

Pedro Henrique Mastriani Vieira

**Caracterização morfofisiológica e sensibilidade à dessecação
de sementes de *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg
(Myrtaceae)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências, área de concentração
Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Profa. Dra. Neusa Steiner

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

vieira, pedro henrique mastriani
caracterização morfofisiológica e sensibilidade à
dessecação de sementes de *Casearia xanthocarpa*
(mart.) O. Berg (Myrtaceae) / pedro henrique
mastriani vieira ; orientadora, Neusa Steiner, 2019.
81 p.

dissertação (mestrado) - universidade federal de
santa catarina, centro de ciências agrárias,
programa de pós-graduação em recursos genéticos
vegetais, Florianópolis, 2019.

inclui referências.

1. recursos genéticos vegetais. 2. fisiologia de
sementes. 3. semente sensível à dessecação. I.
Steiner, Neusa. II. universidade federal de santa
catarina. programa de pós-graduação em recursos
genéticos vegetais. III. título.

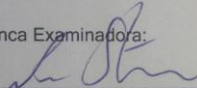
Caracterização morfofisiológica e sensibilidade à
dessecação de sementes de *Campomanesia*
xanthocarpa (Mart.) O. Berg (Myrtaceae)

por

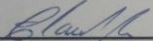
Pedro Henrique Mastriani Vieira

Dissertação julgada e aprovada em 21/02/2019, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

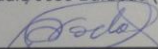
Banca Examinadora:



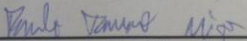
Prof.^a Dr.^a Neusa Steiner (Presidente/Orientadora-CCB/UFSC)



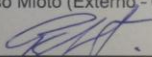
Prof. Dr. Cláudio José Barbedo (Externo - IB/SP)



Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Tamaso Miotto (Externo - CCB/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus pais por todo o apoio, suporte e compreensão ao longo desses últimos dois anos de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o período em que foi desenvolvido este trabalho.

À minha orientadora Profa. Neusa Steiner pela paciência e por todos os aprendizados desses últimos dois anos.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Vegetal BOT/UFSC pela harmonia durante a rotina e por todas as discussões acadêmicas, pessoais e filosóficas extremamente pertinentes para qualquer ambiente de trabalho saudável.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal CCA/UFSC e ao Prof. Marcelo Maraschin do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal CCA/UFSC pela parceria para realização de análises sem as quais este trabalho não poderia ter sido feito.

A todos(a) velhos(a) novos(a) amigos(a) que durante esses últimos dois anos, por mais que perto ou longe, puderam acompanhar o lado pessoal do desenvolvimento desse trabalho, e permitiram momentos de descontração e abstração fundamentais para qualquer vida acadêmica sadia.

À todos servidores e técnicos da UFSC que indiretamente possuem um grande papel indireto em todas as áreas da formação acadêmica.

“[...] Lo mejor que el mundo tiene está en los muchos mundos que el mundo contiene,
las distintas músicas de la vida, sus dolores y colores:
las mil y una maneras de vivir y decir, creer y crear,
comer, trabajar, bailar, jugar, amar, sufrir y celebrar,
que hemos ido descubriendo a lo largo de miles y miles de años. [...]”

(Eduardo Galeano, La escuela del mundo al revés)

RESUMO

O Brasil é o país com a maior diversidade de espécies arbóreas do planeta e a Mata Atlântica brasileira está entre os *hotspots* mundiais de biodiversidade, mas ocupa somente 15,3% de sua área original. Myrtaceae é uma família representativa na Mata Atlântica e no sul do Brasil destaca-se *Campomanesia xanthocarpa*, uma espécie arbórea amplamente distribuída. A espécie possui perspectivas econômicas potenciais para a região sul do país, porém, suas sementes são sensíveis à redução no teor de água, inviabilizando seu armazenamento por métodos convencionais. Sementes sensíveis à dessecação aparentemente não possuem, ou não expressam os mecanismos fisiológicos para tolerar a perda de água sem que ocorram danos irreversíveis e consequente perda da viabilidade. Entretanto, o conhecimento fisiológico de espécies sensíveis à dessecação ainda possui algumas lacunas, como por exemplo, a relação das poliaminas com a dessecação dessas sementes. Neste sentido, devido à abundância de *C. xanthocarpa*, a espécie pode servir de modelo para estudos de comportamento fisiológico de espécies nativas e garantir a adequação das estratégias de conservação. Portanto, as sementes de *C. xanthocarpa* foram removidas dos frutos e submetidas a testes de dessecação e germinação. A descrição anatômica das sementes foi feita através de microscopia de óptica e o conteúdo de poliaminas foi estimado em HPLC, enquanto que a atividade enzimática do sistema antioxidante e a peroxidação lipídica foram estimados em espectrofotômetro. Devido a questões morfológicas intrínsecas, as sementes de *C. xanthocarpa* apresentaram uma alta taxa de dessecação, perdendo 93,9% de seu conteúdo de água e a viabilidade em 24 h. Após 6 h de dessecação as sementes perderam 76% do conteúdo de água, mas mesmo assim não houve redução na taxa de germinação (96%), que somente diminuiu após 12 h (42%) e 24 h (1%). O conteúdo endógeno de poliaminas aumentou durante o processo de dessecação, principalmente devido à espermidina. Os níveis de espermidina permaneceram estáveis nas primeiras 6 h e em seguida aumentaram até que as sementes perdessem viabilidade após 24 h. O comportamento da atividade enzimática da catalase e da ascorbato peroxidase foi parecido, onde inicialmente reduziram, após 12 h começaram a subir e com 24h atingiram valores similares às atividades em sementes frescas. Tal comportamento indica um desbalanço caso algum estresse oxidativo estivesse ocorrendo. No entanto, não houve peroxidação lipídica durante a dessecação, indicando que mesmo com o desbalanço enzimático danos oxidativos não estavam acumulando. Portanto, devido à intensidade de

perda de água é provável que danos mecânicos às membranas durante a desidratação/reidratação dos tecidos esteja levando à perda da viabilidade em sementes de *C. xanthocarpa*. Ao verificar a natureza do dano e a resposta dos mecanismos fisiológicos durante a dessecação contribui para o conhecimento sobre o comportamento e vulnerabilidade de sementes nativas.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes. Espermidina. Guabiroba. Peroxidação lipídica. Poliaminas. Myrtaceae. Recalcitrância.

RESUMO EXPANDIDO

1- INTRODUÇÃO

Sementes sensíveis à dessecação são uma grande preocupação quando consideramos os esforços globais de conservação *ex situ*. Tradicionalmente as sementes foram classificadas segundo sua capacidade de tolerar ou não o armazenamento. Esta classificação também se refere ao comportamento fisiológico da semente de tolerância/sensibilidade à dessecação. Essas categorias são úteis para questões técnicas de armazenamento, mas a dicotomização desses comportamentos pode subestimar a complexidade de muitas espécies. Portanto, é mais pertinente considerar a tolerância/sensibilidade à dessecação como um espectro contínuo de comportamentos fisiológicos. Cerca de 8% das plantas do mundo possuem sementes sensíveis à dessecação, e em ecossistemas tropicais essa proporção pode chegar a 50% das espécies vegetais. Considerando o território Brasileiro, a Mata Atlântica é um ecossistema megadiverso que já sofreu intensa pressão antrópica, restando apenas 15% da sua área original, e onde muitas espécies estão desaparecendo. Neste contexto, estudos fisiológicos de sementes vêm sendo utilizados em estratégias de conservação com o intuito de compreender seus comportamentos e verificar a vulnerabilidade de espécies. *C. xanthocarpa* é uma espécie comumente distribuída pela região sul do Brasil e que possui sementes sensíveis à dessecação, e devido à abundância na produção de frutos e sementes a espécie apresenta potencial como modelo para estudos fisiológicos. Os mecanismos pelos quais sementes toleram a dessecação já são relativamente bem compreendidos pela literatura, porém ainda há lacunas sobre as respostas fisiológicas de sementes sensíveis à dessecação ao estresse, e acredita-se que elas não possuam ou então não expressem os mecanismos de tolerância. Neste sentido a perda da viabilidade pode ser devido a danos físico/mecânicos durante a desidratação/reidratação dos tecidos ou pelo acúmulo de dano oxidativo. Por serem metabolicamente ativas as sementes sensíveis à dessecação produzem radicais livres e espécies reativas de oxigênio durante a desidratação, que por sua vez podem se acumular e exercer efeitos deletérios em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Portanto, sistemas de proteção antioxidante são essenciais para manter a homeostase e integridade funcional das células. Ademais, outros fatores de proteção como as poliaminas, que estimulam a atividade de sistemas

antioxidantes, ainda carecem de estudos, e ainda não se sabe como é seu comportamento durante o estresse em sementes sensíveis à dessecação. Neste sentido, a expansão do conhecimento sobre o comportamento de espécies nativas é de grande interesse para o contexto fisiológico e de conservação, pois permite verificar a vulnerabilidade de espécies e elaborar estratégias de conservação compatíveis.

2- OBJETIVO

Estudar o comportamento fisiológico das sementes de *C. xanthocarpa* baseando-se nas mudanças morfofisiológicas relacionadas à sensibilidade à dessecação.

3- METODOLOGIA

Frutos de *C. xanthocarpa* foram coletados em Janeiro de 2018 a partir de uma população da espécie na região central do estado de Santa Catarina, Brasil. Os frutos foram armazenados sob refrigeração e as sementes foram extraídas manualmente com auxílio de peneira, sendo imediatamente submetidas aos experimentos planejados. O conteúdo de água das sementes foi estimado após secagem em estufa (105°C, 24 h) e um novo lote foi submetido à dessecação em estufa (27°C, 55-65%UR) e em recipientes contendo sílica (27°C) para definição dos tratamentos e do comportamento durante a dessecação. A partir disso cada tratamento foi submetido ao teste de germinação em BOD (25°C, 12/12h fotoperíodo), onde após 30 dias obteve-se a taxa de germinação, índice de velocidade de germinação e comprimento da radícula. A condutividade elétrica de cada tratamento foi medida com auxílio de condutivímetro. O conteúdo de poliaminas de cada tratamento foi estimado por HPLC, e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), assim como a peroxidação lipídica foram estimados por espectrofotômetro. Análises histológicas das sementes de cada tratamento foram feitas em microscopia de luz. Todos os dados obtidos nos experimentos foram sujeitos à ANOVA e as diferenças entre médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$), sendo que para a comparação de duas médias foi utilizado o teste t de student. Para verificar se havia correlação entre os dados foi feito o teste de correlação de Pearson.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *C. xanthocarpa* quando frescas apresentaram um conteúdo de água (CA) de 0,684 g H₂O g dw⁻¹ e demonstraram uma taxa de dessecação muito alta, onde 94% do CA inicial foi perdido durante as primeiras 24 h. No geral a maioria das sementes podem ser desseccadas de maneira rápida ou lenta, mas para as sementes de *C. xanthocarpa* a dessecação foi sempre rápida independente do método. Metade do conteúdo de água já havia sido perdida entre 2-3 h de dessecação, e após 6 h as sementes já haviam perdido 76% de seu CA (0,163 g H₂O g dw⁻¹), mas mesmo assim a taxa de germinação não sofreu redução (96,7%) e continuou alta como nas sementes frescas (95%). Quando as sementes foram desseccadas por 12 h, com CA de 0,079 g H₂O g dw⁻¹, a taxa de germinação reduziu para menos da metade (42,5%) e após 24 h de dessecação o conteúdo de água baixou para 0,042 g H₂O g dw⁻¹ e as sementes perderam totalmente a viabilidade (0,83%). A germinação foi mais rápida para sementes frescas, que começaram a germinar e atingiram sua taxa final de germinação antes dos outros tratamentos, o que também pode ser visto pelos valores do índice de velocidade de germinação 3,03, 2,59, 0,982 e 0,018 para sementes frescas e desseccadas por 6, 12 e 24 h, respectivamente. A eletrocondutividade apresentou uma forte correlação negativa com os valores de germinação dos tratamentos (-0,9463), o que já é sugerido na literatura como método para verificar de qualidade fisiológica de sementes. O tegumento glandular externo de *C. xanthocarpa* na verdade é um falso tegumento, e é característica taxonômica para identificar o gênero *Campomanesia*. Este falso tegumento é relativamente fino e composto por três tipos de tecido, dos quais o mais interno e externo não são lignificados, enquanto que o tecido do meio é lignificado e unisseriado. Muito provavelmente a rapidez observada na dessecação das sementes de *C. xanthocarpa* é por conta da natureza do tegumento da espécie, o que é compartilhado por todo o gênero. A maior taxa de desidratação ocorre nas primeiras horas, e é provável que a água esteja sendo removida de camadas celulares periféricas e do próprio falso tegumento. Por conta disso a semente ainda permanece viável mesmo após reduzir drasticamente seu CA para 0,163 g H₂O g dw⁻¹. Definições clássicas de comportamento de sementes classificam-nas de acordo com o mínimo CA tolerado antes de começarem a perder viabilidade, e neste contexto, o comportamento de *C. xanthocarpa* seria considerado como intermediário. Portanto, classificar sementes apenas pelo seu CA pode ser útil para questões de armazenamento, mas pode generalizar a realidade fisiológica de muitas

espécies, tendo em vista que cada uma percebe e responde de uma forma ao ambiente. Aparentemente as sementes de *C. xanthocarpa* não reduzem sua taxa de germinação com 0,163 g H₂O g dw⁻¹ porque sua dessecação ocorre de forma muito rápida, e por isso que ao expressar o tempo em conjunto com o CA é mais informativo para compreender a condição única de cada semente. Adicionalmente, poliaminas, que são moléculas sinalizadoras de estresse, não alteram seu conteúdo total durante as primeiras 6 h de dessecação, o que sugere que a remoção inicial de água não estava afetando o metabolismo. No entanto, quando a germinação reduziu pela metade após 12 h, o conteúdo total de poliaminas aumentou, e após 24 h quase duplicou, indicando a presença de estresse. O aumento na quantidade de poliaminas durante a perda de viabilidade da semente foi devido ao aumento nos níveis de espermidina, enquanto que os níveis de putrescina e espermina ficaram praticamente inalterados durante todo o processo. A espermidina em muitos trabalhos está envolvida com a minimização dos efeitos de estresses abióticos, e em sementes de *C. xanthocarpa* seu aumento foi considerável quando submetidas ao estresse. Não há muitos trabalhos relacionando a espermidina, ou poliaminas, com a dessecação de sementes, e literalmente nenhum quando diz respeito às sementes sensíveis à dessecação. Geralmente o acúmulo de poliaminas está ligado ao aumento da tolerância a estresses, mas contraditoriamente no caso deste estudo houve uma correlação negativa entre poliaminas e germinação (-0,8553). O acúmulo de poliaminas pode estimular a atividade do sistema antioxidante, e foi observada uma correlação moderada entre os conteúdos de espermidina e as atividades de CAT (0,5495) e APX (0,5086). A atividade da SOD aumentou durante as primeiras 12 h de dessecação, e depois caiu drasticamente após 24 h, momento em que as sementes estavam inviáveis. A SOD é primeira linha de ação contra as espécies reativas de oxigênio, e seu aumento na dessecação pode estar relacionado com o aumento na produção de superóxido O₂⁻ durante o estresse. Por outro lado as atividades da CAT e APX foram similares entre si, mas distintas do comportamento da SOD. Tanto para CAT quanto APX a atividade reduziu com 6 h de dessecação, após 12 h começaram a subir e com 24h atingiram valores similares às sementes frescas. A redução durante as primeiras 6 h pode ser devido ao fato que as sementes não estavam sendo comprometidas pela dessecação, tendo em vista a alta taxa de germinação (96,7%) e a estabilidade dos níveis de espermidina. Apenas quando os danos já estavam ocorrendo após 12 h é que CAT e APX responderam, numa tentativa de manter a homeostase da célula, mas a resposta só foi capaz

de atingir valores parecidos com sementes frescas no momento em que a viabilidade já havia sido perdida. Este descompasso na atuação de sistemas antioxidantes é um dos motivos pelos quais sementes sensíveis à dessecação podem perder a viabilidade. Entretanto, os valores referentes à peroxidação lipídica não se alteraram durante todo o processo de dessecação, indicando que não houve dano metabólico aos sistemas de membrana. Portanto, devido a alta taxa de desidratação, é provável que sementes de *C. xanthocarpa* esteja perdendo viabilidade devido a danos mecânicos durante a desidratação ou reidratação. Ademais, foi observado que as sementes de perceberam o estresse e de alguma maneira tentaram elaborar uma resposta fisiológico para minimizar os danos, mas características intrínsecas da morfoanatomia de *C. xanthocarpa* fizeram com que seu comportamento durante a dessecação superpusse qualquer tentativa dos tecidos em minimizar os danos decorrentes da desidratação.

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sementes de *C. xanthocarpa* apresentaram rápida dinâmica de dessecação devido às características morfoanatômicas de seu tegumento. A alta taxa de desidratação fez com que as sementes tolerassem um conteúdo de água mais baixo do que outras sementes sensíveis à dessecação. Danos e estresses decorrentes da dessecação só ocorreram após 12 h de dessecação, e foi sinalizado pelo acúmulo de espermidina. A atividade enzimática do sistema antioxidante mostrou-se estar desbalanceada com o estresse, mas mesmo assim não houve peroxidação lipídica durante o processo de desidratação. Portanto, presume-se que a natureza do dano em sementes de *C. xanthocarpa* seja mecânico, devido à intensidade da desidratação, mas que mesmo assim não exclui a tentativa da semente em responder ao estresse. Os danos mecânicos referem-se principalmente à desestruturação física e diminuição da fluidez dos sistemas de membrana durante a desidratação, o que é mais comum de acontecer em sementes que apresentam altas taxas de dessecação. As mudanças nos níveis de poliaminas em sementes de *C. xanthocarpa* indicam que este mecanismo é funcional durante o estresse em sementes sensíveis à dessecação, apresentando potencial para maiores investigações. Portanto, a melhor compreensão do comportamento fisiológico das sementes de *C. xanthocarpa* permite um direcionamento dos esforços para conservação. Ademais, este trabalho fornece bases para ampliarmos a perspectiva das sementes

nativas sensíveis à dessecação, e como o estudo dos podem abranger as possibilidades de comportamentos em seu ecossistema natural.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes. Espermidina. Guabiroba. Peroxidação lipídica. Poliaminas. Myrtaceae. Recalcitrância.

