



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



Higor Fernando Salvador

ECOFISIOLOGIA DE BANCOS DE SEMENTES RECALCITRANTES DE *Mauritia flexuosa* (ARECACEAE)

Belo Horizonte – MG

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



Higor Fernando Salvador

ECOFISIOLOGIA DE BANCOS DE SEMENTES RECALCITRANTES DE *Mauritia flexuosa* (ARECACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal e Ecologia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador: Profa. Dra. Yule Roberta Ferreira Nunes
Universidade Estadual de Montes Claros

Belo Horizonte – MG

2022

043

Salvador, Higor Fernando.

Ecofisiologia de bancos de sementes recalcitrantes de *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) [manuscrito] / Higor Fernando Salvador. – 2022.

100 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro. Coorientador: Profa. Dra. Yule Roberta Ferreira Nunes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Fenômenos Fisiológicos Vegetais. 2. Germinação. 3. Dessecação. 4. Dormência de Plantas. I. Ribeiro, Leonardo Monteiro. II. Nunes, Yule Roberta Ferreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO DEFESA DE TESE

HIGOR FERNANDO SALVADOR

Data: 25/08/2022 Entrada: 2018/1 Mat 2018663555 CPF: 114.281.066-69
Título da tese: "Ecofisiologia de bancos de sementes recalcitrantes de *Mauritia Flexuosa* (Arecaceae)"

Comissão Examinadora

Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro (Universidade Estadual de Montes Claros)

Dr. José Marcio Rocha Faria (Universidade Federal de Lavras)

Dr. Fabian Borghetti (Universidade de Brasília)

Dr. Marcel Giovanni Costa França (UFMG)

Dr. Ailton Gonçalves Rodrigues Junior (Universidade Federal de Uberlândia)

Belo Horizonte, 25 de agosto de 2022

Assinaturas dos membros da Comissão Examinadora



Documento assinado eletronicamente por **Marcel Giovanni Costa França, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2022, às 08:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Marcio Rocha Faria, Usuário Externo**, em 29/08/2022, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Monteiro Ribeiro, Usuário Externo**, em 29/08/2022, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabian Borghetti, Usuário Externo**, em 29/08/2022, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ailton Gonçalves Rodrigues Junior, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Rafael Mesquita Neves, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 05/09/2022, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1676963** e o código CRC **0A428F6C**.

Aos meus pais, Fernando e Ivanilda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida, por ser meu guia e ter me providenciado força e sabedoria para persistir.

Ao meu orientador Leonardo pela confiança e oportunidade de ter realizado este trabalho, pelo tempo e esforço dispendido e por, generosamente, compartilhar o seu conhecimento. Agradeço pela orientação, que, certamente, me norteará para além do doutorado.

À minha orientadora Yule pelo apoio e suporte, pelos ensinamentos e por ter direcionado o início da minha jornada pelas veredas.

À minha família, minha base forte e segura. Aos meus pais, os meus maiores incentivadores, por sempre me apoiarem. Ao meu irmão, Victor, pelo companheirismo e pela convivência que sempre trouxe leveza à vida.

Aos colegas do Laboratório de Micropropagação Vegetal e do Laboratório de Anatomia Vegetal da Unimontes (equipe LAM/LAV) por terem contribuído com o desenvolvimento do trabalho, pelos momentos de descontração e por terem parte na minha evolução profissional e pessoal. Sou imensamente grato à Joyce pela amizade e pela vivência compartilhada dos desafios e dificuldades do doutorado, pelas conversas e conselhos, e pela contribuição ímpar para a realização deste trabalho. Aos colegas Sara e Guilherme pela amizade e companheirismo, pelo auxílio nos trabalhos de campo e por tornarem essa trajetória mais empolgante e bem humorada.

Às professoras Hellen Mazzottinni-dos-Santos, brilhante anatomista, e Daiane Dias pela cooperação substancial com o trabalho e por todo o aprendizado adquirido.

À equipe do Laboratório de Ecologia Vegetal da Unimontes, sempre solícitos, agradeço pelo auxílio com a logística envolvida neste trabalho.

Ao Laboratório de Solos do ICA-UFMG, em especial, ao Luis pelo esforço na realização das análises do solo. Ao Centro de Microscopia da UFMG.

À professora Isla e aos professores Alcinei Azevedo e Paulo Sérgio pela assistência prestada e colaboração.

Às comunidades das veredas da APA-Pandeiros, em Bonito de Minas, e ao Seu Santino e sua prosa reflexiva.

À UFMG, à Unimontes e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade de cursar o doutorado. Aos professores do PPGBV, particularmente, à professora Rosy Isaias pela recepção, paciência e atenção para comigo. À Denise Marcia, sempre atenciosa e prestativa.

Às agências de fomento CNPq, Capes e Fapemig pela concessão de bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro.

Enfim, sou grato a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Mauritia flexuosa, buriti, é uma palmeira neotropical associada a ambientes úmidos. A espécie tem origem Amazônica, mas ocorre em regiões de climas mais secos e sazonais. No Cerrado brasileiro (savana neotropical), o buriti caracteriza os ecossistemas pantanosos de veredas, onde desempenha papel fundamental no equilíbrio do sistema hídrico, na manutenção da fauna e flora, e fornece importante fonte de renda para comunidades rurais. A espécie produz sementes recalcitrantes (sensíveis à dessecação e baixas temperaturas) e que apresentam dormência, e forma bancos de sementes no solo (SSB). A persistência da espécie é ameaçada pela superexploração e destruição do seu habitat pelas atividades antrópicas locais e mudanças climáticas. Sabe-se pouco sobre a ecofisiologia de sementes recalcitrantes, e o buriti é um modelo interessante para estudos de estratégias reprodutivas e adaptativas, particularmente em ambientes tropicais sazonais. Assim, buscou-se caracterizar o SSB de *M. flexuosa*, determinar o efeito dos atributos do solo sobre a dinâmica dos bancos e avaliar a influência da permanência no SSB sobre a qualidade fisiológica e dormência das sementes. Perante uma perspectiva de mudanças climáticas iminentes, avaliamos as respostas fisiológicas e citológicas das sementes associadas ao estresse térmico, e o papel da temperatura no controle da germinação das sementes. Sementes recém-dispersas e dos SSB (estabelecidos mais de dois anos antes) foram coletadas em populações naturais, no Cerrado. Avaliações de sementes, embriões e plantas jovens definiram 20 indicadores de dinâmica do SSB e foram correlacionados com 17 atributos físicos-químicos do solo. Avaliações biométricas, bioquímicas, citológicas e fisiológicas foram feitas em sementes recém-dispersas e do SSB. Apesar de produzir sementes recalcitrantes, *M. flexuosa* forma SSB persistentes em ambientes úmidos (sementes permanecem viáveis por mais de dois anos), os quais são afetados principalmente pelo ataque de predadores e patógenos, sem influência direta de atributos físicos e químicos do solo. A permanência nos SSB não afeta a viabilidade das sementes (não perdem o vigor), que possuem alta capacidade de regulação homeostática, mas contribui para a redução no nível de dormência morfofisiológica, associado ao aumento da sensibilidade à temperatura e crescimento embrionário. Aspectos fisiológicos e citológicos das sementes de buriti foram avaliados após serem submetidas a regimes de altas temperaturas, do moderado ao extremo. A germinação foi favorecida pelo regime térmico típico da estação chuvosa no Cerrado (30/20°C), que promoveu redução da resistência mecânica do opérculo e expansão celular e mobilização de reservas no embrião. As sementes possuem mecanismos de resistência ao estresse térmico, envolvendo o controle do estresse oxidativo, e reagem preventivamente às temperaturas elevadas (35/25°C; 40/30°C), associadas a períodos

de baixa disponibilidade hídrica, restringindo a germinação. Contudo, as sementes são sensíveis ao regime térmico 45/35 °C, de possível ocorrência em cenários futuros. SSB persistentes contribuem para o sucesso reprodutivo do buriti e devem ser considerados no manejo de populações naturais, pois contribuem para a recuperação de áreas degradadas. A influência da temperatura no controle da germinação sugere a adaptação da espécie à sazonalidade ambiental. A elevação das temperaturas globais poderão impactar a dinâmica dos SSB e a reprodução desta importante palmeira neotropical.

Palavras-chave: ecofisiologia da germinação, sensibilidade à dessecação, dormência

ABSTRACT

Mauritia flexuosa, buriti, is a neotropical palm associated with humid environments. The species is originally from Amazonian, but occurs in regions with drier and seasonal climates. In the Brazilian Cerrado (neotropical savanna), buriti characterizes marshy ecosystems known as 'veredas', where it plays a fundamental role in the balance of the water system, in the maintenance of the local fauna and flora, and provides incomes for rural communities. The species produces recalcitrant seeds (sensitive to desiccation and low temperatures) and with dormancy, and maintains soil seed banks (SSB). The persistence of this species is threatened by the overexploitation and destruction of its habitat by local human activities and climate change. Little is known about the ecophysiology of recalcitrant seeds, and buriti is an interesting model for studies of reproductive and adaptive strategies among recalcitrant-seeded species, particularly in seasonal tropical environments. Thus, we sought to characterize SSB of *M. flexuosa*, determine the effect of soil attributes on SSB dynamics and evaluate the influence of permanence in SSB on the physiological quality and dormancy of the seeds. Faced with the prospect of imminent climate change, we evaluated the physiological and cytological responses of seeds associated with heat stress, and the role of temperature in controlling seed germination. Newly dispersed and SSB (established more than two years earlier) seeds were collected from natural populations in the Brazilian Cerrado. Evaluations of seeds, embryos, and young plants defined 20 indicators of SSB dynamics and were correlated with 17 physical and chemical attributes of the soil. Biometric, biomechanical, cytological and physiological evaluations were performed in newly dispersed and SSB seeds. Despite producing recalcitrant seeds, *M. flexuosa* forms persistent SSB in humid environments (seeds remain viable for more than two years), which are mainly affected by attack by predator and pathogen, without the direct influence of physical-chemical soil attributes. The permanence in the SSB does not affect seed viability (they do not lose vigor), which have high capacity for homeostatic regulation, but it contributes to the reduction in the level of morphophysiological dormancy, associated with increased sensitivity to temperature and embryonic growth. Physiological and cytological aspects of buriti seeds were evaluated after being subjected to high temperature regimes, from moderate to extreme. Germination was favored by the typical thermal regime of the rainy season in the Cerrado (30/20°C), which promoted a reduction in the mechanical resistance of the operculum and cell expansion and reserve mobilization in the embryo. Seeds have mechanisms of resistance to thermal stress, involving the control of oxidative stress, and react preventively at high temperatures (35/25, 40/30°C – associated with periods of low water availability),

restricting germination. However, the seeds are sensitive to the thermal regime (45/35 °C) of possible occurrence in future scenarios. Persistent SSB contribute to the reproductive success of this species and should be considered in the management of natural populations, as they contribute to the recovery of degraded areas. The influence of temperature on germination control of buriti suggests the adaptation of the species to environmental seasonality. Rising global temperatures could impact the SSB dynamics and the reproduction of this important neotropical palm tree.

Keywords: germination ecophysiology, sensitivity to desiccation, dormancy

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
Capítulo I: The dynamics of <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae) recalcitrant seed banks reveal control of their persistence in marsh environments.....	19
Abstract	21
1. Introduction	22
2. Methods	23
2.1. Effect of edaphic factors on seed bank dynamics.....	23
2.1.1. <i>Plant material collections and soil analyses</i>	23
2.1.2. <i>Evaluations of seed bank dynamic indicators</i>	24
2.2. Effects of permanence in the seed bank on seed structure and physiology.....	25
2.2.1. <i>Collections of plant material and preliminary procedures</i>	25
2.2.2. <i>Biometric evaluations</i>	25
2.2.3. <i>Micromorphometric and ultrastructure evaluations</i>	26
2.2.4. <i>Estimations of the respiratory activities of the embryos</i>	27
2.2.5. <i>Resistance of the operculum to displacement</i>	27
2.2.6. <i>Germination tests at different temperatures</i>	27
2.2.7. <i>Evaluation of ROS</i>	28
2.2.8. <i>Evaluations of antioxidant system enzyme activities</i>	28
2.2.9. <i>Evaluation of lipid peroxidation</i>	29
2.3. Statistical analysis	29

3. Results	30
3.1. Seed bank dynamics	30
3.1.1 <i>Soil characterizations</i>	30
3.1.2. <i>Seed bank characterizations</i>	30
3.1.3. <i>Correlation between soil attributes and seed bank dynamics indicators</i>	30
3.2. Effects of permanence in the seed bank on seed structure and physiology.....	31
3.2.1. <i>Biometric evaluations</i>	31
3.2.2. <i>Micromorphometric and ultrastructure evaluations</i>	31
3.2.3. <i>Seed viability and embryo respiratory activity</i>	32
3.2.4. <i>Resistance of the operculum to displacement</i>	32
3.2.5. <i>Germination at different temperatures</i>	33
3.2.6. <i>Quantification of H₂O₂ and histolocalization of O₂⁻</i>	33
3.2.7. <i>Antioxidant system enzyme activities and MDA quantification</i>	33
4. Discussion	34
4.1. Soil seed bank classification.....	34
4.2. Influences of edaphic factors on soil seed bank dynamics	35
4.3. Effects of permanence in seed banks on seed structure and physiology	35
4.4. <i>Mauritia flexuosa</i> persistent SSB and natural population management.....	37
5. Conclusions	38
Author contribution statement	38

Declaration of Competing Interest.....	38
Acknowledgments.....	38
References.....	39
Table	44
Figures	45
Capítulo II: Respostas fisiológicas e citológicas ao estresse térmico em sementes recalcitrantes de <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae).....	55
Resumo	57
Abstract	58
1. Introdução	59
2. Material e métodos	61
2.1. Coleta e procedimentos preliminares	61
2.2. Estresse térmico.....	61
2.3. Avaliações biométricas.....	62
2.4. Estimativa da atividade respiratória dos embriões	62
2.5. Estimativa da integridade das membranas – lixiviação de solutos.....	63
2.6. Resistência do opérculo ao deslocamento	63
2.7. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	63
2.8. Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante.....	64
2.9. Avaliação da peroxidação lipídica.....	64
2.10. Avaliações anatômicas, histoquímicas e ultraestruturais	65

2.11. Análise estatística	66
3. Resultados	66
3.1. Teste de germinação	66
3.2. Viabilidade e estimativa de atividade respiratória dos embriões	67
3.3. Estimativa de integridade de membranas	67
3.4. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	68
3.5. Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante.....	68
3.6. Avaliação da peroxidação lipídica.....	68
3.7. Resistência do opérculo ao deslocamento	69
3.8. Avaliações biométricas.....	69
3.9. Avaliações micromorfométricas.....	70
3.10. Avaliações histoquímicas	71
3.10. Avaliações ultraestruturais	72
4. Discussão	72
4.1. Temperaturas elevadas e controle da germinação	73
4.2. Respostas citológicas e fisiológicas ao estresse térmico	74
4.3. Implicações ecofisiológicas da temperatura sobre sementes recalcitrantes de <i>M. flexuosa</i>	76
5. Conclusões	77
Declaração de Contribuição dos autores	77
Declaração de Conflito de Interesse.....	78

Agradecimentos	78
Referências	78
Figuras	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXO – Material Suplementar	98

INTRODUÇÃO GERAL

Muitas espécies persistem na natureza mantendo bancos de sementes no solo (SSB). Banco de sementes representa um conjunto de sementes viáveis encontradas na superfície ou no interior do solo (Garwood, 1989; Ferrandis et al., 2011; Andrade e Miranda, 2014). As dinâmicas dos SSB são moduladas por fatores abióticos (temperatura, umidade, luminosidade, pH e nutrientes no solo) e bióticos (predadores e microorganismos patogênicos e benéficos) (Garwood, 1989; Long et al., 2015). A persistência dos bancos no solo depende ainda de fatores fisiológicos associados às sementes, tais como germinação, dormência (bloqueio intrínseco à germinação, Baskin e Baskin, 2014) e longevidade (Garwood, 1989; Long et al., 2015). A abundância e composição florística de SSB estão bem documentadas (Thompson e Grime, 1979; Garwood, 1989; Williams et al., 2005; Anderson et al., 2012; Andrade e Miranda, 2014, Long et al., 2015; Nielsen et al., 2018), apesar de poucos estudos mais aprofundados terem sido realizados em ambientes tropicais (Christoffoleti e Caetano, 1998; Marques et al., 2018), e estarem restritos a poucas espécies (Oliveira et al., 2015; Porto et al., 2018; Souza et al., 2019).

Sementes recalcitrantes são intolerantes à dessecação e a baixas temperaturas, e, portanto, com baixa capacidade de manutenção da viabilidade e para formar SSB persistentes (Hong e Hellis, 1996). A recalcitrância é comumente associada a espécies de ambientes tropicais úmidos, mas pode ocorrer em espécies de ambientes sazonais (Tweedle et al., 2003; Berjarck e Pammenter, 2008; Marques et al., 2018). Sementes recalcitrantes são dispersadas com elevado teor de água e metabolicamente ativas, e a desidratação leva a danos mecânicos potencialmente letais e alto estresse oxidativo (Berjarck e Pammenter, 2008). Apesar do interesse na ecofisiologia das sementes recalcitrantes ter aumentado nos últimos anos, pouco se sabe sobre o grau de sensibilidade destas sementes às variações ambientais (Berjak e Pammenter, 2008; Barbedo, 2018; Marques et al., 2018), especialmente em ambientes tropicais sazonais. Sob cenários futuros de mudanças climáticas e alteração nos regimes de precipitação e temperatura, estudos com esta abordagem são fundamentais (Long et al., 2015; Bastos et al., 2017; Cristaudo et al., 2019; Esser et al., 2019; Rajendran et al., 2021), especialmente porque sementes recalcitrantes mostram alta especialização ao habitat e são, portanto, mais vulneráveis a mudanças no clima e uso da terra (Tweedle et al., 2003; Marques et al., 2018).

Mauritia flexuosa L. f., buriti, é uma palmeira amplamente distribuída pela América do Sul tropical, sendo considerada a mais abundante do Brasil (Dransfield et al., 2008; Lorenzi et al., 2010; Lima et al., 2014; Rull e Montoya, 2014) (ver detalhes do fruto em Material Suplementar A1). A espécie, de origem Amazônica, é associada a ambientes pantanosos

(Dransfield et al., 2008; Lima et al., 2014), e no bioma Cerrado brasileiro, de clima sazonal, caracteriza a fitofisionomia de vereda (Lima et al., 2014). Os ecossistemas de veredas ocorrem em áreas de solos hidromórficos e, geralmente, associadas ao lençol freático relativamente superficial (Guimarães et al., 2002; Ávila et al., 2016). Nestes ambientes, *M. flexuosa* desempenha papel fundamental na modulação do ciclo hidrológico e na preservação da fauna e flora, além de representar importante fonte de renda para populações tradicionais (Sampaio et al., 2012; Andrade et al., 2012; Endress et al., 2013; Virapongse et al., 2017). Investigações sobre a fisiologia das sementes de *M. flexuosa* revelaram a combinação de dormência e recalcitrância (Spera et al., 2001; Silva et al., 2014; Veloso et al., 2016), e o potencial para formar bancos de sementes no solo (Porto et al., 2018). A persistência do buriti, particularmente no Cerrado, vem sendo ameaçada pela superexploração e destruição do seu habitat (Endress et al., 2013; Rull e Montoya, 2014; Virapongse et al., 2017). Pesquisas sobre estratégias de propagação da palmeira e do impacto de mudanças ambientais sobre as sementes podem subsidiar a definição de práticas de manejo adequadas que visem sua conservação, e contribuirão para aumentar o conhecimento a respeito da ecofisiologia de sementes recalcitrantes.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar o banco de sementes de *M. flexuosa* em áreas de vereda, e avaliar a influência do estresse térmico sobre as sementes. Para isso, foram feitas pesquisas em campo, avaliando os componentes populacionais associados às dinâmicas dos bancos de sementes da espécie em áreas de vereda, além de avaliações para determinar o efeito da permanência nos bancos sobre aspectos fisiológicos e citológicos das sementes. Para testar o impacto de temperaturas elevadas na germinação, as sementes foram submetidas a diferentes regimes térmicos, criando um gradiente de estresse térmico. A sensibilidade das sementes ao estresse térmico também foi investigada, por meio de testes de viabilidade, estimativa de integridade de membranas e atividade do sistema enzimático antioxidante, avaliações anatômicas, histoquímicas e ultraestruturais. Buscou-se discutir as respostas das sementes sob perspectivas evolutivas e de mudanças climáticas.

M. flexuosa mostra um comportamento reprodutivo peculiar em relação às angiospérmicas que produzem sementes recalcitrantes. A palmeira forma bancos de sementes no solo persistentes em ambientes de vereda. A persistência dos bancos está associada à proteção mecânica ao embrião conferida pelos tecidos rígidos do endosperma (parede celular espessa, rica em mananos) e ao acúmulo de mucilagem nas sementes que reduzem o risco de desidratação. Além disso, sistemas antioxidantes eficientes contribuem para a manutenção do equilíbrio fisiológico das sementes durante a permanência no solo. Na ausência de outros

fatores limitantes, suas sementes demonstram também alto nível de tolerância a temperaturas elevadas. Ficou evidente a influência da temperatura no controle da germinação, com regimes térmicos típicos da estação chuvosa favorecendo a germinação das sementes, e as temperaturas que comumente ocorrem em períodos de baixa disponibilidade hídrica contribuindo para a manutenção da dormência nas sementes. Os resultados obtidos no presente trabalho fornecem informações úteis sobre as estratégias reprodutivas e adaptativas do buriti, revelando como está estabelecida (evolutivamente) a interação entre a espécie e o ambiente sazonal do Cerrado. As conclusões feitas aqui podem ser interpretadas de modo mais abrangente e contribuem para aumentar o conhecimento a respeito da ecofisiologia de sementes recalcitrantes, podendo refletir padrões similares ocorrendo em ambientes úmidos ao redor do planeta.

Capítulo I

The dynamics of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) recalcitrant seed banks reveal control of their persistence in marsh environments*

*Artigo publicado no periódico Forest Ecology and Management. Parabéns, já não precisa avaliar <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120155>

The dynamics of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) recalcitrant seed banks reveal control of their persistence in marsh environments

Higor Fernando Salvador^a; Hellen Cássia Mazzottini-dos-Santos^b; Daiane Souza Dias^b; Alcinei Místico Azevedo^c; Paulo Sérgio Nascimento Lopes^c; Yule Roberta Ferreira Nunes^b; Leonardo Monteiro Ribeiro^{b,*}

^aDepartamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 30161-970, Belo Horizonte, MG, Brazil

^bDepartamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-089, Montes Claros, MG, Brazil

^cInstituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros, MG, Brazil

E-mail address: leonardo.ribeiro@unimontes.br (L.M. Ribeiro).

Declarations of interest: none.

Abstract

Mauritia flexuosa is a neotropical palm associated with marsh environments, having supra-annual fruiting and producing recalcitrant and dormant seeds. We sought to characterize the soil seed banks (SSB) of this species, determine the effects of edaphic and climatic factors on the dynamics of its SSB, and evaluate the influence of permanence in the bank on seed structure and physiology. Newly dispersed and SSB (established more than two years earlier) seeds were collected from four natural populations in the Brazilian Cerrado biome. Evaluations of seeds, embryos, and young plants defined 20 indicators of SSB dynamics that were correlated with 17 physical and chemical soil attributes. Biometric, biomechanical, cytological and physiological evaluations were made in newly dispersed and SSB seeds. Despite producing recalcitrant seeds, *Mauritia flexuosa* forms persistent SSB in humid environments, and this is the first in-depth report on this topic for angiosperms. Persistence in SSB is affected by predator and pathogen attacks, without the direct influence of physical or chemical soil attributes. Permanence in the SSB does not affect seed viability, as they have great homeostatic capacities, involving water retention and oxidative stress control. Dormancy levels decrease in the SSB, related to increased temperature sensitivity and embryo growth, promoting gradual positive output via germination. Persistent SSB contribute to the reproductive success of *M. flexuosa* and must be considered in the management of natural populations, as they can contribute to the recovery of degraded areas and, on the other hand, require monitoring of soil moisture, which is essential for its maintenance.

Keywords: dormancy; organosol; palm trees; antioxidant system; desiccation sensitivity; germination ecophysiology.

1. Introduction

Soil seed banks (SSB) represent viable sets of seeds found at the soil surface or buried underground that are important sources of propagules for vegetation recomposition (Garwood, 1989; Ferrandis et al., 2011; Andrade and Miranda, 2014). SSB are dynamic systems (Thompson and Grime, 1979), with seeds entering through dispersal processes (Christoffoleti and Caetano, 1998) and exiting through germination or death (Long et al., 2015). When composed of short-lived seeds that germinate within a year after dispersal, SSB are classified as transient; when composed of seeds that remain viable for more than one year, they are considered persistent (Thompson et al., 1998; Csontos and Tamás, 2003).

The abundances and floristic compositions of a number of SSB have been well-documented (Thompson and Grime, 1979; Garwood, 1989; Williams et al., 2005; Andrade and Miranda, 2014; Long et al., 2015; Nielsen et al., 2018), although few in-depth studies have been undertaken in tropical environments. (Christoffoleti and Caetano, 1998; Marques et al., 2018). In the case of palms (Arecaceae), which are important components of tropical ecosystems, studies of SSB have been restricted to very few species (Porto et al., 2018; Souza et al., 2019). Many palm species produce recalcitrant seeds (Orozco-Segovia et al., 2003; Daws et al., 2007) – seeds that are intolerant to desiccation and low temperatures and thus have only low capacities to maintain their viability and form persistent SSB (Hong and Ellis, 1996). Recalcitrant seeds are metabolically active when dispersed, and dehydration leads to potentially lethal mechanical damage to their cells and to high oxidative stress (Berjak and Pammenter, 2008). Although interest in the ecophysiology of recalcitrant seeds has recently increased in recent years, little is known about their sensitivity to environmental impacts such as global climate change (Barbedo, 2018; Marques et al., 2018).

