenamento foram eficientes na superação da dormência e promoção da germinação até 210 dias pós-plantio, uma vez que a germinabilidade nesses tratamentos foram, significativamente superiores, em média, aproximadamente 24% aos pirênios recém-dispersos (controle), sem nenhum tratamento (4,45%) (Fig. 2). Entretanto a permanência dos pirênios recém-dispersos por 300 dias no canteiro superou a dormência, proporcionando o aumento da germinação e a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 2). Outro aspecto importante, a taxa germinativa não se alterou, ao longo do tempo, para os tratamentos com GA₃ e armazenamento (Fig. 2), o que indica que a germinação ocorre, em sua maioria, trinta dias após o plantio, primeira época de avaliação.

Pelo menos em parte, a dormência foi um dos fatores que limitou a germinação até os 210 dias pós-plantio, verificado pela elevada percentagem de sementes não germinadas (Fig. 3) e pela baixa mortalidade destas (Fig. 4) nos pirênios recém-dispersos (controle). Ao contrário, nos outros dois tratamentos, que superaram a dormência, o número sementes não germinadas reduziu, significativamente (Fig. 3), ao longo dos 210 pós-plantio, não pelo aumento da germinabilidade (Fig. 2), mas, sim, pelo drástico incremento na mortalidade (Fig. 4), evidenciando que, apesar de superarem a dormência, o armazenamento e o GA₃ proporcionam maior deterioração das sementes. Na avaliação dos 300 dias, ainda observou-se queda na percentagem de sementes não germinadas e aumento na germinabilidade e mortalidade nos pirênios recém-dispersos, enquanto nos outros dois tratamentos houve uma estabilização quanto a estas características (Fig. 2, 3 e 4).

A emergência foi mais elevada, nas três primeiras épocas de avaliação, para pirênios submetidos aos tratamentos de superação de dormência (dados não apresentados), porém, ao final do experimento, 300 dias pós-plantio, o uso de GA₃ foi o que permitiu a obtenção dos melhores resultados (Fig. 5). Para pirênios tratados com GA₃ e armazenados, a emergência foi iniciada com mais de 30 dias após o plantio e concentrada nos meses de Março e Abril, estabilizando-se a partir de Maio. Nos pirênios recém-dispersos, a emergência de plântulas só iniciou três meses depois do plantio (março) e, assim como os demais tratamentos, também, houve estabilização da emergência (Fig. 5). Entretanto, após o mês de agosto, com aumento da temperatura (Fig.1), houve uma retomada da emergência de plântulas, o que não ocorreu nos tratamentos com GA₃ e armazenamento (Fig.5).

Os pirênios que receberam tratamentos para superar a dormência apresentaram IVE superior ao controle, a partir de 60 dias do plantio até o final do experimento (Fig. 6). Esses resultados seguem a mesma tendência da percentagem de emergência de plântulas, demonstrando que o GA₃ e o armazenamento proporcionam uma germinação maior e mais precoce que o tratamento controle.

3.2 Emergência e qualidade fisiológica de sementes de pequiizeiro semeadas no outono

Após 120 dias de armazenamento, o teor de água das sementes foi de 6,93%, atingindo 47,69%, quando os pirênios foram embebidos com solução de GA₃. A germinabilidade inicial foi de 1,7 % e, depois do uso de GA₃, de 0,3%, enquanto nas sementes isoladas não foi verificada a germinação.

Sementes de pirênios, submetidas ao armazenamento por 120 dias, seguido pela embebição em água e em solução de GA₃ 125 mg/L e plantadas no outono, apresentaram baixa emergência, em média de 2,66%, não ocorrendo diferença estatística entre os tempos de avaliações pós-plantio. Também, para o índice de velocidade de emergência, não houve diferença ao longo de todo o período de avaliações, com IVE médio de 0,14. A mortalidade das sementes foi alta, em todos os períodos, superior a 50%, principalmente, a partir de 120 dias pós-plantio (Fig. 7). Os dados demonstram que a utilização de pirênios, com um período de armazenamento mais longo (quatro meses), seguido por vários dias de embebição (14 dias) e plantados na estação com temperaturas mais baixas (Fig. 1), proporciona altas taxas de deterioração da semente e baixa emergência.