ABSTRACT

Brazil is the most diverse country in terms of tree species and the Brazilian Atlantic Forest is one of the world's biodiversity hotspots, which currently only occupies 15,3% of its original area. Myrtaceae is a representative family in the Atlantic Forest and in southern Brazil *Campomanesia xanthocarpa* is one of the most prominent species. The species has economic potential for Brazilian southern region, but its seeds are desiccation sensitive and not compatible with conventional storage methods. Apparently, desiccation sensitive seeds do not have, or do not express the physiological mechanisms to tolerate water loss without suffering irreversible damages. However, the physiological knowledge concerning desiccation sensitive behavior still has many gaps, as an example, the unknown relation between polyamines and seed desiccation. In this sense, due the abundance of *C. xanthocarpa* fruit and seed production, the species can serve as a model to study the physiological behavior of native seeds and ensure the appropriate conservation efforts. In this sense, *C. xanthocarpa* seeds were removed from fruits and submitted through desiccation and germination tests. The anatomical description was made through optical microscopy and polyamines content was estimated in HPLC, whilst antioxidant enzymatic activity and lipid peroxidation were estimated in spectrophotometer. Due intrinsic morphological features *C. xanthocarpa* seeds had a high drying rate, losing viability and 96% of its initial water content in the first 24 h. After 6h of drying seeds lost 76% of its water content, but there was still no decrease in the germination rate (96%), which only decreased after 12 h (42%) and 24 h (1%). Endogenous polyamine content increased during the desiccation process, mainly driven by spermidine levels. Spermidine content remained stable in the first 6 h and raised until seed viability loss after 24 h. The enzymatic behavior of catalase and ascorbate peroxidase were similar, where they initially dropped, within 12 h started to raise and after 24 h were alike fresh seed values, which indicates unbalanced response if reactive species of oxygen are accumulating. Nevertheless, there was no indicative of lipid peroxidation during seed desiccation, indicating that even with the enzymatic unbalance oxidative damages to membranes were not occurring. Thus, due the intensity of water loss is probable that mechanical damage during dehydration/rehydration could be leading to *C. xanthocarpa* seeds viability loss. Assessing the nature of damage and seeds physiological response during desiccation contributes to the knowledge of behavior and vulnerability of native seeds.

Keywords: Antioxidant enzymes. Guabiroba. Lipid peroxidation. Myrtaceae. Polyamines. Recalcitrance. Spermidine.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Fig. 1- (A) Drying behavior of <i>C. xanthocarpa</i> seeds submitted through air drying and silica drying methods. (B) Drying behavior of <i>C. xanthocarpa</i> seeds during the first 24 hours of air drying and the relation between water content, time, germination and drying rate (k). Drying rate was estimated from the relation between water loss over elapsed time. (C) Germination dynamic of <i>C. xanthocarpa</i> seeds submitted to air drying for 0, 6, 12 and 24 h, which corresponds to WC of 0.684, 0.163, 0.079 and 0.042 g H ₂ O g dw ⁻¹ , respectively. (D) Water content and water potential relationship of whole seeds of <i>C. xanthocarpa</i> that were osmotically dried with polyethylene glycol (PEG 6000).	55
Table 1- Features of <i>C. xanthocarpa</i> seeds during air drying time, water content and water loss in relation to their germination, germination speed index and electrolyte leakage.....	56
Fig. 2- External morphology of whole (A) and longitudinally cut (B) <i>C. xanthocarpa</i> seed. Longitudinal sections of fresh (C, D, E, F) seeds stained with toluidine blue and observed in light microscope.	59
Fig. 3- Longitudinal sections of seed coat (A, B), protoderm (C) and hypocotyl (D, E, F, G) of air dried <i>C. xanthocarpa</i> seeds, stained with toluidine blue and observed in light microscope.	60
Fig. 4- Enzymatic activity of SOD (A), APX (B) and CAT (C), and lipid peroxidation (D) of <i>C. xanthocarpa</i> seeds during air drying and in relation to their germination capacity.	62
Fig. 5- Total polyamines (PAs) (A), free PAs content (B) and ratio between Put/(Spd+Spm) content of <i>C. xanthocarpa</i> seeds during air drying and different water content values.	64
Fig. 6- General physiological and anatomical features of <i>C. xanthocarpa</i> seeds during drying.....	73
Table S1- Correlation values for Pearson's correlation test.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Ácido abscísico
APX – Ascorbato peroxidase
CA – Conteúdo de água
CAT – Catalase
DS – Sensível à dessecação
DT – Tolerante à dessecação
LEA – *Late Embryogenic Abundant proteins*
PAs – Poliaminas
PEG – Polietileno glicol
Put - Putrescina
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SOD – Superóxido dismutase
Spd – Espermidina
Spm – Espermina
WC – *Water content*

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES.....	25
1.1- <i>Campomanesia xanthocarpa</i> (Mart.) O. Berg (Myrtaceae).....	27
1.2- Sementes sensíveis à dessecação.....	30
1.3- Aspectos fisiológicos da sensibilidade à dessecação.....	33
2- OBJETIVOS	39
2.1- Objetivo Geral.....	39
2.2- Objetivos Específicos.....	39
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO ÚNICO	46
Morphophysiological changes in naturally high drying rate seeds of <i>Campomanesia xanthocarpa</i> (Mart.) O. Berg (Myrtaceae).....	47
INTRODUCTION.....	48
MATERIALS AND METHODS.....	50
RESULTS.....	54
DISCUSSION.....	64
ACKNOWLEDGEMENTS.....	74
SUPPLEMENTARY METHODS.....	74
LITERATURE CITED.....	74
3- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	81

1- INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES

O Brasil é detentor da maior diversidade de espécies arbóreas do planeta (BEECH et al. 2017) e a Mata Atlântica brasileira é um dos *hotspots* de biodiversidade no mundo (MYERS et al. 2000). Entretanto, dada à intensa ocupação e intervenção antropogênica ao longo dos séculos, este ecossistema encontra-se extremamente fragmentado, restando apenas 15,3% de sua área original (SOS MATA ATLÂNTICA, 2017). Myrtaceae consiste na terceira maior família de espécies arbóreas do mundo (4330 spp.) e no Brasil abrange 1034 espécies, das quais 710 estão na Mata atlântica (SOBRAL et al. 2015; BEECH et al. 2017). No sul do Brasil Myrtaceae apresenta grande riqueza específica (KLEIN, 1972), e uma das espécies mais abundantes da região é *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg. No estado de Santa Catarina *C. xanthocarpa* é a espécie de Myrtaceae mais comum da Floresta Ombrófila Mista (centro do estado) (VIBRANS et al. 2013), e também com certa representatividade no oeste (Floresta Estacional Semidecidual) e no litoral do estado (Floresta Ombrófila Densa). *C. xanthocarpa* é considerada pelo Ministério do Meio Ambiente como uma das “Plantas para o Futuro” da região sul, havendo a recomendação do incentivo à pesquisa, pois apresenta potencial alimentar, medicinal e ornamental (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004; LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011). No entanto, *C. xanthocarpa* possui sementes sensíveis à dessecação, inviabilizando seu armazenamento e conservação por métodos convencionais, e devido a sua ampla distribuição e abundância de frutos e sementes pode ser utilizada como modelo de estudos sobre comportamento fisiológico de sementes nativas.

Roberts (1973) classificou as sementes de acordo com sua capacidade de serem ou não armazenadas, o que também se refere ao seu comportamento fisiológico de tolerância ou sensibilidade à dessecação. Entretanto, essa classificação dicotômica é um tanto restritiva, e atualmente o comportamento fisiológico vem sendo analisado através de um espectro contínuo de tolerância/sensibilidade à dessecação (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Os mecanismos fisiológicos pelos quais as sementes tolerantes à dessecação (DT) podem permanecer longos períodos de tempo viáveis já foram muito bem estudados (DEKKERS et al. 2015; LEPRINCE et al. 2017). No entanto, segundo Berjak e Pammenter (2013) sementes sensíveis à dessecação (DS) aparentemente não possuem, ou então não expressam os processos e mecanismos necessários para a aquisição da tolerância à dessecação.

A partir do ponto de vista fisiológico, uma vez dispersas as sementes DS começam a desidratar e como consequência seu volume celular diminui. Como consequência isso causa a perda de viabilidade da semente, que pode ocorrer por dano mecânico durante a remoção de água, pelo acúmulo de dano oxidativo ao longo do tempo ou por desnaturação das organelas (UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Sementes DS são metabolicamente ativas e quando expostas ao ambiente seu metabolismo fica desbalanceado, levando à produção de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BERJAK; PAMMENTER, 2008). O acúmulo de ROS pode comprometer a integridade celular ao provocar danos oxidativos em ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, portanto, sistemas antioxidantes são cruciais para manter a homeostase e a integridade funcional da célula (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). Entretanto respostas a estresse em sementes DS podem ser muito variáveis e desbalanceadas, e outros mecanismos fisiológicos de proteção, como as poliaminas (PAs), ainda nem foram estudados em sementes DS. Além de atuar em processos regulatórios de crescimento, o acúmulo de PAs nos tecidos vegetais sinaliza estresse e também pode ter papel de proteção ao estimular a atividade do sistema antioxidante (LIU et al. 2015). Tratamentos de plantas com PAs já são bem sucedidos contra muitos estresses abióticos (GUPTA et al. 2013), mas seu comportamento de resposta em sementes DS ainda é desconhecido e talvez seja um fator a ser considerado para a sensibilidade à dessecação dessas espécies.

Presume-se que a sensibilidade à dessecação evoluiu em espécies de regiões sem tanta sazonalidade, como florestas tropicais e subtropicais, onde não havia tanta pressão seletiva para que as sementes tolerassem a dessecação (MARQUES et al. 2018). Estima-se que 8% de todas as espécies de angiospermas e gimnospermas possuam sementes DS (WYSE; DICKIE, 2017), as quais em ecossistemas tropicais chegam a compor metade da flora (TWEDDLE et al. 2003). A grande maioria das Myrtaceae do neotrópico possuem sementes DS, e a família possui muitas espécies raras ou de dispersão inexpressiva, que segundo Landrum e Kawasaki (1997) estão desaparecendo antes mesmo que se tenha conhecimento básico sobre sua biologia. A exemplo disto, *Campomanesia lundiana* (Kiaersk.) Mattos é atualmente considerada extinta pela *Red List* (IUCN 2018), e provavelmente possuía sementes DS pela proximidade taxonômica com outras espécies que também possuem essa característica. Neste sentido a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) definiu na Estratégia Global para a Conservação de Plantas (GSPC) que 75% das espécies vegetais

ameaçadas devem ser conservadas *ex situ* até 2020. No entanto, como sementes DS não toleram tais formas convencionais de armazenamento, estudos fisiológicos com espécies nativas devem ser aprofundados para contemplar seus comportamentos e exigências.

Tendo em vista o grande contexto fisiológico/conservacionista em relação às sementes DS, estudos acerca do tema são uma demanda imediata para ecossistemas biodiversos e altamente ameaçados. Portanto, devido à ampla distribuição de *C. xanthocarpa* e a grande produção de frutos e sementes, a espécie apresenta potencial como modelo para expandir o conhecimento fisiológico das sementes nativas. Ademais, espécies raras dificilmente vão fornecer quantidade suficiente de sementes para estudos fisiológicos aprofundados, então espécies próximas servem de alternativa para compreensão dos mesmos. Ademais, a elucidação de aspectos totalmente novos para a área, como o comportamento de poliaminas durante a dessecação, também serve para ampliar o contexto fisiológico das sementes DS. Além disso, ao verificar a resposta fisiológica podemos determinar mais precisamente o grau de vulnerabilidade das espécies e então direcionar a elaboração das estratégias de conservação para as mais susceptíveis.

1.1- *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae)

No sul do Brasil Myrtaceae apresenta grande riqueza específica (KLEIN, 1972). *C. xanthocarpa*, mais conhecida por guabiroba, é uma espécie arbórea de 10 a 20 metros de altura que está distribuída pelo planalto meridional dos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, também podendo ocorrer no estado de São Paulo, sul de Minas Gerais, extremo norte do Uruguai, nordeste da Argentina e Paraguai (LEGRAND; KLEIN, 1977). No Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina (2013) *C. xanthocarpa* aparece como uma das Myrtaceae mais comuns do estado, sendo a espécie mais abundante na Floresta Ombrófila Mista e também com certa representatividade na Floresta Estacional Semidecidual (oeste) e Floresta Ombrófila Densa (litoral). O botânico francês Aimé Bonpland (1773-1858) viajou pelo sul do Brasil no meio do século XIX e fez diversas menções em seu diário sobre *C. xanthocarpa* (BONPLAND, 1978), o que sugere que naquela época a espécie também era comumente encontrada, principalmente na floresta de araucária. Bonpland conta que a madeira da espécie era utilizada como lenha para o processo de “sapecada” da erva-mate, e por conta do odor aromático das folhas elas eram misturadas com a erva-mate para ser bebida em infusão. O nome popular guabiroba, gabirola, guavirova ou gavirova, é utilizado para várias outras espécies do gênero

Campomanesia, e sua etimologia tem origem na junção dos termos tupis *wa'bi* (ao comer) e *rob* (amargo), ou seja, “fruto amargo ao comer”. Os frutos de *C. xanthocarpa* são bagas globosas amarelas que apresentam endocarpo suculento, doce e aromático, e seu amargor é proveniente dos óleos presentes no tegumento das sementes. A espécie está incluída no livro “Plantas para o Futuro” do Ministério do Meio Ambiente (LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011), onde é ressaltado o seu potencial econômico para a região Sul do Brasil e recomendando o incentivo à pesquisa. Apesar dos frutos não serem encontrados *in natura* em mercados do sul do país, geleias, doces, sucos, licores e outros derivados podem ser encontrados em feiras regionais. Como exemplo, a família Bellé no interior do estado do Rio Grande do Sul mantém com base no extrativismo e manejo sustentável a produção de polpas concentradas de *C. xanthocarpa*, bem como de outras espécies nativas, e comercializa seus produtos em feiras locais. Nutricionalmente os frutos são promissores como complemento à dieta humana (VALLILO et al. 2008) e representam um importante recurso alimentar para a fauna nativa. A espécie tem potencial para compor pomares nativos, integrar sistemas agroflorestais e suas mudas são comercializadas para uso em paisagismo e para recuperar áreas degradadas (LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011). Ademais, segundo Markman, Bacchi e Kato (2004) a composição das folhas ainda apresenta potencial para fins medicinais.

Portanto, devido à grande importância da família Myrtaceae e a ampla distribuição de *C. xanthocarpa* no sul do Brasil a espécie vem sendo alvo de diversos estudos que abrangem desde fitossociologia até biotecnologia. A descrição completa da espécie encontra-se na Flora Ilustrada Catarinense (LEGRAND; KLEIN, 1977), assim como a chave taxonômica para identificação dentro do grupo. A biologia reprodutiva e o desenvolvimento estrutural dos frutos e sementes de *C. xanthocarpa* foram estudados por Santos et al. (2013), o que pode contribuir para futuros trabalhos de melhoramento genético. Dentre os estudos morfológicos e anatômicos destaca-se Landrum (1982) com o desenvolvimento dos frutos e sementes do gênero *Campomanesia*, e Gogosz et al. (2010) com a germinação e estrutura das plântulas de *C. xanthocarpa*. Landrum (1982) descreve em seu trabalho que as sementes de todas as espécies de *Campomanesia* possuem um tegumento glandular membranáceo característico, que serve para identificação do gênero dentro da família Myrtaceae. No entanto, segundo o autor, o que consideramos como tegumento é na verdade um falso tegumento, pois esta estrutura consiste na parede externa do lóculo do fruto que persiste na semente, sendo aparentemente único em

Myrtaceae e muito difícil de distinguir do verdadeiro tegumento. Ademais, as Myrtaceae neotropicais apresentam uma variedade de embriões que já foi considerada como de grande importância taxonômica (LANDRUM; KAWASAKI, 1997), pois os traços morfológicos das sementes são bem definidos dentre as subtribos da família. Contudo, por mais evidente que esta característica morfológica seja, mostrou-se não ser tão útil atualmente com os avanços das técnicas e estudos moleculares em Myrtaceae (LUCAS et al. 2007). Apesar disso tal variação existe e o embrião de *C. xanthocarpa* pertence ao complexo *Campomanesia*, e consiste em um hipocótilo espiralado volumoso, um feixe central de tecido vascular facilmente distinguível, e dois cotilédones muito menores do que o hipocótilo (LANDRUM; STEVESON, 1986) As reservas energéticas do embrião de *C. xanthocarpa* estão no hipocótilo e os cotilédones são foliáceos, quase vestigiais, idênticos aos eofilos, então podendo ser considerados como paracotilédones segundo Gogosz et al. (2010). Os autores ainda acrescentam que a presença de paracotilédones está relacionada ao rápido crescimento inicial de *C. xanthocarpa* e para uma independência mais rápida das reservas do embrião. Independente da validade de seu caráter taxonômico, a variação morfológica dos embriões das Myrtaceae neotropicais é bem definida e representa a grande diversificação que o grupo sofreu, o que não implica no sucesso de uma estrutura de embrião sobre outra (LANDRUM; STEVESON, 1986), mas pode ser mais investigada.

