



EZEQUIEL GASPARIN

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, CELULARES E
MOLECULARES DA DESSECAÇÃO E
ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE
Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze**

LAVRAS – MG

2016

EZEQUIEL GASPARIN

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, CELULARES E MOLECULARES DA
DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *Araucaria*
angustifolia (Bertol.) Kuntze**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. José Marcio Rocha Faria

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Gasparin, Ezequiel .

Aspectos fisiológicos, celulares e moleculares da dessecação e
armazenamento de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.)

Kuntze / Ezequiel Gasparin. – Lavras : UFLA, 2016.

145 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): José Marcio Rocha Faria.

Bibliografia.

1. Pinheiro-brasileiro. 2. Sementes recalcitrantes. 3. Expressão
gênica. 4. Genes de referência. 5. Banco de sementes do solo. I.

Universidade Federal de Lavras. II. Título.

EZEQUIEL GASPARIN

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, CELULARES E MOLECULARES DA
DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *Araucaria*
angustifolia (Bertol.) Kuntze**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 20 de abril de 2016.

Dr. Cláudio José Barbedo IBt
Dr. João Almir de Oliveira UFLA
Dr. Marco Aurélio Leite Fonte UFLA
Dra. Olívia Alvina Oliveira Tonetti UFLA

Orientador

Dr. José Marcio Rocha Faria

Coorientadores

Dr. Anderson Cleiton José

Dr. Henk W. M. Hilhorst

LAVRAS – MG

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço minha família, especialmente aos meus pais Dino e Zenaide, pelo apoio, incentivo e compreensão ao longo deste percurso.

Ao meu orientador, Prof. José M. R. Faria, pelos ensinamentos, amizade e oportunidades oferecidas para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Anderson C. José, pela coorientação, amizade e suporte prestado ao longo deste período.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade de realização do meu doutorado.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro para realização desta pesquisa. À FAPEMIG pelo auxílio financeiro e apoio para a participação em eventos.

À Wageningen University, em especial aos professores Henk W. M. Hilhorst e Wilco Lighterink, pela oportunidade de realização do estágio de doutorado sanduíche. Aos colegas do Wageningen Seed Lab, Mariana, Paulo Ribeiro, Alexandre, Renake, Anderson, Maria Cecília, Thiago, Débora; aos técnicos, Leo e Juriaan; e aos demais colegas do Laboratory of Plant Physiology pelo auxílio na pesquisa e amizade.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Sementes Florestais, Túlio, Paulo, Janice, Tatiana, Wilson, Ailton, Cristiane, Olívia, Meire, Rayana, Gislean, Fabieli, Francesca, Andreza, Luiz, Fabrício, Patrick, Rodrigo, Thalita, Lucas, Tatiana Portes e aos demais pelos ótimos momentos de convívio, diversão e amizade, sentirei saudades.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural e ao Laboratório Central de Sementes (UFLA) pelo apoio prestado.

Enfim, agradeço a todos meus amigos e pessoas que estiveram ao meu lado e contribuíram para a realização dessa tese.

*“Educação não
transforma o mundo.
Educação muda as
pessoas.
Pessoas transformam o
mundo”.*

Paulo Freire

RESUMO GERAL

Sementes de *Araucaria angustifolia* são classificadas como recalcitrantes, logo, apresentam longevidade limitada, o que dificulta o armazenamento e, conseqüentemente, a disponibilidade de sementes viáveis a longo prazo. A espécie encontra-se ameaçada de extinção e, devido a sua importância econômica, tanto pela madeira como pela comercialização das sementes (pinhão) para alimentação, são necessários estudos para a conservação *ex situ* dessa espécie. Assim, nesta pesquisa objetivou-se: a) avaliar o efeito de diferentes velocidades de secagem na viabilidade das sementes provenientes de dois locais (Minas Gerais e Rio Grande do Sul); b) selecionar genes de referência para normalização de dados de RT-qPCR e analisar a expressão de genes ligados a tolerância à dessecação, em sementes submetidas à desidratação; c) avaliar o potencial de armazenamento em condição de refrigeração e; d) avaliar o comportamento de banco de sementes do solo induzido em diferentes ambientes da floresta. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que as sementes toleram uma leve secagem (próximo de 34% de grau de umidade), mantendo a viabilidade elevada (85% de germinação), sendo que não houve diferença significativa entre os efeitos da secagem rápida e lenta para os dois lotes avaliados. A perda da viabilidade em baixo conteúdo de água esteve associada a um aspecto anormal da parede celular, deformação de organelas e deterioração subcelular. A análise de expressão gênica, por meio de RT-qPCR, indicou que os genes de referência mais estáveis para amostras heterogêneas (diferentes tecidos) foram *ACT*, *GAPDH* e *SARI*. Para a maioria dos genes analisados, houve um decréscimo nos níveis de expressão após a desidratação para os genes *ABI3*, *LEC1*, *SMP*, *APX*, *MIPS* e *XERO1*. Por fim, verificou-se que ambos os lotes avaliados apresentaram potencial de armazenamento de aproximadamente 12 meses, sob condição de refrigeração. Além disso, sementes de *A. angustifolia* podem estabelecer um banco de sementes transitório, o qual esteve associado ao estado de conservação da floresta. Desta forma, pode-se concluir que sementes de *A. angustifolia* toleram uma leve secagem, a qual pode contribuir para uma maior armazenabilidade das sementes. Durante a desidratação, a perda da viabilidade das sementes com baixo conteúdo de água esteve associada a danos celulares irreversíveis e decréscimo nos níveis de transcritos de genes relacionados a tolerância à dessecação. Por fim, verifica-se que é possível realizar um estoque de sementes a curto prazo, visando a produção de mudas, e a conservação da cobertura florestal é primordial para a regeneração da espécie a partir de um banco de sementes do solo.

Palavras-chave: Pinheiro-brasileiro. Sensibilidade à dessecação. Sementes recalcitrantes. Expressão gênica. Genes de referência. Banco de sementes do solo.

GENERAL ABSTRACT

Seeds of *Araucaria angustifolia* are classified as recalcitrant, so they have limited longevity, making difficult the storage and, consequently, available viable seeds for long time. The species is critically endangered and due the economic importance of the timber and the seeds (pinhão) for food, are necessary studies for *ex situ* conservation of this species. Therefore, this search had the followed aims: a) evaluated the effect of drying rates on the viability of seeds from two provenances (Minas Gerais e Rio Grande do Sul); b) selected reference genes for normalization RT-qPCR data and analyzed the expression levels of genes related to desiccation tolerance of seeds subjected to dehydration; c) evaluated the storability of the seeds from two provenances under refrigeration condition and, d) evaluated the behavior of induced soil seed bank in different forest environments. According to the result, seeds tolerate a slight drying (near 34% water content), maintaining high viability (85% germination), and there was no significant differences between effects of fast and slow drying for both seed provenances. The loss of viability to low water content was associated with abnormal aspect of cell wall, deformation of organelles and subcellular deformation. The gene expression by RT-qPCR showed that the most stable reference genes for heterogeneous samples (inter-tissues) were *ACT*, *GAPDH* and *SARI*. For the most genes analysed, there was a decreasing of expression levels of the genes after dehydration, such as *ABI3*, *LEC1*, *SMP*, *APX*, *MIPS* e *XERO1*. Finally, both seed provenances showed storage potential for approximately 12 months, under refrigeration condition. However, *A. angustifolia* seeds are able to establish transient soil seed bank, which was associated with forest conservation status. Thus, it is possible conclude that *A. angustifolia* seeds tolerate a slight drying, which may help increase the seeds storability. During the dehydration, the loss of seeds viability to lower water content was associated to cellular damages and decreasing of transcripts levels of genes related to desiccation tolerance. Finally, it is possible storage the seeds during short time for seedling production, and the conservation of forest cover is primordial for species regeneration by soil seed bank.

Keywords: Brazilian-pine. Desiccation sensitivity. Recalcitrant seed. Gene expression. Reference genes. Soil seed bank.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE - INTRODUÇÃO GERAL	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	12
2.2 Sensibilidade à dessecação: danos por secagem	14
2.3 Aspectos moleculares da tolerância à dessecação	16
2.4 Armazenamento de sementes	18
2.5 Banco de sementes do solo	20
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	31
ARTIGO 1 Physiological and ultrastructural responses to dehydration in recalcitrant seeds of <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	31
ARTIGO 2 Selection of candidate reference genes for normalization of RT-qPCR data and gene expression in dehydrating <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze seeds	62
ARTIGO 3 Viabilidade de sementes recalcitrantes de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze no armazenamento e em banco de sementes induzido	109

PRIMEIRA PARTE - INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação pode ser caracterizada como a capacidade de um organismo sobreviver à remoção quase total da água celular sem causar danos irreversíveis (LEPRINCE; BUITINK, 2010). Assim, é a habilidade das células em perder água até atingirem o equilíbrio com o ar moderado a extremamente seco e, então, retomarem suas funções normais após a reidratação (ALPERT, 2005). Desta forma, são capazes de sobreviver no estado seco por longo período de tempo (BUITINK; LEPRINCE, 2008).

A tolerância à dessecação ocorre em uma ampla variedade de táxons, incluindo invertebrados, bactérias, microalgas terrestres, fungos, leveduras, líquens e esporos. Nas plantas superiores, este mecanismo está amplamente difundido em sementes e pólenes (LEPRINCE; BUITINK, 2010). Nas sementes, pode haver uma grande variação entre espécies, dentro do gênero e tecidos do mesmo indivíduo, existindo assim um contínuo grau de tolerância (ALPERT; OLIVER, 2002).

Sementes ortodoxas são caracterizadas por desenvolverem tolerância à dessecação durante sua formação, passando por um processo de dessecação ao final de seu desenvolvimento, podendo ainda serem desidratadas após sua dispersão, sobrevivendo neste estado por tempo considerável. Por outro lado, as sementes recalcitrantes não passam por um processo natural de secagem durante a maturação e, são dispersas com elevado conteúdo de água. São caracterizadas por serem sensíveis à dessecação, antes e após a dispersão, possuindo longevidade muito limitada após a coleta, mesmo em condição hidratada (ROBERTS, 1973; ROBERTS; ELLIS, 1989; BERJAK; PAMMENTER, 1997; KERMODE et al. 2002; BERJAK; PAMMENTER, 2000).

Talvez a fronteira mais instigante do estudo da tolerância à dessecação seja como induzir tal tolerância em sementes sensíveis (CROWE et al., 2005), no entanto, os pesquisadores que trabalham com sementes recalcitrantes enfrentam uma série de obstáculos, sendo o principal deles o limitado período de disponibilidade de sementes viáveis. Assim, tem-se observado um lento progresso no estudo da recalcitrância.

Estudos analisando aspectos bioquímicos e anatômicos sugerem que, durante os primeiros estádios de desenvolvimento de sementes sensíveis e tolerantes à dessecação, as características são similares, além de haver elevada atividade metabólica em ambas. No entanto, no ponto de maturidade fisiológica, sementes tolerantes inativam seu metabolismo (*switch off*), enquanto as sensíveis mantêm seu metabolismo elevado até mesmo depois do desligamento da planta mãe (BARBEDO et al., 2013).

Devido ao atual estado de fragmentação das florestas nativas e perda da biodiversidade ecológica, muitas espécies arbóreas encontram-se ameaçadas de extinção, sendo que a conservação da diversidade vegetal é fundamental para a manutenção das relações ecológicas no ecossistema. A conservação *in situ* é a principal forma de manutenção das espécies em seu ambiente natural, servindo de fonte de propágulos para a regeneração natural, alimentação da fauna e coleta de sementes, visando a conservação ou comercialização. Contudo, essas áreas estão sujeitas a ação antrópica e vulneráveis ao efeito de catástrofes ambientais, como o fogo, podendo ocasionar a perda dos indivíduos.

Assim, a conservação *ex situ* representa a forma mais segura para a conservação do germoplasma das espécies a longo prazo. Bancos de sementes são constituídos principalmente por espécies ortodoxas, pois é possível armazená-las por décadas ou séculos, sem que ocorra a perda da viabilidade. No entanto, o maior desafio está na conservação de sementes sensíveis à dessecação, em bancos de germoplasma, devido a incapacidade de

armazenamento a baixas temperaturas e reduzido conteúdo de água, como é o caso da *Araucaria angustifolia*, também conhecida como pinheiro-brasileiro.

Atualmente, a *A. angustifolia* encontra-se na Lista Brasileira das Espécies Ameaçadas de Extinção (MMA, 2008), além de constar na categoria de espécies “criticamente em perigo” de extinção de acordo com a “Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas” do IUCN (IUCN, 2013). As sementes dessa espécie são classificadas como recalcitrantes, apresentando nível crítico de umidade entre 37-38% (EIRA et al. 1994; TOMPSETT, 1984). Devido sua importância econômica, sobretudo na comercialização de suas sementes (pinhão) para alimentação, e recuperação de áreas degradadas, são necessários estudos para a conservação *ex situ* dessa espécie.

Diante deste contexto, o objetivo geral nesta pesquisa foi verificar o efeito de diferentes velocidades de secagem, bem como a influência do armazenamento em baixa temperatura e o comportamento em banco de sementes do solo induzido nas características fisiológicas e moleculares de sementes de *Araucaria angustifolia*. Os principais objetivos específicos foram: a) caracterizar o processo de germinação e avaliar o efeito de diferentes velocidades de secagem nas mudanças fisiológicas e ultraestruturais de sementes provenientes de dois locais (Minas Gerais e Rio Grande do Sul); b) selecionar genes de referência para a normalização de dados de RT-qPCR e analisar a expressão gênica de genes ligados à tolerância à dessecação, em sementes submetidas à dessecação; c) avaliar o potencial de armazenamento em condição de refrigeração e; d) avaliar o comportamento de banco de sementes do solo induzido em diferentes ambientes da floresta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

Conhecida popularmente como araucária, pinheiro-brasileiro ou pinheiro do paraná (Figura 1), a área de ocorrência natural dessa espécie no Brasil foi de aproximadamente 200.000 Km², no entanto, a mesma foi reduzida drasticamente para aproximadamente 6.000 Km² (DILLENBURG et al., 2009). A rea original concentrava-se principalmente nos estados do Paraná (40% de sua superfície), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%) estendendo-se com manchas esparsas no sul de São Paulo (3%) até Minas Gerais e Rio de Janeiro. A araucária ocorre também em pequenas manchas no extremo nordeste da Argentina e no leste do Paraguai (LORENZI, 1992; CARVALHO; 2002; DUTRA; STRANZ, 2009).

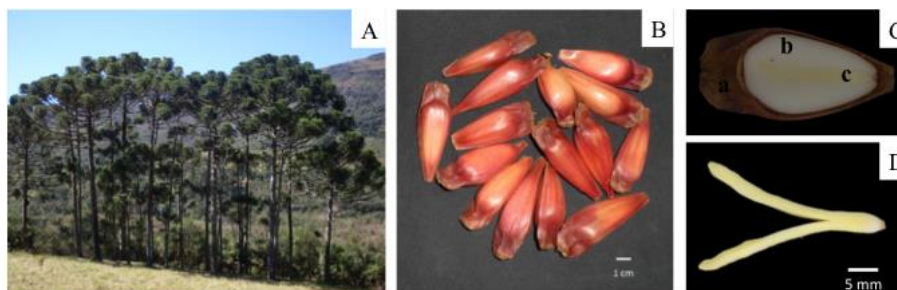


Figura 1 (A) Indivíduos adultos de *A. angustifolia*. (B) Sementes (pinhão). (C) Semente cortada longitudinalmente, observando-se o (a) tegumento (b) megagametfrito e (c) embrião. (D) Detalhes do embrião.

Uma das utilizaces mais nobres da espécie é na alimentação humana e animal, a partir do consumo do pinhão (MATTOS, 2011). Sua madeira apresenta boas características físicas e mecânicas, muito utilizada no passado para a construção de mordias, galpões e depósitos. Além disso, foi muito empregada

na confecção de moirões, fabricação de lápis, fósforos, mobiliário e para outras finalidades (CARVALHO, 2002; MATTOS, 2011). A madeira serrada e laminada de araucária foi por longo período, uns dos principais produtos na exportação brasileira. Os nós de pinho foram muito utilizados nas locomotivas, na navegação marítima e fluvial, substituindo o carvão mineral, devido seu elevado poder calorífico, além de apresentar elevada durabilidade natural (CARVALHO, 2002).

O ciclo de desenvolvimento das sementes se completa num período de, aproximadamente, quatro anos (CARVALHO, 2002; ANSELMINI, 2005), no entanto, Mantovani et al. (2004) observaram que o ciclo reprodutivo não foi superior a dois anos em estudo realizado no Parque Estadual Campos do Jordão (SP). A dispersão de sementes de araucária ocorre principalmente por autocoria, na forma barocórica, havendo também dispersão zoocórica, realizada por aves e roedores. Os principais agentes dispersores são as gralhas, esquilos e as cotias. As gralhas apresentam um comportamento peculiar, pois aceleram a queda dos pinhões e, ocasionalmente, podem perder as sementes durante o voo, auxiliando na dispersão (CARVALHO, 2002; VIEIRA; IOB, 2009).

As sementes de araucária são caracterizadas pela presença de tegumento; embrião, constituído pelo eixo hipocótilo-radícula e dois cotilédones, e gametófito feminino (megagametófito), constituindo-se na principal fonte de reserva alimentar (Figura 1) (PANZA et al., 2002). Sementes de *A. angustifolia* são classificadas como recalcitrantes, apresentando nível crítico de umidade entre 37% e 38% (EIRA et al. 1994; TOMPSETT, 1984), já o embrião, perde totalmente a viabilidade quando desidratado próximo a 43% de umidade (ESPINDOLA et al. 1994).

2.2 Sensibilidade à dessecação: danos por secagem

A perda de água pelas células das plantas é um estresse ambiental que influencia o complexo termodinâmico e cinético da estabilidade estrutural e todos os aspectos biologicamente funcionais da célula (SUN, 2002). Quando um tecido vegetal é submetido à desidratação, observam-se respostas diferenciadas em termos de acúmulo de danos e sobrevivência, podendo variar com a técnica utilizada (PAMMENTER et al., 2002).

Na secagem de sementes recalcitrantes, deve-se considerar o grau de umidade de segurança, o grau de umidade crítico e o grau de umidade letal para cada espécie. De acordo com Hong e Ellis (1992), o grau de umidade de segurança corresponde ao conteúdo de água que pode ser atingido com a dessecação sem prejuízos à viabilidade das sementes. O grau de umidade crítico corresponde ao início da perda da viabilidade e, o grau de umidade letal, significa o limite a partir do qual todas as sementes perdem a viabilidade.

O grau de umidade letal para algumas espécies que produzem sementes recalcitrantes se verifica quando uma pequena porção de umidade é removida e, por outro lado, algumas espécies podem tolerar maior perda de umidade, existindo assim, um *continuum* de sensibilidade à dessecação (FARRANT et al., 1989; BERJAK; PAMMENTER, 2000; BEWLEY et al. 2013).

Em tecidos sensíveis à dessecação, verifica-se a falta ou a falha de possíveis mecanismos que conferem a tolerância, ao invés de um processo individual. Existem pelo menos três níveis de danos que ocorrem em tecidos sensíveis à dessecação na secagem: a) danos mecânicos; devido à redução do volume celular, ocasionado o colapso dos vacúolos e do citoesqueleto; b) metabolismo induzido pela produção de espécies reativas de oxigênio e atividade descontrolada de radicais livres (na remoção de água a níveis intermediários) e; c) desnaturação macromolecular, organelas de sementes

recalcitrantes permanecem em estado altamente diferenciado e sob desidratação tornam-se permanentemente danificadas (PAMMENTER; BERJAK, 1999; BERJAK; PAMMENTER, 2000; BERJAK; PAMMENTER, 2013).

A velocidade de secagem pode influenciar a resposta de sementes recalcitrantes à dessecação. Sementes ou eixos excisados que passam pelo processo de secagem rápida, utilizando sílica gel, por exemplo, podem sobreviver a conteúdos de água inferiores se comparados com a secagem realizada em ambiente com elevada umidade relativa (PAMMENTER et al., 2000).

Uma das explicações para tal fato é que na secagem lenta, as sementes permanecem por longo período em graus de umidade intermediários, se comparada com a secagem rápida, ocasionado maior acúmulo de danos. Desta forma, na secagem rápida, se verifica menor acúmulo de danos e graus de umidade mais baixos podem ser tolerados, preservando as estruturas das membranas celulares. No entanto, sementes recalcitrantes não podem tolerar baixos graus de umidade, típico de sementes ortodoxas, independente da taxa de secagem. Além disso, deve-se considerar o efeito do tempo de secagem, dificultando a quantificação da sensibilidade à dessecação e comparação entre espécies (PAMMENTER et al. 1991; BERJAK et al., 1993; PAMMENTER et al., 1998; PAMMENTER et al., 2000).

Segundo Pammenter e Berjak (2000a) células do eixo embrionário de sementes recalcitrantes submetidas a diferentes velocidades de secagem mostraram respostas ultraestruturais diferenciadas à desidratação. Nas sementes secadas de forma lenta, verificou-se a perda da viabilidade, degradação das estruturas de membranas e uma aparência anormal dos corpos lipídicos. Já as sementes secadas de forma rápida, para um teor de água ligeiramente baixo, mostraram-se viáveis, com as membranas e os núcleos bem preservados,

sugerindo que diferentes danos podem ocorrer em distintas velocidades de secagem.

2.3 Aspectos moleculares da tolerância à dessecação

Embora a dessecação em sementes relaciona-se a um processo físico, a transição do período de acúmulo de reservas para à dessecação está associada a mudanças significativas em termos de expressão gênica e intensa atividade de transcrição. Por exemplo, em *Arabidopsis thaliana*, a análise de transcritos no estágio de dessecação indicou a expressão de 6.963 genes, ou seja, 30% do genoma dessa espécie (ANGELOVICI et al., 2010).

Os principais estudos moleculares realizados com sementes têm sido a identificação e caracterização das proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*). Várias das suas funções já foram propostas, incluído seu papel como antioxidante, estabilizante de membranas e proteínas, mas sua exata função ainda permanece desconhecida (FISHER, 2008). Em alguns casos, verifica-se que o aumento de sua expressão também contribui para o acúmulo de outros compostos de proteção, tais como prolinas, poliaminas e açúcares, sugerindo seu efeito indireto sobre outros mecanismos ou que existem sistemas de *feedback* para coordenar a expressão de adaptações a vários tipos de estresse (BEWLEY et al. 2013).

Em sementes recalcitrantes é possível verificar a ocorrência de proteínas LEA em uma variedade de espécies de diferentes habitats. Sua presença em embriões sensíveis à dessecação pode facilitar a sobrevivência a baixos teores de água, permitindo que os eixos sejam criopreservados (KALEMBA; PUKACKA, 2007; BERJAK; PAMMENTER, 2008).

Um grupo de proteínas LEA que tem mais recebido atenção é a família LEA D11, também conhecido como deidrinas. Acumulam-se durante os últimos

estágios da embriogênese, estando associada à resposta a baixa temperatura, aplicação de ácido abscísico (ABA) ou tratamentos de estresse por desidratação. Devido sua natureza anfipática, são capazes de inibir a desnaturação de uma variedade de macromoléculas (PAMMENTER; BERJACK, 1999). As deidrininas não são desnaturadas devido à secagem ou aquecimento, formando uma estrutura desordenada, que pode evitar o colapso físico durante a desidratação (BEWLEY et al., 2013)..

Farrant et al. (1996) avaliando a presença de deidrininas e níveis de ABA em sementes recalcitrantes de espécies de diferentes habitats, constataram sua presença em *Araucaria angustifolia*, assim como em *Acer saccharinum*, *Zizania palustres* e *Aesculus hippocastanum*. Nas espécies nas quais não foi constatada sua presença, verificou-se baixo conteúdo de ABA. Os mesmos autores relatam que a presença ou ausência de deidrininas, em sementes recalcitrantes, pode estar associada com a extensão da secagem ou baixas temperaturas nas quais as sementes foram expostas.

Por meio da técnica de *western blot* e imunolocalização *in situ* foi avaliado o conteúdo de deidrininas em embriões maduros de *A. angustifolia*, observado-se sua imunolocalização no núcleo (associado com a cromatina), corpos protéicos e microcorpos, constituindo um ponto de partida para entender sua função em células do embrião da espécie (FARIAS-SOARES et al., 2013).

Em *Arabidopsis thaliana*, quatro reguladores principais controlam a maioria dos aspectos da maturação das sementes, tais como a acumulação de compostos de armazenamento, identidade dos cotilédones, aquisição da tolerância à dessecação e dormência, sendo eles: (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE3* [*ABI3*], *FUSCA3* [*FUS3*], *LEAFY COTYLEDON1* [*LEC1*] e *LEC2*), no entanto, a interação entre esses reguladores ainda é mal compreendida (TO et al., 2006).

Sementes sensíveis à dessecação de *Magnolia ovata* secas a diferentes conteúdos de água demonstraram que a expressão de transcritos de genes relacionados ao desenvolvimento do ciclo celular e citoesqueleto (*ABI3*, *CDC2*-like e *ACT2*) não explicou o comportamento germinativo em relação aos danos ocasionados pela secagem (JOSÉ et al. 2008). No entanto, Faria (2006), observou aumento na expressão do gene *ABI3* durante a embebição de sementes de *Medicago truncatula*, porém havendo diminuição durante o crescimento radicular, se comparada com as sementes secas.

Além da influência do ABA as proteínas de choque térmico (HSP) também tem sido relacionadas na aquisição da tolerância à dessecação em sementes. O papel específico desempenhado pelas HSP na dessecação não é bem conhecido, mas provavelmente, interagem para assegurar que as células tenham danos reduzidos quando a água é perdida nas sementes (BEWLEY et al. 2013).

2.4 Armazenamento de sementes

A forma mais conveniente para a conservação *ex situ* de germoplasma vegetal é por meio do armazenamento de sementes sob condições que maximizam sua longevidade pós-colheita. Para sementes tolerantes à dessecação, recomenda-se que seu armazenamento seja realizado em estado seco, em baixa umidade relativa (próximo de 15% e temperaturas abaixo de zero, geralmente -18°C), as quais são normas na maioria dos bancos de sementes (FAO, 2013).

No caso das sementes recalcitrantes, a manutenção do vigor e da viabilidade durante o armazenamento requer a menor temperatura possível que não cause danos por congelamento. O armazenamento de sementes inteiras somente é possível por curto a médio prazo, já que permanecem metabolicamente ativas e tendem a progredir rumo à germinação, se mantido o

conteúdo de água em que são dispersas. Além disso, o elevado grau de umidade pode favorecer a proliferação de fungos, que também afetam a qualidade das sementes (PAMMENTER; BERJAK, 1999; BERJAK; PAMMENTER, 2008).

Aparentemente, a longevidade das sementes no armazenamento está relacionada ao habitat de ocorrência natural da espécie, sendo que sementes de origem tropical possuem baixa longevidade se comparadas com as de origem temperada, e como regra geral, quanto mais quente e úmido o local de ocorrência, menor a sua longevidade (PAMMENTER et al., 1994).

A sensibilidade à dessecação impõe restrições sobre a conservação de germoplasma a longo prazo, devido a incapacidade de armazenamento de sementes a baixas temperaturas e teores de água, problema este que pode ser revertido pela redução do estresse oxidativo, durante a secagem e, indução da vitrificação por secagem parcial e resfriamento rápido (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

Sementes de *A. angustifolia* armazenadas em sacos plásticos selados numa temperatura entre 24-28°C, apresentaram taxa de germinação de 100% após 40 dias de armazenamento. Durante o armazenamento, houve o aumento da atividade metabólica e os componentes de reserva foram progressivamente utilizados, além de um aumento na ocorrência de mitocôndrias e na extensão do desenvolvimento do retículo endoplasmático (FARRANT et al., 1989).

Não existe um método convencional satisfatório para a conservação de sementes recalcitrantes a longo prazo, pois não podem ser dessecadas nem armazenadas a temperaturas sub-zero, devido aos danos causados pelo resfriamento, ocasionando a formação de gelo e, conseqüentemente, a perda de sua viabilidade (HONG; ELLIS, 1996).

A criopreservação (geralmente realizada em nitrogênio líquido a -196 °C) parece oferecer a única opção para a conservação de germoplasma a longo prazo. É comum o uso de embriões ou eixos embrionários como explantes para

serem criopreservados. No entanto, esse método não é facilmente conseguido, uma vez que nos procedimentos podem ocorrer danos oxidativos. Devido ao elevado custo da técnica e a necessidade de desenvolver tecnologias adequadas para o material a ser criopreservado, a mesma ainda apresenta limitações (PAMMENTER; BERJAK, 1999; BERJAK; PAMMENTER, 2008; BERJAK; PAMMENTER, 2013).

2.5 Banco de sementes do solo

Após a dispersão pela planta mãe, as sementes entram em contato com a superfície do solo, podendo germinar imediatamente ou persistirem por um determinado período no solo. Durante este tempo, as sementes são capazes de formar um banco de sementes do solo (THOMPSON, 2000; FENNER; THOMPSON, 2005). Segundo Almeida-Cortez (2004) o banco de sementes pode ser definido como sendo o estoque de sementes viáveis existente no solo, desde a superfície até as camadas mais profundas, em uma dada área num dado momento.

De acordo com a classificação proposta por Garwood (1989) um banco de sementes tropical pode ser classificado em diferentes estratégias de regeneração, sendo que as duas principais são: i) transitório – é composto por sementes de curta longevidade, não dormentes, sendo dispersas por curto período durante o ano e, ii) persistente – esperado para espécies pioneiras, composto por sementes de longa longevidade as quais possuem dormência facultativa e são dispersas por curto ou longos períodos.

Na maioria das florestas predominam bancos de sementes transitórios, no entanto, em outros habitats, como campos aráveis, cerrados propensos ao fogo e áreas úmidas temporárias, as quais sofrem distúrbios não previsíveis, a maioria das espécies possui bancos de sementes persistentes (FENNER;

THOMPSON, 2005). Embora sementes não dormentes têm tendência de serem menos persistentes no solo, a dormência não é uma condição necessária para a formação de um banco de sementes persistentes (THOMPSON, 2000). Assim, a germinação de um banco de sementes persistente pode surgir em resposta a estímulos ambientais e não da superação da dormência. Para a maioria das espécies, o papel da dormência em bancos persistentes se limita na regulação temporal, na qual as sementes respondem a estímulos de germinação ou prevenindo a germinação após sua dispersão (FENNER; THOMPSON, 2005).

Estudos de bancos de sementes naturais podem fornecer evidências da longevidade das sementes no ambiente, muitas vezes as espécies não estão mais presentes na comunidade, mas ainda podem estar estocadas no solo (FENNER; THOMPSON, 2005). O reaparecimento de espécies de plantas no banco de sementes persistente no solo funciona como uma “memória” da comunidade original da vegetação (BAKKER et al., 1996). As sementes presentes no solo de florestas tropicais representam uma importante reserva de recrutamento de indivíduos após determinada perturbação, influenciando na regeneração natural e sucessão ecológica (ALMEIDA-CORTEZ, 2004).