3.3 Quantificação de malondialdeído (MDA) em sementes de pequiizeiro

Os tecidos embrionários de sementes recém-dispersas apresentaram menor concentração de malondialdeído (MDA), quando comparado a sementes com 120 e 480 dias de armazenamento (Fig. 8). A elevada concentração de MDA, longo do tempo de armazenamento, indica o aumento da peroxidação lipídica e conseqüente diminuição da viabilidade das sementes.

4 DISCUSSÃO

O tratamento com GA₃ promoveu a superação da dormência e a germinação de sementes de *C. brasiliense*. A dormência para espécie foi classificada como fisiológica não profunda (DOMBROSKI *et al.*, 2010; MENDES, 2015), caracterizada por baixo potencial de crescimento do embrião associado à resistência mecânica imposta pelo endocarpo (SOUSA *et al.*, 2017). As giberelinas (GAs) aumentam o potencial de crescimento do embrião e enfraquecem os tecidos adjacentes a ele, em razão do afrouxamento da parede celular, facilitando a protrusão da raiz e, conseqüentemente, favorecendo a germinação (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; NONOGAKI *et al.*, 2010). Ao contrário, o ácido abscísico (ABA) mantém a dormência, o que torna a relação ABA/GAs decisiva para inibir ou promover a germinação (BEWLEY *et al.*, 2013; BASKIN; BASKIN, 2014). Desta forma, ao se fazer uso de GAs exógenos, essa relação (GAs/ABA) aumenta, podendo superar a dormência (MIRANSARI;

SMITH, 2014). Estudos demonstraram a eficiência da aplicação de GA₃ na superação da dormência e promoção da germinação em sementes de *C. brasiliense* (DOMBROSKI *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2017; MENDES, 2015). Como o endocarpo não é um tecido vivo, em sementes de pequi o GA₃ atua, no afrouxamento da parede celular embrionária, aumentando a expansão celular (SOUSA *et al.*, 2017) e a capacidade do embrião romper o tecido adjacente.

O armazenamento, por 30 dias dos pirênios, também atuou na superação da dormência e no aumento e na velocidade da geminação de sementes de *C. brasiliense*. O período de armazenamento a seco, também chamado de pós-maturação, é eficiente na superação de dormência em algumas sementes (BEWLEY *et al.*, 2013; CARRERA *et al.*, 2008; HOLDSWORTH; BENTSINK; SOPPE, 2008; ORACZ, 2007), uma vez que proporciona uma diminuição no teor de ABA, em tecidos embrionários, durante o armazenamento (BARRETO *et al.*, 2014). No processo de pós-maturação, há aumento no nível de espécies reativas a oxigênio (ROS) nas células (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; LIU *et al.*, 2010). Essas moléculas podem inativar enzimas envolvidas no processo de sinalização do ABA (MEINHARD; RODRIGUEZ; GRILL, 2002) e estimular produção de GA (EL-MAAROUF-BOUTEAU; BAILLY, 2008), o que pode interferir na relação GA/ABA, podendo superar a dormência e promover a germinação.

Apesar de superarem a dormência, a utilização do armazenamento e do GA₃ aceleraram o processo de deterioração, pois sementes submetidas a esses tratamentos germinaram até 30 dias e emergiram plântulas até 90 dias após o plantio, enquanto as não germinadas sofreram um rápido processo de deterioração, permanecendo somente uma pequena quantidade aparentemente viáveis. Tratamentos de superação de dormência podem desencadear o aumento de ROS, durante a embebição, que desempenham uma função de moléculas sinalizadoras, no catabolismo do ABA, mas também têm um papel deletério em nível celular (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). Existe uma "janela oxidativa" relacionada aos níveis de ROS nas células, que primeiro atuam superando a dormência e depois ocasionam danos celulares oxidativos, levando à deterioração e à perda da viabilidade das sementes (BAILLY *et al.*, 2004; BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). Essas moléculas atuam na oxidação de lipídeos, proteínas e modificam propriedades funcionais das membranas celulares (PARKHEY *et al.*, 2012), podendo levar à morte celular (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008), o que pode explicar a elevada taxa de mortalidade das sementes, após 30 dias nos tratamentos com GA₃.

