

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Museu Nacional

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Botânica)

TESE DE DOUTORADO



**Diapausa em plantas: embriologia e caracterização
ultraestrutural em *Myrciaria floribunda* (H. West ex Wild) O.
Berg (Myrtaceae)**

Diego Pereira Spala

Orientadoras:

Dra. Lygia Dolores R. S. Fernandes

Dra. Sílvia Rodrigues Machado

RIO DE JANEIRO

2019



Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

TESE DE DOUTORADO

**Diapausa em plantas: embriologia e caracterização
ultraestrutural em *Myrciaria floribunda* (H. West ex Wild) O.
Berg (Myrtaceae)**

DIEGO PEREIRA SPALA

Tese de doutorado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica)

Orientadoras: Dra. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes

Dra. Sílvia Rodrigues Machado

RIO DE JANEIRO

2019

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Museu Nacional

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

**Diapausa em plantas: embriologia e caracterização
ultraestrutural em *Myrciaria floribunda* (H. West ex Wild) O.
Berg (Myrtaceae)**

DIEGO PEREIRA SPALA

Aprovada por:

Dr. Lygia Dolores R. S. Fernandes (Presidente)

Dra. Bárbara de Sá Haiad

Dr. Ricardo Cardoso Vieira

Dr. Luiz Ricardo dos Santos Tozin

Dra. Rita de Cássia de Castro Ribeiro

Suplentes:

Dra. Ana Claudia de Macedo Vieira

Dr. Rafael Ribeiro Pimentel

FICHA CATALOGRÁFICA

P734d Pereira Spala, Diego
Diapausa em plantas: embriologia e caracterização
ultraestrutural em *Myrciaria floribunda* (H. West ex
Wild) O. Berg (Myrtaceae) / Diego Pereira Spala. --
Rio de Janeiro, 2019.
65 f.

Orientadora: Dr. Lygia Dolores Ribeiro Santiago
Fernandes .

Coorientadora: Silvia Rodrigues Machado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica), 2019.

1. diapausa. 2. diapausa embrionária. 3.
Myrciaria floribunda. 4. ultraestrutura. I. Ribeiro
Santiago Fernandes , Dr. Lygia Dolores , orient. II.
Rodrigues Machado, Silvia, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA



A todos os Brasileiros, que através de seus esforços foram também responsáveis pelo desenvolvimento desta obra científica.

*Em especial a um Brasileiro, **José Luis Spala** (in memoriam), meu pai, que pelo empenho, amor, dedicação e altruísmo incomparável proporcionou o meu sucesso.*

***"Eu vejo o futuro repetir o passado
Eu vejo um museu de grandes novidades... "***

(O tempo não para)

Agenor De Miranda Araujo Neto / Arnaldo Pires Brandão

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar a minha vida e permitir que tudo tenha acontecido.

A meus pais, minha irmã e melhor amiga, por serem o que tenho de mais precioso na vida. Por todos meus familiares que sempre me encorajaram e me garantiram apoio constante, amor, cuidados e incentivos.

A um homem em especial, José Luis Spala, meu pai, que através de seu altruísmo, trabalho e amor, sempre me proporcionou condições favoráveis a meu desenvolvimento profissional e valores humanos para a construção de minha moral.

Às Dras. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes e Silvia Rodrigues Machado, pelo compromisso em minha orientação e pelos conhecimentos compartilhados, cujas contribuições foram essenciais ao meu crescimento profissional.

À Lygia, ter sido minha “mãe científica” por todos esses anos. Por seu carinho, parceria, dedicação e fonte de inspiração para a minha formação profissional e pessoal. Por ter despertado em mim a maturidade científica tão necessária para a pesquisa acadêmica.

À Prof^a. Dra. Bárbara de Sá Haiad, por ter se apresentado sempre bem disposta a discutir conteúdos, trocar informações, compartilhar seu

conhecimento que é indispensável para o meu amadurecimento científico e pessoal.

À Bárbara, pela amizade, carinho e dedicação de todos esses anos. Por ser fonte de inspiração e tornar a rotina do trabalho laboratorial mais fácil, organizada e prazerosa.

À Prof^a. Dra. Heloísa de Alves Lima, sempre bem disposta a contribuir com minha formação.

À Maria de Fátima Spala, pelos cuidados, amor, dedicação e força em todos os momentos de minha vida.

À Roberta Spala Neves, pelas eternas conversas, cumplicidade, amizade, admiração, carinho e incentivo.

À Fatima Spala, por exemplo de cientista acadêmico e encorajamento constante.

Aos amigos de profissão Daniel Leal, Lareska Zirondi, José Guilherme e Luciene São Leão por acompanharem toda minha trajetória, pelas trocas de informações, pelas parcerias em trabalhos de campo, por toda ajuda ao longo de todo este trabalho e também pelos bons momentos de distração e lazer.

Ao Professor Rafael Pimentel, pela revisão e acompanhamento desta obra ao longo de quatro anos. Pela amizade, competência e disposição prestada a este trabalho.

À Núbia Silva, pela amizade, companheirismo acadêmico e pelo altíssimo desempenho realizado quanto à confecção de lâminas, uma futura anatomista de bons cortes.

Ao Marcos Vinícius Morgado Francisco, pelo companheirismo incomparável, carinho, dedicação e cuidados que contribuíram em diversos momentos para que este objetivo fosse atingido.

A todos os professores do programa de pós-graduação do Museu Nacional/UFRJ que através de suas disciplinas ou sugestões, foram especiais para mim.

Ao Museu Nacional, tido por muitos anos como minha segunda casa, agradeço por ser esse centro de excelência que garante a seus alunos oportunidades incríveis.

A Capes, pela Bolsa de doutorado e pelo auxílio PROAP para o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Museu Nacional, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável tornando tudo mais fácil.

A todos os Brasileiros, que através de seus esforços foram também responsáveis pelo desenvolvimento desta obra científica. E que nenhum mérito é exclusivo e sim um conjunto de ações coletivas.

RESUMO

Sabe-se que animais (e plantas) exibem períodos de atraso reprodutivo - ou seja, pausas entre a fertilização e o nascimento (e a germinação). Tais atrasos no desenvolvimento embrionário em animais são conhecidos como diapausa embrionária: uma dormência restrita aos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. O fenômeno é comum em vários grupos não relacionados filogeneticamente. A diapausa embrionária ainda não foi descrita para plantas, embora existam algumas indicações na literatura sobre a ocorrência de uma pausa significativa entre a floração e o início do desenvolvimento do fruto em um representante da família Myrtaceae. Essa pausa entre floração e desenvolvimento do fruto evidenciou um pro-embrião em lento desenvolvimento, característica de diapausa embriônica. Neste trabalho, investiga-se esse padrão incomum de desenvolvimento embrionário em duas populações de *M.floribunda* da floresta atlântica, uma da restinga e outra da floresta. Nossa hipótese é de que esse fenômeno ocorra em ambas as populações (diapausa embrionária obrigatória) e que haja algumas diferenças ultraestruturais entre os embriões em diapausa e o embrião em desenvolvimento. Para tanto, foram utilizadas análises anatômicas e ultraestruturais. Nossos resultados mostram que a diapausa embrionária foi encontrada em ambas as populações de *M.floribunda*, o que sugere que esse fenômeno é obrigatório. Leva apenas mais dois meses para concluir todo o seu desenvolvimento. Análises ultraestruturais mostram: i) mitocôndrias vacuolizadas durante a dormência; ii) Cristas grandes e uma matriz de mitocôndrias densa em elétrons durante o desenvolvimento do embrião; e iii) heterocromatina durante o período dormente e principalmente eucromatina durante o período de desenvolvimento. Organização celular semelhante e alterações foram registradas em animais. Em analogia com os animais.

ABSTRACT

Animals (and plants) are known to exhibit periods of reproductive delay – that is, pauses occurring between fertilization and birth (and germination). Embryonic diapause in animals is a special kind of dormancy, restricted to the early stages of embryo development. It is common in several groups of vertebrates, including in mammals. Embryonic diapause has not yet been described for plants, although there are some indications in the literature of the occurrence of a significant pause between flowering and the beginning of fruit development in the angiosperm *Myrciaria floribunda* Berg. (Myrtaceae). This gap between flowering and fruit development revealed a pro-embryo into dormancy, which is characteristic of the embryonic diapause. This pause has not yet been associated with dormancy of the embryo. Here, we examine this unusual pattern of embryo development in two populations of *M.floribunda* from Atlantic rain forest, one from restinga and the other from the forest. We hypothesize that this phenomenon occurs in both populations (obligated embryonic diapause) and there are some ultrastructural differences between the embryos in diapause and the developing embryo. To this end, we used anatomical and ultrastructural analyses. Our results show that the embryonic diapause was found in both populations of *M.floribunda*, which suggests that this phenomenon is obligated. It then takes only a further two months to complete their entire development. Ultrastructural analyses show: i) Vacuolated mitochondria during the dormancy; ii) Large cristae and an electron-dense matrix of mitochondria during embryo development; and iii) Heterochromatin during the dormant period and mostly euchromatin during the developmental period. Similar cellular organization and changes have been recorded in animals. In analogy with animals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Áreas de estudo e caracterização das áreas	22
Figura 2: Hábito e aspectos da fenologia de <i>Myrciaria floribunda</i> na APA de Maricá.....	23
Figura 3: Hábito e aspectos da fenologia de <i>Myrciaria floribunda</i> na APA de Maricá e Parnaso	24
Figura 4: Desenvolvimento e anatomia dos frutos	25
Figura 5: Desenvolvimento do pericarpo	26
Figura 6: Embriogênese sexual	27
Figura 7: Embriogênese sexual e sementes sem embrião.....	28
Figura 8: Embriogênese somática	29
Figura 9: Germinação de Sementes	30
Figura 10: Resumo dos eventos no ano de 2016	31
Figura 11: Ultraestrutura das células dos embrião de <i>M. floribunda</i> em diapausa.....	32
Figura 12: Ultraestrutura das células do embrião e endosperma de <i>M. floribunda</i> em diapausa.....	33
Figura 13: Ultraestrutura das células dos embrião de <i>M. floribunda</i> com o desenvolvimento retomado	34
Figura 14: Ultraestrutura das células dos embrião de <i>M. floribunda</i> com desenvolvimento retomado e endosperma	35
Figura 15: Ultraestrutura das proliferações nucelares e de células do embrião de <i>M.floribunda</i> em desenvolvimento	36
Figura 16: Ultraestrutura das células do embrião de <i>M.floibunda</i> em desenvolvimento	37
Figura 17: Ultraestrutura das células do embrião de <i>M.floibunda</i> em desenvolvimento	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Indivíduos de *Myrciaria floribunda* coletados na restinga APA de Maricá/Rj
.....7

Tabela 2: Indivíduos de *Myrciaria floribunda* coletados na floresta ombrófila
(PARNASO de Teresópolis)8

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAIS E MÉTODOS	06
1. Área de estudo	06
2. Anatomia e histoquímica	09
3. Germinação	10
4. Ultraestrutura	11
3. RESULTADOS	12
3.1 Aspectos da fenologia de <i>Myrciaria floribunda</i>	12
3.2 Anatomia do ovário e fruto	14
3.3 Embriogênese sexual	15
3.4 Embriogênese adventícia.....	17
3.5 germinação seminal	18
3.6 Ultraestrutura	19
4. DISCUSSÃO.....	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

Animais e plantas são conhecidos por apresentarem atrasos reprodutivos, ou seja, pausas no mecanismo de reprodução que ocorrem entre a fertilização e o nascimento caracterizando, assim, um lento desenvolvimento embrionário (Orr & Zuk, 2014).