Estudos sobre germinação de sementes de *C. xanthocarpa* são comuns e há extensa informação na literatura sobre o assunto (SANTOS; FERREIRA; AQUILA, 2004; GOGOSZ et al. 2010; HERZOG; MALAVASI; MALAVASI, 2012; NUNES et al. 2013). Herzog, Malavasi e Malavasi (2012) realizaram testes de germinação com frutos em diferentes estádios de maturação, mostrando que a germinação aumenta conforme o fruto amadurece. Quando os frutos estão maduros as sementes apresentam alta taxa de germinação na faixa de temperatura entre 15°C e 30°C, independente do fotoperíodo e do tipo de substrato (SANTOS; FERREIRA; AQUILA, 2004). Entretanto, apesar de tanta informação sobre a germinação praticamente nenhum trabalho abordou aspectos fisiológicos, tampouco informou que as sementes são DS e não toleram armazenamento em longo prazo. Apenas Nunes et al. (2015) preocuparam-se em realizar testes de germinação com sementes de *C. xanthocarpa* dessecadas e em distintos teores de umidade, e verificaram que vigor, velocidade de germinação e viabilidade diminuem com a decorrente perda de água. Ademais, os

autores ainda tentaram reduzir a sensibilidade à dessecação das sementes de *C. xanthocarpa* com aplicação de polietileno glicol (PEG) e ácido abscísico (ABA), mas as tentativas não foram bem sucedidas. Portanto, devido à abundância na produção de frutos e sementes, *C. xanthocarpa* apresenta potencial para ser utilizada como modelo e aprofundar o conhecimento sobre o comportamento fisiológico de sementes nativas, principalmente com relação à sensibilidade à dessecação.

1.2- Sementes sensíveis à dessecação

Roberts (1973) inicialmente classificou os tipos de semente quanto à sua capacidade de armazenamento. Tal classificação também diz respeito ao seu comportamento fisiológico e à sua tolerância/sensibilidade à dessecação. As definições clássicas que denominavam as sementes em ortodoxas ou recalcitrantes atualmente só são apropriadas para questões técnicas de armazenamento, sendo que para o contexto científico a literatura vem adotando os termos tolerante/sensível à dessecação. Essa classificação dicotômica, independente das formalidades conceituais, se tornou muito restritiva conforme mais estudos se aprofundavam no assunto. A partir disso Ellis, Hong e Roberts (1990) incluíram uma categoria intermediária para *Coffea arabica* L., uma vez que suas sementes apresentavam um comportamento que toleravam a perda de água e armazenamento intermediários em relação às classificações anteriores. Tais categorizações são úteis para questões referentes à conservação *ex situ*, mas podem estar generalizando a realidade de muitos comportamentos. Neste contexto, o comportamento de sementes vem sendo considerado como um espectro contínuo de tolerância/sensibilidade (BERJAK; PAMMENTER, 2008), que abrange sementes altamente, moderadamente e minimamente DS. Os parâmetros utilizados para caracterizar os tipos de sementes são o limite mínimo de água tolerado e os efeitos da temperatura e do tempo durante o armazenamento (WALTERS, 2015). Toda e qualquer semente apresenta um limiar mínimo de conteúdo de água que se ultrapassado afeta diretamente a viabilidade, que para sementes DS o valor deste limiar geralmente é alto. Contudo, classificar as sementes somente pelo seu conteúdo mínimo de água tolerável pode acabar restringindo o comportamento de muitas espécies e levar a interpretações equivocadas, principalmente no âmbito fisiológico, uma vez que o conteúdo de água por si só não é uma medida de intensidade de estresse (WALTERS, 2015).

De acordo com Wyse e Dickie (2017) cerca de 8% de todas as plantas com sementes do mundo são DS, e segundo os autores há uma base taxonômica para determinação desse comportamento, onde sementes de espécies podem ser utilizadas para prever o comportamento de espécies próximas ainda não estudadas. Os autores ainda acrescentam que a sensibilidade à dessecação possui relação com o hábito das espécies, onde menos de 1% das plantas herbáceas apresentam sementes DS, portanto este comportamento ocorre majoritariamente em espécies lenhosas (WYSE; DICKIE, 2017). Ademais, ambientes úmidos e sem muita sazonalidade, como florestas tropicais e subtropicais, possuem maior proporção em sua composição de espécies com sementes DS, enquanto regiões mais áridas e temperadas apresentam predominância de espécies DT (TWEDDLE et al. 2003). O trabalho de Tweddle et al. (2003) verificaram que 46,6% da flora de uma floresta tropical era composta por espécies com sementes DS, e foi um dos primeiros autores a abordar aspectos ecológicos e comportamento de sementes. Resultados similares foram encontrados por Hamilton et al. (2012) em uma floresta tropical na Austrália, onde 42 % das espécies possuíam sementes DS. Para o Brasil, foi verificado que 60% de 162 espécies da Mata Atlântica possuem sementes DS (de SOUZA et al. 2015). Apesar de não existirem estudos oficiais, todas ou a grande maioria das Myrtaceae neotropicais possuem sementes DS, o que pode ser tanto pela questão taxonômica ou pelo tipo de ambiente que a família tende a ocupar. Portanto, devido à grande diversidade de espécies nos ecossistemas tropicais, mais estudos devem ser realizados a fim de contemplar o maior número de espécies possíveis, e assim verificar a real vulnerabilidade desses ambientes e aumentar o esforço para conservação dos mesmos.

Por ocorrerem em ambientes de clima ameno, úmidos e relativamente previsíveis, as espécies DS podem ter sofrido menor pressão seletiva por parte de seus ambientes, o que levou à perda da tolerância à dessecação ao longo do tempo evolutivo (MARQUES et al. 2018). De acordo com Marques et al. (2018) espécies com sementes DS são geralmente árvores longevas de grande porte, tolerantes à sombra, geralmente dispersam suas sementes nas épocas de maior precipitação, e como as sementes não tem a capacidade de persistir no solo germinam rapidamente para formar bancos de plântulas e garantir sucesso no recrutamento. Contudo, todos esses traços ecológicos das sementes DS fazem com que estas espécies sejam mais susceptíveis a mudanças no clima e à fragmentação ambiental. Lôbo et al (2011) verificaram que uma região de Mata Atlântica em regeneração no nordeste do Brasil apresentou uma composição florística totalmente distinta da original,

principalmente por conta da ausência de espécies DS, o que levou à uma homogeneização biótica de espécies pioneiras com sementes DT. Apesar de toda a relevância do contexto ecológico, muitas sementes DS são de importância econômica como cítricos (*Citrus* spp.), café (*C. arabica*), cacau (*Theobroma cacao* L.), manga (*Mangifera indica* L.), mamão (*Carica papaya* L.), abacate (*Persea americana* Mill.), seringueira (*Hevea brasiliensis* L.), canela (*Cinnamomum verum* J.Presl), o chá (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), e regionalmente a araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). Uma vez que estas sementes não podem ser conservadas por métodos convencionais de armazenamento há um grande incentivo para o desenvolvimento de procedimentos que possibilitem conservação *ex situ* das espécies, tanto no contexto ecológico, quanto no econômico. Neste sentido, a Estratégia Global para a Conservação de Plantas (GSPC) da Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) define em uma de suas metas que 75% das espécies vegetais ameaçadas devem ser conservadas *ex situ* até 2020. Muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de compreender melhor os mecanismos fisiológicos das sementes DS, e assim tentar prolongar o armazenamento. No entanto, sementes DS possuem comportamentos muito variáveis, e atualmente a criopreservação é vista como a única opção para conservação em longo prazo do germoplasma de sementes DS (GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013).

Sementes DT passam pelas mudanças necessárias para a aquisição da tolerância durante o fim da maturação, ao contrário das sementes DS (BERJAK; PAMMENTER, 2013). Portanto, sementes DS não possuem, ou então não expressam corretamente os processos necessários para tolerar a perda de água (BERJAK; PAMMENTER, 2013). Barbedo, Centeno e Ribeiro (2013) questionam se sementes DS realmente existem, pois segundo os autores elas são dispersas ainda “imaturas”, portanto se permanecessem por mais tempo na planta mãe completariam seu desenvolvimento. Neste contexto os autores argumentam que submeter sementes DS a algum tipo de tratamento após a colheita pode prolongar sua tolerância e armazenamento. Entretanto, nas sementes DS o controle genético e fisiológico das respostas ao estresse ainda não são muito compreendidos, e o que faz o comportamento ser muito variável. Apesar de todos os esforços de para de induzir a tolerância à dessecação em sementes DS, Walters (2015) convenientemente argumenta que a dessecação nessas sementes pode ser evitada, mas não tolerada.

1.3- Aspectos fisiológicos da sensibilidade à dessecação

A tolerância à dessecação pode ser entendida como a habilidade de sobreviver à remoção de todo, ou quase todo, conteúdo de água intracelular sem que ocorram danos irreversíveis (LEPRINCE; BUITINK, 2010). Portanto, a diferença entre o comportamento tolerante/sensível é reflexo da atuação, ou não, de mecanismos fisiológicos de proteção, que em última análise são os responsáveis por manter a viabilidade da semente. Sementes DT dispõem uma gama de mecanismos para proteger suas células e tecidos durante o processo de remoção de água, e seus aspectos fisiológicos são amplamente estudados e relativamente bem compreendidos (DEKKERS et al. 2015; LEPRINCE et al. 2017). Durante o final da embriogênese sementes DT passam por um período de maturação caracterizado pelo aumento no nível endógeno de ABA. O acúmulo de ABA induz uma série de processos fisiológicos que reduzem a atividade metabólica e o conteúdo de água da semente, e promove a acumulação de substâncias de reserva, condensação da cromatina e a produção de grupos de proteínas relacionados com a tolerância à dessecação, como as *Late Embryogenesis Abundant* (LEAs) (LEPRINCE et al 2017).

As LEAs em tradução literal são “proteínas abundantes na embriogênese tardia”, e desempenham um papel importante para a tolerância à dessecação em muitos organismos como bactérias, leveduras, musgos, sementes e nematódeos (LEPRINCE; BUITINK, 2010). As LEAs constituem um grande grupo de proteínas hidrofílicas termoestáveis que durante a diminuição do conteúdo de água reagem sinergicamente com carboidratos solúveis, atuando na osmoproteção condensando o DNA, estabilizando o citoesqueleto, as membranas e proteínas, e atuando na regulação da atividade antioxidante e sequestro de íons (TUNNAcliffe; WISE, 2007). Segundo Leprince e Buitink (2010), a acumulação de LEAs também tem efeito indireto na acumulação de outras moléculas protetoras, seja por alterações do ajuste osmótico ou na indução de outras vias de sinalização. As desidrinas constituem um grupo específico de LEAs caracterizadas pela sua multifuncionalidade e alta hidrofília, estando presente em quase todos tecidos vegetais. Mesmo que certas desidrinas estejam constitutivamente presentes nos órgãos das plantas, elas são altamente expressas após algum estresse hídrico, como em condições de frio, seca, alta salinidade ou após a aplicação de ABA (ERIKSSON; HARRYSON, 2011). As desidrinas não possuem estrutura tridimensional definida e ganham forma quando entram em contato com seu ligante durante o estresse hídrico, formando associações coesivas na superfície do seu

alvo preenchendo as lacunas expostas em sua arquitetura (HARA, 2010). Subgrupos de desidrinas específicos de sementes podem estar presentes em algumas espécies enquanto que ausentes em outras, onde a maioria dos genes de LEAs específicos de sementes presentes em espécies DT está ausente ou reduzido em sementes DS (DELAHAIE et al. 2013). No entanto, sementes DS podem acumular altos níveis de desidrinas não-específicas de sementes em seus cotilédones (DELAHAIE et al. 2013), mas apesar disso seu papel nessas sementes é contraditório, e não se pode afirmar que a sensibilidade à dessecação seja exclusivamente devido à acumulação insuficiente de desidrinas específicas, pois inúmeros outros fatores também estão envolvidos.

Carboidratos também desempenham um importante papel na proteção de membranas durante o estresse hídrico, pois mediante a interação com certas proteínas induzem a vitrificação do citoplasma e a estabilização das membranas (BERJAK; PAMMENTER, 2013). O acúmulo de carboidratos e de outras substâncias de reserva, como lipídeos e proteínas, ocorre devido ao aumento de ABA durante a fase final da embriogênese. Como sementes DS tipicamente não passam pelas mesmas fases de maturação que sementes DT, elas geralmente possuem como reserva carboidratos simples, como a sacarose, que é encontrada em quantidades muito superiores a de monossacarídeos e de oligossacarídeos (OBROUCHEVA; SINKEVICH; LITYAGINA, 2016). Em termos de mobilização de reserva a sacarose é considerada uma molécula de rápida conversão, o que reflete na estratégia de germinação das sementes recalcitrantes. Contudo, carboidratos mais complexos, como os oligossacarídeos, tem a capacidade de tamponar a viscosidade do citoplasma durante a desidratação e reidratação, providenciando assim uma maior estabilidade para as estruturas celulares (BERJAK; PAMMENTER, 2013). Tais carboidratos mais complexos estão em maior proporção nas sementes que toleram dessecação e, portanto, o balanço dessa proporção pode servir para detecção de maior ou menor susceptibilidade entre espécies. Ademais, sementes DT possuem grande quantidade de matéria seca como reserva em suas células, que ocupam praticamente todo o volume intracelular, enquanto que as células de sementes DS, por serem metabolicamente ativas, são caracterizadas pelo grande número de vacúolos (FARRANT et al. 1997). A presença de matéria seca no interior das células de sementes DT tampona a redução do volume celular durante a desidratação, o que acaba protegendo estruturalmente a célula (WALTERS; KOSTER, 2007). No entanto, a alta vacuolização das células DS permite que o volume celular mude abruptamente durante a

perda de água, fusionando os sistemas de membrana e levando à desestruturação dos mesmos durante a reidratação (WALTERS; KOSTER, 2007).

A progressiva perda de água e consequente diminuição do volume celular aumenta a eficiência das associações entre as moléculas, eventualmente imobilizando-as e, a partir de um determinado momento, a quase ausência de água faz com que a matriz celular entre em um estágio viscoso, chamado de vitrificado (WALTERS, 2015). Como consequência, a menor fluidez do citoplasma provoca o declínio da capacidade metabólica da célula e limita a migração de radicais livres e ROS (BERJAK; PAMMENTER, 2013). A relativa estabilidade celular provida pela vitrificação é um dos mecanismos pelo qual sementes DT mantêm a viabilidade com baixos teores de água (embora não indefinidamente) (BERJAK; PAMMENTER, 2008). De acordo com Walters (2015), a formação do estágio vitrificado é inevitável, seja a espécie tolerante ou intolerante à dessecação, mas a expressão de diferentes proteínas e açúcares entre as espécies é que determinam a qualidade da vitrificação e o tempo de sobrevivência da semente. A autora ainda acrescenta que a sacarose não é considerada um carboidrato eficiente na osmoproteção, pois induz a formação de um estágio vítreo frágil, fato que contribui ainda mais para a sensibilidade à dessecação.

A taxa de desidratação de uma semente é influenciada pelo seu tamanho, pela natureza do seu revestimento e pelo seu estágio de desenvolvimento (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Considerando uma semente íntegra, o processo de perda de água pode ocorrer de maneira desigual entre seus órgãos (BERJAK; PAMMENTER, 2013). Geralmente o eixo embrionário constitui apenas uma pequena proporção do volume total da semente (BERJAK; PAMMENTER, 2008), e foi verificado que os cotilédones podem protegê-lo mediante a expressão de desidrinas não específicas (DELAHAIE et al. 2013). Farrant et al. (1997) argumentam que os órgãos de uma mesma semente podem divergir quanto a tolerância à dessecação, uma vez que tecidos distintos apresentam características que indicam maior ou menor sensibilidade. Outro fator que influencia a viabilidade é a velocidade em que ocorre a desidratação (lenta ou rápida). A desidratação lenta faz com que as células fiquem em estágios intermediários por mais tempo e, como são metabolicamente ativas, ocorre um acúmulo de danos oxidativos relacionados ao metabolismo durante esse período (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Portanto, a desidratação rápida é uma das estratégias empregadas para que sementes DS tolerem teores de água mais baixos sem perder a viabilidade.

Segundo Umarani, Aadhavan e Faisal (2015) sementes DS podem perder a viabilidade por três causas básicas, dano mecânico durante a desidratação/reidratação dos tecidos, acúmulo de dano metabólico ao longo do tempo, ou desnaturação macromolecular. Durante a desidratação a bicamada lipídica da membrana se estreita com a perda de água e faz com que seus constituintes segreguem-se lateralmente em regiões particulares de classes lipídicas ou proteicas (WALTERS et al. 2002), fazendo com que o estado cristalino líquido da membrana passe para um estado de gel menos fluido. Ademais, a redução do volume celular pode fazer com que seus constituintes se reorganizem e passem a associar-se entre si, o que pode levar a fusão dos sistemas de membrana e perda da compartimentalização intracelular (WALTERS, 2015). A partir do momento em que ocorre a reidratação dos tecidos durante a embebição da semente, a água entra na célula antes que a membrana consiga se reverter para o estado líquido cristalino, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular e à morte da célula por dano mecânico (BEWLEY; BRADFORD; HILLHORST, 2012). Vacúolos e outras organelas que eventualmente se fundiram com as membranas igualmente sofrem este dano e extravasam seu conteúdo. Além disso, a remoção de água das células também pode danificar a capacidade dos microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto em se reorganizar, comprometendo então a estruturação dos componentes intracelulares e a sobrevivência da célula (UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015).