Sementes não submetidas aos tratamentos de superação de dormência ficaram por mais tempo viáveis comparadas às demais e houve acréscimo da germinação e emergência, na última avaliação, após 10 meses do plantio, no mês de outubro. O Cerrado apresenta duas estações: uma chuvosa (Outubro a Março) e uma seca (Abril a Setembro) (KLINK; MACHADO, 2005). O acréscimo da germinação e emergência, no início da estação chuvosa seguinte, pode significar que elas, durante o período que ficaram no leito de plantio, superaram a dormência e ainda que a elevação da temperatura tem a capacidade de atuar como um gatilho, para a germinação, assim como já foi constatado para outras espécies que ocorrem no Cerrado (NEVES *et al.*, 2013; RODRIGUES-JÚNIOR *et al.*, 2016). A dormência é uma característica importante de adaptação (POSTMA; AGREN, 2015), que atrasa a

germinação até a chegada da estação favorável, para o crescimento da planta (GRAEBER *et al.*, 2012), sincronizando a geminação com o momento ideal para o estabelecimento das plântulas (FOOTITT *et al.*, 2011). Além disso, a permanência de sementes viáveis e a emergência de plântulas, após 10 meses da dispersão, sugerem que, em condições naturais, há formação de banco de sementes, mesmo que seja provisório, para *C. brasiliense*.

Algumas espécies que possuem sementes dispersas, na segunda metade da estação chuvosa (Dezembro a Março), como *C. brasiliense*, utilizam do fenômeno da dormência para atrasar a germinação até o período chuvoso seguinte (NEVES *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2012). Entretanto a dormência, principalmente a fisiológica, é um fenômeno que se caracteriza por uma variação na sua intensidade, o que leva as sementes a terem tempos diferentes, para concluírem o processo de germinação, distribuindo-a no tempo (BASKIN; BASKIN, 2014). Isso pode justificar a presença de germinação e emergência de plântulas, ainda que baixa, de sementes recém-dispersas, logo após a semeadura, entre 30 e 120 dias, evidenciando que algumas não possuíam dormência ou sua intensidade era baixa. Aos 300 dias após o plantio, mesmo com temperaturas mais elevadas, havia uma quantidade expressiva de sementes não germinadas, próximo a 40%, indicando que, provavelmente, estas sementes apresentavam uma intensidade de dormência maior, necessitando de mais tempo em condições específicas, para liberá-la da dormência e concluir a germinação. Outra possibilidade é que as sementes não germinadas, após a liberação da dormência no leito de substrato, tenham-na novamente adquirido, denominada de dormência secundária. A capacidade de adquirir a dormência secundária ocorre, em geral, em espécies com sementes que, após a dispersão são dormentes e não naquelas que, no momento da dispersão, não são dormentes (BASKIN; BASKIN, 2014).

A germinabilidade de pirênios armazenados por 120 dias (1,7%) e a emergência destes tratados com GA₃ (2,66%) foram muito baixos e a mortalidade das sementes elevada, próximo a 80% sete meses após o plantio. A situação acentua-se, observando 100% de mortalidade e nenhuma germinação, quando foram utilizadas sementes isoladas desses pirênios estocados e imersos em GA₃. Isso indica que o endocarpo contribui para preservar, mesmo que minimamente, a viabilidade das sementes armazenadas. O papel protetor do endocarpo contra a deterioração das sementes e a perda da viabilidade e vigor, em sementes armazenadas de *C. brasiliense*, já havia sido mencionado em outros estudos (MENDES, 2015; SOUSA, 2016). O decréscimo, na germinação das sementes de pequi no tempo, pode ser resultado da oxidação lipídica, como relatado anteriormente. Esse processo gera a formação de moléculas secundárias, como o malondialdeído (MDA), um aldeído que apresenta alto grau de toxicidade às células, o que o leva a tornar-se um importante marcador de peroxidação de lipídeos (DEL RIO *et al.*, 2005). Portanto a baixa emergência e alta deterioração de sementes de pequi expostas por um período mais longo de armazenamento, 120 dias, pode ser explicada por uma produção maior de MDA nesse período em comparação às sementes recém-dispersas.

A presença de sementes, de pirênios recém-dispersos, não germinadas e não deterioradas (40%), 300 dias após plantio, é muito superior aos tratamentos que utilizaram o armazenamento prévio a seco de 30 (5%). As sementes de *C. brasiliense*, em substrato úmido, têm apresentado menor taxa de mortalidade (SOUSA, 2016), atenuando, assim, os processos degradativos. Isso é uma característica

interessante, uma vez que alta umidade, geralmente, acelera o processo de deterioração de sementes (BEWLEY et al., 2013) e que deve ser melhor investigado em estudos futuros.