Tais atrasos reprodutivos, em animais, são conhecidos como diapausa embrionária, um tipo de dormência observadas em embriões e já registrada desde invertebrados (copépodes e insetos) até vertebrados (peixes, répteis, aves e mamíferos) (Mapas *et al.*, 2013; Renfree & Shaw, 2000). Este fenômeno resulta em um atraso no nascimento da prole para épocas do ano mais favoráveis em recursos e tem sido considerado uma estratégia evolutiva vantajosa, uma vez que garante melhores condições de sobrevivência dos descendentes. Curiosamente, a diapausa embrionária está presente em táxons não relacionados filogeneticamente, indicando que tenha surgido independentemente algumas vezes durante o curso evolutivo (Mapas *et al.*, 2013; Renfree & Shaw, 2000).

Este fenômeno caracteriza-se pela drástica redução ou cessação de mitoses na fase inicial do desenvolvimento embrionário (Mead, 1993) que pode levar a um estado de animação suspensa do embrião. A diapausa embrionária desencadeia um desenvolvimento descontínuo do embrião, por reduzir o ritmo de divisões celulares durante as fases iniciais da embriogênese e retomar a velocidade de desenvolvimento após seu fim. Os estímulos que desencadeiam essa dormência são vastos e diferem entre os grupos de animais, podendo variar desde taxas hormonais maternas, fatores como

sazonalidade, nutrição, disponibilidade hídrica e até fotoperiodismo (Renfree & Shaw, 2000).

A diapausa embrionária divide-se em duas categorias: diapausa facultativa e diapausa obrigatória. A diapausa facultativa está relacionada à fatores endógenos, como a presença de um neonato estimulando a lactação. Tal estímulo influencia taxas hormonais materna que mantém uma segunda prole, ainda em fase inicial da embriogênese, em diapausa no útero materno. Esta categoria promove uma vantagem seletiva, uma vez que garantindo a permanência de um embrião em diapausa acaba por levar à formação de prole em sequência (Paria *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2004). Por outro lado, a diapausa obrigatória é fortemente relacionada com fatores ambientais e é observada em todas as gestações de uma determinada espécie. Esta variante caracteriza-se por sincronizar o nascimento da prole com épocas mais favoráveis em recursos (Rodney & Mead, 1993 ; Lopes *et al.*, 2004).

Ao analisar embriões de ratos em diapausa, Mc Laren (1968) identificou que nas primeiras 72 horas ocorreram divisões mitóticas nos tecidos embrionários, as quais cessaram a partir do terceiro dia. Já Sherman & Barlow (1972) ao analisarem os blastocistos de camundongos sob o ponto de vista ultraestrutural constataram que a síntese de DNA também é mantida nos primeiros dias e só então se observa a cessação desta síntese, com a maioria das células em fase G1 ou G2 do ciclo celular (sugerindo parada na divisão das células). Na diapausa embrionária a transcrição de RNA é mantida, sugerindo relação entre a quebra da dormência e a síntese de DNA, já que a síntese é retomada quando o embrião sai desse estágio de dormência (Chavez & Blerkom, 1979).

Por outro lado, em camundongos, após a retomada do desenvolvimento, foi observada a reativação das atividades nucleares através de análises da estrutura cromossômica (Zheng *et al.*, 2014). Zheng e colaboradores (2014) ao analisarem ultraestruturalmente o nucléolo de células embrionárias em períodos pós-retomada do desenvolvimento, constataram que estes apresentavam eucromatina (transcrição ativa), enquanto que os embriões em diapausa apresentavam predominantemente a heterocromatina, isto é, estrutura cromossômica condensada (- transcrição não ativa).

Em embriões de camundongo em diapausa, não é observada a presença de poliribossomos, sendo estes observados somente entre 12 a 16 horas após a reativação do embrião (saída da diapausa) (Weitlauf & GreenWald, 1968 ; Weitlauf, 1973). Tais observações, segundo os autores, sugerem uma redução na síntese proteica nos embriões em diapausa.

Há também, dados sobre alterações na ultraestrutura mitocondrial, em camundongos, observadas em embriões em diapausa e embriões que retomaram desenvolvimento. Bergstrom & Nilson (1975) constatam que, após a indução hormonal, promotora da quebra da diapausa, as mitocôndrias embrionárias apresentam matriz elétron-densa e cristas largas, sugerindo intensa atividade metabólica. Apesar dos embriões em dormência e não-dormentes apresentarem número populacional mitocondrial equivalente, embriões em diapausa apresentam um maior percentual de mitocôndrias com vacúolos nas cristas, indicando baixa atividade metabólica (Zheng Fu *et al.*, 2014).

Dormência embrionária , em plantas, é um fenômeno vastamente registrado na literatura e impede a germinação das mesmas sob condições desfavoráveis (Bewley,

1997). O desenvolvimento da semente e do embrião compreende duas fases principais: a embriogênese e a maturação da semente. A dormência embrionária em plantas é induzida durante a fase de maturação da semente (Holdsworth *et al.*, 2008 ; Graeber, 2012) e é caracterizada por baixas atividades metabólicas e pouco crescimento. Assim, o fenômeno da diapausa embrionária não deve ser confundido com o mecanismo de dormência de sementes, amplamente estudado na literatura botânica, que compreende um embrião já diferenciado, em fase de maturação (Holdsworth *et al.*, 2008) a espera de condições ambientais que promovam a germinação (Copete *et al.*, 2011; Baskin & Baskin, 1998; Ptak *et al.*, 2012).

Sementes dependem da retomada da respiração mitocondrial para germinarem e por isso são consideradas um modelo interessante para investigar as propriedades mitocondriais no que diz respeito a tolerância à dessecação. A maioria das sementes é tolerante a a seca, o que permite que o ciclo celular seja suspenso por longos períodos e posteriormente restabelecido em condições favoráveis. Porém, as chamadas sementes ortodoxas desidratam durante a fase final de maturação, chegando a um baixo teor de água, entre 5% e 15%, dependendo da espécie. A respiração é geralmente afetada pelo estresse hídrico, influenciando na taxa de fotossíntese. A capacidade das mitocôndrias da semente em lidar com uma severa desidratação indica que essa organela desempenha papel vital na tolerância à desidratação (Owen & Macherel, 2009).

Enquanto a dormência pré-germinativa em plantas, na fase de maturação da semente, é vastamente estudada na literatura botânica, embriões no início de desenvolvimento que entram em estágio de cessação ou redução das divisões mitóticas, relacionados ou não com condições ambientais - diapausa nos animais - foi pela

primeira vez registrado e descrito em fases iniciais da embriogênese vegetal por Spala (2013). Tal trabalho abrangeu análises anatômicas e ontogenéticas da semente e do fruto de *Myrciaria floribunda*, encontrando-se o artigo pronto para submissão: **“First record of embryonic diapause (early embryo dormancy) in plants: A case study of guavaberry (Myrtaceae) from the Atlantic Rainforest”**. *Myrciaria floribunda* é uma Myrtaceae nativa da Mata Atlântica presente em praticamente todo litoral Brasileiro; apresenta hábito arbustivo à arbóreo com crescimento lento, podendo atingir até 20 metros de altura, sendo de fácil identificação por apresentar uma casca esbranquiçada (Franceschinelli *et al.*, 2007) e/ou avermelhada que descasca em lâminas. Seus frutos são consumidos *in natura* e nas formas de doces e geleias, sendo também muito apreciados como aromatizantes de cachaças (Lorenzi *et al.*, 2015).

Após a polinização dos indivíduos de *M. floribunda* da APA da restinga de Maricá, RJ constatou-se o início do desenvolvimento embrionário logo nas primeiras semanas, que após certo tempo cessou ou continuou vagarosamente por um período de sete meses, coincidindo com épocas do ano de baixo índice pluviométrico. Durante esta fase não houve desenvolvimento dos frutos. Após este período, ocorreu aceleração/ retomada do desenvolvimento embrionário que coincidiu com o início do desenvolvimento dos frutos, ambos atingindo a maturação em cerca de dois meses. Tal retomada de desenvolvimento também coincidiu com maiores índices pluviométricos. (Spala, 2013).

Com base nesse contexto, foram formuladas as seguintes hipóteses: (1) A ocorrência de diapausa embrionária em *Myrciaria floribunda* é obrigatória. (2) Ocorrem

variações no desenvolvimento embrionário em diferentes ambientes. (3) Há diferenças ultraestruturais do embrião em diapausa e embrião com desenvolvimento retomado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os objetos de estudo foram duas populações de *Myrciaria floribunda* localizadas na APA da restinga de Maricá e no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ.

O estudo foi realizado no período de agosto de 2015 a agosto de 2018.

2.1. ÁREA DE ESTUDO

A) O cordão interno da restinga da APA (Área de Proteção Ambiental) de Maricá- RJ, situa-se no litoral fluminense, município de Maricá, entre os distritos de Barra de Maricá e Itaipuaçu, entre as coordenadas 22°55'a 22°54'S e 42°48'a 42°54'W. (Fig. 1A). Na área de estudo, a população distribui-se sobre solo arenoso, em moitas intercaladas por espaços praticamente desnudos (Fig. 1A'). Os indivíduos de *M. floribunda* coletados nessa área de estudo estão listados na Tabela 1.

O clima é tropical úmido (Koeppen, 1948). Em Maricá, a precipitação média é 1.130 milímetros por ano, concentrados entre outubro e março, mas sem uma estação seca no inverno. Anualmente, a temperatura média do ar , de máximos e mínimos, são 28.0°C e 15.3°C, respectivamente, com média anual de 23.6°C, com julho sendo o mês mais frio e fevereiro o mais quente (Mantovani & Iglesias, 2001).