Sementes DS são metabolicamente ativas quando dispersas, então a partir do momento em que começam a perder água seu metabolismo fica desbalanceado e leva à produção de radicais livres e de ROS (BERJAK; PAMMENTER, 2008). A produção de ROS é uma consequência inevitável em qualquer respiração aeróbica e são continuamente geradas em mitocôndrias e glioxissomos como produtos secundários de várias rotas metabólicas (GILL; TUTEJA, 2010). Em baixas concentrações ROS atuam como mensageiros secundários e estão envolvidas com o desenvolvimento e crescimento dos tecidos vegetais, mas seu acúmulo pode causar danos em ácidos nucleicos, oxidação de proteínas e peroxidação de lipídeos, levando à perda da viabilidade em sementes DS (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). As principais ROS produzidas são os radicais superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^\bullet). Sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos precisam estar funcionando para minimizar os efeitos adversos do acúmulo de ROS e então garantir a integridade celular (BERJAK; PAMMENTER, 2013). As principais

enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), presente em todos compartimentos intracelulares e que catalisa o O_2^- em H_2O_2 ; a catalase (CAT), presente em glioxissomos e dismuta H_2O_2 em água e oxigênio; e a ascorbato peroxidase (APX), que possui ao menos cinco isoformas espalhadas pela célula tem alta afinidade com o H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010). Contudo, os mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse em sementes DS são muito variáveis, e o dano metabólico decorrente do acúmulo de ROS provavelmente ocorre ao longo do tempo, sendo a maior causa de perda de viabilidade (UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Os mecanismos enzimáticos antioxidantes em sementes DS muitas vezes não respondem ao aumento nos níveis de ROS intracelular e contribuem para maior sensibilidade à dessecação (CHENG; SONG, 2008). Segundo Umarani, Aadhavan e Faisal (2015) temperaturas baixas são muito mais efetivas para reduzir e minimizar a atividade metabólica da semente DS do que somente alterar o conteúdo de água. Por fim, a última categoria de perda de viabilidade mencionada pelo autor, apesar de não ser muito frequente na literatura, é a desnaturação macromolecular de organelas, as quais já são diferenciadas em sementes DS, e se desnaturam em decorrência do estresse imposto pela dessecação, ficando permanentemente danificadas e comprometendo o funcionamento celular.

Estudos para reduzir a sensibilidade à dessecação de sementes vêm sendo desenvolvidos, mas devido à complexidade dos mecanismos fisiológicos envolvidos as técnicas nem sempre são muito bem sucedidas. Dresch et al. (2017) e Nunes et al. (2015) fizeram tentativas em sementes de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg e *C. xanthocarpa*, respectivamente, para induzir certa tolerância à dessecação, e submeteram as sementes a condicionamento osmótico com PEG e tratamento com ABA. Os trabalhos mostraram que as sementes de *C. adamantium* submetidas ao condicionamento osmótico e sem ABA obtiveram certo sucesso na redução da sensibilidade, enquanto que para *C. xanthocarpa* nenhuma tentativa foi bem sucedida. O hormônio ABA é elemento chave em muitas respostas adaptativas a estresses ambientais, mas também, em sementes possui papel central na última fase de desenvolvimento, estando envolvido com a aquisição da tolerância à dessecação. Durante a germinação qualquer semente, seja DT ou DS, se torna sensível à dessecação, e Maia et al. (2014) conseguiram via aplicação de ABA reestabelecer a DT em sementes germinadas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., o que pode contribuir para a elucidação dos mecanismos genéticos envolvidos. Mesmo que para o caso de *C. adamantium* aparentemente houve relativo sucesso,

quando o mesmo tratamento bem sucedido foi aplicado em outra espécie relativamente próxima não surtiu efeito algum, e os resultados entre os tratamentos da própria *C. adamantium* são muito variados e só reforça a complexidade dos fatores fisiológicos envolvidos com a diminuição da sensibilidade de sementes DS.

Neste contexto de elaboração de técnicas para melhorar a resposta dos tecidos vegetais ao estresse muitos estudos vêm utilizando a aplicação de poliaminas (PAs), o que tem mostrado potencial para utilização em plantas cultivadas e na biotecnologia (TIBURCIO; ALCÁZAR, 2018). Poliaminas são pequenas moléculas policatiônicas derivadas de aminoácidos que contêm dois ou mais grupos amina e possuem papel regulatório em muitos processos fisiológicos, incluindo na organogênese, embriogênese, crescimento do tubo polínico, desenvolvimento de frutos e na resposta a estresses bióticos e abióticos (TIBURCIO et al. 2014). São três os tipos mais comuns de PAs, putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm), sendo que a Put é precursora obrigatória das outras duas e os três tipos podem ser interconvertidos entre si. A rota metabólica das PAs é um caminho de passagem para a interação com outros metabólitos, incluindo compostos de proteção ao estresse, hormônios e moléculas de sinalização (ALCÁZAR et al. 2010). Gupta, Dey e Gupta (2013) compilam em sua revisão o papel das PAs contra estresses abióticos de temperatura, salinidade, seca, oxidativo e mecânico. A acumulação de PAs é indicativa de estresse e geralmente apenas um tipo está envolvido, e seu papel de proteção ocorre devido à sua capacidade de ligar-se a proteínas, ácidos nucleicos e membranas (TIBURCIO et al. 2014). Entretanto, estudos recentes mostram que o papel de proteção conferido pelas PAs está mais associado à sua capacidade de modulação dos sistemas antioxidantes (LIU et al. 2015). Tendo em vista que as PAs podem estimular a atividade do sistema antioxidante, elas exercem um papel indireto na eliminação de ROS e, portanto, podem desempenhar algum efeito potencial para utilização em sementes DS. Entretanto, a grande maioria dos estudos com aplicação de PAs é com plantas ou plântulas, e quando abordam sementes refere-se à sua utilização como *priming* para ampliar o vigor da germinação. O processo de *priming* consiste em pré embeber as sementes em uma determinada solução durante um período de tempo que permita sua hidratação parcial, sem que ocorra a protrusão da radícula, induzindo a iniciação de muitos processos fisiológicos que podem auxiliar a manter o vigor da semente em situações de estresse (TIBURCIO; ALCÁZAR, 2018). Porém, dos muitos trabalhos que existem com PAs e sementes apenas um as relaciona com sementes DS

(PIERUZZI et al. 2011), mas aborda somente o comportamento endógeno das PAs durante a germinação de duas espécies DS. Ademais, ainda não se sabe como é o comportamento de PAs em sementes DS submetidas à dessecação, pois não existe nenhum estudo referente a esse assunto. Portanto, mais estudos nesse sentido devem ser feitos com o intuito de ampliar o conhecimento fisiológico sobre as sementes DS e verificar se as PAs tem alguma relação com a sensibilidade à dessecação em sementes, além de propor novas estratégias que possibilitem reduzir à sensibilidade dessas espécies.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Estudar o comportamento fisiológico das sementes de *C. xanthocarpa* baseando-se nas mudanças morfofisiológicas relacionadas com a sensibilidade à dessecação.

2.2- Objetivos Específicos

- Estudar o comportamento, germinação e a qualidade fisiológica de sementes de *C. xanthocarpa* submetidas à dessecação;
- Caracterizar anatomicamente as sementes de *C. xanthocarpa* durante a dessecação;
- Estimar o comportamento endógeno de poliaminas em sementes de *C. xanthocarpa* submetidas à dessecação;
- Verificar a resposta do sistema enzimático antioxidante e a peroxidação lipídica em sementes de *C. xanthocarpa* submetidas à dessecação;
- Definir o comportamento fisiológico e o grau de vulnerabilidade de sementes de *C. xanthocarpa* à dessecação.

REFERÊNCIAS

ALCÁZAR, Rubén et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta**, v. 231, n. 6, p. 1237-1249, 2010.

BAILLY, Christophe; EL-MAAROUF-BOUTEAU, Hayat; CORBINEAU, Françoise. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes rendus biologiques**, v. 331, n. 10, p. 806-814, 2008.

BARBEDO, Claudio José; CENTENO, Danilo da Cruz; RIBEIRO, Rita de Cássia Leone Figueiredo. Do recalcitrant seeds really exist?. **Hoehnea**, v. 40, n. 4, p. 583-593, 2013.

BEECH, E. et al. GlobalTreeSearch: The first complete global database of tree species and country distributions. **Journal of Sustainable Forestry**, v. 36, n. 5, p. 454-489, 2017.

BERJAK, Patricia; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of botany**, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2007.

BERJAK, Patricia; PAMMENTER, Norman. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 478, 2013.

BEWLEY, J. Derek et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer Science & Business Media, 2012.

BONPLAND, Aimé; LOURTEIG, Alicia. **Journal, voyage de Sn. Borja a La Cierra y a Porto Alegre**. Instituto de Biociências, Departamento de Botanica, 1978.

CHENG, Hong-Yan; SONG, Song-Quan. Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensitivity of Antiaris toxicaria seeds and axes. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 12, p. 1549-1556, 2008.

DEKKERS, Bas JW et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.

DELAHAIE, Julien et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4559-4573, 2013.

DE SOUZA, Thaysi Ventura et al. Seed dormancy in tree species of the Tropical Brazilian Atlantic Forest and its relationships with seed traits and environmental conditions. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 243-264, 2015.

DRESCH, Daiane Mugnol et al. Reduced Sensitivity of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg Seeds to Desiccation: Effects of Polyethylene Glycol and Abscisic Acid. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 10, p. 2501, 2017.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, 1990.

ERIKSSON, Sylvia K.; HARRYSON, Pia. Dehydrins: molecular biology, structure and function. In: **Plant Desiccation Tolerance**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 289-305.

FARRANT, Jill M. et al. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, v. 7, n. 2, p. 135-144, 1997.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GOGOSZ, Alessandra Mara et al. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 24, n. 3, p. 613-623, 2010.

GONZALEZ-ARNAO, Maria Teresa; ENGELMANN, Florent (Ed.). **Criocconservation de plantas en America Latina y el Caribe**. Instituto Interamericano de Cooperation para la Agricultura., 2013.

GUPTA, Kamala; DEY, Abhijit; GUPTA, Bhaskar. Plant polyamines in abiotic stress responses. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 7, p. 2015-2036, 2013.

HAMILTON, Kim N. et al. A comparative study of seed morphology in relation to desiccation tolerance and other physiological responses in 71 Eastern Australian rainforest species. **Plant Species Biology**, v. 28, n. 1, p. 51-62, 2013.

HARA, Masakazu. The multifunctionality of dehydrins: an overview. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 5, p. 503-508, 2010.

MICHELON HERZOG, Neusa Francisca; DE MATOS MALAVASI, Marlene; CONTRO MALAVASI, Ubirajara. Morfometria dos frutos e germinação de sementes de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 4, 2012.

KLEIN, Roberto M. Árvores nativas da floresta subtropical do Alto Uruguai. **Sellowia**, 1972.

LANDRUM, Leslie R. The development of the fruits and seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittonia**, v. 34, n. 2, p. 220-224, 1982.

LANDRUM, Leslie R.; STEVENSON, Dennis. Variability of embryos in subtribe Myrtinae (Myrtaceae). **Systematic Botany**, p. 155-162, 1986.

LANDRUM, Leslie R.; KAWASAKI, Maria Lúcia. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LEGRAND, Carlos D.; KLEIN, Roberto M. Myrtaceae. **Flora Illustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, SC. Brasil**, 1977.

LEPRINCE, Olivier; BUITINK, Julia. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 554-564, 2010.

LEPRINCE, Olivier et al. Late seed maturation: drying without dying. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 4, p. 827-841, 2017.

LISBÔA, G.N.; KINUPP, V.F.; BARROS, I.B.I. *Campomanesia xanthocarpa* In: VIEIRA, R.F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (eds.) **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região sul**. Brasília: MMA, 2011, p. 159-162.

LIU, Ji-Hong et al. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 827, 2015.

LÔBO, Diele et al. Forest fragmentation drives Atlantic forest of northeastern Brazil to biotic homogenization. **Diversity and Distributions**, v. 17, n. 2, p. 287-296, 2011.

LUCAS, Eve J. et al. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon**, v. 56, n. 4, p. 1105-1128, 2007.

MAIA, Julio et al. Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 81-93, 2014.

MARKMAN, Blanca Elena Ortega; BACCHI, Elfriede Marianne; KATO, Edna Tomiko Myiake. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

MARQUES, Alexandre et al. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 11, p. 1083-1095, 2018.

MYERS, Norman et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853, 2000.

NUNES, D. P. et al. Drying and reduction in sensitivity to desiccation of *Campomanesia xanthocarpa* seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 30, p. 2859-2865, 2015.

OBROUCHEVA, Natalie; SINKEVICH, Irina; LITYAGINA, Snejana. Physiological aspects of seed recalcitrance: a case study on the tree *Aesculus hippocastanum*. **Tree physiology**, v. 36, n. 9, p. 1127-1150, 2016.

PIERUZZI, Fernanda P. et al. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals of botany**, v. 108, n. 2, p. 337-345, 2011.

ROBERTS, Eric H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.

SANTOS, Cristina Magalhães Ribas dos et al. Desenvolvimento estrutural associado à biologia reprodutiva de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae). 2013.

DOS SANTOS, Cristina Magalhães Ribas; FERREIRA, Alfredo Gui; ÁQUILA, Maria Estefânia Alves. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 2, p. 13-20, 2004.

SOBRAL, M. et al. *Myrtaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10307>>.

SOS MATA ATLÂNTICA. Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **São Paulo**, 2017.

TIBURCIO, Antonio F.; ALCÁZAR, Rubén. Potential Applications of Polyamines in Agriculture and Plant Biotechnology. In: **Polyamines**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 489-508.

TIBURCIO, Antonio F. et al. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. **Planta**, v. 240, n. 1, p. 1-18, 2014.

TWEDDLE, John C. et al. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of ecology**, v. 91, n. 2, p. 294-304, 2003.

UMARANI, R.; AADHAVAN, E. Kanthaiya; FAISAL, M. Mohamed. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. **Current Science**, p. 2023-2034, 2015.

VALLILO, Maria Isabel et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, 2008.

VIBRANS, Alexander C. et al. Inventário florístico florestal de Santa Catarina (IFFSC). **Floresta Ombrófila Mista. Blumenau: Editora FURB**, 2013.

WALTERS, Christina. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, v. 242, n. 2, p. 397-406, 2015.

WALTERS, Cristina; et al. (2002) Desiccation stress and damage. In: Black M, Pritchard H.W. (eds.) **Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying**. CAB International, Wallingford, 2002, p. 263–291.

WALTERS, Christina; KOSTER, Karen L. **Structural dynamics and desiccation damage in plant reproductive organs**. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 2007.

World Conservation Monitoring Centre 1998. *Campomanesia lundiana*. **The IUCN Red List of Threatened Species** 1998: e.T35330A9927286. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T35330A9927286.en>. Downloaded on 16 October 2018.

WYSE, Sarah V.; DICKIE, John B. Predicting the global incidence of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, v. 105, n. 4, p. 1082-1093, 2017.

CAPÍTULO ÚNICO

Morphophysiological changes in naturally high drying rate seeds of *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae)

Morphophysiological changes in naturally high drying rate seeds of *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae)

ABSTRACT

Desiccation sensitive (DS) seeds are a major concern for *ex situ* conservation efforts. Although major physiological responses to stress are shared DS seeds responses can be highly variable. There is a lack of studies concerning endogenous polyamines and desiccation, whilst for DS seeds there is literally no evidence of how it may behave. *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg is a tree commonly found in the Brazilian Atlantic Forest that has potential as model for seed physiological behavior studies of native DS species. Seeds of *C. xanthocarpa* were desiccated and went through germination tests, histological analysis, and estimation of antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and polyamines content. Due to inherent morphological features, *C. xanthocarpa* seeds have a high drying rate and lose viability in 24 hours. During the first 6 h 76% of initial water content is lost but 96% of the seeds still germinate. Spermidine levels increased after 12 h as a response to stress when germination already declined to half. The activity of antioxidant enzymes reduced and remained in low activity along the whole drying process, and there were no signs of lipid peroxidation. Besides the increase in spermidine content, seed viability was lost, which suggest that damages superposed polyamines protective role. Thus, it is likely that mechanical damage led viability loss, due the intensity of seed water loss. Assessing the nature of damage and physiological response mechanisms to stress contribute to the knowledge of tropical seed behavior and species vulnerability.

KEY WORDS antioxidant enzymes; lipid peroxidation; polyamines; spermidine; recalcitrant.

INTRODUCTION

The global strategies for plant conservation (GSPC) place plants with desiccation sensitive seeds as a major concern to *ex situ* conservation efforts (CBD 2012). Seeds have been traditionally classified as their desiccation tolerance (DT) or desiccation sensitivity (DS) based in storage capacity and thresholds of water content (WC) without suffering considerable viability losses (Roberts 1973). Intermediate seeds are found in between these two contrasting behaviors (Ellis et al. 1990), since they tolerate further drying and storage than DS, but not as DT seeds. These categories are useful for storage purposes, but classifying seeds merely on WC threshold may lead to physiological misinterpretations, as it is not a measure of stress intensity (Walters 2015). Nonetheless, as more studies are heading this topic, the context of seed physiological behavior is now being considered in a perspective of a continuous spectrum of desiccation tolerance/sensitivity (Berjak and Pammenter 2008). Although major physiological responses against desiccation stress are shared among plant organs (Farrant and Moore 2011), unusual DS seed behaviors are emerging and suggest that each species may have its own relation to the environment and respond in its own way against stresses. Therefore, superficial inferences may generalize the wider scope and it is necessary looking at seed physiological behaviors as tendencies within the spectrum of tolerance, rather than merely assuming differences in kind or degree between them.