5 CONCLUSÕES

O armazenamento por 30 dias e o tratamento com GA₃ foram eficientes, na promoção da germinação de sementes de pirênios de *C. brasiliense*, porém proporcionaram maior deterioração das sementes.

O plantio de pirênios recém-dispersos distribui a germinação e a emergência, ao longo do tempo, à exceção da época mais fria entre Maio e Agosto.

A presença de sementes viáveis e a emergência de plântulas, após dez meses da dispersão, sugerem, que, em condições naturais, a espécie tem capacidade de formação de banco de sementes temporário no solo.

Sementes expostas ao armazenamento por tempo prolongado e semeadas no Outono apresentaram baixa emergência e alta deterioração, em decorrência do aumento da peroxidação lipídica.

6 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable of central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**, Bronx, v. 49, p. 40-48, 1995. Acesso em: 04 abr. 2016.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004. Disponível em < doi. org/ 10.1079/ SSR2004159>. Acesso em: 04 abr. 2016.
- BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p. 806-814.2008. Disponível em:< 10.1016/j.crv.2008.07.022.> Acesso em: 04 abr. 2016.
- BARRETO, L. C.; GARCIA, Q. S.; MORALES, M.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Vitamin E and defense-related phytohormones are reliable markers of embryo growth in macaw palm fruits exposed to various storage conditions. **Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2014. Disponível em: <10.1007/s11240-014-0474-8>. Acesso em: 04 abr. 2016.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, 2 edition, Academic Press, 2014, 1600 p.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. 3 ed. New York: Springer, 392p., 2013.
- BRASIL. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.
- CAMARGO, M. P.; ESTEVAM, A.; FEROLDI, M.; CREMONEZ, P. A. A cultura do pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) na recuperação de áreas degradadas e como alternativa para a produção de biodiesel no Brasil. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. especial, p.180-192, 2014.

CARRERA, E.; HOLMAN, T.; MEDHURST, A.; DIETRICH, D.; FOOTITT, S.; THEODOULOU, F. L.; M. J. HOLDSWORTH. 2008. Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis. *The Plant Journal*, Oxford, v. 53, n. 2, p. 214-224.

COLLEVATTI, R.G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Seed abortion in the bat pollinated Neotropical tree species, *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Botany*, v. 87, p1110-1115, 2009. Disponível em: <10.1139/B09-054>. Acesso em 21 fev. 2017.

DEL RIO, D., STEWART, A. J., PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, Amsterdam, v.15, p. 316-328, 2005.

DOMBROSKI, J. L. D.; PAIVA, R.; ALVES, J. M. C.; SANTOS, B. R.; NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P. D. O.; BARBOSA, S. Métodos para superação da dormência fisiológica de *Caryocar brasiliense* Camb. *Cerne, Lavras*, v. 16, n. 2, p. 131-135, abr./jun. 2010.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy, *Plant Signal. Behav*, v. 3, p.175-182, 2008.

FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, v.171, p.501-523, 2006. Disponível em: <10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>. Acesso em: 13 abr. 2016.

FLORA DO BRASIL. Lista de espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/>> Acesso em: 15 jun. 2016.

FOOTITT, S.; DOUTERELO-SOLER, I.; CLAY, H.; FINCH-SAVAGE W.E. Dormancy cycling in Arabidopsis seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.108, p.20236-20241, 2011. Disponível em: <10.1073/pnas.1116325108> Acesso em: 15 abr. 2016.

GIROLDO, A. B.; SCARIOT, A. Land use and management affects the demography and conservation of an intensively harvested Cerrado fruit tree species. *Biological Conservation*, v.191, p. 150-158, 2015.

GRAEBER K. A. I.; NAKABAYASHI K.; MIATTON E., LEUBNER-METZGER G.; SOPPE W. J. J. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ.* v.35, p.1769-1786, 2012. Disponível em: <10.1111/j.1365-3040.2012.02542.x> Acesso em 15 jan. 2017.

HEATH R.L.; PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, v.125, p.189-198, 1968.