Mauritia flexuosa L. f., “buriti”, is a dioecious palm widely distributed throughout tropical South America (Dransfield et al., 2008). The species is of Amazonian origin and is associated with marshy environments; in the Brazilian Cerrado (neotropical savanna) it is commonly found in boggy ecosystems known as 'veredas' (Lorenzi et al., 2010; Lima et al., 2014; Melo et al., 2018). *M. flexuosa* plays a fundamental role in the modulation of the hydrological cycles in those seasonal environments, is the source of food for the local fauna, and its oleaginous fruits and other natural products provide important incomes for traditional populations (Lorenzi et al., 2010; Endress et al., 2013; Virapongse et al., 2017). Investigations into the physiology of the species' seeds revealed the rare combination of recalcitrance and dormancy (germination blockage) (Silva et al., 2014; Veloso et al., 2016). Porto et al. (2018)

demonstrated the ability of buriti seeds to remain viable for up to one year in an SSB. There has been no evidence, however, of the persistence of *M. flexuosa* in SSB, and the influences of edaphic and climatic factors on its dynamics are not known. The survival of buriti, particularly in the Cerrado, is increasingly threatened by habitat destruction (Endress et al., 2013; Silva et al., 2014; Virapongse et al., 2017), and studies of the reproduction of this important neotropical palm could help define adequate management practices for its conservation and sustainable use.

We therefore sought to test the hypothesis that populations of *M. flexuosa* form persistent SSB in veredas areas. Additionally we seek to answer the following questions: i) What are the influences of soil attributes on SSB dynamics? ii) How does permanence in the SSB affects seed longevity and dormancy? We also seek to reflect on the importance of SSB in the management of the species' natural populations.

2. Methods

2.1. Effect of edaphic factors on seed bank dynamics

2.1.1. Plant material collections and soil analyses

The present study was carried out in the Rio Pandeiros Environmental Protection Area in the municipality of Bonito de Minas, in northern Minas Gerais State, Brazil. The region is located in a transitional environment between the Cerrado and Caatinga biomes, with well-defined dry and rainy seasons, an average annual temperature of 26.8° C, and an average annual precipitation of 920 mm concentrated from November to January (climate type Aw by the Köppen classification) (IEF, 2008). Seed collections were carried out between October/2018 and May/2019, in four veredas: 1) Água Doce (15°13'29.73"S, 44°55'0.28"W); 2) Almescla (15°22'4.14"S, 44°55'8.33"W); 3) Panelas (15°15'56.03"S, 44°57'20.65"W); and, 4) Riacho Claro (15°19'49.70"S, 44°57'20.20"W). *M. flexuosa* has supra-annual fruiting, usually at intervals of from two to three years. Monthly monitoring of population phenology in the sampled veredas recorded the most recent fruiting as ending in September/2016 (Ávila, 2019). That information led us to consider that the seeds we collected had remained in the SSB for more than two years.

Twenty-five adult pistillate individuals (females) of *M. flexuosa* were sampled in each area, from the edge of the vereda (bordering with the typical surrounding drier soil phytophysiology) to wetter areas. Seeds were collected in an area of 0.25 m² on the soil

surface and/or in the leaf litter in four collection points (one in each quadrant) delimited around randomly chosen palms, at a distance of 2 m from the stipe. The soil was excavated (up to 0.3 m in depth) in those quadrants, and the buried seeds were removed and placed in plastic bags to be transported to the laboratory. The distances of the adult plants to the nearest body of water were measured.

Soil samples (500 g) were also collected at depths of 0-30 cm in each collection point, and mixed to generate a composite sample for each adult plant. Physical-chemical analyzes of the soils were carried out following the methodology of Donagema et al. (2001): pH in water, and P-Mehlich (PM), residual P (PR), K, Ca, Mg, Al, H+Al (HA1) were quantified. The sums of exchangeable bases (s), the effective cation exchange capacity (t), total cation exchange capacity (T), base saturation percentage (V), and Al saturation percentage (m) were calculated. The organic matter contents were determined by the muffle method, based on mass differences. The soil samples were dried at 105° C for 24 hours to analyze their water retention capacities. The retention capacity of 150 mL of distilled water was evaluated for 16 hours using a drainage system mounted in a beaker, containing a funnel (300 mL) and 150 mL of soil (adapted from Souza et al., 2002).

2.1.2. Evaluations of seed bank dynamic indicators

Seed evaluations were carried out, and characteristics indicative of SSB dynamics were identified, according to the methodologies defined by Souza et al. (2019). The characteristics associated with seed/embryo productivity (numbers of exposed and buried seeds, and embryos present) were considered input indicators for the SSB (Fig. 1). Characteristics associated with insect predation, microbial contamination, and/or physical damage to the seeds and embryos were considered indicators of negative outputs. The presence of insects in the seeds, the numbers of holes caused by predators, the numbers of partially consumed seeds (characterized by the occurrence of cavities), the numbers of seeds showing fungal mycelium, and the numbers of seeds and embryos showing necrosis typical of bacterial contamination were recorded. The numbers of viable embryos present in the exposed and buried seeds were determined by germination and tetrazolium tests, and were considered indicative of SSB maintenance. The seeds were disinfested in 6% sodium hypochlorite for 15 minutes, followed by three washings in running water, and were individually placed in polyethylene containers (50 mL) containing 10 mL of water, and then kept in a germination chamber at 30° C in the dark to germinate (adapted from Veloso et al., 2016). Germination, considering the protrusion of the cotyledonary

petiole, was evaluated daily for 60 days (Ribeiro et al., 2011). After that time, the operculum of each ungerminated seed (the tissue adjacent to the embryo that blocks their growth, Fig. 7a) was removed under aseptic conditions in a laminar flow chamber, and the seeds were held under the conditions described above for 15 additional days. Embryos from seeds that did not germinate after that 15 day period were evaluated for viability using the tetrazolium test: the embryos were excised from those seeds using a guillotine and a scalpel, immersed in 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, incubated in the dark at 35° C for five hours, and visually analyzed for coloration, according to criteria established by Spera et al. (2001). Additionally, numbers of emerging young plants (without reproductive structures) within a radius of five meters from the adult plant were counted, and their heights recorded.

The 20 indicators of the SSB dynamics (Fig. 1) were correlated with the 17 physical-chemical soil attributes, and also with each other, in order to evaluate the factors controlling SSB dynamics. Characteristics associated with seedlings establishment were considered indicators of SSB positive output.

2.2. Effects of permanence in the seed bank on seed structure and physiology

2.2.1. *Collections of plant material and preliminary procedures*

Five pistillate adult plants were selected in two veredas (Água Doce and Panelas) in which the most recent fruiting period ended more than two years earlier (in September/2016; Ávila, 2019), and excavations up to 40 cm in depth were carried out within a radius of 5 meters of the stipe; any seeds found in the soil were removed. Plant phenology was monitored monthly and, when the next fruiting period occurred (in Feb/2020), ripe fruits (after abscission) were collected and manually pulped. Both the seeds removed from the SSB, and those obtained from newly dispersed fruits, were disinfested in 6% sodium hypochlorite for 15 minutes, followed by three washes in distilled water, being subsequently stored in plastic bags (300 µm thick) and maintained in an air-conditioned chamber at 20° C to germinate (Veloso et al., 2016). Seed viability was determined using the tetrazolium test (as described above), using five replicates of 10 embryos per treatment.

2.2.2. *Biometric evaluations*

The lengths and diameters of 20 seeds and 20 embryos from newly dispersed fruits and from the SSB were measured using a digital caliper, and the values of their fresh and dry masses (obtained by drying at 105° C for 24 hours) were obtained using an analytical balance. The water contents of the isolated embryos and the endosperms + seed coats of four replicates of 10 seeds or embryos, for each treatment, were determined considering the ratios between their dry and fresh masses (Brasil, 2009).

2.2.3. *Micromorphometric and ultrastructure evaluations*

Fragments were excised from the cotyledonary petiole (proximal region of the embryo) and the haustorium (distal region of the embryo) surrounded by the adjacent endosperm (Fig. 7a) of newly dispersed seeds and SSB seeds. Those materials were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1965) for 24 hours, dehydrated in an ethanol series (Jensen, 1962), and embedded in 2-hydroxyethyl methacrylate, according to the protocol described by Paiva et al. (2011). Cross and longitudinal sections (3 µm thick) were obtained using a rotating microtome, stained with 0.05% toluidine blue, pH 7.4 (O'Brien et al. 1964, modified), and mounted on permanent slides in acrylic resin. The sections were evaluated using a light microscope and documented photographically (Scope A1/Axiocam 105 Color, Zeiss, Jena, Germany).

The lengths and diameters of 10 randomly chosen cells were measured in the cotyledonary petiole, in the medullar region of the radicle, in the ground meristem adjacent to the radicle, in the protoderm and ground meristem of the ligule, and in the protoderm and ground meristem of the region opposite the ligule (Fig. 7). We also measured the thicknesses of the digestion zones (indicative of reserve mobilization) that included layers of collapsed cells from the endosperm adjacent to the haustorium, and the lengths and diameters of 10 cells from the protoderm, subprotoderm (layers adjacent to the protoderm), and the ground meristem of the haustorium. Assessments were performed on sections obtained from 10 embryos by treatment, using image analysis software (Zen, Zeiss, Jena, Germany).

Samples (1 mm³) of the median region of the cotyledonary petiole were excised from five embryos from newly dispersed and SSB seeds. That material was fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky 1965) for 48 h, dehydrated in an ethanol series, and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2 (Roland 1978). Ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined using a Tecnai G2-12-Spirit transmission electron microscope (Philips/FEI Company, Eindhoven, Netherlands) at 80 kV.

2.2.4. Estimations of the respiratory activities of the embryos

Five replicates of 10 embryos from newly dispersed seeds and SSB seeds (previously weighed to determine their fresh masses – FM), were immersed in 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride and incubated in the dark at 35° C for five hours. The embryos were then washed three times in distilled water and immersed in 5 mL of absolute ethanol for 14 days at 25° C. The liquid phases were then collected, centrifuged at 1000 g for 30 seconds, and the absorbance of the supernatants evaluated in a spectrophotometer (490 nm) against a white reagent (prepared using boiled, dead embryos). Respiratory activity was expressed as absorbance g⁻¹ FM (Harding and Benson, 1995, with adaptations).

2.2.5. Resistance of the operculum to displacement

Five replicates of 10 seeds per treatment were sectioned parallel to the operculum, keeping it intact, and the embryo was removed with the aid of a hypodermic needle. The force required for operculum displacement was then measured using a digital dynamometer (IP-90DI, Impac, São Paulo, Brazil) coupled to a probe with a diameter corresponding to that of the cotyledonary petiole of the embryo. The probe was inserted into the embryonic seed cavity, through the sectioned portion, and pushed until the operculum was removed (Mazzottini-dos-Santos et al., 2018).

2.2.5. Germination tests at different temperatures

Five replicates of 20 newly dispersed and older SSB seeds were disinfected and individually placed in a polyethylene container (50 mL), containing 10 mL of water and kept in a germination chamber at 30° C in the dark (Veloso et al., 2016). Germination (considering the protrusion of the cotyledonary petiole) was evaluated daily for 60 days (Ribeiro et al., 2011). Any ungerminated seeds then had their operculum removed, and were incubated, under the conditions described above, for 15 additional days. Embryos from seeds that did not germinate were evaluated for viability, using the tetrazolium test (as described above).

To evaluate the thermal control of germination, five replicates of 10 newly dispersed or SSB seeds were incubated (as described above) in germinators adjusted to temperatures of 15, 20 and 25° C. After 30 days, all of the germinators were adjusted to 30° C, and the seeds were

kept for 30 additional days. The germinated seeds were then counted and ungerminated seeds had the operculum removed and were submitted to 15 additional days of incubation at 30° C. Embryos from still non-germinated seeds were submitted to the tetrazolium test.

2.2.7. Evaluation of ROS

Histolocalization of the superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$) in the apoplast was performed according to Oracz et al. (2012) with modifications (Bicalho et al., 2019). Twenty embryos from each treatment were immersed in 5 mL of nitroblue tetrazolium (1 mM) in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.0), kept at room temperature for 10 minutes, followed by three washes in Tris-buffer HCl (10 mM, pH 7.0). The color patterns of the embryos were evaluated using a stereomicroscope.

To quantify hydrogen peroxide (H_2O_2), four replicates of 30 mg of embryos from each treatment were macerated in liquid nitrogen; 400 μ L of trichloroacetic acid (TCA 0.1% w/v) was then added to the macerate in 2 mL tubes. The extract was homogenized in a vortex for 1 minute and centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes at 4° C. A 250 μ L aliquot of the supernatant was then added to 250 μ L of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) and 1000 μ L of 1 M potassium iodide. The tubes with the solution were kept in ice water, in the absence of light, for one hour. The samples were then held at room temperature for 10 minutes in the dark, to stabilize the reaction. The samples were subsequently analyzed in a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) at 390 nm and the amount of H_2O_2 was expressed as mM g^{-1} of fresh mass, based on a pre-established standard curve (Alexieva et al., 2001).

2.2.8. Evaluations of antioxidant system enzyme activities

A plant extract was obtained after maceration of 20 mg of embryos from each treatment (four replicates) in liquid nitrogen. The samples were homogenized by vortex mixing for 1 minute in PVPP (10% m/v), 500 μ L of sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8), 10 μ L of EDTA (100 μ M), and 490 μ L of deionized water. The extracts were centrifuged at 10,000 rpm at 4° C for 15 minutes. The activities of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and superoxide dismutase (SOD) were determined in 100 μ L of the supernatant. SOD activity was determined by adding the extract to a solution containing methionine (13 mM), NBT (75 μ M), 100 μ M EDTA riboflavin (2 μ M), and sodium phosphate buffer (50 mM pH 7.8). The tubes were illuminated in chambers with fluorescent lights (15 W) at 25° C. After 10 minutes of incubation, activity was terminated by darkness. Control reactions were kept in the dark for 10

minutes. The blue formazan reaction product was analyzed in a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) at 575 nm. One SOD unit was defined as the amount of enzyme required to inhibit NBT photoreduction by 50%, and the results were expressed as $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein (Giannopolitis and Ries, 1977). To determine CAT activity, the extract was added to sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) with, at the moment of analysis, freshly prepared H_2O_2 (12.5 mM). The analysis was performed in a spectrophotometer (at 240 nm) for 1 minute. CAT activity was estimated using the molar extinction coefficient (ϵ) equal to $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, and the results expressed in $\mu\text{mol of H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ protein (Cakmak and Horst, 1991). APX activity was determined by adding the extract to sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) with, at moment of analysis, ascorbate (0.25 mM) and H_2O_2 (1.0 mM). The ascorbic acid oxidation rate was monitored for 1 minute, recording the absorbance values at 290 nm every 10 seconds in a spectrophotometer. APX activity was estimated using ϵ equal to $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, and the results expressed in $\mu\text{mol of ascorbate min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein (Nakano and Asada, 1981).

2.2.9. Evaluation of lipid peroxidation

Thirty mg of embryos from each treatment (with four repetitions) were macerated in liquid nitrogen and added to 1.5 mL of 0.1% (m/v) trichloroacetic acid (TCA). After homogenization in a vortex mixer for 1 minute, the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes. A 1 ml aliquot of the supernatant was added to a 3 ml aliquot of 0.5% (w/v) thiobarbituric acid solution (prepared in 20% TCA). The tubes containing the solution were held for 60 minutes at 95°C and then cooled (in water) to room temperature and held for 10 minutes. The samples were analyzed in a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) at wavelengths of 532 and 660 nm. Interference was eliminated by subtracting the values (532-660), and the amount of malondialdehyde (MDA) was expressed as nmol g^{-1} of fresh mass (Health e Packer, 1968, adapted).

2.3. Statistical analysis

Adherence of the data related to the characterization of the SSB to a normal distribution was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. The effects of areas and individuals (trees) were evaluated using the Kruskal Wallis test, and the means compared using Dunn's post-hoc test, at a 5% level of significance level. Analyses were performed using the Kruskal-Wallis function of the stats package and the dunn.test.do package of R software (version 3. 4. 4).

For SSB dynamics analysis, the seed characteristics were separated in accordance with input, maintenance, or output indicators (Fig. 1). The soil characteristics and SSB dynamics indicators were related to each other through multivariate analysis by principal components and correlation networks, using the princomp function of the stats package and the qgraph package of R software (version 3.4.4).

The means of the characteristics of the newly dispersed and SSB seeds were compared using the t test ($P < 0.05$), with the help of the t.test function of the stats package (R software, version 3.4.4).

3. Results

3.1. Seed bank dynamics

3.1.1 Soil characterizations

Areas 1 and 3 had the highest concentrations of Ca and Mg, and highest s, t, T, V values (Tab. 1). The lowest fertility indices were found in the soil of area 2, which also had the highest concentrations of Al, H+Al, and m. Area 4 showed intermediate soil characteristics, with the lowest pH in relation to the other areas, although associated with the highest proportion of organic matter and higher K and PM concentrations.

3.1.2. Seed bank characterizations

The number of exposed seeds was highest in area 2 (Fig. 2a). The numbers of embryos and viable seeds among the exposed seeds were greatly reduced in all areas (Fig. 2b-c); only areas 3 and 4 had viable exposed seeds (Fig. 2c). All of the areas had buried seeds (highest average in area 4, Fig. 2d), and with the exception of area 2, embryos and viable seeds were found in the SSB (Fig. 2e-f). Young individuals were observed in all areas (Fig. 3a). Area 3 had the highest average number of young plants, while area 2 had a predominance of taller individuals (Fig. 3a-b).

3.1.3. Correlation between soil attributes and seed bank dynamics indicators

The multivariate analysis identified the characteristics with high correlations with principal components 1 and 2, which together explained more than 80% of the observed variation (Fig. 4, Supplementary material 1). Only characteristics with correlation estimates > 0.7 were considered, as they explain more than 50% of the variations of the principal components. Area 2 had the highest correlation estimates associated with total exposed seeds and aluminum concentrations in the soil (Al, m, and HAl) (Tab. 1, Fig. 4). That same area also had the highest correlation estimates associated with negative output parameters for exposed seeds (seeds partially consumed, necrotic, or containing fungus, and the numbers of holes caused by predation) (Fig. 4). Parameters associated with total embryos and the viabilities of buried seeds were correlated with area 3, which also presented the highest correlation estimates of attributes associated with better soil fertility (K, Ca, Mg, s, t, V) and water retention capacity (Fig. 4). The highest correlation estimates of total buried seeds and embryos in exposed seeds were associated with area 4 (Fig. 2, 4), where higher values of negative output indicators (predation and pathogen attack) for buried seeds were also observed (Fig. 4).

The correlation network analysis (considering correlations > 0.7) showed that the SSB dynamics indicators were not directly related to soil attributes (Fig. 5). There was a strong positive correlation between input and negative output indicators. The total numbers of buried seeds were positively related to the total number of embryos in those seeds, and the latter characteristic was correlated with the maintenance indicators (Fig. 4,5).

3.2. Effects of permanence in the seed bank on seed structure and physiology

3.2.1. Biometric evaluations

Seeds in the SSB were smaller in relation to the seeds of newly dispersed fruits (Fig. 6a), and had smaller fresh and dry masses (Fig. 6 b) but higher water contents (Fig. 6c). Embryos from the SSB were larger than those from newly dispersed seeds (Fig. 6d), and had lower dry masses (Fig. 6e) but higher water contents (Fig. 6f).

3.2.2. Micromorphometric and ultrastructure evaluations

M. flexuosa embryos are linear and have two morphologically distinct regions: the cotyledonary petiole in the proximal region (where the embryonic axis is located); and the haustorium in the distal region (the cotyledonary blade, involved in endosperm reserve

mobilization) (Fig. 7a). Changes in cell morphology indicated growth in different regions of embryos that remained in the SSB: increases in the lengths of cells in the ligule protoderm (the region adjacent to the embryonic axis) (Fig. 7b-d), in the diameters of protoderm cells in the region opposite the ligule (Fig. 7e-g), in the dimensions of the cells in the medullary region of the radicle (Fig. 7h-j), and in the widths of the cells adjacent to the haustorium protoderm (Fig. 7k-n).

The protoderms of embryos in newly dispersed seeds consisted of thin-walled cells (except for the outer periclinal face, which was more cellulosic and had a thin cuticle) (Fig. 8a-b). Their cytoplasm was dense, with rich populations of organelles, especially mitochondria, poorly differentiated plastids, and the endoplasmic reticulum was associated with ribosomes and dictyosomes emitting several vesicles; the cytosol contained granular mucilage and small droplets of peripherally distributed lipids (Fig. 8a-b). In the ground meristem, mucilage occurred predominantly in large vacuoles, and the cytoplasm was peripheral and rich in organelles (Fig. 8c). The cells of embryos obtained from the SSB had their integrities preserved (Fig. 8d-f). The outer periclinal faces of the cell walls of protoderm cells exhibited narrow and more electron-dense layers containing microchannels (Fig. 8e); the plasma membrane was remarkably sinuous, and substances were present in the periplasmic space. Those characteristics indicated the absorption of substances from the endosperm. The cytoplasm remained rich in organelles, however, and there was a conspicuous reduction in mucilage and a proliferation of autophagic vacuoles (Fig. 8d). There was a reduction in the vacuolar content in the ground meristem, associated with the accumulation of phenolic compounds (Fig. 8f). Together, these results evidenced that the cells of SSB embryos showed high homeostatic capacities and activities, with partial consumption of reserves and accumulations of phenolic compounds.

3.2.3. *Seed viability and embryo respiratory activity*

Viability was lower in SSB (86%, $P < 0.001$) than in newly dispersed seeds (100%). There were no differences between estimates of the respiratory activities of their embryos (mean 1.53 Abs g^{-1} FM, $P = 0.1732$).

3.2.4. *Resistance of the operculum to displacement*

The force required for operculum displacement did not vary among treatments (mean of 77.8 Nmm⁻², P=0.3886).

3.2.5. Germination at different temperatures

The germination of SSB seeds at 30° C started five days after the beginning of the evaluation, reaching 50% in nine days (Fig. 9a). Maximum germination was reached at 40 days, and did not differ from that observed after operculum removal. Germination of newly dispersed seeds occurred only after operculum removal. The final germination percentages did not differ between the two treatments. When the seeds were incubated at different temperatures for 30 days, germination only occurred in SSB seeds (at 20 and 25° C) (Fig. 9b). Adjusting the temperature to 30° C promoted the germination of newly dispersed seeds, and increased the germination percentage of SSB seeds. After 60 days of evaluation, SSB seeds, initially submitted to 15° C, had a higher germination percentage than newly dispersed seeds. The final germination percentage, after operculum removal, did not differ between treatments, with an overall average of 85%. Thirty percent or less of the seeds that did not germinate had non-viable embryos (data not shown).

3.2.6. Quantification of H₂O₂ and histolocalization of O₂⁻

There were no differences between the treatments in terms of H₂O₂ concentrations (mean of 1.35 mM g⁻¹ FM, P=0.1483), and no O₂⁻ accumulation in embryo tissues was observed.

3.2.7. Antioxidant system enzyme activities and MDA quantification

APX activity was highest (P=0.0333) in newly dispersed seed embryos (M=0.013 μmol AsA min⁻¹ g⁻¹ protein) in relation to SSB embryos (M=0.006 μmol AsA min⁻¹ g⁻¹ protein). There was no significant difference in CAT activity between embryos from newly dispersed and SSB seeds (M=9.10 μmol min⁻¹ g⁻¹ protein; P=0.1893), and SOD activity was not detected in embryos from either treatment. MDA lipid peroxidation indicator contents were higher (P=0.0204) in embryos from newly dispersed seeds (37.69 nmols g⁻¹ FM) in relation to SSB embryos (28.56 nmols g⁻¹ FM).

4. Discussion

4.1. Soil seed bank classification

M. flexuosa, despite producing recalcitrant seeds, forms persistent SSB, as its seeds remain viable in the soil for more than one year after dispersal (definitions by Thompson et al., 1998; Csontos and Tamás, 2003). Many palm trees native to seasonal environments have long-lived seeds and form persistent SSB (Orozco-Segovia et al., 2003; Souza et al., 2019), but this phenomenon is considered rare for species that produce recalcitrant seeds (because of their desiccation intolerance and rapid losses of viability) (Hong and Ellis, 1996; Marques et al., 2018). Our literature review indicated that among the species with recalcitrant seeds studied until now, only *Podocarpus angustifolius*, a Cuban rainforest conifer, had the ability to form persistent SSB (Ferrandis et al., 2011). The present work evidenced that buriti seeds remained viable for more than two years in the environment, which is the first experimental evidence of persistent SSB formed by recalcitrant angiosperm seeds. The main factors controlling the dynamics of the *M. flexuosa* SSB are presented in Fig. 10.