The physiological and ecological strategies of DT seeds are relatively well studied and understood (Dekkers et al. 2015, Leprince et al. 2017), including in the climate change context (Walck et al. 2011). On the other hand, only recently researchers started surveying deeper about the ecophysiological aspects of DS behaviors. High WC and metabolic activity are one of the main physiological features that comprise DS seeds. It is suggested that they may lose viability due three general causes, mechanical damage during water loss and rehydration, metabolism-induced damage along time, and macromolecular denaturation (Umarani et al. 2015). Once shed and exposed to the environment intracellular water is lost and either cellular membranes collapse during water movement or the unregulated production of reactive species of oxygen (ROS) compromises cell integrity over time. In this sense, physiological protective mechanisms are determinant to maintain viability, but DS seeds constitution and responses to stress are

usually highly variable or, in the latter case, even absent (Berjak & Pammenter 2013). In this context, polyamines (PAs) are small polycationic molecules that play important roles in many physiological processes, once they interact to hormones and regulate plant growth and development, and also accumulate as a signal and/or protection against abiotic stresses (Tiburcio et al. 2014). Since PAs stimulate the activity of antioxidant enzymes they may also have an indirect role in scavenging ROS and maintaining cellular homeostasis along the desiccation process. Additionally, exogenous PAs are being successfully used in seeds for biotechnological purposes to enhance water stress tolerance during germination (Tiburcio and Alcázar 2018). However, there are literally no studies concerning PAs behavior during DS seeds desiccation, and investigating this process may provide new physiological information and broad the perspective of perception and response of DS seeds to stress.

In terms of conservation, it is important take into account that DS seeds comprise almost half of the tree species in tropical and subtropical evergreen rainforests and 8% of total world's seed plants (Tweddle et al. 2003, Wyse and Dickie 2017). Due the relative predictive seasons of their environments DS seeds is thought to have suffered lower selective pressures (Marques et al. 2018), which make them more susceptible to climate changes. Thus, the seed physiological behavior spectrum must be assessed from broader perspective so that it can be compatible with the *in situ* and *ex situ* conservation demands of each species. The Brazilian Atlantic Forest is a biodiversity hotspot that is characterized by a great number of DS seeds species (de Souza et al. 2015), especially in later successional stages, nevertheless it is currently highly fragmented and threatened by anthropogenic activities. Myrtaceae is one of the most representative tree families (710 species) in the Atlantic Forest and has a great number of endemic species (BFG 2015), which most of them produces DS seeds, but many of these species are disappearing before we even get to know them (Landrum and Kawasaki 1997).

In this context, *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, popularly known as guabiroba, is an abundant Myrtaceae tree found in the Southern Brazilian Atlantic Forest. Some species of *Campomanesia* are rare and there is an already extinct species, *Campomanesia lundiana* (Kiaersk.) Mattos (IUCN 2018). *C. xanthocarpa* is zoochoric, exhibit DS seeds and has economic potential for food, medicinal and ornamental purposes (Lisbôa et al. 2011). Attempts tried to reduce the DS behavior of seeds, but they were unsuccessful (Nunes et al. 2015).

Moreover, the ecological and evolutionary context of this species could represent a biological model to understand seed physiological behavior related to desiccation tolerance, looking to improve the knowledge about the spectrum of DS seeds of tropical ecosystems. Seed viability and the success of seedling establishment could be explained by the physiological responses of seeds to the desiccation process. Thus, the physiological behavior context of the seed desiccation process could supply additional information about viability loss, vulnerability and conservation of related species.

In this sense, our work aimed to study the physiological behavior of *C. xanthocarpa* seeds during the dehydration process to broad the context of tropical DS seeds. We showed the relation between seed dehydration rate and morphophysiological alterations which allow us to assess seed viability, nature of damage and stress degree. In addition, the relation of polyamines and antioxidant enzymatic defense with seed viability was here discussed addressing to the metabolic and mechanic damage over seed dehydration. Our study showed seed physiological behavior of native species from Brazilian Atlantic Forest, which is crucial to ensure the conservation of many threatened or potential threatened species as well to head *in situ* and *ex situ* conservation efforts.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Mature fruits of *C. xanthocarpa* were harvested from a parent plants population in January 2018 in the central region of southern Brazil, at the Santa Catarina state (S 27°36'74", W 50°56'87"). After harvested, fruits were transferred to the Plant Physiology Laboratory at the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/Brazil, and stored under refrigeration before experimentation. Due the nature of their desiccation behavior, seeds had to be immediately submitted through the planned experiments after being extracted from the fruits.

Seed WC

WC of seeds was determined gravimetrically by difference in weight before and after drying four replicates of 30 fresh seeds at $105 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 hours (Brasil 2009). WC value was expressed in dry basis ($\text{g H}_2\text{O g dw}^{-1}$).

Seed drying

Fresh seeds were submitted through two drying methods: air drying (AD) and silica drying (SD). For AD four replicates of 25 fresh seeds were incubated at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ (55%-65% RH), while SD was carried out with four replicates of 25 fresh seeds in sealed plastic containers with dry silica at $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Replicates were measured gravimetrically every hour during the first 12 hours and then every 12 hours. Values were transformed in dry basis ($\text{g H}_2\text{O g dw}^{-1}$) according to the WC estimation of the seed batch. Seed drying rate index (k) was calculated from the amount of water loss in dry basis ($\text{g H}_2\text{O g dw}^{-1}$) divided by correspondent elapsed time in hours.

Germination test

Four replicates of 30 seeds were disinfested for 30 seconds in ethylic alcohol 70° GL, 2 minutes in commercial sodium hypochlorite (0.5% v/v) and rinsed three times in sterile distilled water. Seeds were then placed over Germitest[®] paper in sterile acrylic boxes (11 x 11cm), rinsed with distilled water and incubated in a germination chamber type BOD ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60%RH and 12/12h photoperiod). Seeds were monitored daily and considered germinated with the protrusion of the radicle. Once the test ended germination rate and germination speed index (GSI) (Maguire 1962) were assessed.

Electrolytic leakage

Four replicates of 25 seeds of each desiccation treatment were submerged in 75 ml of distilled water and leakage of electrolytes was measured over 12 hours using a conductivity meter. Seed replicates were weighted before being imbibed in order to express the final leakage values as $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$.

Seed osmotic potential

The relation between water potential and WC of *C. xanthocarpa* seeds was estimated based on water sorption isotherms. Whole seeds were soaked in polyethylene glycol (PEG 6000) solutions of different concentrations (0, -0.5, -1, -1.5, -2, -4, -6 and -10 MPa). Once seeds reached osmotic equilibrium with each PEG solution their WC was estimated gravimetrically. Osmotic potential of PEG solutions were based on Michel and Kaufman (1973).

Light microscopy

Seeds were fixed in phosphate-buffered 2.5 % paraformaldehyde (0.1 M), rinsed three times in phosphate buffer (0.1 M) and dehydrated through increasing ethylic alcohol series (30°GL, 50°GL, 70°GL, 80°GL, 90°GL, 100°GL). Samples were then pre-infiltrated through increasing concentrations of Leica Histo-resin[®]/pure ethylic alcohol solutions (1:3, 1:1 and 3:1) and infiltrated in pure histo-resin. Infiltrated samples were placed into plastic molds containing hardener solution and were dried at 35 °C. The histo-resin blocs were sectioned in 5 µm thick pieces in a rotation microtome (Leica RM 2125 RT, Nussloch, Germany). Sections were placed on glass slides and stained with phosphate-buffered toluidine blue. Images were captured under light microscope (Leica DM 2500, Wetzlar, Germany) equipped with digital camera (Opticam OPT 5.1MP, New Songdo City, South Korea) and OPTHD software.

Oxidative enzymes analysis

Seeds were dried, seed coats were excised and the embryos used to measure Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Ascorbate Peroxidase (APX) activities. 300 mg of embryos were homogenized under refrigeration with 3 ml solution of 50 mM phosphate potassium buffer (pH 7.0), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP). Homogenates were centrifuged at 4 °C at 15.000 rpm for 20 min, and the supernatant was used as the source for the following enzyme assays. SOD activity was estimated by monitoring the inhibition of photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) at 560 nm (Giannopolitis and Ries 1977). The 300 µl reaction mixture comprised 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 13 mM methionine, 75 mM nitroblue tetrazolium (NBT), 2 mM riboflavin, 100 nM EDTA and 10 µl of the enzyme extract. After adding the enzyme extract the reaction mixtures were kept in a sealed container under fluorescent light for 15 min to initiate the reaction. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to inhibit 50% the reduction of NBT. CAT activity was estimated by the decrease in absorbance of H₂O₂ (extinction coefficient 39.4 mM⁻¹ cm⁻¹) at 240 nm for 5 min (Peixoto et al. 1999). The 300 µl reaction mixture comprised 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 12.5 mM H₂O₂ and 10µl of the enzyme extract. CAT activity was expressed as µ mol of H₂O₂ decomposed per milligram of protein per minute. APX activity was estimated following the decrease in absorbance of A₂₉₀ (extinction coefficient 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹) at 290 nm for 10min (Koshiha, T. 1993). The 300µl reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate

buffer (pH 7.0), 50 mM ascorbic acid, 4.75 mM H₂O₂, 5 mM EDTA and 10µl of the enzyme extract. APX activity was expressed as µ mol of ascorbate oxidized per milligram of protein per minute. The protein contents of the extracts were determined according to Bradford protein assay using bovine serum albumin as standard (Bradford 1976). SOD, CAT, APX activities and protein content were assessed four times in spectrophotometer (Spectra-Max® 190 Microplate Reader).

Lipid peroxidation

The level of lipid peroxidation was estimated according to an adaptation of Hodges et al. (1999). Three samples of embryos (300 mg) were homogenized with 3 ml of 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 12.000 rpm for 15 min. An aliquot of 0.5 ml of the supernatant was added to 1.5 ml of 0.5% (w/v) 2-thiobarbituric acid and 20% (w/v) TCA, incubated in pre-heated water (100°C) for 30 min and then transferred to an ice bath for another 30 min. Thereafter, the samples were centrifuged at 10.000 rpm for 15 min. Content of malondialdehyde-thiobarbituric acid complex (MDA) was measured using spectrophotometer (Spectra-Max® 190 Microplate Reader) at 532 nm and corrected by subtracting the absorbance at 600 nm and 440 nm. Lipid peroxidation was calculated using the extinction coefficient of 157 mM⁻¹ cm⁻¹ and expressed as nmol of MDA per gram of fresh matter.

PAs analysis

PAs were determined according to Steiner *et al.* (2007). Seeds were dried, seed coats were excised and three samples of embryos (200mg) were macerated with liquid nitrogen and then ground in 1.6 ml of 5% (v/v) perchloric acid. After 1h samples were centrifuged at 4°C at 20.000 rpm for 20 min. Supernatant was derivatized by dansyl chloride and free PAs were identified by HPLC (Shimadzu Shin-pack CLC ODS) using a reverse phase column. PAs content was determined using a fluorescence detector at 340 nm (excitation) and 510 nm (emission). Retention times and peak areas were measured by comparison with standard PAs solution: Putrescine (Put), Spermidine (Spm) and Spermine (Spm). Free PAs content was expressed as µ mol per gram of fresh weight and total PAs content as µ gram per gram of fresh weight.

Statistical analysis

Values obtained in all experiments were expressed as the mean ± SD of the replicates. Data were subjected to one way ANOVA and the mean differences were compared by Tukey (p < 0.05). Pearson

correlation test ($p < 0.05$) was performed in order to verify correlation between data. Linear regression was calculated and $r^2 > 0.95$. All statistical analyses were performed in R core team (2018).

RESULTS

Seed WC and drying

Fresh seeds of *C. xanthocarpa* had an initial WC of $0.684 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$. Besides the method, air drying (AD) and silica drying (SD), the desiccation behavior of seeds was similar (Fig. 1A). Half of the initial WC was lost between 2 and 3 hours of drying, and after 6 and 12 h seeds had a water loss of 76.2% and 88.5% respectively (Table 1). In 24 h AD seeds almost reached a basal stable WC ($0.042 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$). After 120h of AD seeds final water loss and WC were 94.6% and $0.037 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$ respectively, whilst in SD were 95.9% and $0.027 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$, respectively. Significant differences between methods only occurred after 36 h of drying, when seeds of SD reached lower WC. AD method was adopted through the remaining experiments. Seeds drying rate (k) during the first 24 h of air drying was $0.027 \text{ g H}_2\text{O hour}^{-1}$, but it also could be subdivided into three phases. In the initial 6 h the drying rate was higher ($0.087 \text{ g H}_2\text{O hour}^{-1}$), from 6 h to 12 h decreased ($0.014 \text{ g H}_2\text{O hour}^{-1}$) and almost stabilized from 12 h to 24 h ($0.003 \text{ g H}_2\text{O hour}^{-1}$).

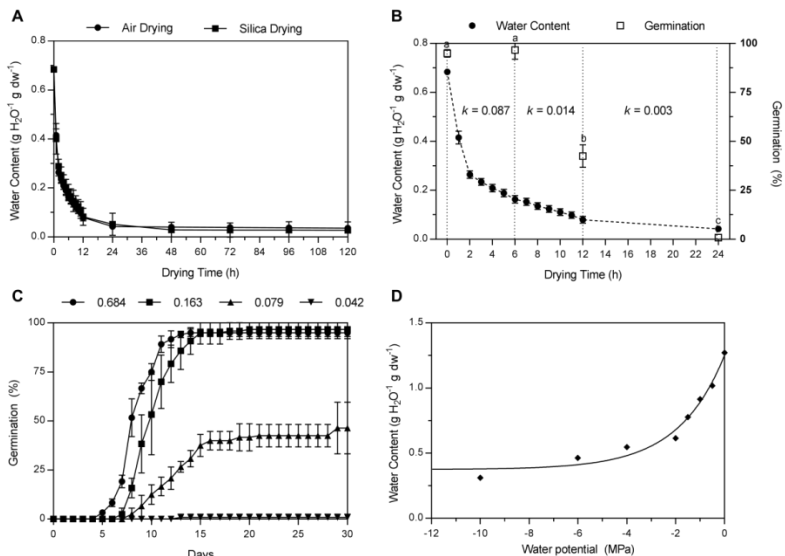


Fig. 1- (A) Drying behavior of *C. xanthocarpa* seeds submitted through air drying and silica drying methods. (B) Drying behavior of *C. xanthocarpa* seeds during the first 24 hours of air drying and the relation between water content, time, germination and drying rate (k). Drying rate was estimated from the relation between water loss over elapsed time. (C) Germination dynamic of *C. xanthocarpa* seeds submitted to air drying for 0, 6, 12 and 24 h, which corresponds to WC of 0.684, 0.163, 0.079 and 0.042 $\text{g H}_2\text{O g dw}^{-1}$, respectively. (D) Water content and water potential relationship of whole seeds of *C. xanthocarpa* that were osmotically dried with polyethylene glycol (PEG 6000). All values are mean of four replicates and vertical bars represent mean \pm SD. Linear regression of WC and water potential $r^2 > 0.95$. Distinct letters indicate means that are statistically different according Tukey test ($p < 0.05$).

Table 1- Features of *C. xanthocarpa* seeds during air drying time, water content and water loss in relation to their germination, germination speed index and electrolyte leakage. Values are mean of four replicates \pm SD. Distinct letters indicate means that are statistically different according Tukey test ($p < 0.05$).

Drying Time (hours)	Water Content (g H ₂ O g dw ⁻¹)	Water Loss (%)	Germination (%)	Germination Speed Index (GSI)	Electrolyte Leakage ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)
0	0.684 \pm 0.017	-	95 \pm 1.92 a	3.030	32.7 \pm 2.27 a
6	0.163 \pm 0.005	76,2	96.67 \pm 4.72 a	2.597	42.27 \pm 5.44 a
12	0.079 \pm 0.007	88,5	42.5 \pm 5.70 b	0.982	73.72 \pm 6.16 b
24	0.042 \pm 0.008	93,9	0.83 \pm 1.67 c	0.018	91.09 \pm 5.07 c

Germination test

Considering the high drying rate during the first 24 hours, seed desiccation treatments were established based on a time/WC basis, where 0 (fresh), 6, 12 and 24 hours of drying corresponded to an average of 0.684, 0.163, 0.079 and 0.042 g H₂O g dw⁻¹ WC, respectively (Table 1). As time progressed and WC decreased, seed germination was reduced (Fig. 1B). Fresh seeds (0.684 g H₂O g dw⁻¹) were able to germinate 95% and drying them for 6 h (0.163 g H₂O g dw⁻¹) did not show any difference in the final germination rate (96.7%). After 12 h, WC reached 0.079 g H₂O g dw⁻¹ and germination reduced to nearly half (42.5%), and within 24 h of drying (0.042 g H₂O g dw⁻¹) seeds lost 99% of their viability, as they germinated 0.83%. In addition, during the drying process seed germination dynamic differed between treatments (Fig. 1C). Fresh seeds germinated faster and reached earlier its maximum value. The protrusion of the radicle in fresh seeds started 5 days after sowing and took 8 days reach 95% of germination. Seeds dried for 6 h showed a lag and started germination at the 7th day and took 12 more days to reach 96.7%. 12 h dried seeds first started to germinate 8 days after sowing and reached final values after 21 days. After 24 hours of drying only one seed germinated. These contrasting dynamics could also be observed by the decrease in GSI (Table 1).

Electrolytic leakage

Leakage of electrolytes remained stable for fresh and 6 h dried seeds (Table 1). After 12 h leakage raised two fold in comparison to fresh seeds. Seeds that lost viability (24 h of desiccation, $0.042 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$) showed the highest values of leakage. Electrolytic leakage showed a strong negative correlation with germination (-0.9463) (Table S1).

Seed osmotic potential

Seeds embedded with pure distilled water (0 MPa) reached a WC of $1.271 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$. The water potential (Ψ_w) of fresh seeds was interpolated from the WC/water potential relation and estimated as -1.78 MPa at $0.684 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$. WC strongly decreases along small changes water potentials prior to -6 MPa, whilst after this point substantial changes in water potential are needed to decrease the WC.