HOLDSWORTH, M. J., L. BENTSINK, AND W. J. SOPPE. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol, Lancaster*, v. 179, n. 1, p. 6133-6154, 2008.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, v. 1, p.147-155. 2005.

KUCERA, B.; COHN, M.A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, v.15, p. 281-307, 2005.

LEITE, G.L.D., NASCIMENTO, A.F., ALVES, S.M; LOPES, P.S.N., SALES, N.P.L.S E ZANUNCIO, J.C. The mortality of *Caryocar brasiliense* in northern Minas Gerais State, Brazil. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 34, n. 2, p. 131-137, 2012.

LIU Y, YE N, LIU R, CHEN M, ZHANG J. H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. **J. Exp. Bot.**,v. 61,p.2979-90, 2010. Disponível em < 10.1093/jxb/erq125> Acesso em: 22 fev. 2017.

MAGUIRE, J. D. Seeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177. 1962.

MEINHARD, M; RODRIGUEZ,P.L; GRILL, E. The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. **Planta**, v.5, p. 775-782,2002.

MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.;VIEIRA, F. A.; OLIVEIRA, D. A. Spatial genetic structure in natural populations of Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae) in the North of Minas Gerais, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 205-209, 2012. Disponível em: < 10.1016/j.bse.2012.02.005>. Acesso em: 22 fev. 2017.

MENDES, D. S. Dormência, germinação e longevidade em sementes de pequizeiro (Caryocar brasiliense Camb.) 2015. 50p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2015.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p.110-121, 2014.

NEVES, S.C.; RIBEIRO, L. M.; CUNHA, I. R. G.; PIMENTA, M. A. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N. Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*), **Flora**, v. 208, p. 68-78, 2013.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination - Still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.

ORACZ, K.; BOUTEAU, H. E. M.; FARRANT, J. M.; COOPER, K.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; JOB, D.; CORBINEAU, F.; BAILLY, C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. **Plant Journal, Oxford**, v. 50, p. 452-465, 2007. Disponível em:< doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03063.x>. Acesso em 21 fev.2017.

PARKHEY S.; NAITHANI S.C.; KESHAVKANT. S. ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during ageing. **Plant Physiol Biochem**, 57, p.261-267, 2012. Disponível em:< 10.1016/j.plaphy.2012.06.008>.Acesso em 21 fev.2017.

POSTMA F.M.; ÅGREN J. Maternal environment affects the genetic basis of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Ecology**,v.24, p.785-797, 2015. Disponível em:< 10.1111/mec.13061> Acesso em 21 mar.2017.

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, T. G. S.; CARVALHO, V. S.; SILVA, P. de O.; NEVES, S. da C.; GARCIA, Q. S. The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. **Seed Science and Technology**, v.40, p.345-353, 2012.

RODRIGUES-JUNIOR, AILTON G.; OLIVEIRA, TÚLIO G.S.; DE SOUZA, PATRÍCIA P. ; RIBEIRO, LEONARDO M. . Temperature effects on *Acrocomia aculeata* seeds provide insights into overcoming dormancy in neotropical savanna palms. **Flora**, v. 223, p. 01, 2016. Disponível em < 10.1016/j.flora.2016.04.011>. Acesso em: 20 abr.2017.

SANTOS, F. S.; SANTOS, R. F.; DIAS, P. P.; JUNIOR, L.A. Z.; TOMASSONI, F. A cultura do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Acta Iguazu**, Cascavel, v.2, n.3, p. 46-57, 2013.

SOUSA, A. M. S. Estrutura, Qualidade Fisiológica e Armazenamento de Sementes de Caryocar brasiliense (Caryocaraceae) 2016.89p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2016.

SOUSA, M. S.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; ANDRADE, M. S.; MERCADANTE SIMÕES, M. O. Structural aspects of germination control in pyrenes of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). **Trees**, v.31, n.1, p. 1-16, 2017. Disponível em: <10.1007/s00468-016-1514-2>. Acesso em: 17 fev. 2017.

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil, 1 ed . Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil, 2006.

WEITBRECHT, K.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3289-3309, 2011. Disponível em: <10.1093/jxb/err030> Acesso em: 20 jan. 2017.