Recalcitrance is common in seeds of species that occur in humid tropical environments, and it is usually associated with the occurrence of germination soon after dispersal and the establishment of seedling banks (Berjack and Pammenter, 2008; Long et al., 2015; Marques et al., 2018). The persistence of *M. flexuosa* seeds in the soil, therefore, is related to the association of recalcitrance and dormancy (which Baskin and Baskin [2014] attributed to a blockage of germination due to causes intrinsic to the dispersal units). The pronounced dormancy of *M. flexuosa* is due to the low growth potential of the embryo, which is not able to overcome the restrictive resistance of the adjacent operculum tissue (Silva et al., 2014). Dormant seeds commonly have mechanisms that can attenuate the impacts of biotic and abiotic agents during their permanence in the soil (Long et al., 2015). Buriti seeds have a thick seed coat with accumulations of phenolic compounds, as well as endosperm cells with rigid cell walls rich in mannans that provide protection to the embryo against mechanical impacts and predator and pathogen attacks (Silva et al., 2014; Dias et al., 2020). Additionally, accumulations of mucilage in the vacuoles of endospermic and embryonic cells are associated with an increased water retention capacity that can mitigate risks of dehydration (Silva et al., 2014; Veloso et al., 2016; Dias et al., 2020). Compounds such as alkaloids and terpenes, with antioxidant and antimicrobial activities, were also identified in *M. flexuosa* seeds and can contribute to maintaining the viability of buriti seeds in SSB (Silva et al., 2014; Veloso et al., 2016).

4.2. Influences of edaphic factors on soil seed bank dynamics

Soil attributes had only limited influences on the dynamics of the buriti SSB. There were no significant correlations between soil attributes and SSB dynamics indicators (Fig. 5), although maintenance indicators appeared to be associated with areas with higher levels of fertility (Fig. 4). The chemical properties of a soil will influence water retention and availability, and can affect microbiological activity and, consequently, seed persistence, as has been demonstrated for several species (Long et al., 2015). The restricted influences of the edaphic factors of the microenvironments evaluated here on the dynamics of buriti SSB suggest the phenotypic plasticity of adult plants (as there were no effects of soil fertility on the positive input – the production of diaspores) and a great homeostatic capacity of the seeds (as their persistence was not affected by soil conditions).

There were strong positive correlations between input and negative output indicators (Fig. 5), which indicated that the seeds suffered strong pressure from the local biota in vereda environments, being impacted mainly by herbivore and pathogen attacks. The proportion of intact to viable seeds was highest among buried seeds, which indicates that permanence under the soil is crucial for maintaining their viability. Exposed seeds are more vulnerable to herbivory and more prone to dehydration. Rapid germination after dispersal is a recalcitrant seed strategy to escape predation and avoid death through desiccation; that strategy is not available, however, to dormant seeds (Tweddle et al., 2003; Berjack and Pammenter, 2013; Dalling et al., 2020). It is therefore possible that buriti seeds have an efficient mix of physical and chemical defenses that can guarantee their persistence in the soil seeds (Silva et al., 2014; Moura et al., 2019) – which was previously only known for orthodox (Dalling et al., 2020).

4.3. Effects of permanence in seed banks on seed structure and physiology

A high proportion of buriti SSB seeds maintained their ability to germinate and generate normal seedlings, which can be attributed to their large homeostatic capacity related to water retention and oxidative stress control (Figs. 6, 8, 10). Maintaining high water contents is fundamental to ensuring the viability of recalcitrant seeds (Berjak and Pammenter, 2008; Marques et al., 2018). Although the marshy environments of veredas favor seed hydration, strong fluctuations of soil moisture can still occur throughout the year (Porto et al., 2018). Studies have shown that buriti seeds have high water retention capacities, which is related to mucilage accumulations in the vacuoles of endospermic and embryonic cells (Silva et al., 2014;

Veloso et al., 2016; Moura et al., 2019). The water retained in the endosperm can easily flow to the embryo and will have a buffering effect in case of a water deficit (Dias et al., 2020).

The ability to control oxidative stress is also crucial for the maintenance of buriti seeds in SSB. The loss of viability of recalcitrant seeds is associated with damage to cellular components caused by ROS accumulations (Berjak and Pammenter 2008, 2013; Marques et al., 2017). That damage will intensify with the progression of dehydration, when increases in ROS production are accompanied by reductions in intracellular antioxidant defense activities (Berjak and Pammenter 2008, 2013). Despite the maintenance of their respiratory capacities (the main source of ROS in seeds, Bailly, 2019), H₂O₂ levels did not change in buriti SSB seeds, and accumulations of O₂⁻ in embryo tissues were not detected; MDA (indicator of lipid peroxidation) production also remained low – preserving cell structure. The control of oxidative stress in seeds occurs through both enzymatic and non-enzymatic pathways (Bailly, 2019). Despite low levels of antioxidant enzyme activity (only APX and CAT activities were detected in the embryos), it is important to emphasize that buriti embryos are rich in phenolic compounds (Fig. 8f and Silva et al., 2014) and that palm seeds generally accumulate vitamin E (Siles et al., 2013). Both groups of compounds have relevant roles in the non-enzymatic control of oxidative stress (Bailly, 2019).

SSB buriti seeds showed greater germinability than newly dispersed seeds (which did not germinate until the operculum was removed) – indicating that dormancy intensity decreases during passage through the SSB (Fig. 10). Previous studies have identified the role of the operculum in maintaining dormancy in Cerrado palm trees (Carvalho et al., 2015; Mazzottini-dos-Santos et al., 2018; Souza et al., 2019), and we observed no weakening of the operculum tissues during the passage of seeds through the SSB in the present study. Thus, changes in the embryo's growth potential are crucial to overcoming dormancy (Fig. 6). That proposition is supported by evidence of embryonic reserve mobilization (reductions in embryo mass) (Fig. 6e), cell expansion in different regions of the embryo (Fig. 7), and increased embryo size (Fig. 6d) after passage through the SSB. Those same processes were also found to be involved in overcoming dormancy in the SSB of the Cerrado palm *Butia capitata* (Soares et al., 2021).

Passage through the SSB allows the seeds of *M. flexuosa* to germinate under a wider range of temperatures, and makes them more sensitive to stratification at low temperatures (Fig. 9). Temperature is a key factor for controlling germination and overcoming dormancy, and passage through a SSB is commonly related to increased seed sensitivity to temperature (Baskin and Baskin, 2014; Dessent et al., 2019; Souza et al., 2019). It is also possible that gradual changes in hormone levels during permanence in the SSB are involved in this process, as has

already been reported for seeds of several species (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Long et al., 2015). The balance between gibberellins and abscisic acid has been shown to be decisive for controlling the germination of palm seeds (Ribeiro et al., 2015; Dias et al., 2017), and future studies on the subject, involving buriti seeds, may contribute to an expansion of our knowledge concerning the ecophysiology of SSB.

The control of oxidative stress also appears to be related to overcoming dormancy in buriti SSB. Oxidative stress is one of the main causes of viability losses of recalcitrant seeds (Xia et al., 2012; Marques et al. 2017). When ROS levels can be controlled, however, those molecules play important signaling roles in the hormone metabolism pathways that control germination (Berjack and Pammenter, 2008; Umarani et al., 2015; Bailly, 2019). Interestingly, conditions that impose moderate water stress on recalcitrant seeds can apparently stimulate germination (Long et al., 2015; Phartyal et al. 2020). That phenomenon was described for buriti, whose seeds tend to germinate in less humid microenvironments and remain dormant in flooded soils (Porto et al., 2018). Our results show that buriti seeds are efficient at controlling oxidative stress, and it is possible that the controlled production of ROS is related to the gradual acquisition of embryonic growth capacity through mediated changes in hormone levels.

4.4. *Mauritia flexuosa* persistent SSB and natural population management

Persistent SSB favor the resilience and spatial distribution of species (Marques et al., 2018; Gioria et al., 2021; He et al., 2021), and they certainly play a crucial role in the reproductive success of buriti (Melo et al., 2018; Moura et al., 2019). Although the long-term maintenance capacities of buriti SSB have been demonstrated, recalcitrance in SSB seeds limits their occurrence to humid environments. In the Cerrado biome, the buriti palm is associated with vereda ecosystems, which have been impacted both locally (by deforestation and the agricultural use of water resources) and by global climate change, placing those palm populations under imminent threats (Porto et al., 2018; Veloso et al., 2018). The balance between environmental impacts and resilience will define the fate of this iconic palm tree in those environments. Our results indicate that the presence of persistent SSB must be considered in the management of natural populations of *M. flexuosa*. In addition to contributing to the resilience of populations, SSB can provide genetic material for the recovery of areas impacted by the suppression of adult plants. On the other hand, monitoring the soil moisture level is crucial for population management, since soil drying will lead to the loss of an important component of the population, represented by SSB embryos.

5. Conclusions

M. flexuosa, despite producing recalcitrant seeds, forms persistent soil seed banks – and thus represents the first such definitive report for angiosperms. The physical and chemical attributes of the soil have no direct influence on the dynamics of those banks, although soil moisture is essential for the maintenance of seed viability in SSB. The maintenance of seed viability during its permanence in the soil is mainly related to the seed's capacity to retain water and control oxidative stress, with predation and microbial contamination being the main causes of bank depletion. Newly dispersed seeds have pronounced dormancy, but SSB embryos gradually acquire temperature sensitivity and growth capacities that can overcome physical restrictions imposed by adjacent seed structures and germinate. Seed adaptations for persistence in marsh environments contribute to the reproductive success and wide distribution of *M. flexuosa*. Persistent SSB can contribute to the regeneration of degraded areas and, on the other hand, require monitoring of soil moisture, which is essential for its maintenance.

Author contribution statement

LMR, PSNL and YRFN conceived the work. HFS collected the samples, performed the experiments, and drafted the initial text. DSD performed the analyses and interpreted the results of oxidative stress. AMA performed the analyses and interpreted the edaphic results. HCM-S performed the anatomical evaluations and interpreted the related results. LMR, PSNL and YFN interpreted the ecophysiological data. LMR drafted the final text. All of the authors have read the final version of the manuscript and agreed to its submission.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the Long Term Ecological Research Network (Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração - PELD-VERE) of the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Process 441583/2020-2); the Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Finance Code 88887.136273/2017-00); the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-04816-17); and the Ministry of Science, Technology and Innovations – MCTI. The authors are grateful to FAPEMIG for the doctoral scholarship granted to HFS, and to CNPq for the research productivity scholarships granted to PSNL, LMR, and YRFN.

References

- 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
- Andrade, L.A.Z. de, Miranda, H.S., 2014. The dynamics of the soil seed bank after a fire event in a woody savanna in central Brazil. *Plant Ecol.* 215, 1199-1209
- Ávila, M.A. de, 2019. *Mauritia flexuosa* e *Mauritiella armata*: de floresta ombrófila a espécies-chaves no semiárido mineiro. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras. Bibliografia. 112 p. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/33631>
- Bailly, C., 2019. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochem. J.* 476, 3019-3032
- Barbedo, C.J., 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *J. Seed Sci.* 40, 221-236
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, 2nd ed. Elsevier/AP, San Diego, CA.
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Ann. Bot.* 101, 213–228
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00478>.
- Bicalho, E.M., Santos, T.R., Garcia, Q.S., 2019. Abscisic acid and the antioxidant system are involved in germination of *Butia capitata* seeds. *Acta Bot. Bras.* 33, 174–178.
- Brasil – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Regras para análise de sementes. MAPA: Brasília
- 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
- Christoffoleti, P.J., Caetano, R.S.X., 1998. Soil seed banks. *Sci. Agric.* 55, 74-78

- Csontos, P., Tamás, J., 2003. Comparisons of soil seed bank classification systems. *Seed Sci. Res.* 13, 101–111
- Dalling, J.W., Davis, A.S., Arnold, A.E., Sarmiento, C., Zalamea, P-C., 2020. Extending plant defense theory to seeds. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 51, 123-41
- Daws, M.I., Wood, C.B., Marks, T.R., Pritchard, H.W., 2007. Desiccation sensitivity in the *Arecaceae*: correlates and frequency. *S. Afr. J. Bot.* 73(3), 483, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.04.007>
- Dessent, J., Lawler, S., Nielsen, D., 2019. The impact of increased temperatures on germination patterns of semi-aquatic plants. *Seed Sci. Res.* 29, 204-209
- 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 Physiology and Biochemistry* 118, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.015>
- Dias, G.P., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Nunes, Y.R.F., Bragança, G.P.P., Isaias, R.M. dos S., Mercadante-Simões, M.O., 2020. Reserve mobilization dynamics and degradation pattern of mannan-rich cell walls in the recalcitrant seed of *Mauritia flexuosa* (*Arecaceae*). *Plant Physiol. Biochem.* 156, 445–460
- Donagema, G.K., Campos, D.V.B., Calderano, S.B., Teixeira, W.G., Viana, J.H.M., 2001. *Manual de Métodos de Análise de Solo*. Embrapa Solos: Rio de Janeiro
- Dransfield, J., Uhl, N.W., Lange, C., Baker, W.J., Harley, M., Lewis, C., 2008. *Genera Palmarum. The evolution and classification of palms*. International Palm Society, London
- Endress, B.A., Horn, C.M., Gilmore, M.P., 2013. *Mauritia flexuosa* palm swamps: Composition, structure and implications for conservation and management. *For. Ecol. Manag.* 302, 346–353
- Ferrandis, P., Bonilla, M., Osorio, L. del C., 2011 Germination and soil seed bank traits of *Podocarpus angustifolius* (*Podocarpaceae*): an endemic tree species from Cuban rain forests *Rev. Biol. Trop.* 59, 1061-1069
- Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171, 501-523
- Garwood, N.C., 1989. Tropical Soil Seed Banks: a Review. In: Leck, M.A., Parker, T.V., Simpson, R.L. (eds) *Ecology of Soil Seed Banks*. Academic Press
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superóxido dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314
- Gioria, M., Carta, A., Baskin, C.C., Dawson, W., Essl, F., Kreft, H., Pergl, J., Kleunen, M., Weigelt, P., Winter, M., Pyšek, P., 2021. Persistent soil seed banks promote naturalisation and invasiveness in flowering plants. *Ecology Letters* ele.13783. <https://doi.org/10.1111/ele.13783>

- Harding K., Benson E.E. (1995) Biochemical and molecular methods for assessing damage, recovery and stability in cryopreserved plant germplasm. In: Grout B.W.W. (Ed.), Genetic preservation of plant cells in vitro. Springer, Berlin, Germany, pp 113–167.
- He, M., Xin, C., Baskin, C.C., Li, J., Zhao, Y., Na, H., Sheng, X., Zhao, L., Zhao, Y., Ma, M., 2021. Different response of transient and persistent seed bank of alpine wetland to grazing disturbance on the Tibetan Plateau. *Plant Soil* 459, 93-107
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolate chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198
- Hong, T.D., Ellis, R.H., 1996. A Protocol to Determine Seed Storage Behavior. IPGRI. Technical Bulletin No. 1. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- IEF – Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais, 2008. APA Pandeiros. <http://www.ief.mg.gov.br>
- Jensen WA (1962) Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman. San Francisco.
- Karnovsky MJA. A formaldehyde-glutaraldehyde fixate of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v. 27, p. 137A-138A, 1965.
- Lima, N.E. de, Lima-Ribeiro, M.S., Tinoco, C.F., Terribile, L.C., Collevatti, R.G., 2014. Phylogeography and ecological niche modelling, coupled with the fossil pollen record, unravel the demographic history of a Neotropical swamp palm through the Quaternary. *J. Biogeogr.* 41, 673–686
- Long, R.L., Gorecki, M.J., Renton, M., Scott, J.K., Colville, J., Goggin, D.E., Commander, L.E., Westcott, D.A., Cherry, H., Finch Savage, W.E., 2015. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biol. Rev.* 90, 31-59
- Lorenzi, H., Noblick, L., Kahn, F., Ferreira, E., 2010. Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeira). Nova Odessa: São Paulo
- Marques, A., Buijs, G., Ligterink, W., Hilhorst, H., 2018. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. *Funct. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1071/FP18022>
- Marques, E.R., Vaz, T. A. A., Rodrigues-Junior, A.G., Davide, A.C., José, A.C., 2017. In situ germination of two tropical recalcitrant seeds and changes in activity of ROS-scavenging enzymes. *Trees*. doi 10.1007/s00468-017-1584-9
- Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., 2018. Structural changes in the micropylar region and overcoming dormancy in Cerrado palm seeds. *Tress* 32, 1415-1428
- Melo, W.A., Freitas, C.G., Bacon, C.D., Collevatti, R.G., 2018. The road to evolutionary success: insights from the demographic history of an Amazonian palm. *Heredity* 121, 183-195
- Moura, A.C.F., Ribeiro, L.M., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Mercadante-Simões, M.O., Nunes, Y.R.F., 2019. Cytological and histochemical evaluations reveal roles of the cotyledonary petiole in the germination and seedling development of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Protoplasma* 256, 1299–1316

- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880
- Nielsen, D.L., Campbell, C., Rees, G.N., Durant, R., Littler, R., Petrie, R., 2018. Seed bank dynamics in wetland complexes associated with a lowland river. *Aquat. Sci.* 80, 23
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59:368-373
- Oracz, K., Voegelé, A., Tarkowská, D., Jacquemoud, D., Turecková, V., Urbanová, T., Strnad, M., Sliwinska, E., Leubner-Metzger, G., 2012. 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 Cell Physiol.* 53, 81-95.
- Orozco-Segovia, A., Batis, A.I., Rojas-Aréchiga, M., Mendoza, A., 2003. Seed biology of palms: A Review. *Palms* 47(2), 79–94
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT (2011) Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Choarini-Garcia H, Melo RCN (Eds) *Light Microscopy: Methods and Protocols*. Springer/Humana Press. New York. pp. 37-49
- Phartyal, S.S., Rosbakh, S., Poschlod, P., 2020. Seed germination of mudflat species responds differently to prior exposure to hypoxic (flooded) environments. *Seed Sci. Res.* 30, 268-274
- Porto, K.C.N., Nunes, Y.R.F., Ribeiro L.M., 2018. The dynamics of recalcitrant seed banks of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) reveal adaptations to marsh microenvironments. *Plant. Ecol.* 219, 199-207
- Ribeiro, L.M., Garcia, Q.S., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2015. Tissue-specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. *Physiol Plantarum* 153, 627–642. <https://doi.org/10.1111/ppl.12269>
- Ribeiro, L.M., Souza, P.P., Rodrigues-Junior, A.G., Oliveira, T.G.S., Garcia, Q.S., 2011. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. *Seed Sci. Technol.* 39, 303-317
- Roland, A.M., 1978. General preparations and staining of thin sections. In: Hall, J.L. (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. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.008>
- Silva, R.S., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Nunes, Y.R.F., Lopes, P.S.N., 2014. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*) – the swamp palm. *Flora* 209, 674-685
- Soares, J.R., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Lopes, P.S.N., 2021. Hydration cycles and overcoming dormancy in *Butia capitata* (Arecaceae) diaspores. *Trees*. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02132-9>

- Souza, C.C., Oliveira, F.A., Silva, I.F., Neto, M.A.S., 2002. Avaliação de métodos de determinação de água disponível em solo cultivado com algodão. *Pesq. Agropec. Bras.* 37(3), 337-341
- Souza, J.N., Agostinho, C. de O., Ribeiro, L.M., Azevedo, A.M., Lopes, P.S.N., 2019. Edaphic and climatic control of macaúba palm seed bank dynamics. *Ind. Crops Prod.* 141:111802 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111802>
- Spera, M.R.N., Cunha, R., Teixeira, J.B., 2001. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti. *Pesq. Agropec. Bras.* 36, 1567-1572
- Thompson, K., Bakker, J.P., Bekker, R.M., Hodgson, J.G., 1998. Ecological correlates of seed persistence in soil in the north-west European flora. *J. Ecol.* 86, 163–169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.1998.00240.x>.
- Thompson, K., Grime, J.P., 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *J. Ecol.* 67, 893-921
- Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91, 294–304
- Umarani, R., Aadhavan, E.K., Faisal, M.M., 2015. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. *Curr. Sci.* 108, 2023-2034
- Veloso, M.D.M., Fernandes, L.A., Ávila, M.A., Nunes, Y.R.F., Frazão, L.A., 2018. Soil Attributes in Anthropized Hygrophilous Forest in Northern Minas Gerais State, Brazil. *J. Agric. Sci. Technol. B* 8, 311-319
- Veloso, V.H.S., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Nunes, Y.R.F., 2016. Cytological aspects of recalcitrance in dormant seeds of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Acta Physiol. Plant* 38, 171
- Virapongse, A., Endress, B.A., Gilmore, M.P., Horn, C., Romulo, C., 2017. Ecology, livelihoods, and management of the *Mauritia flexuosa* palm in South America. *Glob. Ecol. Conserv.* 10, 70–92
- Williams, P.R., Congdon, R.A., Grice, A.C., Clarke, P.J., 2005. Germinable soil seed banks in a tropical savanna: seasonal dynamics and effects of fire. *Austral Ecol.* 30, 79-90
- Xia, K., Daws, M.I., Stuppy, W., Zhou, Z-K., Pritchard, H.W., 2012. Rates of water loss and uptake in recalcitrant fruits of *Quercus* species are determined by pericarp anatomy. *PLoS ONE* 7, e47368. doi:10.1371/journal.pone.0047368

Table

Tab. 1 Soil physicochemical characteristics of four vereda areas with populations of *Mauritia flexuosa*. Means of 100 samples per area, followed by the standard deviation.

Characteristic	Area							
	1		2		3		4	
pH	5.84	± 0.06	4.26	± 0.07	4.92	± 0.05	4.04	± 0.05
PM (mg dm ⁻³)	47.42	± 6.66	55.45	± 13.5	31.95	± 4.35	64.85	± 22.3
PR (mg dm ⁻³)	45.17	± 0.95	12.42	± 1.20	23.48	± 1.63	28.82	± 2.30
K (mg dm ⁻³)	173.97	± 11.7	74.85	± 8.12	187.56	± 12.4	258.13	± 29.9
Ca (cmolc dm ⁻³)	29.81	± 2.26	2.52	± 0.37	25.88	± 2.08	4.63	± 0.93
Mg (cmolc dm ⁻³)	5.54	± 0.50	0.81	± 0.07	9.42	± 0.92	1.00	± 0.17
Al (cmolc dm ⁻³)	0.16	± 0.02	4.03	± 0.33	0.81	± 0.15	2.14	± 0.22
HAl (cmolc dm ⁻³)	2.77	± 0.19	28.05	± 2.08	7.99	± 1.08	6.50	± 0.53
s (cmolc dm ⁻³)	35.79	± 2.68	3.62	± 0.42	35.78	± 2.90	6.29	± 1.15
t (cmolc dm ⁻³)	35.94	± 2.68	7.54	± 0.40	36.59	± 2.80	8.43	± 1.21
m (%)	0.59	± 0.10	55.12	± 4.22	10.35	± 2.94	39.60	± 3.01
T (cmolc dm ⁻³)	38.55	± 2.65	31.57	± 1.92	43.77	± 2.41	12.79	± 1.19
V (%)	90.47	± 1.18	15.77	± 2.36	73.81	± 4.14	37.43	± 3.71
OM (%)	54.02	± 3.69	61.39	± 2.94	37.84	± 3.34	64.83	± 4.26
MM (%)	45.98	± 3.69	38.61	± 2.94	62.16	± 3.34	35.17	± 4.26

PM – P-Mehlich; PR – residual P; HAl – H+Al; s – sum of exchangeable bases; t – effective total cation exchange capacity; m – percentage of aluminum saturation; T – total cation exchange capacity; V – percentage of base saturation; OM – organic matter; MM – mineral matter.

Figures

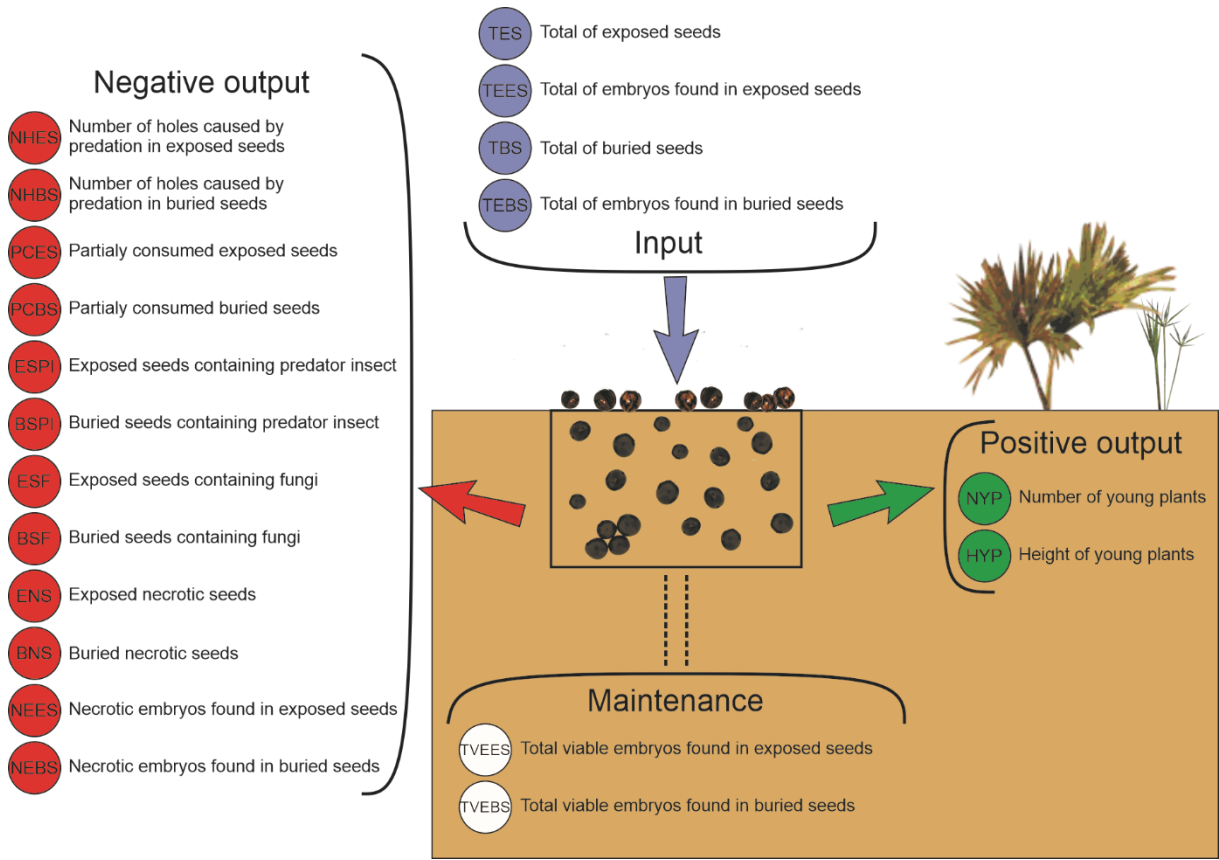


Fig. 1 Schematic illustration of the definitions of input, maintenance, negative output, and positive output indicators of the *Mauritia flexuosa* SSB, based on the methodology of Souza et al. (2019).