Seed anatomy

Seeds of *C. xanthocarpa* are composed by an external glandular structure that covers the embryo (Fig. 2A), a swollen hypocotyl that entirely fills the seed (Fig.2B), radicle, small rudimentary cotyledons and lack of endosperm. The external glandular covering is relatively thin when compared with the whole seed and anatomically comprises three distinct tissues (Fig. 2C). The most external tissue (et) is also the most extensive, which comprises several layers of flattened thin walled cells that surround big oil cavities (oc). Afterward there is a one layered cell middle tissue (mt) with thickened lignified walls, followed internally by a tissue of small flattened thin walled cells. This most internal tissue (it) may vary in extension along the seed and it could be comprised from one, two or up to seven layers of cells. Cotyledons (ct) (Fig. 2D) were much smaller than the other seed components and remain folded in the center of the seed, covered by the swollen spiral hypocotyl (hp). The whole seed is majorly comprised by the hypocotyl, which ground tissue (gt) (Fig. 2E) has a great amount of cells storing lipidic content similar to the covering tissue. The hypocotyl's ground tissue is comprised by axially elongated cells in the periphery that tend to be isodiametric or relatively flattened in the middle portion of the organ. Two parallel sets of procambium (pc) cells cross the entire seed from the cotyledons towards the radicle. Since *C. xanthocarpa* seeds do not have endosperm, its energetic reserves are accumulated among the ground tissue cells. At the radicle apex was possible to verify promeristem (pm) and procambium (Fig 2F).

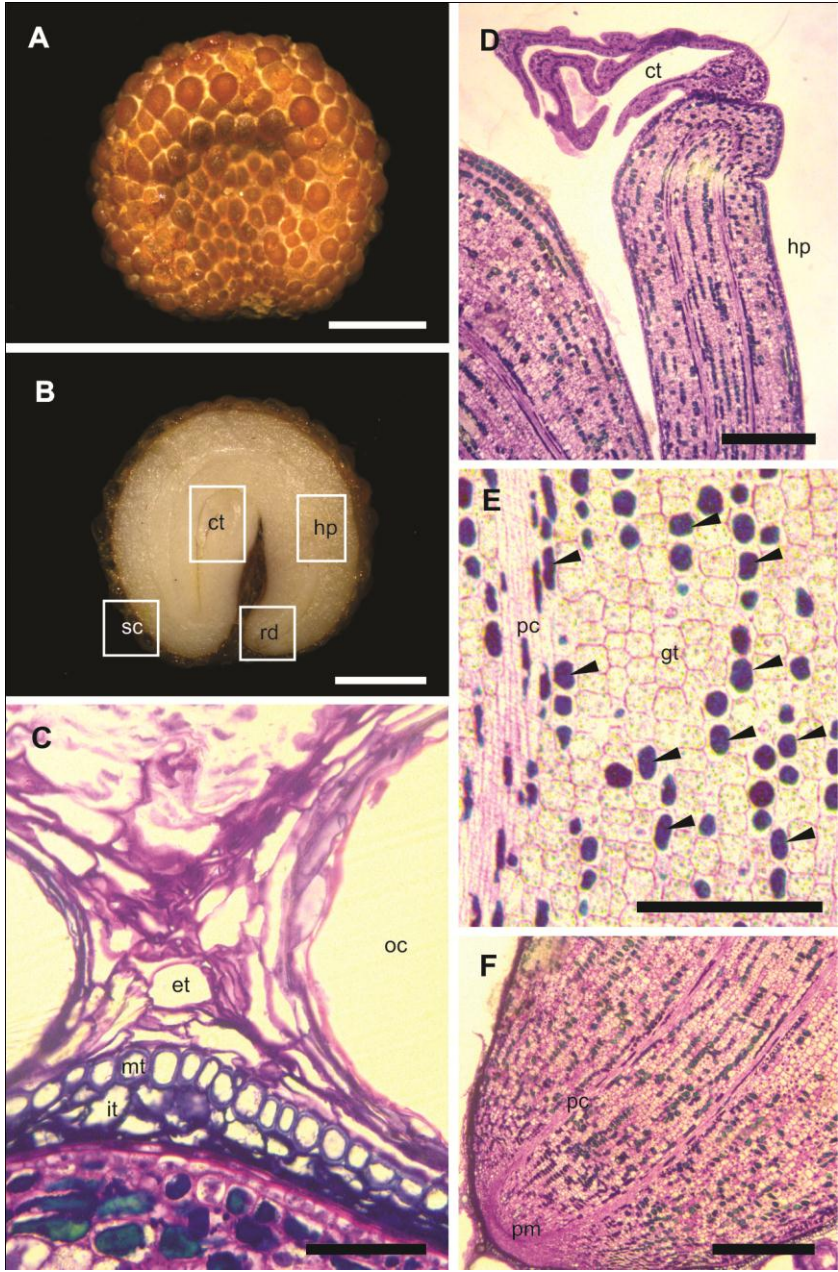


Fig. 2- External morphology of whole (A) and longitudinally cut (B) *C. xanthocarpa* seed. Longitudinal sections of fresh (C, D, E, F) seeds stained with toluidine blue and observed in light microscope. (A) Overview of the entire seed and its external glandular covering tissue. (B) Seed longitudinally sectioned showing the external thin glandular covering tissue and the whole embryo. Embryo is comprised by a swollen hypocotyl much wider than cotyledons, and a central core of vascular tissue is distinguishable from the surrounding ground tissue. (C) Seed coat comprised by external, middle and internal tissues. External tissue has big oil cavities that can be observed macroscopically. (C) Overall look of the hypocotyl, which is mainly comprised by a reserve ground tissue and procambium. (D) Small folded leafy cotyledons. (E) Hypocotyl ground tissue. Many cells exhibit lipidic content that entirely fills intracellular space, which also can be observed inside procambium cells (arrows). (F) Root apical meristem of the embryo indicate promeristem and procambium. ct, cotyledons, et, external tissue, gt, ground tissue, hp, hypocotyl, it, internal tissue, mt, middle tissue, oc, oil cavity, pc, procambium, pm, promeristem, rd, radicle, sc, seed coat. Scale bars: A, B, 2.5 mm; C, 50 μ m; E 1000 μ m; D, F, 4000 μ m.

Upon desiccation tissues overall changes were observed by light microscopy analysis presented in Fig. 3. Seed coat tissues were the first to suffer structural changes during desiccation (Fig. 3A, B), where external and internal tissues cell walls exhibited invagination as a result of water removal. On the other hand the lignified middle tissue did not show any structural changes in all desiccation treatments. Protodermal cells in 6 h dried seeds also showed signs of dehydration when the plasmalemma was shed from its cell walls (Fig. 3C). Similarly, after 6 h of drying a few cells of the hypocotyl ground tissue also showed detachment of the plasmalemma from the cell walls (Fig. 3D). After 12 h of desiccation cell shrinkage and plasmalemma detachment were more evident along the hypocotyl ground tissue (Fig. 3E), and some cell walls even collapsed due water removal (Fig. 3F). Dehydrating seeds for 24 h led to further detachment of plasmalemma from cell walls, and shrinkage became more frequent in cells of the hypocotyl ground tissue (Fig. 3G).

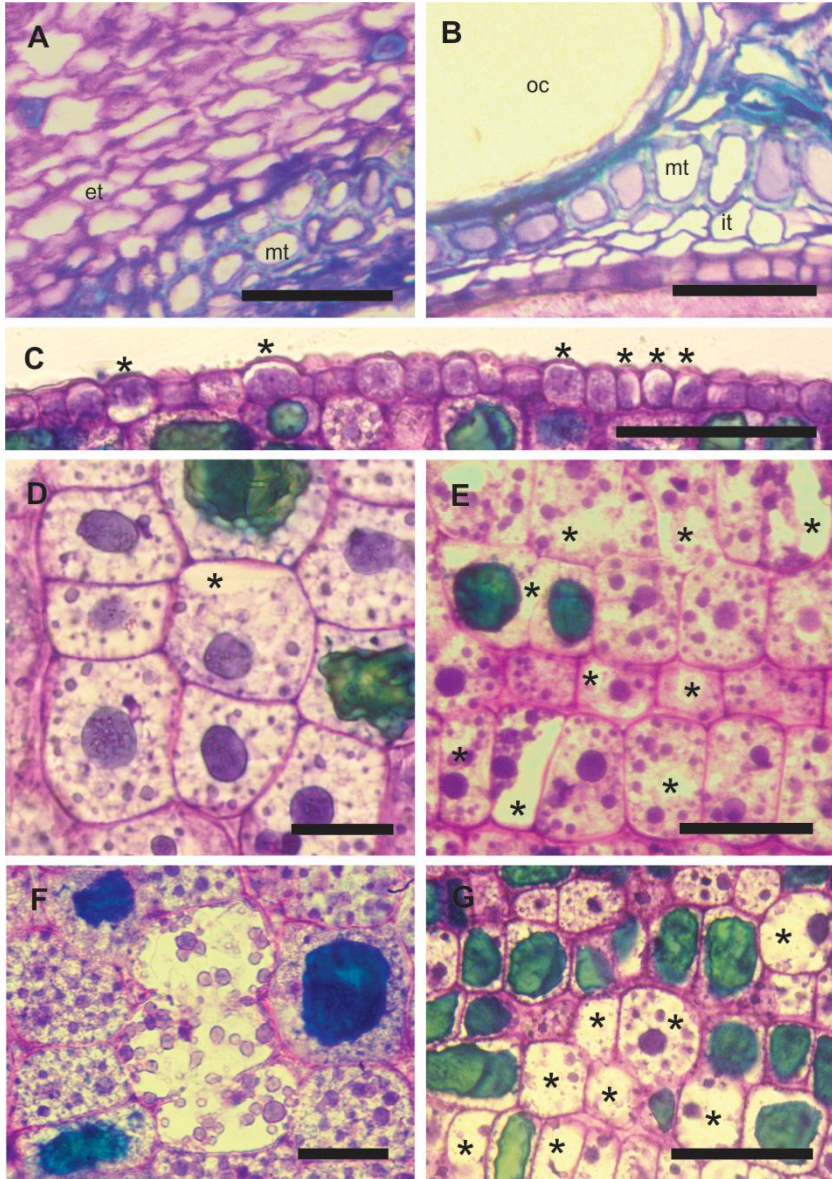


Fig. 3- Longitudinal sections of seed coat (A, B), protoderm (C) and hypocotyl (D, E, F, G) of air dried *C. xanthocarpa* seeds, stained with toluidine blue and observed in light microscope. (A) External and middle tissue of the seed coat of a dried seed. Invagination of cell walls of external tissue cells. (B) Middle and

internal tissue of the seed coat of a dried seed. Invagination of cell walls of internal tissue cells. (C) Protoderm of a 6 h dried seed. Protodermal cells exhibit separation of the plasmalemma from cellular walls due water removal (indicated by asterisks). (D) Hypocotyl ground tissue of a 6 h dried seed. Initial evidences of tissue dehydration, detachment of plasmalemma from cellular wall indicated by asterisk. (E) Ground tissue of the hypocotyl of 12 h dried seed. Many cells of the tissue exhibited cytoplasmic shrinkage due water loss, characterized by the separation of the plasmalemma from the cellular walls, as indicated by asterisks. (F) Cells of the ground tissue of the hypocotyl of seeds that were dried for 12 h. Collapsed cellular walls due the intensity of water loss. (G) Ground tissue of a 24 h dried seed. Along further dehydration cell shrinkage became more evident, leading to a more frequent number of cells with plasmalemma detachment from cell walls, as indicated by asterisks. et, external tissue, it, internal tissue, mt, middle tissue, oc, oil cavity. Scale bars: A, B, C, E, G, 50 μm ; D, F, 25 μm .

Antioxidant enzymes and lipid peroxidation

The enzymatic activity of SOD, APX and CAT was estimated along the drying process and consequent WC reduction of *C. xanthocarpa* seeds (Fig. 4). SOD activity (Fig. 4A) increased during the first 6 and 12 h of drying, but after 24 h seeds lost their viability and activity sharply declined. Values of SOD in unviable seeds were almost as half as observed in fresh seeds. In contrast to SOD behavior, APX (Fig. 4B) and CAT (Fig. 4C) shared a common trend. APX activity during the first 6 h of drying declined and after 12 h exhibited a slight increase. When seeds lost their viability APX values were similar as in fresh seeds. A similar behavior was observed for CAT, as its activity significantly reduced during the initial 6 h and then after 12 h started to increase. CAT activity continued to increase during drying and when seeds lost their viability values were as observed in fresh seeds.

Peroxidation of lipids was estimated according to the formation of MDA content (Fig. 4D). Although MDA levels seemed to have an increase along dehydration, this raise was discrete and there was no statistical difference between treatments.

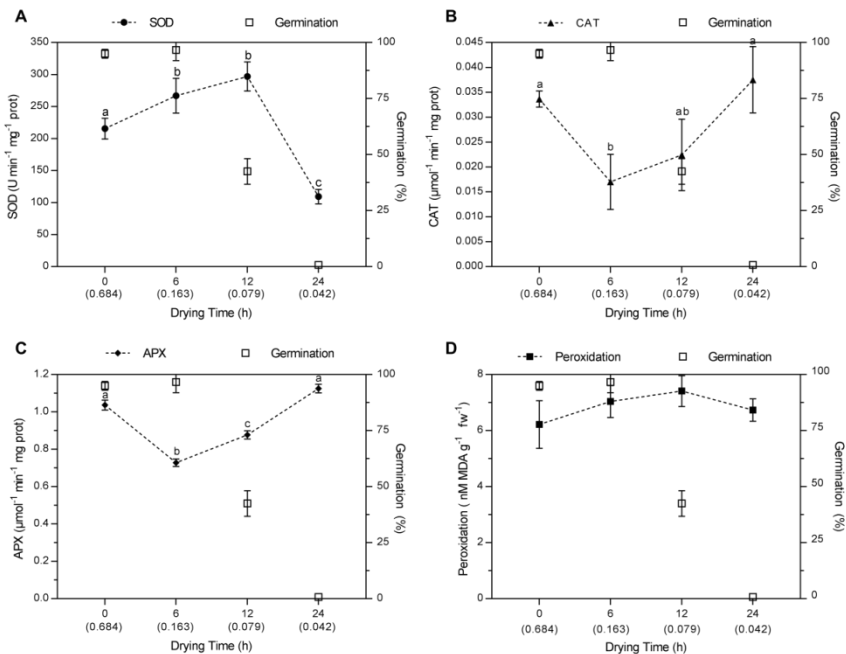


Fig. 4- Enzymatic activity of SOD (A), APX (B) and CAT (C), and lipid peroxidation (D) of *C. xanthocarpa* seeds during air drying and in relation to their germination capacity. Values between parentheses represent seed water content in dry basis (g H₂O g dw⁻¹) at each respective drying time. Values are mean of three replicates and vertical bars represent mean ± SD. Distinct letters indicate means that are statistically different according Tukey test ($p < 0.05$).

PAs

Changes in overall free PAs content (Put, Spd and Spm) were observed during desiccation of *C. xanthocarpa* seeds (Fig. 5), where the content of total PAs increased (Fig. 5A), being mainly driven by Spd levels. The first 6 h exhibited no significant changes in total PAs content, but after 12 h of drying there was an increase, which after 24 h reached nearly two fold the initial fresh seeds PAs content. There was a negative correlation of total free PAs and germination (-0.8553) during the drying process (Table S1). Free Spd was the main PA observed in fresh seeds and exhibited the highest levels through the whole drying process (Fig. 5B). Free Put and Spm levels were on average 4 and 6 times lower, respectively, in comparison to free Spd. Free Put and Spm

levels had no statistical difference during seed drying. On the other hand, free Spd content increased along drying, where it remained constant in fresh and 6 h dried seeds, and as desiccation proceeded, 12 and 24 h of drying led a two fold increase. It was observed a strong negative correlation between Spd levels and germination (-0.8775), and a moderated positive correlation between Spd levels and APX (0.5086) and CAT (0.5495) activities during drying (Table S1). The Put/(Spd+Spm) ratio decreased during the drying process (Fig. 5C), mainly driven by the increase in Spd content. The ratio reduction became more evident only after 24 h of drying, a moment that seeds lost their viability.

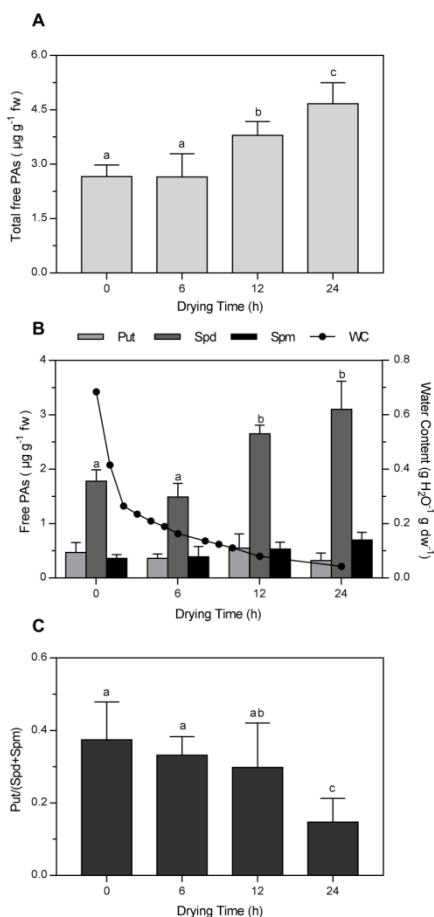


Fig. 5- Total polyamines (PAs) (A), free PAs content (B) and ratio between Put/(Spd+Spm) content of *C. xanthocarpa* seeds during air drying and different water content values. Values are mean of three replicates and vertical bars represent mean \pm SD. Distinct letters indicate means that are statistically different according Tukey test ($p < 0.05$).

