

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Bruno Guilherme Gonçalves

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E CITOLÓGICAS EM RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO EM
EMBRIÕES DE *Butia capitata* (ARECACEAE)**

Montes Claros

2019

Bruno Guilherme Gonçalves

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E CITOLÓGICAS EM RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO
EM EMBRIÕES DE *Butia capitata* (ARECACEAE)**

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

Orientador: Leonardo Monteiro Ribeiro

Coorientadores: Hellen Cássia Mazzottini dos Santos e Paulo Sérgio Nascimento Lopes

Montes Claros
Fevereiro de 2019

G635a
2019

Gonçalves, Bruno Guilherme.

Alterações fisiológicas e citológicas em resposta ao estresse hídrico em embriões de *Burra capitata* (Arecaceae) / Bruno Guilherme Gonçalves. Montes Claros, 2019.

51 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Leonardo Monteiro Ribeiro.

Banca examinadora: Clívia Carolina Fiorilo Possobom, Delacyr da Silva Brandão Júnior, Geraldo Aclécio Melo, Túlio Gabriel Soares Oliveira, Leonardo Monteiro Ribeiro.

Inclui referências.

1. Água -- análise. 2. Bancos de sementes. 3. Palmeira. I. Ribeiro, Leonardo Monteiro. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 631.53

Bruno Guilherme Gonçalves

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E CITOLÓGICAS EM RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO
EM EMBRIÕES DE *Butia capitata* (ARECACEAE)

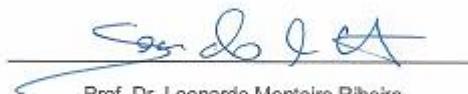
Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr^a. Clivia Carolina Fiorilo Possobom
UFMG

Prof. Dr. Delacyr da Silva Brandão Junior
UFMG

Prof. Dr. Geraldo Aclécio Melo
UNIMONTES

Dr. Túlio Gabriel Soares Oliveira



Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro
(Orientador)
UFMG

Montes Claros, 28 de fevereiro de 2019.

Dedico esse trabalho aos professores Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro, Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes e colaboradores, que se empenham na investigação científica de espécies vegetais dos biomas Cerrado, visando agregar conhecimento para contribuir no seu manejo e conservação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças para superar os desafios e conseguir alcançar meus objetivos;

Aos meus pais, Juscelino e Maria Aparecida; aos meus avós Samuel e Tereza; às minhas irmãs Letícia, Kele e ao meu irmão Luis Felipe; às minhas tias Marli e Marilda e demais familiares que sempre apoiaram as minhas decisões, me incentivaram e por mim rezaram;

Ao meu orientador, o professor Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro, por não desistir de mim, que acreditou na minha capacidade e, durante esses dois anos, me instruiu com sabedoria e paciência;

À minha co-orientadora, a professora Dra. Hellen Cássia Mazzottini dos Santos pelo empenho e orientação nos estudos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais; ao meu co-orientador professor Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes pelos ensinamentos, apoio e auxílio na obtenção das sementes de coquinho-azedo;

À professora Dra. Maria Olívia Mercadante-Simões, pelo constante incentivo e contribuição na Microscopia Eletrônica de Transmissão; ao professor Dr. Charles Martins pela contribuição com os conhecimentos de termodinâmica na etapa inicial do trabalho;

Aos meus professores, com os quais tive a oportunidade de ser aluno neste curso de mestrado, além daqueles que acompanharam minha trajetória acadêmica desde o jardim de infância até a universidade, pelo conhecimento compartilhado;

Aos professores que compõem a banca, pelas suas valiosas contribuições para aumentar a qualidade do trabalho;

Aos estagiários e ex-estagiários do Laboratório de Micropropagação (Anne Caroline, Guilherme, Higor, Joyce Nascimento, Ludimila, Rafael, Thainara) e aos estagiários do Laboratório de Anatomia Vegetal (Alessandra, Ana Íris, Karine, Maria Gabriela e Wanessa), além de Maria Luíza, que muito me auxiliaram na realização dos experimentos; especialmente a Sara, Natália Araújo (*in memoriam*) e Joyce Natalícia;

À amizade de Valéria e Kátia pelos momentos de descontração, Aldenir, pelas horas de estudo na biblioteca e Cleide, companheira de RU;

À Dr^a. Daiane Dias, à Joyce Nascimento e à Josiane Cordeiro, pela análise das enzimas, especialmente à Dr^a. Daiane Dias que também contribuiu na escrita da dissertação. À Dr^a. Cristina Martins pelas análises do ABA. Ao professor Dr. Flaviano, que disponibilizou os laboratórios de química para realização de análises de lixiviação e de ABA, além das funcionárias Érica e Anne. Ao Márcio, do laboratório de análise de resíduos para aproveitamento agrícola pela concessão de reagente para realização de análises;

Ao laboratório de propagação de plantas frutíferas e ao grupo de estudo em frutíferas exóticas e nativas (GEFEN) e ao laboratório de sementes, pelo apoio fornecido. Ao Centro de Microscopia da UFMG pelas análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão;

Ao Aldair e ao CAA pela disponibilização dos frutos de coquinho-azedo, insumo fundamental para a condução dos experimentos;

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Ciências Agrárias, ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de realizar mais um sonho; à secretaria da pós-graduação, pela orientação e ao colegiado de pós-graduação por compreender as dificuldades enfrentadas por meio da renovação da bolsa de estudos;

À CAPES pela concessão de bolsa. Ao PROAPE pelo auxílio financeiro concedido;

À Universidade Estadual de Montes Claros pelo acolhimento;

À bibliotecária Rachel Carvalho pelo auxílio na formatação desta dissertação;

Enfim, a todos vocês que fazem parte da minha história.

Muito obrigado!

“Tudo posso naquele que me fortalece”.

(Fl 4,13)

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E CITOLÓGICAS EM RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO EM EMBRIÕES DE *Butia capitata* (ARECACEAE)

RESUMO

Butia capitata, popularmente conhecida por coquinho-azedo, é uma palmeira de ocorrência no bioma Cerrado. Seus frutos são empregados na fabricação de sucos, sorvetes, licores e cerveja, além de fonte de alimento para a fauna nativa. Sua exuberância lhe confere potencial para uso em projetos paisagísticos. Por ser uma espécie que tolera a dessecação, pode formar bancos de sementes no solo. No entanto, as chuvas irregulares e a ocorrência de queimadas no seu hábitat podem submeter as sementes ao estresse hídrico severo, e assim prejudicar sua germinação e estabelecimento das plântulas. O ajuste do metabolismo dos embriões aos ciclos de hidratação e secagem é crucial para a persistência dos bancos de sementes. O objetivo desse trabalho foi avaliar aspectos fisiológicos e citológicos em embriões de *B. capitata*, palmeira adaptada a ambientes semiáridos, sob estresse hídrico induzido osmoticamente. A variação da massa, o potencial hídrico, a viabilidade e o vigor dos embriões desidratados ou hidratados foram mensurados, após imersão em soluções osmóticas com diferentes potenciais hídricos (ψ) (0; -2; -4; -6; -8 e -10 MPa para embriões desidratados e 0; -0,5; -1; -2; -3 e -4 MPa para embriões hidratados) nos tempos 0, 12, 24 e 36 horas (variação da massa e ψ) e no tempo 12 horas (viabilidade e vigor). Com base nos resultados, foram selecionados ψ que simularam condição não estressante (0 MPa), estresse hídrico moderado (-1 e -2 MPa) e estresse hídrico severo (-2 e -4 MPa). Nestas condições, foram avaliados indicadores do estresse oxidativo (H_2O_2 , O_2^- , MDA e atividade CAT, SOD e APX), funcionalidade das membranas (condutividade elétrica e lixiviação de íons K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}) e quantificação do ABA. A ultraestrutura de embriões desidratados e embriões hidratados e submetidos aos $\psi = 0, -1$ e -2 MPa foi avaliada. Os embriões desidratados (-8,5 MPa) apresentam elevada tolerância ao estresse hídrico, o que está relacionado à abundância de reservas lipídicas e proteicas, atividade SOD e alto conteúdo de ABA. Os embriões toleram hidratação rápida e a hidratação faz $\psi = -0,2$ MPa. Embriões hidratados também apresentam elevada tolerância ao estresse hídrico, o que está relacionado ao controle do estresse oxidativo e aumento do conteúdo de ABA. A perda da viabilidade, sob estresse hídrico severo, ocorre associada ao bloqueio da mobilização protéica, perda da funcionalidade das membranas e desestruturação celular. A resistência dos embriões ao estresse hídrico favorece a manutenção de bancos de sementes de *B. capitata* em ambientes com clima sazonal do bioma Cerrado.

Palavras-chave: Déficit hídrico. Banco de sementes. Palmeiras. Estresse oxidativo. ABA. H_2O_2 . MDA.

PHYSIOLOGICAL AND CYTOLOGICAL CHANGES IN RESPONSE TO WATER STRESS IN EMBRYOS OF *Butia capitata* (ARECACEAE)

ABSTRACT

Butia capitata, popularly known as coquinho-azedo, is a palm tree that occurs in the Cerrado biome. Its fruits are used in the manufacture of juices, ice cream, liqueurs and beer, as well as a source of food for the native fauna. Its exuberance gives it potential for use in landscape projects. Because it is a species that tolerates desiccation, it can form seed banks in the soil. However, irregular rains and the occurrence of fires in their habitat may subject the seeds to severe water stress, and thus impair their germination and establishment of the seedlings. Adjustment of embryo metabolism to hydration and drying cycles is crucial for the persistence of seed banks. The objective of this work was to evaluate physiological and cytological aspects in embryos of *B. capitata*, palm adapted to semi-arid environments, under osmotically induced water stress. The variation of the mass, water potential, viability and vigor of dehydrated or hydrated embryos were measured after immersion in osmotic solutions with different water potentials (ψ) (0; -2; -4; -6; -8 and -10 MPa for dehydrated embryos and 0; -0.5; -1; -2; -3 and -4 MPa for hydrated embryos) at times 0, 12, 24 and 36 hours (change in mass and ψ) and at time 12 hours (viability and vigor). Based on the results, ψ that simulated a non-stressing condition (0 MPa), moderate water stress (-1 and -2 MPa) and severe water stress (-2 and -4 MPa) were selected. Under these conditions, oxidative stress (H_2O_2 , O_2^- , MDA and CAT, SOD and APX), membrane functionality (electrical conductivity and leaching of K^+ ions, Mg^{2+} and Ca^{2+}) and ABA quantification were evaluated. The ultrastructure of dehydrated embryos and hydrated embryos submitted to $\psi = 0$, -1 and -2 MPa was evaluated. Dehydrated embryos (-8.5 MPa) present high tolerance to water stress, which is related to the abundance of lipid and protein reserves, SOD activity and high ABA content. Embryos tolerate rapid hydration and hydration does $\psi = -0.2$ MPa. Hydrated embryos also present high tolerance to water stress, which is related to the control of oxidative stress and increase of ABA content. Loss of viability, under severe water stress, is associated with blockade of protein mobilization, loss of membrane functionality and cellular destruction. The resistance of the embryos to water stress favors the maintenance of seed banks of *B. capitata* in environments with a seasonal climate of the Cerrado biome.

Keywords: Water deficit. Seed bank. Palm trees. Oxidative stress. ABA. H_2O_2 . MDA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Massa seca de embriões (A) e teor de água em base seca de sementes e embriões (B) de *Butia capitata* nas condições desidratada (sementes com teor de água de 5,4% em base fresca) ou hidratada (sementes com teor de água de 25,6% em base fresca). Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0.05$). As barras representam o erro padrão da média 29
- Figura 2 – Variação do teor de água dos embriões (mg H₂O mg⁻¹ MS) e do ψ (MPa) de embriões de *Butia capitata* desidratados (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou hidratados (1,84 g H₂O g⁻¹ MS), submetidos à imersão em soluções com diferentes potenciais hídricos, ao longo de 36h. Os números à frente das curvas indicam os ψ (MPa) utilizados como tratamentos. Os valores dentro dos quadros cinzas indicam os ψ nos respectivos tempos. Em vermelho estão indicadas as reduções na capacidade hídrica (capacidade de absorver ou reter água) nos tratamentos que foram selecionados para as avaliações fisiológicas e ultraestruturais 30
- Figura 3 – Percentuais de embriões de *Butia capitata* viáveis (A) e vigorosos (B) submetidos, nas condições desidratada (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou hidratada (1,84 g H₂O g⁻¹ MS), submetidos a diferentes ψ , durante 12 h, avaliados pelo teste de tetrazólio. Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média 31
- Figura 4 – Imagens de embriões de *Butia capitata* submetidos à diferentes ψ nas condições hidratada (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou desidratada (1,84 g H₂O g⁻¹ MS), corados com NBT para a histolocalização de O₂⁻ (identificado pela cor púrpura). As linhas em vermelho indicam as comparações relacionadas aos processos avaliados. pc: pecíolo cotiledonar; ha: hautório 32
- Figura 5 – Concentrações de H₂O₂ (A) e MDA (B) em embriões de *Butia capitata* submetidos a diferentes ψ nas condições hidratada (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou desidratada (1,84 g H₂O g⁻¹ MS). As linhas em vermelho indicam as comparações relacionadas aos processos avaliados, sendo, hr: hidratação rápida; hl: hidratação lenta; es: estresse hídrico. Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0.05$). As barras representam o erro padrão da média 34
- Figura 6 – Concentração de ABA (ng g⁻¹ MF) em embriões de *Butia capitata* submetidos a diferentes ψ nas condições hidratada (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou desidratada (1,84 g H₂O g⁻¹ MS). As linhas em vermelho indicam as comparações relacionadas aos processos avaliados, sendo, hr: hidratação rápida; hl: hidratação lenta; es: estresse hídrico. Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0.05$). As barras representam o erro padrão da média 35
- Figura 7 – Condutividade elétrica (A) e lixiviação de íons K⁺ (B) e Mg²⁺ (C) avaliados em embriões de *Butia capitata* submetidos à diferentes ψ nas condições hidratada (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou desidratada (1,84 g H₂O g⁻¹ MS). As linhas em vermelho indicam as comparações relacionadas aos processos avaliados, sendo, hr: hidratação rápida; hl: hidratação lenta; es: estresse hídrico. Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0.05$). As barras representam o erro padrão da média. 37
- Figura 8 – Imagens obtidas por MET da protoderme do pecíolo cotiledonar de embriões de *Butia capitata* desidratados (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) (A-B) ou hidratados (1,84 g H₂O g⁻¹ MS) e submetidos à diferentes ψ (indicados na coluna à esquerda) (C-H). A, B) Célula com parede delgada; citoplasma denso, rico em organelas, contendo pequenos vacúolos proteicos. C, D) Região mediana da célula mostrando vacúolos contendo resíduos de proteínas, indicando início da mobilização proteica durante a

embebição. E) Célula contendo vacúolos proteicos ladeados de corpos lipídicos esféricos. F) Periferia da célula destacando os glioxissomos e resíduos de membranas (pontas de setas brancas) dentro dos vacúolos proteicos. G) Célula com notável contração do protoplasto e acúmulo de substâncias no espaço periplasmático (pontas de setas pretas); núcleo contraído e sem o envoltório. H) Periferia da célula indicando intensa mobilização lipídica (setas pretas) e vacúolos proteicos íntegros. cw, parede celular; di, dictiossomo; er, retículo endoplasmático; gl, glioxissomo; lb, corpos lipídicos; mi, mitocôndria; nu, núcleo; pp, proplastídeo; va, vacúolo proteico 39