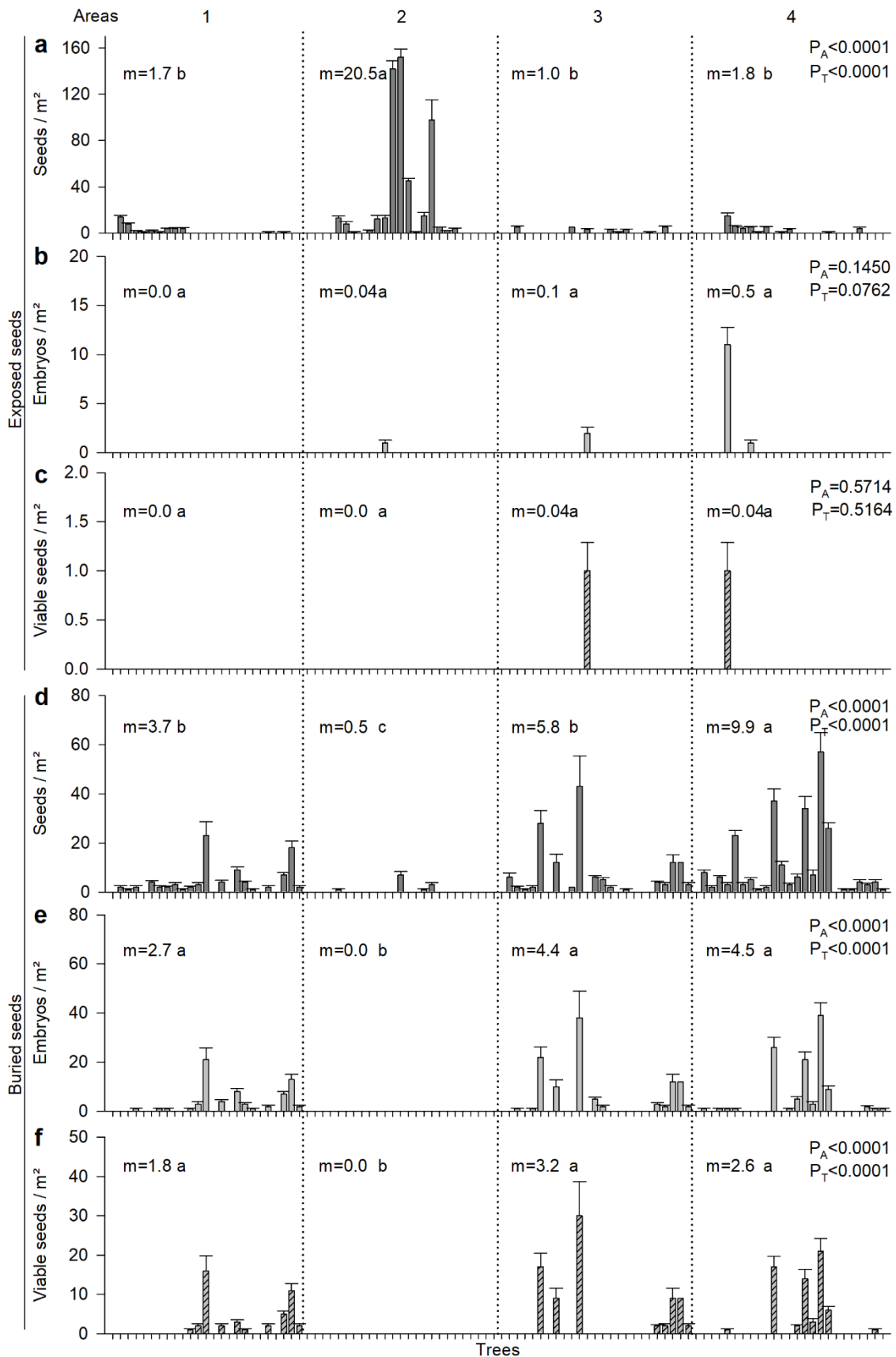


Fig. 2 Characterization of the *Mauritia flexuosa* SSB in four vereda areas. Numbers of seeds (a, d), embryos (b, e), and viable seeds (c, f) exposed and buried. m , mean; P_A , P_T , levels of significance for

areas and individuals, respectively, using the Kruskal-Wallis test. Different letters indicate differences among the means of the areas, according to the Dunn *post-hoc* test ($P \leq 0.05$). Dotted lines separate the areas. Vertical bars indicate the standard errors of the means.

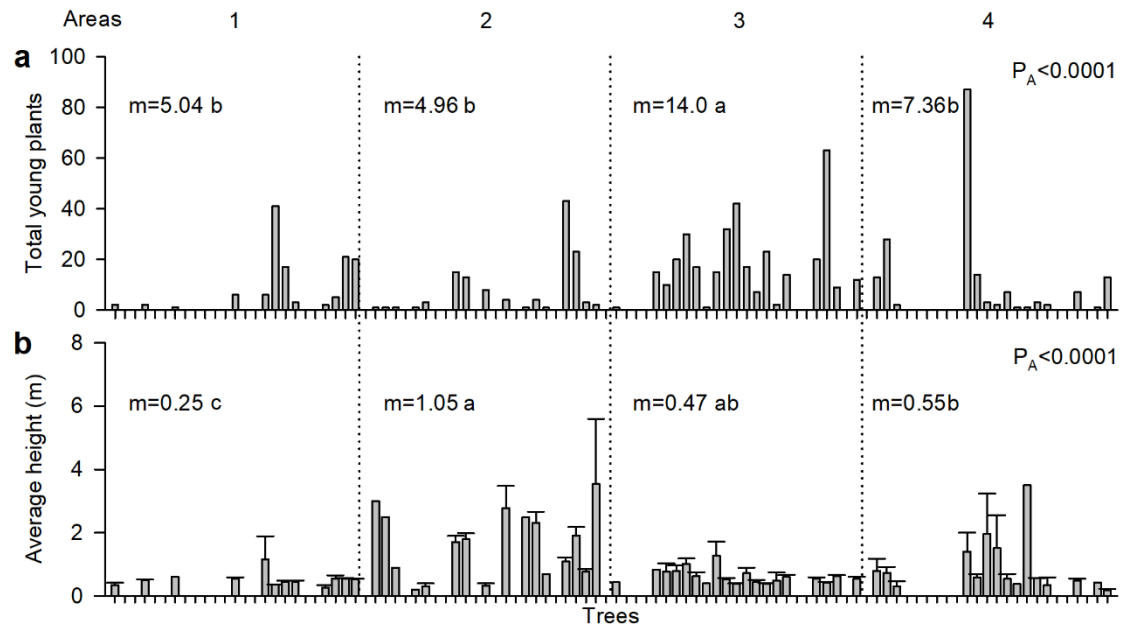


Fig. 3 Characterization of the population component of young plants of *Mauritia flexuosa* in four vereda areas. Numbers (a) and average heights (b) of young plants. m, average. P_A , level of significance for the area, by the Kruskal-Wallis test. Different letters indicate differences among the means of the areas, according to the Dunn *post-hoc* test ($P \leq 0.05$). Dotted lines separate the areas. Vertical bars indicate the standard errors of the means.

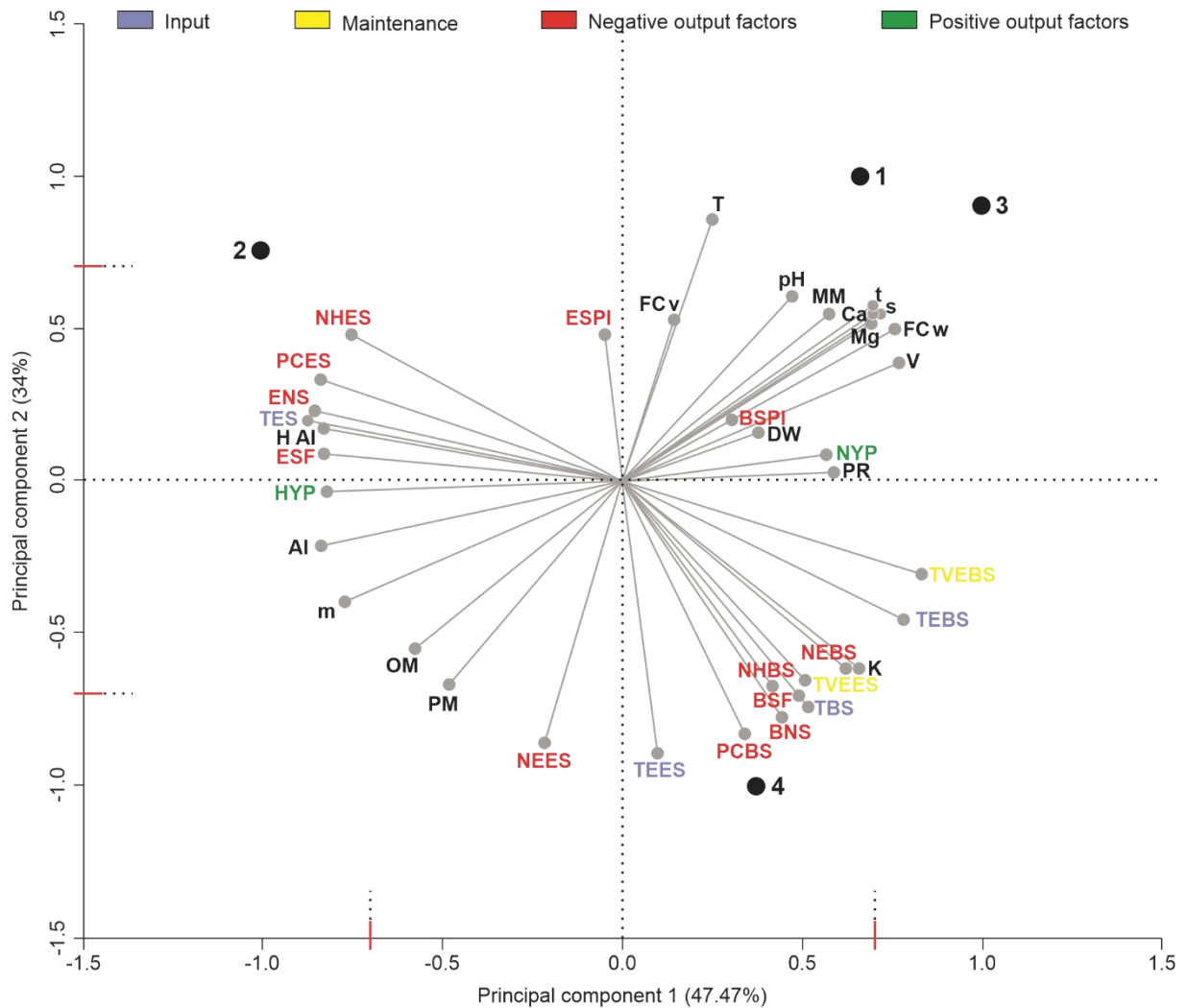


Fig. 4 Graphical dispersion of the main components of the variables related to the study areas (black circles, numbered 1-4), soil attributes and characteristics of the seeds and young plants of *Mauritia flexuosa*, considering indicators of input, maintenance, negative output, and positive output of the SSB (Fig. 1). Soil attributes: pH; P-Mehlich (PM); residual P (PR); K; Ca; Mg; Al; H+Al(HAl); sum of exchangeable bases (s); effective total cation exchange capacity (t); percentage of aluminum saturation (m); total cation exchange capability (T); percentage of base saturation (V); organic matter (OM); mineral matter (MM); v/v water retention capacity (FCv); water retention capacity m/m (FCw). Indicators related to SSB dynamics: total exposed seeds (TES); numbers of holes caused by predation of exposed seeds (NHES); partially consumed exposed seeds (PCES); exposed seeds containing predatory insects (ESPI); exposed seeds showing fungal growth (ESF); necrotized exposed seeds (ENS); total buried seeds (TBS); numbers of holes caused by predatory insects in buried seeds (NHBS); partially consumed buried seeds (PCBS); buried seeds containing predatory insects (BSPI); buried seeds showing fungal growth (BSF); necrotic buried seeds (BNS); total embryos found in exposed seeds (TEES); total viable embryos found in exposed seeds (TVEES); necrotic embryos found in exposed seeds (NEES); total embryos found in buried seeds (TEBS); total viable embryos found in buried seeds (TVEBS); necrotic embryos found in buried seeds (NEBS); numbers of young plants (NYP); young plant heights (HYP); distances from the adult plant to the nearest body of water (DW). Dotted red lines indicate correlation estimates > 0.7.

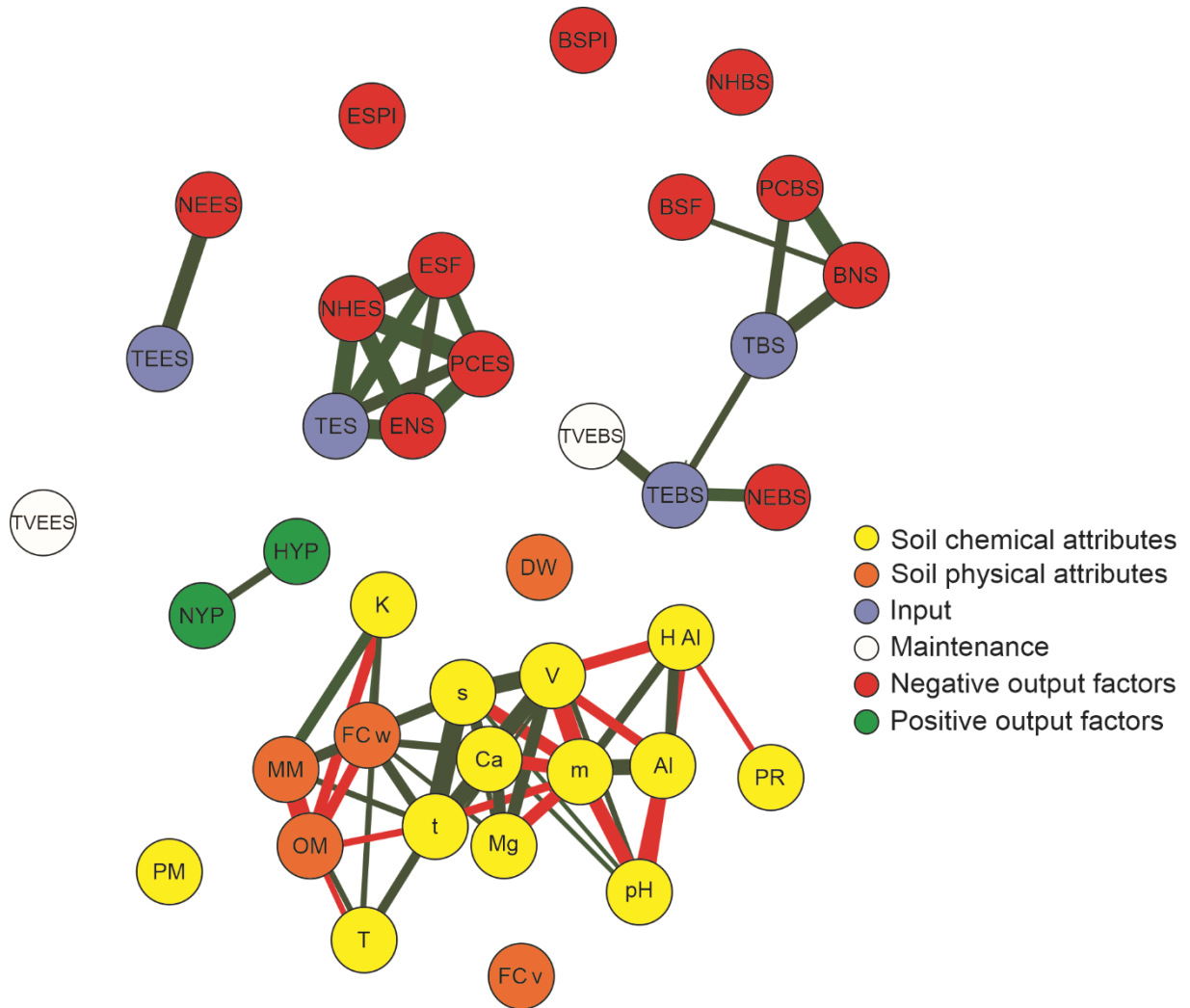


Fig. 5 Estimated correlation network based on soil attributes and the characteristics of seeds and young plants of *Mauritia flexuosa*, from four veredas areas, related to SSB input, maintenance, negative output, and positive output (Fig. 1). Green and red lines represent, respectively, positive and negative Spearman correlations by the t test ($P < 0.05$). Line thickness is proportional to the correlation estimate. Soil attributes: pH; P-Mehlich (PM); residual P (PR); K; Ca; Mg; Al; H+Al(HAl); sum of exchangeable bases (s); effective total cation exchange capacity (t); percentage of aluminum saturation (m); total cation exchange capacity (T); percentage of base saturation (V); organic matter (OM); mineral matter (MM); v/v water retention capacity (FCv); m/m water retention capacity (FCw). Indicators related to SSB dynamics: total exposed seeds (TES); number of holes caused by predation of exposed seeds (NHES); partially consumed exposed seeds (PCES); exposed seeds containing predatory insect (ESPI); exposed seeds showing fungal growth (ESF); necrotized exposed seeds (ENS); total buried seeds (TBS); numbers of holes caused by predatory insects in buried seeds (NHBS); partially consumed buried seeds (PCBS); buried seeds containing predatory insects (BSPI); buried seeds showing fungal growth (BSF); necrotic buried seeds (BNS); total embryos found in exposed seeds (TEES); total viable embryos found in exposed seeds (TVEES); necrotic embryos found in exposed seeds (NEES); total embryos found in buried seeds (TEBS); total viable embryos found in buried seeds (TVEBS); necrotic embryos found in buried seeds (NEBS); numbers of young plants (NYP); young plant heights (HYP); distances from the adult plant to the nearest body of water (DW).

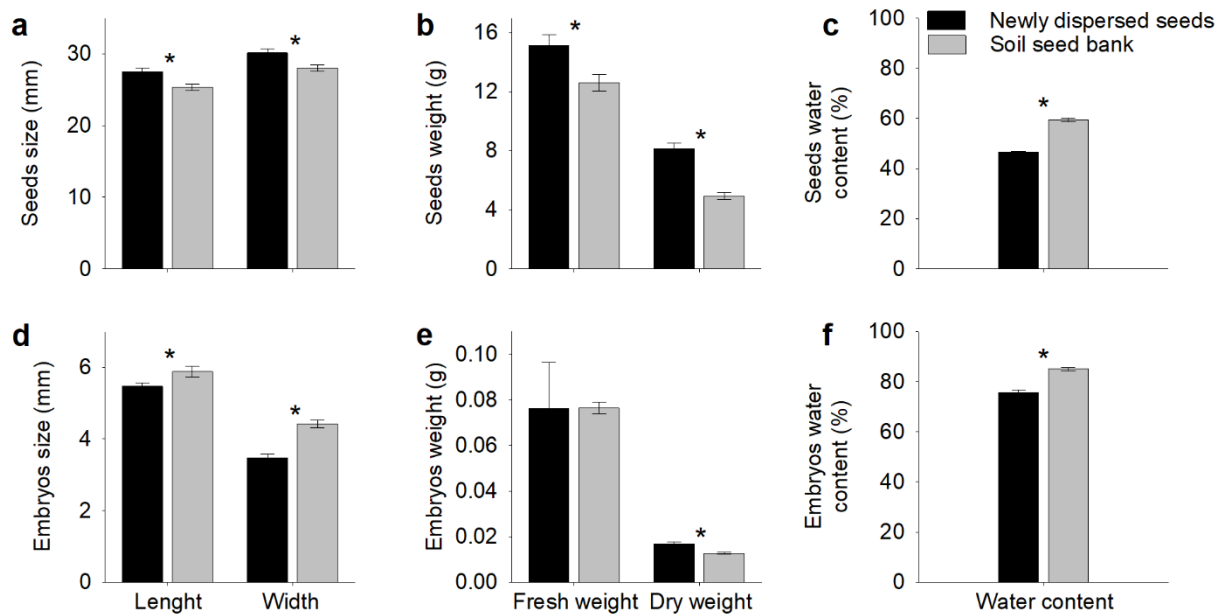


Fig. 6 Biometric characteristics of newly dispersed and SSB seeds of *Mauritia flexuosa* collected in two veredas areas. (a-c) seeds; (d-f) embryos. Asterisks indicate statistical differences among treatments by the t test ($P \leq 0.05$). Vertical bars indicate the standard errors of the means.

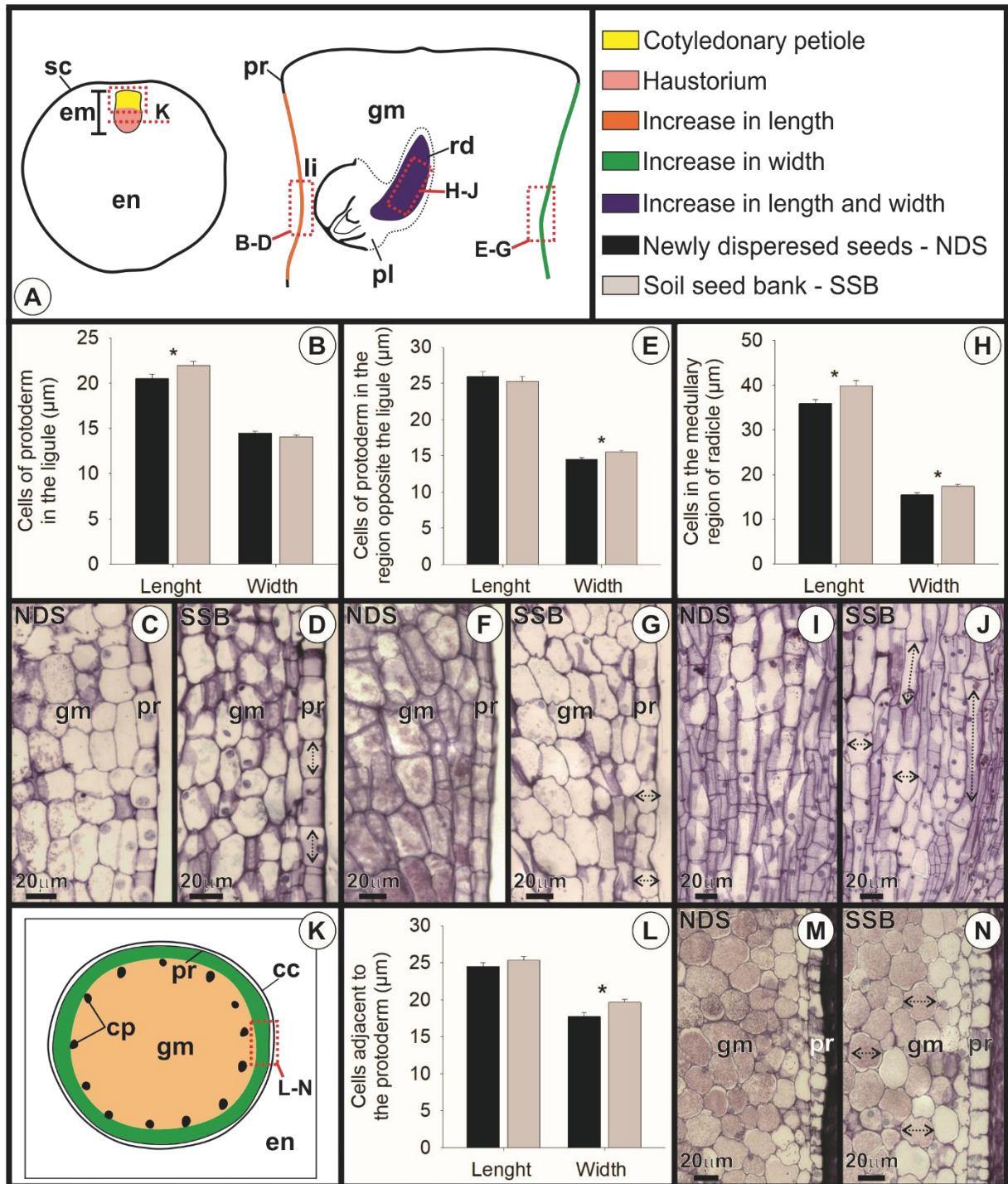


Fig. 7 Micromorphometric evaluations of newly dispersed and SSB seeds of *Mauritia flexuosa* collected in two veredas areas. (a) Schematic representation of the seed and embryo (left) and the longitudinal section of the cotyledonary petiole (right). (k) Schematic representation of the cross section of the haustorium and adjacent endosperm. In the diagrams, dotted rectangles indicate the regions evaluated, showing regions with increased cell lengths (orange) or diameters (green), or both (purple), in SSB seeds. (b-d) Protoderm cells in the ligule region. (e-g) Protoderm cells in the region opposite the ligule. (h-j) Cells in the medullary region of the radicle. (l-n) Cells adjacent to the haustorium protoderm. (c, f, i, m) Details of embryo cells from newly dispersed seeds and (d, g, j, n) from the SSB. Arrows indicate the direction of cell expansion. (b,e,h) Asterisks indicate statistical differences between treatments by the t test ($P \leq 0.05$); vertical bars indicate the standard errors of the means.

cc, collapsed cells; cp, cordões procambiais; em, embryo; en, endosperm; li, ligule; gm, ground meristem; op, operculum, pl, plumule; pr, protoderm; ps, procambial strands; rd, radicle; sc, seed coat.