A sensibilidade à dessecação e a curta longevidade das sementes recalcitrantes implica diretamente na regeneração natural, não havendo a formação de um banco de sementes do solo a longo prazo, mas sim a germinação e formação de banco de plântulas (PAMMENTER; BERJAK, 2000b). Avila et al. (2011), avaliando os mecanismos de regeneração natural em remanescente de Floresta Ombrófila Mista, observaram a ausência de *A. angustifolia* no banco de sementes do solo, devido ao comportamento recalcitrante das sementes, constatando-se que a melhor estratégia para a regeneração da espécie é por meio da chuva de sementes, que dá origem a um banco de plântulas.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo descreve o comportamento fisiológico, mudanças celulares e aspectos moleculares de sementes recalcitrantes de *Araucaria angustifolia* submetidas a condição de desidratação, armazenamento tradicional e em banco de sementes do solo induzido na sensibilidade à dessecação e viabilidade das sementes. Assim, o trabalho é composto por três artigos e abaixo esta descrito uma síntese dos principais resultados obtidos.

No primeiro artigo, foi estudada a sensibilidade à dessecação em diferentes condições de secagem, observando-se que não houve diferença significativa entre a secagem rápida e lenta, e a viabilidade total das sementes é perdida quando desidratadas próximo de 20% de grau de umidade. No entanto, as sementes toleram uma leve secagem, até de 34%, mantendo a viabilidade elevada (85% de germinação). Por meio da análise ultraestrutural, verificou-se que a drástica perda de água pelas sementes promoveu um aspecto anormal da parede celular, deformação de organelas e deterioração subcelular.

No segundo artigo, identificou-se genes de referência para a normalização de dados de RT-qPCR e analisou-se a expressão de genes relacionados a tolerância à dessecação em sementes submetidas à desidratação. Constatou-se, que os genes de referencia mais estáveis para amostras heterogêneas foram *ACT*, *GAPDH* e *SARI*. Houve um decréscimo nos níveis de transcritos durante a desidratação para os genes *ABI3*, *LEC1*, *SMP*, *APX*, *MIPS* e *XERO1*. Por outro lado, *CAT* e *NAC* apresentaram um acúmulo de transcritos seguidos pela perda de água e da viabilidade das sementes.

No terceiro artigo, avaliou-se o potencial de armazenamento de dois lotes (Lotes MG e RS) e o comportamento de banco de sementes do solo induzido em diferentes ambientes da floresta. Observou-se, para ambos os lotes avaliados, que o armazenamento de sementes de *A. angustifolia* só é possível por

curto período de tempo sob condições de refrigeração (aproximadamente 12 meses) e que a procedência das sementes não afetou o potencial de armazenamento, apesar das distintas características climáticas das regiões. Além disso, a manutenção da cobertura florestal, principalmente o sub-bosque, mostrou ser fundamental para a regeneração e conservação da araucária por meio do banco de sementes, pois a condição de borda é desfavorável para a regeneração da espécie.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Dispersão e banco de sementes: In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 225-235.

ALPERT, P. No the limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 685-695, 2005.

ALPERT, P.; OLIVER, M. J. Drying without dying. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.). **Desiccation and survival in plants: Drying without dying**. London: CABI Publishing, 2002. p. 422.

ANGELOVICI, R.; GALILI, G.; FERNIE, A. R.; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 4, p.211-218, 2010.

ANSELMINI, J. I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba – PR**. 2005. 52 p. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AVILA, A. L.; ARAUJO, M. M.; LONGHI, S. J., GASPARIN, E. Agrupamentos florísticos na regeneração natural em remanescente de Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil. **Scientia Forestalis**, v. 39, n. 91, p. 331-342, 2011.

BAKKER, J. P.; POSCHLOD, P.; STRYKSTRA, R. J.; BEKKER, R. M.; THOMPSON, K. Seed banks and seed dispersal: importante topics in restoration ecology. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 45, n. 4, p. 461-490, 1996.

BARBEDO, C. J.; CENTENO, D. C.; RIBEIRO, R. C. L. F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, v. 40, n. 4, p. 583-593, 2013.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 478, p. 1-9, 2013.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Progress in the understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrante) seeds. In: ELLIS, R. H.; BLACK, M.; MURDOCH, A. J.; HONG, T. D. (Eds.). **Basic and Applied Aspects of Seed Biology**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1997. p. 689-703.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. Edição Especial, p. 22-25, 2000.

BERJAK, P.; VERTUCCI, C. W.; PAMMENTER, N. W. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, v. 3, p.155-166, 1993.

BERJAK, PATRICIA; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, n. 2, p. 213-28, 2008.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. New York: Springer, 3 ed., 2013. 392 p.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 788-795, 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Pinheiro do paraná. Colombo: EMBRAPA-MAPA, 2002. 17 p. (Circular Técnica, 60).**

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; WOLKERS, W.F.; OLIVER, A.E.; MA, X.; AUH, J.; TANG, M.; ZHU, S.; NORRIS, J.; TABLIN, F. Stabilization of dry mammalian cells: Lessons from nature. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, p. 810-820, 2005.

DILLENBURG, L. R.; FRANCO, A. M. S.; COUTINHO, A. L. et al. Aspectos ecofisiológicos da regeneração de *Araucaria angustifolia*. In: FONSECA, C. R.; SOUZA, A. F.; LEAL-ZANCHET, A. M.; DUTRA, T.; BACKES, A.; GANADO, G. (Eds.). **Floresta com Araucária: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2009, cap. 5. p. 57-65.

DUTRA, T. L.; STRANZ, A. Biogeografia, evolução e ecologia da família Araucariaceae: o que mostra a Paleontologia. In: FONSECA, C. R.; SOUZA, A. F.; LEAL-ZANCHET, A. M.; DUTRA, T.; BACKES, A.; GANADO, G. (Eds.). **Floresta com Araucária: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2009, cap. 1. p. 15-34.

EIRA, M. T. S.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R.; CARRADA, D. K.; MELLO, C. M. C. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze – Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 1994.

ESPINDOLA, L. S.; NOIN, M.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrante *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research**, v. 4, p. 193-201, 1994.

FAO. **Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**. Rome: FAO, 2013.

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

FARIAS-SOARES, F. L.; BURRIEZA, H. P.; STEINER, N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos. **Protoplasma**, v. 250, p. 911-918, 2013.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; FARNSWORTH, E. J.; VERTUCCI, C. W. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat. **Seed Science Research**, v. 6, p. 175-182, 1996.

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. **Planta**, v. 178, p. 189-198, 1989.

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The ecology of seeds**. New York, USA: Cambridge University Press, 2005. 250 p.

FISHER, K. M. Bayesian reconstruction of ancestral expression of the LEA gene families reveals propagule-derived desiccation tolerance in resurrection plants. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 4, p. 506-515, 2008.

GARDWOOD, N. C. Tropical soil seed banks: a review. In: LECK, M., PARKER, V., SIMPSON, R. (Eds.). **Ecology of Soil Seed Banks**. Academic Press, San Diego: 1989. p. 149-209.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior**. IPGRI Technical Bulletin No. 1. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, 1996.

IUCN. **The IUCN red list of threatened species 2013.2**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/32975/0>>. Acesso em: 22 de jan. de 2014.

JOSÉ, A. C.; LIGTERINK, W.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; HILHORST, H. W. M. Changes in gene expression during drying and imbibition of desiccation sensitive *Magnolia ovata* (A. ST.-HIL.) Spreng. seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 270-280, 2008.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B.E. Dessication sensitivity in orthodox and recalcitrant seed in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.). **Desiccation and survival in plants: Drying without dying**. London: CABI Publishing, 2002. p. 149-184.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: From genomics to the field. **Plant Science**, v. 179, p. 554-564, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 352 p.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P.; DOS REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787-796, 2004.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2011. 700 p.

MMA. **Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção – IBAMA**. Brasília, 2008.

PAMMENTER, N. W. GREGGAINS, V.; KIOKO, J. I.; WESLWEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W. E. Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, v. 8, p. 463-471, 1998.

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

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects os recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. Edição Especial, p. 56-59, 2000a.

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

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; SMITH, M. T.; ROSS, G. Why do stored hydrated recalcitrante seeds die? **Seed Science Research**, v. 4, p. 187-191, 1994.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WESLEY-SMITH, J.; WILLIGEN, C. V. Experimental aspects of drying and recovery. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.). **Desiccation and survival in plants: Drying without dying**. London: 2002. p. 93-110.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERKAJ, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia Kirkii*. **Plant Physiology**, v. 96, 1093-1098, 1991.

PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MARODER, H.; PREGO, I.; MALDONADO, S. Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 3, p. 273-281, 2002.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, v.1, n. 4, p. 499-514, 1973.

ROBERTS, E. H.; ELLIS, R. H. Water and seed survival. **Annals of Botany**, v. 63, p. 39-52, 1989.

SUN, W. Q. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.). **Desiccation and survival in plants: Drying without dying**. London: 2002. p. 47-91.

THOMPSON, K. The functional ecology of soil seeds banks. In: FENNER, M. (Ed.), **Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities**. CABI Publishing. Wallingford: 2000. p. 215–235.

TO, A.; VALON, C.; SAVINO, G.; GUILLEMINOT, J.; DEVIC, M.; GIRAUDAT, J.; PARCY, F. A Network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. **The Plant Cell**, v. 18, p. 1642-1651, 2006.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Biology**, v. 105, n. 3, p. 581-586, 1984.

VIEIRA, E. M.; IOB, G. Dispersão e predação de sementes de *Araucaria angustifolia*. In: FONSECA, C. R.; SOUZA, A. F.; LEAL-ZANCHET, A. M.; DUTRA, T.; BACKES, A.; GANADO, G. (Eds.). **Floresta com Araucária: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2009, cap. 8. p. 85-95.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Physiological and ultrastructural responses during dehydration of recalcitrant seeds of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

Versão preliminar submetida à revista *Seed Science and Technology*, podendo sofrer alterações de acordo com o corpo editorial da revista.

Authors: E. Gasparin; J. M. R. Faria; A. C. José; H. W. M. Hilhorst

Running heading: Desiccation-sensitivity in *Araucaria angustifolia* seeds

Abstract

The intense exploration of forests for wood production in Brazil over the past decades has led to the reduction of the population of native trees with economic importance and many efforts have been carried out to conserve these species. The purpose of this study was to characterize the germination process and evaluate the effect of different drying rates on physiological and ultrastructural changes of *Araucaria angustifolia* seeds from two provenances. The imbibition pattern was linear during germination and when seeds were cut, the water uptake increased, indicating that the seeds coat inhibits water absorption although final germination percentage was not affected. Seeds subjected to fast drying in silica gel or slow drying in a cold room did not show interaction between water content (WC) and drying rate, and total viability was lost when seeds were dried to 20% WC. Under slight drying at a fast rate seeds survived dehydration to 34% WC (85% germination). The ultrastructure of mature embryos indicated their actively metabolic condition and starch appears to be main storage reserve.

Drying to lower WC promoted abnormal aspect of cell wall, deformation of organelles and subcellular deterioration which was followed by an increase in electrical conductivity.

Introduction

The conifers are the group that most stands out among the gymnosperms, tending to dominate the Northern Hemisphere forests; there is also a wide diversity in the Southern Hemisphere, but only in small numbers in the most tropical environments (Conway, 2013). *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is the only representative of the Araucariaceae family in Brazil (Dutra and Stranz, 2009). The natural occurrence of Brazilian pine covered approximately 200,000 km²; however, over the last 40 years its area has dramatically reduced to near 6,000 km² (Dillenburger *et al.*, 2009), mainly through the uncontrolled exploitation of the timber (Guerra *et al.*, 2000). Currently, this species is on the Brazilian List of Endangered Species (MMA, 2008) and included in the category of species “critically endangered” of extinction according to the Red List of Threatened Species (IUCN, 2014). Many efforts have been done to attempt reforestation with this conifer but many failed (Hampp *et al.*, 2000). In this context, it is important to develop strategies for germplasm conservation in order to support reforestation and conservation programmes (Elbl *et al.*, 2015).

The germplasm conservation of species that produce desiccation sensitive seeds is difficult because such seeds cannot be dried and stored under conditions usually used for orthodox seeds (Pammenter and Berjak, 2014). This problem may be overcome by a partial dehydration, which can prevent germination during storage, but which is mild enough to avoid desiccation damage (Eggers *et al.*, 2007). Several factors can affect drying rate when whole

seeds are subjected to dehydration, such as seed coverings, seed size and developmental status (Berjak and Pammenter, 2008). Studies have shown that drying rate can lead to different responses of the seeds regarding mechanical stress and the extent of desiccation in which deleterious reactions may occur (Liang and Sun, 2000).

To quantify desiccation sensitivity adequately when seeds are dehydrated it is necessary to determine the “critical moisture content”, when a significant reduction in germination percentage occurs, and “lethal moisture content”, determined by a complete lack of germination (Hong and Ellis, 1992). Furthermore, during the drying of desiccation-sensitive tissues there are at least three levels of damages: mechanical damage due to the reduction of cellular volume; metabolism-induced by production of reactive oxygen species (ROS); and desiccation damage *sensu stricto* (Farrant, 2000; Berjak and Pammenter, 2000; Berjak and Pammenter, 2013). The drying rate normally influences the response of recalcitrant seeds to desiccation. Seeds and/or embryonic axes subjected to fast drying can survive to lower water contents than the slowly dried (Berjak and Pammenter, 2008). One of the reasons for the contrasting behaviour is that in slow drying the seeds remain at a range of intermediate water content for a long period, accumulating more damages compared with fast drying. However, recalcitrant seeds cannot tolerate low water contents, typical of orthodox seeds, regardless of the drying rate. Furthermore, the drying time should be considered, making it difficult to quantify the desiccation-sensitivity and to make comparisons among species (Pammenter *et al.*, 1991; Berjak *et al.*, 1993; Pammenter *et al.*, 1998; Bewley *et al.*, 2013; Berjak and Pammenter, 2013).

In this context, the present study aimed to characterize the germination process of recalcitrant seeds of *A. angustifolia* and investigate the effect of drying rate (slow x fast) on the viability of the seeds from two provenances

comparing ultrastructural characteristics of tissues dehydrated, in order to help short time conservation germplasm of such seeds and allow the development of techniques to increase storability.

Materials and methods

Seed material

Mature seeds of *A. angustifolia* were collected in two regions of natural occurrence of the species. One provenance (RS) was from Mixed Ombrophilous Forest (29°25'22.4"S; 50°23'11.2"W) located at the National Forest of São Francisco de Paula (São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul State, Brazil), and the other provenance (MG) was from Tropical Lowland Rainforest (21°13'55.0"S; 44°58'42.0"W) located at Aiuruoca, Minas Gerais State, Brazil. The seeds were collected from at least 12 trees in April and May 2012 (first experiment) and 2014 (second experiment). After collection, the seeds were held in a container filled with water in order to discard the floating seeds (Wendling and Delgado, 2008). Seeds with visible sign of larvae predation were also eliminated. After that, seeds were kept at room temperature ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) for one day to remove superficial water, and then the experiments were conducted. Precipitation data of the regions where the seeds were collected were obtained from BDMET-INMET Climatology Station of São Lourenço (MG) and Caxias do Sul (RS).

Germination test

Germination test was carried out with seeds cut approximately 3 mm from their proximal end (Moreira-Souza and Cardoso, 2003). All seeds were surface sterilized with 2% sodium hypochlorite for 10 minutes and rinsed with distilled water. After this, seeds were then sown immediately in plastics trays

(510 x 260 x 70 mm) containing moistened sand that was washed and sterilized by autoclaving. Germination assays were carried out with four replicates of 20 cut seeds, at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under constant light. Germination was scored weekly, during 70 days, evaluating radicle protrusion and normal seedlings formation (include those that have primary or a set of secondary root, well-developed hypocotyl, epicotyl and presence of needles). The germination speed index (GSI) was used to quantify seed vigour (Maguire, 1962).

Seed characterisation

Water content (WC) of whole seeds/embryos was determined in four replicates of five cut transversally seed/intact embryo by oven drying at 103°C for 17 hours (ISTA, 1996), calculated on a fresh weight basis. Weight of 1,000 seeds was estimated from eight replicates of 100 seeds (ISTA, 1996). The seed morphological measurements were determined by length, width and thickness (mm), and the weight of 50 individual seeds collected in 2012.

Water imbibition

In order to evaluate imbibition pattern and compare the effect of cutting seed tip on the germination percentage (MG provenance/2012), intact and cut seeds (tegument removal, approximately, 3 mm from the tip - proximal end - of each seed, according Moreira-Souza and Cardoso, 2003) were weighed before and after incubation ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ /constant light) on a moist substrate (over sand). Four replicates of ten seeds were weighed individually at time 0, 3, 6, 9, 12 and after every 24 hours when there was no further increase in imbibed seeds weight, when radicle protrudes (germination *sensu stricto*).

Flow cytometry analysis

To estimate the 2C DNA content, seeds from provenances MG and RS (2012) were imbibed for 0 (control), 6 or 8 (more than 20% of the seeds with radicle protrusion) and 13 or 17 days (more than 50% seeds with radicle protrusion), respectively. Approximately 20-30 mg of five replicates of two radicles tips were chopped on ice with LB01 buffer (1 mL) to release the nuclei (Dolezel *et al.*, 1989). The triturated tissue was filtered through two layers of cheesecloth using a plastic pipette, and subsequently filtered through a nylon filter (50 μ m), and collected in a polystyrene tube. The nuclei suspension was stained with 25 μ L propidium iodide 1% (w/v), and 2.5 μ L RNase was subsequently added to each sample. At least 10,000 nuclei were analyzed for each sample using a FACSCalibur cytometer (BectonDickinson). Each cytometric histogram from Cell Quest software was analyzed using WinMDI 2.8 software. The 2C DNA values of each sample were calculated by the relative fluorescence intensity of the sample with respect to the internal reference standard (*P. sativum* 9.09 pg). Three samples per accession were analyzed to obtain the mean 2C DNA value.

Dehydration condition

In the first experiment, fast drying was carried out in a closed plastic container at $20 \pm 3^{\circ}$ C, under circulating air, containing silica gel (RH $6 \pm 3\%$ / $20 \pm 3^{\circ}$ C), separated by a plastic mesh. The silica gel was replaced when the colour changed from blue (dry) to pink (humid/wet). For slow drying, seeds were placed in plastics trays in a cold room (RH $35 \pm 5\%$ / $20 \pm 3^{\circ}$ C) to obtain different target water contents: seeds without dehydration (fresh) and approximately 30 and 20% WC, for fast and slow drying. During dehydration the weight of the samples was monitored and recorded daily until reaching the target weight, coinciding with the desired target water content. A seed sample

(control) was kept in the cold room ($25 \pm 3^{\circ}$ C) to check the effect of time on viability of the seeds. The experimental design was completely randomised with two factors, drying rate (fast and slow) \times water content (30 and 20%) for the seeds collected in 2012. In the second experiment, seeds collected in 2014 were dried under circulating air, containing silica gel (RH $6 \pm 3\%/20 \pm 3^{\circ}$ C), in order to obtain seeds with 34, 32 and 29% WC.

X-ray imaging

X-ray images of the seeds collected in 2014 (MG) were acquired using a Faxitron HP MX-20 digital x-ray machine. Four replicates of 20 identified seeds were placed manually on the platform of the detection system and the classification of uninfested and infested seeds was determined based on the X-ray images. After that, the seeds were set to germinate.

Electrical conductivity

To evaluate the seed quality, four replicates of five individual seeds without the tegument were weighed and soaked in 50 ml distilled water at 25° C/dark and were left to soak for 24 hours. The electrical conductivity (EC) of the solution was measured by a conductivity meter (Digimed DM-31) and expressed as $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ seed.

Scanning electron microscopy

The ultrastructural analysis was carried out using only MG provenance (2012) because there was no physiological difference between the two provenances during dehydration test. Samples of fresh and dried megagametophyte and root apical meristem of the seeds (20% WC - fast drying) of MG provenance were cut breadthways and immersed in a modified Karnovsky solution (glutaraldehyde 2.5%, paraformaldehyde 2.5% in sodium

cacodylate buffer 0.05 M, pH 7.2, CaCl₂ 0.001 M) and stored in a cold chamber until analysis. They were then infiltrated with a cryoprotector, an aqueous solution consisting of 30% glycerol, for 30 minutes and transversally sectioned in liquid nitrogen using a scalpel blade. The cuts obtained were transferred to a 1% aqueous solution of osmium tetroxide for 1 hour and subsequently dehydrated for 10 minutes in a series of acetone solutions (25%, 50%, 75%, 90% and 100% three times) before being taken to the critical point apparatus (Baltec CPD 030). The specimens were placed on aluminium support stubs, over a film of aluminium foil using a carbon tape, sputter-covered with gold (Baltec SCD 050) and observed in a LEO EVO 40 XVP scanning electron microscope (Leo Electron Microscopy). Images were digitally generated and registered at magnifications between 50-600 x. The instrument set up used were to 20 kv accelerating voltage and a working distance of 9 mm. Images were processed using Corel Draw 5 Photopaint software, where they were selected and arranged.

Transmission electron microscopy

Samples of fresh and dried root apical meristem embryo of seeds with 30% water content (fast and slow drying), from both MG and RS provenances (2012), were bisected longitudinally and immersed in a fixative solution (Karnovisky's modified), pH 7.2, and stored in a cold chamber until analysis. They were then washed in cacodylate buffer 0.05 M, pH 7.2 (three times for 10 minutes), post-fixed in 1% aqueous osmium tetroxide solution for 1 hour, washed twice for 15 minutes in distilled water, transferred to a 0.5% uranyl acetate solution for 12 hours at 4°C and then washed once more in distilled water and dehydrated in a series of acetone solutions (25%, 50%, 75%, 90% and 100% three times). The dehydrated tissue was gradually infiltrated with spur/acetone, 30% for 8 hours, 70% for 12 hours and 100% twice for 24 hours

each. The specimens obtained were set in moulds and polymerised at 70°C for 48 hours. Resulting blocks were used for ultramicrotomy.

Polymerised blocks were trimmed in thin (>4100 nm) and ultra thin sections (<100 nm) using a diamond knife in a Reichert-Jung ultramicrotome. Thin sections were selected using a gold ring, placed on glass microscope slides, coloured with toluidine blue (1%) and sodium borate (1%) solutions, filtered in a Millipore filter (0.2mm) and set up permanently in a Permalt environment. Ultra-thin sections were taken in golden slot grids and dried on aluminium racks covered with formvar. The sections were post contrasted in uranyl acetate, followed by lead citrate for three minutes, and then examined by transmission electron microscopy (Zeiss Moded EM-109).

Statistical analysis

The experimental design of flow cytometry analysis, X-ray imaging and electrical conductivity were completely randomised. All the data were submitted to normality and homoscedastic ($p \geq 0.05$) and then subjected to ANOVA analysis. Germination data was transformed by $\arcsin(x/100)^{0.5}$. The effects of particular factors (drying rate x water content) were tested and the means were compared by Scott-Knott test at 5% probability. The data analysis was carried out by Sisvar software (Ferreira, 2008).

Results

General characteristics of A. angustifolia seeds

The initial water content (fresh weight basis) of *A. angustifolia* seeds collected in 2012 was 43.2% (MG) and 41.7 % (RS), which was lower than the water content of the embryo, 55.9% (MG) and 51.3% (RS) (table 1). Both provenances showed high viability after shedding; however, the percentage of

normal seedling formation was lower for the provenance RS (76%) than for MG (93%). The morphological characteristics indicated that the seeds from RS were heavier and longer than those from MG, consequently with a lower number of seeds per kilo (table 1). According to figure 1, monthly precipitation on the collection regions was 1491.3 mm (MG/2012), 673.1 mm (MG/2014) and 1766.2 mm (RS/2012).

During the first hours of imbibition, the water uptake by intact seeds remained stable and only after 10 days the fresh weight of the seeds began to increase (figure 2). Once imbibed, cut seeds showed a linear increase in fresh weight, a different pattern to that observed for the intact seeds. Germination of cut seeds, as assessed by radicle protrusion, started five days after imbibition whereas in intact seeds it started after seven days. The proportion of germination was greater in cut seeds, at all times, as compared to intact seeds. At the end of the test (16 days), the total germination percentage was 82.5% for cut and 72.5% for intact seeds (MG provenance/2012), but there was no significant difference in the final germination ($p = 0.2645$).

Table 1. Morphological and physiological characteristics of *A. angustifolia* seeds (MG and RS provenances). Data between parentheses represent the standard deviation of each parameter.

Characteristic	MG	RS
Seed weight (g)	6.920 (1.490)	7.400 (1.550)
Weight of 1000 seeds (g)	845.13 (15.79)	887.34 (22.12)
Number of seeds/kg	148 (16)	141 (22)
Seed length (mm)	50.09 (3.69)	59.38 (5.09)
Seed width (mm)	20.04 (2.38)	20.52 (1.56)
Seed thickness (mm)	16.47 (2.16)	16.58 (2.14)
Seed water content after collection (%)	43.2 (1.4)	41.7 (0.7)
Embryo water content after collection (%)	55.9 (0.9)	51.3 (1.7)
Germination (%)	94 (5)	81 (8)
Normal seedlings (%)	93 (3)	76 (7)

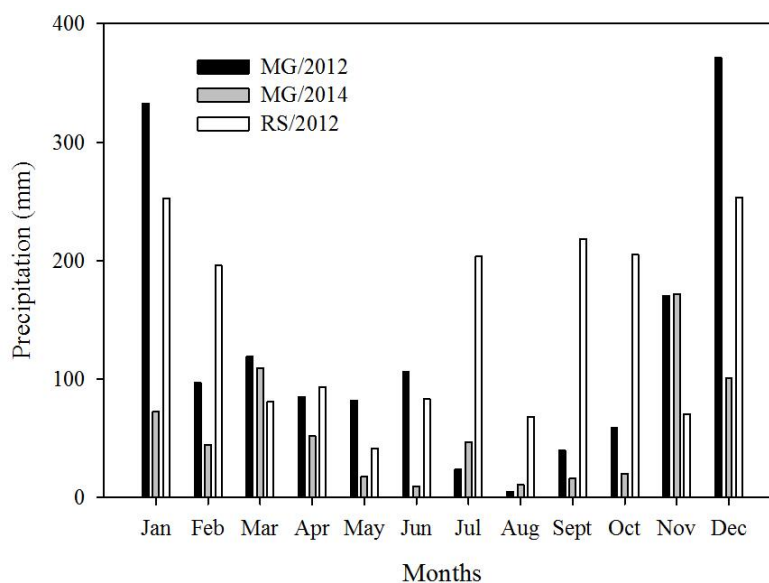


Figure 1. Monthly precipitation of collection regions of *Araucaria angustifolia* seeds during 2012 in Rio Grande do Sul (RS) and 2012 and 2014 in Minas Gerais (MG) State, Brazil. Source: BDMET-INMET.

During imbibition of both seeds provenances (MG and RS/2012), percentage of 2C DNA content remained constant in the radicles (figure 3). Fresh tissue showed a 2C DNA content of 15% (MG and RS). Upon germination, when more than 20% of seeds had germinated (after six and eight days upon imbibition, respectively, for MG and RS provenances), the relative DNA content was 19% (MG) and 13% (RS), and when more than 50% of seeds had germinated (13 and 17 days, respectively, for MG and RS provenances), 2C DNA content was 17% (MG) and 14% (RS).

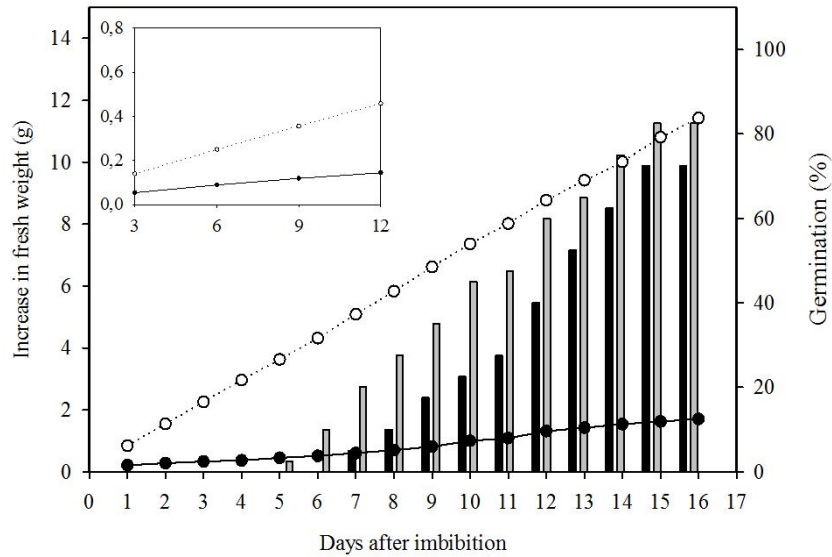


Figure 2. Fresh weight (lines) and germination (bars) response of imbibition of *A. angustifolia* seeds (MG provenance/2012) with (○ □) and without (● ■) cutting the seeds. Inset: fresh weight during early hours of imbibition.

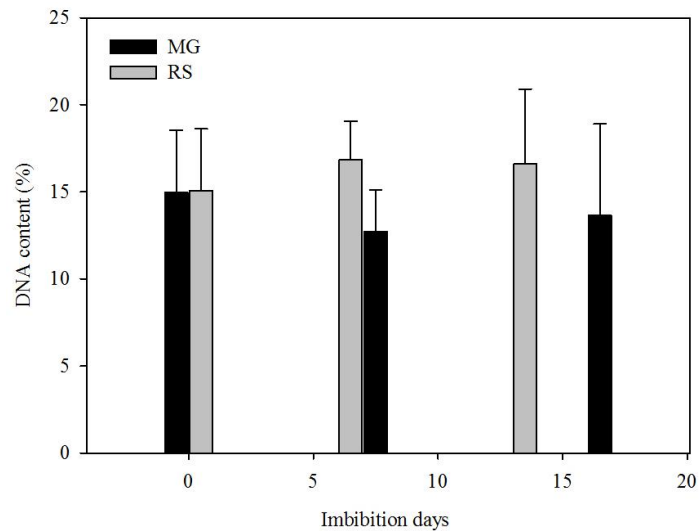


Figure 3. 2C DNA content of root apical meristem nuclei of *A. angustifolia* (MG: 0, 6 and 13 days; RS: 0, 8 and 17 days) at different intervals of imbibition (zero, more than 20 and 50% of radicle protrusion). Bars represent standard deviation.

The effect of drying rates on the viability and ultrastructure of A. angustifolia seeds

There was no interaction between drying rate x water content for both seed provenances (MG and RS/2012). The average germination of fresh seeds was 85% (MG) and 80% (RS) but percentage of the normal seedling formation values was lower, 75% (MG) and 78% (RS). The reduction of water content from 43% (MG) and 42% (RS) to around 20% took 75 days (fast) and 105 days (slow) for the MG provenance, and 50 days (fast) and 60 days (slow) for the RS provenance (table 2).