Figura 9 – Imagens obtidas por MET de células do meristema fundamental do pecíolo cotiledonar de embriões de *Butia capitata* desidratados (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) (A-B) ou hidratados (1,84 g H₂O g⁻¹ MS) e submetidos à diferentes ψ (indicados na coluna à esquerda) (C-H). A, B) Células com parede delgada, citoplasma denso, rico em mitocôndrias, grandes vacúolos protéicos, corpos lipídicos e amido. C, D) Células com vacúolo contendo resíduos de proteína, de aspecto floculado, ladeado por pequenos corpos lipídicos esféricos. E) Célula com vacúolos proteicos contendo resíduos de proteína e resíduos de membrana (pontas de setas brancas). F) Periferia da célula mostrando glioxissomos associados a mitocôndrias e corpos lipídicos. G, H) Células com parede fortemente sinuosa (seta branca), conspícua contração do protoplasto e acúmulo de substâncias no espaço periplasmático (pontas de setas pretas); proteína em vacúolos e no citoplasma. cw, parede celular; di, dictiossomo; er, retículo endoplasmático; gl, glioxissomo; is, espaço intercelular; lb, corpos lipídicos; mi, mitocôndria; nu, núcleo; pi, campo de pontoação primário; pp, proplastídeo; st, amido; va, vacúolo proteico. 41

Figura 10 – Esquema ilustrando alterações celulares na protoderme e no meristema fundamental do pecíolo cotiledonar de embriões de *Butia capitata* desidratados (controle) ou hidratados e submetidas a diferentes ψ 42

Figura 11 – Esquema ilustrando o pirênio *Butia capitata* (canto superior esquerdo), com destaque para o poro germinativo (seta), as principais causas de estresse hídrico a que são submetidos os embriões em bancos de sementes e as respostas fisiológicas associadas. No quadro, as cores vermelha e azul indicam, respectivamente aumento ou diminuição da resposta, em relação aos controles (embriões desidratados ou hidratados nas condições iniciais), em condição de estresse moderado. em, embrião; en, endocarpo; se, semente 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
APX	Ascorbato peroxidase
CAT	Catalase
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
MDA	Malondialdeído
MPa	Megapascal
NBT	Cloreto de tetrazólio-nitroazul
PEG 6000	Polietilenoglicol 6000
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1	Germinação	15
3.2	Germinação de sementes de palmeiras.....	15
3.3	Relações hídricas na germinação	16
3.4	Alterações citológicas e fisiológicas em resposta ao estresse hídrico.....	17
3.5	<i>Butia capitata</i> (Mart.) Becc.	17
3.6	Referências.....	18
4	ARTIGO.....	21
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51

1 INTRODUÇÃO

Butia capitata (Mart.) Becc. é uma palmeira endêmica do Cerrado na região central do Brasil (norte de Minas Gerais, sudoeste da Bahia e nordeste de Goiás) (LORENZI et al., 2010). A espécie apresenta importância econômica, social e ambiental. Seus frutos, obtidos pelo extrativismo por comunidades rurais, são empregados na indústria alimentícia na produção de sucos, sorvetes e picolés (OLIVEIRA et al., 2013). Portanto, consistem em uma fonte suplementar de renda para a população rural. A palmeira, devido a sua exuberância, apresenta potencial de uso em projetos paisagísticos e de arborização urbana (MAGALHÃES et al., 2013).

Apesar dos potenciais de uso e importância de *B. capitata*, o extrativismo predatório dos seus frutos, o desmatamento de áreas nativas e o pastejo extensivo atrelados à irregularidade do regime pluviométrico nas suas áreas de ocorrência natural têm comprometido a sobrevivência de populações nativas da espécie (OLIVEIRA et al., 2013).

Nos últimos anos tem-se evidenciado mudanças climáticas, em virtude da elevação da temperatura média do planeta (aquecimento global) (WALTHER et al., 2002). Dentre elas destaca-se a irregularidade na distribuição das chuvas, que pode resultar na redução de sua frequência e volume e, conseqüentemente, culminar no prolongamento do período de seca (FENG; FU, 2013). Com o prolongamento dos períodos de seca e o uso irracional dos recursos naturais é duvidoso o futuro de muitas espécies vegetais em ambos os biomas.

A formação de banco de sementes no solo propicia a perpetuação da espécie, garantindo a disseminação da diversidade genética, no decorrer do tempo. Isso depende de características físicas e fisiológicas das sementes e de como elas interagem com os fatores abióticos (LONG et al., 2014).

Quanto à sensibilidade à dessecação, as sementes podem ser classificadas em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. As sementes ortodoxas e intermediárias são dispersas com baixo conteúdo de água (HONG; ELLIS; 1996). No entanto, uma vez iniciado o processo germinativo e sob estresse hídrico severo a semente pode ter sua viabilidade comprometida (BEWLEY; BRADFORD; HILHORST, 2013).

Estudar o comportamento das sementes de *Butia capitata* sob condições de estresse hídrico, além de agregar conhecimentos botânicos à espécie, pode contribuir na sua conservação *in situ* e aperfeiçoar as práticas de propagação e manejo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar aspectos fisiológicos e ultraestruturais de embriões de *Butia capitata* sob estresse hídrico, em sementes desidratadas e hidratadas, induzido osmoticamente.

2.2 Objetivos específicos

Procurou-se responder aos seguintes questionamentos:

- Quais as respostas fisiológicas e os aspectos citológicos ao estresse hídrico em embriões de sementes desidratadas ou hidratadas?
- Quais os efeitos da hidratação das sementes sobre a fisiologia e ultraestrutura dos embriões?

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Germinação

A germinação, na maioria das sementes, se inicia com a embebição e culmina no alongamento continuado do eixo embrionário (BEWLEY; BRADFORD; HILHORST, 2013). Para que uma semente germine é necessária a presença de níveis adequados de água, oxigênio, além de temperatura favorável (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

As sementes podem ser dispersas no estado de quiescência, quando o fator limitante para a germinação for a ausência de condições favoráveis (BEWLEY; BRADFORD; HILHORST, 2013). No entanto, nem todas as sementes germinam prontamente, mesmo sob as condições favoráveis, devido a fatores intrínsecos. Nesta situação elas são enquadradas como dormentes (BASKIN; BASKIN, 2004).

A dormência é um fenômeno encontrado em muitas sementes de espécies nativas dos biomas brasileiros, sobretudo no Cerrado, que favorece a sobrevivência e contribui na perpetuação das espécies (CARVALHO et al., 2015). Palmeiras que ocorrem no Cerrado tendem a apresentar intensa dormência (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2018; NEVES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015).

3.2 Germinação de sementes de palmeiras

As sementes de muitas espécies de palmeiras são envolvidas pelo endocarpo rígido, formando o pirênio, estrutura que é envolta pelo epicarpo e mesocarpo, os quais, normalmente, são consumidos pelos animais (MAGALHÃES et al., 2013). A semente é albuminosa com endosperma abundante (Oliveira et al., 2013). Os embriões são lineares e pequenos em relação ao tamanho da semente. Na região proximal do embrião encontra-se o pecíolo cotiledonar, parte tubular na qual está inserido o eixo embrionário e, na região distal, localiza-se o haustório funcional, que atua na mobilização de reservas (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012). O opérculo é uma estrutura presente em sementes de palmeiras, posicionado adjacente ao embrião (no ápice do pecíolo cotilenodar) e que contribui na restrição da germinação. Quando ocorre a superação da dormência, o opérculo é deslocado e ocorre a protrusão do pecíolo cotiledonar através do poro germinativo do endocarpo (CARVALHO et al., 2015; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2018; OROZCO-SEGOVIA et al., 2003).

Na literatura, há evidências de que as palmeiras apresentam dormência morfológica, em que as sementes são dispersas com embriões subdesenvolvidos, que necessitam de um tempo adicional para concluir o seu desenvolvimento e germinarem, ou ainda dormência morfofisiológica, cuja superação exige alterações na fisiologia da semente ou embrião (BASKIN; BASKIN, 2014).

Trabalhos recentes sobre germinação de sementes de palmeiras do Cerrado demonstram que a dormência tende a ser fisiológica não-profunda associada à incapacidade

do embrião em romper as estruturas adjacentes, ou o opérculo, (CARVALHO et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; DIAS et al., 2017; MAZZOTTINI-dos-SANTOS et al., 2018).

Embora as estruturas das sementes, como o opérculo, limitam a germinação, não impedem a absorção de água pelo embrião. Em sementes de *Acrocomia aculeata*, Rodrigues Júnior et al. (2013) verificaram que o tegumento opercular não evita a absorção de água pelo embrião, mas a velocidade de embebição é reduzida. No entanto, quando removido, o índice de velocidade de germinação e o percentual de germinação aumentam.

3.3 Relações hídricas na germinação

A germinação se inicia com a embebição de água pelas sementes, sendo seu metabolismo ativado e as atividades celulares retomadas (BEWLEY; BRADFORD; HILHORST, 2013).

O processo de germinação associado à embebição está dividido em três fases: Fase I, caracterizada pela rápida absorção de água pela semente; Fase II, na qual o nível de água se mantém constante e a Fase III em que a absorção de água é retomada. A embebição é ocasionada pela diferença de potencial hídrico entre a semente e o meio (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Na Fase I, o componente mátrico é o principal responsável pelo baixo potencial hídrico celular, o que justifica a rápida absorção de água que ocorre nessa fase. As forças mátricas são formadas pela ligação da água às superfícies sólidas, como finos capilares dos componentes das paredes celulares, além da superfície de macromoléculas, como proteínas e amido. Na Fase II a absorção de água é desacelerada, pois a célula encontra-se completamente hidratada. Nas fases I e II, a semente tolera a desidratação (BEWLEY; BRADFORD; HILHORST, 2013; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Na Fase III uma redução do potencial de pressão celular e a formação de osmólitos pela degradação das moléculas de reserva permitem maior influxo de água para a semente. A fase III é caracterizada pela conclusão do processo germinativo, estabelecimento da plântula e perda da tolerância à desidratação. Esta é a fase mais vulnerável de todo o ciclo de vida da planta, pois o estresse hídrico pode inviabilizar o seu estabelecimento (BEWLEY; BRADFORD; HILHORST, 2013; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Flutuações hídricas afetam o estado de dormência do banco de sementes no solo (BATTLA; BENECH-ARNOLD, 2006), sobretudo em sementes pouco profundas, proporcionando ciclos de dormência e germinação de sementes no decorrer do tempo, o que contribui para a perpetuação da espécie. As sementes que se encontram na superfície do solo são mais sensíveis aos ciclos de hidratação (DOWNS; CAVERS, 2000).

Ciclos de desidratação e reidratação das sementes em campo podem aumentar a sua taxa de germinação (BASKIN; BASKIN, 1982), longevidade e persistência no banco de

sementes, por meio da manutenção da atividade antioxidante, capacidade de autorreparo e, portanto, resistência ao estresse (DOWNS; CAVERS, 2000; LONG et al., 2014).

3.4 Alterações citológicas e fisiológicas em resposta ao estresse hídrico

A água é um elemento fundamental para a estrutura e metabolismo celular. Sob déficit hídrico, a célula sofre vários danos como a invaginação da parede celular e retração do protoplasto, que em condições mais severas pode resultar no colapso dessas estruturas (PAMMENTER; BERJAK, 2000).

Veloso et al. (2016), ao avaliarem o efeito da desidratação das sementes de *Mauritia flexuosa*, relataram a ocorrência de invaginação das paredes celulares, retração da membrana plasmática, proliferação do retículo endoplasmático e vacúolos autofágicos, aumento da densidade do conteúdo vacuolar que culminaram no colapso do protoplasma.

O estresse hídrico comumente ocasiona a peroxidação de lipídios. Conseqüentemente, as membranas perdem a sua permeabilidade seletiva, que culmina no extravasamento de íons e solutos relevantes no metabolismo celular. Tudo isso pode contribuir para a perda da viabilidade e vigor da semente (BAILLY, 2004).

Outra consequência do estresse oxidativo é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o íon superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), as quais, caso não sejam neutralizadas por enzimas removedoras, podem ocasionar danos estruturais irreversíveis nos sistemas de membranas celulares (membrana plasmática, mitocôndria, tonoplasto e DNA) (GILL; TUTEJA, 2010). Testes de histolocalização do íon superóxido e quantificação da concentração de (H_2O_2) podem auxiliar na compreensão da produção de EROs em resposta a atividades metabólicas como germinação e estresse oxidativo (BICALHO; SANTOS; GARCIA, 2018; DIAS et al., 2018; ORACZ et al., 2012).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal que desempenha várias funções fisiológicas, dentre elas o controle da germinação (KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005; WEYERS; PATERSON, 2001) e resposta ao estresse (HAUSER; WAADT; SCHROEDER, 2011). Sob condições de déficit hídrico seus níveis aumentam, desencadeando uma série de sinais para regular a resposta do vegetal ao estresse (DAR et al., 2017). Este hormônio é o principal mediador de respostas ao estresse hídrico (CAMPALANS et al., 1999).

3.5 *Butia capitata* (Mart.) Becc.