DISCUSSION

After being removed from fruits *C. xanthocarpa* seeds lost 93.9% of their WC during the first 24 h. In general, most seeds can be either fast or slow dried for distinct purposes. However, despite the use of silica, which should have increased the drying rate, water loss occurred rapidly besides the method and the drying process, so it was assumed to be naturally fast for *C. xanthocarpa* seeds. For this reason treatments were defined not only based on seed WC, but also as the time required to reach it, because expressing it along time and drying rate can be more informative when it concerns stress nature, accumulation of damage and seed viability (Varghese et al. 2011; Walters 2015). Nonetheless, it is rare in seed desiccation studies the expression of drying rate along other seed features, and there are no standard methods to calculate it. Hill et al. (2010) tried to propose a single negative exponential model to explain seeds drying behaviors, but almost half of the studied seeds did not fit the model and the physical expectations of water vapor loss. Xia et al. (2012a) expressed the drying rate as the decline in WC during a determinate time period and expressed it as a percentage of water loss. In another study Xia et al. (2012b) used an index (k) obtained from the slope of the initial drying curve to measure the drying rate. Although there is no consensus in how to calculate or express it, seeds drying rates are extremely useful to give an idea of the physical relation of the environment and seeds physiological intrinsic features. In our work the concept of drying rate is presented as water loss (%) and as an index obtained from the relation such water loss along drying time.

Seed drying rate depends on their surface area, the hydraulic conductivity of the tissue and the difference in water potential of the external air and seed tissue (Sun 2002). Once the use of silica did not affect the rate of water loss, the drying behavior observed could be due the nature of *C. xanthocarpa* seed coat, which is thin and mainly comprised by unlignified tissues. In fresh seeds of *C. xanthocarpa* the seed coat has a soft malleable membranous consistence, which upon drying becomes harder and brittle. Conspicuous cavities containing oil are all over the surface of *C. xanthocarpa* seed coat, and it has been traditionally considered as a distinctive taxonomic trait shared by the

entire genus *Campomanesia* (McVaugh 1968). As a matter of fact, the structure that we *a priori* consider as a glandular seed coat is actually the internal locule-wall of the fruit and is apparently unique in Myrtaceae (Landrum 1982). Interestingly, high drying rates are also observed among seeds of other *Campomanesia*, such as *C. phaea* (Maluf and Pisciotanno-Ereio 2005), *C. pubescens* (Dousseau et al. 2011), *C. adamantium* (Dresch et al. 2015) and *C. littoralis* (data not published). Thus, insufficient dehydration protection by this false seed coat is likely to occur for the whole genus *Campomanesia*, and it could serve as an alert to the vulnerability of these species in terms of seed viability. A typical example is the case of *C. lundiana*, an already extinct *Campomanesia* species from Southeastern Brazil (IUCN 2018).

In our work, after 6 h of drying seeds lost 76% of their WC ($0.163 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$), but germination (96.7%) was the same as fresh seeds (95%). However, fresh seeds had higher germination speed index (3.030) and the observed lag between imbibition and radicle protrusion of 6h dried seeds (2.597) may be due the action of mechanisms repairing damages that occurred during the drying process. After 12 h 88% of the WC was lost ($0.079 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$), germination was slower (0.982) and reduced below half (42.5%). Finally, after 24 h of drying seeds lost 93.9% of their initial WC ($0.079 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$) and seed viability was completely lost. In this sense, Marques et al. (2018) gathered information about seed lowest safe WC that 98 DS and 31 intermediate species could tolerate. The authors assessed that DS seeds on average could be dried to $0.33 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$ before germination started to decline, whilst intermediate seeds tolerated on average $0.13 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$. Thus, according to our results *C. xanthocarpa* seeds would be considered as tending to intermediate behavior, since drying around $0.16 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$ exhibited no reduction in germination (96.7%). However, we take into account that water loss is so intense during the first hours of drying that WC values could represent just a transient moment along a time that the seed itself did not remain. In fact, it was due this high drying rate that *C. xanthocarpa* seeds were able to tolerate further dehydration and behave out of the classical DS thresholds. This behavior even reflects the goals of fast drying methods and helps us to analyze the physiological implications that enable DS seeds survival in lower WC, which avoids damage accumulation in intermediate states of WC. Thus, it can be difficult to determine viability loss and to rank DS only considering critical WC, due the existence of innumerable possibilities in terms of seed physiological behavior categories. In addition, seeds must be contextualized along their intrinsic

morphological, physiological, biophysical and environmental features (Hill et al. 2012), not only to give an idea of a tendency inside the drying behavior spectrum, but also to bridge the gap between seed physiologists and community ecologists (Jiménez-Alfaro et al. 2016).

In this context, Neotropical Myrtaceae exhibits a morphological diversity of embryos that has been traditionally used for grouping family subtribes in previous taxonomy studies (Lucas et al. 2007). Although this variety of embryos does not imply in any success of one structure over another (Landrum and Stevenson 1986), distinct DS behaviors can be observed among genera, where some require days to reach a certain WC while others take just a few hours. For example, *Eugenia*, the most diverse tree genus in the Atlantic Forest (BFG 2015), due their swollen fused cotyledons exhibit a drying behavior that require several days for seeds to lose viability. Delgado and Barbedo (2007) reported for six *Eugenia* species that seed loss of viability occurred with WC around $0.25 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1}$, which took them on average 456 h of drying. On the other hand, *Campomanesia* small rudimentary cotyledons and false seed coat features confers seeds a much faster drying dynamic and a shorter lifespan. Although drying methods may differ slightly between studies, the morphological diversity and responses must be taken into account to assess the real desiccation behavior and to make stress considerations associated to seed physiological viability. Surprisingly, from the classical perspective of desiccation thresholds *Eugenia* seeds can be considered as highly DS, once viability is lost at higher WC than most DS seeds, while *C. xanthocarpa* seeds tend to be as intermediate. However, in terms of survival a 24 h lifespan is much more vulnerable than a hypothetical WC threshold that takes several days to be reached, and distinct sources of damage are likely to be involved. Furthermore, in order to rank the degree of DS seed and susceptibility of species it is necessary to solve the issues between drying rate and tissue WC, because is difficult to distinguish and to correlate intensity and duration of dehydration stress (Pammenter et al. 2002). The variation of critical WC along the seed behavior spectrum demonstrates the capacity of stress tolerance and the quantitative nature of desiccation tolerance (Walters 2015). Thus, the above mentioned issues could lead to a misclassification paradox that neither concerns survival nor nature of damage. Our data underlines the importance of expressing seed WC along a time basis, since distinct desiccation behaviors may imply different interpretations of DS seed survival and physiological stress.

It is also interesting to point out that such generalization that constrain DS seeds in respect to their desiccation thresholds and

physiological behavior may also occur in the ecological context. Seeds that are DS are usually associated with high WC, large size, thin tegument, rapid germination, dispersion in the rainy season and do not form soil seed bank. However, this stereotype does not give us the idea of the idiosyncratic behavior in their natural environments, and as more studies are concerning the diversity of DS seeds the spectrum perspective is getting broader. There are examples of DS species with seed features such as dormancy (Gumilevskaya and Azarkovich 2007, Veloso et al. 2016), dispersion in the dry season (Vaz et al. 2016), soil seed bank formation (Ferrandis et al. 2011) and tolerance to flooded anoxic conditions (Marques and Joly 2000, Calvi et al. 2017), which do not fit the classical definitions of DS seeds and may demand different *ex situ* conservation efforts. In the biodiversity scope, despite the concepts and terminologies limiting the real context of seed behavior, the fact is that conservation of DS seed species is a major concern for ecological and economic issues.

From a physiological perspective, one of the main general causes of viability loss in DS seeds is due mechanical perturbations during water removal and rehydration. When water is removed from cells they lose turgor, shrink and molecules become spatially closer, which may cause fusion of the membranes system and loss of cellular compartmentalization (Walters et al. 2002). In addition, the lipidic bilayer of the membrane during drying compact and its constituents rearrange, leading to a less fluid structure that upon rehydration may leak intracellular content (Bewley et al. 2012). However, during fast drying seed water loss may be uneven, and it is likely to occur primarily from apoplast and peripheral cell layers (Berjak and Pammenter 2013). Considering that the seed coat is the main barrier to the external environment, initial water loss of *C. xanthocarpa* seeds seemed to be occurring from peripheral tissues, mainly by its false seed coat. Anatomical evidences from 6 h dried seeds showed signs of dehydration in the false seed coat, since it is relatively hydrated in fresh seeds. Cell walls invaginated in the most internal and external tissues of the seed coat, and the one layered lignified middle tissue remained unchanged. At this moment protodermal cells also showed signs of dehydration when its plasmalemma detached from cell walls. The behavior of an initial high rate of water loss followed by a lower rate is associated to changes in covering and internal seed properties (Hill et al. 2010), which also have relation with the distinct types of water in each level of tissue hydration.

Although five types of water can be found in tissues, three main types are usually associated with the dehydration process and changes in seed physiology. These types of water are related to tissues hydration level and are usually expressed in terms of water potential (Ψ_w), which is much more informative when concerning water stress (Walters 2015). Type 3 is a free water that form bridges over hydrophobic portions of macromolecules and is detected from -4 to -11 MPa, type 2 has a glassy aspect that strong interacts with polar surfaces of macromolecules between -12 and -150 MPa, and type 1 occurs at levels below than -150 MPa and is referred as a molecular theoretical level where water binds as a structural component (Vertucci and Farrant 1995). There is a direct relation between WC and water potential, which varies during seed development and among mature seed tissues (Farrant and Walters 1998; Xia et al. 2014). For *C. xanthocarpa* seeds it was able to establish the water potential of fresh seeds (-1.8 MPa), but for dried seeds values were estimated as in the literature (0.163 ~ -15MPa; 0.079 ~ -150 MPa; 0.042 ~ -200 MPa) (Walters 2015). The behavior and decrease in water potential of *C. xanthocarpa* seeds during osmotic drying with PEG 6000 was as expected for DS seeds, and as seen in other studies (Farrant and Walters 1998; Xia et al. 2014). The total removal of type 3 water is considered to be lethal to DS seeds, because it is related to changes in membrane structure (Vertucci and Farrant 1995). Nonetheless, *C. xanthocarpa* survived to -15 MPa (0.163 g H₂O g dw⁻¹), a moment where the plasmalemma in most internal tissues were just starting to detach from cell walls. Usually cells of DS seeds are highly vacuolated and susceptible to volume changes (Walters et al. 2002), thus water in hydrated tissues (type 3) is essential to cell structural maintenance. On the other hand, cells with more dry matter reserves are able to buffer volume changes, and the proportion of intracellular dry matter supply cell tolerable amount of water loss (Walters and Koster 2007). Thus, the great quantity of lipid stored in *C. xanthocarpa* tissues may be contributing to buffer the effects of drying and changes in seed water relations, allowing seeds to maintain viability (96.7%) at lower WC than most of DS species (0.163 g H₂O g dw⁻¹). However, further dehydration and removal of type 2 water lead to membrane function loss in unprotected systems, which for *C. xanthocarpa* seeds could be observed after 12 and 24 h of drying, where cells plasmalemma detached from walls much more frequently, thus increasing potential mechanical damages that possibly contributed to the loss of viability.

Besides mechanical loss of membrane function during dehydration, the other main cause of viability loss in DS seeds is due

metabolism aqueous-based degradative processes. The high WC of DS seeds confer the cytoplasm a fluid environment where metabolism is active, which along dehydration becomes unbalanced and frequently produces excessive quantities of ROS (Berjak and Pammenter 2008). Accumulation of ROS compromises cellular membranes, proteins, nucleic acids, cellular integrity and seed survival. However, cell water removal below -100 MPa increases the cytoplasm viscosity and reduces the reactivity and mobility of potential damaging molecules such as ROS (Berjak and Pammenter 2013). Usually DS seeds lose viability before its cytoplasm enters in this glassy state, so the relative mobility of the aqueous environment can make ROS reach targets far from their production sites (Walters 2015). In this case, the role of antioxidant enzymes is determinant to maintain cellular homeostasis of DS seeds along time, and the first line of defense against ROS is provided by SOD (Gill and Tuteja 2010), which catalyzes superoxide radicals (O_2^-) producing hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen (O_2). Roach et al. (2008) verified a burst of O_2^- production during the first minutes after excision and drying of DS embryonic axes of *Castanea sativa*. Similarly, *C. xanthocarpa* seeds had an increase of SOD activity when fresh seeds were submitted through 6 and 12 h of drying, which could mean that SOD was responding to the initial intracellular production of O_2^- . On the other hand, when seeds lost viability, after 24 h of drying, SOD activity sharply declined, which may be related to the decrease in O_2^- content also observed by Roach et al. (2008). Our results are also similar to observed by Luo et al. (2012) in seeds of *Mimosa elengi*, where high drying rates increased SOD activity. The main product of SOD activity is H_2O_2 , which is a moderately reactive molecule that has relatively long half-life in comparison to others ROS (Gill and Tuteja 2010). Thus, the balance between SOD and H_2O_2 -scavenging enzymes (as APX and CAT) is considered to have a central role in maintaining steady cellular contents of O_2^- and H_2O_2 (Quan et al. 2008). Considering that SOD levels increased along desiccation, it could be assumed that its product, H_2O_2 , may be also increasing. However, there was a similar trend during the drying process where the activity of both APX and CAT decreased in the first 6 h of drying, possibly because there was apparently no stress, damage and change in germination. During the subsequent hours, as viability began to be lost, APX and CAT started to increase and exhibited similar activity as in fresh seeds after 24 h of drying, a moment when seeds were unviable. This behavior of APX and CAT decreasing, increasing as viability is lost and returning to fresh seeds values was similar as observed by Chen et al. (2015) for a cultivar

of *Camellia sinensis* during drying. Along DS seed dehydration the response of enzymatic antioxidant systems can be highly variable among species, and it can significantly differ depending on the drying rate (Varghese et al. 2011, Luo et al. 2012). Fast drying induces higher activities, while during slow drying insufficient enzymatic responses is more critical to survival due the likelihood of ROS accumulation. In the case of *C. xanthocarpa* seeds overall enzymatic activity somehow tried to respond to dehydration stress and possible ROS production, where SOD increased through the whole process and sharply declined with seed viability loss, while APX and CAT decreased in the first hours and then seemed to be only after 12 h, but damage was occurring and viability was being lost.

Moreover, ROS scavenging enzymes activity can be induced by PAs, which are other stress-related molecules. PAs are considered to play important roles against abiotic stresses, as they protect many macromolecules and stimulate protective mechanisms, but a tight regulation must be assured due the deleterious effect of their accumulation (Tiburcio et al. 2014). Depending on the source of stress distinct PAs biosynthetic genes are stimulated and in most cases only one type of the three main PAs is significantly involved (Liu et al. 2015). Current surveys on PAs and abiotic stresses are showing potential applications in agriculture and plant biotechnology (Tiburcio and Alcázar 2018), and concerning seeds exogenous PAs are being used to prime and improve germination under stressful conditions, especially water drought. Nonetheless, there is a lack of studies considering endogenous PAs behavior during seed drying, and there are literally no mentions when it comes to DS seeds and the possible relations of seed desiccation stress, PAs accumulation, antioxidant activity and seed viability. Although PAs accumulation is considered as a general response to abiotic stress, is still uncertain the cause-effect relation between accumulation and protective behavior (Liu et al. 2015), especially in DS seeds. Endogenous content of free PAs increased when *C. xanthocarpa* seeds started to lose viability, which was mainly driven by Spd levels that were much higher than the others PAs. Since the three main PAs can be interconverted, the observed reduction of Put/(Spd+Spm) ratio can show Spd induction during drying and, although changes in Put content was not statistically different, the slight raise with 12 h that decreases after 24 h could also be an evidence of Put interconversion to Spd, since it is its obligate precursor. Although there are not studies that specifically concern PAs and seed desiccation, Spd is related to a broad spectrum of stresses and successfully enhances

survival under these conditions (Alcázar et al. 2010). It has been shown that during distinct sources of stress exogenous Spd increases many stress-responsive genes that improve ROS scavenging capacity in plant tissues (Parvin et al. 2014, Paul and Roychoudury 2017) and seeds (Navyar and Chander 2004, Yadu et al. 2018). Whether if Spd was accumulating in *C. xanthocarpa* seeds to signalize stress or to act as a protective agent is elusive, but it was an evident indicator for stress and suggests that seeds perceived and somehow attempted to respond to it. Accumulation of PAs is time and stress-dependent, and their biosynthetic genes can be expressed days after stress induction (Liu et al. 2011). *C. xanthocarpa* seeds increased Spd content only after 12 h of drying ($0.079 \text{ g H}_2\text{O g dw}^{-1} \text{ WC}$), a moment when germination decreased below half (42.5%). Thus, since drying seeds for 6 h did not affect their germination, it may be that up to that moment the seed itself was not recognizing the changes in WC as stress and Spd content remained stable. The misperception of stress during the first 6 h of desiccation was probably due the seed high drying rate, which most water was lost from seed coat and peripheral cell layers. Increase in Spd content after 12 h was possibly because cell structural changes were already generalized in seed tissues, affecting their metabolism and stimulating PAs response to stress.