The highest values of normal seedlings were found in non-dehydrated seeds and control sample (MG) as well as for GSI, for which there was no significant difference ($p \geq 0.05$) between fresh and control seeds from RS seed provenance. Dehydration of the seeds to lower water content affected germination speed and vigour, which dropped during the drying. The loss of seed viability was followed by an increase in electrical conductivity. Fresh seeds and those that were fast-dried to 30% WC showed the lowest values of EC (MG) as well as mature seeds from RS provenance. As the viability of seeds dropped with dehydration, the rate of EC increased, reaching the highest values at the lowest moisture contents (table 2).

Table 2. Water content, drying time, germination, normal seedlings, germination speed index (GSI) and electrical conductivity of *A. angustifolia* seeds (MG and RS provenances) collected in 2012 followed by fast or slow drying.

MG							
Drying Treatments	Water content seed (%)	Water content embryo (%)	Drying time (days)	Germination (%)	Normal seedlings (%)	GSI	Electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)
Fresh	43.2	55.9	-	85 a	75 a	0.96 b	6.72 b
Fast	30.0	47.2	20	16 c	5 c	0.04 d	52.53 b
	20.0	33.0	75	0 d	0 c	0 d	203.91 a
Slow	30.0	46.2	35	24 c	23 b	0.16	105.12 a
	20.0	32.9	105	0 d	0 c	0 d	211.81 a
Control	41.2	-	20	90 a	88 a	1.18 a	-
	37.0	-	75	64 b	45 b	0.7 c	-
RS							
Fresh	41.7	51.3	-	80 a	78 a	1.28 a	6.02 e
Fast	30.0	40.1	20	25 c	25 c	0.29 b	55.11 d
	20.0	23.1	50	0 d	0 d	0 c	194.43 a
Slow	30.0	44.2	20	40 b	40 b	0.51b	62.94 c
	20.0	27.0	60	0 d	0 d	0 c	129.36 b
Control	41.2	-	20	75 a	74 a	1.39 a	-
	39.0	-	50	68 a	68 a	1.27 a	-

Means with the same letter within a column for each provenance are not significantly different according Soctt-Knott test ($p \geq 0.05$).

Considering that the dehydration levels tested had significant effects ($p \leq 0.05$) on seed viability and the presence of seeds infested by larvae (*Cydia araucariae* Pastrana), the experiment was repeated two years later, adopting only fast drying condition and different drying moisture contents (34, 32 and 29% of WC). Mature seeds collected in 2014 had lower water content compared to seeds collected in 2012 in the same region (MG). In 2014 the WC of the whole seeds were 37.5% (91% germination) and the embryos 52.0% (table 3) whereas in 2012, the WC of the seeds were 43.2% (85% germination) and of embryo corresponded 55.9% (table 2). Fast drying of whole seeds reduced the WC to 34.1% within 6 days, to 32.0% in 21 days, and to 28.9% in 34 days (table 3). Seeds that had been slightly dried for 6 days to a WC of 34% did not show significant differences ($p \geq 0.05$) in germination (85%) and normal seedling formation (80%), if compared with undried seeds, as well as for control samples (WC 33.8%/81% germination).

Even though the seeds remained in the same environment until each drying moisture content was reached (control sample), the reduction of WC to 29.5% (34 days) was accompanied by viability loss (8% germination). Electrical conductivity was observed to increase with decreasing water content in whole seeds, and the same pattern was found in seed vigour, as evaluated by GSI (table 3). Seed predation also contributed to viability loss, even infested seed were removed after collection, but some larvae infest seeds without show external signals. However the presence of larvae was not the main cause, indicating that the infestation rate was lower in undried seed (3%) than those subjected to dehydration (14% of maximum predation), which did not show significant differences ($p \geq 0.05$) (table 3).

Table 3. Water content, drying time, germination, normal seedlings, germination speed index (GSI), electrical conductivity and seed predation of *A. angustifolia* seeds (MG provenance) collected in 2014 and fast dried.

Drying Treatments	Water content seed (%)	Water content embryo (%)	Drying time (days)	Germination (%)	Normal seedlings (%)	GSI	Electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	Seed Predation (%)
Fresh	37.5	52.0	-	91a	85 a	4.20 a	22.30 b	3 b
	34.0	51.6	6	85 a	80 a	4.00 a	54.91 a	11 a
Dried	32.0	47.5	21	59 b	49 b	2.32 b	51.64 a	14 a
	28.9	44.4	34	9 d	4 d	0.31 d	62.88 a	10 a
	33.8	49.0	6	81 a	68 a	3.73 a	-	11 a
Control	32.4	52.8	21	36 c	33 c	1.43 c	-	14 a
	29.5	46.5	34	8 d	9 d	0.27 d	-	5 b

Means with the same letter within a column are not significantly different according Scott-Knott test ($p \geq 0.05$).

Undried seeds (43.2% WC), the megagametophyte displayed cells with intact appearance, integrated cell wall and a greater content of starch as compared to dried seeds (figure 4A-B), largely similar to root apical meristem pattern (figure 4E). On the other hand, in seeds dried to 20.0% WC, the megagametophyte showed irregular cell wall and occlusion of intracellular space; similar characteristics were observed in the root apical meristem (figure 4C-F).

Transmission electron micrographs of root apical meristem of the fresh embryos indicated that seeds were metabolically active, as can be expected in recalcitrant seeds. The typical ultrastructural characteristics observed in this state are the presence of many lipid bodies, starch grains, vacuoles and the cell walls with intact appearance (figure 5A-F). Protein bodies, nucleus, nucleolus and apoplastic space displayed normal morphology. All these characteristics were observed in seeds from both provenances.

In contrast to undried seeds, ultrastructural analysis of root apical meristem after fast drying showed abnormal vacuoles, tonoplast appeared dissolute, and vacuolar and cytoplasmic contents were mixed in the intracellular space (figure 6A). The cell walls of this tissue were deformed with irregular aspects and invaginations can be seen in the plasmalemma (figure 6B). A massive accumulation of intra-lipid bodies was observed (figure 6C-F). The shape of the nucleus, starch grains and protein bodies was abnormal and damages in all organelles could be observed (figure 6D). The opening of the apoplastic space caused detachment of plasma membrane from the cell wall and there was dilation of inter-membrane space, suggesting subcellular deterioration and collapse of cell wall (figure 6E-F).

Slow drying caused the same ultrastructural damages as the fast drying. The cell wall and starch grains showed abnormal aspects, there were plasmalemma invaginations, dissolution of apoplastic space and vacuole content,

and accumulation of lipid bodies (figure 7A-D). Regardless of the drying rate, the reduction of water content below 30% led to a drastic decrease of seed viability and when the seeds were dried close to 20% WC, viability of both seed provenances was lost.

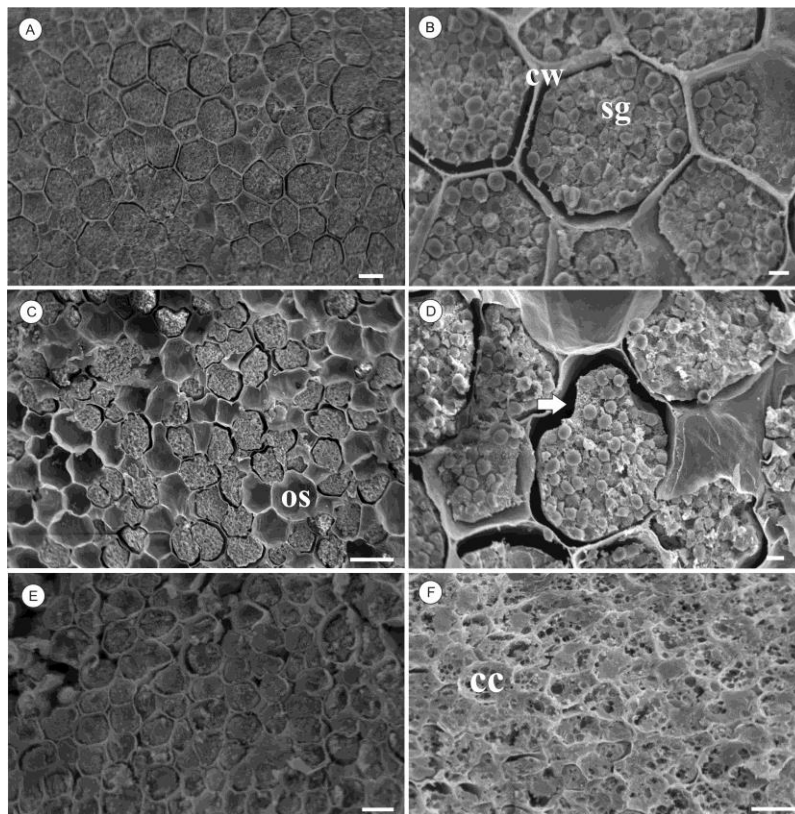


Figure 4. Scanning electron micrographs of *A. angustifolia* seeds (MG provenance/2012) before and after fast dehydration. (A-B) Megagametophyte in non-dehydrated state (water content of whole seed of 43.2%), containing abundant storage reserves (starch grains) and showing the integer cell wall. (C-D) Megagametophyte after drying (whole seed) to a water content of 20.0%, showing irregular cell wall (white arrow) and occlusion of intracellular spaces. (E) Root apical meristem aspects in non-dehydrated situation (embryo water content of 47.2%). (F) Aspect of root apical meristem after dehydration of the whole seeds to 20.0% water content (embryo water content of 33.0%), presenting damage in the cell structure and cell collapse. Abbreviations: cw - cell wall; sg - starch grain; os - occlusion of intracellular spaces; cc - cell collapse. Scale bars: Fig A = 100 μ m; B, D, E and F = 20 μ m; C = 200 μ m.

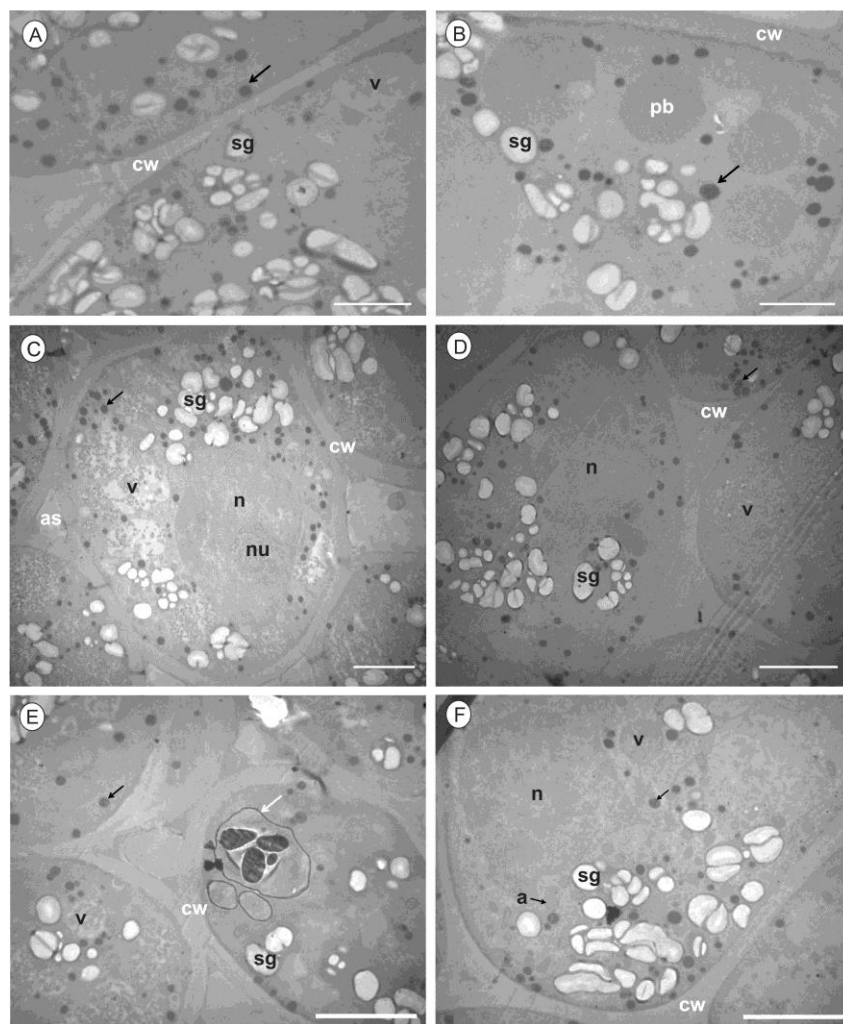


Figure 5. Transmission electron micrographs of root apical meristem of *A. angustifolia* in non-dehydrated state (MG 43.2% and RS 41.7% water content of whole seed/2012). (A) Root apical meristem containing many lipid bodies, starch grains, some vacuoles and cell wall in intact appearance. (B) Detail of a protein body. (C) Nucleus, nucleolus and apoplasmic space and the cell wall. (D) Distribution aspect of the lipids in the cell and the presence of nucleus, starch grains, vacuole and cell wall. (E) Solid compound in vacuoles (white arrow). (F) Details of nucleus, vacuole, starch grains, lipid bodies and amyloplast. Abbreviations: cw – cell wall; sg – starch grain; v – vacuole; pb – protein body; n – nucleus; nu – nucleolus; as – apoplasmic space; a - amyloplast. In all figures black arrows indicate lipid bodies. Figures A and B are seeds from MG (47.2% water content of embryo) and C, D, E and F from RS (51.3% water content of embryo). Scale bars: Fig A, B and D = 5 μ m; Fig C = 2.5 μ m and E and F = 2.0 μ m.

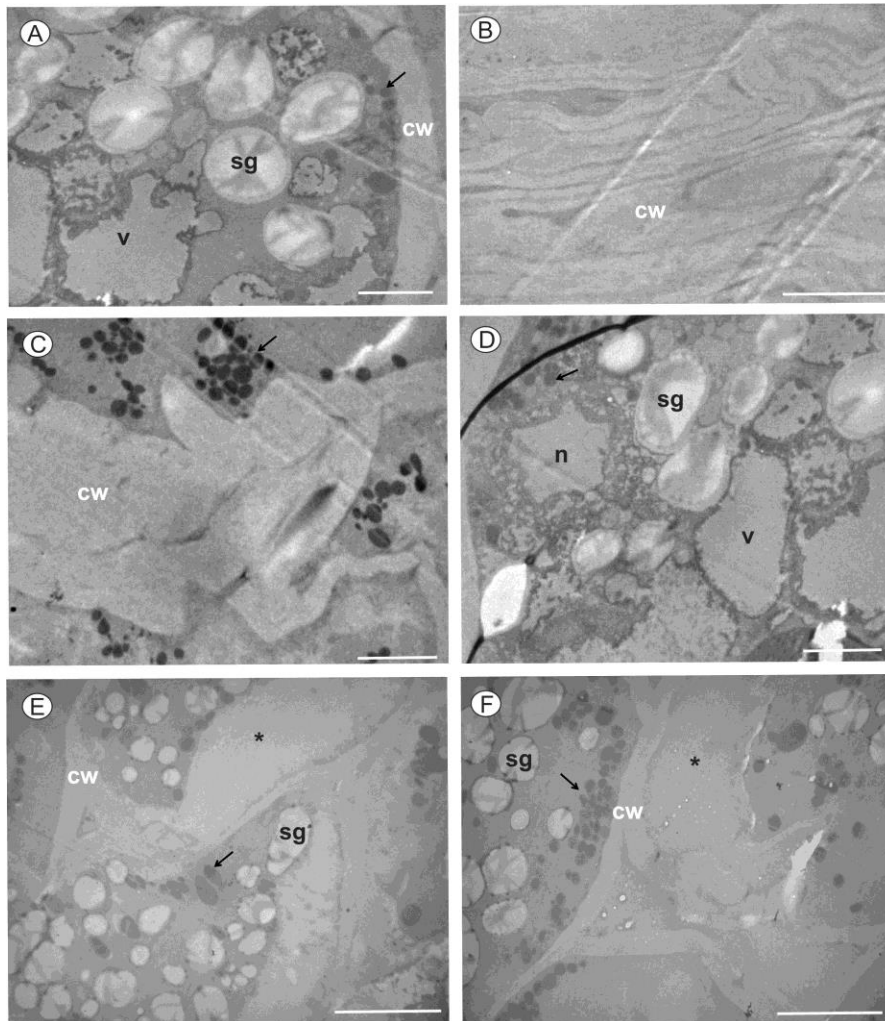


Figure 6. Transmission electron micrographs of root apical meristem of *A. angustifolia* after fast drying (MG and RS with 20.0% water content of whole seed/2012) (A) Details of abnormal vacuoles, dissolution of the tonoplast, and mixing of vacuolar contents and cytoplasm. (B) Deformation of cell wall. (C) A massive accumulation of intra-lipid bodies (black arrows) and irregular cell wall. (D) The appearance of damaged organelles and abnormal shape change (nucleus, starch grains and protein body). (E-F) Subcellular deterioration and collapse of cell wall (asterisk). Figures A, B, C and D seeds from MG (33.0% water content of embryo) and E and F from RS (23.1% water content of embryo). Abbreviations: cw – cell wall; sg – starch grains; v – vacuole; n – nucleus. In all figures black arrows indicate lipid bodies. Scale bars: Fig A, B, C and D = 2.5 μ m; Fig E and F = 2.0 μ m.

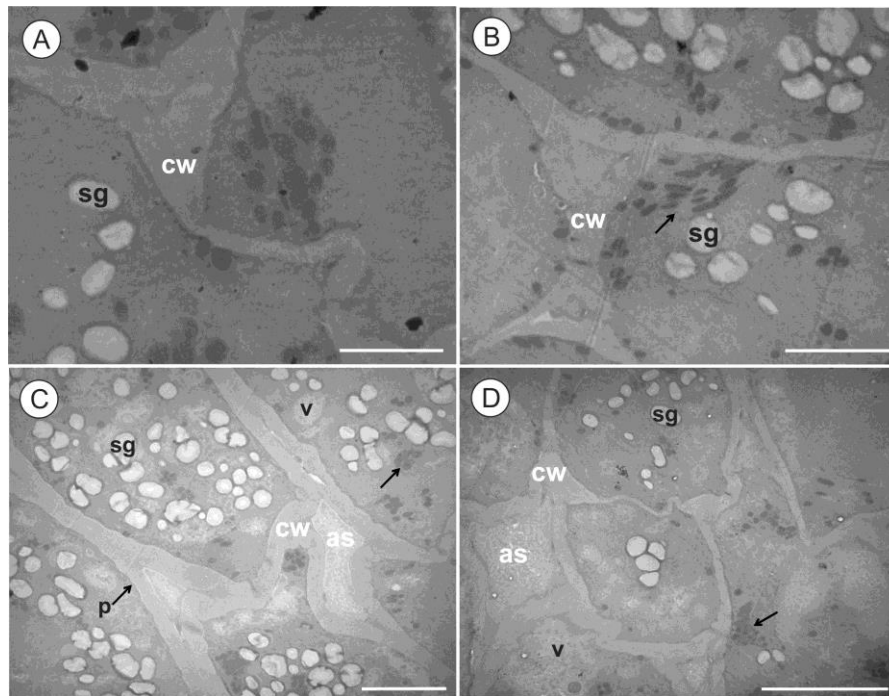


Figure 7. Transmission electron micrographs of root apical meristem of *A. angustifolia* after slow drying (MG and RS with 20.0% water content of whole seed/2012) (A-B) Deformation of cell wall, accumulation of intra-lipid bodies (black arrows), and irregular shape of starch grains. (C-D) Cell wall deformation, invagination of the plasmalemma and, dissolution of apoplastic space and protein vacuole content. Figures A and B: seeds from MG (32.9% water content of embryo) and C and D from RS (27.0% water content of embryo). Abbreviations: cw – cell wall; sg – starch grains; v – vacuole; as – apoplastic space; p - plasmalemma. In all figures black arrows indicate lipid bodies. Scale bars: Fig A and B = 2.0 μm ; Fig C and D and F = 2.5 μm .

Discussion

Seeds of *A. angustifolia* are shed with relatively high moisture content and they are sensitive to desiccation, categorising them as recalcitrant seeds (Tompsett, 1984; Eira *et al.*, 1994). Assessments of seed size and food reserves of *Araucaria* seeds indicated that larger and heavier seeds have lower critical moisture content than smaller and lighter seeds. Starch was the main storage reserve and lipids were present in only small amounts (Tompsett, 1984).

Germination of *A. angustifolia* seeds is uneven and slow, and takes long until the formation of normal seedlings, close to 70 days in this study. The results of the present study confirmed that cutting the seeds increased percentage germination, consistent with previous findings for species (Moreira-Sousa and Cardoso, 2003; Balbuena *et al.*, 2011). These results suggest that the tegument could be a physical impediment slowing down water uptake and extending the germination process as compared to cut seeds.

Our data suggest that seeds of *A. angustifolia* are nondormant, based on the classification proposed by Baskin and Baskin (2014), that characterizes nondormant seeds as having a differentiated and fully developed embryo, and germination occurring in less than four weeks after imbibition. In addition, the same authors report the absence of water-impermeable palisade layer in gymnosperm seeds, which is typical of physical dormancy.

After shedding, only 15% of the cells of *A. angustifolia* seeds were arrested at the G1 phase of the cell cycle (2C DNA content) and, upon imbibition, the nuclei maintain this phase until radicle protrusion. *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* seeds, also recalcitrant, are dispersed with most of the cells (81%) of the root apex in the G1 phase and upon imbibition, 2C and 4C DNA remained constant in the shoot and root apex (Faria *et al.*, 2004). It has been suggested that the arrest of cell cycle activity in the G1 phase is not correlated with seed water content, as in *Castanea sativa* Mill. seeds, another recalcitrant-seeded with accumulation of its nuclei in the G1 seed tissues (Bino *et al.*, 1993).

The results presented in this study showed that the drying condition (fast or slow) had no influence on seed viability by drastic reduction of water content of whole seed and a decrease in water content between 32 and 23% was lethal. The presence of *Cydia araucariae* larvae into the seeds also contributed to the reduction of germination, even when the external damaged seeds were removed. When recalcitrant seeds are dried to below approximately 20% WC, desiccation-

induced mortality occurs (Daws *et al.*, 2006). It has been suggested that the drying rates, fast or slow, can be classified on different time scales (Ntuli, 2012), depending on the tissue dried (axes or whole seeds) and species, varying from hours to days.

Measurements of electrical conductivity indicated that the progress of dehydration was followed by increase in the release of solutes. Espindola *et al.*, (1994) also observed damages in cell membranes in response to dehydration in embryos of *A. angustifolia*, by an increase in electrical conductivity, showing a critical moisture content of the embryos of about 30%.

Some reports suggest that it is possible to maintain high viability and achieve lower water content in desiccation sensitivity seeds when they are subjected to very fast drying (Pammenter and Berjak, 1999; Berjak and Pammenter, 2008), and this has been shown in excised axes of a variety of species: *Theobroma cacao* L. (Li and Sun, 1999); *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Wesley-Smith *et al.*, 2001); *Trichilia emetica* Vahl (Kioko *et al.*, 2006); *Trichilia dregeana* Sond. (Varghese *et al.*, 2011); *Acer platanoides* L. (orthodox seeds) and *Acer pseudoplatanus* L. (Pukacki and Juszczak, 2015) as well as for whole seeds; *Quercus nigra* L. (Bonner, 1996); *Ekebergia capensis* Sparrm. (Pammenter *et al.*, 1998); *Warburgia salutaris* (Bertol.) Chiov. (Kioko *et al.*, 2003). On the other hand, some species lose their viability independent of drying rate, as in mature embryos of *Inga vera* (Faria *et al.*, 2004), or even the slow-dried seeds or embryos maintaining high viability when compared to fast drying to the same water content, as in *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Berjak *et al.*, 1993); *Magnolia ovata* Spreng. (José *et al.*, 2011) and *Genipa americana* L. (Magistrali *et al.*, 2015).

The effect of drying rate and the level of dehydration tolerated by recalcitrant seed tissues is much less marked in whole seeds than in the excised axes (Pammenter and Berjak, 1999). In order to achieve lower water content by

fast dehydration in large seeds it is necessary to excise the embryonic axes, because the seed size influences the responses to fast drying, as observed in *T. emetica* (Kioko *et al.*, 2006).

Seeds of *A. angustifolia* are characterized by containing two tissues for reserves storage: the massive female gametophyte (megagametophyte) and the embryo (hypocotyl-radicle axis and two cotyledons). The megagametophyte cells have thin cell walls and starch as the main reserve. Protein and lipid bodies are also present (Panza *et al.*, 2002). Megagametophyte is an important source of free amino acids, but is not the major protein storage organ in the mature seeds (Astarita *et al.*, 2003). The ultrastructure of root apical meristem of embryonic axes of *A. angustifolia* displayed typical features of recalcitrant seeds, indicating active metabolism, such as lipid and protein bodies, vacuoles, amyloplasts, starch grains and intact cell walls. Furthermore, the ultrastructural markers of some recalcitrant seeds are the presence of Golgi bodies and endoplasmic reticulum, indicating increased in cellular respiration and intracellular metabolic status (Berjak and Pammenter, 2000).

The ultrastructural features of the root apical meristem of *A. angustifolia* dried in two conditions were similar and, in both cases, a greater dehydration that led to seed death was associated with cellular collapse, deformation of cell wall, invagination of plasmalemma and dissolution of apoplastic space. Wesley-Smith *et al.* (2001), observed in jackfruit an increase in electrical conductivity when the seeds were dried slowly to 0.7 g g^{-1} (41% fwb), evidencing the loss of membrane integrity and survival. The decrease of water content, below the limit tolerated, changes the physical and physiological characteristics of cells, by reducing the cell size and turgor pressure, leaving an irreversible loss of membrane surface area (Walters *et al.*, 2002).

Other responses have been reported on loss of viability of *A. angustifolia* embryos induced by desiccation, such as the inability to convert

ACC (1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid) to ethylene, condensation of chromatin, decrease of oxygen uptake and the capacity to synthesize proteins (Espindola *et al.*, 1994).

It has been shown that climate and habitat influence desiccation tolerance in seeds, and that the proportion of desiccation sensitive seeds declines as the habitat becomes drier, and also possibly cooler, occurring at more higher frequencies in moist and aseasonal vegetation zones (Tweddle *et al.*, 2003). Daws *et al.*, (2006) presenting a model correlating desiccation sensitivity and several seed traits in Panamanian species, demonstrated that water content at dispersal was not a useful predictor of response to drying, and dehydration below 20% WC results in desiccation-induced mortality.

In agreement with these authors, in the present study, no great differences in response to dehydration were found comparing seed collected in the South (RS) and Southeast (MG) of Brazil, which had different values of water content at shedding and the same behaviour under dehydration, except when seeds were partially dehydrated. The initial water content of the seeds probably was influenced by climatic conditions when comparing year of collection. Seeds from MG provenance collected in 2012 showed higher initial WC than those collected in 2014. This characteristic may have been related to the lower levels of precipitation in 2014 if compared with 2012. Desiccation tolerance can vary according to climatic conditions during maturation period and, under water restriction, seeds may achieve lower water content at shedding, maintaining high viability, as was found in our results.

This study suggests that seeds of *A. angustifolia* have the typical features of other species with desiccation sensitive seeds, and they cannot tolerate the same level of desiccation as orthodox seeds. However, a slight dehydration could be tolerated by this species, which may increase the storability for shorter times by decreasing the seeds metabolic activity. The

drying rate conditions had no positive influence on the loss of water in whole seeds, and future studies are necessary to investigate the effects of dehydration over excised embryonic axes, which could contribute to long-term preservation, e.g., cryopreservation.

Acknowledgements

The authors thank the Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Estrutural (UFLA) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) for funding it. We also thank Cláudia R.G. Labory for her assistance with the microscopy studies. Authorization for seed collection granted by Ministério do Meio Ambiente (MMA – Permit No 34243-3) and FLONA de São Francisco de Paula/RS (collection of seeds and shipment of RS). José Carlos Martins and José Pedro de Oliveira are also acknowledged for the collection of seeds in MG. This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

References

- Astarita, L.V., Floh, E.I.S. and Handro, W. (2003). Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum*, **47**, 53–59.
- Balbuena, T.S., Jo, L., Pieruzzi, Dias, F.P., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Junqueira, M., Thelen, J.J., Shevchenko, A. and Floh, E.I.S. (2011). Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*, **72**, 302–301.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (2014). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, Second. Elsevier, San Diego, USA.
- Berjak, P. and Pammenter, N. (2000). What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **12**, 22–25.
- 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.W. (2013). Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 478.
- Berjak, P., Vertucci, C.W. and Pammenter, N.W. (1993). Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Science Research*, **3**, 155–166.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. and Nonogaki, H. (2013). *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. Springer, New York.
- Bino, R.J., Lanteri, S., Verhoeven, H. and Kraak H.L. (1993). Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. *Annals of Botany*, **72**, 181–187. doi: 10.1006/anbo.1993.1097.
- Bonner, F.T. (1996). Responses to Drying of Recalcitrant Seeds of *Quercus nigra* L. *Annals of Botany*, **78**, 181–187.
- Conway, S. (2013). Beyond Pine Cones: An Introduction to Gymnosperms. *Arnoldia*, **70**, 2–14.

- Daws, M.I., Garwood, N.C. and Pritchard H.W. (2006). Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: a probabilistic model based on two seed traits and 104 species. *Annals of Botany*, **97**, 667–74.
- Dillenburg, L.R., Franco, A.M.S., Coutinho, A.L., Korndorfer, C. L., Clebsch, C.C. and Duarte, L. (2009). Aspectos ecofisiológicos da regeneração de *Araucaria angustifolia*. In: Fonseca, C.R., Souza, A.F., Leal-Zanchet, A.M., Dutra, T., Backes, A. and Ganado, G. (eds). *Floresta com Araucária: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável*. Holos, Ribeirão Preto, pp. 57-65.
- Dolezel, J., Binarova, P. and Lucretti, S. (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, **31**, 113–122.
- Dutra, T.L. and Stranz, A. (2009). Biogeografia, evolução e ecologia da família Araucariaceae: o que mostra a Paleontologia. In: Fonseca, C.R., Souza, A.F., Leal-Zanchet, A.M., Dutra, T., Backes A. and Ganado, G. (eds). *Floresta com Araucária: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável*. Holos, Ribeirão Preto, pp 15-34.
- Eggers, S., Erdey, D., Pammenter, N.W. and Berjak, P. (2007). Storage and Germination Response of Recalcitrant Seeds Subjected to Mild Dehydration. In: Adkins, S. W., Ashmore, S.E. and Navie, S. (eds). *Seeds: Biology, Development and Ecology*. CAB International, London, pp 85–92.
- Eira, M.T.S., Da., Salomão, A.N., Cunha, R.Da., Carrara, D.K. and Mello, C.M.C. (1994). Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE - Araucariaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, **16**, 71–75.
- Elbl, P., Lira, B.S., Andrade, S.C.S., Jo, L., dos Santos, A.L.W., Coutinho, L.L., Floh, E.I.S. and Rossi, M. (2015). Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **120**, 903–915. doi: 10.1007/s11240-014-0523-3.
- Espindola, L.S., Noin, M., Corbineau, F. and Côme, D. (1994). Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Science Research*, **4**, 193–201.