O coquinho-azedo, [*Butia capitata* (Mart.) Becc.] também conhecido por butiá-azedo, butiá-vinagre, butiá, cabeçudo, guabiroba-do-campo, é uma palmeira brasileira nativa no norte de Minas Gerais, sudoeste da Bahia e nordeste de Goiás em cerrados e cerradões, de modo geral em solos arenosos (LORENZI et al., 2010). Esta palmeira, pela sua exuberância, pode ser empregada em projetos paisagísticos. A polpa dos frutos do coquinho-azedo pode ser empregada na produção de sucos, doces, geleias, licores e sorvetes. O extrativismo da

espécie proporciona fonte de renda alternativa para populações rurais (MAGALHÃES et al., 2013).

B. capitata está sendo ameaçada pelo desmatamento, consumo por bovinos e equinos e extrativismo intenso. A retirada excessiva de frutos pode interferir na alimentação da fauna nativa, assim como na formação de bancos de sementes que permitem a perpetuação da espécie (OLIVEIRA et al., 2013).

3.6 Referências

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Effects of wetting and drying cycles on the germination of seeds of *Cyperus Inflexus*. **Ecology**, v. 63, n. 1, p. 248-252, 1982.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. What kind of seed dormancy might palms have? **Seed Science Research**, v. 24, n. 1, p. 17-22, 2014.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 392 p.

BICALHO, E. M.; SANTOS, T. R.; GARCIA, Q. S. Abscisic acid and the antioxidant system are involved in germination of *Butia capitata* seeds. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, n. 1, p. 174-178, 2019.

CAMPALANS, A.; MESSEGUER, R.; GODAY, A.; PAGES, M. Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 327-340, 1999.

CARVALHO, V. S.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; AGOSTINHO, C. O.; MATIAS, L. J.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; CORREIA, L. N. F. Dormancy is modulated by seed structures in palms of the Cerrado biome. **Australian Journal of Botany**, v. 63, n. 5, p. 444-454, 2015.

DAR, N. A.; AMIN, I.; WANI, W.; WANI, S. A.; SHIKARI, A. B.; WANI, S. H.; MASOODI, K. Z. Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants. **Plant Gene**, v. 11, p.106-111, 2017.

DIAS, D. S.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; MUNNÉ-BOSCH, S.; GARCIA, Q. S. Hormonal profile and the role of cell expansion in the germination control of Cerrado biome palm seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 168-177, 2017.

DIAS, D. S.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; MELO, G. A.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Haustorium–endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae) seeds. **Annals of Botany**, v. 122, n. 2, p. 267-277, 2018.

DOWNS, M. P.; CAVERS, P. B. Effects of wetting and drying on seed germination and seedling emergence of bull thistle, *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, n. 12, p. 1545-1551, 2000.

FENG, S.; FU, Q. Expansion of global dry lands under a warming climate. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 13, n. 10, p. 081-10, 2013.

FILIPENSES. In: **A BÍBLIA**: tradução ecumênica. São Paulo: Paulinas, 2002.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New phytologist**, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

HAUSER, F.; WAADT, R.; SCHROEDER, J. I. Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. **Current Biology**, v. 21, n. 9, p. 346-355, 2011.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55p.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, v. 15, n. 4, p. 281-307, 2005.

LONG, R. L.; GORECKI, M. J.; RENTON, M.; SCOTT, J. K.; COLVILLE, L.; GOGGIN, D. E.; COMMANDER, L. E.; WESTCOTT, D. A.; CHERRY, H.; FINCH-SAVAGE, W. E. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. **Biological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 31-59, 2014.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.R.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (Palmeiras)**. Nova Odessa: Plantarum, 2010. 384 p.

MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA, D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, n. 1, p. 273-283, 2013.

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T. Structural changes in the micropylar region and overcoming dormancy in Cerrado palms seeds. **Trees**, v. 32, n. 5, p.1415-1428, 2018.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; CUNHA, I. R. G.; PIMENTA, M. A. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N. (2013) Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*). **Flora**, v. 208, n. 1, p. 68-78, 2013.

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

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F.O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, n. 6, p. 1633-1645, 2013.

ORACZ K.; VOEGELE A.; TARKOWSKÁ D.; JACQUEMOUD D.; TURECKOVÁ V.; URBANOVÁ T.; STRNAD M.; SLIWINSKA E.; LEUBNER-METZGER G. Myriganone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 1, p. 81-95, 2012.

OROZCO-SEGOVIA, A.; BATHIS, A. I.; ROJAS-ARÉCHIGA, M.; MENDOZA, A. Seed biology of palms: a review. **Palms**, v. 47, p. 79-94, 2003.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. 2000. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 56-69, 2000.

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. **Trees**, v. 26, n. 3, p. 851-863, 2012.

RIBEIRO, L. M.; GARCIA, Q. S.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Tissue specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. **Physiologia Plantarum**, v.153, n. 4, p. 627–642 2015.

RODRIGUES JUNIOR, A. G.; OLIVEIRA, T. G. S.; SOUZA, P. P.; RIBEIRO, L. M. Water uptake and pre-germination treatments in macaw palm (*Acrocomia aculeata* - Arecaceae) seeds. **Journal Seed of Science**, v. 35, n. 1, p. 99-105, 2013.

VELOSO, V. H. S.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y. R. F. Cytological aspects of recalcitrance in dormant seeds of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 7, p. 171, 2016.

WALTHER, G. R.; POST, E.; CONVEY, P.; MENZEL, A.; PARMESAN, C.; BEEBEE, T. J.; FROMENTIN, J. M.; HOEGH-GULDBERG, O.; BAIRLEIN, F. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 389-395, 2002.

WEYERS, J. D.; PATERSON, N. W. Plant hormones and the control of physiological processes. **New Phytologist**, v. 152, n. 3, p. 375-407, 2001.

4 ARTIGO

“Aspectos fisiológicos e citológicos da resposta ao estresse hídrico em embriões da palmeira do Cerrado *Butia capitata*”

Este artigo foi elaborado conforme as normas da Revista Plant Physiology and Biochemistry.

Aspectos fisiológicos e citológicos da resposta ao estresse hídrico em embriões da palmeira do Cerrado *Butia capitata*

Bruno Guilherme Gonçalves^a; Leonardo Monteiro Ribeiro^{b,*}; Daiane Souza Dias^b; Hellen Cássia Mazzottini-dos-Santos^b; Cristina de Paula Santos Martins^a; Paulo Sérgio Nascimento Lopes^a; Maria Olívia Mercadante-Simões^b

^aInstituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

^bDepartamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-089 Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

E-mail address: leomrib@hotmail.com (L.M. Ribeiro).

Abbreviations: ABA, ácido abscísico; APX, ascobarto peroxidase; CAT, catalase; GPX, glutathione peroxidase; SOD, superóxido dismutase.

Resumo

Nos bancos de sementes embriões de sementes dormentes passam por ciclos de hidratação e estão sujeitos ao estresse hídrico (WS) e à hidratação rápida (FH). Avaliou-se aspectos fisiológicos e citológicos em embriões da palmeira neotropical *Butia capitata*, submetidos ao WS induzido osmoticamente. O potencial hídrico (ψ), a viabilidade e o vigor de embriões desidratados ou hidratados foram determinados, após imersão em soluções osmóticas. Os embriões foram submetidos à FH ($\psi = 0$ MPa), WS moderado ($\psi = -1$ e -2 MPa) e WS severo ($\psi = -2$ e -4 MPa) e foram avaliados indicadores do estresse oxidativo (H_2O_2 , O_2^- , MDA e atividade CAT, SOD e APX), funcionalidade das membranas (condutividade elétrica e lixiviação de K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}) e o ABA foi quantificado. A ultraestrutura de embriões desidratados e embriões hidratados e submetidos à $\psi = 0$, -1 e -2 MPa foi avaliada. Os embriões desidratados ($\psi = -8,5$ MPa) apresentam elevada tolerância ao WS, o que está relacionado à abundância de reservas lipídicas e proteicas, atividade SOD e alto conteúdo de ABA. Os embriões toleram FH e a hidratação faz $\psi = -0,2$ MPa. Embriões hidratados também apresentam elevada tolerância ao WS, o que está relacionado ao controle do estresse oxidativo e aumento do conteúdo de ABA. A perda da viabilidade, sob WS severo, ocorre associada ao bloqueio da mobilização protéica, perda da funcionalidade das membranas e desestruturação celular. A resistência dos embriões ao WS favorece a manutenção de bancos de sementes de *B. capitata* em ambientes com clima sazonal do bioma Cerrado.

Palavras-chave: ABA. Déficit hídrico. Estresse oxidativo. H_2O_2 . MDA. Palmeiras.

Introdução

Em ambientes com clima sazonal, muitas espécies vegetais produzem sementes que possuem mecanismos de bloqueio da germinação (i.e. sementes dormentes) (Bewley et al., 2013; Baskin and Baskin, 2014). Estas sementes comumente são enterradas no solo e se integram a um componente da população conhecido como banco de sementes (Long et al., 2014). Nesta condição, as sementes podem passar por vários ciclos de hidratação (alternância entre estados de hidratação e desidratação), até que a dormência seja superada (Bewley et al., 2013).

Os ciclos de hidratação são importantes sinalizadores para mecanismos de superação da dormência, mas proporcionam condições estressantes e potencialmente fatais às células embrionárias (El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008; Baskin and Baskin, 2014). O estresse hídrico (WS) nos bancos de sementes pode decorrer de períodos prolongados de estio e a hidratação rápida (FH), como consequência de chuvas intensas. Tanto WS quanto a FH pode causar, diretamente, danos às membranas celulares, sendo que o WS é também associado ao estresse oxidativo (Bewley et al., 2013). Este processo é resultado do desequilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade de remoção e pode acarretar danos em membranas, proteínas e DNA (Berjak and Pammenter, 2008; Apel e Hirt, 2004; Bailly, 2004). A modulação do estresse oxidativo por mecanismos enzimáticos (atividade de SOD, APX, GPX e CAT) e não enzimáticos (vitamina E, flavonóides, entre outros) previne danos celulares e permite a utilização das ROS como sinalizadores em diversos processos metabólicos (Bailly, 2004). O ABA é um hormônio associado à manutenção da dormência e que tem as rotas de síntese e degradação influenciadas pelo estresse oxidativo, podendo, por

outro lado, induzir o aumento da eficiência do sistema antioxidante (Ozfidan et al., 2012; Souza et al., 2017). O conhecimento sobre a resposta metabólica e ultraestrutural ao WS ainda é restrito para espécies tropicais e estudos sobre o tema poderão agregar novos padrões àqueles descritos, principalmente para espécies cultivadas (Bewley et al., 2013; Huang and Song, 2013).

Butia capitata (Mart.) Becc. é uma palmeira endêmica do bioma Cerrado (savana neotropical) na região central do Brasil, com importância ecológica e econômica e que encontra-se ameaçada pelo desmatamento (Magalhães et al., 2013; Oliveira et al., 2013). As sementes da espécie apresentam dormência pronunciada e, em banco de sementes, são sujeitas à WS, nos longos períodos de estiação, o que pode ser amplificado pela ocorrência de fogo, comum em ambiente de Cerrado (Carvalho et al., 2015; Dias et al., 2017; Mazzottini-dos-Santos et al., 2018). As sementes de *B. capitata* apresentam comportamento intermediário (entre ortodoxo e recalcitrante) (Dias et al., 2015), um padrão pouco estudado, caracterizado pela tolerância à dessecação e intolerância à baixas temperaturas (Marques et al., 2018).

O objetivo deste estudo foi avaliar aspectos fisiológicos (potencial hídrico, estresse oxidativo e funcionalidade das membranas) e ultraestruturais da resposta de embriões de *Butia capitata* ao WS induzido osmoticamente. Procurou-se responder aos seguintes questionamentos: Quais as respostas fisiológicas ao WS em embriões desidratados ou hidratados? Quais os efeitos da hidratação sobre a fisiologia e ultraestrutura dos embriões? Procurou-se também discutir sobre aspectos ecofisiológicos relacionados à tolerância ao WS e suas implicações para a manutenção de bancos de sementes da espécie nos ambientes de ocorrência.

2. Métodos

2.1. Coleta e armazenamento do material vegetal

Frutos maduros de *Butia capitata* (caracterizados pela cor amarelada do epicarpo e fácil abscisão do cacho) foram coletados em populações naturais nos municípios de Mirabela (16°26'64"S; 44°19'34"W) na safra 2017/2018, Bonito de Minas (15°25'59.8"S; 44°41'31.7"W) e Itacambira (17°03'54"S; 43°18'32"W) na safra 2018/2019, no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. Os frutos foram despolpados mecanicamente e os pirênios (sementes envolvidas pelo endocarpo lenhoso) foram mantidos em local sombreado e arejado, por até 60 dias, quando os experimentos foram realizados. Cada experimento foi realizado com sementes de um mesmo lote.

2.2. Relações hídricas

A resposta ao estresse hídrico foi avaliada em sementes desidratadas e sementes hidratadas. As sementes desidratadas foram obtidas dos pirênios armazenados a sombra e sob temperatura ambiente, entre 30 e 60 dias, após a quebra do endocarpo, com utilização de um torno manual. Para a hidratação, sementes isoladas foram imersas em água destilada, por 72 horas, a 25°C (Oliveira et al., 2013). O teor de água das sementes desidratadas ou hidratadas e de seus embriões (extraídos com auxílio de estiletos) foi determinado pelo método da estufa, com comparação entre as massas frescas e secas, após a desidratação em estufa, a 105°C, por 24 horas (Brasil, 2009), em cinco repetições de 10 sementes ou embriões. A variação do teor de água das sementes e embriões na base seca foi comparada com a variação do teor de água das sementes na base fresca.