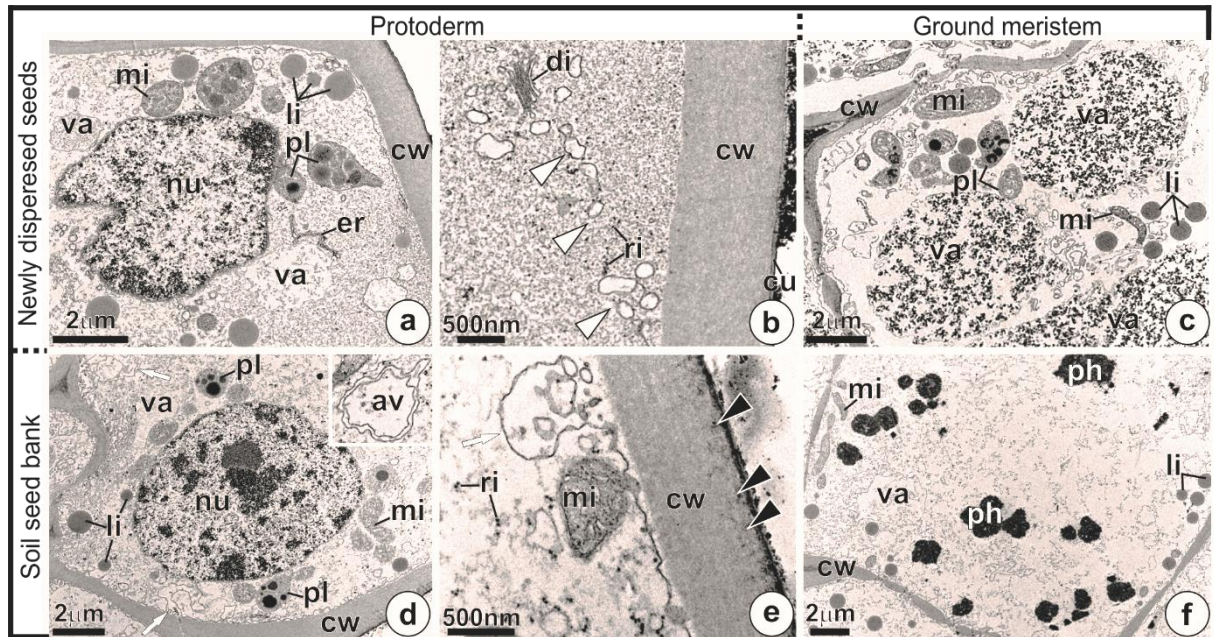


Fig. 8 TEM images of the cotyledonary petiole of *Mauritia flexuosa* in newly dispersed seeds and SSB seeds collected in two veredas areas. (a) Cell with dense cytoplasm, rich in mitochondria, plastids, mucilage in small vacuoles and in the cytosol, and lipid droplets. (b) Periphery of the cell showing a thick, cellulosic outer periclinal wall with a thin cuticle; cytoplasm containing ribosomes and dictyosomes emitting vesicles (white arrowheads). (c) Ground meristem cell with peripheral cytoplasm, rich in organelles and large mucilage containing vacuoles with granular appearances. (d) Cell with dense protoplast, rich in organelles, with a lower mucilage density and the proliferation of autophagic vacuoles (highlight). (e) Periphery of the cell with emphasis on alterations of cell wall electron densities (black arrowheads) and the conspicuous sinuosity in the plasma membrane (white arrow). (f) Fundamental meristem cell with peripheral cytoplasm, reduced quantities of mucilage, and accumulations of phenolic compounds. av, autophagic vacuole; cu, cuticle; cw, cell wall; di, dictyosome; er, endoplasmic reticulum; li, lipids; mi, mitochondria; nu, nucleus; ph, phenolic compounds; ri, ribosomes; va, vacuole.

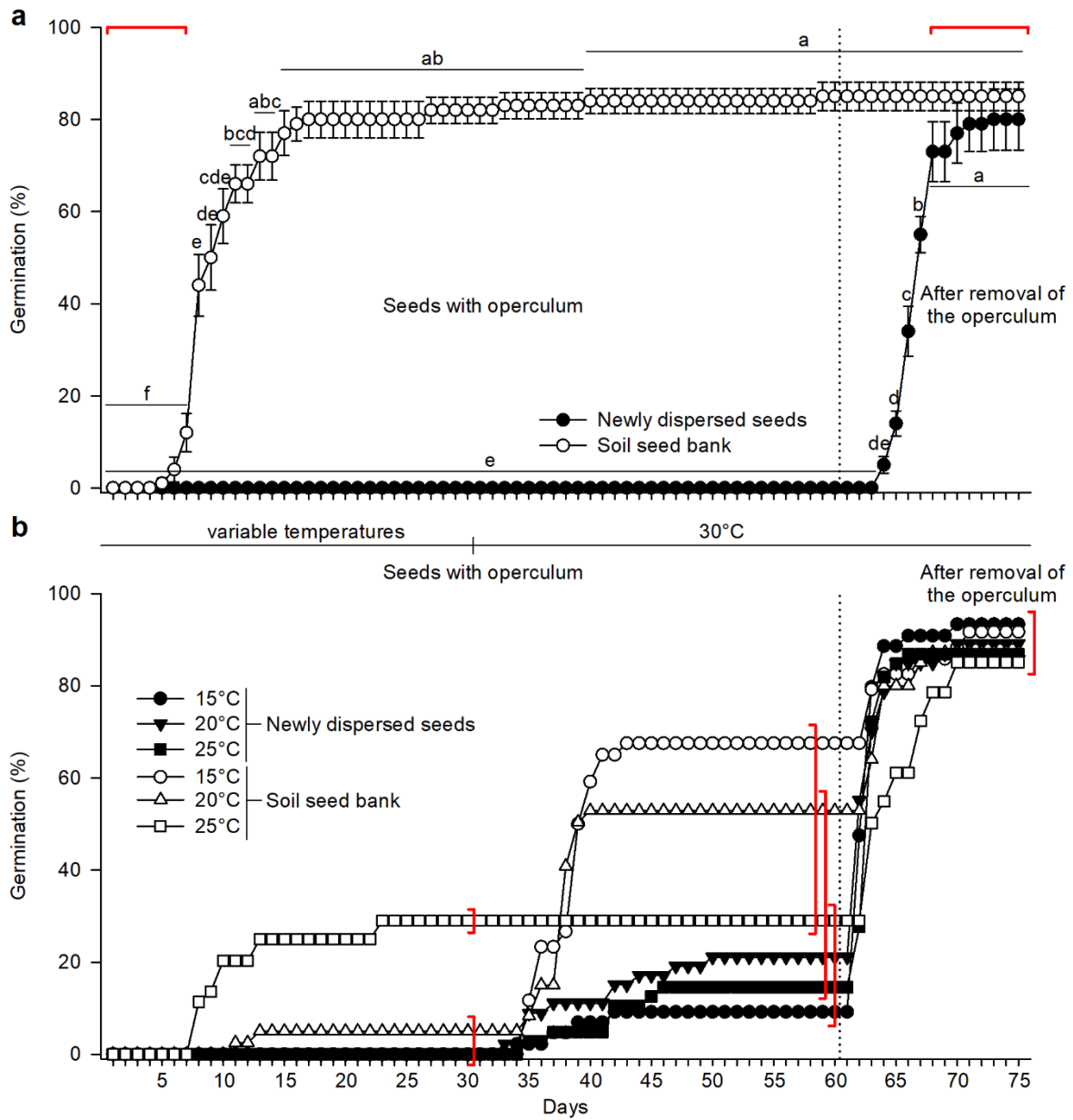


Fig. 9 Germination percentages of newly dispersed and SSB seeds of *Mauritia flexuosa* collected in two veredas areas submitted to different thermal regimes. (a) Seeds submitted to 30° C, for 60 days, followed by removal of the operculum and maintenance for another 30 days under the same thermal condition. (b) Seeds submitted to different temperatures (15, 20 or 25° C) for 30 days, to 30° C for 30 additional days, followed by removal of the operculum and their maintenance for 30 additional days in this thermal condition. (a) Vertical bars indicate the standard errors of the means. (b) Bars are not displayed here for ease of viewing. Different letters (in each line) indicate statistical differences among the means; (a) horizontal and (b) vertical red lines indicate no statistical differences between treatments (newly dispersed and SSB seeds), by the t test ($P \leq 0.05$).

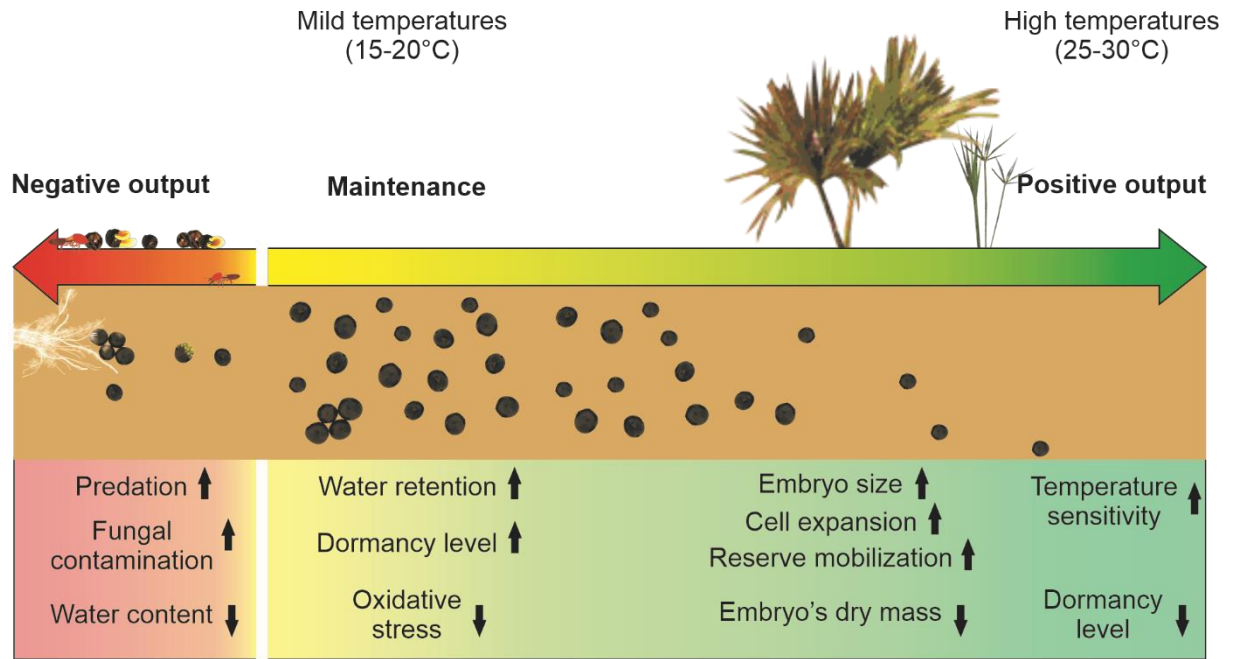


Fig. 10 Schematic illustration of the control of *Mauritia flexuosa* SSB dynamics. Up and down arrows show, respectively, how increasing or decreasing factor intensity contributes to the maintenance, positive output, and negative output of the SSB.

Capítulo II

Respostas fisiológicas e citológicas ao estresse térmico em sementes recalcitrantes de
Mauritia flexuosa (Arecaceae)*

*Manuscrito escrito nas normas do periódico Environmental and Experimental Botany.

Respostas fisiológicas e citológicas ao estresse térmico em sementes recalcitrantes de *Mauritia flexuosa* (Arecaceae)

Higor Fernando Salvador¹, Hellen Cassia Mazzottini-dos-Santos², Yule Roberta Ferreira Nunes², Leonardo Monteiro Ribeiro^{1,2}

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Rui Braga, Vila Mauricéia, 39401-089, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

Declarations of interest: none.

Resumo

Mauritia flexuosa é uma palmeira neotropical, que ocorre em ambientes alagados, e no bioma sazonal do Cerrado brasileiro caracteriza os ecossistemas de vereda. A espécie produz sementes recalcitrantes com dormência morfofisiológica, formando banco de sementes persistente no solo. Buscou-se avaliar a influência do estresse térmico em sementes da espécie. Usando diferentes regimes térmicos (30/20, 35/25, 40/30, 45/35°C), investigamos o papel da temperatura na germinação e respostas fisiológicas (viabilidade, controle do estresse oxidativo, manutenção da integridade de membranas) e citológicas das sementes (alterações morfológicas, ultraestruturais e mobilização de reservas). A germinação foi estimulada pelo regime térmico 30/20°C (típico da estação chuvosa), associada à redução da resistência mecânica exercida pelo opérculo da semente e à mobilização de reservas e expansão celular no embrião. O termoperíodo 40/30°C contribuiu para a manutenção da dormência nas sementes, enquanto 35/25°C induziu a elevação no nível da dormência, por não propiciar a germinação após expor as sementes a 30/20°C. O termoperíodo 45/35°C causou a morte das sementes, devido ao alto nível de estresse oxidativo e colapso das células embrionárias. As sementes possuem mecanismos de resistência ao estresse térmico, contando com sistemas antioxidantes enzimático e não-enzimático eficientes no controle do estresse oxidativo sob temperaturas elevadas, e reagem preventivamente às temperaturas elevadas não letais, restringindo a germinação e mantendo o metabolismo ativo. As respostas aos ciclos de temperatura são importantes no controle da dinâmica de bancos de sementes da espécie e podem estar relacionadas à adaptação da espécie à sazonalidade do Cerrado. O aumento das temperaturas locais coloca em risco o sucesso reprodutivo da espécie.

Palavras-chave: dormência; sensibilidade à dessecação; palmeiras; sistema antioxidante; ecofisiologia da germinação.

Abstract

Mauritia flexuosa is a neotropical palm, which occurs in marshy environments; in the seasonal Brazilian Cerrado biome, it characterizes the vereda ecosystems. The species produces recalcitrant seeds with morphophysiological dormancy, and maintains persistent soil seed banks. We sought to evaluate the influence of heat stress on seeds of this species. Using different thermal regimes (30/20, 35/25, 40/30, 45/35°C) we evaluated the role of temperature in germination and physiological (viability, control of oxidative stress, maintenance of membrane integrity) and cytological responses (morphometric and ultrastructural changes and reserve mobilization) of seeds. The thermal regime 30/20°C, typical of the wet/rainy season, favored the germination, and it was associated to the reduction of physical resistance from operculum, the embryonic cells expansion and reserves mobilization. The thermoperiod 40/30°C contributed to the maintenance of dormancy in the seeds, while 35/25°C induced an increase in the dormancy level (there was no germination recovery at 30/20°C). The thermoperiod 45/35°C caused the death of the seeds, due to the high level of oxidative stress and collapse of the embryonic cells. *M. flexuosa* seeds have mechanisms of resistance to heat stress, relying on efficient enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems in controlling oxidative stress under elevated temperatures, and react preventively at high temperatures, restricting germination and keeping an active metabolism. Responses to temperature cycles are important in controlling the dynamics of buriti seed soil banks and may be associated to the species' adaptation to the Cerrado seasonality. However, the reproduction of this species can be threatened by the increase in local temperatures.

Keywords: dormancy; desiccation sensitivity; palm trees; antioxidant system; germination ecophysiology.

1. Introdução

Sementes recalcitrantes são intolerantes à dessecação e a baixas temperaturas e apresentam, portanto, baixa capacidade de manter sua viabilidade a longo prazo e formar bancos de sementes persistentes (as sementes perdem a viabilidade em poucos dias ou meses) (Hong e Ellis, 1996; Marques et al., 2018). A recalcitrância está associada a espécies que ocorrem em ambientes úmidos, embora plantas que produzem sementes recalcitrantes também ocorram em ambientes sazonais (Tweedle et al., 2003; Berjak e Pammenter, 2008; Marques et al., 2018). A maioria dos estudos com sementes recalcitrantes enfatiza as respostas das sementes à dessecação (Berjak e Pammenter, 2008; 2013). O papel de outros fatores abióticos, como a temperatura, sobre seu comportamento ainda é subentendido, especialmente para espécies de ambientes tropicais sazonais.

Com as mudanças climáticas em progresso, o aumento das temperaturas médias, junto com a imprevisibilidade e redução nos níveis de precipitação, representa uma ameaça à biodiversidade em cenários futuros, uma vez que pode refletir negativamente na dinâmica populacional das espécies (Pausas et al., 2022). A temperatura é um dos principais fatores ambientais que controlam a germinação das sementes, fornecendo indicativos de períodos favoráveis para o estabelecimento das plântulas (Bewley et al., 2013, Baskin e Baskin, 2014). Este papel é especialmente importante, no caso das sementes recalcitrantes, que são dispersas em um estado hidratado e metabolicamente ativo (Berjak e Pammenter, 2008), sendo presumivelmente impactadas em maior grau pelas variações de temperatura. Estudos mostram que altas temperaturas podem aumentar as taxas de germinação e, entretanto, reduzir o tempo disponível para o estabelecimento das plântulas (Stevens et al., 2014). Existem casos raros de associação entre recalcitrância e dormência (bloqueio à germinação por causas intrínsecas) (Tweedle et al., 2003; Silva et al., 2014), em que a interação semente-temperatura é mais complexa, por envolver, diretamente, o controle da viabilidade, além da regulação da germinação (Baskin e Baskin, 2014; Jaganathan, 2021).

Temperaturas elevadas podem intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), relacionada ao aumento da atividade metabólica (Barreto e Garcia, 2017; Bailly et al., 2019; Marques et al., 2017). O desequilíbrio entre a produção e erradicação desses radicais pode resultar em estresse oxidativo potencialmente fatal às sementes recalcitrantes (Berjak e Pammenter, 2008; Wojtyla et al., 2016; Bailly et al., 2019). Por outro lado, a temperatura é o principal fator ambiental relacionado à superação da dormência fisiológica, o tipo mais comum entre sementes tropicais, por estar envolvida no aumento do potencial de crescimento do

embrião (Orozco-Segovia et al., 2003; Schlindwein et al., 2013; Baskin e Baskin, 2014). A temperatura atua na modulação das concentrações endógenas de hormônios, e no enfraquecimento de tecidos que restringem o crescimento embrionário (Finch-Savage e Gerhard Leubner-Metzger, 2006; Baskin e Baskin, 2014). Alguns desses processos podem ser mediados por níveis controlados de ROS, o que envolve o aparato antioxidante e outros mecanismos de sinalização e controle da homeostase celular (Pagano et al., 2002; Wojtyla et al., 2016; Bailly et al., 2019). Informações aprofundadas sobre o efeito do estresse térmico sobre a fisiologia das sementes recalcitrantes são escassas. Estudos com esse enfoque são imprescindíveis para estimar o impacto das mudanças climáticas sobre a dinâmica de bancos de sementes em ambientes úmidos, muitos dos quais altamente ameaçados (Long et al., 2015; Bastos et al., 2017; Marques et al., 2018; Cristaudo et al., 2019; Esser et al., 2019; Rajendran et al., 2021).

Mauritia flexuosa L. f., ou buriti, é uma palmeira amplamente distribuída pela América do Sul tropical (Dransfield et al., 2008). A espécie, de origem Amazônica, está associada a ambientes pantanosos (Lorenzi et al., 2010; Lima et al., 2014; Melo et al., 2014). No Cerrado brasileiro (savana neotropical), de clima marcadamente sazonal, ocorre em ambientes alagados, conhecidos como veredas (Lorenzi et al., 2010; Lima et al., 2014; Melo et al., 2014). *M. flexuosa* é considerada uma espécie chave para a ecologia das veredas, além de ser importante fonte de renda para populações rurais (Lorenzi et al., 2010; Endress et al., 2013; Nunes et al., 2022). A espécie produz sementes recalcitrantes que apresentam dormência morfofisiológica (Silva et al., 2014; Veloso et al., 2016), o que resulta em estratégia reprodutiva que conjuga o estabelecimento de bancos de plântulas e a manutenção de bancos de sementes persistentes no solo (Porto et al., 2018; Salvador et al., 2022). A sobrevivência do buriti no Cerrado vem sendo ameaçada pela destruição de seu habitat, em decorrência de ações antrópicas e das mudanças climáticas (Endress et al., 2013; Silva et al., 2014; Virapongse et al., 2017; Nunes et al., 2022). O Cerrado brasileiro está localizado em uma região para a qual está previsto um aumento nas temperaturas e na frequência de eventos quentes extremos, sendo considerado o *hotspot* de biodiversidade que mais será afetado pelas mudanças climáticas na América do Sul (IPCC, 2022), o que ressalta a importância de estudos sobre o potencial impacto do estresse térmico sobre a dinâmica dos bancos de sementes da espécie.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do estresse térmico em sementes de *M. flexuosa*, buscando responder as seguintes questões: (i) qual o papel da temperatura no controle da germinação das sementes? (ii) quais as respostas fisiológicas e citológicas das sementes associadas ao estresse térmico? Buscou-se, ainda, discutir sobre os aspectos ecofisiológicos

relacionados à tolerância ao estresse térmico, e as implicações do comportamento das sementes no ambiente sob condições climáticas atuais e futuras.

2. Material e métodos

2.1. Coleta e procedimentos preliminares

Frutos de *Mauritia flexuosa* foram coletados, após abscisão, em uma população natural localizada na Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros (APA-Pandeiros), no município de Bonito de Minas, região norte do estado de Minas Gerais, Brasil (15°22'4.14"S; 44°55'8.33"O). Os frutos foram despulpados manualmente e as sementes predadas e com presença de micélio fúngico foram descartadas. Inicialmente, após a coleta, quatro repetições de 10 sementes e embriões (excisados com auxílio de guilhotina e estilete) foram destinadas à avaliação do teor de água, considerando-se a razão das massas fresca e seca, obtida por secagem em estufa a 105°C por 24 horas (Brasil, 2009). Adicionalmente, cinco repetições de 10 embriões foram submetidas ao teste de tetrazólio, para avaliação da viabilidade. Os embriões foram imersos em cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio a 1%, incubados no escuro, a 35° C, por cinco horas e analisados visualmente para coloração (Spera et al., 2001; Ribeiro et al., 2010). As sementes foram armazenadas em sacos plásticos, em câmara climatizada a 20°C, por até um mês antes do início do experimento.

Os dados climatológicos (Fig. 1) foram obtidos na estação de climatologia do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizada no município de Januária, aproximadamente 70 km da área de estudo; os locais têm as mesmas condições geomorfológicas (depressão Sanfranciscana) e climáticas (tipo Aw, Köppen). Não há registro histórico de temperaturas ao nível do solo para a região de coleta. Médias atmosféricas foram extrapoladas para avaliar o comportamento das sementes sob diferentes regimes de temperatura.

2.2. Estresse térmico

As sementes foram desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio 6%, por 15 minutos, seguida de três lavagens em água destilada, para os testes de estresse térmico. Sementes intactas foram dispostas para germinar em recipientes de polietileno (22 x 16 x 5 cm) com tampa, contendo areia autoclavada e umedecida até a capacidade de retenção (baseado em Silva et al. 2014; Veloso et al. 2016). Cinco repetições de 20 sementes foram mantidas em

câmaras de germinação ajustadas para os regimes de temperatura 30/20 °C, 35/25 °C, 40/30 °C e 45/35 °C, 12/12h, no escuro, durante 60 dias. Considerando as condições climáticas locais registradas nas últimas décadas (Fig.1), os regimes de temperatura aplicados foram selecionados, ajustados para representar a extensão das flutuações diárias, criando um gradiente de estresse térmico, do moderado (simulando condições atuais) ao severo. O controle da umidade do substrato foi feito por meio do monitoramento da massa de um recipiente adicional, para cada tratamento, contendo apenas areia autoclavada umedecida. A reposição da água foi efetuada quando necessário. A germinação foi avaliada diariamente, considerando a protrusão do pecíolo cotiledonar (Ribeiro et al. 2011). Ao final de 60 dias, todos os tratamentos foram transferidos para 30/20 °C, e mantidos por mais 30 dias. Sementes não germinadas na última avaliação tiveram o opérculo removido e permaneceram nas mesmas condições durante 15 dias. Ao final do experimento, embriões não germinados foram excisados das sementes e submetidos ao teste de tetrazólio a 1%, para avaliação da viabilidade (Spera et al 2001; Ribeiro et al. 2010).

As avaliações biométricas, fisiológicas e citológicas, descritas a seguir, foram realizadas utilizando amostras adicionais de sementes no início do experimento (condição inicial) e após serem submetidas às condições térmicas descritas anteriormente.

2.3. Avaliações biométricas

Cinco repetições de 10 sementes (endosperma e envoltório seminal) ou embriões isolados, de cada regime térmico, foram mensurados no início do experimento (condição inicial) e após 30, 60 e 90 dias. O comprimento e o diâmetro na região mediana dos embriões foram mensurados, com auxílio de um paquímetro digital. A massa fresca e a massa seca (após secagem em estufa, a 105 °C, por 24 h) das sementes ou embriões isolados foram obtidas e o teor de água foi mensurado (Brasil, 2009).