B) A Mata ombrófila densa do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), localiza-se na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro , entre as coordenadas 22°52'

e 22°54'S e 42°09' e 45°06'W, e altitudes variando de 300 a 2.263m (Fig 1B). O parque abrange os municípios de Teresópolis, Petrópolis, Magé e Guapimirim, com distintas fisionomias florestais (floresta pluvial baixo-montana e montana; floresta pluvial alto-montana e campos de altitude) que variam com a altitude (ICMBio, 2008) (Fig 1B'). Os indivíduos de *M. floribunda* coletados nessa área de estudo estão listados na Tabela 2.

O clima na região é classificado como mesotérmico, com verões brandos, sem estação seca e abundante precipitação (superior a 2.000 mm). A alta pluviosidade encontrada da região é devido a ocorrência de chuvas orográficas provocadas pela presença da Serra do Mar (ICMBio, 2008).

Tabela 1: Indivíduos de *Myrciaria floribunda* coletados na restinga de Maricá/Rj.

Indivíduo	Local	Posição Geográfica	Observação
MFR - 1	Cordão interno da da APA	Altitude: 9m Lat: 22 57'53''S Long: 42 53'42'' O	Arbusto com casca esbranquiçada
MFR - 2	Cordão interno da da APA	Altitude: 10 m Lat: 22 57'53'' S Long: 42 53'41'' O	Arbusto
MFR - 3	Cordão interno da da APA	Altitude: 6m Lat: 22 57'50''S Long: 42 53'40'' O	Arbusto
MFR - 4	Cordão interno da da APA	Altitude: ??m Lat: 22 57'50''S Long: 42 53'40'' O	Arbusto
MFR - 5	Cordão interno da da APA	Altitude: 11m Lat: 22 57'49''S Long: 42 53'40'' O	Arbusto
MFR - 6	Cordão interno da da APA	Altitude: 4m Lat: 22 57'49''S Long: 42 53'40'' O	Arbusto

Indivíduo	Local	Posição Geográfica	Observação
MFR - 7	Cordão interno da da APA	Altitude: 7m Lat: 22 57'48''S Long: 42 53'41'' O	Arbusto
MFR - 8	Cordão interno da da APA	Altitude: -1m Lat: 22 57'49''S Long: 42 53'41'' O	Arbusto

Tabela 2: Indivíduos monitorados de *Myrciaria floribunda* na mata ombrófila (PARNASO)

Indivíduo	Local	Posição Geográfica	Observação
MFP - 1	Sede Guapimirim Trilha Mãe d'água	Altitude: 381m Lat: 22 29' 37'' S Long: 42 59' 59'' O	Árvore de 5 metros, Tronco descamando
MFP - 2	Sede Guapimirim Trilha Mãe d'água	Altitude: 381 m Lat: 22 29' 38'' S Long: 42 59' 58'' O	Árvore de 7 metros, Tronco ligeiramente marrom e descamando
MFP - 3	Sede Guapimirim Trilha Mãe d'água	Altitude: 377m Lat: 22 29' 39'' S Long: 42 59' 57'' O	Arvoreta de 5 metros com tronco descamando
MFP - 4	Sede Guapimirim Próximo à trilha do poço da capela	Altitude: 356m Lat: 22 29' 41'' S Long: 42 59' 52'' O	Arvoreta de 4 metros com tronco esbranquiçado e liso
MFP - 5	Sede Guapimirim Margeando a estrada ao lado direito do Museu.	Altitude: 400m Lat: 22 29' 41'' S Long: 43 00' 05'' O	Arvoreta de 5 metros, tronco descamando
MFP - 6	Sede Guapimirim Margeando a estrada ao lado esquerdo do Museu.	Altitude: 398m Lat: 22 29' 39'' S Long: 43 00' 05'' O	Árvore de 10 metros com tronco ligeiramente marrom e descamando.
MFP - 7	Sede Guapimirim Início da trilha do poço verde	Altitude: 406m Lat: 22 29' 38'' S Long: 43 00' 06'' O	Árvore de 9 metros com tronco ligeiramente marrom e descamando.
MFP - 8	Sede Guapimirim Trilha do poço verde	Altitude: 422m Lat: 22 29' 35'' S Long: 43 00' 07'' O	Arvoreta de 3 metros com tronco liso

Indivíduo	Local	Posição Geográfica	Observação
MFP - 9	Sede Guapimirim Trilha do poço verde	Altitude: 427m Lat: 22 29' 34" S Long: 43 00' 09" O	Arvoreta de 4 metros com tronco liso
MFP - 10	Sede Teresópolis Trilha Cartão Postal	Altitude: 1.144m Lat: 22 27' 26" S Long: 42 59' 41" O	Arvoreta de 4 metros
MFP - 11	Sede Teresópolis Trilha Cartão Postal	Altitude: 1.212m Lat: 22 27' 28" S Long: 42 59' 36" O	Arvoreta de 4 metros com tronco marrom ligeiramente avermelhado e descamando
MFP - 12	Sede Teresópolis Trilha Cartão Postal	Altitude: 1.224m Lat: 22 27' 29" S Long: 42 59' 33" O	Árvore de 5 metros com tronco avermelhado e descamando
MFP - 13	Sede Teresópolis Trilha Cartão Postal	Altitude: 1.245m Lat: 22 27' 27" S Long: 42 59' 29" O	Árvore de 10 metros com tronco grosso e avermelhado, descamando

2.2 ESTUDOS ANATÔMICOS E HISTOQUÍMICOS

Para o estudo anatômico, frutos foram coletados ao longo do desenvolvimento - desde flor em pós-antese até frutos maduros.

As coletas foram realizadas em intervalos de 15 dias. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído 4% + glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2 (Gahan, 1984), submetidas à baixa pressão, desidratadas em série etílica, emblocadas em Historesin®(Leica) e seccionadas com navalha de vidro em micrótomo rotativo, modelos (Spencer 820 American Optical Co e RM2255 - Leica). Secções seriadas de 1-3 μ m de espessura foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05% (Feder & O'Brien, 1968).

Análises, mensurações e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio Olympus BX-51 com câmera Q color 5 e software Image-Pro Express e em microscópio Leica DM500 com câmera Leica ICC50 HD e software LAS EZ versão 3.0.0. As imagens foram trabalhadas no software Photoshop 6.0 e as pranchas montadas utilizando o CorelDRAW 12.

Para testar a presença das principais classes de metabólitos secundários, secções de material embocado e fresco, obtidas em micrótomo rotativo e de Ranvier foram tratadas com: (a) Sudan Black e Sudan IV, para compostos de natureza lipofílica (Jensen, 1962), (b) Lugol, para amido (Langeron, 1949), (c) solução de dicromato de potássio, para compostos fenólicos (Johansen, 1940), (d) Vermelho de Rutênio, para substâncias pécticas (Langeron, 1949), (e) ácido acético e ácido clorídrico para a determinação da natureza química dos cristais através de testes de solubilidade diferencial (Maclean & Ivemey-Cook, 1952).

2.3 GERMINAÇÃO

As sementes foram retiradas manualmente dos frutos e, nos dias subsequentes às coletas de campo, submetidas à germinação em laboratório (n=20), em temperatura ambiente, usando-se placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada. Os experimentos de germinação foram acompanhados diariamente. Foi considerada germinada a semente que apresentou o rompimento dos tegumentos e pode-se observar a projeção da radícula.

2.4 ESTUDO ULTRAESTRUTURAL

Para análise ultraestrutural, amostras foram fixadas em glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) por 24 horas ou Karnovsky, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) incubadas em acetato de uranila (0,5% em solução aquosa), desidratadas em séries crescentes de soluções de acetona e incluídas em Araldite. As secções ultrafinas (50nm) foram contrastadas com solução saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit, a 60kv.

3. RESULTADOS

3.1 Aspectos da fenologia de *Myrciaria floribunda*

- Na APA da restinga de Maricá.

Os indivíduos de *M. floribunda* estudados na restinga de Maricá apresentaram hábito variando de arbustivo a arbóreo, com 1 a 3 metros de altura, casca esbranquiçada e esfoliante (Fig 2 A e B). As folhas apresentaram aroma típico, facilmente detectável.

No início do mês de setembro de 2015, observou-se a presença de frutos inconspícuos com coloração amarela-esverdeado nos ramos. Esses frutos apresentaram região cicatricial no ápice, proveniente da queda do perianto e estilete, que pode ser facilmente confundida com um ramo quebrado (Fig.2 C)

No mês de outubro, os frutos até então inconspícuos, apresentaram início de crescimento e passam de tamanhos inferiores a 1mm em setembro à 2 a 4mm tornando-se perceptíveis nos ramos. A coloração dos frutos também se tornou verde mais intenso (Fig. 2 D).

Após algumas semanas de intensas chuvas, no início de dezembro, os frutos apresentaram crescimentos ainda mais expressivos com tamanhos variando de 8 a 10mm e a coloração que variou do esverdeado ao laranja, quando maduros (Fig. 2 E e detalhe). A maioria dos frutos nesta época já estavam maduros e sendo dispersos (Fig. 2 F).

Após os meses de janeiro, fevereiro e março (de 2016) bastante chuvosos, em meados de abril até o início de maio os indivíduos de *Myrciaria floribunda*

floresceram. A flor apresenta sépalas verdes e pétalas alvas/brancas. Os estames são numerosos e destacam-se na flor em antese (Fig. 3A e detalhe). As flores são efêmeras entrando em senescência que é caracterizada pela queda do perianto e estames, no mesmo dia da sua antese. O estilete foi mantido nos ovários por mais sete dias (Fig 3B). Nessa fase, os ovários mantidos na planta mãe apresentavam coloração esverdeada e tamanhos inferiores a 1mm (Fig 3C).

Nos meses seguintes os ovários tornaram-se menos vistosos passando de esverdeados à amarelados e por fim esbranquiçados. Tais ovários podem ser facilmente confundidos com uma parte do ramo vegetativo quebrado (Fig. 2B).

No final do mês de setembro, cinco meses após a floração, os ovários iniciaram seu desenvolvimento em frutos. De esbranquiçados e inconspícuos passam a esverdeados e mais discerníveis (Fig 2. C e D).

Posteriormente, em outubro e novembro os frutos atingiram a maturidade em apenas dois meses, passando de 1mm à 10mm e de esverdeados à alaranjados que emanam cheiro adocicado característico (Fig 2. E e F).