O potencial hídrico (ψ_w) foi determinado nos embriões obtidos de sementes desidratadas e sementes hidratadas. Os embriões foram imersos em soluções de polietileno glicol 6000 (PEG 6000) (agentes osmóticos inertes, atóxicos e que não penetram nas membranas celulares; Michel e Kaufman, 1973). Nós procuramos simular condições estressantes que afetem a capacidade hídrica dos embriões, definida aqui como a capacidade de absorver ou reter água. Como embriões desidratados apresentam menores ψ_w , potenciais mais negativos foram aplicados a eles, em relação aos embriões hidratados. Assim, os tratamentos corresponderam às concentrações de PEG 6000 que proporcionaram $\psi_w = 0, -2, -4, -6, -8$ e -10 MPa (aplicados à embriões desidratados); $\psi_w = 0, -0,5, -1, -2, -3$ e -4 MPa (aplicados à embriões hidratados). Testes preliminares indicaram que os ψ_w mais negativos utilizados alteraram a capacidade hídrica (capacidade dos embriões desidratados absorverem água e capacidade dos embriões hidratados reterem água), entre 1,5 e 2 vezes, em relação ao $\psi_w = 0$, obtido com água destilada. As concentrações de PEG 6000 foram calculadas utilizando equação de Michel e Kaufmann (1973), considerando-se 25 °C, como temperatura de referência. A massa fresca dos embriões foi determinada na condição inicial e após 12, 24 e 36 horas de imersão na solução osmótica, em cinco repetições de dez embriões, sendo calculada a variação da massa. O ψ_w foi calculado para cada tempo de imersão, a partir do ajuste de equações quadráticas, considerando-se que $\psi_{\text{embryo}} = \psi_{\text{solution}}$, quando o fluxo de água é zero. A viabilidade e o vigor dos embriões desidratados e hidratados, submetidos aos diferentes ψ_w , por 12h, foram avaliados pelo teste de tetrazólio, seguindo critérios estabelecidos por Ribeiro et al. (2010).

Para a realização das avaliações fisiológicas apresentadas a seguir, a partir da avaliação da variação da massa dos embriões e da viabilidade e vigor, foram selecionados $\psi_w = 0$ e ψ_w que simularam, estresse moderado (redução da capacidade hídrica, manutenção da viabilidade e redução do vigor) e estresse severo (perda da viabilidade em mais de 60% dos embriões). Os ψ_w que proporcionaram estresses hídricos moderados e severos foram, respectivamente, -2 e -4 MPa, para embriões desidratados e -1 e -2 MPa para embriões hidratados.

2.3. *Histolocalização do íon superóxido (O_2^-)*

A histolocalização de O_2^- no apoplasto foi realizada de acordo com Oracz et al. (2012) com modificações (Bicalho et al. 2018). Vinte embriões de cada tratamento foram imersos em 500 μ L de nitroblue tetrazolium (1 mM) em tampão Tris-HCl (10mM, pH 7.0) e mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos. Os embriões foram lavados três vezes em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7.0) e o registro de imagens foi obtido em estereomicroscópio acoplado à câmera digital..

2.4. *Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)*

Quatro repetições de 30 mg de embriões de cada tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido. Em tubos Eppendorf de 2 mL foram adicionadas 0,1% de TCA (m/v). O extrato vegetal foi homogeneizado em vortex por 1 minuto, e centrifugado a 10000 x g, durante 15 minuto, a 4°C. Uma alíquota de 250 μ l do sobrenadante foi extraída e adicionada a 250 μ l de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 1000 μ l de iodeto de potássio 1 M. Os tubos com a solução foram colocados no gelo sob ausência de luz por uma hora. As amostras permaneceram no escuro sob temperatura ambiente durante 20 min, para que a estabilização da reação. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) a 390 nm e a quantidade de H_2O_2 foi expressa em μ mol g^{-1} de massa seca, baseado em curva padrão de H_2O_2 pré-estabelecida (Alexieva et al., 2001).

2.5. *Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante*

O extrato vegetal foi obtido após a maceração quatro repetições de 20 mg embriões de cada tratamento em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas em PVPP (10% m/v), 500 μ L de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,8), 10 μ L de EDTA (100 μ M) e 490 μ L de água deionizada, em vortex, por 1 minuto. Os extratos foram centrifugados a 10000 x g, a 4°C, por 15 minutos. A atividade CAT, APX e SOD foi determinada em 100 μ L do sobrenadante. A atividade SOD foi determinada adicionando-se o extrato a uma solução contendo metionina (13 mM), NBT (75 μ M), 100 μ M de EDTA de riboflavina (2 μ M) e tampão fosfato de potássio (50 mM pH 7,8). Os tubos foram iluminados em câmaras compostas por tubos fluorescentes (15 W) a 25 °C. Decorridos 10 minutos de incubação, o término da atividade foi determinado pela interrupção da luz. Reações controle foram mantidas no escuro, por 10 minutos. O composto azul de formazana foi analisado em espectrofotômetro (UV-1800,

Shimadzu, Tokyo, Japan) a 575 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50 % da fotoredução do NBT. Os resultados foram demonstrados em $U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína (Giannopolitis e Ries, 1977). Para a determinação da atividade CAT adicionou-se o extrato ao tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), acrescido no momento da análise H_2O_2 recém preparado (12,5 mM). A análise foi realizada em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) a 240 nm, por 1 minutos. A atividade CAT foi estimada, usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Cakmak e Horst, 1991) e os resultados foram expressos em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ minuto}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína. A atividade APX foi determinada pela adição do extrato ao tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,8) e no momento da análise ascorbato (0,25 mM) e H_2O_2 (1,0 mM). A taxa de oxidação do ácido ascórbico foi acompanhada por 1 minutos, registrando os valores de absorbância a 290 nm a cada 10 segundos em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japão). A atividade APX foi determinada utilizando ϵ igual a $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de ascorbato minuto}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína (Nakano e Asada, 1981).

2.6. Quantificação de malondialdeído (MDA)

Quatro repetições de 30 mg de embriões de cada tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido e foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). Após homogeneização em vortex por 1 minuto, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 15 min. Retirou-se uma alíquota de 1 ml do sobrenadante no qual adicionou-se uma alíquota de 3 mL de solução de ácido tio barbitúrico 0,5% (m/v) (preparado em TCA 20%). A solução permaneceu por 60 min a 95°C e, em seguida, foi resfriada no gelo por 10 min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) em comprimentos de onda de 532 e 660 nm. Interferentes foram eliminados pela subtração dos valores (532-660) e a quantidade de MDA foi expressa em nmol g^{-1} de massa seca (Health e Packer, 1968, adaptado).

2.7. Quantificação de ABA

O ABA foi quantificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras foram obtidas pela maceração de quatro repetições de 100 mg de embriões de cada tratamento em nitrogênio líquido, em tubo eppendorf de 2 ml. Em cada amostra foi adicionado 1 ml de solvente extrator (metanol: isopropanol e ácido acético nas proporções de 20:79:1 respectivamente). A solução foi submetida ao vortex, por 1 minuto, banho ultrassom (Quimis, 0335D, Diadema, Brasil), por 30 minutos (temperatura da água de $4-7^\circ\text{C}$) e novamente ao vortex por 1 minuto. A solução obtida foi centrifugada por 15 minutos, sob temperatura de 4°C , a 10000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e ao precipitado foram adicionados 0,5 mL do

solvente extrator e o procedimento de extração foi repetido mais duas vezes. O sobrenadante recolhido de cada repetição das extrações foi misturado e, em seguida, secado com nitrogênio gasoso. Adicionou-se 500 µl de metanol absoluto ao extrato seco, e foi realizada a filtração em filtro com 0,22 µm de porosidade. O filtrado foi injetado na cuba cromatográfica nas seguintes condições: 20 µl da amostra em sistema de HPLC acoplado com detector de arranjo de diodos (1290 Infinity, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), fluxo de 0,8 ml/minuto, temperatura da coluna 30 °C e fase móvel metanol (Müller e Munné-Bosch, 2011, adaptado). Os resultados foram expressos em ng ABA g⁻¹ de massa seca.

2.8. Estimativa da integridade das membranas – lixiviação de solutos

Quatro repetições de 20 embriões de cada tratamento tiveram a massa determinada e foram imersos em água ultrapura durante 4 horas e mantidos em câmara de germinação, a 30° C. A leitura de condutividade elétrica foi realizada utilizando condutivímetro de bancada (AKSO, AK83, São Leopoldo, Brasil). A quantificação dos íons K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ na solução foi realizada por meio de espectrofotômetro de absorção atômica (Varian, AA 240, Santa Clara, Estados Unidos), segundo metodologia adaptada de Gomes-Copeland et al. (2012). Os resultados foram expressos com base na massa seca.

2.9. Avaliações ultraestruturais e citoquímicas

Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão, pecíolos cotiledonares de *B. capitata* de embriões desidratados (controle) e embriões hidratados submetidos aos potenciais 0, -1 e -2 MPa foram fragmentados com auxílio de lâmina de barbear. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 (Roland 1978). As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Philips/FEI Company, Eindhoven, Netherlands) a 80 kV.

Para identificação das reservas embrionárias, amostras adicionais dos mesmos materiais utilizados para as avaliações ultraestruturais foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica e incluídas em (2-hidroxietil)-metacrilato Leica® (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Secções longitudinais de 5 µm foram obtidas com auxílio de micrótomo rotativo (Atago, Tokyo, Japan) e coradas com Xylidine-Ponceau (Vidal, 1970) para proteínas, ácido periódico e reagente Schiff - PAS (Feder e O'Brien, 1968), para polissacarídeos neutros e Sudan black em glicerina (10%) (Johansen, 1940, modificado) para lipídeos.

2.10. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias, quando significativas, foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados referentes à lixiviação de Mg foram transformados em $\arcsen(x/100)^{-2}$ para as comparações.

3. Resultados

3.1. Relações Hídricas

As sementes desidratadas de *B. capitata* e seus embriões apresentaram, na condição inicial, teores de água de 5,4 e 9,9% (base fresca), respectivamente. A imersão das sementes em água destilada, por 72 horas, elevou os teores para 25,6% nas sementes e 64,8% nos embriões. As massas secas dos embriões hidratados ou desidratados não diferiram entre si (Fig. 1A). A hidratação aumentou os teores de água (base seca) das sementes e de seus embriões 5,6 e 17,7 vezes, respectivamente (Fig. 1 B).

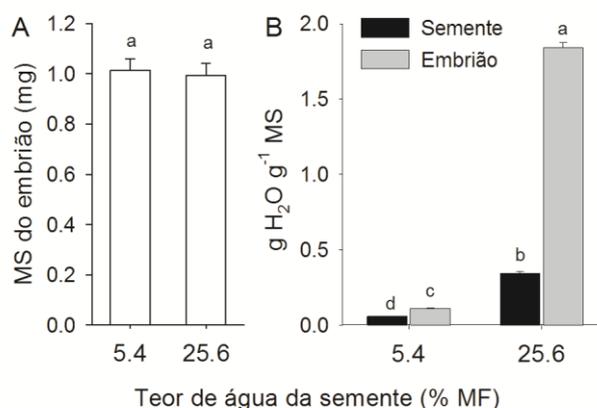


Figura 1 – Massa seca de embriões (A) e teor de água em base seca de sementes e embriões (B) de *Butia capitata* nas condições desidratada (sementes com teor de água de 5,4% em base fresca) ou hidratada (sementes com teor de água de 25,6% em base fresca). Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0.05$). As barras representam o erro padrão da média

Nos embriões desidratados ($0,11 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$) houve incremento de aproximadamente duas vezes no teor de água quando os mesmos foram submetidos à $\psi = 0 \text{ MPa}$ (Fig. 2). O aumento do teor de água também ocorreu nos demais tratamentos nas primeiras 12 horas, com intensidade influenciada pelo ψ da solução. No tempo de 24 horas, apenas sob $\psi = -10$

MPa houve diminuição do teor de água, o que ocorreu às 36 horas sob $\psi = -8$ e $\psi = -10$ MPa. No caso dos embriões hidratados ($1,84 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$), apenas $\psi = 0$ MPa proporcionou aumento do teor de água. Sob os demais tratamentos, a intensidade da redução do teor de água foi mais intensa conforme diminuiu o ψ .

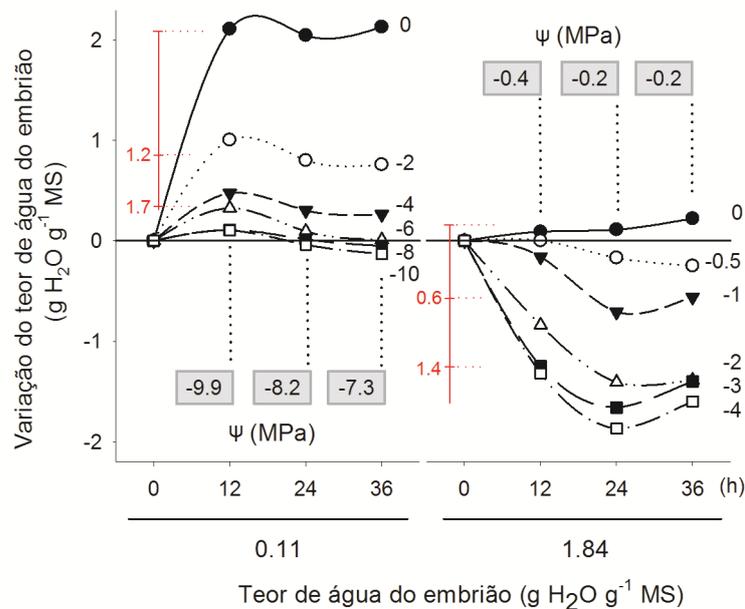


Figura 2 – Variação do teor de água dos embriões ($\text{mg H}_2\text{O mg}^{-1} \text{ MS}$) e do ψ (MPa) de embriões de *Butia capitata* desidratados ($0,11 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$) ou hidratados ($1,84 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$), submetidos à imersão em soluções com diferentes potenciais hídricos, ao longo de 36h. Os números à frente das curvas indicam os ψ (MPa) utilizados como tratamentos. Os valores dentro dos quadros cinzas indicam os ψ nos respectivos tempos. Em vermelho estão indicadas as reduções na capacidade hídrica (capacidade de absorver ou reter água) nos tratamentos que foram selecionados para as avaliações fisiológicas e ultraestruturais

Tanto para embriões desidratados ou hidratados, os ψ testados proporcionaram variação de aproximadamente duas vezes na capacidade hídrica (definida aqui como a capacidade de absorver ou reter água) (Fig. 2). O ψ dos embriões desidratados aumentou 26%, entre 12 e 36 horas de imersão nas soluções, com média de $-8,5$ MPa. A hidratação promoveu aumento de 98% no ψ dos embriões, o qual se estabilizou em $-0,2$ MPa, após 24 horas.

3.2. Viabilidade e vigor

Na condição inicial, a viabilidade dos embriões desidratados ou hidratados era, respectivamente, 80 e 95%, e não foi afetada significativamente pela imersão em água destilada ($\psi = 0$ MPa), por 12 horas. A viabilidade declinou à medida que ψ mais negativos que -2 e -1 MPa foram utilizados, respectivamente, em embriões desidratados ou hidratados (Fig. 3A).