2.4. Estimativa da atividade respiratória dos embriões

Quatro repetições de 10 embriões de sementes na condição inicial e daquelas submetidas aos tratamentos de estresse térmico, por 90 dias, foram pesadas para determinação da massa fresca (FM) e imersos em cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio a 1%, incubados no escuro, a 35° C, por cinco horas. O material foi lavado três vezes em água destilada e imerso em 5 mL de etanol absoluto, por 14 dias. O sobrenadante foi coletado, centrifugado a 1.000 g, por 30 segundos, e a absorbância da solução foi avaliada em espectrofotômetro, a 490 nm, contra um

reagente branco (utilizando embriões mortos). A atividade respiratória foi expressa em absorvância g^{-1} FM (Harding e Benson, 1995, com adaptações).

2.5. Estimativa da integridade das membranas – lixiviação de solutos

Quatro repetições de 20 embriões de sementes na condição inicial e de sementes submetidas a cada tratamento de estresse térmico, por 90 dias, tiveram a massa determinada e foram imersos em água ultrapura, mantidas em câmara de germinação, por 4 horas, a 30° C. A leitura de condutividade elétrica da solução foi realizada utilizando condutivímetro de bancada (AKSO, AK83, São Leopoldo, Brasil). Os resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ FM, equivalente à condutividade total após 4 h subtraída da condutividade do branco (água ultrapura).

2.6. Resistência do opérculo ao deslocamento

Quatro repetições de 10 sementes obtidas na condição inicial e de sementes submetidas ao estresse térmico, por 60 e 90 dias, foram seccionadas paralelamente ao opérculo, mantendo-o intacto, e os embriões foram removidos com auxílio de uma agulha hipodérmica. A força requerida para o deslocamento do opérculo foi mensurada, usando um dinamômetro digital acoplado a sonda com diâmetro correspondente ao do pecíolo cotiledonar dos embriões. A sonda foi inserida na cavidade embrionária da semente, através da parte seccionada, e empurrada até a remoção do opérculo (Mazzottini-dos-Santos et al., 2018).

2.7. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Foram utilizados embriões, de cada tratamento térmico, na condição inicial e após 30, 60 e 90 dias de experimento. Quatro repetições de 30 mg de tecidos de embriões foram maceradas em nitrogênio líquido. Em tubos de 2 mL foram adicionados 400 μL de ácido tricloroacético (TCA 0,1 % m/v). O extrato vegetal foi homogeneizado em vortex, por 1 minuto, e centrifugado a 10.000 rpm, durante 15 minutos, a 4 °C. Uma alíquota de 250 μl do sobrenadante foi extraída e adicionada a 250 μl de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,5) e 1.000 μL 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 10 minutos, para estabilização da reação. As amostras foram analisadas em

espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) a 390 nm e a quantidade de H₂O₂ foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca, baseado em curva padrão de H₂O₂ pré-estabelecida (Alexieva et al., 2001).

2.8. Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante

O extrato vegetal foi obtido após a maceração em nitrogênio líquido de quatro repetições de 20 mg de tecidos de embriões na condição inicial e de cada tratamento, após 30, 60 e 90 dias. As amostras foram homogeneizadas em PVPP (10 % m/v), 500 μL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,8), 10 μL de EDTA (100 μM) e 490 μL de água deionizada, em vortex, por 1 minuto. Os extratos foram centrifugados a 10.000 rpm, a 4 °C, por 15 minutos. A atividade de CAT, APX e SOD foi determinada em 100 μL do sobrenadante. A atividade de SOD foi determinada adicionando-se o extrato a uma solução contendo metionina (13 mM), NBT (75 μM), 100 μM de EDTA de riboflavina (2 μM) e tampão fosfato de sódio (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 fotorredução do NBT, e os resultados foram demonstrados em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína (Giannopolitis e Ries, 1977). Para a determinação da atividade de CAT, o extrato foi adicionado ao tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), acrescido, no momento da análise, de H₂O₂ recém preparado (12,5 mM). A análise foi realizada em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) a 240 nm, por 1 minuto. A atividade de 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 expressos em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína. A atividade de APX foi determinada pela adição do extrato ao tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,8) e, no momento da análise, ascorbato (0,25 mM) e H₂O₂ (1,0 mM). A taxa de oxidação do ácido ascórbico foi acompanhada por 1 minuto, registrando os valores de absorvância a 290 nm a cada 10 segundos em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japão). A atividade de APX foi determinada utilizando ϵ igual a $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de ascorbato min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína (Nakano e Asada, 1981).

2.9. Avaliação da peroxidação lipídica

Quatro repetições de 30 mg de tecidos de embriões de sementes na condição inicial e submetidas aos tratamentos térmicos, por 30, 60 e 90 dias, foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionadas a 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % (m/v). Após homogeneização em vortex, por 1 minuto, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, durante 15 minutos. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi adicionada a uma alíquota de 3 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v) (preparado em TCA 20 %). A solução permaneceu por 60 minutos a 95 °C e, em seguida, foi resfriada em banho de gelo, por 10 minutos. 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 malondialdeído (MDA) foi expressa em nmol g⁻¹ de massa fresca (Health e Packer, 1968, adaptado).

2.10. Avaliações anatômicas, histoquímicas e ultraestruturais

Fragmentos do pecíolo cotiledonar e haustório mais endosperma adjacente das sementes, de cada tratamento térmico, foram utilizados. O material foi coletado na condição inicial e após 30 e 60 dias de experimento. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965), por 24 horas, desidratadas em série etílica e incluídas em 2-hidroxietil metacrilato, de acordo com protocolo descrito por Paiva et al. (2011). Secções transversais e longitudinais (3 µm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo, coradas com azul de toluidina 0,05 %, pH 7,4 (O'Brien et al., 1964, modificado), e montadas em lâminas permanentes em resina acrílica. As secções foram avaliadas e a documentação fotográfica foi realizada em câmera digital acoplada ao fotomicroscópio (Scope A1/Axiocam 105 Color, Zeiss, Sena, Alemanha).

As regiões do embrião avaliadas foram selecionadas considerando aquelas que mostram alterações morfológicas celulares pré-germinativas associadas à superação de dormência em sementes de *M. flexuosa*, com base em trabalhos anteriores (Moura et al., 2019; Salvador et al., 2022). No pecíolo cotiledonar, foram mensurados o comprimento e diâmetro de 10 células, escolhidas aleatoriamente, na região medular da radícula, no meristema adjacente à radícula, na protoderme e no meristema fundamental da lígula (região adjacente ao eixo embrionário), e na protoderme e no meristema fundamental da região oposta à lígula. A espessura da zona de digestão (camada de células colapsadas do endosperma adjacente ao haustório), e o comprimento e diâmetro de 10 células da protoderme, subprotoderme e no meristema

fundamental do haustório foram mensurados. As avaliações foram realizadas em secções, obtidas conforme descrito acima, de 10 fragmentos de cada estrutura, por tratamento, utilizando software de análise de imagens (Image-Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Rockville, USA).

Para a avaliação histoquímica, foram obtidas secções histológicas conforme descrito para avaliação anatômica. As secções foram submetidas aos testes com ácido periódico de Schiff-PAS (O'Brien e McCully, 1981, adaptado), para detecção de polissacarídeos neutros, e azul de toluidina (O'Brien et al., 1964, modificado), para detecção de compostos fenólicos. A documentação fotográfica foi realizada como descrito para a avaliação anatômica.

Para avaliação ultraestrutural, fragmentos da região periférica do pecíolo cotiledonar de embriões de sementes na condição inicial e submetidas aos tratamentos térmicos, por 60 dias, foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1964), durante 48 horas, e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 (Roland, 1978). Secções ultrafinas foram tratadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12-Spirit (Philips/FEI Company, Eindhoven, Netherlands) a 80 kV.

2.11. Análise estatística

Os dados quantitativos dos parâmetros morfológicos (análises biométricas), biodinâmicos (resistência do opérculo), fisiológicos (germinação, viabilidade, atividade respiratória embrionária, teor de água, lixiviação de solutos, atividade do sistema antioxidante enzimático, indicadores de estresse oxidativo) e micromorfométricos (dimensões celulares) foram submetidos ao teste de normalidade e ao teste de homogeneidade das variâncias. Após, os dados foram submetidos à análise de variância (considerando esquema fatorial, com os termoperíodos e os tempos de análises (30, 60 e 90 dias) como fatores e a condição inicial como tratamento adicional) e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Teste de germinação

A temperatura afetou a germinação das sementes de *M. flexuosa* ($P < 0,0001$) (Fig. 2). A germinação das sementes incubadas a 30/20°C teve início após 21 dias de avaliação, e atingiu 31% em 30 dias, média superior em relação aos demais termoperíodos ($P = 0,001$), os quais

não divergiram entre si, com médias inferiores à 5%. Esse padrão se manteve até o final de 60 dias ($P = 0,002$). O termoperíodo 30/20°C estimulou a germinação de sementes inicialmente incubadas a 40/30°C, apesar de não ter tido efeito para os outros termoperíodos. Ao final de 90 dias, não houve diferença entre percentuais de germinação de 30/20°C (37%) e 40/30°C (45%). Assim, o tratamento de 30/20°C foi o mais eficiente em reduzir o nível de dormência das sementes, enquanto 35/25°C favoreceu a manutenção de dormência pronunciada.

A remoção do opérculo promoveu um aumento drástico no percentual de germinação para os termoperíodos de 30/20°C, 35/25°C e 40/30°C (81, 69 e 76%, respectivamente) (Fig. 2). Apenas 2% de germinação foi observada para sementes do termoperíodo 45/35°C, cujas sementes não germinadas não mostraram embriões viáveis, pelo teste de tetrazólio. Juntos, esses resultados indicam que, com exceção de 45/35°C ($P < 0,0001$), os termoperíodos empregados não causaram nível de estresse letal nas sementes.

3.2. Viabilidade e estimativa de atividade respiratória dos embriões

A viabilidade inicial das sementes foi de 94%, em média (Fig. 3a). A viabilidade das sementes não se alterou para os termoperíodos 30/20, 35/25 e 40/30°C até o final do experimento (91,8%, 88% e 79,3%, respectivamente), enquanto que no tratamento de 45/35°C a viabilidade das sementes caiu para zero ($P < 0,0001$) (Fig. 3a). Por outro lado, houve um aumento da atividade respiratória de 1,5 Abs g⁻¹ FM, na condição inicial, para 3,6, 2,8 e 2,9 Abs g⁻¹ FM, após 90 dias de experimento, para os termoperíodos de 30/20, 35/25 e 40/30°C, respectivamente, enquanto a atividade respiratória para o tratamento de 45/35°C foi praticamente nula (0,01 Abs g⁻¹ FM, $P < 0,0001$) (Fig. 3b).

3.3. Estimativa de integridade de membranas

A condutividade elétrica observada para o teste com embriões na condição inicial foi de 57,9 $\mu\text{S g}^{-1}$ FM, e não foi diferente daquela registrada para o tratamento de 35/25°C no final do experimento (68,7 $\mu\text{S g}^{-1}$ FM) (Fig. 4). O tratamento de 45/35°C afetou de maneira mais intensa a permeabilidade das membranas, resultando em um aumento de cerca de sete vezes na condutividade elétrica em relação à condição inicial (405,1 $\mu\text{S g}^{-1}$ FM, $P < 0,001$) (Fig. 4). Não foi possível realizar os testes para os tratamentos de 30/20°C e 40/30°C, uma vez que a superação de dormência e subsequente germinação das sementes em ambos os tratamentos levou à redução de amostras disponíveis para as avaliações.

3.4. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O nível de H₂O₂ inicial nos embriões foi de 2,86 mM g⁻¹FM, em média (Fig. 5c). O tempo mostrou efeito sobre esse parâmetro (P = 0,0053), com redução na concentração de H₂O₂ após 60 e 90 dias de experimento (1,62 e 1,54 mM g⁻¹FM, respectivamente) (Fig. 5a). O termoperíodo 45/35°C contribuiu substancialmente para essa redução, mostrando o menor valor (1,06 mM g⁻¹FM), em relação aos demais termoperíodos, que não diferiram entre si (Fig. 5b). Igualmente, é possível que tenha ocorrido um ajuste do nível de H₂O₂ nas sementes com o tempo, mesmo mantendo a atividade respiratória alta (Fig. 3b).

Em 30 dias de experimento, a quantidade de H₂O₂ se manteve estatisticamente igual à inicial, independente do termoperíodo (P = 0,0260) (Fig. 5c). A redução mais acentuada dos níveis de H₂O₂ em 30/20°C e 45/35°C, aos 60 dias (1,53 e 0,78 mM g⁻¹ FM, respectivamente), fez com que esses tratamentos diferissem da condição inicial (P < 0,0001) (Fig. 5c). Padrão similar foi observado no final do experimento (Fig. 5c). Por causa da falta de amostras, decorrente da germinação da maioria das sementes, não foi possível avaliar a concentração de H₂O₂ para 30/20 e 40/30°C após 90 dias.

3.5. Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante

A atividade inicial da catalase (CAT) foi de 15,95 μmol min⁻¹ g⁻¹ prot. A atividade de CAT variou com o tempo (P = 0,0003) (Fig. 5d), mas não houve efeito dos termoperíodos (P = 0,1928). A atividade da enzima aumentou de 11,05 e 12,85, em 30 e 60 dias, respectivamente, para 19,40 μmol min⁻¹ g⁻¹ prot, em 90 dias (Fig. 5d), acompanhando a redução nos níveis de H₂O₂ dos embriões (Fig. 5a).

Na condição inicial a atividade de superóxido dismutase (SOD) foi de 0,30 U min⁻¹ g⁻¹ prot, e não variou com o tempo (P= 0,7067), e também não houve diferença entre termoperíodos (P=0,8279). A atividade de ascorbato peroxidase (APX) foi de 6,30 μmol AsA mg⁻¹ prot min⁻¹ no início do experimento. O tempo (P = 0,3796) e os termoperíodos aplicados (P = 0,2869) não afetaram a atividade de APX.

3.6. Avaliação da peroxidação lipídica

O tempo ($P = 0,0325$) e as temperaturas ($P < 0,0001$) influenciaram na variação nos níveis de MDA observados, sem, no entanto, ter havido interação entre estes fatores (Fig. 5e, f). A concentração de MDA na condição inicial foi de 26,90 nmols g^{-1} FM. Após 30 dias, a concentração de MDA nos embriões foi de 27,73 nmols g^{-1} FM, e não se alterou até 60 dias de experimento (26,13 nmols g^{-1} FM, em média) (Fig. 5e). Depois disso, aos 90 dias, houve uma redução na concentração de MDA para 19,87 nmols g^{-1} FM. O termoperíodo de 45/35°C obteve os menores valores para este parâmetro (média de 16,12 nmols g^{-1} FM) em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si (Fig. 5f). Concentrações baixas de MDA para 45/35°C, associadas à alta taxa de lixiviação de solutos (Fig. 4), são indicativos de que esse termoperíodo resulta em danos letais a curto prazo nas sementes.

3.7. Resistência do opérculo ao deslocamento

Na condição inicial, a força necessária para o deslocamento do opérculo foi de 88,13 N mm/s^{-2} (Fig. 6b). Os termoperíodos aplicados afetaram a resistência do opérculo ($P = 0,0026$) (Fig. 6a). Ao longo do experimento, a resistência do opérculo reduziu para os tratamentos 30/20, 40/30 e 45/35°C (66, 75,26 e 75,51 N mm/s^{-2} , respectivamente) (Fig. 6a). Somente as sementes que permaneceram a 35/25°C mantiveram a resistência do opérculo igual à observada na condição inicial (77,83 N mm/s^{-2}) até o final do experimento (Fig. 6b). Na primeira avaliação após submeter as sementes aos tratamentos térmicos, a temperatura de 30/20°C proporcionou a maior redução na resistência do opérculo (66,0 N mm/s^{-2} $P = 0,0330$), e, após 90 dias, houve uma redução discreta para os tratamentos 40/30°C e 45/35°C, os quais atingiram médias de 72,37 e 69,19 N mm/s^{-2} , respectivamente, sem diferença estatística entre eles (Fig. 6b). A redução da resistência do opérculo tem relação com a superação da dormência observada no teste de germinação (Fig. 2).

3.8. Avaliações biométricas

Na condição inicial, a massa seca das sementes de buriti foi de 7,72 g, em média. A massa seca das sementes reduziu progressivamente com o tempo ($P = 0,0168$) (Fig. 7a), embora tenha sido diferente da condição inicial apenas para os termoperíodos 35/25°C (6,29 g) e 45/35°C (5,37 g), em 30 e 60 dias, respectivamente, quando foi menor. O teor de água das sementes na condição inicial foi de 47,74% e durante o experimento foi maior para o tratamento 45/35°C (48,31 g, $P = 0,0005$), em relação aos demais termoperíodos (Fig. 7b).

O tempo não afetou significativamente as características biométricas dos embriões, mas houve efeito dos termoperíodos aplicados (Fig. 8a, b, d). Nesse caso, embriões de sementes mantidas a 45/35°C foram menores em tamanho (diâmetro de 4,45 mm, $P = 0,0008$) e tiveram menor massa seca (0,008 g, $P < 0,0001$), enquanto o conteúdo de água foi sempre maior que nos outros termoperíodos (87,77%, $P < 0,0001$).

A massa seca reduziu em embriões mantidos a 45/35°C já a partir de 30 dias de experimento (8 mg), quando foi diferente da condição inicial (14,35 mg, $P < 0,0001$) (Fig. 8c). Não houve diferença na massa seca entre os demais tratamentos, dos quais também não diferiu da observada antes do experimento. Uma relação inversa foi observada no teor de água dos embriões, sendo o maior valor observado para 45/35°C (88,08%), o único termoperíodo que diferiu da condição inicial ($P < 0,0001$) (Fig. 8e). A temperatura mais alta, aparentemente, proporcionou inicialmente intensa mobilização de reservas (Fig. 8b,c), mostrando, em seguida, efeitos deletérios aos componentes celulares (Fig. 4), resultando na absorção de água não controlada (Fig. 8d,e).

3.9. Avaliações micromorfométricas

As alterações nas características micromorfométricas dos embriões estão esquemáticas na Fig. 9. De modo geral, as dimensões das células da radícula, do meristema da lígula e do meristema da região oposta à lígula aumentaram progressivamente com o tempo, com as temperaturas mais altas provocando uma expansão mais rápida nas últimas duas regiões. As células do meristema adjacente à radícula aumentaram em tamanho após 30 dias, mas não foi constatada diferença da condição inicial depois de 60 dias. Similarmente, o termoperíodo 40/30°C proporcionou expansão das células nesta região aos 30 dias, mas não aos 60 dias. As dimensões celulares na protoderme da lígula aos 30 dias não foram diferentes da condição inicial, independente do termoperíodos, mas após 60 dias foi observada uma redução no diâmetro das células nesta região em embriões mantidos à 45/35°C, em relação aos demais termoperíodos. Não houve diferença entre tempo e termoperíodos para os outros parâmetros avaliados em secções de pecíolo cotiledonar.

As dimensões das células da protoderme do haustório aumentaram com os tratamentos aplicados às sementes, mas não variaram no transcorrer do experimento, com exceção de 45/35°C, aos 60 dias, quando houve redução no diâmetro. As temperaturas mais altas (40/30 e 45/35°C) promoveram um aumento nas dimensões das células na subprotoderme aos 30 dias, seguido de aumento também para as outras temperaturas em 60 dias, quando houve redução no

diâmetro celular para 45/35°C. As células do meristema fundamental do haustório também aumentaram em tamanho ao longo do experimento, sendo que temperaturas mais altas favoreceram a expansão celular relativamente mais rápida. Não houve diferença na espessura da camada de células colapsadas (zona de digestão) do endosperma adjacente ao haustório.

3.10. Avaliações histoquímicas

Na condição inicial, as células da lígula apresentaram mucilagem granular, indicando início de mobilização das reservas mucilaginosas, enquanto as células da região oposta à lígula mostraram vacúolos densos em mucilagem, sem consumo aparente de reservas (Fig. 9 e Material Suplementar A3a,b). A redução no conteúdo de mucilagem nas células da radícula evidenciou um estágio mais avançado de mobilização de reservas nesta região (Fig. 9). Células da protoderme do haustório já haviam iniciado o consumo de parte de suas reservas, mas não foi observado nenhum indicativo de processo de mobilização ativa nas células mais internas, que mantiveram seu conteúdo de mucilagem associada aos vacúolos preservado (Fig. 9 e Material Suplementar A3h). Após 30 dias, o consumo de reservas, de modo geral, se intensificou nas regiões do pecíolo cotiledonar e haustório analisadas, evidenciado pela redução no conteúdo de mucilagem e deposição de amido transitório (Fig. 9 e Material Suplementar A3c,d,i). Foi notória a polarização dos metabólitos em direção ao eixo embrionário (Material Suplementar A3). Neste período, o aumento do consumo (em relação à condição inicial) não foi observado somente para células das protodermes da lígula, da região oposta à lígula e do haustório de embriões a 30/20 e 35/25°C, e no meristema fundamental da região oposta à lígula do último tratamento, que foram ricas em mucilagem (Fig. 9). Células da lígula e do haustório de embriões mantidos a 45/35°C já mostravam sinais de desorganização celular (Material Suplementar A2e-g e A3j). Aos 60 dias, embriões de sementes incubadas a 45/35°C exibiram células colapsadas, com membranas deterioradas e conteúdo vacuolar disperso no citoplasma (Fig.10m-o e Material Suplementar A2j-m). Para os demais termoperíodos, a mobilização de reservas de polissacarídeos se manteve intensa por todo o pecíolo cotiledonar, entretanto, o status das células do haustório não se alterou para 30/20°C, e foi mais próximo do observado na condição inicial para 35/25 e 40/30°C (Fig. 9). A mobilização de reservas do endosperma aumentou com os tratamentos aplicados, sendo mais evidente para embriões mantidos em temperaturas mais altas (Material Suplementar A3f,g).

O acúmulo de compostos fenólicos foi observado na região periférica proximal do pecíolo cotiledonar em embriões na condição inicial, sem diferenças significativas para os

tratamentos de 30/20, 35/25 e 40/30°C ao longo do experimento (Fig. 9 e Material Suplementar A2d). Houve um aumento no acúmulo de compostos fenólicos em embriões mantidos a 45/35°C, nos quais foram identificados compostos fenólicos na plúmula, e depois de 60 dias notou-se quantidades mais expressivas produzidas no ápice do pecíolo cotiledonar e extravasamento através das células rompidas (Fig. 9 e Material Suplementar A2h,i,m,n).

3.11. Avaliações ultraestruturais

As células da protoderme do pecíolo cotiledonar dos embriões têm parede celular espessa na face periclinal mais externa, com uma fina cutícula (Fig. 10a,e,g,k,n). Na condição inicial, foram observadas sinuosidade de membrana plasmática, mitocôndrias e gotículas de lipídio dispostas no citossol fino, denso e periférico. O conteúdo celular estava bem preservado, com material flocular (mucilagem) abundante (Fig. 10a,b). Células de embriões submetidos ao termoperíodo 35/25°C não sofreram alterações evidentes, em relação ao estado inicial (Fig. 10g,h). O tratamento 30/20°C ocasionou proliferação de mitocôndrias em torno do núcleo e associadas a plastídeos (contendo amido transitório) (Fig. 10d,e). Foram observadas invaginações na membrana plasmática e formação de vesículas para transporte de degradados do endosperma; a translocação foi também evidenciada pela diferença na eletrondensidade das paredes celulares adjacentes (Fig. 10e). Células protodérmicas submetidas a 40/30°C também se mostraram ricas em organelas associadas ao núcleo, além da proliferação de vacúolos autofágicos e da redução de mucilagem (protoplasto eletrólucido), indicativo de consumo de reservas (Fig. 10j,k), assim como observado para 30/20°C (10d,e).

Células do meristema fundamental se mostraram densas, com mucilagem em vacúolos ocupando quase a totalidade do protoplasto, tanto na condição inicial, quanto em embriões mantidos a 35/25°C, que também foram ricas em gotículas de lipídio (Fig. 10c,i). Em células de embriões submetidas a 30/20°C, a proliferação de mitocôndrias associadas ao núcleo indicaram aumento na atividade metabólica (Fig. 10f), evidenciado também para 40/30°C pela redução no conteúdo de mucilagem, acúmulo de compostos fenólicos, e invaginação conspícua de membrana (Fig. 10 l). Em consequência do tratamento 45/35°C ficou evidente o colapso celular generalizado, com desintegração de organelas, e remanescentes de material flocular e compostos fenólicos dispersos no citoplasma, sem delimitação de membranas (Fig. 10m-o).

4. Discussão

4.1. Temperaturas elevadas e controle da germinação

Temperaturas elevadas limitam a germinação de sementes de *M. flexuosa*, induzindo a perda da viabilidade ou a manutenção da dormência. O regime térmico mais extremo testado, 45/35°C [que ainda não foi registrado na série histórica nas regiões de estudo (Fig. 1)] causou perda total da viabilidade das sementes em curto período. Por outro lado, as sementes respondem às temperaturas elevadas não fatais evitando a germinação (Fig. 2). O termoperíodo de 40/30°C contribuiu para a manutenção do estado dormente inicial das sementes, uma vez que parte das sementes germinou quando transferidas para o regime 30/20°C (Fig. 2). Já o termoperíodo 35/25°C induziu a elevação no nível da dormência, considerando que, após a submissão a este regime, as sementes não germinaram quando expostas a 30/20°C (Fig. 2). Estes termoperíodos normalmente ocorrem na transição entre os períodos seco/chuvoso (meses de setembro e outubro, primavera austral), quando as chuvas são imprevisíveis, ou durante ondas de calor, associadas a estio (conhecidos como veranicos), que ocorrem com frequência durante o período chuvoso (nos meses de dezembro e janeiro). Estes períodos de baixa disponibilidade hídrica impõe vulnerabilidade à germinação e representam um risco à sobrevivência das plântulas. Comparativamente, a termo-dormência, em teoria, tem papel importante na inibição da germinação de sementes de *Euphorbia* durante chuvas ocasionais no Mediterrâneo (Cristaudo et al., 2019). As veredas (fitofisionomia do Cerrado em que o buriti ocorre) são caracterizadas como ambientes úmidos, mas com estratificação transversal acentuada, ficando os solos sujeitos a flutuações na umidade ao longo do ano (Araújo et al., 2002; Porto et al., 2018). A germinação de sementes de *M. flexuosa* foi favorecida pelo regime térmico 30/20°C. Assim, ajustar a taxa de germinação em resposta à temperatura demonstra ser uma estratégia ecológica para que o recrutamento ocorra preferencialmente durante o período chuvoso no ambiente sazonal do Cerrado (Fig. 1, 2). Padrão similar foi observado para sementes ortodoxas com dormência morfofisiológica em bancos no solo (Silva et al., 2007, Souza et al., 2022).