- *No Parque Nacional da Serra dos Órgãos.*

Os indivíduos estudados na área do Parque Nacional da serra dos Órgãos apresentam hábito arbóreo, variando de 3 a 10 metros de altura (Fig 3 D). O DAP mostrou-se variável, há indivíduos com tronco delgado (DAP = 15cm) e outros com troncos mais grossos (DAP = 40cm) . O tronco de alguns indivíduos era esfoliante e de coloração marrom (Fig 3E) à verde, já, outros apresentaram o tronco liso. O aroma das folhas desses indivíduos era pouco perceptível.

No início do mês de janeiro de 2018, os indivíduos floresceram (Fig. 3F). As flores efêmeras, entraram em senescência ao final do mesmo dia em que entram em antese (Fig 3G). Nos meses subsequentes, fevereiro, março e abril identificou-se a manutenção dos ovários nos ramos da planta mãe (Fig. 3 H).

3.2 Anatomia do ovário e fruto

Os frutos coletados no final do mês de setembro apresentaram aproximadamente 1mm de comprimento e a partir deste período iniciaram seu desenvolvimento tornando-se mais conspícuos, vistosos e esverdeados até que atingissem a maturidade (no início de dezembro) com aproximadamente 10mm e coloração alaranjada (Fig. 4A , B, C e D).

Com tamanhos inferiores a 1mm, os ovários apresentaram epiderme uniestratificada com células retangulares e altas concentrações de conteúdos fenólicos (Fig. 4E). O tecido parenquimático apresentou células globosas e em toda sua extensão também é rico em fenóis (Fig. 4E e F). Cavidades secretoras foram encontradas nas camadas subepidermicas e nas camadas mais internas do tecido parenquimático, há grande disposição de idioblastos drusíferos principalmente circundando o ovário (Fig 4E). Na região apical notou-se um espesso tecido de cicatrização repleto de células retangulares com fenóis e parede espessa com suberina. (Fig 4F)

A partir de então o pericarpo iniciou seu desenvolvimento marcado pela abundância do desenvolvimento de cavidades secretoras subepidérmicas que aumentaram de volume progressivamente e levaram ao crescimento em diâmetro do fruto (Fig. 5A). A região parenquimática situada abaixo da porção rica em cavidades secretoras estende-se até a epiderme da face interna e teve o desenvolvimento

caracterizado por numerosas mitoses e presença de mucilagem nos espaços intercelulares (Fig 5B), idioblastos drusíferos e fenólicos. Estes dois últimos, predominaram a região que circunda os óvulos (Fig. 5C).

À medida que o fruto se desenvolve a abundância de conteúdos fenólicos diminuiu no sentido centrífugo e houve um progressivo aumento de mucilagem nos espaços intercelulares. Na maturidade do fruto, observou-se nas células parenquimáticas, no sentido centrífugo, a retração do citoplasma e gradual redução de sua densidade. Esta região do parenquima foi progressivamente substituída por uma matriz mucilagínosa (Fig. 5C)

3.3 Embriogênese sexual

Sementes coletadas no mês de maio apresentaram a formação da testa caracterizada por grande quantidade de idioblastos fenólicos no tegumento. A região micropilar mostrou-se formada pelo único tegumento presente e tecido nucelar espesso (Fig. 6A). Internamente ao tegumento, identificaram-se camadas de tecido nucelar com células de vacuoma desenvolvido e citoplasma denso. As células nucleares mais próximas a região micropilar estavam repletas de grãos de amido conspícuos (Fig.6B). No interior da semente, logo após as camadas nucleares, o zigoto caracterizou-se como uma célula diferenciada e polarizada. Esta célula tem citoplasma denso, rico em grãos de amido rodeando o núcleo que é conspícuo. Enquanto o núcleo do zigoto está voltado para a célula média a região do vacuolo está voltada para a micrópila (Fig. 6C e detalhe).

Nessa fase, notou-se também embriões bicelulares, ancorados à região micropilar. As células embrionárias apresentaram grande quantidade de grânulos de amido dispostos em três unidades, o núcleo era evidente, o citoplasma era denso e o vacúolo era conspícuo (Fig 6D). Os limites celulares do endosperma foram pouco discerníveis, este tecido caracteriza-se por um material citoplasmático distribuído no interior da semente (não celularizado) (Fig.6 E).

Em junho, o embrião apresenta poucas células com características meristemática. O citoplasma é bastante denso e o núcleo é evidente. Nesta fase já está estabelecido um suspensor bicelularizado, de células com vacúolo desenvolvido e que ancora o embrião a região micropilar. Nesta fase o endosperma inicia progressivamente a formação de paredes em suas células (Fig. 6F)

Em julho, o embrião ganhou poucas novas células e estas apresentaram as mesmas características meristemáticas. Já o endosperma apresentou-se celularizado com células de vacúolo bastante desenvolvido (Fig. 7A). Já em agosto o embrião apresentou-se em fase globular inicial. O suspensor era bicelularizado com células vacuolizadas e de contorno retangulares (Fig. 7B).

Ao longo de todos esses meses, notou-se também sementes vazias, sem evidências de endosperma ou embriões (Fig. 7C). Em outros casos, há sementes formadas apenas por tegumento e nucelo e material celular degenerado próximo a região micropilar (Fig. 7D).

No final de setembro, quando os frutos apresentam 1mm, o embrião em fase globular apresenta diferenciação de protoderme. As células abaixo da protoderme

apresentam padrão de divisões periclíticas e citoplasma denso. Há células na porção basal embrionária ricas que grânulos de amido. O suspensor é caracterizado por uma célula grande, em comparação as demais células embrionárias, e com vacúolo bastante desenvolvido (Fig. 7 E).

3.4 Embriogênese adventícia

Além do desenvolvimento de embriões de origem sexual, as análises das sementes ao longo do desenvolvimento do fruto também evidenciaram embriões adventícios de origem nucelar. No nucelo destas sementes, foi comum observar proliferações intrusivas de células em uma determinada região do nucelo. Tais células proliferativas apresentam vacuoma desenvolvido (Fig. 8A).

Nessas proliferações, em alguns casos, observou-se uma célula diferenciada com núcleo evidente e citoplasma rico em amido (Fig. 8B).

Um mês e meio após a floração, no tecido nucelar diferenciou-se um pró-embrião bicelular, cujas células exibiam citoplasma denso, núcleo evidente e rico em amido no citoplasma (Fig. 8C). Outros embriões adventícios originaram-se até mesmo de células nucleares no polo calazal (Fig. 8D). Estes embriões apresentam células com vacúolo conspícuo (Fig. 8C).

Dois meses após a floração, embriões adventícios com células apicais globosas, núcleo grande e vacuoma bem desenvolvido foram observados. Na parte basal do embrião, ocorreram duas células retangulares com vacúolo bem desenvolvido. Todas as células embrionárias nesse estágio apresentaram grãos de amido (Fig. 8E).

Em frutos com 2mm, cinco meses após a floração, verificou-se sementes com embriões em fase de torpedo, caracterizados pelo alongamento dos cotilédones e eixo hipocotilo-radícula diminuto. Esse embrião estava ancorado em células nucelares não adjacentes a região micropilar (Fig. 8F).

3.5 germinação seminal

As sementes submetidas a germinação apresentaram a emergência radicular 18 dias após o início do experimento (Fig. 9A). A radícula mostrou-se esbranquiçada e delgada. Vinte dias após a protusão da primeira radícula, ou seja, 38 dias após as sementes serem submetidas a germinação, notou-se o aparecimento de um segundo eixo bastante próximo ao primeiro eixo radicular (Fig. 9B). Esse segundo eixo germinativo é coloração avermelhada e apresentou intensa pilosidade. (Fig. 9C)

O eixo radicular apresentou epiderme uniestratificada com espessamento de parede celular. Abaixo da epiderme, no tecido parenquimático identificou-se de três a quatro camadas de células globosas e vacuolizadas. Nessa região notou-se por vezes, espaços intercelulares. Internamente a esse estrato parenquimático, foi possível identificar células do parênquima de contorno retangulares e impregnadas de conteúdos fenólicos. Internamente ao parênquima, notou-se a presença de cilindro vascular sólido em que destacavam-se os elementos de vaso com parede celular espessadas (Fig. 9D).

O segundo eixo a emergir do embrião apresentou epiderme uniestratificada de contorno irregular e parede espessa. O parênquima apresentou células globosas com vacúolos conspícuos e abundância em fenóis. Por vezes, foi possível identificar espaços intercelulares nessa região parenquimática. Abaixo dos estratos parenquimáticos

identificou-se uma camada de células densamente coradas e de contorno retangulares. Os feixes vasculares circundam uma região medular com células circulares e vacuolizadas. Foi possível identificar atividade cambial entre as células do xilema e floema (Fig. 9E).

A figura 10 resume o desenvolvimento do fruto e da embriogênese, no ano de 2016, da população de *Myrciaria floribunda* da APA de Maricá-RJ.

3.6 Ultraestrutura

Embrião em diapausa

Dois meses após a floração, embriões em diapausa apresentaram suspensor com duas células, sendo as paredes externas (aquelas voltadas para o endosperma), espessadas e as paredes internas, em contato com o embrião propriamente dito, delgadas (Fig. 11A) e interconectadas por plasmodesmos (Fig. 11B). O protoplasto das células do suspensor, apresentou vacuoma desenvolvido ocupando quase todo o volume celular, atravessados por cordões citoplasmáticos, e com a membrana do tonoplasto rompida em algumas porções, (Fig. B-C). Notou-se pequenos amiloplastos dispersos no citoplasma (Fig. 11C) e vesículas com ribossomos associados à membrana dispostas na periferia do citoplasma, além de ribossomos livres (Fig. 11D).