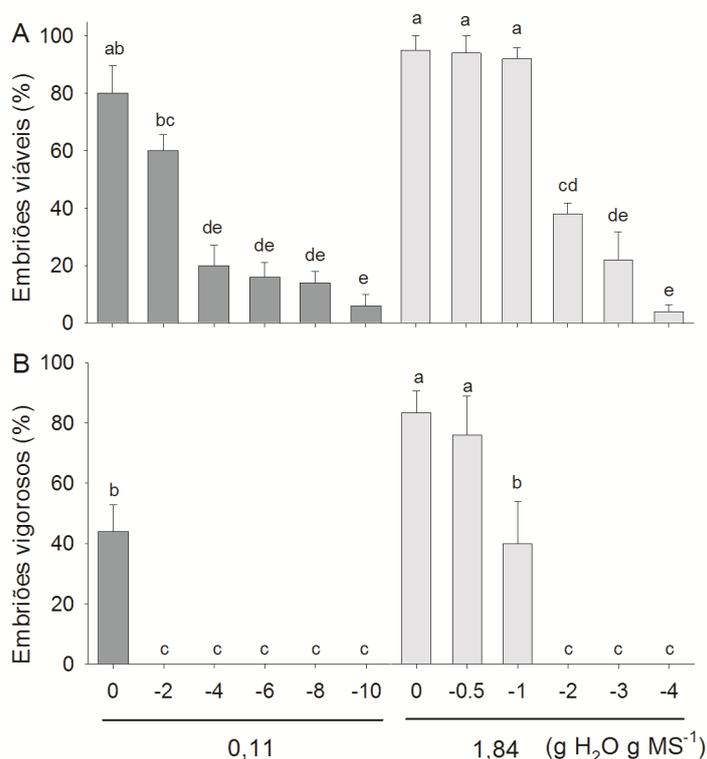


Figura 3 – Percentuais de embriões de *Butia capitata* viáveis (A) e vigorosos (B) submetidos, nas condições desidratada (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou hidratada (1,84 g H₂O g⁻¹ MS), submetidos a diferentes ψ , durante 12 h, avaliados pelo teste de tetrazólio. Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, p < 0,05). As barras representam o erro padrão da média

Embriões hidratados apresentaram maior vigor, em relação aos desidratados, quando os mesmos foram submetidos à $\psi = 0$ MPa (Fig. 3B). Este fato está relacionado à maior atividade metabólica presente nos embriões hidratados, considerando-se que teste de tetrazólio avalia a atividade respiratória. Observou-se que $\psi = -1$ MPa reduziu o vigor dos embriões hidratados, sendo que embriões vigorosos não foram identificados quando $\psi \leq -2$ MPa foram utilizados em embriões nas duas condições.

Para a realização das avaliações descritas nas próximas seções, além da condição inicial (controle) e de $\psi = 0$ MPa, foram considerados como tratamentos ψ que proporcionaram

estresses moderados e severos em embriões desidratados ou hidratados. Para embriões desidratados, considerou-se que $\psi = -2$ MPa, induziu estresse moderado, uma vez que ele reduziu a capacidade hídrica (capacidade de absorver ou reter água) em $1,2 \text{ mg H}_2\text{O mg}^{-1} \text{ DM}$ (Fig. 2), não reduziu significativamente a viabilidade e eliminou o vigor dos embriões (Fig. 3A-B); $\psi = -4$ MPa foi considerado indutor de estresse severo, por reduzir a capacidade hídrica em $1,7 \text{ mg H}_2\text{O mg}^{-1} \text{ DM}$ (Fig. 2) e reduzir em 75% a viabilidade dos embriões (Fig. 3A). Para embriões hidratados, $\psi = -1$ MPa foi considerado indutor de estresse moderado, uma vez que ele reduziu a capacidade hídrica em $0,6 \text{ mg H}_2\text{O mg}^{-1} \text{ DM}$ (Fig. 2), não reduziu a viabilidade e diminuiu em 54% o vigor dos embriões (Fig. 3A-B); $\psi = -2$ MPa foi considerado indutor de estresse severo, por reduzir a capacidade hídrica em $1,4 \text{ mg H}_2\text{O mg}^{-1} \text{ DM}$ (Fig. 2), reduzir em mais de 60% a viabilidade dos embriões e eliminar o seu vigor (Fig. 3A-B). Além disto, o efeito da hidratação rápida pôde ser avaliada, pela comparação do efeito da exposição dos embriões desidratados diretamente em água destilada ($\psi = 0$ MPa), enquanto que o efeito da hidratação lenta foi avaliado pela comparação entre as condições iniciais (controles), nas condições desidratada e hidratada, uma vez que neste caso, a hidratação foi realizada ao longo de 72 horas e com os embriões inseridos nas sementes.

3.3. Histolocalização de O_2^- e quantificação de H_2O_2

Os embriões de *B. capitata* apresentam duas regiões morfológicamente distintas: o pecíolo cotiledonar, a qual abriga o eixo embrionário e tem papel determinante na germinação e o haustório, região responsável pela mobilização de reservas endospermicas (Fig. 4) (Oliveira et al., 2013; Dias et al., 2017).

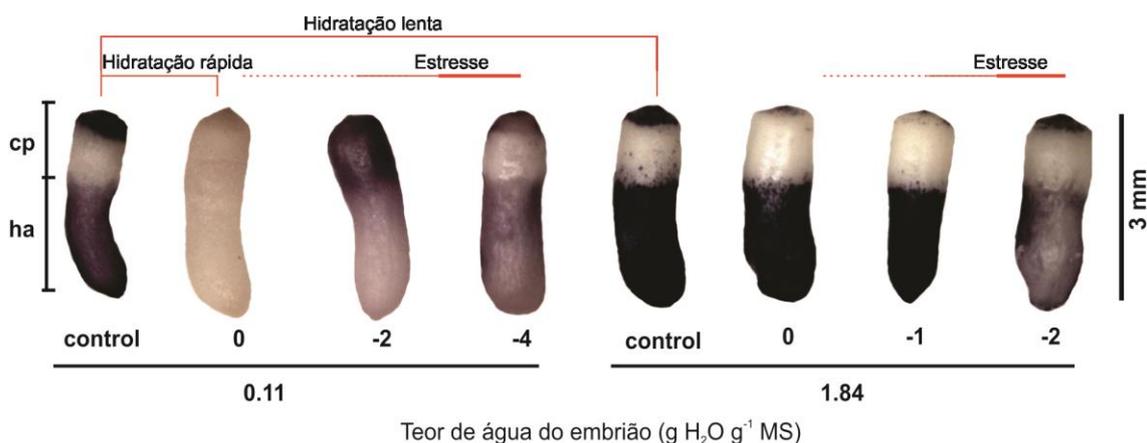


Figura 4 – Imagens de embriões de *Butia capitata* submetidos à diferentes ψ nas condições hidratada ($0,11 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$) ou hidratada ($1,84 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$), corados com NBT para a histolocalização de O_2^- (identificado pela cor púrpura). As linhas em vermelho indicam as comparações relacionadas aos processos avaliados. pc: pecíolo cotiledonar; ha: haustório

Em geral, a produção de O_2^- foi expressivamente maior nos embriões hidratados, em relação aos desidratados. Nos embriões desidratados, na condição inicial, foi identificado O_2^- acumulado no ápice do pecíolo cotiledonar e em todo o haustório. A hidratação rápida levou à expressiva remoção de O_2^- em todo o embrião, enquanto que a hidratação lenta ocasionou intensificação da produção do íon nas mesmas regiões em que o mesmo foi observado na condição inicial. Nos embriões desidratados, o estresse moderado ($\psi = -2$ MPa) ocasionou produção de O_2^- especialmente no pecíolo cotiledonar, o que ocorreu, no caso do estresse severo ($\psi = -4$ MPa) no ápice do pecíolo cotiledonar e em todo o haustório. Nos embriões hidratados, tanto a exposição à $\psi = 0$, quanto o estresse moderado ($\psi = -1$ MPa), levaram a remoção de O_2^- no pecíolo cotiledonar e intensa produção do íon no haustório. Sob estresse severo ($\psi = -2$ MPa), houve redução da produção de O_2^- , num padrão semelhante ao observado para os embriões desidratados sob o mesmo nível de estresse.

A concentração de H_2O_2 não foi afetada pela hidratação rápida ou lenta (Fig 5A). Nos embriões desidratados os estresses moderados e severos não afetaram a concentração de H_2O_2 , a qual teve expressivo aumento, no caso dos embriões hidratados, apenas sob estresse moderado.

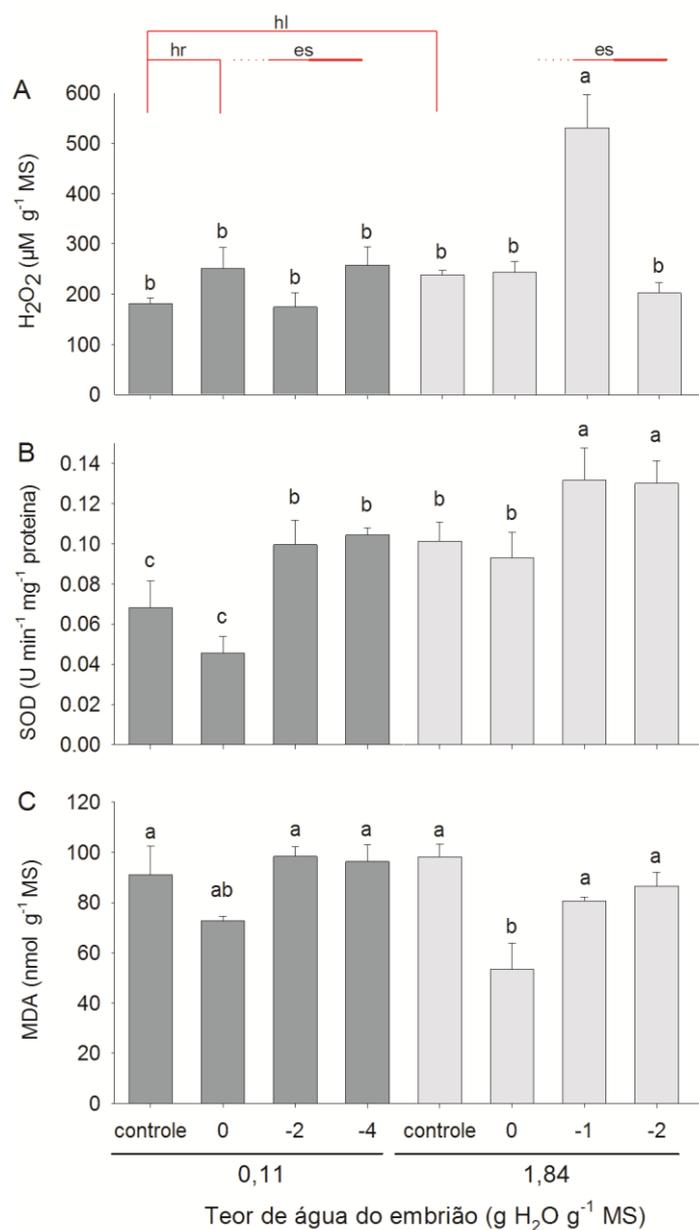


Figura 5 – Concentração de H₂O₂ (A), atividade de SOD (B) e concentração de MDA (C) em embriões de *Butia capitata* submetidos a diferentes ψ nas condições hidratada (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou desidratada (1,84 g H₂O g⁻¹ MS). As linhas em vermelho indicam as comparações relacionadas aos processos avaliados, sendo, hr: hidratação rápida; hl: hidratação lenta; es: estresse hídrico. Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0.05$). As barras representam o erro padrão da média.

3.3. Atividades de enzimas do sistema antioxidante e quantificação de MDA

Não foi detectada atividade da enzima APX e não houve diferença significativa nas atividades das enzimas CAT ($M=10,44 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína; $P=0,407$) entre os tratamentos

avaliados. A hidratação rápida não afetou atividade SOD, a qual teve incremento com a hidratação lenta (Fig. 5B). As condições de estresse moderado e severo, tanto em embriões desidratados, quanto em embriões hidratados induziram aumento da atividade SOD. O conteúdo do indicador de peroxidação lipídica (MDA) não foi afetado pela hidratação ou pelos estresses a que foram submetidos os embriões (Fig. 5C). No entanto, a exposição dos embriões hidratados à $\psi = 0$ MPa reduziu a concentração de MDA, em relação aos demais tratamentos.

3.4. Quantificação de ABA

Tanto a hidratação rápida, quanto à lenta, elevaram expressivamente as concentrações de ABA nos embriões (Fig. 6). Nos embriões desidratados os estresses moderado e severo levaram à redução do conteúdo de ABA, em relação à $\psi = 0$ MPa, porém, os níveis do hormônio permaneceram mais elevados que na condição inicial. Nos embriões hidratados, a exposição à $\psi = 0$ MPa e o estresse moderado ($\psi = -1$ MPa) elevaram a concentração de ABA, em relação ao controle, enquanto que o estresse severo promoveu redução no conteúdo do hormônio.