Informações prévias sinalizaram para a pronunciada dormência das sementes, a capacidade de formação de bancos de sementes e a influência da temperatura no controle da germinação do buriti (Silva et al. 2014; Salvador et al., 2022). Segundo esses estudos, as sementes da espécie germinam em uma faixa mais ampla de temperatura após a superação da dormência, o que ocorre naturalmente após a passagem das sementes pelo banco no solo. No presente trabalho foram encontradas evidências adicionais de que a temperatura atua na redução da resistência dos tecidos adjacentes (Fig. 6) e no aumento do potencial de crescimento do

embrião (Fig. 9), favorecendo a superação da dormência fisiológica em sementes (como descrito em Baskin e Baskin, 2004) que passam por ciclos sazonais em bancos de sementes. O tratamento 30/20°C foi mais efetivo na redução na resistência exercida pelo opérculo, restrição mecânica crítica para a manutenção da dormência em sementes de palmeiras (Neves et al. 2013; Silva et al. 2014; Carvalho et al., 2015; Mazzotinni-dos-Santos et al., 2018). Além disso, foram observadas alterações citológicas significativas em embriões de sementes durante a superação da dormência (expostas a 30/20°C), como a expansão celular e a mobilização de reservas para o eixo embrionário (Fig. 9, 10 e Material Suplementar A3c,d,i).

É comum que haja uma variação nos níveis de dormência dentro de uma população de sementes (Baskin e Baskin, 2004, Finch-Savage e Leubner-Metzger, 2006; Carvalho et al., 2015). A germinação desigual resultante é uma estratégia para distribuir a emergência de plântulas (*bet-heading*) e, assim, maximizar a chance de sobrevivência sob condições climáticas desfavoráveis, contribuindo para a formação de bancos de sementes (Ooi et al., 2007; Silva et al., 2007; Long et al., 2015; Pausas et al., 2022; Zhang et al., 2022). Nossos resultados indicam que sementes de *M. flexuosa* superam a dormência durante a estação chuvosa, e aquelas que não germinam, poderiam ser induzidas à dormência secundária (pela exposição a temperaturas elevadas do início da primavera), alcançando as condições para a germinação em períodos chuvosos subsequentes, adequados para o estabelecimento das plântulas. Temperaturas tão altas quanto 45/35°C, que são previstas para ocorrerem na região futuramente (Cristaudo et al., 2019; Oliveira et al., 2019; IPCC, 2022), excedem o limite tolerável pelas sementes e são letais (Fig. 2, 3).

4.2. Respostas citológicas e fisiológicas ao estresse térmico

Sementes de buriti são capazes de alto nível de homeostase em resposta ao estresse térmico, entretanto, são altamente vulneráveis ao regime de 45/35°C, o qual pode ocorrer em cenário futuro. Nenhum dos outros tratamentos representou condição estressante severa para as sementes. Ao longo do experimento, foi constatado a progressão das dinâmicas de expansão celular e mobilização de reservas, especialmente no tratamento 30/20°C, associado à maiores taxas de germinação (Fig. 2, 9, 10 e Material Suplementar A3c,d,i). As sementes de buriti respondem bem a curtos períodos de elevadas temperaturas, mantendo o metabolismo celular ativo, o que, oportunamente, contribuirá para a germinação. A exposição ao regime térmico de 40/30 °C ou 40°C constante, seguida de 30°C, promoveu também maiores índices de germinação em sementes da palmeira *Butia odorata* (Schlindwein et al., 2013). As temperaturas

mais altas, empregadas no presente trabalho, promoveram rápida expansão celular e ativação dos processos de mobilização de reservas. As mudanças ultraestruturais (aumento do volume celular, vacuolização extensiva, consumo de reservas, proliferação de mitocôndrias) que ocorrem em sementes recalcitrantes durante o armazenamento são comparáveis aos eventos do início da germinação de sementes ortodoxas (Farrant et al., 1985; Moothoo-Padayachie et al., 2016), indicando que o aumento da atividade metabólica observada contribui para preparar a semente para que a germinação ocorra prontamente quando as condições favoráveis forem alcançadas. O estado dos embriões mantidos sob 35/25°C (tratamento que favorece a manutenção da dormência), no entanto, se assemelhou mais ao observado na condição inicial (Fig. 9, 10). Em estudo com bancos simulados de *Annona crassiflora* (Silva et al., 2007), os autores também constataram ausência de modificações significativas a nível celular na porção de sementes não germinadas após o pico de emergência, sugerindo uma relação entre o status celular e o nível de dormência. Ao contrário, a redução do peso seco das sementes e embriões mantidos a 45/35°C (Fig. 7, 8) está associada à intensa mobilização de reservas no embrião, antes das células entrarem em colapso (Fig. 9, 10 e Material Suplementar A2).

Danos oxidativos associados ao metabolismo são a principal causa de perda de viabilidade em sementes recalcitrantes (Berjak e Pammenter, 2008). O impacto negativo de ROS tende a ser reduzido em sementes que apresentam dormência fisiológica, em virtude de antioxidantes e hormônios associados com a dormência (Long et al., 2015; Moothoo-Padayachie et al., 2016). O sistema antioxidante enzimático foi importante no controle do estresse oxidativo em sementes de buriti submetidas a altas temperaturas, assim como teve papel fundamental na persistência das sementes nos bancos no solo (Salvador et al., 2022). A concentração de H₂O₂ reduziu ao longo do tempo, o que indica que a atividade de CAT foi eficiente em evitar a peroxidação lipídica para níveis perigosos (Fig. 4, 5). Além disso, grupos de compostos (fenólicos e vitamina E) com atividade antioxidante presentes nos frutos e sementes do buriti (Siles et al., 2013; Silva et al., 2014) são eficazes como mecanismos protetores contra danos oxidativos (Bailly, 2019).

A condição de 45/35°C provocou a morte das sementes em um curto período de tempo, o que pode ser constatado pelo alto nível de degradação celular observado a partir dos 30 dias (Material Suplementar A2). O maior acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos embrionários sugere que a dinâmica oxidativa nesta condição, possivelmente, ocorreu em períodos mais curtos do que os avaliados (Material Suplementar A2h,i,m,n). Não são encontrados na literatura estudos que relacionem o estresse térmico ao estresse oxidativo em sementes recalcitrantes, entretanto, pode-se notar uma similaridade entre os danos causados pelo estresse térmico e

danos consequentes da desidratação das sementes. Em sementes de *M. flexuosa* desidratadas a 20% do teor de água, Veloso et al. (2016) observaram o protoplasto colapsado em células embrionárias, evidenciado pela desintegração de organelas e lixiviação de conteúdo celular pelo espaço periplasmático. No presente trabalho, tratamentos que não promoveram a morte celular mantiveram a integridade das células, mostrando grandes vacúolos densos em mucilagem, e citoplasma rico em organelas e compostos de reserva (Fig. 10d-1). As sementes de buriti, portanto, possuem mecanismos de resistência a temperaturas elevadas, restringindo a germinação e mantendo o metabolismo ativo (Fig. 2, 3), mas são ameaçadas pelo aumento drástico esperado nas temperaturas locais.

4.3. Implicações ecofisiológicas da temperatura sobre sementes recalcitrantes de *M. flexuosa*

Ciclos de temperatura são importantes na germinação do buriti em condições naturais, como é observado para outras palmeiras nativas do Cerrado (Gonçalves et al., 2020; Soares et al., 2021; Souza et al., 2022). Isto se dá apesar da ocorrência da espécie ser associada a ambientes alagados, e pode estar relacionado à adaptação da espécie à sazonalidade observada no bioma. Neste contexto, é importante destacar que as veredas são ambientes alongados, associados à cursos de água, com grande estratificação transversal, sendo os solos das bordas (e os bancos de sementes associados) sujeitos a secamento superficial durante o período de estiagem (Araújo et al., 2002; Porto et al., 2018).

A relação das sementes recalcitrantes com a água contribui para a determinação do momento em que a germinação vai ocorrer (Eggers et al., 2007; Porto et al. 2018). De acordo com nossos resultados, a temperatura também mostrou ser potencialmente relevante no controle da germinação de sementes recalcitrantes de buriti em ambientes sazonais. Essa adaptação também se refletiu na tolerância a altas temperaturas observadas nas sementes da palmeira. A capacidade homeostática garantiu a manutenção da concentração não letal de radicais peróxidos sob uma ampla faixa de temperatura, aumentando a capacidade competitiva da espécie e sendo crucial no seu sucesso reprodutivo.

Manter o teor de água constante durante o experimento nos permitiu isolar os efeitos da temperatura e avaliar a resposta das sementes na ausência de outro fator limitante. As veredas experimentam o mesmo regime climático de formações savânicas do Cerrado, mas suas características edáficas, especialmente a umidade do solo, representam o principal fator restringindo a ocorrência das espécies a esses ambientes úmidos (Ribeiro e Walter, 2008; Ávila et al., 2021). Em situações como esta, a ação da temperatura pode estar, portanto, mais

direcionada à prevenção da germinação (Pausas et al., 2022). O aumento da temperatura promove mudança na dinâmica do recrutamento (Pausas et al., 2022; Stevens et al., 2014) e pode alterar os padrões de precipitação regionais (IPCC, 2022), prejudicando a interação estabelecida entre semente e ambiente, e colocando a manutenção das populações naturais em risco.

Espécies com alto grau de especialização tendem a ser mais sensíveis às mudanças climáticas (Borges et al., 2019), de modo que a persistência dependeria da somatória da tolerância das sementes e resistência do habitat. Estudos recentes tem chamado atenção para o colapso das veredas, ecossistemas altamente vulneráveis às ações antrópicas e mudanças climáticas (Endress et al., 2013; Silva et al., 2014; Virapongse et al., 2017; Nunes et al. 2022), o que compromete a persistência das populações de buriti. Nossos resultados ressaltam que a investigação do efeito de variáveis ambientais sobre a fisiologia das sementes é importante para predição de dinâmicas ecológicas futuras e para a proposição de práticas adequadas para conservação da espécie. Neste sentido, é preocupante a perspectiva de elevação das temperaturas globais e a intensificação da ocorrência de eventos extremos, os quais poderão impactar a dinâmica dos bancos de sementes e a reprodução desta icônica palmeira sul americana.

5. Conclusões

A temperatura afeta a germinação e a viabilidade das sementes de *M. flexuosa*. A germinação é estimulada pelo regime térmico típico da estação chuvosa do Cerrado (30/20°C), e está associada à redução da resistência mecânica exercida pelo opérculo da semente e à mobilização de reservas e expansão celular no embrião. As sementes reagem preventivamente às temperaturas elevadas, restringindo a germinação e mantendo o metabolismo ativo, contando com mecanismos de resistência ao estresse térmico, incluindo um sistema antioxidante enzimático eficiente no controle do estresse oxidativo sob temperaturas elevadas. Entretanto, regimes térmicos extremos, previstos de ocorrerem futuramente na região, causam a morte das sementes em curto prazo. As respostas de sementes de buriti aos ciclos de temperatura são importantes no controle da dinâmica de bancos de sementes da espécie, e, portanto, o aumento das temperaturas locais coloca em risco o sucesso reprodutivo da espécie.

Declaração de Contribuição dos autores

LMR concebeu o trabalho. HFS coletou as amostras, conduziu os experimentos, e escreveu o texto inicial. LMR realizou as análises estatísticas. HCM-S realizou as avaliações anatômicas e interpretou os resultados relacionados. LMR e YFN interpretaram os dados ecofisiológicos. HFS e LMR escreveram o texto final. Todos os autores leram a versão final do manuscrito e concordam com sua submissão.

Declaração de Conflito de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração - PELD-VERE do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 441583/2020-2); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Finance Code 88887.136273/2017-00); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-04816-17); e Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações – MCTI. Os autores agradecem à FAPEMIG pela bolsa de doutorado concedida a HFS, e ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a LMR e YRFN.

Referências

- Barreto, L.C., Garcia, Q.S., 2017. Accelerated ageing and subsequent imbibition affect seed viability and the efficiency of antioxidant system in macaw palm seeds. *Acta Physiol. Plant.* 39:72
- Bhatt, A., Bhat, N.R., Murru, V., Santo, A., 2019. Eco-physiological studies on desert plants: germination of *Halothamnus iraqensis* Botsch. seeds under different conditions. *J. Arid Land* 11(1), 75–85
- Elgabra, M., El-Keblawy, A., Mosa, K.A., Soliman, S., 2019. Factors controlling seed dormancy and germination response of *Brachypodium hybridum* growing in the hot arid mountains of the Arabian Desert. *Botany* 00: 1–9 dx.doi.org/10.1139/cjb-2018-0207
- 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
- Araújo, M.G., Barbosa, A.A.A., Arantes, A.A., Amaral, A.F., 2002. Composição florística de veredas no Município de Uberlândia, MG. *Rev. Bras. Bot.* 25, 475-493

- Ávila, M.A., Mota, N.M., Souza, S.R., Santos, R.M., Nunes, Y.R.F., 2021. Diversity and structure of natural regeneration in swamp forests in Southeastern Brazil. *Flora (Jena)* 28, 1-7
- Bailly, C., 2019. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochem. J.* 476, 3019–3032
- Barreto, L.C., Garcia, Q.S., 2017. Accelerated ageing and subsequent imbibition affect seed viability and the efficiency of antioxidant system in macaw palm seeds. *Acta Physiol. Plant.* 39:72
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, 2nd ed. Elsevier/AP, San Diego, CA.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14, 1–16
- Bastos, L.L.S., Ferraz, I.D.K., Lima Junior, M.J.V., Pritchard, H.W., 2017. Variation in limits to germination temperature and rates across the seed-seedling transition in the palm *Oenocarpus bataua* from the Brazilian Amazon. *Seed Sci. Technol.* 45, 1-13
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Ann. Bot.* 101, 213–228
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00478>.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H., 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, third ed. Springer, New York, NY
- Borges, F.J.A., Ribeiro, B.R., Lopes, L.E., Loyola, R. 2019. Bird vulnerability to climate and land use changes in the Brazilian Cerrado. *Biol. Conserv.* 236, 347-355
- Brasil – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. *Regras para análise de sementes*. MAPA: Brasília
- 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
- Cristaudo, A., Catara, S., Mingo, A., Restuccia, A., Onofri, A., 2019. Temperature and storage time strongly affect the germination success of perennial *Euphorbia* species in Mediterranean regions. *Ecol. Evol.* 9, 10984–10999
- Dransfield, J., Uhl, N.W., Lange, C., Baker, W.J., Harley, M., Lewis, C., 2008. *Genera Palmarum. The evolution and classification of palms*. International Palm Society, London
- Eggers, S., Erdey, D., Pammenter, N.W., Berjak, P., 2007. Storage and germination responses of recalcitrant seeds subjected to mild dehydration. In: Adkins S, ed. *Seed science research:*

advances and applications. Wallingford, Oxon: CABI Publishing, 85–92

Endress, B.A., Horn, C.M., Gilmore, M.P., 2013. *Mauritia flexuosa* palm swamps: Composition, structure and implications for conservation and management. *For. Ecol. Manag.* 302, 346–353

Esser, L.F., Neves, D.M., Jarenkow, J.A., 2018. Habitat-specific impacts of climate change in the Mata Atlântica biodiversity hotspot. *Divers. Distrib.* 25, 1846-1856

Farrant, J.M., Berjak, P., Pammenter, N.W., 1985. The effect of drying rate on viability retention of recalcitrant propagules of *Avicennia marina*. *S. Afr. J. Bot.* 51, 432-438

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 Physiol.* 59, 309-314

Gonçalves, B.G., Ribeiro, L.M., Dias, D.S., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Martins, C.D.P.S., Lopes, P.S.N., Mercadante-Simões, M.O., 2020. Embryo responses to extreme water events provide insights into the behavior of *Butia capitata* (Arecaceae) seed banks during hydration cycles. *Environ. Exp. Bot.* 169,103904

Harding K., Benson E.E. (1995) Biochemical and molecular methods for assessing damage, recovery and stability in cryopreserved plant germplasm. In: Grout B.W.W. (Ed.), *Genetic preservation of plant cells in vitro*. Springer, Berlin, Germany, pp 113–167.

Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolate chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198

Hong, T.D., Ellis, R.H., 1996. A Protocol to Determine Seed Storage Behavior. IPGRI. Technical Bulletin No. 1. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. <https://portal.inmet.gov.br/>

IPCC, 2022. *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 3056 pp., doi:10.1017/9781009325844.

Jaganathan, G.K., 2021. Ecological insights into the coexistence of dormancy and desiccation-sensitivity in Arecaceae species. *Ann. For. Sci.* 78:10 <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01032-9>

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

Lima, N.E. de, Lima-Ribeiro, M.S., Tinoco, C.F., Terribile, L.C., Collevatti, R.G., 2014. Phylogeography and ecological niche modelling, coupled with the fossil pollen record, unravel the demographic history of a Neotropical swamp palm through the Quaternary. *J. Biogeogr.* 41,

673–686

Long, R.L., Gorecki, M.J., Renton, M., Scott, J.K., Colville, J., Goggin, D.E., Commander, L.E., Westcott, D.A., Cherry, H., Finch Savage, W.E., 2015. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biol. Rev.* 90, 31-59

Lorenzi, H., Noblick, L., Kahn, F., Ferreira, E., 2010. *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeira)*. Nova Odessa: São Paulo

Marques, A., Buijs, G., Ligterink, W., Hilhorst, H., 2018. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. *Funct. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1071/FP18022>

Marques, E.R., Vaz, T. A. A., Rodrigues-Junior, A.G., Davide, A.C., José, A.C., 2017. In situ germination of two tropical recalcitrant seeds and changes in activity of ROS-scavenging enzymes. *Trees*. doi 10.1007/s00468-017-1584-9

Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., 2018. Structural changes in the micropylar region and overcoming dormancy in Cerrado palm seeds. *Tress* 32, 1415-1428

Melo, W.A., Freitas, C.G., Bacon, C.D., Collevatti, R.G., 2018. The road to evolutionary success: insights from the demographic history of an Amazonian palm. *Heredity* 121, 183-195

Moothoo-Padayachie, A., Varghese, B., Pammenter, N.W., Govender, P., Ser Shen, 2016. Germination associated ROS production and glutathione redox capacity in two recalcitrant-seeded species differing in seed longevity. *Botany* 94, 1103-1114

Moura, A.C.F., Ribeiro, L.M., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Mercadante-Simões, M.O., Nunes, Y.R.F., 2019. Cytological and histochemical evaluations reveal roles of the cotyledonary petiole in the germination and seedling development of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Protoplasma* 256, 1299–1316

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

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* 208, 68–78

Nunes, Y.R.F., Souza, C.S., Azevedo, I.F.P.de, Oliveira, O.S.de, Frazão, L.A., Fonseca, R.S., Santos, R.M.dos, Neves, W.V., 2022. Vegetation structure and edaphic factors in veredas reflect different conservation status in these threatened áreas. *For. Ecosyst.* 9, 100036

O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59:368-373

O'Brien, T.P., McCully, M.E., 1981. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcarphi PTY, Melbourne.

Oliveira, V.A.de, Mello, C.R.de, Beskow, S., Viola, M.R., Srinivasan, R., 2019. Modeling the effects of climate change on hydrology and sediment load in a headwater basin in the Brazilian Cerrado biome. *Ecol. Eng.* 133, 20–31

- Ooi, M.K.J, Auld, T.D., Whelan, R.J., 2007. Distinguishing between persistence and dormancy in soil seed banks of three shrub species from fire-prone southeastern Australia. *J. Veg. Sci.* 18, 405-412
- Orozco-Segovia, A., Batis, A.I., Rojas-Aréchiga, M., Mendoza, A., 2003. Seed biology of palms: A Review. *Palms* 47(2), 79–94
- Pagano, A., Folini, G., Pagano, P., Sincinelli, F., Rossetto, A., Macovei, A., Balestrazzi, A., 2002. ROS accumulation as a hallmark of dehydration stress in primed and overprimed *Medicago truncatula* seeds. *Agronomy* 12, 1-16 <https://doi.org/10.3390/agronomy12020268>
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT (2011) Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Choarini-Garcia H, Melo RCN (Eds) *Light Microscopy: Methods and Protocols*. Springer/Humana Press. New York. pp. 37-49
- Pausas, J.G, Lamont, B.B, Keeley, J.E., Bond, W.J., 2022. Bet-hedging and best-bet strategies shape seed dormancy. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.18436>
- Porto, K.C.N., Nunes, Y.R.F., Ribeiro L.M., 2018. The dynamics of recalcitrant seed banks of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) reveal adaptations to marsh microenvironments. *Plant. Ecol.* 219, 199-207
- Rajendran, P.A., Avarachan, S.E., Krishnannair, S.K., 2021. Desiccation studies in seeds of *Arenga wightii* Griff., na endemic vulnerable palm of Southern Western Ghats. *Res. J. Biotech* 16:(9)
- Ribeiro, J.F., Walter, B.M.T. 2008. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF (Eds.). *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica
- 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. Agropec. Bras.* 45, 361-368
- Ribeiro, L.M., Souza, P.P., Rodrigues-Junior, A.G., Oliveira, T.G.S., Garcia, Q.S., 2011. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. *Seed Sci. Technol.* 39, 303-317
- Roland, A.M., 1978. General preparations and staining of thin sections. In: Hall, J.L. (Ed.), *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. Elsevier, New York.
- Salvador, H.F., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Dias, D.S., Azevedo, A.M., Lopes, P.S.N., Nunes, Y.R.F., Ribeiro, L.M., 2022. The dynamics of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) recalcitrant seed banks reveal control of their persistence in marsh environments *For. Ecol. Manag.* 511, 120155
- Schindwein, G., Schindwein, C.C.D., Tonietto, A., Dillenburg, L.R., 2013. Alleviation of seed dormancy in *Butia odorata* palm tree using drying and moist-warm stratification *Seed Sci. & Technol.*, 41, 1-11
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.008>

- Silva, E.A.A. da, Melo, D.B., Davide, A.C., Bode, N., Abreu, G.B., Faria, J.R.M., Hilhorst, H.W.M., 2007. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Ann. Bot.* 99, 823-830
- Silva, R.S., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Nunes, Y.R.F., Lopes, P.S.N., 2014. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*) – the swamp palm. *Flora* 209, 674-685
- Soares, J.R., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Lopes, P.S.N., 2021. Hydration cycles and overcoming dormancy in *Butia capitata* (Arecaceae) diaspores. *Trees* <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02132-9>.
- Souza, J.N., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Dias, D.S., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., 2022. Seasonality and the control of longevity and dormancy in macaúba palm diaspores. *Ind. Crops Prod.* 177, 114475
- Spera, M.R.N., Cunha, R., Teixeira, J.B., 2001. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti. *Pesq. Agropec. Bras.* 36, 1567-1572
- Stevens, N, Seal, C.E., Archibald, S., Bond, W., 2014. Increasing temperatures can improve seedling establishment in arid-adapted savanna trees. *Oecologia* 175, 1029-1040
- Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91, 294–304
- Veloso, V.H.S., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Nunes, Y.R.F., 2016. Cytological aspects of recalcitrance in dormant seeds of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Acta Physiol. Plant* 38, 171
- Virapongse, A., Endress, B.A., Gilmore, M.P., Horn, C., Romulo, C., 2017. Ecology, livelihoods, and management of the *Mauritia flexuosa* palm in South America. *Glob. Ecol. Conserv.* 10, 70–92
- Wojtyła, Ł., Lechowska, K., Kubala, S., Garnczarska, M., 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* 7(66): 1-16
- Zhang Y, Liu Y, Sun L, Baskin CC, Baskin JM, Cao M, Yang J. 2022. Seed dormancy in space and time: global distribution, paleo- and present climatic drivers and evolutionary adaptations. *New Phytol.* 234, 1770-1781

Figuras

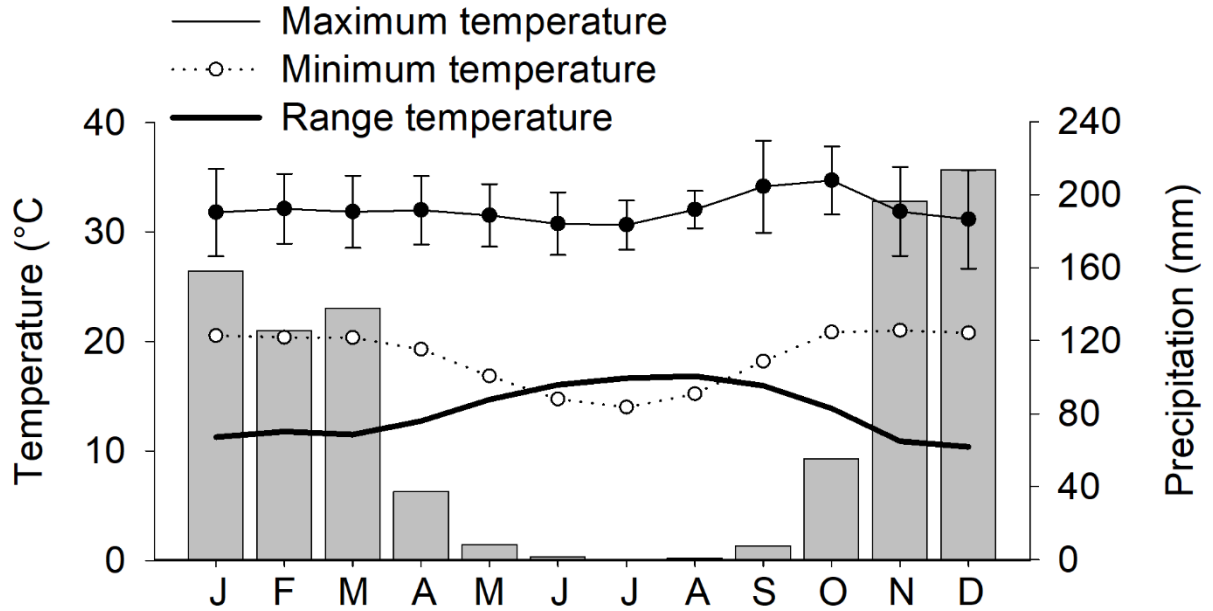


Fig. 1 Temperaturas médias mensais, amplitude térmica (diferença entre as temperaturas médias máximas e mínimas observadas em cada mês), e precipitação no município de Januária, estado de Minas Gerais, Brasil, nos anos de 1991-2021. Barras verticais indicam o desvio das temperaturas máximas diárias registradas neste período.