O embrião propriamente dito apresentou células de paredes delgadas com plasmodesmos (Fig. 11D). O protoplasto era fortemente eletrondenso, o núcleo e a membrana nuclear, por vezes ausente (com interrupções), eram evidentes e notou-se heterocromatina (Fig. 11E). O nucleolo era conspícuo, o retículo endoplasmático rugoso apresentou disposição linear e ocorreu próximo ao núcleo (Fig. 11F). Numerosos

ribossomos livres estavam presentes em todas as regiões citoplasmáticas (Fig. 11F). Nesta fase, notaram-se poucas mitocôndrias com cristas pouco evidentes e matriz elétron-translúcida (Fig. 11F) e muitas mitocôndrias intumescidas, desprovidas de cristas e com matriz elétron-translúcida (Fig. 12A e detalhe). O vacuoma era formado por vacúolos de diferentes dimensões e apresentaram tonoplasto íntegro (Fig. 12B). Os dictiossomos eram diminutos e ocorrem na periferia celular (Fig. 12C)

O endosperma apresentou paredes com fibrilas de celulose desorganizadas na região em contato com o embrião propriamente dito. As células deste tecido apresentaram citoplasma reduzido e vacuoma desenvolvido que ocupava quase que a totalidade do volume celular com material membranoso no interior (Fig. 12D). Nestas células houve retração protoplasmática; o citoplasma é periférico com núcleo e nucléolo evidentes (Fig. 12D). Notou-se também presença de elaioplastos em diferentes estádios de desenvolvimento, alguns destes fusionaram-se à membrana plasmática (Fig. 12E). Dictiossomos bem desenvolvidos com as extremidades das cisternas dilatadas formaram vesículas e ribossomos livres estavam dispostos no citoplasma (Fig. 12 E). As mitocôndrias do endosperma possuíam matriz elétron-densa e cristas evidentes (Fig. 12F).

Embrião retomando o desenvolvimento

Cinco meses após a floração e paralelamente ao início do desenvolvimento dos frutos, em algumas células epidérmicas do embrião houveram divisões periclinais (Fig. 13A). As células embrionárias nesta fase apresentaram parede celular com muitos plasmodesmos e, posteriormente, houve o espessamento da parede (Fig. 13B). O

citoplasma era denso e abundante; o vacuoma era formado por numerosos vacúolos de tamanhos variados, com distribuição uniforme e continha material floculado (Fig. 13C), ou resquícos de material membranoso em seu interior (Fig. 13D). O núcleo celular nesta fase era volumoso, esférico e ocupava a região central da célula (Fig 13 A e B).

Amiloplastos em diferentes estádios de diferenciação foram encontrados em toda região citoplasmática das células embrionárias (Fig 13.E); houveram também amiloplastos cujas membranas externas estavam parcialmente degradadas, que eram conspícuos, elétron-translúcidos e em início do processo de hidrólise que distribuem-se pelo citoplasma (Fig. 13F). Ainda na região citoplasmática notou-se plastídeos lamelares e retículo endoplasmático rugoso (RER) com disposição linear (Fig. 14A). Os dictiossomas caracterizaram-se por serem inconspícuos e apresentarem de duas a três cisternas (Fig. 14B). As mitocôndrias eram numerosas, algumas apresentaram cristas discerníveis e matriz elétron-densa, e outras apresentaram a matriz eletron-translucida (Fig. 14C).

O núcleo das células embrionárias era centralizado e o envoltório nuclear era ininterrupto (Fig. 13F). Em algumas poucas regiões nucleares o DNA estava disposto em heterocromatina, apresentando-se em sua maior porção sob a forma de eucromatina (Fig. 14D). O nucléolo nestas células mostrou-se evidente em algumas células, em outras e de maneira mais frequente, apresentou menor densidade. (Fig. 14E).

O endosperma caracterizou-se por apresentar células vacuolizadas e com o citoplasma reduzido a uma delgada camada de na periferia celular. O núcleo apresentou

envoltório nuclear sinuoso com um grande nucléolo. O citoplasma apresentou mitocôndrias com cristas evidentes e matriz eletrônica-densa, numerosos corpos lipídicos, RER situado na periferia citoplasmática e houve também a presença de grande quantidade de corpos multivesiculares (Fig 14F).

Ao longo do desenvolvimento seminal, notou-se a proliferação de células nucleares no sentido centrípeto, em direção ao endosperma (fig. 15A). Essas células proliferativas apresentaram parede bastante espessa e o citoplasma denso com núcleo e nucléolo conspícuos, mitocôndrias com cristas evidentes e matriz eletrônica-densa. Ainda nestas células, os vacúolos eram numerosos e diminutos e grãos de amido dispostos em três unidades e corpos lipídicos também foram identificados (Fig. 15B).

Embrião em desenvolvimento

Os embriões em desenvolvimento estão em processo de divisão celular e as células embrionárias apresentaram paredes celulares delgadas (Fig. 15C) interconectadas por plasmodesmos (Fig. 15D). Nessas células o núcleo apresentou nucléolo evidente e DNA predominantemente em eucromatina, com as regiões em heterocromatina mais próximas a membrana nuclear (Fig. 15E). O citoplasma era abundante e rico em ribossomos (Fig. 15C), com numerosas mitocôndrias com cristas evidentes e matriz eletrônica-densa (Fig. 15D, F). Plastídeos polimórficos mostraram-se abundantes e caracterizados por apresentar um istmo na região central (Fig. 16.A); corpos lipídicos de tamanhos variados foram observados no interior dos vacúolos (Fig. 16B). Dispostos na periferia citoplasmática notou-se uma grande população de dictiosomos, com numerosas cisternas de extremidades dilatadas, formando vesículas

(Figs. 16C-D) que se fundem à membrana plasmática (Fig. 16D). Nas adjacências dos dictiosomos, ocorrem elementos do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 16C).

Numerosos vacúolos de tamanhos distintos estão distribuídos em todo o protoplasto (Figs. 16E-F). Em algumas regiões, esses vacúolos fundem-se, originando vacúolos maiores (Fig. 16F) que podem apresentar conteúdo granular ou restos membranosos (Fig. 16E-F). O RER é extensivo e apresenta disposição linear (Fig. 17A).

4. Discussão

O presente trabalho se propôs a investigar se a ocorrência de diapausa embrionária em *Myrciaria floribunda* é obrigatória ou facultativa. Sendo esta dormência obrigatória, possíveis variações no desenvolvimento embrionário ocorreriam em diferentes ambientes. O trabalho objetivou também investigar diferenças ultraestruturais dos embriões em diapausa para os embriões em desenvolvimento. Para a comprovação de tais hipóteses, foram realizadas análises anatômicas e ultraestruturais de embriões de duas populações de *M.floribunda* estabelecidas em área restinga (APA - Maricá-RJ) e mata ombrófila densa (PARNASO - Teresópolis-RJ). As análises de campo e anatômicas confirmaram que a diapausa embrionária é obrigatória, uma vez que tanto os indivíduos analisados no PARNASO quanto os da restinga, apresentaram um lento desenvolvimento nas fases iniciais embrionárias. As análises ultraestruturais também mostraram diferenças significativas nos padrões mitocondriais, sendo cristas e matrizes ausentes durante a diapausa embriônica e matriz elétron-densas com cristas evidentes em embriões em desenvolvimento. A estrutura de DNA foi outro caráter variável nessas duas fases embrionárias: heterocromatina predominantemente durante a diapausa embriônica e eucromatina em embriões em desenvolvimento.

O fenômeno da diapausa, bastante estudado e descrito em insetos, caracteriza-se por ser um desenvolvimento lento ocorrente em qualquer estágio inicial, não restrito a embriogênese, da vida de um inseto. A diapausa relaciona-se a mudanças fisiológicas que leva à uma dormência temporária. A retomada do ritmo de desenvolvimento não necessariamente está relacionada ao fator que desencadeou a diapausa (Romoser, 1990; Csiro, 1991; Gullan & Cranston, 2000). Esse fenômeno pode ser facilmente confundido

com quiescência, uma parada imediata ou um desenvolvimento pouco expressivo em qualquer fase da ontogenia de um indivíduo. Condições adversas desencadeiam a quiescência em animais e a retomada do desenvolvimento nesses casos está sempre relacionada ao reestabelecimento das condições favoráveis. Diferentemente de quiescência, os fatores que desencadeiam o fim da diapausa e, conseqüentemente, a retomada do desenvolvimento nem sempre são os mesmo que determinaram esta dormência (Romoser, 1990; Csiro, 1991; Gullan & Cranston, 2000).

A diapausa não se restringe aos insetos, tendo sido identificada em uma grande diversidade de outros invertebrados e até mesmo vertebrados (Mapas *et al.*, 2013; Renfree & Shaw, 2000). O termo se confunde um pouco na literatura zoológica tendo sido empregado como sinônimo de dormência nas fases iniciais da embriogênese. Dormências embrionárias em animais, mais especificamente em vertebrados (mamíferos) geralmente ocorrem em fases iniciais do desenvolvimento embrionário e são enquadradas em uma categoria de diapausa, a diapausa embrionária (Renfree & Shaw, 2000; Lopes *et al.*, 2008; Ptak *et al.*, 2012; Zuk & Orr, 2014). Apesar do período das chuvas coincidir com o início e fim da diapausa embriônica em *Myrciaria floribunda*, a utilização do termo quiescência torna-se inapropriado para o fenômeno investigado neste trabalho, visto que a quiescência pode ocorrer em qualquer fase da ontogenia e apresentam equivalência quanto aos fatores promotores e de quebra desta dormência (Romoser, 1990; Csiro, 1991; Gullan & Cranston, 2000). Nesse contexto a utilização do termo “diapausa embrionária” para descrever o evento de dormência do embrião investigado em *M. floribunda* justifica-se pela indução desta ocorrer nas fases

pró-embrionárias, característico de diapausa embriônica , mesmo que, análoga a encontrada em animais.

Em plantas há menções de ocorrência do fenômeno da diapausa embrionária com um certo equívoco (Ptak *et al.*, 2012, Orr & Zuk, 2014). Tais autores relacionam a dormência de sementes em fase de pré-germinação ao fenômeno de diapausa embrionária. Apesar de ambos estarem relacionados a dormências embrionárias, há diferenças substanciais na fase de desenvolvimento em que a dormência é induzida. A dormência de sementes é induzida na fase de maturação embrionária (embrião já diferenciado) a espera de condições que promovam a germinação, ou seja, em período pré-germinativo (Copete *et al.*, 2011; Baskin & Baskin, 1998; Holdsworth *et al.*, 2008 Ptak *et al.*, 2012). Por outro lado, a diapausa embrionária é induzida durante as fases iniciais do desenvolvimento do embrião, compreendendo um pró-embrião com poucas células meristemáticas (Spala 2013).

A suspensão temporária do desenvolvimento de qualquer estrutura vegetal que contenha um tecido meristemático é classificada como dormência (Lang, 1987). Desta forma, os embriões de *M.floribunda* em início de desenvolvimento, caracterizados por poucas células com propriedades meristemáticas, estão dormentes. Essa dormência de ocorrência precoce na embriogênese de *M.floribunda* torna o uso do termo diapausa embriônica apropriado.