Additionally, accumulation of PAs can induce its catabolism and generate ROS, mainly H_2O_2 , which elicits stress-responsive genes and stimulates the antioxidant enzymatic system (Tiburcio et al. 2014). Our results showed some moderate positive correlation between changes in Spd levels and CAT (0.5086) and APX (0.5495) activity. During the first 6 h of drying *C. xanthocarpa* seeds maintained high viability (96.7%), content of Spd remained stable and APX and CAT activity decreased. Nonetheless, after 12 h of drying intracellular damage is likely to occur and germination started to decline, stress perception leads to Spd increase and the activity of both enzymes started to respond. Finally, after 24 h, Spd was continuously stimulated and its content was even higher, APX and CAT activity were further stimulated and reached values almost as in fresh seeds, though viability was already lost. APX and CAT are the main H_2O_2 -scavenging enzymes, but as they were in low activity during drying, it could be a sign of an unbalanced response, which contributes to the accumulation of ROS and potential oxidative damage in cells and tissues along time. Increased Spd levels in general tissues are usually associated to a successful stress response that in seeds improve germination, vigor and maintain seed viability. Nonetheless, our results showed a strong negative correlation between germination

and total free PAs (-0.8553), and Spd (-0.8775), which is contradictory with the proposed protective role of PAs. Thus, major damages could be superposing the response and protective role of PAs, possibly due the quick duration and intensity of water loss. In this context, peroxidation of lipids by ROS and consequent disruption of the membrane system is one of the main causes of oxidative damages and viability loss of DS seeds. However, there was no substantial evidence of lipid peroxidation in *C. xanthocarpa* seeds during drying. As already mentioned, the accumulation of potential deleterious molecules is usually associated with intermediate WC that allows these molecules to accumulate, which is more likely to occur during slow drying. Since *C. xanthocarpa* seeds have an intrinsic high drying rate, it is probably that there was not enough time for such metabolism-linked damages accumulate. As a matter of fact, damage is a function of rate and duration of dehydration, which mechanical and physical perturbations are more likely to occur with high drying rates (Liang and Sun 2002). Additionally, fast rehydration in seeds at low WC may result in damage and plasmolysis, since water enters before membranes can be reverted to the fluid state (Bewley et al. 2012). Membrane composition and structure of DT seeds have better elasticity and transition from phases that can avoid mechanical perturbations that ensure survival (Walters et al. 2002), which is also related to the glass matrix state of the cytoplasm. Nonetheless, seeds of *C. xanthocarpa* showed a strong negative correlation (-0.9463) between electrolyte leakage and germination, which suggests the occurrence of membrane structural damages. Thus, at the same rate *C. xanthocarpa* seeds lose water they may gain and, as consequence, improperly fused membranes during drying may leak intracellular solutes due the inability of membranes transition upon water uptake. Similar as our results, Xin et al. (2010) found no signs of ROS accumulation neither lipid peroxidation during fast drying of DS tissues, and it was suggested the occurrence of mechanical damage rather than metabolic. Based on these evidences we suggest that is the case of *C. xanthocarpa* seeds and the structural, physiological and temporal changes assessed in this study were summarized in Fig. 6. Though this schematic figure represents just a glimpse of the real physiological context, it gives an idea of how dynamic, complex and idiosyncratic the processes of perception and response in DS seeds can be. In addition, how structurally and temporally physiological events are associated allow us to infer the tendency of behavior within the spectrum of seed tolerance/sensitivity.

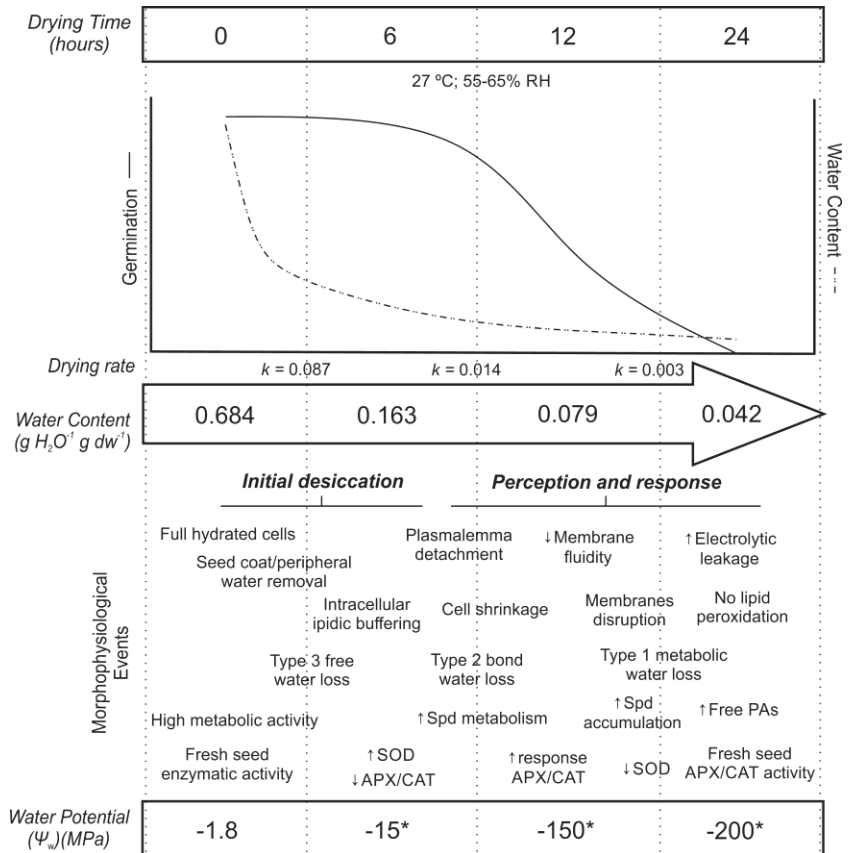


Fig. 6- General physiological and anatomical features of *C. xanthocarpa* seeds during drying. Inherent structural and temporal effects on response during stress leads to a tendency of behavior inside the spectrum of desiccation sensitive seeds. * Values estimated according to the literature (Walters 2015)

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

SUPPLEMENTARY METHODS

Table S1- Correlation values for Pearson's correlation test.

Pearson's correlation test	
Electrolytic leakage / Germination	-0.9463
Total free PAs / Germination	-0.8553
Spermidine / Germination	-0.8775
Spermidine / Ascorbate peroxidase	0.5086
Spermidine / Catalase	0.5495

LITERATURE CITED

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., ... & Tiburcio, A. F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6), 1237-1249.

Berjak, P., and Pammenter, N. W. (2008). From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany* 101: 213-228.

Berjak, P., and Pammenter, N. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science* 4: 478.

Bewley, J. D., Bradford, K., & Hilhorst, H. (2012). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer Science & Business Media.

BFG – The Brazilian Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1085-1113.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Brasil (2009) Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, Brasil.

Calvi, G. P., Anjos, A. M., Kranner, I., Pritchard, H. W., and Ferraz, I. D. 2017. Exceptional flooding tolerance in the totipotent recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata*. *Seed Science Research* 27: 121-130.

Convention on Biological Diversity (2012) *Global Strategy for Plant Conservation: 2011–2020*. Botanic Gardens Conservation International, Richmond, UK.

Chen, Z. X., Lan, Q. Y., Zheng, L., Bao, Y. X., and Luo, Y. L. 2015. Effects of dehydration and temperature on seed viability and antioxidative enzymes activities on three kinds of cultivars of *Camellia sinensis*. *Brazilian Journal of Botany* 38: 497-504.

Dekkers, B. J., Costa, M. C. D., Maia, J., Bentsink, L., Ligterink, W., and Hilhorst, H. W. 2015. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta* 241: 563-577.

de Souza, T. V., Torres, I. C., Steiner, N., & Paulilo, M. T. S. 2015. Seed dormancy in tree species of the Tropical Brazilian Atlantic Forest and its relationships with seed traits and environmental conditions. *Brazilian Journal of Botany* 38: 243-264.

Delgado, L. F., and Barbedo, C. J. 2007. Desiccation tolerance of seeds of species of *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 265-272 (in Portuguese with English abstract).

Dousseau, S., Alvarenga, A. A. D., Mendes Guimarães, R., Lara, T. S., Custódio, T. N., and Chaves, I. D. S. 2011. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. *Ciência Rural* 41 (in Portuguese with English abstract).

Dresch, D. M., Masetto, T. E., & Scalon, S. P. 2015. *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg seed desiccation: influence on vigor and nucleic acids. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 87: 2217-2228.

Ellis, R. H., Hong, T. D., and Roberts, E. H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41: 1167-1174.

Farrant, J. M., & Walters, C. (1998). Ultrastructural and biophysical changes in developing embryos of *Aesculus hippocastanum* in relation to the acquisition of tolerance to drying. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 513-524.

Farrant, J. M., and Moore, J. P. 2011. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 340-345.

Ferrandis, P., Bonilla, M., and Osorio, L. D. C. 2011. Germination and soil seed bank traits of *Podocarpus angustifolius* (Podocarpaceae): an endemic tree species from Cuban rain forests. *Revista de Biología Tropical* 59: 1061-1069.

Giannopolitis, C. N., and Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.

Gill, S. S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

Gumilevskaya, N. A., and Azarkovich, M. I. 2007. Physiological and biochemical characteristics of the recalcitrant seeds having dormancy: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43: 332-340.

Hill, J. P., Edwards, W., & Franks, P. J. (2010). How long does it take for different seeds to dry?. *Functional Plant Biology*, 37(6), 575-583.

Hill, J. P., Edwards, W., and Franks, P. J. 2012. Size is not everything for desiccation-sensitive seeds. *Journal of Ecology* 100: 1131-1140.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., and Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.

Jiménez-Alfaro, B., Silveira, F. A., Fidelis, A., Poschod, P., and Commander, L. E. 2016. Seed germination traits can contribute better to plant community ecology. *Journal of Vegetation Science* 27: 637-645.

Koshiha, T. 1993. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant and Cell Physiology* 34: 713-721.

Landrum, L. R. 1982. The development of the fruits and seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). *Brittonia* 34: 220-224.

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

Landrum, L. R., and Stevenson, D. 1986. Variability of embryos in subtribe Myrtinae (Myrtaceae). *Systematic Botany* 1: 155-162.

Leprince, O., Pellizzaro, A., Berriri, S., and Buitink, J. 2017. Late seed maturation: drying without dying. *Journal of Experimental Botany* 68: 827-841.

Li, Z., Zhou, H., Peng, Y., Zhang, X., Ma, X., Huang, L., and Yan, Y. 2015. Exogenously applied spermidine improves drought tolerance in creeping bentgrass associated with changes in antioxidant defense, endogenous polyamines and phytohormones. *Plant Growth Regulation* 76: 71-82.

Liang YH, Sun WQ (2002) Rate of dehydration and cumulative desiccation stress integrated to modulate desiccation tolerance of Cocoa and Ginkgo embryonic tissues. *Plant Physiol* 128: 323–1331.

Liu, J. H., Nakajima, I., and Moriguchi, T. 2011. Effects of salt and osmotic stresses on free polyamine content and expression of polyamine biosynthetic genes in *Vitis vinifera*. *Biologia Plantarum* 55: 340-344.

Liu, J. H., Wang, W., Wu, H., Gong, X., and Moriguchi, T. 2015. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in Plant Science* 6: 827.

Lucas, E. J., Harris, S. A., Mazine, F. F., Belsham, S. R., Nic Lughadha, E. M., Telford, A., ... and Chase, M. W. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtales (Myrtales). *Taxon* 56: 1105-1128.

Luo, Y. L., Lan, Q., Lu, X., Chen, Z. X., and Tan, Y. H. 2012. Storage behaviour and antioxidant activities of *Mimusops elengi* seeds subjected to different drying rates. *Seed Science and Technology* 40: 354-364.

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

Maluf, A. M., and Pisciotano-Ereio, W. A. 2005. Desiccation and storage of cambuci seeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 707-714 (in Portuguese with English abstract).

Marques, M., and Joly, C. A. 2000. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. *Acta Botanica Brasilica* 14: 113-120 (in Portuguese with English abstract).

Marques, A., Buijs, G., Ligterink, W., and Hilhorst, H. 2018. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. *Functional Plant Biology*.

McVaugh, R. (1968). The genera of American Myrtales: an interim report. *Taxon* 4: 354-418.

Michel, B. E., & Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiology*, 51(5), 914-916.

- Nayyar, H., & Chander, S. (2004). Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190(5), 355-365.
- Nunes, D. P., Dresch, D. M., Scalon, S. P. Q., and Pereira, Z. V. 2015. Drying and reduction in sensitivity to desiccation of *Campomanesia xanthocarpa* seeds. *African Journal of Agricultural Research* 10: 2859-2865.
- Parvin, S., Lee, O. R., Sathiyaraj, G., Khorolragchaa, A., Kim, Y. J., & Yang, D. C. (2014). Spermidine alleviates the growth of saline-stressed ginseng seedlings through antioxidative defense system. *Gene*, 537(1), 70-78.
- Paul, S., & Roychoudhury, A. (2017). Effect of seed priming with spermine/spermidine on transcriptional regulation of stress-responsive genes in salt-stressed seedlings of an aromatic rice cultivar. *Plant Gene*, 11, 133-142.
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P. R., and Moreira, M. A. 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11: 137-143.
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., and Li, H. Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 2-18.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Roach, T., Ivanova, M., Beckett, R. P., Minibayeva, F. V., Green, I., Pritchard, H. W., and Kranner, I. 2008. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. *Physiologia Plantarum* 133: 131-139.
- Roberts, E. H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and technology* 1: 499-514.
- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Floh, E. I., and Guerra, M. P. 2007. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89: 55-62.
- Sun, W. Q. 2002. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In *Desiccation and survival in plants: drying without dying* (pp. 47-91). CABI, New York, NY.

Tiburcio, A. F., and Alcázar, R. 2018. Potential Applications of Polyamines in Agriculture and Plant Biotechnology. In *Polyamines* (pp. 489-508). Humana Press, New York, NY.

Tiburcio, A. F., Altabella, T., Bitrián, M., and Alcázar, R. 2014. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* 240: 1-18.

Tweddle, J. C., Dickie, J. B., Baskin, C. C., and Baskin, J. M. 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology* 91: 294-304.

Umarani, R., Aadhavan, E. K., & Faisal, M. M. 2015. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. *Current Science* 108: 2023-2034.

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

Vaz, T. A., Davide, A. C., Rodrigues-Junior, A. G., Nakamura, A. T., Tonetti, O. A., and da Silva, E. A. 2016. *Swartzia langsdorffii* Raddi: morphophysiological traits of a recalcitrant seed dispersed during the dry season. *Seed Science Research* 26: 47-56.

Veloso, V. H. S., Ribeiro, L. M., Mercadante-Simões, M. O., and Nunes, Y. R. F. 2016. Cytological aspects of recalcitrance in dormant seeds of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 171.

Vertucci, C. W., & Farrant, J. M. (1995). Acquisition and loss of desiccation tolerance. *Seed development and germination*, 237-271.

Walck, J. L., Hidayati, S. N., Dixon, K. W., Thompson, K. E. N., and Poschlod, P. 2011. Climate change and plant regeneration from seed. *Global Change Biology* 17: 2145-2161.

Walters, C. 2015. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242: 397-406.

Walters, C., and Koster, K. L. 2007. Structural dynamics and desiccation damage in plant reproductive organs. In *Plant Desiccation Tolerance* (pp. 251-280). Blackwell Publishing, Iowa, USA.

Walters C, Farrant JM, Pammenter N, Berjak P (2002) Desiccation stress and damage. In: Black M, Pritchard HW, eds. *Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying*. CAB International, Wallingford. pp. 263–291.

World Conservation Monitoring Centre 1998. *Campomanesia lundiana*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 1998:

e.T35330A9927286. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T35330A9927286.en>. Downloaded on 16 October 2018.

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

Xia, K., Daws, M. I., Hay, F. R., Chen, W. Y., Zhou, Z. K., & Pritchard, H. W. (2012a). A comparative study of desiccation responses of seeds of Asian Evergreen Oaks, *Quercus* subgenus *Cyclobalanopsis* and *Quercus* subgenus *Quercus*. *South African Journal of Botany*, 78, 47-54.

Xia, K., Daws, M. I., Stuppy, W., Zhou, Z. K., & Pritchard, H. W. (2012b). Rates of water loss and uptake in recalcitrant fruits of *Quercus* species are determined by pericarp anatomy. *PLoS One*, 7(10), e47368.

Xia, K., Hill, L. M., Li, D. Z., & Walters, C. (2014). Factors affecting stress tolerance in recalcitrant embryonic axes from seeds of four *Quercus* (Fagaceae) species native to the USA or China. *Annals of botany*, 114(8), 1747-1759.

Xin, X., Jing, X. M., Liu, Y., & Song, S. Q. 2010. Viability loss pattern under rapid dehydration of *Antiaris toxicaria* axes and its relation to oxidative damage. *Journal of integrative plant biology* 52: 434-441.

Yadu, B., Chandrakar, V., Meena, R. K., Poddar, A., & Keshavkant, S. (2018). Spermidine and Melatonin Attenuate Fluoride Toxicity by Regulating Gene Expression of Antioxidants in *Cajanus cajan* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-14.

3- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As sementes de *C. xanthocarpa* apresentaram alta taxa de dessecação devido às características morfoanatômicas de seu tegumento. A alta taxa de desidratação fez com que as sementes tolerassem um conteúdo de água mais baixo do que outras sementes sensíveis à dessecação. Danos e estresses decorrentes da dessecação só ocorreram após 12 h de dessecação, e foi sinalizado pelo acúmulo de espermidina. A atividade enzimática do sistema antioxidante mostrou-se estar desbalanceada com o estresse, mas mesmo assim não houve peroxidação lipídica durante o processo de desidratação. Portanto, presume-se que a natureza do dano em sementes de *C. xanthocarpa* seja mecânico, devido à intensidade da desidratação, mas que mesmo assim não exclui a tentativa da semente em responder ao estresse. Os danos mecânicos referem-se principalmente à desestruturação física e diminuição da fluidez dos sistemas de membrana durante a desidratação, o que é mais comum de acontecer em sementes que apresentam altas taxas de dessecação. As mudanças nos níveis de poliaminas em sementes de *C. xanthocarpa* indicam que este mecanismo é funcional durante o estresse em sementes sensíveis à dessecação, apresentando potencial para maiores investigações. Portanto, a melhor compreensão do comportamento fisiológico das sementes de *C. xanthocarpa* permite um direcionamento dos esforços para conservação. Ademais, este trabalho fornece bases para ampliarmos a perspectiva das sementes nativas sensíveis à dessecação, e como o estudo dos podem abranger as possibilidades de comportamentos em seu ecossistema natural.