7 APÊNDICES

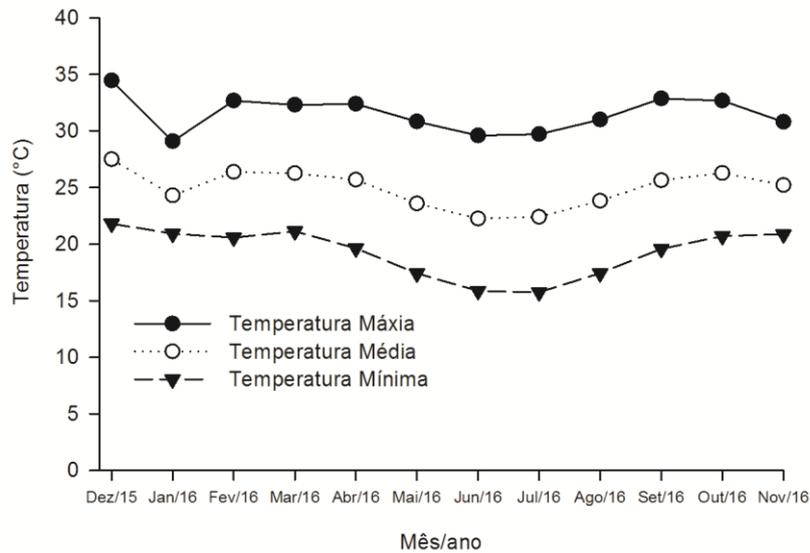


Fig.1 Temperaturas (°C) máxima, mínima e média no período de dezembro de 2015 a novembro de 2016.

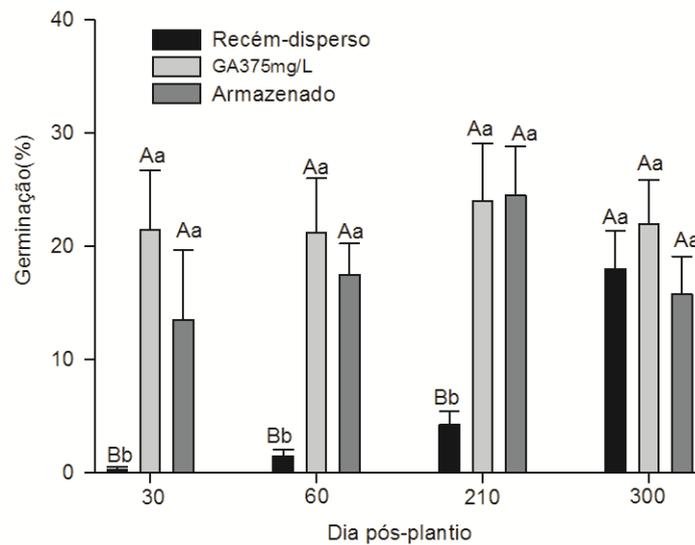


Fig. 2 Germinabilidade de sementes de pirênios de *C.brasiliense* recém-dispersos, tratados com GA₃ 375 mg/L e armazenados por 30 dias, avaliadas 30, 60, 210 e 300 dias pós-plantio. Letras minúsculas comparam média da germinação de sementes do mesmo tipo de pirênios em diferentes tempos. Letras maiúsculas comparam médias de germinação de sementes de tipos diferentes de pirênios no mesmo tempo. Mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