- Faria, J.M.R., Van Lammeren, A.M. and Hilhorst, H.W. (2004). Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. affinis. *Seed Science Research*, **14**, 165–178. doi: 10.1079/SSR2004166.
- Farrant, J.M. (2000). A comparison of patterns of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*, **151**, 29–39.
- Ferreira, D. F. (2008). Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, **6**, 36-41.
- Guerra, M.P., Silveira, V., Santos, A.L.W., Astarita, L.V. and Nodari, R.O. (2000). Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: Jain. S.M., Gupta, P.K. and Newton, R.J. (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 457–478.
- Hampp, R., Mertz, A., Schaible, R., Schwaigerer, M. and Nehls, V. (2000). Distinction of *Araucaria angustifolia* seeds from different locations in Brazil by a specific DNA sequence. *Trees*, **14**, 429–434.
- Hong, T.D. and Ellis, R.M. (1992). Optimum air-dry seed storage environments for *Arabica coffea*. *Seed Science and Technology*, **20**, 547-560.
- ISTA (1996). International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, **24**, 48-52.
- IUCN (2014). The IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org/details/32975/0>. Accessed 22 Jan 2014.
- José, A.C., Da Silva, E.A.A., Davide, A.C., Melo, A.J.S. and Toorop, P.E. (2011). Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. *Seed Science and Technology*, **39**, 425–434.
- Kioko, J.I., Berjak, P. and Pammenter, N.W. (2003). Responses to dehydration and conservation of the non-orthodox seeds of *Warburgia salutaris*. *South African Journal of Botany*, **69**, 532–539.
- Kioko, J.I., Berjak, P. and Pammenter, N.W. (2006). Viability and ultrastructural responses of seeds and embryonic axes of *Trichilia emetica* to different dehydration and storage conditions. *South African Journal of Botany*, **72**, 167–176.

- Li, C. and Sun, W.Q. (1999). Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. *Seed Science Research*, **9**, 209–217.
- Liang, Y. and Sun, W.Q. (2000). Desiccation tolerance of recalcitrant *Theobroma cacao* embryonic axes: the optimal drying rate and its physiological basis. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 1911–1919.
- Magistrali, P.R., José, A.C., Faria, J.M.R. and Nascimento, J.F. (2015). Slow drying outperforms rapid drying in augmenting the desiccation tolerance of *Genipa americana* seeds. *Seed Science Technology*, **43**, 101–110.
- Maguire, J.D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science*, **2**, 176-177.
- MMA (2008). Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção – IBAMA, Brasília. Available from: http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf.
- Moreira-Souza M. and Cardoso, E.J.B.N. (2003). Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. seeds. *Scientia Agricola*, **60**, 389–391.
- Ntuli, T.M. (2012). Drought and Desiccation-Tolerance and Sensitivity in Plants. In: Mworio, J. K. (ed). *Botany*, InTech, doi: 10.5772/33584. Available from: <http://www.intechopen.com/books/botany/drought-and-desiccation-tolerance-and-sensitivity-in-plants>.
- Pammenter, N.W. and Berjak, P. (2014). Physiology of Desiccation-Sensitive (Recalcitrant) Seeds and the Implications for Cryopreservation. *International Journal of Plant Science*, **175**, 21–28.
- Pammenter, N.W. and Berjak, P. (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research*, **9**, 13–37.
- Pammenter, N.W., Greggains, V., Kioko, J.I., Wesley-Smith, J., Berjak, P. and Finch-Savage, W.E. (1998). Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. *Seed Science Research*, **8**, 463–471.

- Pammenter, N.W., Vertucci, C.W. and Berjak, P. (1991). Homeohydrous (Recalcitrant) Seeds: Dehydration, the State of Water and Viability Characteristics in *Landolphia kirkii*. *Plant Physiology*, **96**, 1093–1098.
- Panza, V., Láinez, V., Maroder, H., Prego, I. and Maldonado, S. (2002). Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **140**, 273–281.
- Pukacki, P.M. and Juszczak, K. (2015). Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two *Acer* species. *Trees*, **29**, 385–396.
- Tompsett, P.B. (1984). Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. *Annals of Applied Biology*, **105**, 581–586.
- 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.
- Varghese, B., Sershen, 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.
- Walters, C., Farrant, J.M., Pammenter, N.W. and Berjak, P. (2002). Desiccation stress and damage. In: Black M. and Pritchard H.W. (eds). *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*. CABI Publishing, London, pp 263–291.
- Wendling, I. and Delgado, M.E. (2008). Produção de mudas de araucária em tubetes. Embrapa Florestas, *Comunicado Técnico*, **201**, 1-8.
- Wesley-Smith, J., Pammenter, N.W., Berjak, P. and Walters, C. (2001). The effects of two drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. *Annals of Botany*, **88**, 653–664.

ARTIGO 2 Selection of candidate reference genes for normalization of RT-qPCR data and gene expression in dehydrating *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze seeds

Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Tree Physiology*.

Authors: Ezequiel Gasparin; José Marcio Rocha Faria; Paulo Roberto Ribeiro; Wilco Ligterink; Henk W. M. Hilhorst

Abstract

Araucaria angustifolia (Brazilian pine) is a Brazilian conifer species that produces desiccation sensitive seeds also know as recalcitrant seeds. Currently, this species is critically endangered due its overexploitation for timber production. Conservation of recalcitrant seeds through conventional techniques are limited and the underlying mechanism of quick viability loss is remains unclear. The aim of this study was to identify candidate reference genes for normalization of RT-qPCR data and to analyze the transcript levels of genes related to seed development, antioxidant system and stress response in *A. angustifolia* seeds subject to dehydration. The most stable candidate reference genes for normalization of gene expression data in heterogeneous samples (inter-tissues) were *ACT*, *GAPDH* and *SARI*. For embryonic samples axis the optimal combination was *ACT* and *PP2AA1*, whereas *GAPDH*, *UBI* and *POB* were the most stable candidate reference genes for cotyledons samples. Slight drying (35% water content) had a positive effect on seed viability, since germination percentage did not show significant diference (84% germination) with undried seeds (41% water content/94% germination). Seed viability, however, decreased when seeds reached lower water content levels. Transcript levels of *ABI3*, *LEC1*,

SMP, *APX*, *MIPS* and *XERO1* decreased in embryonic axis and cotyledon during dehydration, whereas transcript levels of *CAT* and *NAC* increased. Our study provides important insights for studies on normalization of gene expression and also suggests that loss of seed viability during dehydration appears to be associated with decreasing of transcript levels of genes related to desiccation tolerance.

Keywords: Brazilian pine; desiccation sensitive; drying seeds; gene expression stability; housekeeping gene.

Abbreviations: *ABI3* - abscisic acid insensitive 3; *ABI5* - abscisic acid insensitive 5; *FUS3* - transcription factor; *LEC1* - leafy cotyledon 1; *SMP* - seed maturation protein; *APX* - ascorbate peroxidase; *CAT* - catalase; *GPX* - glutathione peroxidase; *SOD* - superoxide dismutase; *AQP* - aquaporin; *DHN1* - dehydrin 1; *DRE* - dehydration-responsive element; *ERD* - early-responsive to dehydration stress protein; *HSP17* - heat shock protein 17; *LEA8-2* - late embryogenesis abundant protein 8-2; *MIPS* - myo-inositol 1-phosphate synthase; *NAC* - NAC domain-containing protein 2-like; *TIP* - tonoplast intrinsic protein; *XERO1* - dehydrin XERO 1.

Introduction

Over the last decades the overexploitation of tropical and subtropical rainforests for high-grade logging, agricultural and urban expansion has led an extensive loss of natural habitats and the extinction of many species. Great efforts have been made to conserve plant genetic resources through *in situ* conservation (maintenance of natural habitat) or *ex situ* (germplasm conservation) (Pammenter and Berjak 2014). Seed banks represent the most

common complementary alternative used for *ex situ* conservation, which offers insurance against plant extinction and supply propagules for plants reintroduction or restoration (Raven and Havens 2014).

The majority of higher plants are orthodox-seeded species. They are characterized by the acquisition of desiccation tolerance during seed development, which ensures seed survive in the dehydrated state for prolonged periods (Tweddle et al 2003, Walters et al 2013). Recalcitrant seeds are, however, desiccation and chilling sensitive and, therefore, cannot be stored for long periods (Roberts 1973; Roberts and Ellis 1989; Berjak and Pammenter 2008).

Acquisition of desiccation tolerance is a complex protection mechanisms that confers to the seeds the ability to survive at low water content (WC). It relies on several factors, such as intracellular physical characteristics, *switching-off* of metabolism, presence of antioxidant system, accumulation of protective molecules (late embryogenic abundant proteins (LEAs), heat shock proteins (HSPs) and non-reducing sugars), and formation of intracellular glassy state (Pammenter and Berjak 1999; Berjak and Pammenter 2008; Berjak and Pammenter 2013).

One possible reason, at molecular level, for the sensitivity of recalcitrant seeds to desiccation is the absence of LEA genes in the genome or the lack expression of them (Farrant et al. 1993). The presence of LEA proteins, abscisic acid (ABA) and non-reducing sugars in recalcitrant seeds are not effective enough as protection mechanism since recalcitrant seeds die at water contents higher than those where such processes operate (Bewley et al., 2013). Dehydrins, a group of LEA proteins, were identified in some recalcitrant seeds, such as *Araucaria angustifolia*, *Acer saccharinum*, *Zizania palustres* and *Aesculus hippocastanum*. They were associated with high levels of ABA,

showing the potential to express these proteins in response to water loss and low temperature (Farrant et al. 1996).

ABA plays a role in the regulation of dehydrins and LEA genes expression in orthodox seeds (Kermode and Finch-Savage 2002) by stimulating the synthesis of those proteins, with addition of tetracycline, by induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in recalcitrant seeds of *Acer saccharinum* (Beardmore and Whittle 2005). Transcriptome analysis of recalcitrant seeds of *Castanospermum australe* and orthodox seeds of *Medicago truncatula* revealed that 12 LEA genes were either absent or reduced in the cotyledons of recalcitrant-seeded species compared with the orthodox (Delahaie et al. 2013).

The antioxidant system is important in scavenging excess of reactive oxygen species (ROS) during dehydration of seed tissues (Pukacka et al. 2011). Several studies have shown that genes related to antioxidant defense are up-regulated in desiccation tolerant tissues (Leprince and Buitink 2010). The inefficiency of antioxidant system against free-radicals generated during dehydration could be one of the main causes of desiccation sensitivity (Pammenter and Berjak 1999). In recalcitrant seeds of *Camellia sinensis* submitted to desiccation, ROS production was enhanced followed by an increase of translation of antioxidant enzymes such as ascorbate peroxidase and superoxide dismutase, showing the negative effect of high concentrations of ROS for seed germination (Chen et al. 2011).

The physiological aspects of desiccation in seeds are still unclear, but it involves a complex cascade of molecular events related to signal perception, signal transduction, gene activation and biochemical modification during dehydration. Therefore, additional investigation at transcriptome, proteome and metabolome levels is required to fully understand this phenomenon (Ramanjulu and Bartels 2002, Angelovici et al. 2010). In *Arabidopsis thaliana* leaves,

33,555 transcripts were identified in non-stressed plants by RNA-Seq and when these plants were subjected to dehydration, 20% of those genes (6,579 transcripts) showed significant variation in their transcript levels during the dehydration stress (Ding et al. 2013). Four major regulators (*ABI3*, *FUSCA3*, *LEC1* and *LEC2*) control most of aspects of seed maturation in *A. thaliana*, such as acquisition of desiccation tolerance, however the interactions among these regulators requires a better understanding (To et al. 2006).

The re-establishment of desiccation tolerance (DT) in germinated *A. thaliana* seeds by treatment of a mild osmotic stress before dehydration, showed a massive repression of genes related to photosynthesis, cell wall modification and energy metabolism and the role of ABA biosynthesis in DT re-establishment (Maia et al. 2011, 2014). It appears that during dehydration, early responsive genes provide initial protection and amplification signals, whereas later responsive genes seem to be related to adaptation to stress conditions (Ramanjulu and Bartels 2002). Four types of dehydration stress memory genes are known in Arabidopsis transcriptome. These genes improve stress tolerance and/or survival, by activating protective functions, including heat shock proteins and chaperons, which are involved in the membrane repair under induced stress (Ding et al. 2013).

It is assumed that in desiccation sensitive seeds a number of putative mechanisms that confers tolerance in orthodox seeds are missing or fail to be activated, highlighting the need of understanding the physiological behavior in order to better conserve those species (Berjak and Pammenter 2013, Delahaie et al. 2013). One of the most difficult points in the study of recalcitrant seeds at molecular level is the absence a sequenced genome of such species. Recently, the transcriptome of early somatic embryo formation of *A. angustifolia* was sequenced (Elbl et al. 2015) as well as the proteome analysis of mature and

germinated embryos (Balbuena et al. 2011), providing insights into the conifer physiology and recalcitrance phenomena.

In this study, recalcitrant seeds of *A. angustifolia* were characterized at gene expression level using the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). This is an important tool to gene-expression analysis in many fields of biology research due its high sensitivity, accuracy, speed and high resolution being able to measure small differences in gene expression between samples (Vandesompele et al. 2002, de Vega-Bartol et al. 2013). Gene expression levels are normalized by using internal controls gene to eliminate the influence of variability among samples in total RNA content, the quality of starting material, RNA stability, differences in RNA preparation and cDNA synthesis, enzymatic efficiencies, or sample loading variation (Radonić et al. 2004, Hruz et al. 2011). The ideal internal control referred to as a “reference genes” or “housekeeping gene” presumed to be stable across tissues and different experimental conditions, making necessary a proper validation of their presumed stability expression (Vandesompele et al. 2002). These genes generally are involved in cellular processes, such as actin (*ACT*), tubulin (*TUB*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), 18S ribosomal RNA (*18S*), ubiquitin (*UBQ*) and elongation factor 1- α (*EF1*) (Radonić et al. 2004, Huggett et al. 2005, de Vega-Bartol et al. 2013, Wang et al. 2014).

A. angustifolia is a native conifer Brazilian conifer species which produce desiccation sensitive seeds (Tompsett 1984, Eira et al. 1994). Currently, the population of this species is critically endangered of extinction (IUCN 2014) due its intense exploitation for wood production over the past decades. Besides the economic importance of the timber, the seeds of *A. angustifolia* are widely consumed due the high nutritious value comprised basically by starch (Thys et al. 2010). In this context, many efforts have been made in order to develop

strategies for germplasm conservation and recovery of exploited areas considering the requirement to conserve this species.

The current study aimed to evaluate the expression levels of 10 potential candidate reference genes across a set of biological samples represented by different tissues (embryonic axis and cotyledons) under dehydration condition, and, to analyze the expression of genes involved in seed development, antioxidant system and stress responses in recalcitrant seeds of *A. angustifolia* dehydrated to different water content.

Materials and methods

Plant material and dehydration condition

Mature *A. angustifolia* seeds were collected from 12 trees in a Tropical Lowland Rainforest (21°13'55.0"S; 44°58'42.0"W) located at Aiuruoca (Minas Gerais State, Brazil) in May 2014. After collection, seeds were immersed in a container with water and those that floated were discarded (Wendling and Delgado 2008). Seed with visible sign of larvae predation were also eliminated. After that, seeds were removed from the container and the excess of water on seed surface was allowed to evaporate at room temperature ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) for one day.

Seed dehydration was performed in a closed plastic container (higrostat) at $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, under circulating air, containing silica gel (RH $6 \pm 3\%$), separated by a plastic mesh. Four different WC were used: undried seeds (41%), 35, 30 and 28% (fresh weight basis). Embryonic axes and cotyledons of seeds from each of the conditions were separated and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. Three biological replicates of 15 seeds each were used.

Water content of whole seeds was determined in four replicates of five cut seeds by oven drying at 103°C for 17h (ISTA, 1996). Germination tests of fresh and dry seeds were carried after cutting the seeds, approximately 3 mm from the tip (Moreira-Souza and Cardoso 2003). Seeds were surface sterilized with 2% sodium hypochlorite for 10 minutes and rinsed with distilled water three times. Then, seeds were sown in plastics trays (51 x 26 x 7 mm) containing moistened autoclaved sand. Germination tests were carried out with four biological replicates of 20 seeds each. Seeds were incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under constant light. Germination was scored weekly during 70 days, evaluating radicle protrusion and normal seedlings.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Undried seeds (41% WC) and seed dehydrated until 35 and 30% WC were used for RNA extraction. Total RNA was extracted by using hot borate protocol modified from Wan and Wilkins (1994). Twenty miligrams of dry material were homogenized with 800 μL of extraction buffer (0.2M Na borate decahydrate (Borax), 30mM EGTA, 1% SDS, 1% Na deoxycholate (Na-DOC) containing 17.6 mg DTT and 528 mg PVP40 which had been heated to 80°C. After that, proteinase K was added to this suspension and incubated for 12 min 42°C. After adding 64 μL of 2M KCl the samples were incubated on ice for 30 min and subsequently centrifuged for 20 min at 12,000g at 4°C. Ice-cold 8M LiCl was added to the supernatant and the tubes were incubated overnight on ice. After centrifugation for 20 min at 12,000g at 4°C, the pellets were washed with 750 μL ice-cold 2M LiCl. The samples were centrifuged for 10 min at 12,000g at 4°C and the pellets were re-suspended in 80 μL DEPC-treated water. The samples were treated with DNase (RQ1 DNase, Promega), phenol chloroform extracted, and further purified with Phase lock gel (5 Prime)

following the manufacturer's instructions. The RNA was precipitated for 1h at -20°C by adding 1/10 volume NaaC (3M) and 2.5x volume of 100% ethanol. Samples were centrifuged for 20 min at 12,000g at 4°C and the supernatant was removed. The pellet was washed with 250 µL cold 70% ethanol, centrifuged for 5 min at 4°C, dried and dissolved in 20 µL DEPC water. RNA quality and concentration were assessed by 1% agarose gel and spectrophotometrically using NanDrop ND-1000 spectrophotometer (NanDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). Samples that showed A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratios close to 2.0 were used for subsequent analysis. The first-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using iScript™ cDNA synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) according the manufacturer's instructions. The negative control used in RT-qPCR to test the presence of any residual cellular DNA in the samples consisted of the same reaction without addition the reverse transcriptase (RT), compensated with the addition of DEPC water. The cDNA was diluted 10 times for the use in RT-qPCR reactions. All cDNAs were stored at -20°C prior to the analysis. Three biological replicates of 15 embryonic axis (EA) or cotyledons (Cot) were used for all analyses.

Selection of candidate reference gene, design of degenerated primers and cloning of PCR products

Candidate reference genes were selected based on available data in the literature usually used to normalize target gene expression in some plant species, such as *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum* (Dekkers et al. 2012), *Ricinus communis* (Ribeiro et al. 2014), *Picea abies* (de Vega-Bartol et al. 2013) and *Populus euphratica* (Wang et al. 2014). This selection included the following genes: Histone (*HIST*), α -tubulin (*AHTUB*), Serine/threonine protein phosphatase 2a regulatoty subunit A (*PP2AA1*), Elongation factor-1 (*EF1*),

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), protein Pob (*POB*), Clathrin adaptor complex subunit (*CAC*), GTP-binding protein Sar1 (*SAR1*) and reference genes used in *A. angustifolia*, including the Ubiquitin-1 (*UBQ*) (Schlögl et al. 2012) and Actin homolog (*ACT*) (Dornelas et al., unpublished results; GenBank accession JF922129).

Degenerate primers were designed for each of the selected candidate reference gene based on gene sequences from at least three different plant species collected from NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The sequences were aligned using CLCbio software (CLCbio, Aarhus, Denmark) and the degenerated primers (see Supplementary Table 1) were manually designed in highly conserved nucleotide regions. The melting temperatures (T_m) were established by using the OligoAnalyzer 3.1 tool (<https://www.idtdna.com/calc/ analyzer>). Conventional PCR was carried out in order to check the amplification for each primer and also to find the annealing temperature (T_a) by gradient when necessary. The following thermal cycles conditions were used: 95°C for 5 min, followed by 95°C for 30 s, annealing temperature of each pair of primers for 30 s, 72°C for “x” time (1000bp/min), and a final elongation step of 10 min at 72°C. PCR reactions were conducted with 4 μ L of cDNA as template, 25 mM MgCl₂, 20 mM dNTP mix, 1X Buffer B, 10 μ mol of each primer, 5 units FIREPol DNA polymerase (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) in a final volume of 15 μ L. The PCR products were resolved on 2.5% (w/v) agarose gels stained with ethidium bromide.

For cloning purposes, PCR products were amplified using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific, USA) and separated on an agarose gel (2.5%) stained with ethidium bromide and the fragments were excised and extracted by QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Blunt-end PCR fragments reaction were conducted with 1-2 μ L purified PCR fragment, 10X Buffer, 25 mM MgCl₂, 0.2 mM dATs, 5 units FIREPol DNA polymerase (Solis

BioDyne, Tartu, Estonia) in a final volume of 10 μ L incubated at 70°C for 30 min. The ligation was carried out using the T4 DNA ligase from pGEM-T and pGEM-T easy vector systems (Promega, USA) in a total volume of 10 μ L containing 50 ng of T-vector and the corresponding volume of PCR product with a standard insert-to-vector molar ratio around 3:1. The ligation reaction mixture was used for *E. coli* transformation by electroporation. For that, *E. coli* strain DH5 α was used. Recombinant plasmids identified from individual *E. coli* colonies were purified using QIAprep spin miniprep Kit (Qiagen, USA) and the plasmids containing the correct insert were screened out by PCR amplification with respective primer set. The concentration of the extracted plasmids was determined with a NanDrop spectrophotometer and the nucleotide sequence determined by sequencing. In order to identify the cDNA cloned sequences, each one was compared to DNA sequences databases, using BLAST search tools (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Primer design and RT-qPCR conditions

The expression levels of 19 genes was evaluated in embryonic axes and cotyledons of the seeds subject to dehydration to the following water content range: 41% (undried), 35% and 30%. The genes selected are involved in seed development (*ABI3*, *ABI5*, *FUS3*, *LEC1*, *SMP*); antioxidant system (*APX*, *CAT*, *GPX*, *SOD*); and stress responses (*AQP*, *DHN1*, *DRE*, *ERD*, *HSP17*, *LEA8-2*, *MIPS*, *NAC*, *TIP*, and *XERO1*). The cDNA sequences of target genes were screened on NCBI database and blasted against SRA (Sequence Read Archive) database (NCBI) from *A. angustifolia* (Elbl, Lira, et al. 2015). Possible orthologues of SRA sequences from *A. angustifolia* were identified through a BLASTN and only sequences that showed high similarity were selected for primer design. Primers for the 19 target genes and the 10 candidate reference

genes were designed using PrimerQuest tool (<https://www.idtdna.com>) with annealing temperature 58-61°C, primer lengths 18-24 bp, % CG between 40-60 and amplicon lengths of 75-150 bp. Primer efficiency was calculated with LinRegPCR software (Ruijter et al. 2009) with a pool of cDNA samples with three replicates for each primer (see Supplementary Table 2 and 3). The specificity of the primers was verified by loading the PCR products on a 2.5% agarose gel and by analysing their melting curve.

RT-qPCR reactions contained 2.5 µL of cDNA, 0.5 µL of primer-mix (from a 10 µM working solution), 5 µL of iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and 2 µL of water in a final volume of 10 µL. RT-qPCR reactions carried out on a CFX (Bio-Rad). The following RT-qPCR program was used for all PCR reactions: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s. Melting curves were recorded after cycle 40 by heating from 65 to 95°C, increasing the temperature stepwise every 5 s by 0.5°C.

Gene expression normalization and statistical analyses

The expression levels of the 10 candidate reference genes were expressed by the number of quantification cycles (Cq) required to reach fluorescence above a specific threshold level. GeNorm (Vandesompele et al. 2002) was used to evaluate the expression stability of the candidate reference genes across all tested samples. GeNorm ranks the candidate reference genes according to the expression stability index (M). The pairwise variation (V_n/V_{n+1}) was calculated to determine the optimal number of reference genes (Vandesompele et al. 2002). The expression level of the target genes were normalized using the most stable candidate reference genes across all tested samples. qBase (Biogazelle, Ghent, Belgium) was used to normalize the expression level using these reference genes and the most stable candidate

reference genes across two samples subsets: embryonic axes and cotyledons. Statistical analyses were conducted with two factors (tissue x water content) and the data were subjected to ANOVA analysis and the means were compared by Tukey test at 5% probability. Statistical analyses were carried out on Sisvar software (Ferreira 2008).

Results

Seed viability and gene expression stability of the candidate reference genes

According to previous results there was no difference between fast (silica gel/RH $6 \pm 3\%$) and slow (cold room/ RH $35 \pm 5\%/20 \pm 3^\circ\text{C}$) drying when the whole seeds were dried until 20% of water content (Gasparin et al., 2016 in press). For that reason, in this study only one drying condition (silica gel) was used to obtain different dehydration levels. The water content of whole seeds decreased from 41% to 35% within 10 days, to 30% within in 21 days, and to 28% within 34 days. Seeds that had been slightly dried to a WC of 35% did not any show statistical difference in terms radicle protrusion (84%) and normal seedling formation (60%), when compared with undried seeds (41% WC, 94% of germination and 90% of normal seedling). However, the reduction of WC to 28% caused a significant decrease on seed viability, near total mortality (Figure 1).

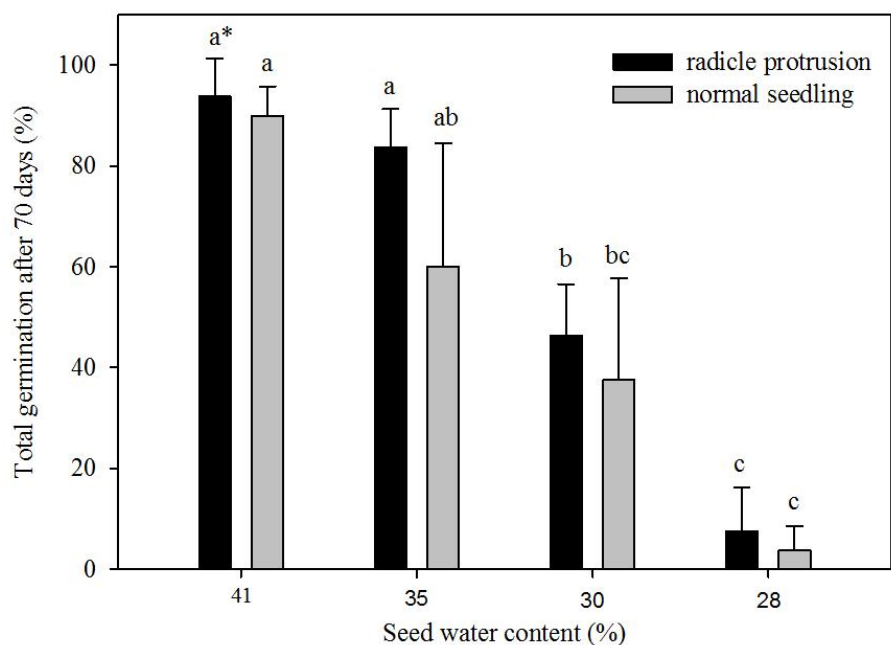


Figure 1. The response of whole seeds of *Araucaria angustifolia* to dehydration under silica gel ($6 \pm 3\%$ RH), expressed as total germination after 70 days. The black bar is the mean of radicle protrusion and grey bar is normal seedling. The same letter indicates no significant difference across different water content levels, according to Tukey test ($p \leq 0.05$).

The expression stability of set of genes from a range of functional categories which are not available for *A. angustifolia* were tested in order to identify suitable reference genes over a diverse set of seed sample included undried and dry seed with different WC (41, 35 and 30%) from different tissues, embryonic axis and cotyledons. Therefore 10 reference genes were selected, including two candidate genes used in *A. angustifolia* and eight used in other species and cloned in this study.

Total RNA samples isolated showed a high quality based on A260/280 ratio which was 2.06 ± 0.045 (range from 1.99 to 2.13) and A260/230 was 2.26 ± 0.031 (range from 2.20 to 2.31). Moreover, the absence of genomic DNA was

confirmed by agarose gel electrophoresis and melt curve analysis by RT-qPCR using two primers of reference genes (*PP2AA1* and *ACT*) with the cDNA template that RNA samples were not reverse transcribed (minus RT control). *PP2AA1* did not show any amplification and in *ACT* low signals was detected, but was at least 13 Cq higher than with cDNA samples, which is above the limit of 5 Cq as considered by Nolan et al. (2006). The amplification efficiency of the 10 candidate reference genes were evaluated ranged from 1.854 for *POB* to 2.053 for *GAPDH*, and the coefficient of determination (R^2) varied from 0.985 (*HIST*) to 0.999 (*POB*). These results indicate that the primers designed and the reaction conditions used were suitable for RT-qPCR. Additionally, the melting curves and electrophoresis gel confirmed that all primers generated only a single amplicon.

The Cq value of the 10 candidate reference genes across all samples showed different levels of the relative abundance among the analyzed transcript. The higher was *CAC* (24.70 ± 0.96) and the least expressed was *EFI* ($15.50 \pm 0,69$). The mean value of all candidate reference genes was a Cq of 20.01 (Figure 2).