A diapausa embrionária em animais, mais precisamente em mamíferos, pode ser um fenômeno de ocorrência facultativa ou obrigatória (Renfree e Shaw, 2000; Lopes *et.al.*, 2004). A diapausa embrionária facultativa é comum em roedores e marsupiais e

está intimamente relacionada a fatores endógenos materno que garantam a manutenção desta dormência. Em marsupiais, a presença de um neonato estimulando a constante lactação materna mantém as taxas hormonais da mãe apropriadas para a manutenção de um blastocisto em diapausa no útero (Lopes *et al.*, 2004). Esta categoria de diapausa é considerada vantajosa por manter as fêmeas constantemente fecundadas e prontas para gerar um novo embrião, gerando proles em sequência. Qualquer trágica eventualidade que leve a morte do filhote já nascido, desencadeia quedas hormonais no corpo materno que irão quebrar a diapausa do blastocisto que até então se encontrava dormente (Renfree e Shaw, 2000 ; Paria *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2004). Apesar da manutenção ou quebra da diapausa embrionária facultativa estar relacionada a fatores endógenos (hormonais), estes podem ser desencadeados por questões ambientais, uma vez que, períodos de escassez podem levar a morte de neonatos e desta forma, a ausência de lactação mudaria o cenário endógeno crucialmente.

Já a diapausa embrionária obrigatória é um modelo mais estudado/constatado em mustelídeos, cervídeos e até mesmo morcegos e é de ocorrência em toda gestação (Sandell, 1990; Lopes *et al.* , 2004). Esta categoria de diapausa apresenta maior estreitamento com fatores ambientais como: fotoperiodismo, disponibilidade hídrica, baixa disponibilidade nutricional e sincroniza o nascimento da prole com épocas anuais em que os recursos citados estão mais disponíveis (Rodney & Mead, 1993 ; Lopes *et al.*, 2004).

Em *Myrciaria floribunda* as duas populações de ambientes com características diferentes (restinga e floresta ombrófila densa) foram analisadas, a fim de se investigar se em plantas o fenômeno é de caráter facultativo ou obrigatório. Na restinga, os

indivíduos de *M.floribunda* floresceram em abril e os frutos iniciaram o desenvolvimento no final de setembro, coincidindo com períodos índices de pluviosidade mais elevados. Nestes indivíduos, pode-se acompanhar anatomicamente a manutenção do embrião em diapausa por um período de aproximadamente cinco meses. Já os indivíduos da floresta ombrófila densa apresentaram floração ao longo do mês de janeiro e o início do desenvolvimento dos frutos ocorreu em meados do mês de maio. Na população de mata ombrofila densa também verificou a manutenção de um embrião em estágio inicial do desenvolvimento ao longo dos quatro meses. Desta forma, por meio da análise de duas populações, conclui-se que o fenômeno da diapausa embrionária em plantas é de caráter obrigatório, uma vez que se manteve nas duas populações analisadas, mesmo não havendo dados pluviométricos para os indivíduos da floresta.

As análises ultraestruturais dos embriões de *M.floribunda* em diapausa, coletados tanto na restinga quanto na floresta, revelaram que a maioria das mitocôndrias não apresentou matriz e as cristas estavam vacuolizadas (intumescidas) . Após o fim da diapausa embrionária, a população mitocondrial era diversa. A maioria das mitocôndrias apresentaram cristas largas e matriz elétron-densa enquanto outras poucas apresentaram matriz elétron-translucidas. Mitocôndrias estruturalmente vacuolizadas já foram descritas em células embrionárias de camundongos. Bergson & Nilson (1975), encontraram mitocôndrias com vacúolos nas cristas durante o período de diapausa, sugerindo assim baixa atividade metabólica destas células. Os autores ainda verificaram que embriões fora da diapausa, ou seja, aqueles que já haviam retomado o

desenvolvimento apresentavam mitocôndrias com cristas largas e matriz elétron-densa, indicativo de uma recuperação das atividades metabólicas.

Plantas de *Zea mays* (Poaceae) , *Pinus silvestres* (Pinaceae) , *Lactuca sativa* , *Pyrus malus* (Rosaceae) apresentaram diferenças ultraestruturais das mitocôndrias embrionárias. Em sementes submetidas a períodos de seca, ou seja, com embriões em dormência pré germinativa, nota-se pouco desenvolvimento das membranas internas mitocondriais e como consequência, pouca formação de cristas. Por outro lado, as sementes em germinação, apresentaram progressivamente mitocôndrias com cristas mais numerosas e mais evidentes (Bouvier-Durant *et al* 1981; Logan *et al* 2001; Simola, 1974; Srivastava, 1968). Tais resultados também são sugestivos de baixa e alta atividade metabólica respectivamente e reforçam a relação da estrutura mitocondrial com os mecanismos de dormência pré germinativa.

Em relação ao número populacional de mitocôndrias em *Hordeum vulgare* (Poaceae), há um progressivo aumento no número de mitocôndrias a medida que o embrião se desenvolve, sugerindo um aumento na taxa metabólica em decorrência de divisões mitocondriais (Norstog 1972). Por outro lado, em *M.floribunda*, embora o número de mitocôndrias não tenha sido quantificado, este parece ser equivalente tanto em diapausa embriônica quanto nos embriões em desenvolvimento. Em animais, mais especificamente camundongos, o número populacional mitocondrial em embriões em diapausa é até ligeiramente superior do que em embriões em desenvolvimento. Porém a estrutura mitocondrial difere substancialmente nesses dois estágio, uma vez que embriões de camundongos em diapausa apresentam altíssimo número de mitocôndrias

com alterações estruturais (intumescidas) e essas são raras nos embriões em desenvolvimento. (Zheng Fu *et al*, 2014).

Portanto, a retomada da atividade metabólica nos embriões de *M. floribunda* estaria mais relacionada primariamente com a estrutura mitocondrial do que com a quantidade desta organela no citoplasma, mesmo que neste trabalho não tenha sido realizado um estudo quantitativo, não se observa, segundo os resultados ultraestruturais, diferenças significativas no número de mitocôndrias. O mesmo verifica-se na literatura zoológica (Zheng Fu *et al*, 2014).

Desta forma, a diapausa embrionária sendo uma dormência seminal precoce está mais intimamente relacionada a ultraestrutura mitocondrial descrita neste trabalho com baixa densidade de matriz e cristas não evidentes (Zenhg Fu *et al.*, 2014).

Em plantas há uma íntima relação entre a atividade mitocondrial e cloroplastos (Atkin & Macherel, 2009). Durante a exposição da planta a luz, cloroplastos podem gerar ATP utilizada na posterior síntese de açúcares. Porém, na ausência de luz ou em tecidos vegetais heterotróficos cabe apenas à mitocôndria ser a fonte produtora de ATP na maquinaria celular (Hoefnagel *et al.*, 1998).

Em situações de intenso estresse hídrico/seca, as mitocôndrias também podem auxiliar as funções dos cloroplastos. Plantas quando submetidas a períodos de seca, fecham os estômatos, o que inviabiliza a assimilação de gás carbônico e conseqüentemente o processo fotossintético (Lorimer and Andrews, 1981). Desta maneira, há um acúmulo de glicina oxidada na célula que exige um suprimento de NADH para um processo de re-oxidação deste composto. Sob essas condições, a

mitocôndria acaba fornecendo o suprimento de NADH para o processo de re-oxidação e desta forma preservando as taxas fotossintéticas (Atkin & Macherel, 2009). Além disso, verifica-se a capacidade de importação de proteínas celular por parte das mitocôndrias em resposta à seca. À medida que o estresse hídrico se torna mais intenso, danos oxidativos tornam-se maiores e desta forma, a importação de proteínas por parte das mitocôndrias auxilia na reparação aos danos oxidativos desencadeados pela ausência de água (Taylor *et al.*, 2002 e 2005; Bartoli *et al.*, 2004). Apesar da escassez de estudos sobre a estrutura mitocondrial em plantas submetidas à seca, Flowers e Hanson, 1969 e Sells e Koeppel, 1981 sugerem baixas taxas metabólicas desta organela em função da falta de água. Sementes são estruturas geralmente submetidas a dissecação e um bom modelo para estudos de respostas ao estresse hídrico (Benamar *et al.*, 2003; Macherel *et al.*, 2007). Benamar e colaboradores afirmam que a retomada das atividades respiratória mitocondriais são rápidas e por isso as mitocôndrias são mantidas preservada durante a ausência de água.

Os embriões de *M.floribunda* em diapausa analisados sob o ponto de vista ultraestrutural apresentam mitocôndrias com estrutura sugestiva de baixa atividade metabólica (ausência de cristas, cristas intumescidas e matriz translúcida) e outras poucas que apresentam certa densidade de matriz e cristas, mas que podem estar preservadas por meio da importação de proteínas. Tudo isso pode estar relacionado com a manutenção da vida desses embriões que apresentam um desenvolvimento inicial bastante lento (característico de diapausa embrionária). Principalmente tratando-se dos indivíduos analisados na restinga, que foram submetidos a meses de baixa disponibilidade hídrica coincidentes com o período de diapausa embrionária. Os

resultados indicam que em *M.floribunda* as mitocôndrias também desempenham um papel vital na tolerância a dessecação evidenciando a versatilidade desta organela para a manutenção da vida celular.

A estrutura do DNA em embriões de *M.floribunda* em diapausa se apresenta predominantemente em heterocromatina, sugestivo de pouca atividade transcricional. Já nos embriões em desenvolvimento, predomina a eucromatina, sugestivo de transcrição ativa. Essas observações são similares às descritas em animais (ratos) , células embrionárias em diapausa, também verifica-se que o DNA se apresenta condensado (heterocromatina) enquanto que as células embrionárias em desenvolvimento eram predominantes em Eucromatina (Zheng *et al.* ,2014).

Por outro lado, diversos autores (MC laden (1968) , Sherman & Barlow (1972) e Given & Weitlauf (1981 e 1982) identificaram atividade transcricional mantida em embriões animais durante a diapausa, enquanto que apenas a síntese de DNA (replicação) foi interrompida. Os autores sugerem que a ausência de síntese de DNA está mais intimamente relacionada com a diapausa embriônica do que a própria atividade de síntese proteica (transcrição e tradução). Por outro lado, há dados na literatura mais incisivos que indicam a manutenção da síntese proteica e ausência da replicação de DNA durante a diapausa embrionária (Surani, 1981; Renfree & Shaw, 2000). Em insetos, na maioria das espécies analisadas, as células embrionárias em diapausa se mantêm em período G1 do ciclo celular, fase de atividade de síntese proteica. O período G1 precede a fase de replicação de DNA (período S), indicando a não ocorrência de síntese de DNA durante a diapausa embriônica (Tammariello , 2001 ; Desmarais *et al.*, 2004). Até mesmo genes relacionados a replicação do DNA não estão

expressos durante a diapausa embriônica (Denlinger , 2002; Fotedar *et al.*, 2004; Hamatani *et al.*, 2004).