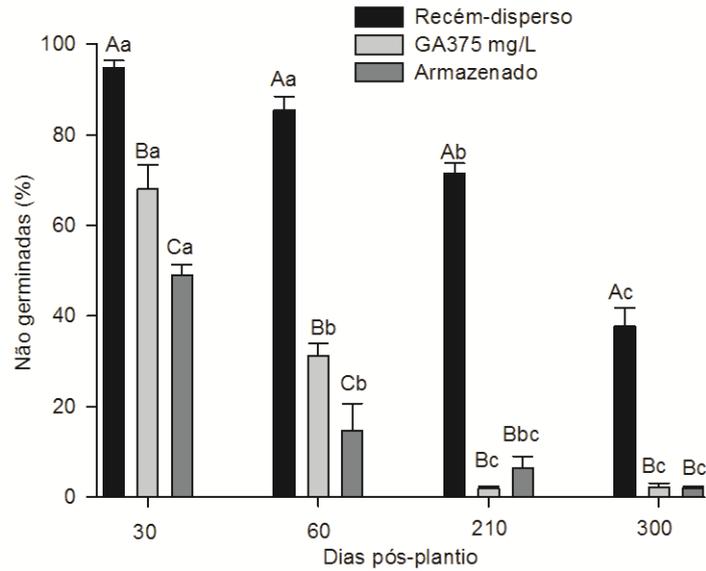


Fig. 3 Sementes não germinadas de pirênios recém-dispersos, tratados com GA₃ 375 mg/L e armazenados por 30 dias, avaliadas 30, 60, 210 e 300 dias pós-plantio. Letras minúsculas comparam média da germinação de sementes do mesmo tipo de pirênios em diferentes tempos. Letras maiúsculas comparam médias de germinação de sementes de tipos diferentes de pirênios no mesmo tempo. Mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

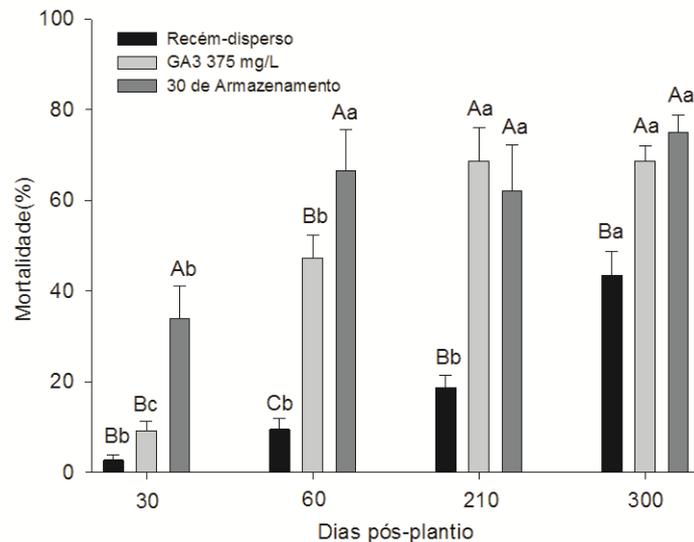


Fig. 4 Mortalidade de sementes de pirênios de *C.brasiliense* recém-dispersos, tratados com GA₃ 375 mg/L e armazenados por 30 dias, avaliadas 30, 60, 210 e 300 dias pós-plantio. Letras minúsculas comparam média da mortalidade de sementes do mesmo tipo de pirênios em diferentes tempos. Letras maiúsculas comparam médias de mortalidade de sementes de tipos diferentes de pirênios no mesmo tempo. Mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

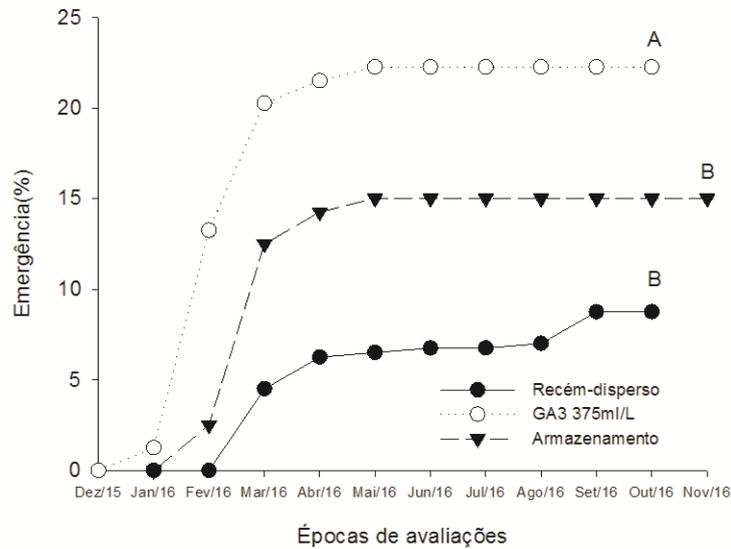


Fig. 5 Emergência acumulada de plântulas a partir de pirênios de *C. brasiliense* recém-dispersos, tratados com GA₃ 375 mg/L e armazenados por 30 dias, durante 300 dias pós-plantio. Mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