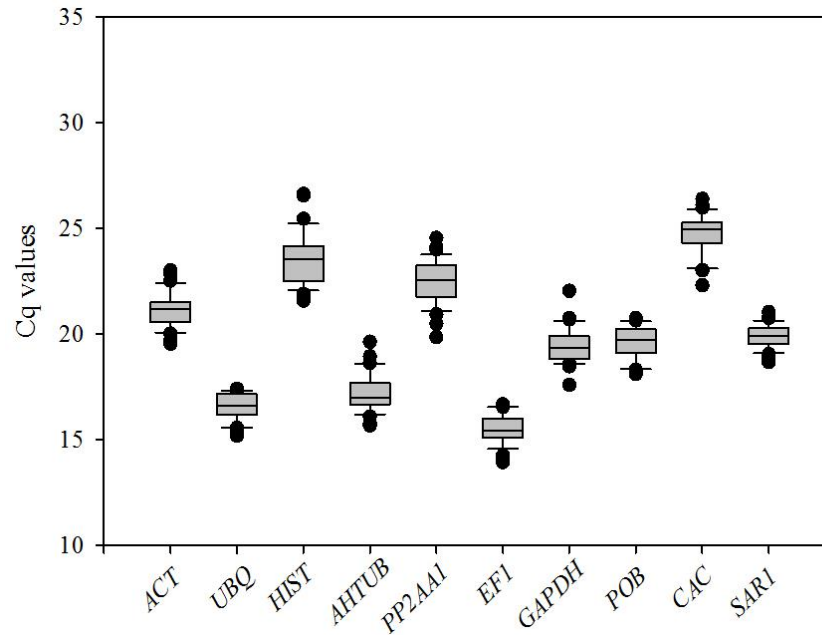
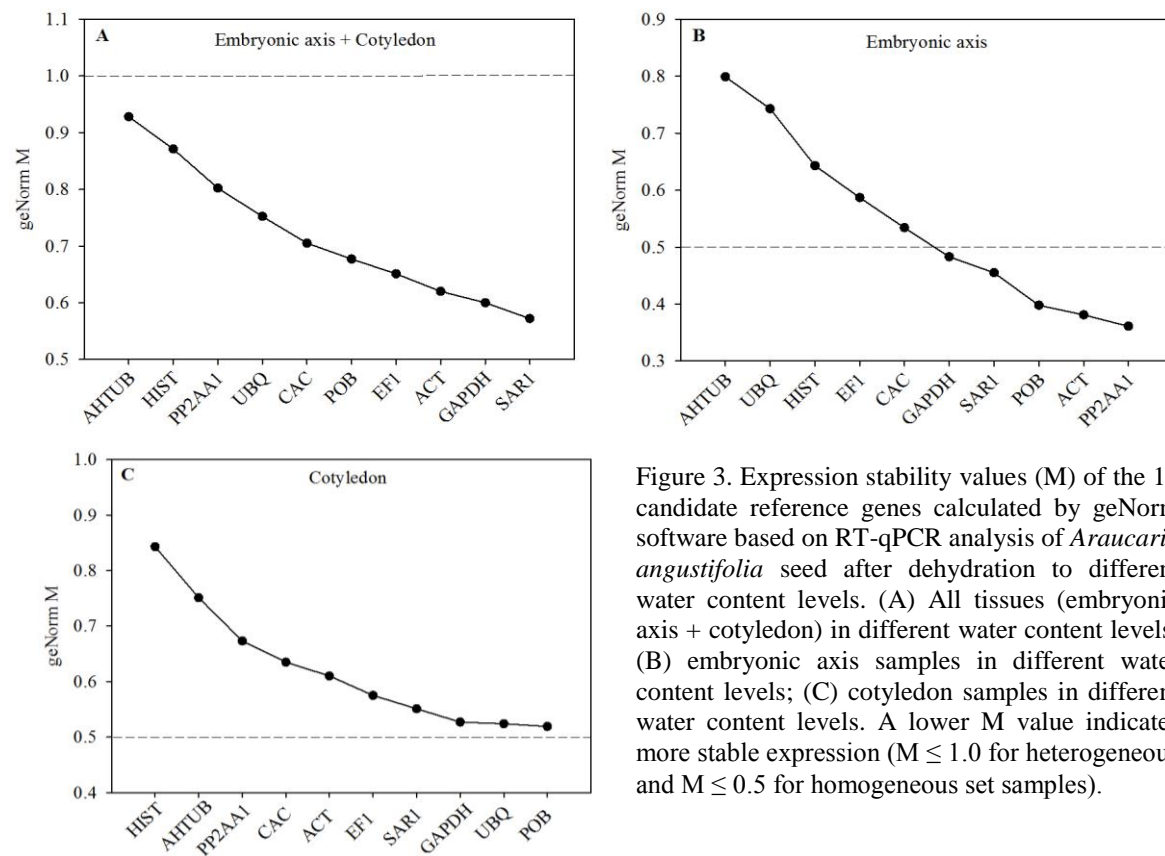


Figure 2. Box-whisker plot showing the quantification cycles values (Cq) of the 10 candidate reference genes across all samples. Grey bars indicate the 25/75 percentiles, whisker caps indicate the 10/90 percentiles, the line marks the median, and all outliers are indicated by dots.

Expression stabilities of the 10 candidate reference genes across the samples showed M values below the acceptable limit, being *SARI* ($M = 0.572$) the most stable and *AHTUB* ($M = 0.928$) the least stable candidate reference gene (Figure 3A). In a sample set of different tissues, geNorm ranked only five genes with $M \leq 0.5$ (*GAPDH*, *SARI*, *POB*, *ACT* and *PP2AA1*) for embryonic axis tissue (Figure 3B). In this case, the most stable was *PP2AA1* ($M = 0.361$) and the least one was *GAPDH* ($M = 0.483$), whereas for cotyledons tissue none candidate reference genes had a value below or equal the acceptable limit (Figure 3C).



The optimal number of reference genes for normalization was determined by the pairwise variation value (V_n/V_{n+1}) using $V < 0.15$ as the cut-off value below which inclusion of more reference genes has no significant effects for normalization (Vandesompele et al. 2002). geNorm analysis suggested that three reference genes ($V_{3/4} < 0.15$) should be to normalize the heterogeneous set of samples (cotyledons and embryonic axis): *ACT*, *GAPDH* and *SARI* (Figure 4A). For accurate normalization of embryonic axis subset samples (Figure 4B) two reference genes (*ACT* and *PP2AA1*) would be necessary, whereas for cotyledons subset samples the optimal number was three: *GAPDH*, *UBQ* and *POB* (Figure 4C). According to these results the reference genes *ACT*, *GAPDH* and *SARI* were considered the most stable genes in all samples compose for different tissues and dehydration levels in *A. angustifolia* seeds. Theses genes were used to normalize the gene expression of targets genes in an RT-qPCR experiment in the present study.

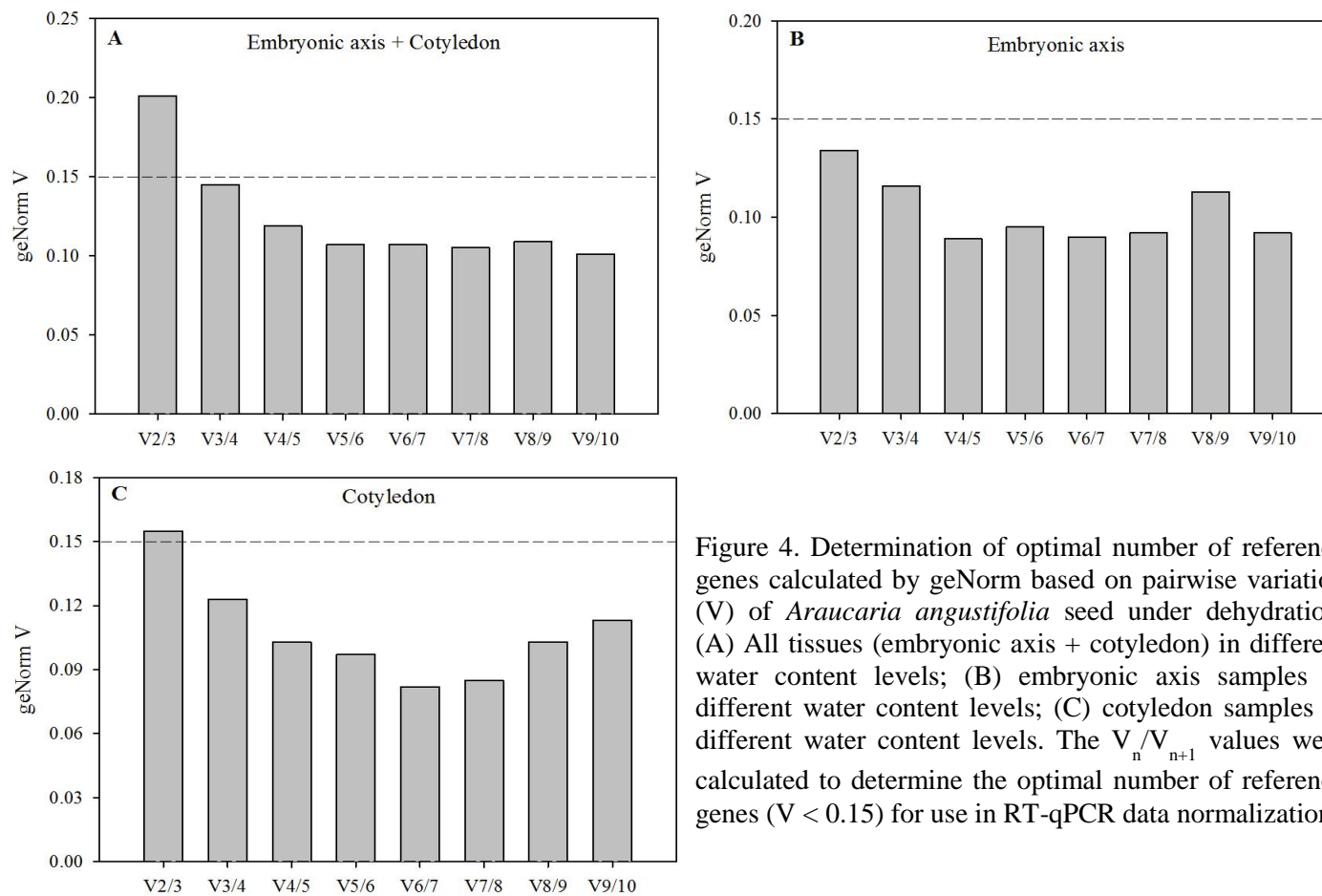


Figure 4. Determination of optimal number of reference genes calculated by geNorm based on pairwise variation (V) of *Araucaria angustifolia* seed under dehydration. (A) All tissues (embryonic axis + cotyledon) in different water content levels; (B) embryonic axis samples in different water content levels; (C) cotyledon samples in different water content levels. The V_n/V_{n+1} values were calculated to determine the optimal number of reference genes ($V < 0.15$) for use in RT-qPCR data normalization.

Relative gene expression in different tissues after dehydration

The expression levels of 19 putative genes related to seed development, antioxidant system and stress responses was analyzed in cotyledons and embryonic axis after dehydration in *A. angustifolia* seeds. The expression levels of *ABI3*, *LEC1* and *SMP* which are genes related to seed development, decreased after dehydration in embryonic axis, whereas no significant changes were observed. No variation in the expression levels of *ABI5* and *FUS3* was observed after dehydration of the seeds. *ABI5* showed, however, higher expression levels in embryonic axis than cotyledons at 30% WC (Figure 5A-E).

The expression levels of *APX* decreased in the cotyledons tissue after dehydration, whereas in embryonic axis did not present any variation (Figure 6A). In undried seeds the highest expression level for this gene was observed, as well as difference in the expression between tissues. *CAT* showed, however, an increasing expression levels in embryonic after dehydration axis and, with 30% WC the higher expression levels in embryonic axis was observed if compared with cotyledon (Figure 6B). In general, *GPX* and *SOD* did not present significant differences, remained stable the expression levels among the water content and between tissues after seeds dehydration (Figures 6C-D).

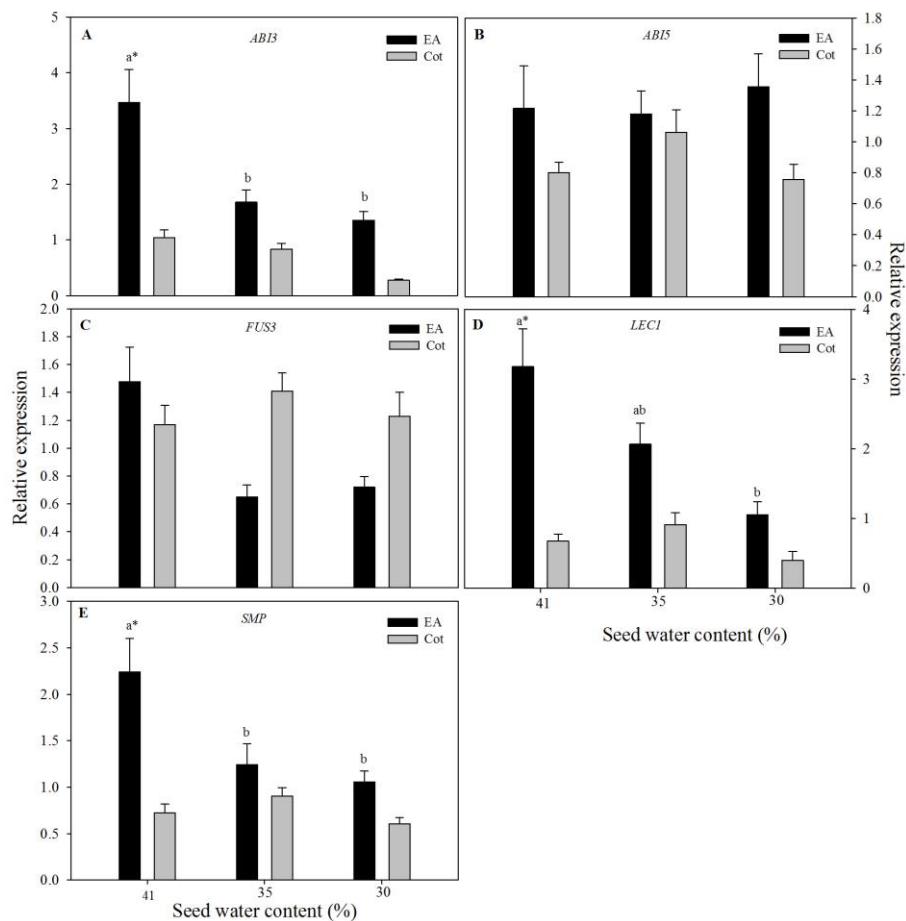


Figure 5. Expression levels of genes related to seed development as (A) *ABI3*; (B) *ABI5*; (C) *FUS3*; (D) *LEC1*; (E) *SMP* in *Araucaria angustifolia* embryonic axis (EA/black bar) and cotyledons (Cot/grey bar) after dehydration to different water contents. The same letter indicates no significant differences across all water content values, for each tissue analyzed, and asterisk indicate significant difference between EA and Cot, for each water content, according to Tukey test ($p \leq 0.05$). Results are expressed as mean \pm SD.

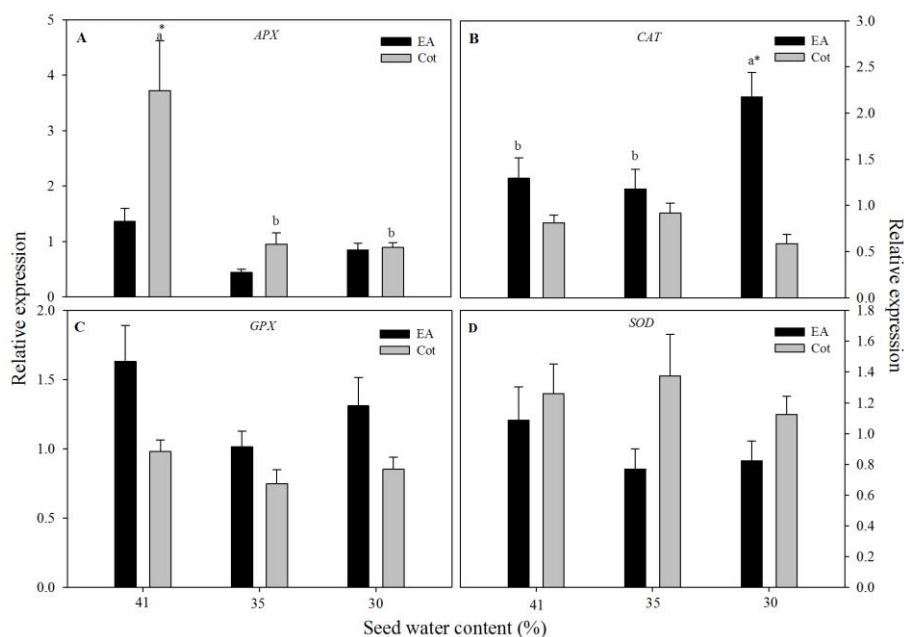


Figure 6. Expression levels of genes related to antioxidant system such as: (A) *APX*; (B) *CAT*; (C) *GPX*; (D) *SOD* in *Araucaria angustifolia* embryonic axis (EA/black bar) and cotyledons (Cot/grey bar) after dehydration to different water contents. The same letter indicates no significant difference across all water content values, for each tissue analyzed, and asterisk indicate significant difference between EA and Cot, for each water content, according to Tukey test ($p \leq 0.05$). Results are expressed as mean \pm SD.

The expression levels *AQP* (Figure 7A), *DHN1* (Figure 7B), *ERD* (Figure 7D) and *LEA8-2* (Figure 8B), genes related to stress responses, exhibited no significant differences after dehydration and there was no difference between tissues. *DRE* (Figure 7C) and *TIP* (Figure 8E) only demonstrated significant difference between tissues in seeds with 30% WC. *DRE* was high expression level in embryonic axis while *TIP* was significant in the cotyledons.

No differences were observed in the expression levels of the *HSP17* in the embryonic axis after dehydration, whereas in the cotyledons the highest level was in the seeds with 35% WC and also in this point the expression levels was

higher in cotyledons than in embryonic axis (Figure 8A). The expression levels of *MIPS* were high in undried seeds and low in 35 and 30% WC of the seeds, between which there was no significant difference (Figure 8C). In contrast, the expression level of *NAC* showed increase in the embryonic axis after dehydration, that was higher expressed in this tissue at 35 and 30% WC than in cotyledons (Figure 8D). The expression levels of *XERO1* were most abundant in undried seeds as well as in seeds with 30% WC in both tissues. Seeds with 35% WC showed the lowest transcript level for this gene in both tissues (Figure 8F).

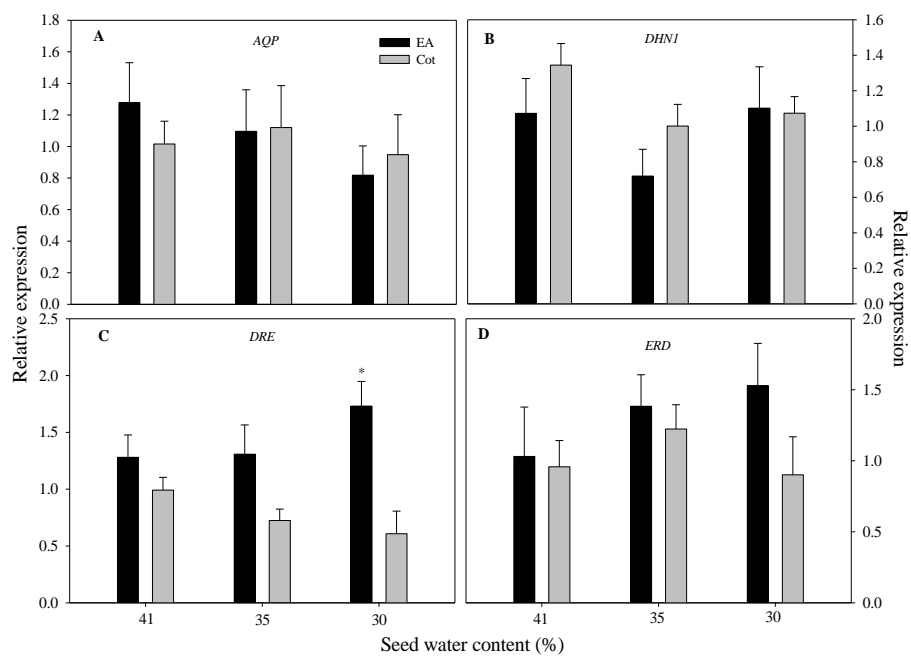


Figure 7. Expression levels of genes related to stress responses such as: (A) *AQP*; (B) *DHN1*; (C) *DRE* and (D) *ERD* in *Araucaria angustifolia* embryonic axis (EA/black bar) and cotyledons (Cot/grey bar) after dehydration to different water contents. The same letter indicates no significant differences across all water content values, for each tissue analyzed, and asterisk indicate significant difference between EA and Cot, for each water content, according to Tukey test ($p \leq 0.05$). Results are expressed as mean \pm SD.

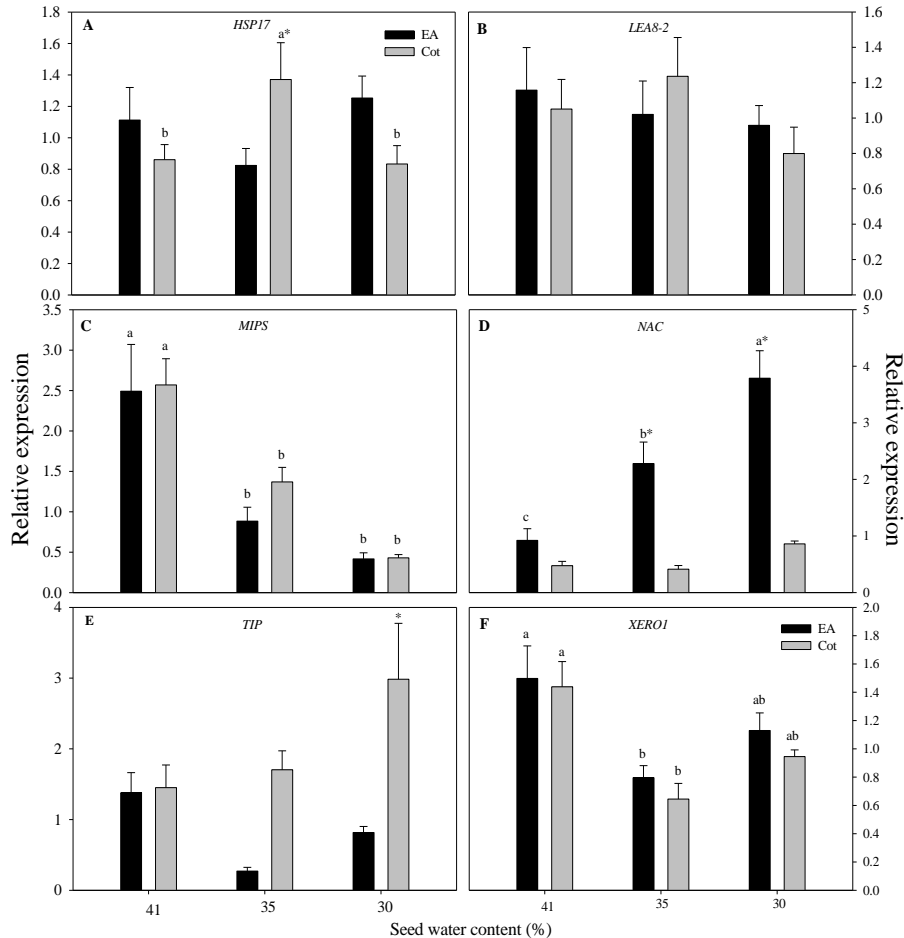


Figure 8. Expression levels of genes related to stress responses such as (A) *HSP17*; (B) *LEA8-2*; (C) *MIPS*; (D) *NAC*; (E) *TIP*; (F) *XERO1* in *Araucaria angustifolia* embryonic axis (EA/black bar) and cotyledons (Cot/grey bar) after dehydration to different water contents. The same letter indicates no significant differences across all water content values, for each tissue analyzed, and asterisk indicate significant difference between EA and Cot, for each water content, according to Tukey test ($p \leq 0.05$). Results are expressed as mean \pm SD.

Discussion

Dehydration effects on seed viability and identification of candidate reference genes for A. angustifolia

Seeds of *A. angustifolia* are shedding with relatively high water content and they are sensitive to desiccation, thus being classified as recalcitrant (Tompsett 1984, Eira et al. 1994). Moreover, germination of those seeds is uneven, slow and takes long until the formation of normal seedlings, close to 70 days in this study, even if the tips of the seeds were cut before germination, indicating the tegument is a physical impediment to water uptake. Reduction of the water content to values lower than 35% causes decreases in viability, losing more than half of germination and, below 28% WC almost seeds die. Some studies showed that it is possible to maintain high viability and achieve lower water content in desiccation sensitivity seeds when they are subjected to very fast drying (Pammenter et al. 1998, Pammenter and Berjak 1999, Berjak and Pammenter 2008). However, for *Araucaria angustifolia* there was not significant difference between fast and slow drying of whole seeds when they were dried until 20% WC (Gasparin et al., 2016 in press). Nevertheless, it was observed that a slight dehydration (near 35% WC) did not show significant difference in germination and normal seedling formation compared to undried seeds.

According to Eggers et al. (2007), partial dehydration that can prevent germination during storage, but which is mild enough to avoid desiccation damage may have positive effect to improve the storability of sensitive seeds. The germplasm conservation of recalcitrant seeds is a serious problem due to the inability to use conventional storage methods which are usually applied for orthodox seeds (Bewley et al. 2013), but short or medium-term storage is possible if hydrated condition is maintained (Berjak and Pammenter 2013). It

seems that the nature and intensity of the damage caused by dehydration may be similar among seeds which may be differentiated in storage categories by the amount of water that seeds can lose and time necessary for lethal damages to accumulate (Walters 2015). The dehydration level that recalcitrant seed tolerate varies among species and it seems that the rate that water is lost until reaching the safe moisture content is one of the main parameters (Berjak and Pammenter 2008).

Several mechanisms are responsible to confer the ability of orthodox seeds to tolerate desiccation and many studies have been done at molecular level to discover the genes and pathways linked to this phenomena, but the mechanisms by which sensitive seeds lose their viability during dehydration and storage are still not well understood, hampering the conservation of recalcitrant-seeded species in germplasm bank (Delahaie et al. 2013). Furthermore, the absence of non-model recalcitrant-seeded species with sequenced genome poses barriers to investigate the physiological mechanisms related to desiccation sensitiveness at molecular level with orthodox seeds.

The use of molecular tools have provided important results in the biological fields unraveling the regulation and the mechanisms responsible for desiccation tolerance in seeds and the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is widely used method of choice (Vandesompele et al. 2002, Gachon et al. 2004). For RT-qPCR analysis, it is necessary to use an internal control, also called “reference genes” or “housekeeping genes”, in order to standardize expression level correcting variability related to total RNA content, RNA stability, enzymatic efficiencies, or sample loading variation (Hruz et al. 2011). To decrease experimental errors, many strategies can be used, including normalization to sample size, total RNA and measuring the reference gene, however the data must be normalized with appropriate validation (Huggett et al. 2005).

This study evaluated the best set of candidate reference genes to be used for normalization purposes of different tissues of *A. angustifolia* seeds after dehydration. A value of $M \leq 1.0$ is accepted when is evaluating candidate reference genes on a heterogeneous set of samples (e.g. different tissues) and $M \leq 0.5$ is typical for stability expressed genes of homogeneous set of samples, e.g., same tissue (Hellemans et al. 2007). The most stable set of candidate reference genes for the heterogeneous set of samples (embryonic axis plus cotyledons) were *ACT*, *GAPDH* and *SARI*. For the homogeneous set of samples, *ACT* and *PP2AA1* were selected as the best combination of reference genes to normalize gene expression for embryonic axis, whereas *GAPDH*, *UBI* and *POB* would be the most stable set of reference genes for cotyledons.

Dekkers et al. (2012) analysed candidate reference genes for gene expression studies and identified 14 stable genes in Arabidopsis samples seeds which included *SARI*, *PP2AA1* and *CAC*, and for tomato samples nine stable expressed genes was observed, including *ACT*, *PP2AA1* and *SARI*. *SARI*, *PP2AA1*, *CAC* and *ACT* were identified as stable reference genes in *A. angustifolia* seeds samples as well, corroborating their potential for normalization in gene expression studies. For heterogeneous samples (inter-tissue) of *Ricinus communis*, *ACT*, *POB* and *PP2AA1* were selected as the most stable reference genes. In the same study, Ubiquitin-conjugating enzyme *E2* (*UBI_E2*) and *PP2AA1* showed consistent expression in cotyledons, whereas *SARI* had the best stability in endosperm samples (Ribeiro et al. 2014). Ubiquitin also exhibited the most stable expression among different genotypes in *Pennisetum glaucum* whereas β -tubulin was the least stable across all the tested samples (Reddy et al. 2015). In our study, *AHTUB* was found the least stable gene in all samples as well as in embryonic axis, whereas *HIST* followed by *AHTUB* were the least stable in cotyledons sets.

The suitable most suitable reference genes for normalization gene expression during somatic embryogenesis in two conifer species were Elongation factor-1 α , α -tubulin and Histone 3 in *Pinus pinaster*, and Elongation factor-1 α , α -tubulin and Clathrin adaptor complex in *Pinus abies* (de Vega-Bartol et al. 2013). Depending on the experimental conditions the classic reference genes can vary extensively and become inappropriate for normalization purposes, imposing serious implications for studies that have not validated reference genes for the experiment in question (Huggett et al. 2005).

Vandesompele et al. (2002) showed that the common practice to use single control normalization leads to erroneous normalization. Moreover, the use of single reference gene does not allow to analyze its stability, which it is possible with multiple reference genes, providing more reliable data (Hellemans et al. 2007). For *Populus euphratica*, it is recommend to use at least two reference genes for reliable quantification, excepted for dehydration treatment, which requires three for accurate normalization due the impact that dehydration causes on the stability of the reference genes (Wang et al. 2014). Our study showed that is recommended to use at least three internal controls genes in heterogeneous samples (inter-tissue) and also for cotyledons, whereas for embryonic axis, two reference genes would be suitable.

A. angustifolia gene expression under dehydration condition

The three most stable reference genes (*ACT*, *GAPDH* and *SARI*) were used to normalize the expression levels of the target genes related to seed development, antioxidant system and stress responses of the samples composed by different tissues after dehydration condition. The relative expression of the genes compares tissues and different water content of the seeds. According to Espindola et al. (1994), cotyledons of *A. angustifolia* embryos were more

sensitive to dehydration than axes, as shown by tetrazolium test and electrolyte leakage. In most cases, the expression levels of the genes did not have significant differences between tissues in each water content analyzed. Only for some genes, for example, those related to seed development (*ABI3*, *LEC1* and *SMP*) a higher expression was observed in embryonic axis of undried seeds (41% WC).

The complex interaction among the regulators of seed maturation is still not well understood, but four regulators (*ABI3*, *FUS3*, *LEC1* and *LEC2*) apparently control most of functional aspects of seed maturation, including accumulation of storage reserves, cotyledons identity, acquisition of desiccation tolerance and dormancy in *Arabidopsis* (To et al. 2006). *Absciscic acid* (*ABA*) has a wide spectrum of occurrence in plants (including seeds and fruit tissues), and the peak of *ABA* content occurs in suppression of precocious germination, induction of desiccation tolerance and synthesis of late embryogenesis abundant proteins (Bewley et al. 2013). *LEC1* also plays a fundamental role controlling late embryogenesis, since *LEC1* mutations affects the process of late embryonic program (West et al. 1994). In the present study, it was possible to observe a decrease pattern in the transcripts of *ABI3*, *LEC1* and *SMP* in embryonic axis of the seeds after dehydration showed higher expression in undried seeds, indicating that the transcripts of those genes are not accumulating under abiotic stress and are might be unable to protect against desiccation in *A. angustifolia* seeds.