Portanto, em plantas (*M.floribunda*), apesar deste trabalho não investigar atividades relacionada à síntese de DNA (mantida ou não) durante a diapausa embrionária, nossas análises ultraestruturais podem apenas indicar a predominância de heterocromatina em diapausa e eucromatina nos embriões em desenvolvimento. Desta forma, apenas a ultraestrutura do DNA isoladamente não é um caráter revelador da atividade genômica em *M. floribunda*.

Ainda nesse contexto, algumas inferências podem ser feitas com base na estrutura/densidade do nucléolo: embriões de camundongos em diapausa apresentam nucléolo condensado e conspícuo, sugestivo de elevada síntese de RNA ribossomal. (Zheng Fu *et al.* 2014; Van Blerkom e Chavez,1978). Já os embriões que retomam o desenvolvimento o nucléolo apresentava-se menos denso e inconspícuo, sugestivo do início das atividades ribossomal para a tradução de proteínas, fato não observado durante a diapausa embrionária (Zheng Fu *et al.* 2014). As análises do nucléolo em *M. floribunda* também aproximam a diapausa embrionária em animais de plantas, uma vez que as células embrionárias em diapausa de *M.floribunda* apresentam nucléolos densos e bastante conspícuos. Já as os embriões que retomam o desenvolvimento apresentam variações quanto à densidade do nucléolo. A maioria das células destes embriões tem nucléolos conspícuos, porém, de tamanhos inferiores se comparados aos embriões em diapausa, enquanto outras apresentam nucléolos inconspícuos. Desse modo, apesar de não ser possível constatar a relação de síntese de DNA (replicação) com a diapausa embrionária, a análise do nucléolo em *M.floribunda* sugere que a atividade

transcricional se mantém durante a diapausa mas que síntese proteica (tradução) é mais expressiva após a retomada do desenvolvimento embrionário.

Sobre as divisões celulares, em *M.floribunda* não identificamos vestígios de divisões celulares durante a diapausa embrionária. Apenas quando o embrião retoma o desenvolvimento, notamos divisões mitóticas periclinais. Em animais, as divisões celulares são contínuas até 72 horas após a fecundação e só então os embriões reduzem seus ritmos de divisões mitóticas (Mc Laren 1968). Desta forma, a diapausa embrionária em plantas inicia-se logo após a fertilização, enquanto que em ratos, essa dormência inicia-se algumas horas após a fecundação.

Outros elementos citológicos como dictiossomas, vacúolos e retículo endoplasmático em células embrionárias de *M.floribunda* não variaram entre os estádios de diapausa e após a retomada do desenvolvimento. Por isso, esses elementos não foram usados como critério para estabelecer diferenças ultraestruturais entre essas duas fases. No entanto, este é o primeiro estudo ultraestrutural em embriões de plantas em diapausa e análises mais aprofundadas desses componentes celulares, com a utilização de métodos de microscopia avançada podem futuramente auxiliar a compreensão deste fenômeno em plantas.

Os embriões de origem no tecido nucelar foram testados para germinação. As sementes submetidas aos tratamentos germinaram evidenciando dois eixos iniciais embrionários. Esses dois eixos, devido a proximidade com que germinaram, pareceram inicialmente duas estruturas radiculares. Somente após a realização de cortes anatômicos, foi possível perceber que se tratava do eixo do meristema apical caulinar e

do eixo radicular. Desta forma, apesar do número pequeno de análises com sementes germinando (N=20), os resultados obtidos sugerem que os embriões de origem nucelar podem se desenvolver até certo estágio, porém não se confirma seu desenvolvimento e germinação.

Em Myrteae os caracteres do embrião são variáveis, o que levou Berg (1855- 59) a utilizá-los como caráter taxonômico delimitando três sub-tribos: Myrciinae, que apresenta embrião com cotilédones finos, membranáceos e o eixo do hipocótilo enrolado aos cotilédones; Myrtinae, com embrião longo, fino e em forma de ferradura, onde o hipocótilo se mantém curvado entre dois cotilédones reduzidos; e Eugeniinae, com embrião com cotilédones carnosos e exuberantes, às vezes indivisíveis, e eixo do hipocótilo não discernível ou bastante diminuto. *Myrciaria floribunda* está inserida na sub-tribo Eugeniinae e portanto a proximidade dos meristemas apicais caulinar e radicular em função do hipocótulo diminuto, levou-nos a interpretações iniciais equivocadas sobre a protusão de duas radículas, tratando-se dos meristemas radicular e caulinar.

O fato de que embriões nucleares estarem presentes até maturidade do fruto pode ser interpretado no contexto das estratégias de defesa do embrião contra a herbivoria. Sementes com embriões nucleares já foram registradas anteriormente na família Myrtaceae (Silva, 2006; Coneglian, 2007). Sua presença aumentaria a probabilidade das sementes com embriões zigóticos prosperarem, uma vez que aquelas com embriões nucleares também estariam disponíveis para a predação.

Perea e colaboradores (2013) sugerem estratégia equivalente para *Ulmus lavis* (Ulmaceae), mas relacionando à produção de sementes vazias. O gasto energético para produção dessas sementes é baixo e essas ao serem predadas contribuiriam consideravelmente para o sucesso das sementes com embriões. Sementes estéreis de *Magnolia grandiflora* (Magnoliaceae) e *Paeonia mlokosewitchii* (Paeoniaceae) apresentam o tegumento externo carnoso e avermelhado cuja função seria a de atrair predadores, enquanto que as sementes férteis apresentam coloração escura e são menos conspícuas (Leins & Erbar, 2010). As sementes de *M. floribunda* estão em desenvolvimento lento e protegidas pelos tecidos ovarianos. Os ovários inconspícuos, com embriões em início de desenvolvimento, podem contribuir para a proteção dos mesmos contra a herbivoria, ao passarem despercebidos, já que, no período de maturação dos frutos, frequentemente há a presença de larvas e insetos no interior das sementes.

O desenvolvimento seminal em *M.floribunda* é composto por três tecidos geneticamente diferentes (três genótipos): o nucelo, o endosperma e o embrião (Sreenivasulu e Wobus, 2013). Nas angiospermas, três diferentes estratégias para nutrir e auxiliar o desenvolvimento embrionário são identificadas em função desses tecidos. Em sementes endospermicas (cereais) o endosperma desempenha a principal função de nutrir o embrião (Sreenivasulu & Wobus, 2013), enquanto que em sementes não endospermicas (legumes) o endosperma é rapidamente consumido pelo embrião e a nutrição para o desenvolvimento do mesmo fica a cargo das próprias reservas embrionárias (Weber *et al* .,2005). Há ainda as sementes perispermicas (Amaranth e Quinoa), caracterizadas por apresentarem um grande aporte de tecido nuclear que

desempenha a função nutridora do embrião por transferência (Burrieza *et al.* , 2014). Também observados em certas espécies de cereais o tecido nucelar persiste durante todo o desenvolvimento embrionário e são de fato as células de transferência de nutrientes para o embrião (Dominguez *et al.* , 2001; Yang *et al.*, 2012).

Neste contexto, as sementes de *M.floribunda* são do tipo perispérmicas ao apresentarem nucelo espesso e persistente além de tecido endospérmico que se esgota rapidamente. Grande quantidade de grânulos de amido são encontrados no nucelo de *M.floribudnda* , em especial na região micropilar, nas fases iniciais do desenvolvimento seminal, sugerindo a grande importância deste tecido na nutrição e desenvolvimento do embrião desta espécie.

Neste trabalho, a ocorrência de diapausa embrionária revelou-se de caráter obrigatório uma vez que foi identificada nas duas populações analisadas de *Myrciaria floribunda* (na restinga da APA de Maricá-RJ e na floresta ombrófila densa, PARNASO de Teresópolis). Dados ultraestruturais, principalmente relacionados a estrutura mitocondrial e do DNA mostraram-se substancialmente relevantes para estabelecer diferenças citológicas durante a diapausa do embrião e o posterior desenvolvimento embrionário. O ineditismo da investigação de um fenômeno, que é vastamente estudado na literatura zoológica e até então desconhecido pela ciência em plantas é o primeiro passo para desvendar os mecanismos citológicos envolvidos na diapausa embrionária em plantas. Mais estudos fenológicos fazem-se necessários, pois podem dar pistas sobre a ocorrência de diapausa embriônica em outros grupos de plantas. Desta forma, os resultados aqui apresentados podem ajudar na compreensão das distinções e semelhanças entre animais e vegetais quanto às estratégias reprodutivas. Além disso, as

análises comparativas anatômicas e ultraestruturais em dois ambientes contrastantes podem auxiliar também na compreensão de como *M. floribunda* lida com o ambiente instável de restinga. Num contexto mais abrangente, elucidações sobre as estratégias vegetais para lidar com os estresses ambientais se tornarão dados cada vez mais relevantes em virtude das atuais discussões/preocupações sobre as alterações climáticas. Maiores compreensões sobre como as plantas lidam com as adversidades ambientais podem inclusive propor futuras ações a impactar diretamente a agricultura e em especial a biodiversidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Atkin, O. K. Macherel, D. 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany* 103: 581–597.

Barlow, P. W., Sherman M. 1972. The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *Embryology, exp. Morph.* (27): 447-465.

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

Bartoli, C.G. Gomez, F. Martinez, D.E. Guiamet, J.J. 2004. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 55: 1663–1669.

Benamar, A. Tallon, C. Macherel, D. 2003. Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. *Seed Science Research* 13: 35–45.

Berg, O. 1855-1856. *Revisio Myrtacearum Americae*. *Linnaea*. 27:1-472.
 _____. 1857-1859. *Myrtaceae*. In: Martius, C.P.F. (ed.). *Flora Brasiliensis* 14 (1): 1-656.

Bergstromm,S., Nilsson, O. 1975. Embryo endometrial relationship in the mouse during activation of the blastocyst By oestradiol. *F. reprod. Fert* 44, 117-120

Bewley, J. D. 1977. *Seed Germination and Dormancy*. *The Plant Cell*, Vol. 9, 1055 -1066.

Bouvier-Durand, M. Dereudree, J. Come, D. 1981. Ultrastructural Changes in the Endoplasmic Reticulum During Dormancy Release of Apple Embryos (*Pyrus malus* L.). *Planta*. 151: 6-14.