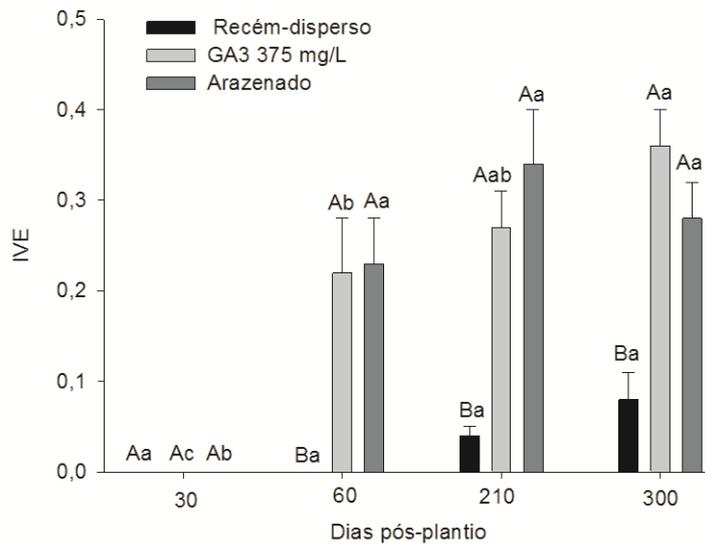


Fig. 6 Letras minúsculas comparam IVE de plântulas provenientes de sementes do mesmo tipo de pirênios, em diferentes tempos. Letras maiúsculas comparam IVE de plântulas provenientes de sementes de tipos diferentes de pirênios no mesmo tempo. Mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

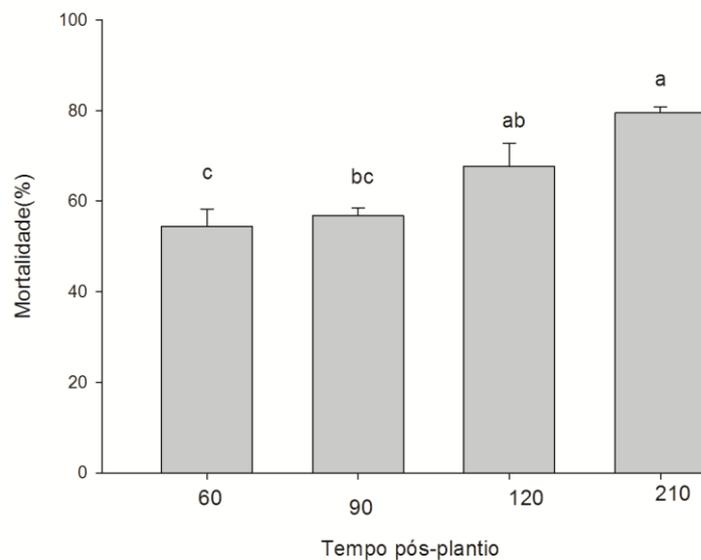


Fig. 7 Mortalidade de sementes de pirênios de *C.brasiliense* armazenados por 120 dias e tratados com GA₃ 125 mg/L avaliados 60, 90, 120 e 210 dias pós-plantio. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

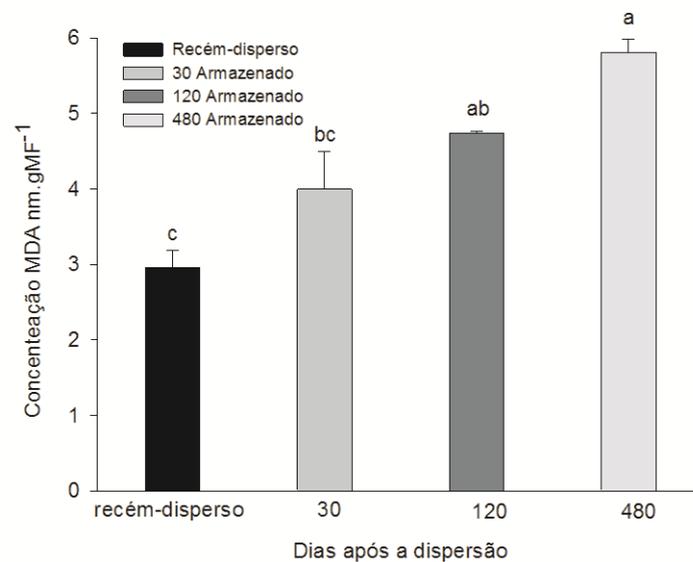


Fig. 8 Concentração de MDA em sementes de pirênios de *C. brasiliense* recém-dispersos, armazenados 30, 120 e 480 dias. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.