Recently, some reports confirmed the role of phytohormone *ABA* sensitivity in the re-induction of desiccation tolerance (DT) in germinated *Arabidopsis* seeds by incubation in polyethylene glycol (PEG) solution and the role of gene *ABI5* in the re-establishment of DT which was up-regulated under osmotic stress (Maia et al. 2011, 2014). Other studies reported that level of *ABI3* transcripts was stable during drying of desiccation sensitive seeds of *Magnolia*

ovata, increasing only during subsequent imbibition, but could not explain the germination behavior under this stress condition (José et al. 2008). Similarly, Faria et al. (2007) also did not find correlation between the expression of genes related to seed development (*ABI3* and *LEC1*) and loss and re-establishment of desiccation tolerance in *Medicago truncatula* seeds. The relative expression of *SMP* followed the same pattern that was observed for the other development genes, by decreasing the transcripts abundance during the drying in *A. angustifolia* seeds. This class of protein has been associated with desiccation tolerance in developing soybean seeds as well as under artificial drying (Blackman et al. 1991, 1992).

Other genes are associated with protection mechanism against desiccation as the genes related to antioxidant defense which are up-regulated in desiccation tolerant tissues (Leprince and Buitink 2010). Intolerant tissues subjected to desiccation undergo oxidative damages, such as peroxidation of lipids, resulting in the production of reactive oxygen species (ROS) or free radicals and increasing of respiration rates (Bewley et al., 2013). Several enzymes are involved in the protective processes against ROS such as superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase and peroxidases (Li and Sun 1999). In our study the only gene related to antioxidant system with decreasing expression during dehydration was *APX*, which had higher expression in the cotyledons than embryonic axis at 41% WC. *CAT* increased its expression levels during dehydration in embryonic axis, showed the highest expression in the lower water content that was different from cotyledons. *GPX* and *SOD* showed similar behavior during dehydration in both tissues, which had no significant difference in the expression levels.

The effect of desiccation was also investigated in other recalcitrant-seeded species such as *Quercus robur*, in which the activities of superoxide dismutase during the rapid dehydration increased significantly in the first stage

of water loss whereas the enzymatic activity of ascorbate did not change significantly during the slow and rapid dehydration (Pukacka et al. 2011). In *Theobroma cacao* seeds, desiccation sensitivity in cotyledons, that was more desiccation tolerant than axis, was associated with reduction in superoxide dismutase activity and increase of lipid peroxidation, with ascorbate peroxidase being not found at any water content analyzed (Li and Sun 1999). The enzymatic activity of catalase and superoxide dismutase measured in wheat seedling shoots increased during the first hours and with prolonged dehydration, but did not prevent the hydrogen peroxide accumulation, indicating a role of antioxidant enzyme in the response to water loss (Niedzwiedz-Siegien et al. 2004). In the present study, catalase gene expression pattern indicated a marked trend of accumulation with further dehydration in the embryonic axis. Chen et al. (2011) proposed that the over-accumulation of ROS are not efficiently scavenged by the increase of antioxidant activity in recalcitrant seeds, and the reduction of ROS to appropriate concentration is a better choice to prevent desiccation damage and maintain high germination, which could be made by ROS scavengers, such as ascorbic acid and butylated hydroxytoluene. Balbuena et al. (2009) observed in the early seed development of *A. angustifolia* higher number of proteins related to stress responses, indicating a high oxidative metabolism and hydrogen peroxide production. The presence of NADH dehydrogenase, a possible ROS scavenger, in mature somatic embryos of *A. angustifolia* may prevent the ROS activity, important for seed formation (Jo et al. 2014).

Desiccation tolerance in seeds is mediated by a complex cascade at molecular levels, which is regulated by protective mechanisms that prevent lethal damage. Such cascade can be divided into signal perception, signal transduction, gene activation and biochemical changes (Ramanjulu and Bartels 2002). Many metabolites that contribute to desiccation tolerance also have been identified in some recalcitrant seeds (Pammenter and Berjak 2000) but few

studies have been carried out in order to understand the behavior of these protective mechanism in desiccation sensitive tissues. In this study it was also analyzed some genes related to stress responses, which were reported in seeds of others species as a response to dehydration. Among the ten genes evaluated, only four genes had relative expression statistically different during the seed dehydration: *HSP17*, *MIPS*, *NAC* and *XERO 1*.

Heat shock proteins (HSP) are generalized protective role in response to high temperature and desiccation tolerance, which are up-regulated during dehydration (Dinakar and Bartels 2013), preventing irreversible denaturation of proteins and protecting the cells against damages during water loss in seeds (Bewley et al. 2013). In our study, the highest expression level of *HSP17* was observed in cotyledon tissue with 35% WC in *A. angustifolia* seeds, whose germination still remained high, suggesting that this gene operates against dehydration damages in a mild stress but not with further dehydration.

Carbohydrate metabolism plays a critical role in desiccation tolerance by accumulation of some compounds during desiccation, such as sucrose, raffinose, stachyose, maltotetraose, and myo-inositol (Dinakar and Bartels 2013). Myo-inositol is the main storage form of phosphate in plant seeds which accumulates in protein storage vacuole and mediates the synthesis of galactinol (Panzeri et al. 2011). Myo-inositol and sucrose can affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides (RFOs) in seeds, which possibly protect cellular structures during dehydration and constitute carbon reserve for early germination (Karner et al. 2004). In yellow lupin seeds, the loss of desiccation tolerance was followed by loss of RFOs and an increase in reducing sugars in cotyledons, hypocotyl and radicle tissues (Górecki et al. 1997). According to our results, the level of *MIPS* transcript decreased during the dehydration in both tissues (embryonic axis and cotyledons) achieving the lowest level at 35 and 30% of WC of seeds. Some evidences suggested a correlation between myo-

inositol content and response to ABA during germination (Panzeri et al. 2011) and also when combined with sucrose promotes RFO accumulation in seeds (Karner et al. 2004).

The *NAC* gene showed an accumulation in the expression levels after dehydration in embryonic axis tissues, that was significant different from cotyledons at 35 and 30% WC of seeds. *NAC* proteins are transcription factors considered one of the largest families of transcriptional regulators in plants associated with plants stress responses (Nuruzzaman et al. 2013) and more than 100 *NAC* genes have been identified in *Arabidopsis* and rice (Nakashima et al. 2012). Transgenic plants of these species that were overexpressed by stress-responsive *NAC* genes are associated with improve drought tolerance (Tran 2004, Nakashima et al. 2012). Recently, several transcription factors associated with stress responses were identified in embryogenic cells lines of *A. angustifolia*, including *NAC* (Elbl et al. 2015). Re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds showed, by analysis of transcriptome, the presence of many drought responsive genes in desiccation tolerance and desiccation sensitive set, such as *DREB2A*, *XERO1*, *LEA* genes and *ABA*-responsive genes (Maia et al. 2011). Our results suggest a probably role of *NAC* transcription factor in desiccation sensitive seeds. This needs to be further investigated in seeds during the dehydration condition, since most of reports associate this transcription factor to vegetative tissues under abiotic stress.

Late embryogenesis abundant proteins (*LEAs*) are other group of proteins correlated with acquisition of desiccation tolerance in seeds (Berjak and Pammenter 2013) but the behavior of *LEAs* in recalcitrant seeds is unclear, since they occur in species from different habitats and are absent in others (Farrant et al. 1996, Berjak and Pammenter 2008). It suggests that the desiccation sensitive in recalcitrant seed is due to, at least, the incapacity to accumulate *LEA* proteins

(Kermode 1997). In accordance to this hypothesis, recalcitrant seeds of *Castanospermum austral* revealed a significantly lower abundance (or even it was not detected) of LEA protein in the seed proteome of this species if compared with orthodox seeds of *Medicago truncatula*, however, dehydrins (group of LEA proteins) accumulated at high level in the cotyledon of that recalcitrant-seeded species (Delahaie et al. 2013). The presence of dehydrins has also been reported in *A. angustifolia* seeds, suggesting its potential to express this protein in response to water stress (Farrant et al. 1996). In our investigation, there was no significant difference in levels of *DHN1* and *LEA8-2* in both tissues studied, however *XERO1* transcripts levels decreased during dehydration in both tissue significantly, corroborating with the idea that dehydrins alone cannot avoid dehydration damages and other mechanism should be involved or stimulated to withstand the water deprivation without loss the seeds viability.

Other several genes related to stress responses, such as *AQP*, *DRE*, *ERD* and *TIP* have been reported as induced by dehydration and drought and are up-regulated under water loss (Ingram and Bartels 1996, Ramanjulu and Bartels 2002, Bartels et al. 2007, Dinakar and Bartels 2013). In our study, however, these genes did not show an expressive difference in the relative expression under dehydration in embryonic axis and cotyledon of *A. angustifolia* seeds, making it difficult to associate them to desiccation sensitivity in seeds.

Conclusions

The present study provided important insights by describing the optimal combination of reference genes for normalization gene expression data of *A. angustifolia* seeds during the dehydration condition by RT-qPCR. This study also identified by cloning eight reference genes which could be useful in further studies for accurate normalization of gene expression experiments. Furthermore, this study demonstrated changes in gene expression profile during the dehydration of recalcitrant seed of Brazilian pine, which suggested that the loss of viability during seed dehydration is associated with decreasing of expression levels of genes related to desiccation tolerance. Our results can offer a valuable contribution to understand the recalcitrance phenomena in seeds and to elucidate genes profile related to desiccation tolerance in sensitive seeds.

Acknowledgments

This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) through Sandwich Doctorate Scholarship (Proc. n° BEX 2687/14-3). The authors thank Ministério do Meio Ambiente/IBAMA (Permit n° 14BR014368/DF) and Wageningen University (The Netherlands) for support this research.

References

- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci* 14:211–218.
- Balbuena TS, Jo L, Pieruzzi FP, Dias LLC, Silveira V (2011) Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 72:302–3011.
- Balbuena TS, Silveira V, Junqueira M, Dias LLC, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh EIS (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *J Proteomics* 72:337–352.
- Bartels D, Phillips J, Chandler J (2007) Desiccation tolerance: gene expression, pathways, and regulation of gene expression. *Plant Desiccation Toler* 35:115–137.
- Beardmore T, Whittle C-A (2005) Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. *Tree Physiol* 25:965–972.
- Berjak P, Pammenter NW (2008) From *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective. *Ann Bot* 101:213–228.
- Berjak P, Pammenter NW (2013) Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Front Plant Sci* 4:478.
- Blackman SA, Obendorf RL, Leopold AC (1992) Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiol* 100:225–30.
- Blackman S a, Wettlaufer SH, Obendorf RL, Leopold a C (1991) Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiol* 96:868–74.
- Chen Q, Yang L, Ahmad P, Wan X, Hu X (2011) Proteomic profiling and redox status alteration of recalcitrant tea (*Camellia sinensis*) seed in response to desiccation. *Planta* 233:583–92.

- Dekkers BJW, Willems L, Bassel GW, Van Bolderen-Veldkamp RPM, Ligterink W, Hilhorst HWM, Bentsink L (2012) Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in arabidopsis and tomato seeds. *Plant Cell Physiol* 53:28–37.
- Delahaie J, Hundertmark M, Bove J, Leprince O, Rogniaux H, Buitink J (2013) LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. *J Exp Bot* 64:4559–73.
- Dinakar C, Bartels D (2013) Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Front Plant Sci* 4:1–14.
- Ding Y, Liu N, Virilouvet L, Riethoven J-J, Fromm M, Avramova Z (2013) Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 13:229.
- Eggers S, Erdey D, Pammenter NW, Berjak P (2007) Storage and germination response of recalcitrant seeds subjected to mild dehydration. In: Adkins SW, Ashmore SE, Navie S (eds) *Seeds: Biology, Development and Ecology*. CAB International, London, pp 85–92.
- Eira MTS Da, Salomão AN, Cunha R Da, Carrara DK, Mello CMC De (1994) Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE - Araucariaceae. *Rev Bras Sementes* 16:71–75.
- Elbl P, Lira BS, Andrade SCS, Jo L, Santos ALW, Coutinho LL, Floh EIS, Rossi M (2015) Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 120:903–915.
- Elbl P, Navarro B V., de Oliveira LF, Almeida J, Mosini AC, dos Santos ALW, Rossi M, Floh EIS (2015) Identification and evaluation of reference genes for quantitative analysis of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia* Bertol. Kuntze) gene expression. *PLoS One* 10:1–15.
- Espindola LS, Noin M, Corbineau F, Côme D (1994) Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Sci Res* 4:193–201.

- Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P (1993) Seed development in relation to desiccation tolerance: A comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. *Seed Sci Res* 3:1–13.
- Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P, Farnsworth EJ, Vertucci CW (1996) Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat. *Seed Sci Res* 6:175–182.
- Finch-Savage W, Blake PS, Clay HA (1996) Desiccation stress in recalcitrant *Quercus robur* L. seeds results in lipid peroxidation and increased synthesis of jasmonates and abscisic acid. *J Exp Bot* 47:661–667.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B (2004) Real-time PCR: What relevance to plant studies? *J Exp Bot* 55:1445–1454.
- Górecki RJ, Piotrowicz-Cieślak AI, Lahuta LB, Obendorf RL (1997) Soluble carbohydrates in desiccation tolerance of yellow lupin seeds during maturation and germination. *Seed Sci Res* 7:107–115.
- Hellemans J, Mortier G, De Paep A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19.
- Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl MW, Masanetz S, Borghi L, Verbrughe P, Kalaydjieva L, Bleuler S, Laule O, Descombes P, Grissem W, Zimmermann P (2011) RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics* 12:156.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279–284.
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol* 47:377–403.

- Jo L, Dos Santos ALW, Bueno CA, Barbosa HR, Floh EIS, Sederoff R (2014) Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. *Tree Physiol* 34:94–104.
- José AC, Ligterink W, Davide AC, Silva EAA, Hilhorst HWM (2008) Changes in gene expression during drying and imbibition of desiccation sensitive *Magnolia ovata* (A. St.-Hill) spreng. seeds. *Rev Bras Sementes* 31:270–280.
- Karner U, Peterbauer T, Raboy V, Jones DA, Hedley CL, Richter A (2004) myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *J Exp Bot* 55:1981–1987.
- Kermode AR (1997) Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. *Seed Sci Res* 7:75–95.
- Leprince O, Buitink J (2010) Desiccation tolerance: from genomics to the field. *Plant Sci* 179:554–564.
- Li C, Sun WQ (1999) Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. *Seed Sci Res* 9:209–217.
- Maia J, Dekkers BJW, Dolle MJ, Ligterink W, Hilhorst HWM (2014) Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. *New Phytol* 203:81–93.
- Maia J, Dekkers BJW, Provart NJ, Ligterink W, Hilhorst HWM (2011) The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. *PLoS One* 6
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1819:97–103.
- Niedzwiedz-Siegien I, Bogatek-Leszczynska R, Côme D, Corbineau F (2004) Effects of drying rate on dehydration sensitivity of excised wheat seedling shoots as related to sucrose metabolism and antioxidant enzyme activities. *Plant Sci* 167:879–888.

- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559–1582.
- Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front Microbiol* 4:1–16.
- Pammenter NW, Berjak P (1999) A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Sci Res* 9:13–37.
- Pammenter NW, Berjak P (2000) Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds. *Plant Species Biol* 15:153–156.
- Pammenter NW, Berjak P (2014) Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. *Int J Plant Sci* 175:21–28.
- Pammenter NW, Greggains V, Kioko JI, Wesley-Smith J, Berjak P, Finch-Savage WE (1998) Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. *Seed Sci Res* 8:463–471.
- Panzeri D, Cassani E, Doria E, Tagliabue G, Forti L, Campion B, Bollini R, Brearley CA, Pilu R, Nielsen E, Sparvoli F (2011) A defective ABC transporter of the MRP family, responsible for the bean *lpa1* mutation, affects the regulation of the phytic acid pathway, reduces seed myo-inositol and alters ABA sensitivity. *New Phytol* 191:70–83.
- Pukacka S, Malec M, Ratajczak E (2011) ROS production and antioxidative system activity in embryonic axes of *Quercus robur* seeds under different desiccation rate conditions. *Acta Physiol Plant* 33:2219–2227.
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313:856–62.
- Ramanjulu S, Bartels D (2002) Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell Environ* 25:141–151.
- Raven P, Havens K (2014) *Ex situ* plant conservation and cryopreservation: breakthroughs in tropical plant conservation. *Int J Plant Sci* 175:1–2.

- Reddy PS, Reddy DS, Sharma KK, Bhatnagar-Mathur P, Vadez V (2015) Cloning and validation of reference genes for normalization of gene expression studies in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] by quantitative real-time PCR. *Plant Gene* 1:35–42.
- Ribeiro PR, Dekkers BJW, Fernandez LG, de Castro RD, Ligterink W, Hilhorst HWM (2014) Identification of reference genes for gene expression studies during seed germination and seedling establishment in *Ricinus communis* L. *Seed Sci Res* 24:341–352.
- Schlögl PS, Luis A, Vieira N, Iochevet E, Floh S, Guerra MP (2012) Cloning and expression of embryogenesis-regulating genes in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Brazilian Pine). *Genet Mol Biol* 35:172–181.
- To A, Valon C, Savino G, Guillemint J, Devic M (2006) A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation. *Plant Cell* 18:1642–1651.
- Tompsett PB (1984) Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. *Ann Appl Biol* 105:581–586.
- Tran L-SP (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell Online* 16:2481–2498.
- Tweddle JC, Dickie JB, Baskin CC, Baskin JM (2003) Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J Ecol* 91:294–304.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:1–12.
- de Vega-Bartol JJ, Santos RR, Simões M, Miguel CM (2013) Normalizing gene expression by quantitative PCR during somatic embryogenesis in two representative conifer species: *Pinus pinaster* and *Picea abies*. *Plant Cell Rep* 32:715–729.

- 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, Berjak P, Pammenter N, Kennedy K, Raven P (2013) Preservation of recalcitrant seeds. *Science* (80-) 339:915–916.
- Wang H-L, Chen J, Tian Q, Wang S, Xia X, Yin W (2014) Identification and validation of reference genes for *Populus euphratica* gene expression analysis during abiotic stresses by quantitative real-time PCR. *Physiol Plant* 152:529–545.
- West M, Yee K, Danao J, Zimmerman J, Fischer R, Goldberg R, Harada J (1994) LEAFY COTYLEDON1 is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in Arabidopsis. *Plant Cell* 6:1731–1745.

Supplementary data

Table 1 - Gene description, degenerated primers sequences, annealing temperature, and product size used for cloning the candidate reference genes of *A. angustifolia* seeds.

Symbol	Primer Sequence	Annealing Temperature (°C)	Product Size (bp)
<i>AHTUB</i>	F: 5'- TYGGWCAGGCCGGTATYCAG - 3' R: 5'- WCCCTCRCCVACATACCAR - 3'	59	1211
<i>HIST</i>	F: 5'- GAGGAAAGGCTCCAAGGAAG - 3' R: 5'- GCATGGATGGCACACAAGTT - 3'	55	307
<i>PP2AA1</i>	F: 5'- GAGGARACHTGYGTGAGRGAK - 3' R: 5'- TGCCCAITCWGGACCAAAY - 3'	56	1125
<i>CAC</i>	F: 5'- GAGAAGCAGCARGAGCTTAT - 3' R: 5'- TGCTGTARTTGAACACAATGTC - 3'	50	632
<i>POB</i>	F: 5'- CCAAATATGGCMATGGATATG - 3' R: 5'- GTARRGCCCAITCATGCTGAA - 3'	50	379
<i>EF1</i>	F: 5'- GTGGTCATTGGMCATGTCGAC - 3' R: 5'- ACCAMTCAAGGTTGGTTGAKC - 3'	58	601
<i>GAPDH</i>	F: 5'- AGAGTATGTGGTTGAATCCACT - 3' R: 5'- TCTGTGTAACCAAGAATWCC - 3'	56	558
<i>SAR1</i>	F: 5'- TGGCAGAARGAGGCKAAGAT - 3' R: 5'- TAACGRAGCTCKTCCTCTGA - 3'	52	383

Table 2 - Gene description, primers sequences, product size, PCR efficiency and regression coefficient (R^2) used for RT-qPCR analyses of the candidate references genes of *A. angustifolia* seeds.

Symbol	Primer Sequence	Product Size (bp)	PCR Efficiency	R^2
<i>AHTUB</i>	F: 5'- CTCGTCTCACAGGTCATTTTC - 3' R: 5'- CTAGGATACGGGACCAGATT - 3'	104	1.964	0.9912
<i>HIST</i>	F: 5'- GAGGCTTGTGAGAGAGATTG - 3' R: 5'- TGGATGGCACACAAGTTC - 3'	135	1.907	0.9853
<i>PP2AA1</i>	F: 5'- TGTTGAGGGTTGTGCTTC - 3' R: 5'- GAACTCGCCAAGACTTATCC - 3'	107	1.957	0.9860
<i>UBIQ</i>	F: 5'- CATTCAAGGATGCTTGGTCTC - 3' R: 5'- GTTTGGATCCGTAAGCAGAG - 3'	79	1.947	0.9950
<i>CAC</i>	F: 5'- CAAGAACTCCATCCCTGTTC - 3' R: 5'- CAGCAATACTCTTCCAGGTG - 3'	134	1.911	0.9881
<i>POB</i>	F: 5'- CGCTGTGTATCATCTGTGG - 3' R: 5'- CAGTGGATGTCAGCTATGTG - 3'	115	1.854	0.9997
<i>EF1</i>	F: 5'- CCAGAGATGGGCACAAAG - 3' R: 5'- GCTACCACTCCCAAGTATTC - 3'	116	1.941	0.9906
<i>ACT</i>	F: 5'- TTGCCTCATGCCATTCTC - 3' R: 5'- GCTAGCTTCTCCTTCATGTC - 3'	140	1.922	0.9884
<i>GAPDH</i>	F: 5'- CATCACAGCAACACAGAAGA - 3' R: 5'- CCGGTCAACTTCCCATTAAG - 3'	150	2.053	0.9932
<i>SARI</i>	F: 5'- CATCAACCCACCCAATATCC - 3' R: 5'- AACCCCTCCTAGCGATCTG - 3'	99	1.928	0.9960

Table 3 - Gene description, primers sequences, product size, PCR efficiency and regression coefficient (R^2) used for RT-qPCR analyses of the target genes of *A. angustifolia* seeds.

Symbol	Primer Sequence	Product Size (bp)	PCR Efficiency	R^2
<i>ABI5</i>	F: 5'- GTGTACGCCTGCTTTCTT- 3' R: 5'- AGAAGACCGTGGAAAGGA - 3'	85	1.824	0.9968
<i>DHN1</i>	F: 5'- CAGCACGAGGGTTTGAAG - 3' R: 5'- TCGCCTTCTTCCTCATCA - 3'	80	1.850	0.9973
<i>LEC1</i>	F: 5'- GAGCCGCATCATGAAGAA - 3' R: 5'- GCTGATGAACTCCGACAC - 3'	94	1.971	0.9685
<i>FUS3</i>	F: 5'- CCATGATGAAATCTCCACGA - 3' R: 5'- AAGCCGAATGTACGTCTTAG - 3'	77	1.839	0.9959
<i>SMP</i>	F: 5'- GGTCTCAGCCCAAGAGAA - 3' R: 5'- TTCCTTCGCCTCCTTCTT - 3'	88	2.123	0.9905
<i>HSP17</i>	F: 5'- CCGTGGATGTCAAGGAATAC - 3' R: 5'- CTTGATGTCAGTGGGCTT - 3'	77	1.979	0.9958
<i>LEA8-2</i>	F: 5'- GAGCAGGCGAAACAGAAG - 3' R: 5'- GACGGTCTCCTTCACCTTAT - 3'	75	1.977	0.9882
<i>ABI3</i>	F: 5'- TCGTAACGTCTCGTGTGT - 3' R: 5'- ACCAGTGTCTCCAGAAGATA - 3'	83	1.835	0.9941
<i>TIP</i>	F: 5'- TGGCACCAACAATCAATCC - 3' R: 5'- GTGTATGCCACTGCGATT - 3'	82	1.934	0.9930
<i>AQP</i>	F: 5'- CAGTGAGAATGGTGTAGTAGAG - 3' R: 5'- TAAGTCATGGTCCTTCTGGA - 3'	80	1.997	0.9958
<i>DREB</i>	F: 5'- TGCCTTACTCCTCTGTAGTT - 3' R: 5'- CTGCCAAAGGTTCAAAGAAAG - 3'	82	1.905	0.9990
<i>CAT</i>	F: 5'- GCCCAACTATTTGATGCTG - 3'	85	1.897	0.9984

<i>GPX</i>	R: 5'-GTGCATAAAGTTCATGAAACCC - 3' F: 5'-GTTATTGCCTGGTTCCTCTC - 3' R: 5'-GCAAAGTACAAGGATCAAGGA - 3'	78	1.974	0.9985
<i>APX</i>	F: 5'-AGGAGCTTCTTAGTGGAGAG - 3' R: 5'-AGATGGGATCTTCCAACAATG - 3'	75	2.074	0.9935
<i>SOD</i>	F: 5'-TCACTTTAGACCGCTGATTG - 3' R: 5'-CGAGGTGGACATGAACTAAG - 3'	92	1.916	0.9950
<i>MIPS</i>	F: 5'-CGACAACGTTGCTCTTAGAA - 3' R: 5'-GGAAACAACGACGGAATGA - 3'	76	1.906	0.9968
<i>ERD</i>	F: 5'-GAGAAAGTTCCAGACCATAACC - 3' R: 5'-TCTATTCCTCCCGTTGCT - 3'	79	1.911	0.9935
<i>NAC</i>	F: 5'-GTATGATCCGTGGCAGTTG - 3' R: 5'-TTTGATACTTCCTGTCCCT - 3'	87	1.894	0.9936
<i>XERO</i>	F: 5'-CATGGCTAGTGCCCTTTC - 3' R: 5'-GGAGAAGAAGGGATTAATGGAG - 3'	81	1.972	0.9878

ARTIGO 3 Viabilidade de sementes recalcitrantes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no armazenamento e em banco de sementes induzido

Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Forest Ecology and Management*

Autores: Ezequiel Gasparin; José M. R. Faria; Anderson C. José; Olivia A. O. Tonetti; Rodrigo A. de Melo; Henk W. M. Hilhorst

Resumo

Araucaria angustifolia é uma espécie arbórea representativa da Floresta Ombrófila Mista no bioma Mata Atlântica, ocorrendo nas regiões sul e sudeste do Brasil. Por produzir sementes sensíveis à dessecação, a formação de um banco de germoplasma a longo prazo é comprometida para essa espécie, havendo a possibilidade de armazenamento apenas a curto e médio prazos. Além disso, a formação de um banco de sementes do solo em seu ambiente natural pode ser limitada, sujeita ao efeito das condições climáticas, estado de conservação da cobertura florestal e de taxas de predação. Assim, no presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de armazenamento de sementes de *A. angustifolia* coletadas no sul (Lote RS) e no sudeste (Lote MG) do Brasil, e o comportamento das sementes em um banco de sementes do solo induzido em dois ambientes da floresta. Os resultados mostraram que ambos os lotes apresentam potencial de armazenamento em câmara fria por aproximadamente 12 meses, mantendo a viabilidade das sementes elevada durante esse período. O decréscimo da germinação verificado em seguida esteve associado tanto com a redução como o aumento do grau de umidade das sementes, além de uma maior

taxa de condutividade elétrica. Em ambiente de sub-bosque, a viabilidade das sementes no banco de sementes induzido foi elevada (acima de 85%) por um período de 60 dias, e ao final do experimento (270 dias), houve a emergência de plântulas no local. No entanto, na condição de borda da floresta, houve perda total da viabilidade das sementes aos 120 dias, associada a uma redução do seu grau de umidade e maior taxa de predação, não havendo o estabelecimento de plântulas. Desta forma, conclui-se que é possível realizar o armazenamento de *A. angustifolia* a curto prazo em câmara fria, fundamental para atender a demanda fora do período de produção de sementes, e a conservação da cobertura florestal mostrou-se primordial para a regeneração e conservação da espécie.

Palavras-chave: pinheiro-brasileiro, sensibilidade à dessecação, armazenabilidade, banco de sementes do solo, cobertura florestal.

Introdução

Muitas espécies produzem sementes que são tolerantes à dessecação, as quais podem sobreviver por longos períodos, centenas de anos em alguns casos, com baixo conteúdo de água, retomando seu desenvolvimento quando reidratadas (Bewley et al., 2013). Por outro lado, algumas sementes são dispersas com elevado conteúdo de água e são intolerantes à dessecação, podendo ser armazenadas por curto período de tempo, desde que mantidas em estado hidratado (Berjak e Pammenter, 2013). Considerando as características dos habitats, observa-se que espécies que produzem sementes sensíveis à dessecação são comuns em ambientes úmidos e não sazonais, sendo menos frequentes ou até mesmo ausentes em regiões áridas e altamente sazonais (Tweddle et al., 2003). As diferenças no comportamento entre sementes ortodoxas e recalcitrantes parece ser consequência do processo de seleção

natural devido às diferentes condições ambientais necessárias para seu estabelecimento (Barbedo e Bilia, 1998).

A longevidade *ex situ* de sementes ortodoxas quando correlacionada com as características ambientais do local de coleta, demonstra que sementes originárias de ambientes quentes e secos são mais longevas daquelas coletadas em locais frios e úmidos (Probert et al., 2009). Sementes recalcitrantes possuem baixo potencial de armazenamento, impondo grandes desafios para sua conservação *ex situ* em bancos de germoplasma (Umarani et al., 2015). Além das sementes recalcitrantes não tolerarem a secagem abaixo do conteúdo de água não congelável, as mesmas apresentam alto risco de formação de cristais de gelo, o qual pode ser letal, quando são utilizados métodos convencionais empregados no armazenamento de sementes ortodoxas (Walters, 2015). Algumas técnicas podem auxiliar na diminuição da sensibilidade à dessecação e aumento da armazenabilidade de sementes recalcitrantes, como o condicionamento fisiológico (ex., uso do polietileno glicol); indução de estresse; aplicação de reguladores de crescimento, como o ácido abscísico e antioxidantes (Beardmore e Whittle, 2005; Bonjovani e Barbedo, 2014, 2008; Faria et al., 2006).

Entre as sementes, existe um *continuum* de sensibilidade à dessecação, indo desde aquelas que são altamente sensíveis à desidratação e resfriamento até aquelas que toleram secagem a baixo conteúdo de água e baixas temperaturas no armazenamento. Se considerarmos apenas as sementes recalcitrantes, seu comportamento entre as espécies também é variável, pois nem todas as sementes perdem a viabilidade no mesmo grau de umidade (Berjak e Pammenter, 2000; Bewley et al., 2013). Dentro de um mesmo gênero, pode-se observar espécies com comportamento diferenciado, como é o caso da *Araucaria*, uma vez que sementes de *A. cunninghamii* podem ser secas até 7% umidade, sendo classificadas como ortodoxas, enquanto sementes de *A. hunsteinii* toleram uma

desidratação entre 44 e 32%, apresentando comportamento recalcitrante (Tompsett, 1982).