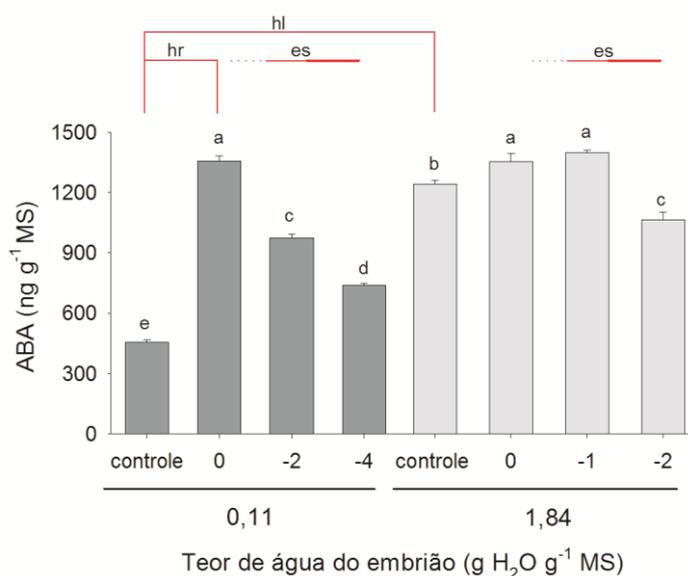


Figura 6 – Concentração de ABA (ng g⁻¹ MF) em embriões de *Butia capitata* submetidos a diferentes ψ nas condições hidratada (0,11 g H₂O g⁻¹ MS) ou hidratada (1,84 g H₂O g⁻¹ MS). As linhas em vermelho indicam as comparações relacionadas aos processos avaliados, sendo, hr: hidratação rápida; hl: hidratação lenta; es: estresse hídrico. Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0.05$). As barras representam o erro padrão da média

3.5. Integridade de membranas – condutividade elétrica e lixiviação de solutos

Em geral, os embriões desidratados demonstraram menor controle da lixiviação de solutos, com maiores níveis de condutividade elétrica e de K^+ e Mg^{2+} lixiviados (Fig. 6A-C). A avaliação da condutividade elétrica e a quantificação de K^+ apresentaram resultados bastante parecidos, o que sugere que este é o íon mais lixiviado. Por outro lado, não houve efeito dos tratamentos sobre a concentração de Ca^{2+} na solução, o que indica que os embriões possuem grande capacidade de retenção deste íon. A lixiviação de Mg^{2+} ocorreu em valores aproximadamente 10 vezes menores, em relação ao K^+ .

A hidratação rápida não afetou a condutividade elétrica e levou à redução da lixiviação de K^+ , no entanto houve aumento na lixiviação de Mg^{2+} (Fig. 7A-C). O estresse moderado nos embriões desidratados não afetou a condutividade elétrica e a lixiviação de K^+ , características que foram afetadas pelo estresse severo (Fig. 7A-B). A lixiviação de Mg^{2+} foi aumentada, em relação ao controle, tanto no estresse moderado, quanto no severo (Fig. 7C).

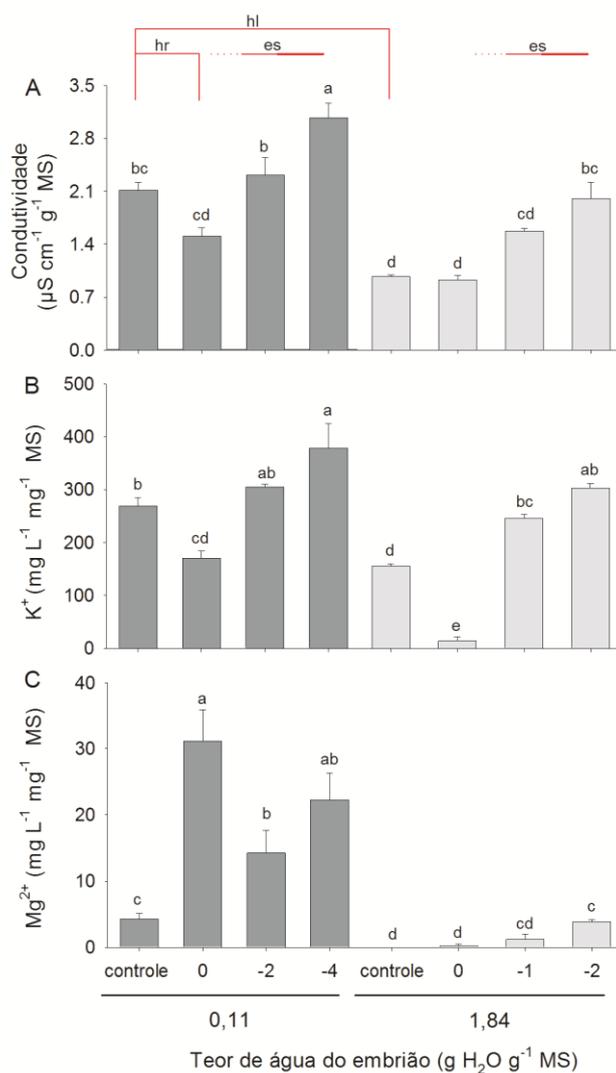


Figura 7 – Condutividade elétrica (A) e lixiviação de íons K^+ (B) e Mg^{2+} (C) avaliados em embriões de *Butia capitata* submetidos à diferentes ψ nas condições hidratada (0,11 g H_2O g^{-1} MS) ou desidratada (1,84 g H_2O g^{-1} MS). As linhas em vermelho indicam as comparações relacionadas aos processos avaliados, sendo, hr: hidratação rápida; hl: hidratação lenta; es: estresse hídrico. Letras distintas indicam que os tratamentos diferiram entre si (teste Tukey, $p < 0.05$). As barras representam o erro padrão da média.

Nos embriões hidratados, a exposição à $\psi = 0$ MPa, por 12h, reduziu a lixiviação de K^+ , em relação ao controle, mas não afetou a condutividade e a lixiviação de Mg^{2+} (Fig. 7A-C). O estresse moderado elevou apenas a lixiviação de K^+ , enquanto que o estresse severo elevou tanto a condutividade quanto a lixiviação dos dois íons.

3.6. Avaliações ultraestruturais

As células da protoderme do pecíolo cotiledonar, na condição inicial, apresentaram paredes delgadas e levemente sinuosas (Fig. 8A-B); o citoplasma era denso e rico em organelas, especialmente mitocôndrias, mas também dictiossomos e proplastídeos. Numerosos pequenos vacúolos armazenavam proteína, revelada por teste histoquímico (dados não apresentados). Os embriões hidratados ($\psi = 0$ MPa) apresentaram células túrgidas e sem sinuosidade na parede (Fig. 8C). Nessa condição, o citoplasma se manteve denso, porém, com número reduzido de mitocôndrias e dictiossomos; observou-se a proliferação de retículo endoplasmático, comumente associado a ribossomos (Fig. 7C-D). Houve fusão de vacúolos contendo resíduos de proteínas, com aspecto floculado, indicando o início da mobilização de reservas; numerosos corpos lipídicos, revelados por teste histoquímico (dados não apresentados), encontravam-se organizados em torno dos vacúolos. A imersão em solução dos embriões em solução com a $\psi = -1$ MPa não provocou danos aparentes às células da protoderme (Fig. 8E-F). O depósito de proteínas era mais abundante no interior dos vacúolos, em relação ao observado no tratamento $\psi = 0$ MPa, indicando que houve restrição à mobilização. Os vacúolos comumente apresentavam resíduos de membranas em seu interior. Glioxissomos, com matriz granular ocorreram no citoplasma, usualmente próximos a mitocôndrias e corpos lipídicos (Fig. 8F). O estresse gerado pela imersão dos embriões em solução com $\psi = -2$ MPa proporcionou danos severos às células da protoderme. A parede celular apresentou elevada sinuosidade e o protoplasto sofreu forte retração (Fig. 8G). Notadamente houve acúmulo de substâncias no espaço periplasmático, tais como lipídeos e resíduos de membrana. O citoplasma apresentou-se pouco denso, com baixa população de organelas, sendo ausentes mitocôndrias, retículos endoplasmáticos, dictiossomos, glioxissomos e plastídeos. A proteína se manteve acumulada em pequenos vacúolos, porém, indicando que a mobilização foi restringida (Fig. 8H). Os corpos lipídicos estavam distribuídos aleatoriamente no citoplasma, sendo que muitos se apresentavam, parcialmente, degradados.

O núcleo encontrava-se localizado na periferia da célula e estava notadamente contraído, sem o envoltório nuclear (Fig. 8G).

As células do meristema fundamental do pecíolo cotiledonar exibiram diferenças significativas em relação aquelas da protoderme. Na condição inicial, a proteína (evidenciada por testes histoquímicos - dados não apresentados) estava armazenada em vacúolos de tamanhos variáveis e também distribuída no citoplasma (Fig. 9A-B). Corpos lipídicos, de contorno irregular, encontravam-se posicionados periféricamente e havia pequenos grãos de amido no citoplasma. A hidratação dos embriões ocasionou intensa mobilização protéica e a formação de grandes vacúolos apresentando resíduos protéicos, os quais estavam ladeados por pequenos corpos lipídicos, de contorno esférico (Fig. 9C-D). Embriões submetidos a $\psi = -1$ MPa também apresentavam evidência de intensa mobilização protéica (ao contrário do observado nas células protodérmicas) (Fig. 9E), além da presença de glioxissomos, comumente associados à mitocôndrias (Fig. 9F). Sob WS ($\psi = -2$ MPa), as células apresentaram-se parcialmente colapsadas, com conspícuas invaginações na parede (Fig. 9G-H). A proteína não havia sido mobilizada e estava distribuída no citoplasma e no interior de vacúolos, dentro dos quais frequentemente havia corpos lipídicos e resíduos de membranas.

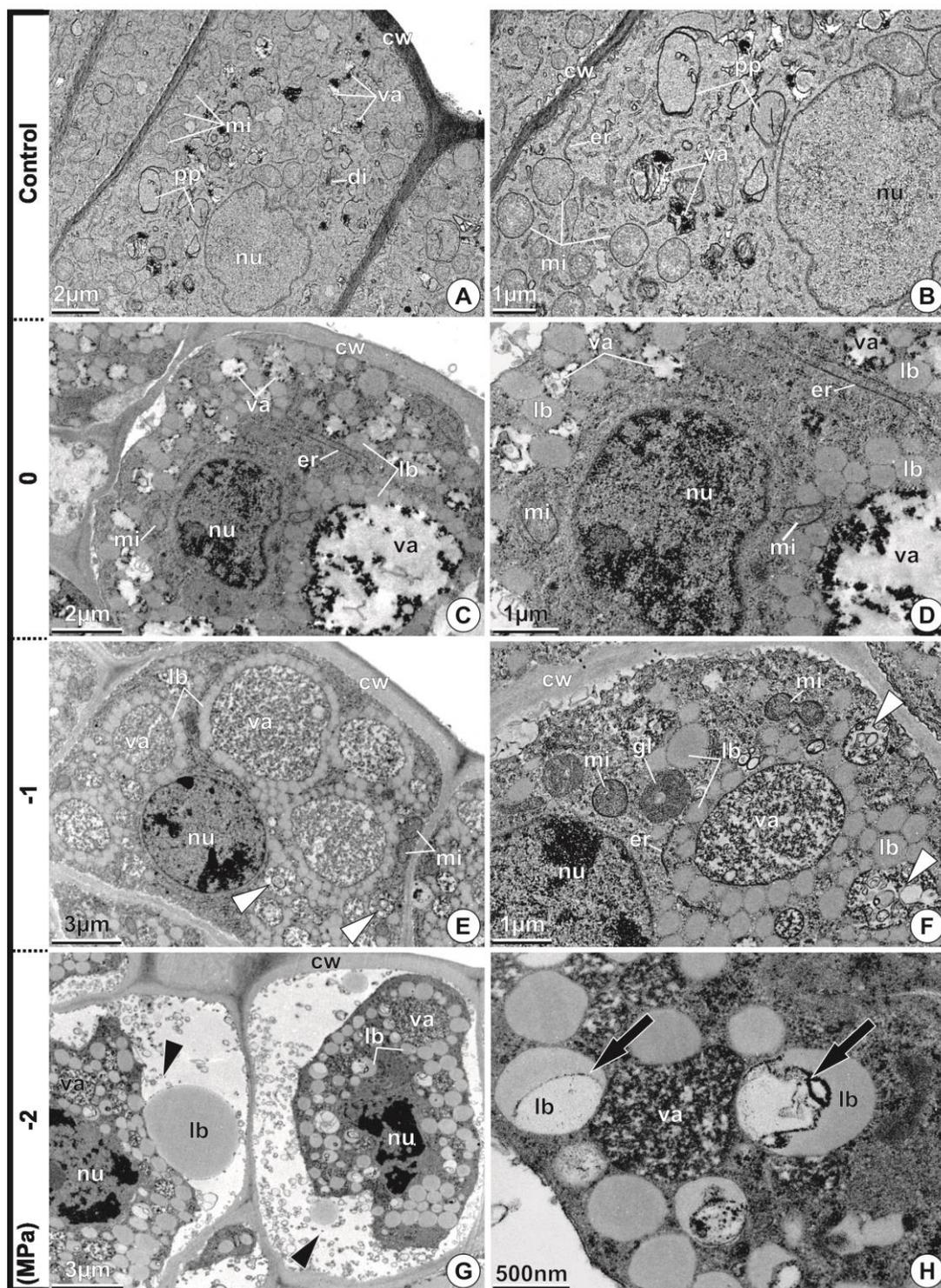


Figura 8 – Imagens obtidas por MET da protoderme do pecíolo cotiledonar de embriões de *Butia capitata* desidratados ($0,11 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$) (A-B) ou hidratados ($1,84 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$) e submetidos à diferentes ψ (indicados na coluna à esquerda) (C-H). A, B) Célula com parede delgada; citoplasma denso, rico em organelas, contendo pequenos vacúolos proteicos. C, D) Região mediana da célula mostrando vacúolos contendo resíduos de proteínas, indicando início da mobilização proteica durante a embebição. E) Célula contendo vacúolos proteicos ladeados de corpos lipídicos esféricos. F) Periferia da célula destacando os glioxissomos e resíduos de

membranas (pontas de setas brancas) dentro dos vacúolos proteicos. G) Célula com notável contração do protoplasto e acúmulo de substâncias no espaço periplasmático (pontas de setas pretas); núcleo contraído e sem o envoltório. H) Periferia da célula indicando intensa mobilização lipídica (setas pretas) e vacúolos proteicos íntegros. cw, parede celular; di, dictiossomo; er, retículo endoplasmático; gl, glioxissomo; lb, corpos lipídicos; mi, mitocôndria; nu, núcleo; pp, proplastídeo; va, vacúolo proteico