Burrieza, H. Lopez-Fernandez, M.P. Maldonato, S. 2014. Analogous reserve distribution and tissue characteristics in quinoa and grass seeds suggest convergent evolution. *Frontiers in Plant Science*. 5: 1-14.

Chávez, D.J. , Blerkom J. V. 1979. Persistence of embryonic RNA synthesis during facultative delayed implantation in the mouse. *Developmental Biology* (1): 39-49.

Copete, E., José M. H., Pablo F., Baskin C. C., Baskin J. M. 2011. Physiology, morphology and phenology of seed dormancy break and germination in the endemic Iberian species *Narcissus hispanicus* (Amaryllidaceae). *Annals of Botany* Page 1 of 14.

Coneglian, I. R. N. 2007. Morfologia e ontogênese do pericarpo e semente de *Eugenia puniceifolia* (H. B. & K.) DC., *Myrcia bella* Camb. e *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg (MYRTACEAE). Dissertação de Mestrado. Universidade estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

Desmarais, J.A. Bordignon, V. Lopes, F.L. Smith, L.C. Murphy, B.D. 2004. The escape of the mink embryo from obligate diapause. *Biology of Reproduction*. 70 662–670.

Domínguez, F. Moreno, J. Cejuno, F.J. 2001. The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta*. 213: 352-360.

Donohue, K., Dorn, L., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Chandra R. P., Schmitt J. 2005. Environmental and genetic influences on the germination of *Arabidopsis thaliana* in the field. *Evolution* Vol 59 (4) :740–757

Denlinger, D.L. 2002. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*. 47, 93–122.

Feder, N.; O' Brien, T. P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123-142.

Franceschinelli, E. V.; Vasconcelos, G. M. P.; Landau, E. M.; Ono, K.Y.; Santo, F. A. M. 2007. The genetic diversity of *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae) in Atlantic Forest fragments of different sizes. *Journal of Tropical Ecology* 23: 361-367.

Flowers, T.J. Hanson, J.B. 1969. The effect of reduced water potential on soybean mitochondria. *Plant Physiology* 44: 939–945.

Fotedar, R. Bendjennat, M. Fotedar, A. 2004. Functional analysis of CDK inhibitor p21WAF1. *Methods in Molecular Biology* 281 55–72.

Graeber, K., Nakabayashi K., Miattonne E., leubner-metzger, G., Soppe, W. J. J. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell & Environment* Vol 35 (10) 1769–1786.

Gahan, P. B. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry - an introduction*. London: Academic Press Inc., xi + 301 p., il.

Givan, R. L. Weitlauf, H. M. 1981. Resumption of DNA Synthesis During Activation of Delayed Implanting Mouse Blastocysts. *The Journal Of Experimental Zoology* 218:253-259.

Givan, R. L. Weitlauf, H. M. 1982. Resumption of DNA Synthesis in Delayed Implanting Mouse Blastocysts During Activation In Vitro. *The Journal Of Experimental Zoology* 224:111-114

Hamatani, T. Daikoku, T. Wang, H. Matsumoto, H. Carter, M,G. Ko, M,S. Dey, S,K. 2004. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *PNAS* 101, 10326–10331.

Hoefnagel, M.H.N. Atkin, O.K. Wiskich, J.T. 1998. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1366: 235–255.

Holdsworth, M. J., Bentsink, L., Soppe W. J. J. 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, afterripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179: 33–54

Huang, X. Johana, S. Lisa, D. Converse, G. Sigi, F. Shian, T. Maarten, K. Kathleen, D. 2010. The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLs for seed dormancy. *Molecular Ecology*, 19: 1335–1351

ICMBIO. 2008. Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Documento eletrônico disponível em <http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>, acessado em 18/03/2015.

Jensen, W. A. 1962. Botanical Histochemistry: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman & Co., 408 p.

Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. London: Mac. Graw-Hill Comp. Book Inc. 593p. il.

Koeppen, W. 1948. Climatologia: com um estúdio de lós climas de la tierra. Fondo de Cultura Econômica. México. 479p.

Lang, G. A. 1987. Dormancy: a new universal terminology. Hort Science 22: 817-820

Langeron, M. 1949. Précis de microscopie. Paris, Masson et Cie. Ed., 1430 p. il.

Leins, P.; Erbar, C. 2010. Flower and Fruit - Morphology, Ontogeny, Phylogeny, Function and Ecology. Schweizerbat Science Publishers Edit. 439 p. il.

Logan, D, C. Millar, A, H. Sweetlove, L, J. Hill, S, A. Leaver, C, J. 2001. Mitochondrial Biogenesis during Germination in Maize Embryos. Plant Physiology. Vol 125.

Lopes, F. L.; Desmarais, J. A.; Murphy, B. D. 2004. Embryonic diapause and its regulation. Reproduction. 128: 669-678.

Lorenzi, H.; Lacerda, M.T.C.; Bacher, L.B. 2015. Frutas no Brasil nativas e exóticas (de consumo in natura). São Paulo. Instituto Plantarum de Estudos da flora.

Lorimer, G.H. Andrews, T.J. 1981. The C₂ chemo- and photorespiratory carbon oxidation cycle. In: Stumpf PK, Conn EE, eds. The biochemistry of plants. Academic Publishers, 329–374.

Macherel D, Benamar A, Avelange-Macherel MH, Tolleter D. 2007. Function and stress tolerance of seed mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 233–241.

MacLean, R. C.; Iveney-Cook, W. R. 1952. Textbook of practical botany. 5a ed., London: Longmans Greenlands Co., 476 p. il.

Maps, F., Nicholas, R., Andrew J. P., 2013. A metabolic approach to dormancy in pelagic copepods helps explaining inter- and intra-specific variability in life-history strategies. *J. Plankton Res.* 0(0): 1–13.

Mantaroni, A. Iglesias, R.R. 2001. Terrestrial bromeliads of the restinga of Barra de Maricá, Rio de Janeiro: Influence on the microclimate, soil and nutrient storage on the border of vegetation islands. *Leandra* 16(1): 14-37

Mclaren, A. 1968. A study of blastocysts during delay and subsequent implantation in lactating mice. *J. endocr.* 42: 453-463

Mead, R.A. 1993. Embryonic diapause in vertebrates. *Journal of Experimental Zoology.* 266: 629–641.

Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L., Day. D.A. 2011. Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 79–104

Norstog Knut. 1972. Early development of the Barley embryo: fine structure. *American Journal of Botany*. 59(2): 123-132

Owen K, A. David M. 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann Bot* 2009; 103 (4): 581-597

Ptak ,G, E. Tacconi, E. Czernik, M. Toschi, P. Modlinski J,A. Loi, P.2012. Embryonic Diapause Is Conserved across Mammals. *PLoS ONE* 7(3): e33027.

Perea, R.; Venturas, M.; Gil, L. 2013. Empty seeds are not always bad: simultaneous effect of seed emptiness and masting on animal seed predation. *PLoS ONE* 8(6): e65573.

Renfree, M. B.; Shaw, G. 2000. Diapause. *Annual Review of Physiology* 62: 353-75.

Reynolds, E. S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208.

Sandell, M. 1990. The evolution of seasonal delayed implantation. *Quarterly Review of Biology*. 65, 23–42.

Sells, G.D. Koeppel, D.E. 1981. Oxidation of proline by mitochondria isolated from water-stressed maize shoots. *Plant Physiology* 68: 1058–1063.

Silva, A,L,G. 2006. *Biologia Reprodutiva de quatro espécies de Eugenia L. (Myrtaceae)*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Simola, K, L. 1974. The ultrastructure of dry and germinating seeds of *Pinus sylvestris* L. *Acta Botanica Fennica*.

Spala, D. P. 2013. Biologia reprodutiva e ontogenia da semente e do fruto de *Myrciaria floribunda* (H. West ex Wild) O. Berg (MYRTACEAE). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Sherman, M , I., Barlow, P. W. 1972. The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *Embryology exp. Morph.* Vol. 27, 2, pp. 447-465

Srivastava, S, k. 1968. The fine structure of the embryo of *Lactuca sativa*. I. Dry embryo. vol 46.

Sreenivasulu, N. Wobus, U. 2013. Seed-Development Programs: A Systems Biology–Based Comparison Between Dicots and Monocots. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 189-217.

Surani, M, A, H. Fishel, S,B. 1981. Embryonic and uterine factors in delayed implantation in rodents. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 29, 159–72.

Tamariello, S, P. 2001. Regulation of the cell cycle during diapause. In *Insect timing, circadian rhythmicity to seasonality*. Elsevier Science, pp 173–183.

Taylor, N.L. Day, D.A. Millar, A.H. 2002. Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 42663–42668.

Taylor, N.L. Heazlewood, J.L. Day, D.A. Millar, A.H. 2005. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Molecular and Cellular Proteomics* 4: 1122–1133.

Van Blerkom J, Chavez DJ, Molecular Bell H. and cellular aspects of facultative delayed implantation in the mouse. *Ciba Found Symp* 1978; 141–172.

Weber, H. Borisjuk, L. Wobus, U. 2005. Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 253-279.

Weitlauf, H. M. and Greenwald, G. S. 1968. Influence of estrogen and progesterone on the incorporation of ³⁵ methionine by blastocysts in ovariectomized mice. *J. Exp. Zool.* 169, 463-470.

Weitlauf, H. M. 1973. In vitro uptake and incorporation of amino acids by blastocysts from intact and ovariectomized mice. *J. Exp. Zool.* 183, 303-308.

Wenjia X. Elisa, F. Olivier, C. Christine. P, L, L. Enrico, M. 2016. Endosperm and Nucellus Develop Antagonistically in Arabidopsis Seeds. *American Society of Plant Biologists.*

Yang, X., Wu, F., Lin, X., Du, X., Chong, K., Gramzow, L., Schilling, S., Becker, A., Theissen, G., and Meng, Z. 2012. Live and let die - the B(sister) MADS-box gene OsMADS29 controls the degeneration of cells in maternal tissues during seed development of rice (*Oryza sativa*). *PLoS One* 7, e51435.

Zheng, F., Wang, B. Wang, S., Weiwe, W., Wang Q., Chen, Y.,Kong, S., Lu, J., Tang, Zhenzhou., Ran, Hao., Tu Z., He, Bo., Zhang S., Chen, Qi., Jin, W., Duan, E., Wang H., Wang, ling., Li L., Wang,F., Gao S., and Wang H. 2014. Integral Proteomic Analysis of Blastocysts Reveals Key Molecular Machinery Governing Embryonic Diapause and Reactivation for Implantation in Mice. *Biology of reproduction* 90(3):52, 1-1