A longevidade das sementes da grande maioria das espécies tropicais ainda é desconhecida, tanto em condições de armazenamento artificial como no seu próprio ambiente natural (Vazquez-Yanes e Orozco-Segovia, 1993). Após a dispersão, as sementes podem germinar imediatamente ou persistirem por um determinado período no solo, formando um banco de sementes (Fenner e Thompson, 2005; Thompson, 2000), que é constituído por todas as sementes viáveis, num determinado perfil do solo, incluindo aquelas que permanecem na superfície (Saatkamp et al., 2014). A estimativa da persistência no banco de sementes do solo pode ser realizada de forma direta ou indireta como, por meio da simulação, enterrando-se as sementes no solo e contabilizando a viabilidade ao longo do tempo (direta); ou de forma indireta, pela retirada de amostras de solo, as quais são expostas a condições favoráveis para germinação e posterior identificação das plântulas (Saatkamp et al., 2009).

O estudo do comportamento das sementes no solo é fundamental para o entendimento da dinâmica populacional, sendo que sua persistência é influenciada pelas características físicas e fisiológicas das sementes e pelos fatores bióticos e abióticos do ambiente (Long et al., 2015). O estado de conservação do habitat parece ter relevante efeito na persistência das sementes no solo. No noroeste da Europa, comunidades vegetais relativamente conservadas e sem distúrbios, como pastagens e bosques florestais, geralmente tem baixa persistência de sementes, enquanto habitats com elevado grau de alteração, como campos aráveis, apresentam um banco de sementes persistente (Thompson et al., 1998). Em uma floresta tropical decídua do México observou-se que a maioria das espécies forma um banco de sementes persistente, constituído principalmente por sementes com tegumento impermeável, estando a germinação associada aos picos de precipitação (Soriano et al., 2014).

Cryptocarya aschersoniana, espécie da Mata Atlântica Brasileira, produz sementes recalcitrantes capazes de formar um banco de sementes transitório, porém ambientes perturbados são desfavoráveis para a germinação e regeneração da espécie (Tonetti et al., 2015).

Diante do elevado estado de fragmentação do bioma Mata Atlântica, muitas espécies estão ameaçadas de extinção e apresentam baixos índices de regeneração natural, comprometendo a permanência das mesmas no ecossistema. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (pinheiro-brasileiro) é a espécie representativa da Floresta Ombrófila Mista neste bioma, ocorrendo naturalmente no Brasil desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais (Carvalho, 2002). No entanto, devido à exploração predatória, principalmente entre 1930 e 1950, a área de ocorrência natural da araucária foi reduzida para 1 a 2% da área original (Guerra et al., 2000) e, atualmente, a espécie encontra-se criticamente ameaçada de extinção (IUCN, 2016). Além da importância madeireira da espécie, suas sementes são amplamente consumidas pela fauna e pelo homem, devido seu elevado teor nutricional (Thys et al., 2010). Suas sementes são sensíveis à dessecação (Tompsett, 1984) e, nesse sentido, o conhecimento do comportamento fisiológico de sementes recalcitrantes, visando o estabelecimento de um banco de germoplasma, a curto ou médio prazo, e o potencial de formação de um banco de sementes do solo são primordiais para a conservação da espécie e a recuperação de ambientes degradados. Assim, no presente estudo objetivou-se avaliar o potencial de armazenamento de sementes de *Araucaria angustifolia* provenientes de dois locais de coleta, e o comportamento em um banco de sementes induzido em diferentes ambientes da floresta.

Material e métodos

Coleta e beneficiamento das sementes

As sementes foram coletadas em duas áreas de ocorrência natural da espécie, sendo um lote (Lote RS) proveniente da Floresta Nacional de São Francisco de Paula (FLONA-SFP), São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul (RS), em vegetação classificada como Floresta Ombrófila Mista (Leite, 2002) (coordenadas 29°25'22,4"S; 50°23'11,2"W), e outro (Lote MG) de remanescentes florestais localizados no município de Aiuruoca, Minas Gerais (MG), classificados como Floresta Ombrófila Baixo-Montana (Oliveira-Filho e Fontes, 2000) (coordenadas 21°13'55,0"S; 44°58'42,0"W). As coletas foram realizadas entre os meses de abril e maio de 2013 e 2014, coletando-se sementes de, no mínimo, 12 árvores em cada região.

Após a coleta foi realizado o beneficiamento das sementes, as quais foram imersas em um recipiente com água. As que boiaram foram descartadas e as que permaneceram no fundo foram usadas nos experimentos (Wendling e Delgado, 2008). Sementes que apresentaram sinais visíveis de ataque por broca do pinhão também foram eliminadas. Em seguida, foi realizada uma leve secagem em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24 horas, para remoção da água superficial das sementes decorrente do beneficiamento.

Armazenamento das sementes

As sementes coletadas no ano de 2013 foram acondicionadas em embalagens semipermeáveis (sacos plásticos de polietileno selados) e armazenadas em câmara fria ($5 \pm 1^\circ\text{C}$ /UR 35-40%). Periodicamente, foram retiradas amostras para a avaliação do grau de umidade das sementes e dos

embriões, viabilidade por meio do teste de germinação e tetrazólio, condutividade elétrica, taxa de respiração e predação. Os seguintes tempos de armazenamento foram avaliados: 0 (logo após a coleta), 3, 12, 19 e 26 meses para o Lote MG e 0, 4, 12 e 18 meses para o Lote RS.

Grau de umidade, teste de tetrazólio e condutividade elétrica

O grau de umidade foi determinado pelo método de estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas (ISTA, 1996), com quatro repetições de cinco sementes cortadas transversalmente e com embriões intactos.

O teste de tetrazólio foi conduzido utilizando-se quatro repetições de 15 embriões. Os mesmos foram imersos em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,2%, por quatro horas a 40°C em câmara do tipo B.O.D., na ausência de luz. Em seguida, os embriões foram lavados em água destilada, permanecendo submersos até o momento da avaliação da coloração, seguindo recomendações de Abreu et al. (2012). Os resultados foram apresentados em porcentagem de viabilidade.

O teste de condutividade elétrica das sementes foi feito com quatro repetições de cinco sementes individuais, sem tegumento, previamente pesadas em balança eletrônica de precisão e submersas em 50 mL de água deionizada por amostra. Os recipientes foram mantidos em câmara de germinação, do tipo BOD, em temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ /no escuro por 24 horas. Em seguida, foi efetuada a leitura dos lixiviados, utilizando-se condutivímetro Digimed (DM 31)[®], cujos valores obtidos foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Teste de germinação

Para o teste de germinação, foi realizado um despoite (corte no tegumento) das sementes a 3 mm acima da extremidade proximal da semente, de acordo com as recomendações de Moreira-Souza e Cardoso (2003), a fim de acelerar e uniformizar a germinação. As sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos, seguido de enxágue em água corrente, e semeadas em bandejas plásticas (51 x 26 x 7 cm) sob areia peneirada e autoclavada, umedecida o suficiente para garantir às sementes quantidade de água necessária para a germinação. O teste foi realizado com quatro repetições de 20 sementes, conduzido em germinador do tipo Mangelsdorf ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), sob luz constante. Foram contabilizadas semanalmente, durante 70 dias, as sementes germinadas (protrusão da radícula) e a formação de plântulas normais.

Taxa de respiração e Raios-X

A atividade respiratória foi avaliada utilizando-se quatro repetições de 15 sementes, colocadas em um frasco de 600 mL, com uma abertura na tampa vedada com borracha específica, impedindo trocas gasosas com o ambiente, porém permitindo a entrada da agulha para a retirada do ar e posterior leitura de CO_2 e O_2 ($\% \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), por meio do aparelho PBI – Dansensor CHECKPOINT O_2/CO_2 .

Para a realização do teste de raios-x foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes, as quais foram submetidas à análise radiográfica automática, utilizando o equipamento Faxitron HP MX-20 digital. Avaliou-se a taxa de predação por meio da visualização das imagens radiográficas. Em seguida, as sementes radiografadas foram utilizadas para a realização do teste de germinação visando avaliar a viabilidade das mesmas.

Banco de sementes induzido

O experimento foi instalado em um fragmento de Floresta Estacional Semidecídua Montana (21°20'35,41" S; 44°58'58,58" O), em Lavras (MG), no mês de maio de 2014 utilizando as sementes coletadas no mesmo ano (Lote MG). O banco de sementes induzido permaneceu em dois ambientes distintos: área de sub-bosque e na borda da floresta. No sub-bosque, foram realizadas avaliações no tempo 0 (após a coleta das sementes) e aos 30, 60, 190 e 270 dias, enquanto na borda, as avaliações foram feitas no tempo 0 e aos 30, 60 e 120 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 160 sementes cada. As sementes foram acondicionadas em telas de *nylon* de 15 x 30 cm perfuradas, cobertas por serapilheira e dispostas em uma “gaiola” de grade metálica (1,20 m de comprimento x 80 cm de largura x 15 cm de altura, malha 1 x 1 cm) com a finalidade de evitar a predação das sementes por roedores, ocupando, cada uma, uma área de, aproximadamente, 0,96 m².

Inicialmente (tempo zero) foi realizada a avaliação da viabilidade das sementes e, em cada época de avaliação, foram retiradas amostras para o teste de germinação (protrusão da radícula e formação de plântulas normais), determinação do grau de umidade das sementes e do embrião e taxa de predação, as quais foram conduzidas em laboratório de acordo com os procedimentos descritos anteriormente.

O experimento foi instalado no mês de maio/2014 (época de dispersão das sementes) e finalizado em janeiro/2015. Em cada época de avaliação, foram coletadas amostras de solo para a determinação do grau de umidade (quatro repetições de 70 g de solo cada/secagem em estufa a 105°C por 24 horas). Foram obtidos os dados climatológicos durante o período experimental, junto à

Estação Climatológica do Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras situada a 13 Km do local.

Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo que os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. As análises foram realizadas no software estatístico Sisvar (Ferreira, 2008).

Resultados

Armazenamento das sementes

Sementes de *A. angustifolia* coletadas em 2013 apresentaram grau de umidade inicial (tempo zero) de $40,1 \pm 1,2\%$ (Lote MG) e $39,0 \pm 1,3\%$ (Lote RS), enquanto que o embrião apresentou umidade superior, $52,4 \pm 0,6\%$ (Lote MG) e $51,7 \pm 0,8\%$ (Lote RS). A viabilidade das sementes após a coleta, verificada pelo teste de germinação, para ambos os lotes foi similar, constatando-se valores de protrusão da radícula de $78 \pm 12\%$ (Lote MG) e $81 \pm 8\%$ (Lote RS) e, de plântulas normais, valores de $63 \pm 10\%$ (Lote MG) e $68 \pm 10\%$ (Lote RS). No entanto, a viabilidade avaliada por meio do teste de tetrazólio demonstrou médias superiores àquelas encontradas no teste de germinação para o Lote MG ($97 \pm 4\%$) e inferiores para o Lote RS ($62 \pm 35\%$) (Tabela 1 e Figura 1).

Durante o armazenamento, por um período de 12 meses, verificou-se que não houve diferença significativa nos valores de protrusão da radícula e plântulas normais para o Lote MG (Figura 1), assim como para o grau de

umidade das sementes, observando-se apenas uma leve diminuição no grau de umidade do embrião. Após 12 meses de armazenamento, observou-se uma redução significativa na germinação das sementes, as quais atingiram menor valor aos 26 meses, $11 \pm 9\%$ para protrusão da radícula e plântulas normais, diferindo-se estatisticamente das médias aos 19 meses. A redução da viabilidade das sementes ao final do armazenamento coincidiu com uma diminuição significativa do grau de umidade das sementes e do embrião, observando-se, respectivamente, um decréscimo de 11,6 e 4,4 pontos percentuais se comparado com os valores iniciais.

O mesmo comportamento foi observado pelo teste de tetrazólio para o Lote MG, havendo uma diminuição da viabilidade dos embriões ao longo do armazenamento, verificando-se a perda total da viabilidade aos 26 meses. A condutividade elétrica das sementes não diferiu significativamente até 19 meses, aumentando drasticamente na última avaliação, passando de 89,28 (ponto inicial) para $433,38 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (avaliação final). A taxa de respiração (O_2 e CO_2) e predação das sementes mantiveram-se constante ao longo das avaliações, exceto para o Lote RS (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios de grau de umidade, viabilidade por tetrazólio, condutividade elétrica, taxa de respiração e predação de sementes de *Araucaria angustifolia*, provenientes de diferentes locais (lotes MG e RS), durante o armazenamento em câmara fria (5 ± 1 °C/UR 35-40%).

Lote MG							
Tempo (meses)	Grau de umidade (%)		Viabilidade por tetrazólio (%)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	Taxa de respiração		Taxa de predação (%)
	Semente	Embrião			O ₂ (% $\text{g}^{-1} \text{dia}^{-1}$)	CO ₂ (% $\text{g}^{-1} \text{dia}^{-1}$)	
0	40,1 a*	52,4 ab	97 a	89,28 b	0,165 a	0,577 a	9 a
3	39,0 a	49,9 bc	88 a	72,95 b	0,129 a	0,918 a	8 a
12	39,0 a	50,5 bc	58 b	46,79 b	0,152 a	0,690 a	8 a
19	38,4 a	54,3 a	17 c	96,16 b	0,161 a	0,708 a	3 a
26	28,5 b	48,0 c	0 c	433,38 a	-	-	6 a
Lote RS							
0	39,0 b	51,7 a	62 a	14,85 b	0,172 a	0,595 a	8 a
4	39,0 b	49,1 a	63 a	14,45 b	0,087 bc	0,159 b	6 a
12	41,8 b	52,4 a	43 a	19,15 b	0,077 c	0,144 b	4 a
18	46,4 a	51,9 a	25 a	84,65 a	0,130 ab	0,109 b	15 a

*Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna para cada lote de sementes não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

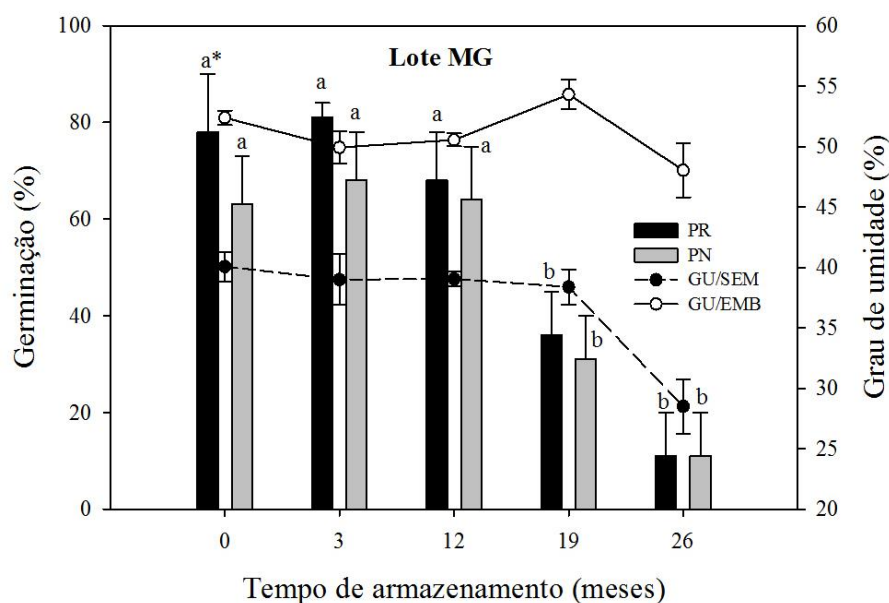


Figura 1 – Germinação e grau de umidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Lote MG) durante o armazenamento em câmara fria. Abreviações: PR (protrusão da radícula), PN (plântulas normais), GU/SEM (grau de umidade da semente), GU/EMB (grau de umidade do embrião). Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão.

Sementes provenientes do Lote RS apresentaram comportamento similar ao Lote MG, mantendo a viabilidade por um período de 12 meses de armazenamento, não diferindo significativamente, quando considerada a protrusão da radícula. No entanto, aos 18 meses, houve uma queda significativa nesses valores, passando de 81% (tempo zero) para 40% (18 meses). Os percentuais de formação de plântulas normais não foram significativamente diferentes ao longo do armazenamento (Figura 2). Aos 25 meses de armazenamento houve a perda total da viabilidade das sementes, com elevada infestação de fungos, e mesmo após tentativa de desinfestação das sementes antes do teste de germinação, a incidência de fungos foi elevada (dados não apresentados).

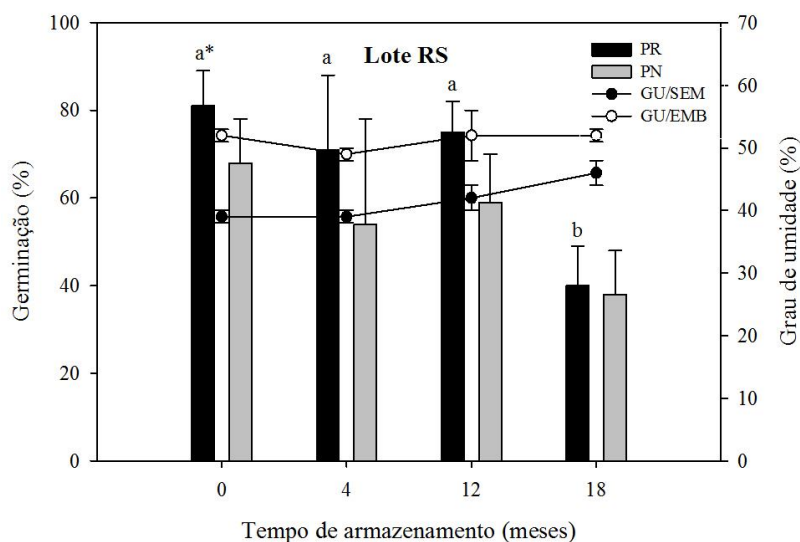


Figura 2 – Germinação e grau de umidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Lote RS) durante o armazenamento em câmara fria. Abreviações: PR (protrusão da radícula), PN (plântulas normais), GU/SEM (grau de umidade da semente), GU/EMB (grau de umidade do embrião). Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão.

Diferentemente do Lote MG, na última avaliação do armazenamento do Lote RS, o grau de umidade das sementes aumentou significativamente se comparado com o valor inicial, porém para o embrião, não houve diferença significativa durante o armazenamento. A viabilidade dos embriões verificada pelo teste de tetrazólio manteve-se constante durante o armazenamento e inferior aos valores do teste de germinação (Tabela 1). A condutividade elétrica das sementes aumentou significativamente na última avaliação, passando de 14,84 (tempo zero) para 84,65 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (18 meses). Além disso, a taxa de consumo de O_2 foi maior para as sementes recém-coletadas e armazenadas por 18 meses (0,172 e 0,130 $\% \text{g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ de O_2 , respectivamente), enquanto a taxa liberação de CO_2 foi superior apenas para as sementes recém-coletadas. A taxa de predação das sementes não diferiu-se significativamente ao longo do armazenamento (Tabela 1).

Por meio da análise radiográfica constatou-se a infestação das sementes de *A. angustifolia* pela broca-do-pinhão (*Cydia araucariae* - Lepidoptera) em ambos os lotes, porém os valores não foram elevados, próximo de 10%. Em alguns casos, observou-se a presença da larva apenas no tegumento e, em outros, a destruição do megagametófito e do embrião (Figura 3A-B). Além disso, foi possível observar ao final do armazenamento a germinação de algumas sementes e a atividade predatória de larvas, as quais danificaram o tecido de reserva e o embrião, ocasionando a perda da viabilidade (Figura 3C). Também, pela análise radiográfica, observou-se uma redução do espaço ocupado pelo megagametófito para o Lote MG, ao longo do armazenamento devido, provavelmente, a perda de água das sementes (Figura 3D). Além disso, o megagametófito apresentou-se endurecido ao final.

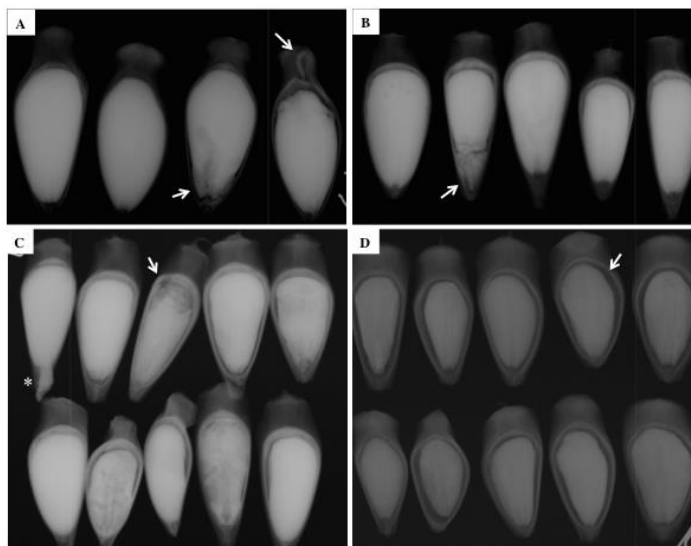


Figura 3 – Radiografia de sementes de *Araucaria angustifolia* durante o armazenamento em câmara fria. (A) Sementes do Lote RS e (B) Lote MG após a coleta, sendo possível observar a presença de larvas (setas). (C) Sementes do Lote RS armazenadas por 18 meses, observando-se a germinação (asterisco) e predação (setas) das sementes. (D) Redução do volume ocupado pelo megagametófito (seta) de sementes armazenadas por 26 meses (Lote MG).

Banco de sementes induzido

Sementes de *A. angustifolia* coletadas em 2014 em Minas Gerais (Lote MG), utilizadas no banco de sementes induzido, apresentaram grau de umidade inicial de $37,5 \pm 0,8\%$ e do embrião de $52,0 \pm 1,3\%$. A viabilidade inicial, avaliada pelo teste de germinação em laboratório teve duração de 70 dias, apresentando $91 \pm 5\%$ de protrusão da radícula e $85 \pm 11\%$ de plântulas normais. A taxa inicial de predação das sementes, devido a presença da broca-do-pinhão, foi baixa ($3 \pm 3\%$) (Figuras 4 e 5/tempo zero).

Os valores de protrusão da radícula, plântulas normais e grau de umidade do solo variaram significativamente ($p \leq 0,05$) ao longo dos 190 dias de avaliação do banco de sementes induzido, na condição de sub-bosque (Figura 4A-B). A viabilidade das sementes manteve-se elevada (acima de 85%) até 60 dias após a instalação do banco, porém aos 190 dias, a germinação decresceu abruptamente, diferindo-se significativamente da avaliação anterior, observando-se valores de $36 \pm 17\%$ para protrusão da radícula e $33 \pm 17\%$ para plântulas normais (Figura 4A). O grau de umidade das sementes e do embrião não variou significativamente no tempo (Figura 4B). A variação da taxa de predação das sementes durante o estudo não foi significativa, ficando abaixo de 10% em todas as avaliações. Na última avaliação, aos 270 dias, observou-se emergência de plântulas no ambiente sub-bosque, alcançando $23 \pm 12\%$, sendo que as demais sementes encontravam-se mortas, com aspecto de podridão. A emergência de plântulas no campo iniciou-se no período de maior precipitação (primavera/verão) no qual os maiores índices pluviométricos foram registrados aos 210 e 240 dias, associado também a um aumento constante da temperatura média (Figura 6). O grau de umidade do solo também seguiu a mesma tendência dos dados pluviométricos, variando significativamente ao longo do período estudado, apresentando maior média de umidade aos 190 dias (Figura 4B).

No banco de sementes induzido na borda da floresta, constatou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo para todas as variáveis analisadas. A viabilidade das sementes diminuiu gradativamente ao longo das avaliações, apresentando valores de $40 \pm 11\%$ de protrusão da radícula e $16 \pm 13\%$ de plântulas normais aos 60 dias e, aos 120 dias, observou-se a perda total da viabilidade das sementes, não havendo a emergência de plântulas no ambiente (Figura 5A). A queda na germinação foi acompanhada pela diminuição do grau de umidade das sementes e do embrião, observando-se na última avaliação valores de $22,6 \pm 5,2\%$ e $28,2 \pm 2,1\%$ para sementes e embrião, respectivamente (Figura 5B). A taxa de predação das sementes não variou significativamente até os 60 dias porém, aos 120 dias, verificou-se um aumento significativo da predação ($35\% \pm 4\%$). O grau de umidade do solo foi maior no momento da instalação do experimento ($17,4 \pm 0,31\%$ /tempo zero) e após houve uma oscilação nos valores, influenciada pelas variações pluviométricas, apresentando menor valor aos 30 dias ($13,4 \pm 0,06\%$), coincidindo com o período de menor precipitação, início do inverno, quando foi realizada a coleta do solo.

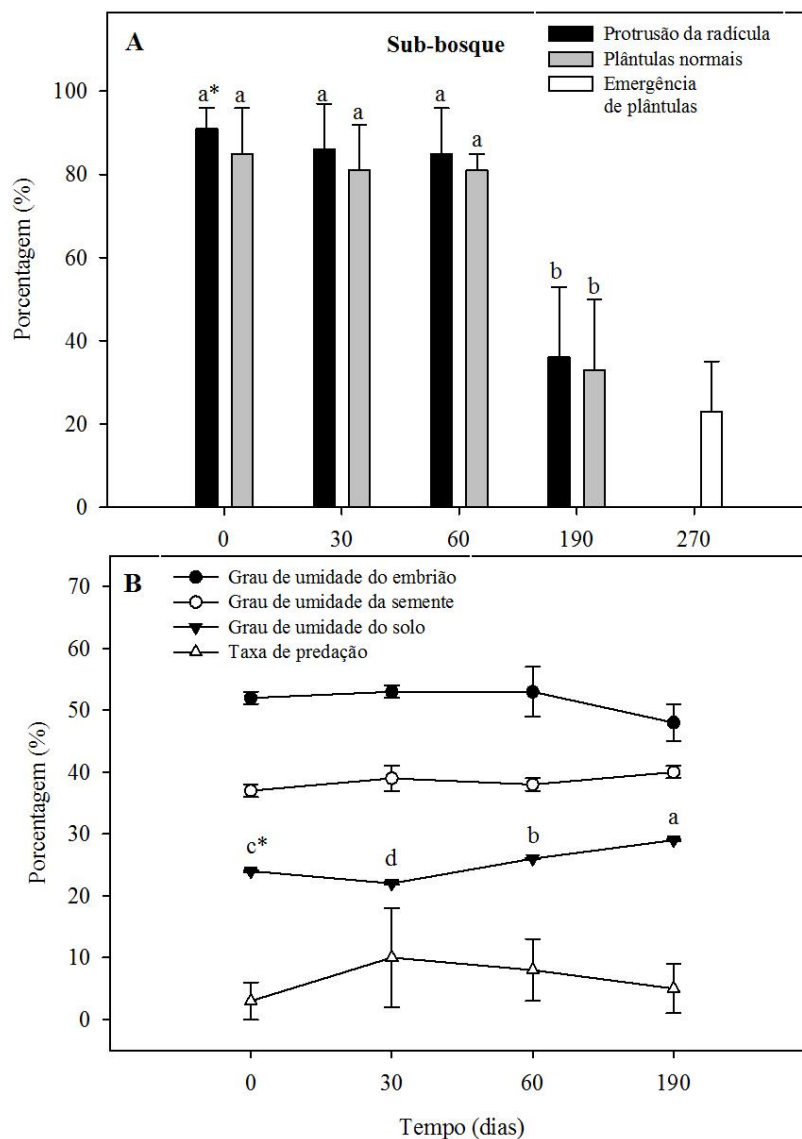


Figura 4 – Comportamento de sementes de *Araucaria angustifolia* em banco de sementes induzido na condição de sub-bosque. (A) Protrusão da radícula, formação de plântulas normais e emergência de plântulas no campo e (B) valores do grau de umidade do embrião, semente, solo e taxa de predação das sementes durante o período experimental de maio de 2014 (tempo zero) a janeiro de 2015 (270 dias). Médias seguidas pela mesma letra em cada avaliação não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão.

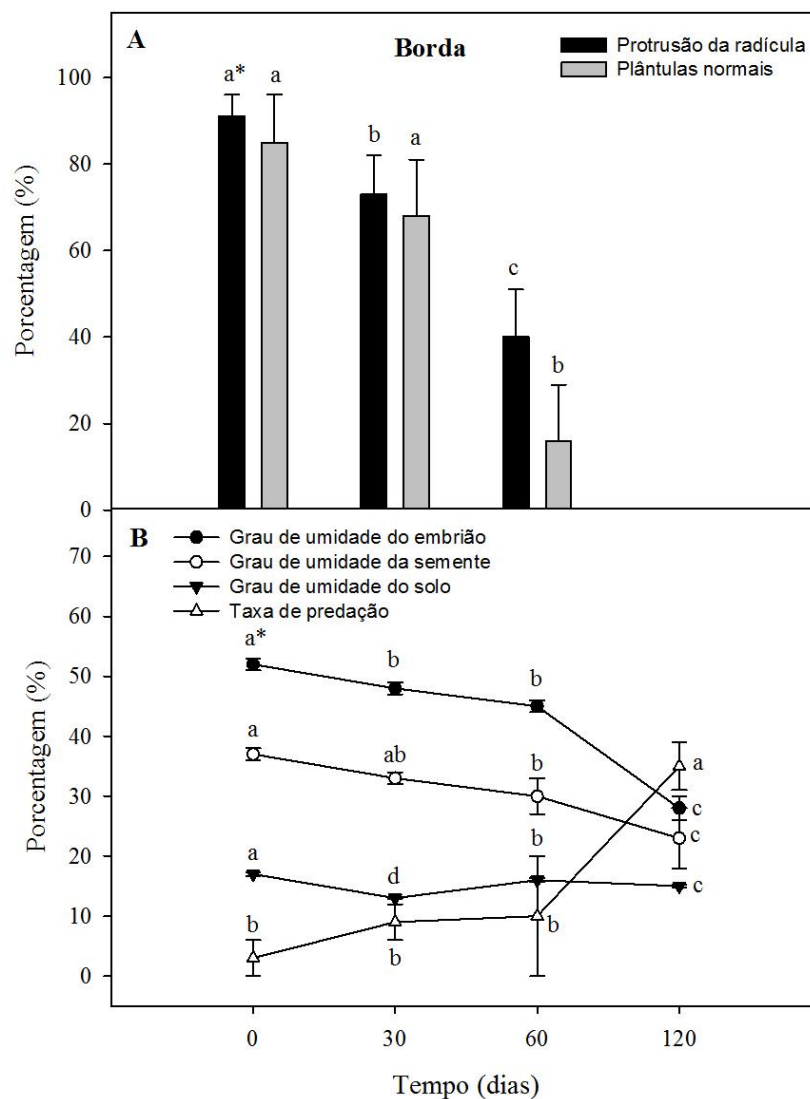


Figura 5 – Comportamento de sementes de *Araucaria angustifolia* em banco de sementes induzido na condição de borda da floresta. (A) Protrusão da radícula e formação de plântulas normais e (B) valores do grau de umidade do embrião, semente, solo e taxa de predação das sementes durante o período experimental de maio (tempo zero) a setembro de 2014 (120 dias). Médias seguidas pela mesma letra em cada avaliação não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão.