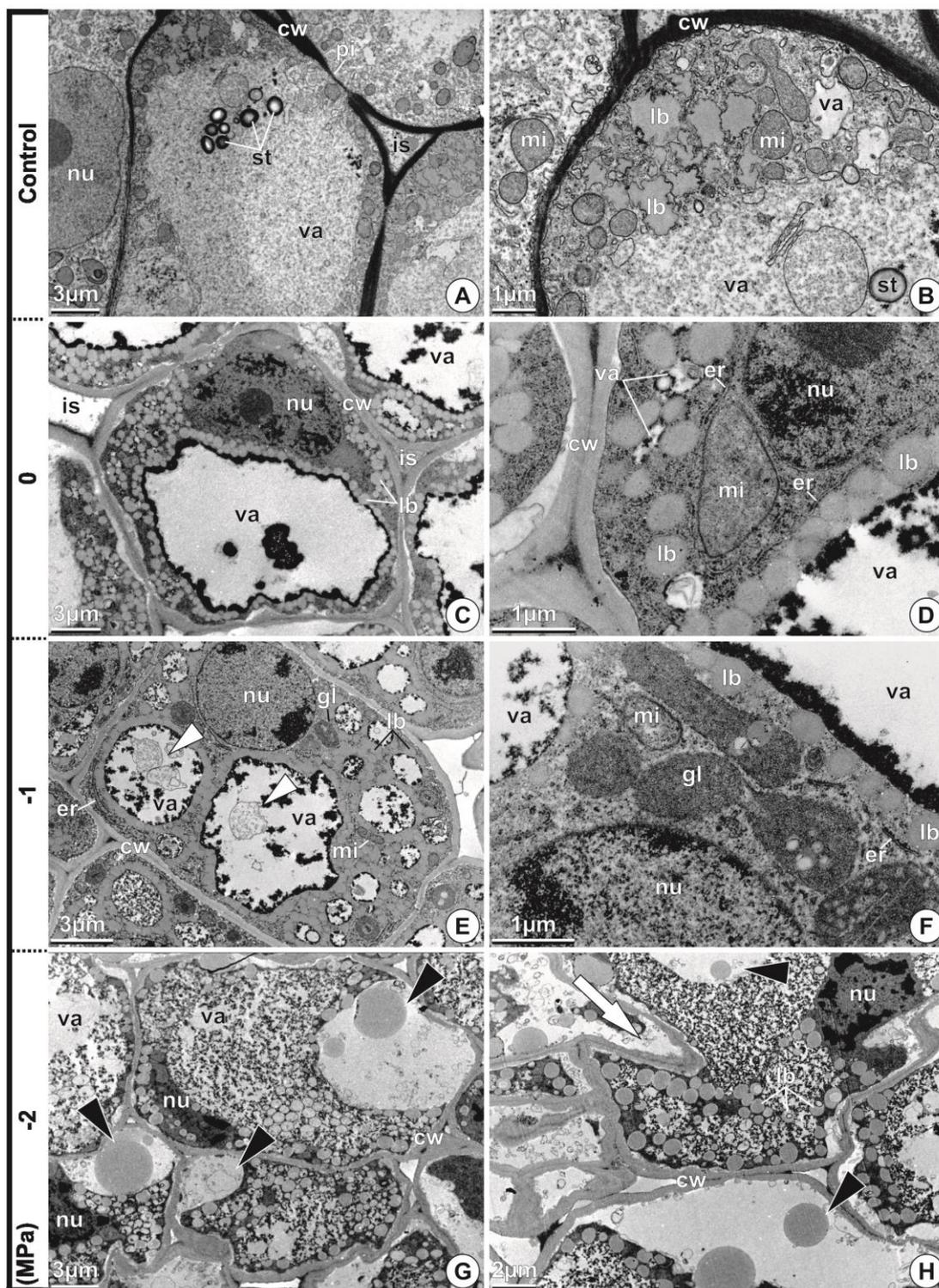


Figura 9 – Imagens obtidas por MET de células do meristema fundamental do pecíolo cotiledonar de embriões de *Butia capitata* desidratados ($0,11 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$) (A-B) ou hidratados ($1,84 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$) e submetidos à diferentes ψ (indicados na coluna à esquerda) (C-H). A, B) Células com parede delgada, citoplasma denso, rico em mitocôndrias, grandes vacúolos protéicos, corpos lipídicos e amido. C, D) Células com vacúolo contendo resíduos de proteína, de aspecto floculado, ladeado por pequenos corpos lipídicos esféricos. E) Célula com vacúolos protéicos contendo resíduos de proteína e resíduos de membrana (pontas de setas brancas). F)

Periferia da célula mostrando glioxissomos associados a mitocôndrias e corpos lipídicos. G, H) Células com parede fortemente sinuosa (seta branca), conspícua contração do protoplasto e acúmulo de substâncias no espaço periplasmático (pontas de setas pretas); proteína em vacúolos e no citoplasma. cw, parede celular; di, dictiossomo; er, retículo endoplasmático; gl, glioxissomo; is, espaço intercelular; lb, corpos lipídicos; mi, mitocôndria; nu, núcleo; pi, campo de pontoação primário; pp, proplastídeo; st, amido; va, vacúolo proteico.

As principais alterações citológicas evidenciadas nos embriões em reposta aos ψ estão resumidas na Figura 10.

Estruturas	(MPa)			
	controle	0	-1	-2
Sinuosidade da parede				■
Densidade do citoplasma	■	■	■	■
Mitocôndria	■	■	■	■
Retículo endoplasmático	■	■	■	■
Dictiossomo	■	■	■	■
Glioxissomo	■	■	■	■
Proplastídeo	■	■	■	■
Vacúolo	■	■	■	■
Proteína	■	■	■	■
Lipídeo	■	■	■	■
Amido	■	■	■	■
Contração do protoplasto	■	■	■	■
Envoltório nuclear	■	■	■	■

■ Frequente ■ Pouco frequente ■ Raro ou ausente

Figura 10 – Esquema ilustrando alterações celulares na protoderme e no meristema fundamental do pecíolo cotiledonar de embriões de *Butia capitata* desidratados (controle) ou hidratados e submetidas a diferentes ψ

4. Discussão

O diásporo da palmeira *B. capitata* é constituído pelo pirênio (semente envolvida pelo endocarpo), o qual, normalmente, é introduzido em bancos de sementes no solo, após o consumo do mesocarpo carnoso pelos dispersores (Oliveira et al., 2013). Apesar do endocarpo ser rígido e proteger a semente, o embrião mantém contato com o ambiente por meio de um poro germinativo, que estabelece uma via para o fluxo de água e ar (Fig. 11). As sementes da espécie podem permanecer longos períodos em bancos de sementes, devido seu alto nível de dormência e tolerância à dessecação (Dias et al., 2015, 2017). *B. capitata* ocorre na transição entre os biomas Cerrado e Caatinga, na região central do Brasil, caracterizada pelo clima semi-árido, com precipitação sazonal e irregular e solos arenosos (Carvalho et al., 2015). Neste ambiente, as sementes passam por ciclos de hidratação e desidratação até que a dormência

seja superada (Oliveira et al., 2013; Dias et al., 2017). Além disso, o bioma Cerrado é marcado pela incidência de incêndios, que podem contribuir para a redução do ψ do solo a níveis extremamente baixos (Fichino et al., 2016). Nesse contexto, no presente trabalho, procurou-se caracterizar as respostas fisiológicas e ultraestruturais de embriões desidratados e hidratados de *B. capitata* submetidos a condições de WS moderado e severo, além da hidratação rápida e lenta, simulando condições de ocorrência nos ciclos de hidratação nos bancos de semente.

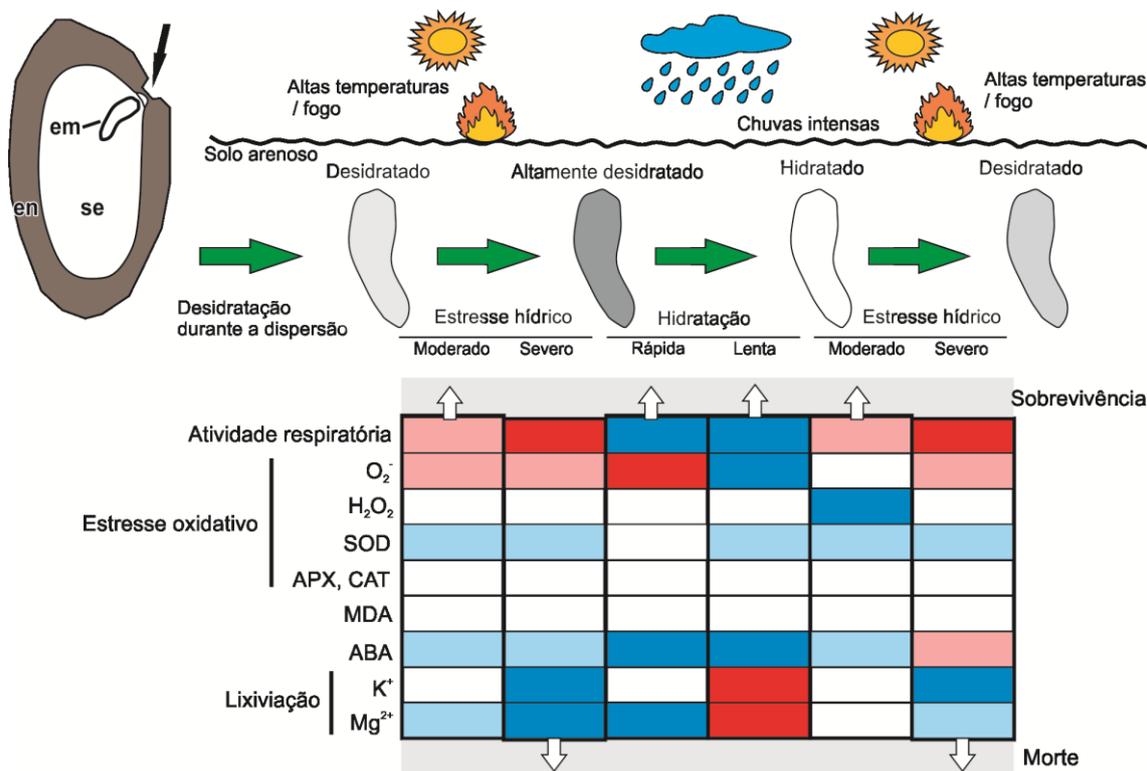


Figura 11 – Esquema ilustrando o pirênio *Butia capitata* (canto superior esquerdo), com destaque para o poro germinativo (seta), as principais causas de estresse hídrico a que são submetidos os embriões em bancos de sementes e as respostas fisiológicas associadas. No quadro, as cores vermelha e azul indicam, respectivamente aumento ou diminuição da resposta, em relação aos controles (embriões desidratados ou hidratados nas condições iniciais), em condição de estresse moderado. em, embrião; en, endocarpo; se, semente.

4.1. Aspectos da tolerância ao WS em embriões desidratados

Embriões desidratados de *B. capitata* têm elevada capacidade de resistência ao WS em bancos de semente, devido à capacidade hídrica associada à abundância de reservas, controle do estresse oxidativo e elevado conteúdo de ABA. No momento da abscisão, os embriões de *B. capitata* apresentam conteúdo de água próximo de 1,8 g H₂O g MS⁻¹. Durante a dispersão os embriões passam por processo de desidratação, atingindo, nos bancos de semente, equilíbrio hídrico com o ambiente com teor de água próximo à 0,1 g H₂O g MS⁻¹ (Carvalho et al., 2015).

No presente trabalho, evidenciou-se que os embriões desidratados apresentam baixo ψ (-8,5 MPa) e elevada capacidade hídrica (Fig. 2). O WS proporcionado por $\psi = -2$ MPa, o qual, normalmente, não ocorre no solo (Kirkham, 2005), mas que pode ocorrer, por exemplo, em caso de incidência de fogo, não afetou a viabilidade dos embriões. Esta condição está associada à abundância de reservas embrionárias (proteínas, lipídios e amido), já evidenciadas em outros estudos (Magalhães et al., 2013; Oliveira et al., 2013). As reservas proteicas e amiláceas influenciam diretamente o ψ matricial, principal componente do ψ relacionado à capacidade hídrica das sementes desidratadas (Nonogaki et al., 2010; Beewley et al., 2013). Além disto, diversas proteínas e carboidratos têm papel crucial na proteção das membranas celulares em condição de desidratação intensa (Berjak and Pammenter, 2008; Marques et al., 2018). A capacidade de preservação das membranas refletiu no baixo nível de lixiviação de solutos observados nos embriões desidratados sob estresse moderado (Fig. 11). Outro aspecto a ser considerado é que o estresse hídrico restringe o metabolismo. Nesta condição, a produção de ROS é limitada (Apel e Hirt, 2004; Bailly, 2004), como nós evidenciamos pela baixa produção de O_2^- e H_2O_2 . Além disto, a atividade SOD, relacionada à limpeza de O_2^- , aumentou nas condições de WS. Deste modo, a peroxidação lipídica (avaliada pela quantificação de MDA), potencialmente danosa às membranas celulares, permaneceu em níveis estáveis mesmo no caso de WS severo.

Merece destaque o elevado conteúdo de ABA presente nos embriões de *B. capitata* e sua síntese, mesmo em condição de baixo metabolismo (Fig. 11). Altas concentrações de ABA também foram observadas em embriões de *Acrocomia aculeata* (Ribeiro et al., 2015) e *Attalea vitrivir* (Dias et al., 2017), palmeiras com sementes altamente tolerantes à dessecação e que também ocorrem no bioma Cerrado. O ABA é considerado um hormônio-chave na tolerância ao estresse hídrico, condição que, comumente, promove aumento na biossíntese (Ozfidan et al., 2012). O fitormônio atua como mensageiro de diversas redes de sinalização celular que desencadeiam a expressão de genes relacionados com a tolerância ao estresse e na ativação do sistema antioxidante, resultando na redução de ROS e MDA (Ozfidan et al., 2012; Souza et al., 2017). A capacidade de síntese de ABA, mesmo em condição de estresse hídrico severo, evidenciado no presente trabalho, pode ser considerado um aspecto chave da tolerância à dessecação em embriões de *B. capitata*.

4.2. Efeitos da hidratação sobre a fisiologia e ultraestrutura dos embriões

Os embriões de *B. capitata* toleram a hidratação rápida e a elevação do ψ está associada à mobilização de reservas, restauração da funcionalidade das membranas e ao controle do estresse oxidativo. Em condições ambientais, as sementes de *B. capitata* podem permanecer vários meses em solo seco durante o inverno e chuvas torrenciais na primavera podem alterar drasticamente o status hídrico (Carvalho et al., 2015). Nós observamos considerável elevação do ψ (de -8,5 para -0,2 MPa) com a hidratação dos embriões. A

avaliação do vigor, pelo teste de tetrazólio, evidenciou aumento da atividade respiratória com a hidratação e as avaliações ultraestruturais mostraram intensa mobilização de proteínas, além de mobilização de amido, apesar de a massa seca dos embriões não ter sido alterada significativamente (Fig. 1; 9C; 11). Estas observações sugerem que a expressiva redução do ψ dos embriões seja devida, além da hidratação de proteínas, amido e celulose (ψ matricial), à redução do ψ osmótico relacionado à rápida mobilização de reservas.