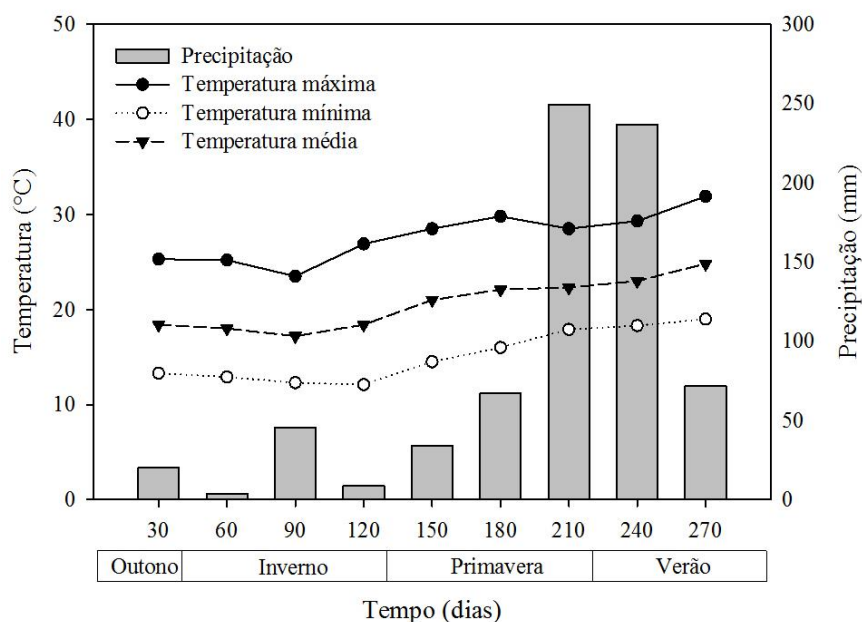


Figura 6 – Dados climáticos da área de estudo obtidos da Estação Climatológica do Departamento de Engenharia (UFLA) durante o período de maio de 2014 (30 dias) até janeiro de 2015 (270 dias).

Discussão

De acordo com os resultados descritos no presente estudo para *A. angustifolia* pode-se constatar que o armazenamento das sementes por longo prazo, utilizando-se técnicas convencionais, não é possível de ser executado, porém a curto prazo, aproximadamente 12 meses, a viabilidade das sementes mantém-se elevada quando acondicionadas em sacos de polietileno selados e armazenadas em condição de câmara fria (5 ± 1 °C/UR 35-40%). Em ambos os lotes, a qualidade das sementes foi mantida por um prazo de um ano, porém a perda total da viabilidade aconteceu de forma antecipada para o Lote RS se comparado com o Lote MG. Apesar das duas regiões de origem das sementes possuírem características climáticas distintas, não foi observado comportamento

diferenciando em relação a capacidade de armazenamento dos lotes avaliados. Na Bacia do Rio Aiuruoca (local de coleta do Lote MG) o clima predominante, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo *Cwa*, com temperatura média anual de 18°C, mínima média de 13°C e máxima média de 21°C, apresentando precipitação média anual de 1.500 mm (Viola et al. 2009). Por outro lado, na região dos Campos de Cima de Serra (local de coleta do Lote RS) o clima é do tipo *Cfb*, com temperatura média anual de 14,5°C, máxima média de 22°C e mínima média de 3°C, apresentando precipitação média anual de 2.500 mm. Essa região é uma das mais úmidas do Estado do RS, sendo frequente a formação de geada e, eventualmente, neve no período de inverno (Moreno, 1961; Nimer, 1990).

Os fatores climáticos podem influenciar na produção de sementes durante o processo de maturação e adaptação das espécies a uma determinada condição ambiental. Sementes recalcitrantes de *Quercus ilex* coletadas em diferentes regiões geográficas apresentaram características fisiológicas similares após a coleta, exceto para a condutividade elétrica, a qual foi maior para o lote de sementes que caracterizou-se pela restrição na disponibilidade hídrica durante sua maturação (Pasquini et al., 2011). Comparando-se os valores de condutividade elétrica no presente estudo, observam-se valores superiores para o Lote MG, tanto para sementes frescas quanto armazenadas, no entanto, a viabilidade foi elevada para ambos os lotes por um período de um ano, conforme o teste de germinação.

A perda da viabilidade das sementes durante o armazenamento tem sido associada a perda da integridade das membranas celulares, associada a um aumento na liberação de lixiviados, conforme constatado em *Moringa oleifera*, na qual observou-se aumento nos valores de condutividade elétrica das sementes ao longo do armazenamento (Fotouo-M et al., 2015). Para *Parapiptadenia rigida*, também foi observado aumento da condutividade elétrica das sementes

durante o armazenamento em câmara fria e ambiente de laboratório, porém foi constante quando armazenadas em geladeira, considerado o melhor ambiente para o armazenamento de sementes dessa espécie (Gasparin et al., 2013). Além disso, a baixa condutividade elétrica tem sido associada a outros parâmetros, como elevados valores na germinação e primeira contagem de sementes de *A. angustifolia* coletadas precocemente (Shibata et al., 2013).

Um aspecto interessante a ser observado no presente estudo é a variação do grau de umidade, tanto da semente como do embrião, durante o armazenamento. Para o Lote MG observa-se que a perda da viabilidade das sementes é acompanhada por uma redução gradual do grau de umidade, sendo que o menor valor registrado (28,5%) está associado a menor germinação. Por outro lado, para o Lote RS, verifica-se um aumento do grau de umidade das sementes ao longo do armazenamento, acompanhado também pela redução da viabilidade, ou seja, um acréscimo de 7,4 pontos percentuais no conteúdo de água das sementes reduziu a germinação em 41%, se comparados os valores inicial e final das avaliações.

Sementes de *A. angustifolia* são classificadas como recalcitrantes, apresentando nível crítico de umidade entre 37 e 38%, e nível letal de umidade próximo de 25% (Eira et al., 1994; Tompsett, 1984). Já o embrião perde totalmente a viabilidade quando desidratado próximo a 43% de umidade (Espindola et al., 1994). No presente estudo, foi observado a perda total da viabilidade do embrião (Lote MG) após 26 meses de armazenamento, pelo teste de tetrazólio, com 48% de umidade. Sementes recalcitrantes são dispersas com elevado conteúdo de água e a secagem a um nível de aproximadamente 20% de umidade resulta na morte por dessecação (Daws et al., 2006). Em um estudo realizado com distintas espécies que produzem sementes recalcitrantes, observou-se que em *A. angustifolia*, a redução de 20 pontos percentuais no conteúdo de água das sementes, após 21 dias de armazenamento em sílica gel,

ocasionou uma deterioração subcelular. Além disso, quando o conteúdo de água foi reduzido para 26 pontos percentuais, observou-se o afastamento da membrana plasmática da parede celular, acompanhada por uma compactação do citoplasma, seguida da perda da viabilidade (Farrant et al., 1989). A redução do conteúdo de água em sementes sensíveis à dessecação está ligada ao declínio da germinação, no entanto, tem sido proposto que as sementes recalcitrantes podem ser desidratadas até certo nível sem que ocorram danos significativos no seu potencial fisiológico (Eggers et al., 2007; Umarani et al., 2015).

O aumento do grau de umidade das sementes durante o armazenamento pode estar associado a um maior nível de respiração das sementes, resultando na elevação do conteúdo de água, conforme constatado para sementes recalcitrantes de *Quercus alba* armazenadas em diferentes tipos de atmosfera (Iakovoglou et al., 2010). Os mesmos autores relatam que baixos níveis de O₂ induzem a fermentação e a consequente perda da viabilidade das sementes, além da influência da condensação do vapor da água durante o armazenamento, que contribui para o aumento do grau de umidade das sementes. O oxigênio pode influenciar a deterioração das sementes por meio de reações oxidativas, sendo que a taxa de respiração em sementes secas é extremamente baixa se comparada com sementes em desenvolvimento ou germinando (Bewley et al., 2013). Walters et al. (2001) observaram que, tanto para sementes sensíveis quanto para as tolerantes à dessecação, a viabilidade permaneceu elevada durante a secagem e armazenamento somente quando pequenas quantidades de oxigênio foram consumidas. Por outro lado, a perda da viabilidade de sementes recalcitrantes de *Idiospermum australiense*, induzidas pela dessecação, foi associada a um aumento de 10 vezes na taxa de CO₂, sendo que as causas desse aumento extraordinário necessitam de maiores investigações (Franks e Drake, 2003).

No presente estudo, as taxas de CO₂ foram quase sempre maiores que as de O₂, sendo que os maiores níveis para ambas foram verificados nas sementes

frescas do Lote RS. Uma elevada taxa de respiração também pode estar associada à presença da microflora. Sugere-se que umas das principais causas da deterioração durante o armazenamento de sementes úmidas de *Avicennia marina* foi a infestação por microrganismos, particularmente fungos (Motete et al., 1997). No armazenamento de sementes de *A. angustifolia* verificou-se uma elevada contaminação por fungos, tanto durante o armazenamento como no teste de germinação, podendo ser este um dos fatores relacionados a uma maior atividade respiratória ao final do armazenamento no caso do Lote RS, contribuindo para a redução da viabilidade das sementes. Fungos de armazenamento podem ocasionar diversos efeitos deletérios nas sementes, como diminuição da viabilidade, descoloração, produção de micotoxinas e produção de calor (Bewley et al., 2013).

Diversos fatores influenciam no potencial de armazenamento de sementes, desde as características genéticas até a interação com outros fatores, como o grau de umidade das sementes, temperatura de armazenamento, presença e injúrias por microrganismos, dormência, reguladores de crescimento e, especialmente, o grau de maturidade das sementes (Barbedo et al., 2013). A criopreservação, ao que tudo indica, parece ser a única forma para a conservação de sementes recalcitrantes a longo prazo, podendo, a curto ou médio prazo serem armazenadas, desde que a condição de armazenamento não permita a perda de água (Berjak e Pammenter, 2013). Sementes de *A. angustifolia* podem ser armazenadas por aproximadamente 12 meses formando um estoque a curto prazo, o qual pode ser utilizado para atender o cronograma de semeadura no viveiro ou demanda fora da época de produção de sementes. O controle da infestação por microrganismos, assim como a predação das sementes por larvas, devem ser controlados visando a obtenção de lotes de sementes com qualidade fisiológica superior, no entanto, métodos eficientes para o controle desses fatores precisam ainda ser melhor investigados.

O banco de sementes induzido de *A. angustifolia* apresentou comportamento diferenciado na condição de sub-bosque e borda da floresta. O grau de umidade das sementes, após a coleta, encontrava-se relativamente mais baixo (37,5%) se comparado com as sementes coletadas no ano anterior (40,1%), utilizadas no experimento de armazenamento. No entanto, o conteúdo de água das sementes após a dispersão estava no intervalo do nível crítico de umidade, considerado por Eira et al. (1994) e Tompsett et al. (1984), entre 37 e 38%. Em outro estudo realizado com *A. angustifolia* constatou-se que a secagem até 34% do conteúdo de água não foi prejudicial na viabilidade das sementes, porém uma secagem mais drástica, próximo de 23%, ocasionou a perda total da viabilidade (Gasparin et al., 2016 *no prelo*).

A viabilidade de sementes de araucária na condição de sub-bosque manteve-se por um período de aproximadamente 270 dias, com a consequente emergência de plântulas. No entanto, no ambiente de borda da floresta a viabilidade das sementes foi perdida aos 120 dias. De acordo com Thompson e Grime (1979) o banco de sementes do solo pode ser classificado como transitório (efêmero), uma vez que as sementes permanecem viáveis no solo por menos de um ano, enquanto no banco de sementes persistente, uma proporção significativa de sementes sobrevive por mais de um ano. Os mesmos autores descrevem que no banco de sementes transitório as sementes são dispersas com algum tipo de dormência, superada pela alternância de temperaturas. Por outro lado, Gardwood (1989) relata que esse tipo de banco é composto por sementes de curta longevidade, não dormentes, dispersas em um curto período do ano e geralmente está associado à formação de um banco de plântulas. Walck et al. (2005) propõem que a classificação deve levar em consideração ciclos de dormência e padrões de germinação, sugerindo que no banco transitório as sementes devem permanecer viáveis até a segunda estação de germinação (ex., 16-18 meses após a dispersão). De acordo com a literatura, sementes de *A.*

angustifolia formam um banco de sementes transitório em ambiente de sub-bosque.

No presente estudo, o banco de sementes induzido foi instalado em dois ambientes durante o período de dispersão das sementes, final do outono, coincidindo com a época de menor precipitação. Na condição de sub-bosque, as sementes permaneceram com elevada taxa de viabilidade por até 60 dias, não germinando no campo durante esse período, enquanto que, na condição de borda, esse mesmo comportamento foi mantido somente por somente 30 dias. A perda da viabilidade das sementes no ambiente de borda está associada a uma redução inicial significativa do grau de umidade do solo, coincidindo com o período de menor precipitação, e uma expressiva redução do grau de umidade, tanto da semente como do embrião, atingindo aos 120 dias, valores abaixo do grau de umidade letal, considerado próximo de 25% para semente e de 43% para o embrião (Eira et al., 1994; Espindola et al., 1994; Tompsett, 1984). Em outro estudo avaliando taxas de secagem em sementes de araucária verificou-se que a perda total da viabilidade ocorreu quando as sementes e os embriões atingiram valores próximo de 23 e 33% de grau de umidade, respectivamente (Gasparin et al., 2016 *no prelo*). Outros estudos também constataram que a redução do grau de umidade do solo está associada com a diminuição da germinação de sementes, conforme foi observado para *Quercus rubra* (García et al., 2002). No entanto, neste mesmo trabalho a germinação foi positivamente influenciada pela ausência da serapilheira, a qual inibe a emergência das plântulas.

Para *A. angustifolia*, o ambiente de sub-bosque favoreceu a manutenção da viabilidade e a emergência de plântulas, apesar de ter sido baixa. Isso é um indicativo da importância da presença da vegetação e, conseqüentemente, a formação de um microclima favorável ao estabelecimento de um banco sementes, ainda que transitório, para a espécie. O início da germinação e a formação de plântulas nesse ambiente coincide com o período de maior

precipitação (final da primavera e início do verão) além da elevação da temperatura média mensal. A maior disponibilidade hídrica também está associada à elevação do grau de umidade do solo, no entanto, a presença da vegetação parece ter exercido um papel fundamental na manutenção do grau de umidade das sementes, o qual sempre permaneceu acima do nível crítico ao longo do tempo e, diante de condições ambientais favoráveis, ocorreu o estabelecimento das plântulas. Existem diversas evidências que demonstram a influência da umidade do solo e das condições climáticas na viabilidade das sementes no solo (Fenner e Thompson, 2005). Algumas espécies em florestas tropicais úmidas produzem sementes em períodos desfavoráveis, ocasionando atraso à germinação, no entanto, com o surgimento de condições ambientais específicas, como temperatura e luz, a germinação e o desenvolvimento de plântulas são favorecidos (Vazquez-Yanes e Orozco-Segovia, 1993).

Estudo realizado na mesma região do presente trabalho, com sementes sensíveis à dessecação de *Cryptocaria aschersoniana* (Lauraceae), demonstrou que a formação de um banco sementes transitório está relacionada ao estado de conservação do habitat natural da espécie (Tonetti et al., 2015). Os autores observaram que o pico de germinação no ambiente natural iniciou-se aos 210 após a instalação do experimento, coincidindo com o início da estação chuvosa, atingindo valores superiores a 80% ao final do experimento, enquanto que no ambiente perturbado, 90% das sementes estavam inviáveis aos 240 dias de avaliação. Comportamento similar foi observado no presente estudo, havendo o efeito negativo de áreas antropizadas no estabelecimento de espécies que produzem sementes intolerantes à dessecação. O efeito da fragmentação florestal também foi desfavorável na germinação de sementes de *Heliconia acuminata* (espécie da Amazônia), quando comparada com o ambiente de floresta contínua, no qual a proporção de sementes germinadas foi de três a sete vezes maior, provavelmente, devido ao efeito de borda no ambiente alterado (Bruna, 1999).

Diversos estudos relatam a ausência da *A. angustifolia* no banco de sementes do solo, realizado por meio da coleta do solo em ambientes com ocorrência natural da espécie, podendo ser ocasionada pela característica recalcitrante de suas sementes e devido à pressão tanto da fauna como do homem sobre as mesmas (Avila et al., 2011; Souza et al., 2011). Em alguns casos, apesar da araucária dominar o estrato superior da floresta, não apresenta indivíduos na regeneração natural (Caldato et al., 1996). Considerando-se as características autoecológicas da espécie, verifica-se que a melhor estratégia de regeneração para a araucária é por meio da chuva de sementes associada ao banco de plântulas, sendo a espécie heliófila, a presença de luminosidade é fundamental para que a regeneração ocorra (Avila et al., 2013, 2011). A sensibilidade à dessecação e a curta longevidade das sementes recalcitrantes implicam diretamente na regeneração natural, não havendo a formação de um banco de sementes do solo a longo prazo, mas sim a germinação e formação de banco de plântulas (Pammenter e Berjak, 2000).

No presente estudo, constatou-se que sementes de *A. angustifolia* têm potencial para a formação de um banco de sementes transitório, porém o isolamento do fator predação parece ser fundamental para o sucesso do mesmo, aliado a condições climáticas e ambientais favoráveis. Nesse estudo, o uso da gaiola metálica foi primordial na proteção das sementes, pois em experimento semelhante instalado no ano anterior, sem proteção, todas as sementes foram predadas por roedores após 30 dias (dados não apresentados). A taxa de predação de sementes de araucária parece também estar associada ao nível de conservação do ambiente, já que no ambiente de borda da floresta os valores de predação foram maiores se comparados com o sub-bosque, principalmente pela infestação por larvas. Por outro lado, em floresta tropical seca, a predação de frutos e sementes de *Ceiba aesculifolia* foi significativamente reduzida em ambiente de floresta fragmentada se comparada com a floresta contínua,

resultando na menor germinação de sementes (Herrerías-Diego et al., 2008). A fauna silvestre, além de promover a predação das sementes, pode contribuir para sua dispersão e estabelecimento das espécies no ambiente. No caso da *A. angustifolia*, a gralha azul (*Cyanocorax caeruleus*) desempenha um papel fundamental na dispersão, enterrando as sementes em um determinado local com o intuito de esconder seu alimento dos predadores, ocasionando, em muitos casos, a germinação das sementes no ambiente (Mattos, 2011).

A sobrevivência de sementes em áreas de florestas tropicais úmidas é considerada uma das mais curtas diante das demais comunidades vegetais, em decorrência de sua rápida germinação após a dispersão, favorecida pela alta umidade do solo e temperaturas elevadas, as quais também favorecem maior atividade de predadores e parasitas (Vazquez-Yanes e Orozco-Segovia, 1993). Um dos fatores cruciais para formação de um banco de sementes persistente no solo é a presença das sementes nas camadas mais profundas do solo, caso contrário, com as sementes na superfície, pode ocorrer a germinação ou predação das mesmas (Fenner e Thompson, 2005).

Em ambientes florestais onde se verifica baixa produção de sementes associada à predação e a curta longevidade, a regeneração das espécies arbóreas pode ser limitada. Para amenizar este problema, a vegetação precisa ser conservada e manejada de forma sustentável, podendo-se realizar semeaduras adicionais, proteção das plântulas e até mesmo o plantio de mudas, excluídos os fatores de degradação, a fim de aumentar o sucesso de regeneração das espécies (Wassie et al., 2010).

No presente estudo fica demonstrado que o armazenamento de sementes de *A. angustifolia* só é possível por curto período de tempo sob condições de refrigeração (aproximadamente 12 meses) e que a procedência das sementes não afetou o potencial de armazenamento, apesar das distintas características climáticas das regiões consideradas. Além disso, a manutenção da cobertura

florestal, principalmente o sub-bosque, mostrou ser fundamental para a regeneração e conservação da araucária por meio do banco de sementes, pois a condição de borda é desfavorável para a regeneração da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor. Ao IBAMA, pela autorização para a coleta das sementes nos diferentes locais (Licença No 34243-3). À FLONA de São Francisco de Paulo/RS pelo auxílio na coleta das sementes do Lote RS e ao José C. Martins e José P. de Oliveira pelo auxílio na coleta do Lote MG.

Referências

- Abreu, D.C.A., Medeiros, A.C. de S., Aguiar, I.B., Banzatto, D.A., 2012. Teste topográfico de tetrazólio em sementes de pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), in: 4º Congresso Florestal Paranaense. Curitiba.
- Avila, A.L., Araujo, M.M., Gasparin, E., Longhi, S.J., 2013. Mecanismos de regeneração natural em remanescente de Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil. *Cerne* 19, 621–628.
- Avila, A.L., Araujo, M.M., Longhi, S.J., Gasparin, E., 2011. Agrupamentos florísticos na regeneração natural em remanescente de Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil. *Sci. For.* 39, 331–342.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C., 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Sci. Agric.* 55, 121–125.
- Barbedo, C.J., Centeno, D.D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.D.C.L., 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40, 583–595.
- Beardmore, T., Whittle, C.A., 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. *Tree Physiol.* 25, 965–972.
- Berjak, P., Pammenter, N., 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12, 22–25.
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Front. Plant Sci.* 4, 478.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W., Nonogaki, H., 2013. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*, 3rd ed. Springer, New York.

- Bonjovani, M.R., Barbedo, C.J., 2014. Induction of tolerance to desiccation and to subzero temperatures in embryos of recalcitrant seeds of inga. *J. Seed Sci.* 36, 419–426.
- Bonjovani, M.R., Barbedo, C.J., 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. *Rev. Bras. Botânica* 31, 345–356.
- Bruna, E.M., 1999. Seed germination in rainforest fragments. *Nature* 402, 139.
- Caldato, S.L., Floss, P.A., Croce, D.M. Da, Longhi, S.J., 1996. Estudo da regeneração natural, banco de sementes e chuva de sementes na Reserva Genética Florestal de Caçador, SC. *Ciência Florest.* 6, 27–38.
- Carvalho, P.E.R., 2002. Pinheiro-do-paraná. *Circ. Técnica Embrapa* 60, 1–17.
- Daws, M.I., Garwood, N.C., Pritchard, H.W., 2006. Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: a probabilistic model based on two seed traits and 104 species. *Ann. Bot.* 97, 667–74.
- Eggers, S., Erdey, D., Pammenter, N.W., Berjak, P., 2007. Storage and germination response of recalcitrant seeds subjected to mild dehydration, in: Adkins, S.W., Ashmore, S.E., Navie, S. (Eds.), *Seeds: Biology, Development and Ecology*. CAB International, London, pp. 85–92.
- Eira, M.T.S. Da, Salomão, A.N., Cunha, R. Da, Carrara, D.K., Mello, C.M.C. De, 1994. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE - Araucariaceae. *Rev. Bras. Sementes* 16, 71–75.
- Espindola, L.S., Noin, M., Corbineau, F., Côme, D., 1994. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Sci. Res.* 4, 193–201.

- Faria, J.M.R., Davide, L.C., Da Silva, E. a a, Davide, A.C., Pereira, R.C., Van Lammeren, A. a M., Hilhorst, H.W.M., 2006. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *affinis* embryos during storage. *Brazilian J. Plant Physiol.* 18, 503–513.
- Farrant, J.M., Pammenter, N.W., Berjak, P., 1989. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. *Planta* 178, 189–198.
- Fenner, M., Thompson, K., 2005. *The ecology of seeds*. Cambridge University Press, New York, USA.
- Ferreira, D.F., 2008. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. *Rev. Symp.* 6, 36–41.
- Fotouo-M, H., du Toit, E.S., Robbertse, P.J., 2015. Germination and ultrastructural studies of seeds produced by a fast-growing, drought-resistant tree: implications for its domestication and seed storage. *AoB Plants* 7, plv016.
- Franks, P.J., Drake, P.L., 2003. Desiccation-induced loss of seed viability is associated with a 10-fold increase in CO₂ evolution in seeds of the rare tropical rainforest tree *Idiospermum australiense*. *New Phytol.* 159, 253–261.
- García, D., Bañuelos, M.-J., Houle, G., 2002. Differential effects of acorn burial and litter cover on *Quercus rubra* recruitment at the limit of its range in eastern North America. *Can. J. Bot.* 80, 1115–1120.
- Gardwood, N.C., 1989. Tropical soil seed banks: a review, in: Leck, M., Parker, V., Simpson, R. (Eds.), *Ecology of Soil Seed Banks*. Academic Press, San Diego, pp. 149–209.
- Gasparin, E., Araujo, M.M., Tolfo, C.V., Foltz, D.R.B., Magistrali, P.R., 2013. Substrates for germination and physiological quality of storage seeds of *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *J. Seed Sci.* 35, 77–85.

- Guerra, M.P., Silveira, V., Dos Santos, A.L.W., Astarita, L. V., Nodari, R.O., 2000. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze, in: Jain, S.M., Gupta, P.K., Newton, R.J. (Eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 457–578.
- Herrerías-Diego, Y., Quesada, M., Stoner, K.E., Lobo, J.A., Hernández-Flores, Y., Sanchez Montoya, G., 2008. Effect of forest fragmentation on fruit and seed predation of the tropical dry forest tree *Ceiba aesculifolia*. *Biol. Conserv.* 141, 241–248.
- Iakovoglou, V., Misra, M.K., Hall, R.B., Knapp, A.D., 2010. Alterations of seed variables under storage in nitrous oxide (N₂O) atmospheres for two recalcitrant *Quercus* species. *Scand. J. For. Res.* 25, 24–30.
- ISTA, 1996. International rules for seed testing. *Seed Science Technol.* 24, 48–52.
- IUCN, 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4 [WWW Document]. URL www.iucnredlist.org (accessed 3.18.16).
- Leite, P.F., 2002. Contribuição ao conhecimento fitoecológico do Sul do Brasil. *Ciência Ambient.* 1, 51–73.
- Long, R.L., Gorecki, M.J., Renton, M., Scott, J.K., Colville, L., Goggin, D.E., Commander, L.E., Westcott, D.A., Cherry, H., Finch-savage, W.E., 2015. The ecophysiology of seed persistence : a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biol. Rev.* 90, 31–59.
- Mattos, J.R., 2011. O pinheiro brasileiro. Editora da UFSC, Florianópolis.
- Moreira-Souza, M., Cardoso, E.J.B.N., 2003. Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. seeds. *Sci. Agric.* 60, 389–391.
- Moreno, J.A., 1961. Clima do Rio Grande do Sul. Secretaria da Agricultura, Porto Alegre.

- Motete, N., Pammenter, N.W., Berjak, P., Frédéric, J.C., 1997. Response of the recalcitrant seeds of *Avicennia marina* to hydrated storage: events occurring at the root primordia. *Seed Sci. Res.* 7, 169–178.
- Nimer, E., 1990. Geografia do Brasil: Região Sul, in: IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística. IBGE, Rio de Janeiro, pp. 51–187.
- Oliveira-Filho, A., Fontes, M.A.L., 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32, 793–810.
- Pammenter, N.W., Berjak, P., 2000. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology N.W. *Seed Sci. Res.* 10, 301–306.
- Pasquini, S., Braidot, E., Petrusa, E., Vianello, A., 2011. Effect of different storage conditions in recalcitrant seeds of holm oak (*Quercus ilex* L.) during germination. *Seed Science Technol.* 39, 165–177.
- Probert, R.J., Daws, M.I., Hay, F.R., 2009. Ecological correlates of ex situ seed longevity: A comparative study on 195 species. *Ann. Bot.* 104, 57–69.
- Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T., Poschlod, P., 2009. The seed bank longevity index revisited: limited reliability evident from a burial experiment and database analyses. *Ann. Bot.* 104, 715–724.
- Saatkamp, A., Poschlod, P., Venable, D.L., 2014. The functional role of soil seed banks in natural communities, in: Gallagher, R.S. (Ed.), *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 263–295.
- Shibata, M., Coelho, C.M.M., Steiner, N., 2013. Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at different stages of development. *Seed Sci. Technol.* 41, 214–224.
- Soriano, D., Huante, P., Gamboa-deBuen, A., Orozco-Segovia, A., 2014. Effects of burial and storage on germination and seed reserves of 18 tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. *Oecologia* 174, 33–44.

- Souza, M.L., Nogueira, A.C., Macedo, R.L.G., Sanquetta, C.R., Venturin, N., 2011. Estudos de um banco de sementes no solo de um fragmento florestal com *Araucaria angustifolia* no estado do Paraná. *Floresta* 41, 335–346.
- Thompson, K., 2000. The functional ecology of soil seeds banks, in: Fenner, M. (Ed.), *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 215–235.
- Thompson, K., Grime, J.P., 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *J. Ecol.* 67, 893–921.
- Thompson, K.E.N., Bakker, J. a N.P., Hodgson, J.G., 1998. Ecological correlates of seed persistence in soil in the north-west European flora. *J. Ecol.* 86, 163–169.
- Thys, R.C.S., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Aires, A.G., Cladera-Olivera, F., 2010. Adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch and thermodynamic analysis. *J. Food Eng.* 100, 468–473.
- Tompsett, P.B., 1984. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. *Ann. Appl. Biol.* 105, 581–586.
- Tompsett, P.B., 1982. The effect of desiccation on the longevity of seeds of *Araucaria hunsteinii* and *A. cunninghamii*. *Ann. Bot.* 50, 693–704.
- Tonetti, O. a. O., Faria, J.M.R., José, A.C., Oliveira, T.G.S., Martins, J.C., 2015. Seed survival of the tropical tree *Cryptocarya aschersoniana* (Lauraceae): Consequences of habitat disturbance. *Austral Ecol.* n/a–n/a.
- Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91, 294–304.
- Umarani, R., Aadhavan, E.K., Faisal, M.M., 2015. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. *Curr. Sci.* 108, 2023–2034.
- Vazquez-Yanes, C., Orozco-Segovia, a, 1993. Patterns of seed longevity and germination in the Tropical Rainforest. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24, 69–87.

- Viola, M.R., Mello, C.R., Acerbi Jr, F.W., Silva, A.M., 2009. Modelagem hidrológica na bacia hidrográfica do Rio Aiuruoca, MG. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 13, 581–590.
- Walck, J.L., Baskin, J.M., Baskin, C.C., Hidayati, S.N., 2005. Defining transient and persistent seed banks in species with pronounced seasonal dormancy and germination patterns. *Seed Sci. Res.* 15, 189–196.
- 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., Pammenter, N.W., Berjak, P., Crane, J., 2001. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. *Seed Sci. Res.* 11, 135–148.
- Wassie, A., Bekele, T., Sterck, F., Teketay, D., Bongers, F., 2010. Postdispersal seed predation and seed viability in forest soils: Implications for the regeneration of tree species in Ethiopian church forests. *Afr. J. Ecol.* 48, 461–471.
- Wendling, I., Delgado, M.E., 2008. Produção de mudas de araucária em tubetes. *Comun. Técnico Embrapa* 201, 1–18.