A hidratação constitui a primeira etapa do processo germinativo, no entanto, em sementes de diversas espécies, a hidratação rápida pode causar danos celulares severos (Bewley et al., 2013). No presente trabalho evidenciou-se que tanto a hidratação rápida quanto a lenta não afetaram a viabilidade dos embriões (Fig. 11). Com a hidratação lenta a funcionalidade das membranas foi restaurada, sendo constatada expressiva redução na lixiviação de solutos, em relação à condição desidratada. Embora a hidratação rápida em embriões de *B. capitata* tenha promovido aumento na atividade respiratória, houve redução na produção de O_2^- , enquanto a produção de H_2O_2 não foi afetada, o que sugere que o metabolismo ainda esteja em ajuste, nesta condição. Em decorrência da hidratação lenta, nós observamos expressivo aumento na produção de O_2^- , o que esteve relacionado ao aumento da atividade SOD. A atividade enzimática possivelmente contribuiu para estabilidade da peroxidação lipídica (avaliada pelo nível de MDA) (Fig. 11).

A embebição está relacionada à preparação para o processo germinativo por meio da retomada do metabolismo e remoção de inibidores (Finch-Savage e Leubner-Metzger, 2006; Bewley et al., 2013). No presente trabalho evidenciou-se que a concentração de ABA (um dos principais inibidores da germinação) aumentou com a embebição. A síntese de ABA pelos embriões é reconhecida como um mecanismo de manutenção da dormência (Bewley et al., 2013), sendo que o hormônio é considerado chave para o controle da germinação de *B. capitata* e outras palmeiras do Cerrado (Ribeiro et al., 2015; Dias et al., 2017). Consideram-se que a rápida síntese de ABA em resposta à hidratação por embriões de *B. capitata* constitua um mecanismo de prevenção da germinação em condições instáveis produzidas, por exemplo, pelas chuvas esparsas que são típicas da primavera do Cerrado.

4.3. Respostas fisiológicas e ultraestruturais ao WS em embriões de sementes hidratadas

Embriões de *B. capitata* quando hidratados tem elevada tolerância ao estresse hídrico, o que está relacionado ao controle do estresse oxidativo e da funcionalidade das membranas, além da elevação do conteúdo de ABA. Sob estresse severo a perda da viabilidade dos embriões está associada ao bloqueio da mobilização proteica, perda da funcionalidade das membranas e desestruturação celular. Em condições naturais, a dormência impede a germinação da maioria das sementes de *B. capitata* hidratadas após as primeiras chuvas da primavera, e elas ficam sujeitas ao novo WS (Oliveira et al., 2013; Mazzottini-dos-Santos et al., 2018). No presente trabalho, evidenciou-se que os embriões hidratados da espécie apresentam

considerável capacidade hídrica, com resistência à perda de água e manutenção da viabilidade mesmo sob $\psi = -1$ MPa, o qual não ocorre comumente nos solos (Kirkham, 2005).

Em condição de estresse moderado ou severo, observou-se incremento na atividade SOD, o que, possivelmente contribuiu para o controle dos níveis de O_2^- , que inclusive caíram, no caso de estresse severo (Fig. 11). Por outro lado, observou-se que a produção de H_2O_2 foi expressivamente aumentada nos embriões submetidos ao estresse moderado. O evento esteve relacionado a proliferação de glioxissomos (evidenciada nas avaliações ultraestruturais; Fig. 9F), organela envolvida na produção desta substância pela beta oxidação de lipídios (Bailly, 2004; El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008). Apesar de que níveis elevados de H_2O_2 , comumente, estarem relacionados a danos celulares (Bailly, 2004; Diaz-Vivancos et al., 2013), constatou-se que a peroxidação lipídica, a funcionalidade das membranas e a estrutura celular não foram afetadas (Fig. 11). Como o sistema antioxidante enzimático relacionado à remoção de H_2O_2 (atividade CAT e APX) não foi ativado, é possível que mecanismos alternativos de proteção contra o estresse oxidativo sejam efetivos, assim como a elevação da concentração de ABA, num padrão próximo ao observado, no caso dos embriões desidratados. Alguns estudos demonstraram que embriões de espécies de palmeiras da tribo Cocoseae, como *B. capitata*, acumulam os potentes antioxidantes tocoferóis e tocotrienóis (Siles et al., 2013; Barreto et al., 2014). Outros trabalhos têm evidenciado que formas oxidadas de proteínas têm papel destacado na limpeza de ROS (Job et al., 2005; Barba-Espín et al., 2012). Além disto, merece consideração o fato de que as reservas lipídicas podem competir com ácidos graxos poliinsaturados das membranas como alvos de ataque de ROS (Wojtyla et al., 2016), atenuando os efeitos do estresse oxidativo. A elucidação da composição das abundantes reservas proteicas evidenciadas nos embriões de *B. capitata* (Oliveira et al., 2013), além da investigação sobre mecanismos antioxidantes não enzimáticos poderão, em trabalhos futuros, contribuir para o aprofundamento do conhecimento sobre a tolerância ao estresse oxidativo na espécie.

Quando se aplicou WS severo ($\psi = -2$ MPa) os embriões perderam completamente o vigor e apresentaram declínio de 56% na viabilidade, o que esteve associado ao expressivo aumento na lixiviação de íons (Fig. 11). A isso também se associa ao bloqueio da mobilização de proteínas e desestruturação celular, visível pela invaginação da parede celular, redução da população de organelas, retração do protoplasto, presença de resíduos e membrana no espaço periplasmático, perda do envoltório nuclear, degradação de lipídeos (Fig. 8G; 9G). Em conjunto estes processos são comuns à resposta ao WS decorrente de danos biofísicos aos componentes celulares (Berjak and Pammenter, 2008).

A partir dos resultados do presente trabalho é possível concluir que os embriões desidratados de *B. capitata* possuem grande resistência ao estresse hídrico, devido à capacidade hídrica, abundância de reservas, mecanismos de controle do estresse oxidativo e elevado conteúdo de ABA. O embrião desidratado apresenta baixo ψ e tolerância à hidratação rápida. A elevada tolerância ao WS está relacionada ao controle do estresse oxidativo,

preservação da funcionalidade das membranas e elevada capacidade de síntese de ABA. A perda da viabilidade sob estresse severo ocorre por danos biofísicos à estrutura celular.

5. Contribuições

LMR e PSNL conceberam o trabalho. BGG realizou os experimentos, coletou as amostras, e redigiu o texto inicial. DSD realizou as análises e interpretou os resultados sobre estresse oxidativo. CPSM realizou as análises e interpretou os resultados sobre ABA. HCMS e MOM-S realizaram as avaliações ultraestruturais e citoquímicas e interpretaram os resultados relacionados. LMR e PSNL interpretaram os dados sobre relações hídricas. LMR redigiu o texto final. Todos os autores leram e concordaram com a versão final do manuscrito.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado a BGG. e ao CNPq pela bolsa de pós-doutorado concedida à CPSM e pelas bolsas de produtividade em pesquisa concedidas a LMR, PSNL e MOM-S.

Referências

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environ.** 24, 1337–1344.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Sci. Res.** 14, 93-107.
- Barba-Espín, G., Hernández, J.A., Diaz-Vivancos, P., 2012. Role of H₂O₂ in pea seed germination. **Plant Signal. Behav.** 7, 193–195.
- Barreto, L.C., Garcia, Q.S., Morales, M., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2014. Vitamin E and defense-related phytohormones are reliable markers of embryo growth in macaw palm fruits exposed to various storage conditions. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** 118, 203-213.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. **Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination.** Academic Press, San Diego.
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2008. **From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective.** *Ann. Bot.* 101, 213-228.

- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H. (Eds.), 2013. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. Springer, New York.
- Bicalho, E.M., Santos, T.R., Garcia, Q.S., 2018. Abscisic acid and the antioxidant system are involved in germination of *Butia capitata* seeds. **Acta Bot. Bras.**
- Brasil, 2009. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF.
- Cakmak I., Horst. W.J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.** 83, 463–468.
- Carvalho, V.S., Ribeiro, L.M., Lopes, P.S.N., Agostinho, C.O., Matias, L.J., Mercadante-Simões, M.O., Correia, L.N.F., 2015. Dormancy is modulated by seed structures in palms of the Cerrado biome. **Aust. J. Bot.** 63, 444-454.
- Dias, D.S., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., Oliveira, L.A.A., Mendes, E.V., Carvalho, V.S., 2015. Tolerance of desiccation and cryopreservation of *Butia capitata* palm seeds. **Seed Sci. Technol.** 43, 90-100
- Dias, D.S., Ribeiro, L.M., Lopes, P.S.N., Munné-Bosch, S., Garcia, Q.S., 2017. Hormonal profile and the role of cell expansion in the germination control of Cerrado biome palm seeds. **Plant. Physiol. and Biochem.** 118, 168-177.
- Diaz-Vivancos, P., Barba-Espín, G., Hernández, J.A., 2013. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. **Plant Cell Rep.** 32, 1491-1502.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C., 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signal Behav.** 3, 175–182.
- Feder, N., O'Brien, T.P., 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. **Am. J. Bot.** 55, 123–142.
- Fichino, B.S., Dombroski, J.R., Pivello, V.R., Fidelis, A., 2016. Does fire trigger seed germination in the Neotropical Savannas? Experimental tests with six Cerrado species. **Biotropica** 48, 181-187.
- Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. **New phytol.** 171, 501-523.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superóxido dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Phys.** 59, 309-314.
- Gomes-Copeland, K.K.P., Lédo, A.D.S., Almeida, F.T.C.D., Miranda, R.P., Santos, I.R.I., 2012. Assessing the viability of cryopreserved coconut zygotic embryos by electrolytic conductivity and potassium leaching. **Pesq. Agrop. Bras.** 47, 8-13.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolate Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** 125, 189-198.
- Huang, H., Song., 2013. Change in desiccation tolerance of maize embryos during development and germination at different water potential PEG-6000 in relation to oxidative process. **Plant. Physiol. and Bioche**, 68, p. 61-70, 2013.
- Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., Job, D., 2005. Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. **Plant Physiol.** 138, 790–802.
- Johansen, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.

Karnovsky, M. J. A. A formaldehyde-glutaraldehyde fixate of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 27, p. 137A-138A, 1965.

Kirkham, M. B. **Principles of soil and plant water relations**. Amsterdam; New York: Elsevier Academic Press, 2005.

Long, R.L., Gorecki, M.J., Renton, M., Scott, J.K., Colville, L., Goggin, D.E., Commander, L.E., Westcott, D.A., Cherry, H.; Finch-Savage, W.E., 2014. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. **Biol. Rev.** 90, 31-59.

Magalhães, H.M., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., Sant'Anna-Santos, B.F., Oliveira, D.M.T., 2013. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees** 27, 273-283.

Marques, A., Buijs, G., Ligterink, W., & Hilhorst, H., 2018. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. **Funct. Plant Biol.** 45, 1083-1095.

Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., 2018. Structural changes in the micropylar region and overcoming dormancy in Cerrado palms seeds. **Trees** 1-14.

Michel, B.E, Kaufmann, M. R., 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiol.** 51, 914-916.

Müller, M.L., Munné-Bosch, S., 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Plant Methods** 7, 37.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 22, 867-880.

Nonogaki, H., Bassel, G.W., Bewley, J.D., 2010. Germination—still a mystery. **Plant Sci.** 179, 574-581.

Oliveira, N.C.C., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., Mercandante-Simões, M.O., Oliveira, L.A.A., Silvério, F.O., 2013. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees** 27, 1633-1645.

Oracz K., Voegelé A., Tarkowská D., Jacquemoud D., Turecková V., Urbanová T., Strnad M., Sliwinska E., Leubner-Metzger G., 2012. Myrigalone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. **Plant Cell Physiol.** 53, 81-95.

Ozfidan, C., Turkan, I., Sekmen, A.H., Seckin, B., 2012. Abscisic acid-regulated responses of *aba2-1* under osmotic stress: the abscisic acid-inducible antioxidant defence system and reactive oxygen species production. **Plant Biol.** 14, 337-346.

Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 17, 208-212.

Ribeiro, L.M., Garcia, Q.S., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2015. Tissue specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. **Physiol. Plant.** 153, 627-642.

Ribeiro, L.M., Garcia, Q.S., Oliveira, D.M.T., Neves, S.C., 2010. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesq. Agrop. Bras.** 45, 361-368.

Roland, A.M., 1978. General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL (ed) **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. Elsevier, New York.

Siles, L., Cela, J., Munné-Bosch, S., 2013. Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the Arecaceae family. **Phytochemistry** 95, 207–214.

Souza, L.A., Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Gratão, P.L., Azevedo, R.A., 2017. Dealing with abiotic stresses: an integrative view of how phytohormones control abiotic stress-induced oxidative stress. **Theor. Exp. Plant Physiol.** 29,109-127.

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

Watson, M.L., 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals II. Application of solutions containing lead and barium. **J. Biophysic. Biochem. Cxtol** 727–730.

Wojtyła, Ł., Lechowska, K., Kubala, S., Garnczarska, M., 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. **Front. Plant Sci.** 7, 66.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O intuito deste trabalho não foi o de esgotar todas as abordagens aplicáveis em estudos relacionados às relações hídricas na germinação. Esta pesquisa ainda é um dos prelúdios para compreender as respostas fisiológicas e citológicas envolvidas na germinação de *B. capitata*.

Os resultados encontrados poderão ser úteis para esforços futuros em relação à adoção de iniciativas de conservação de populações naturais de *B. capitata*, pela sua relevância econômica, social, ecológica e ambiental. Além disso, através da agregação de conhecimentos científicos que instiguem a compreensão do comportamento do embrião e da plântula ao longo do processo germinativo e pós-germinativo e subsidiem o desenvolvimento de tecnologias de propagação para esta espécie.

Os resultados também podem ser úteis para direcionar pesquisas futuras em uma abordagem mais avançada, como no emprego de técnicas moleculares para classificação e identificação de proteínas e, por que não, prospecção de genes que conferem tolerância ao estresse abiótico com potencial de uso agrícola.