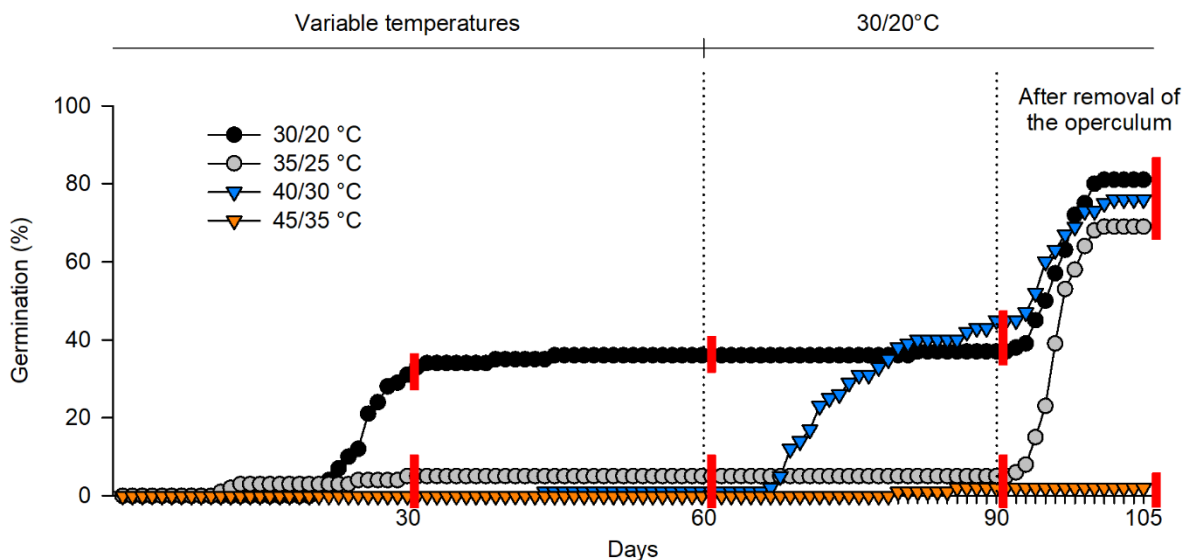


Fig. 2 Percentuais de germinação de sementes de *M. flexuosa*. As sementes foram submetidas aos diferentes regimes de temperatura por 60 dias, e após foram transferidas para a temperatura 30/20°C por mais 30 dias, seguido da remoção do opérculo de sementes não germinadas, e incubação a 30/20°C por

15 dias adicionais. Linhas verticais vermelhas indicam ausência de diferença estatística entre tratamentos, pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

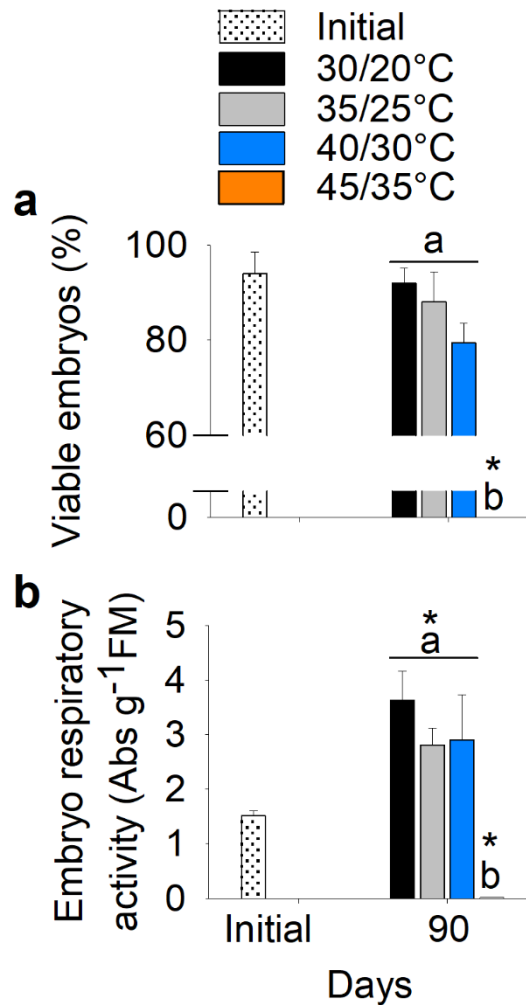


Fig. 3 Porcentagem de sementes viáveis (a) e estimativa da atividade respiratória (b) de embriões de sementes de *M. flexuosa*. As sementes foram submetidas aos diferentes regimes de temperatura por 60 dias, e após foram transferidas para a temperatura 30/20°C por mais 30 dias. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença em relação à condição inicial. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos dentro do tempo, pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

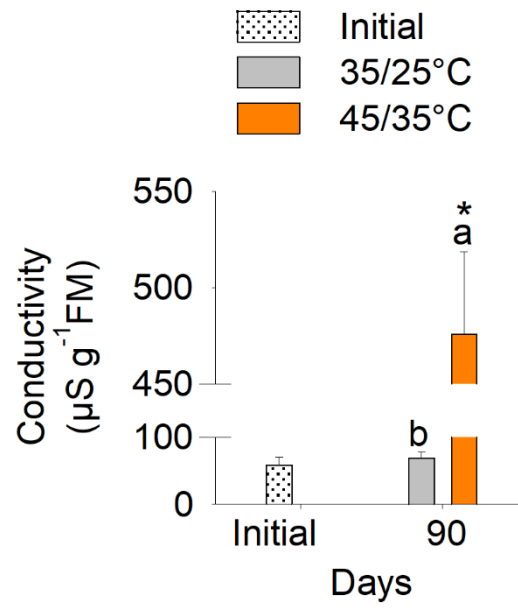


Fig. 4 Condutividade elétrica de embriões de sementes de *M. flexuosa*. As sementes foram submetidas aos diferentes regimes de temperatura por 60 dias, e após foram transferidas para a temperatura 30/20°C por mais 30 dias. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Asterisco (*) indica diferença em relação à condição inicial. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no tempo, pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

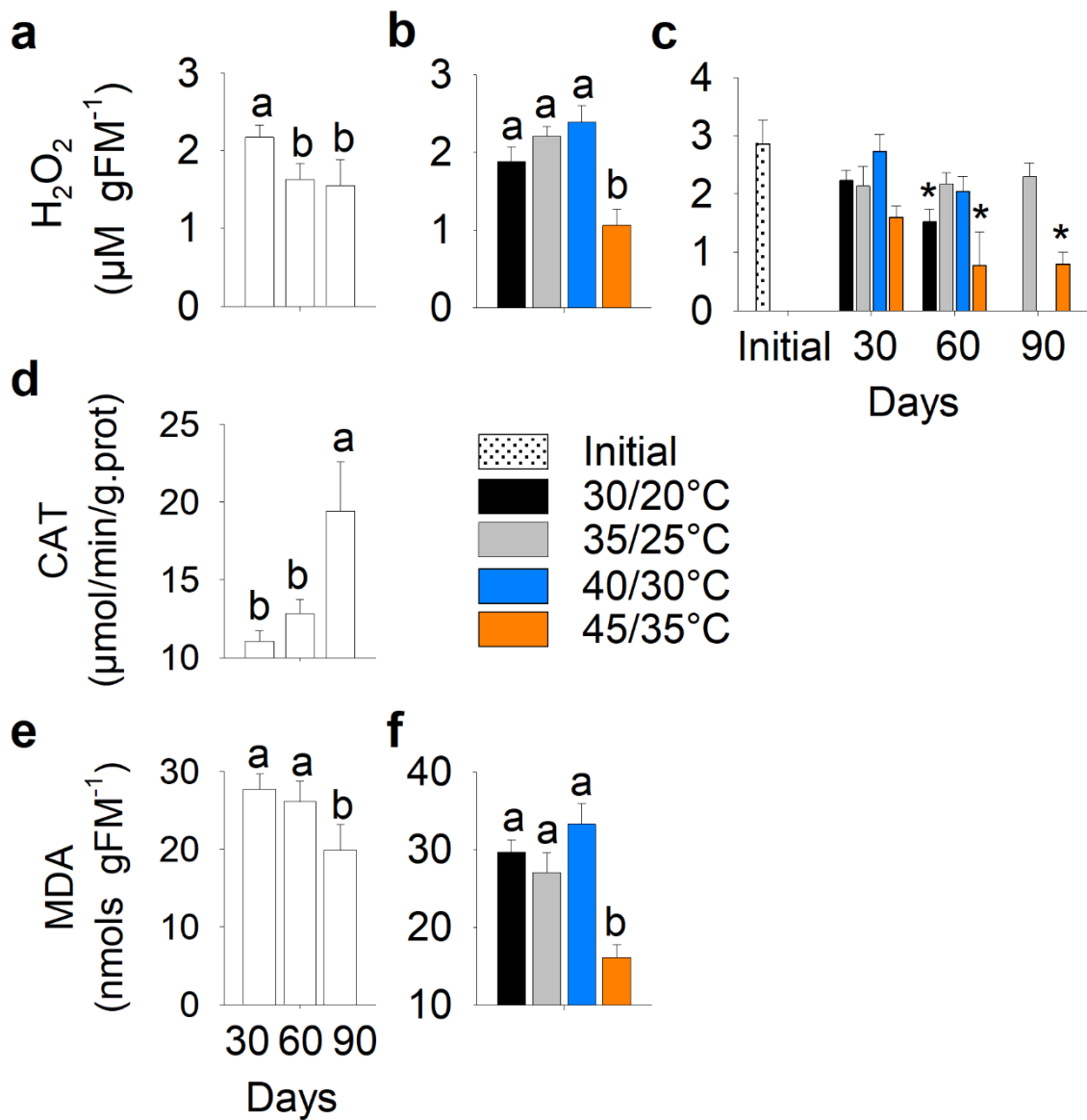


Fig. 5 Efeito do tempo (a, d, e) e temperatura (b, f) sobre a atividade enzimática da catalase (CAT) (d), e teores de H_2O_2 (a-c) e malondialdeído (MDA) (e, f) em embriões de sementes de *M. flexuosa*. As sementes foram submetidas aos diferentes regimes de temperatura por até 60 dias, e após foram transferidas para a temperatura 30/20°C por mais 30 dias. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença em relação à condição inicial. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos, pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

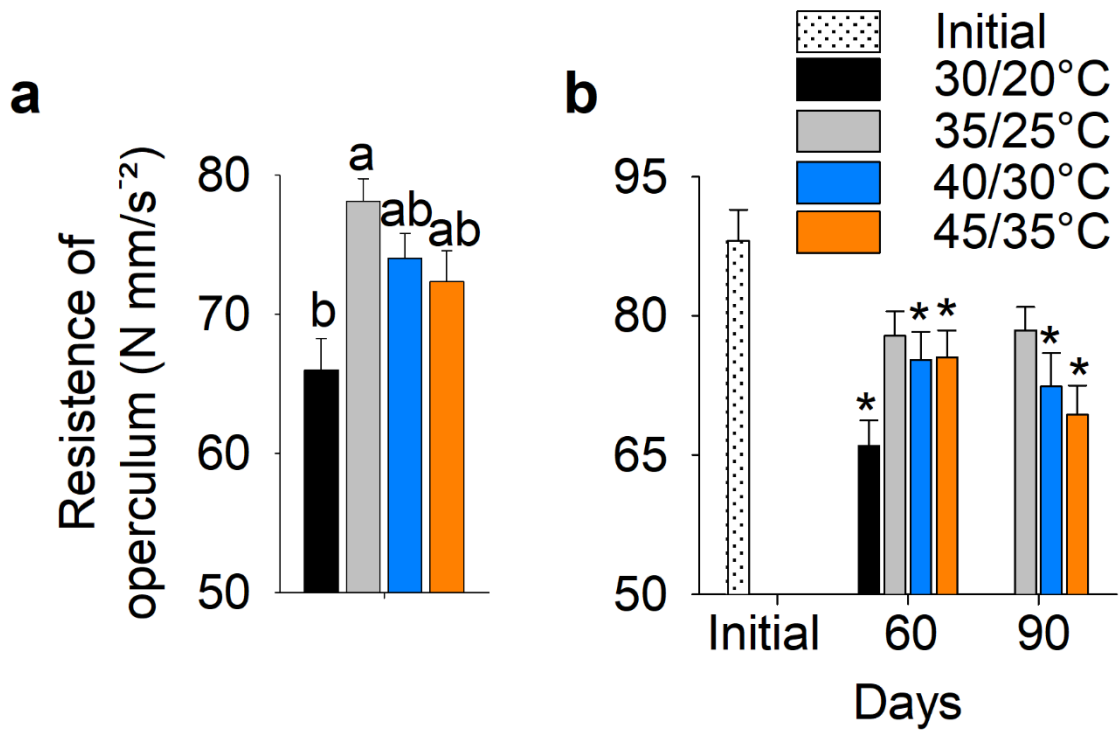


Fig. 6 Resistência do opérculo ao deslocamento em sementes de *M. flexuosa*. As sementes foram submetidas aos diferentes regimes de temperatura por 60 dias, e após foram transferidas para a temperatura 30/20°C por mais 30 dias. a – efeito isolado da temperatura sobre a resistência do opérculo; b – variação na resistência do opérculo em função do tempo e temperatura. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença em relação à condição inicial. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos dentro do tempo, pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

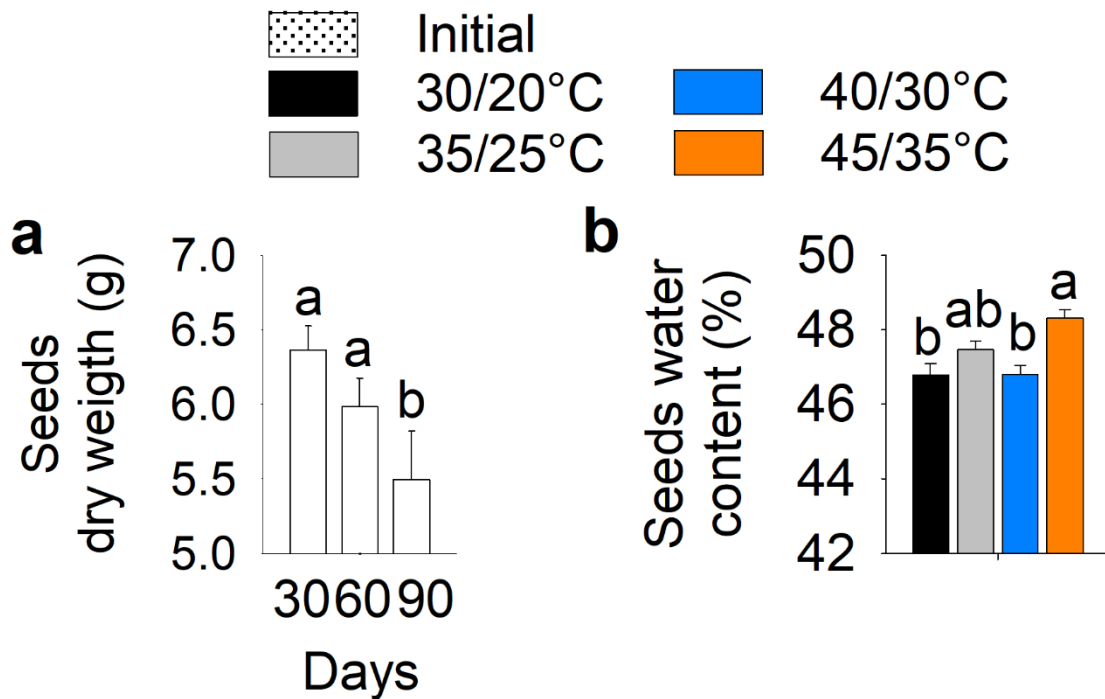


Fig. 7 Efeito do tempo (a) e temperatura (b) sobre as características biométricas de sementes (endosperma+tegumento) de *M. flexuosa*. As sementes foram submetidas aos diferentes regimes de temperatura por até 60 dias, e após foram transferidas para a temperatura 30/20°C por mais 30 dias. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos, pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

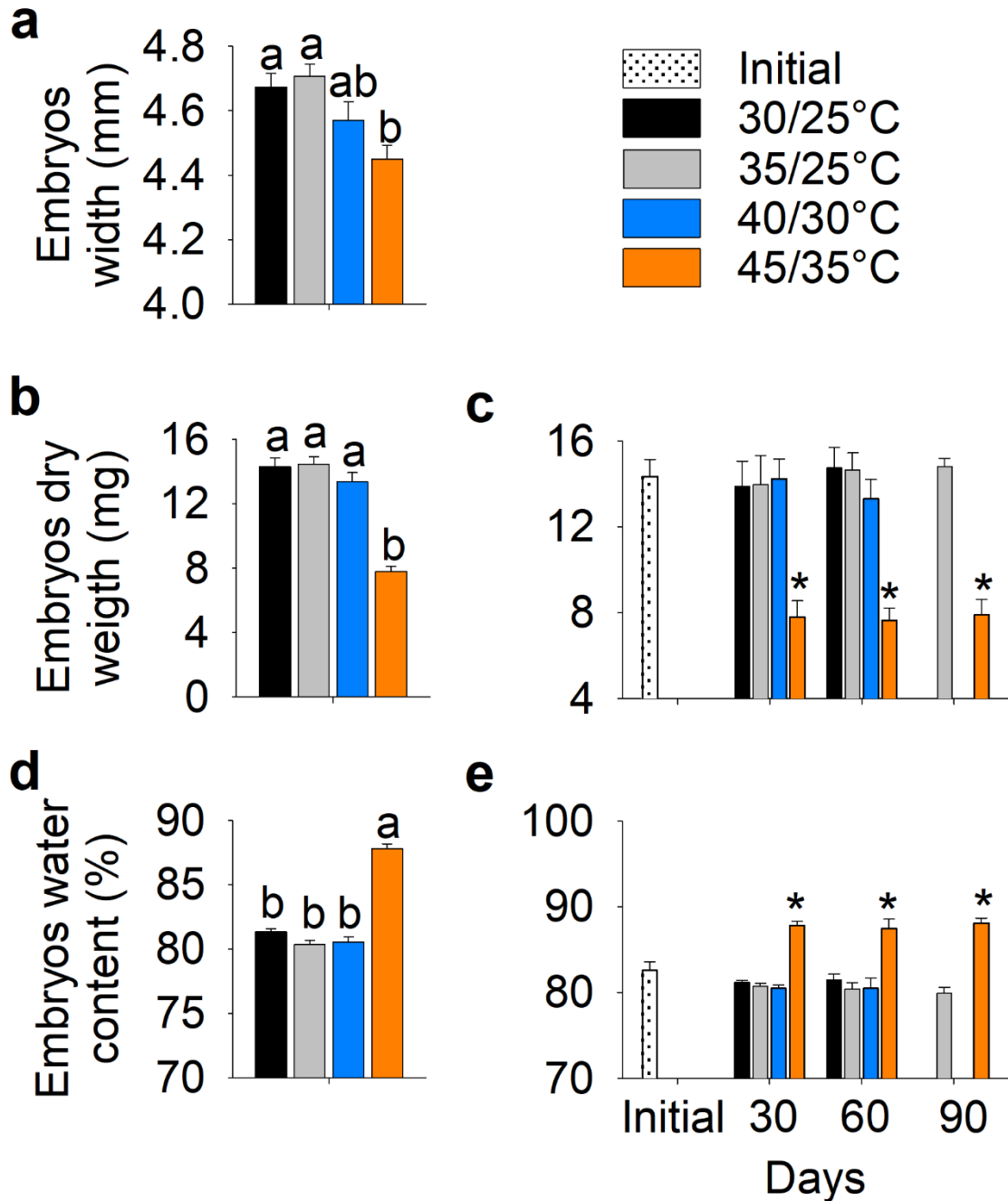


Fig. 8 Características biométricas de embriões de sementes de *M. flexuosa*. a, b, d – efeito isolado da temperatura sobre os parâmetros avaliados. As sementes foram submetidas aos diferentes regimes de temperatura por até 60 dias, e após foram transferidas para a temperatura 30/20°C por mais 30 dias.

Barras verticais indicam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença em relação à condição inicial. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos, pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

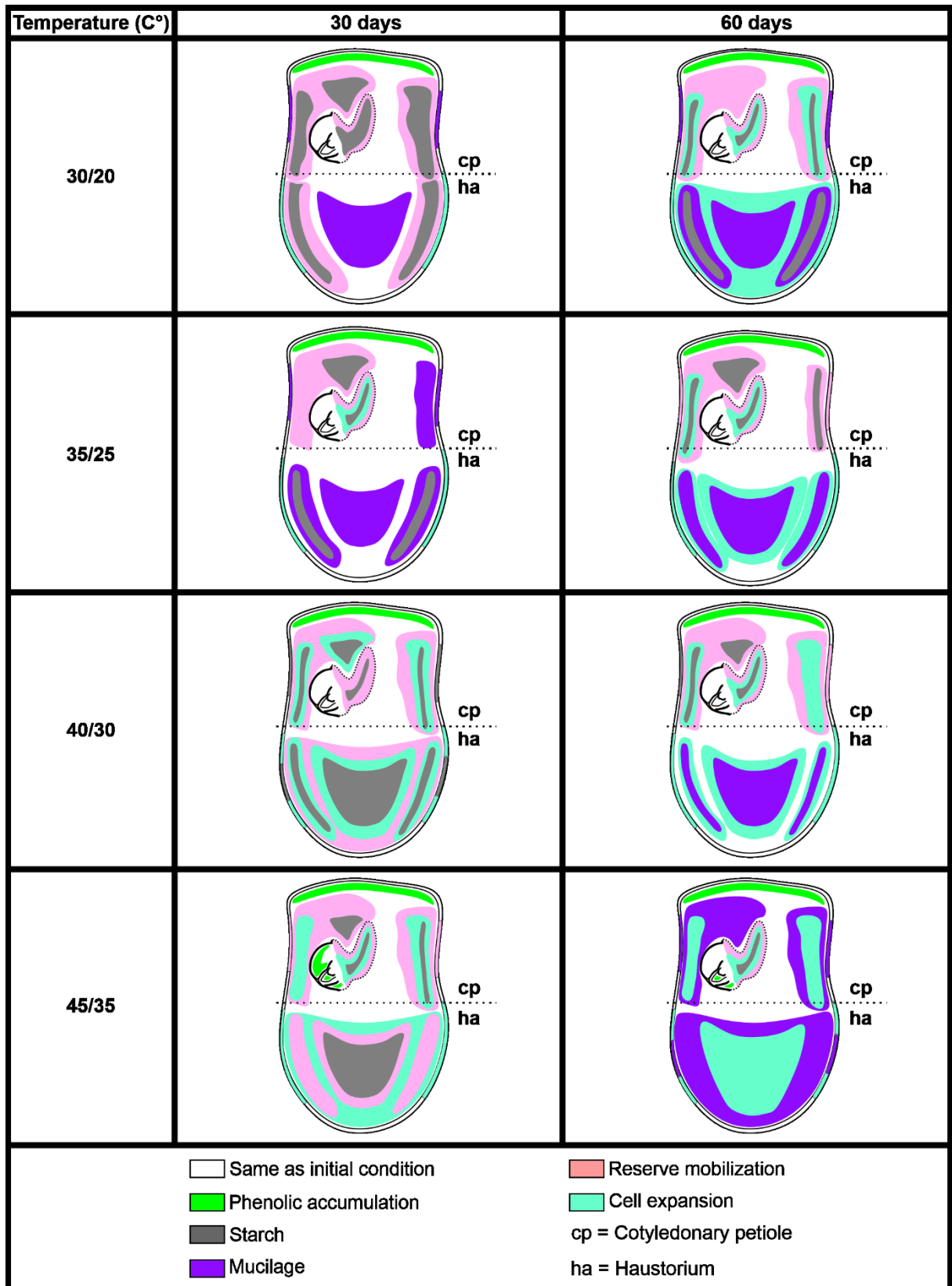


Fig. 9 Ilustração esquemática das alterações micromorfométricas e avaliações histoquímicas em

embriões de *M. flexuosa* de sementes mantidas sob termoperíodos de 30/20, 35/25, 40/30 e 45/35°C, por 30 e 60 dias. As avaliações foram realizadas em secções longitudinais do pecíolo cotiledonar e secções transversais do haustório dos embriões. A dinâmica de expansão celular representada é relativa às dimensões das células na condição inicial.

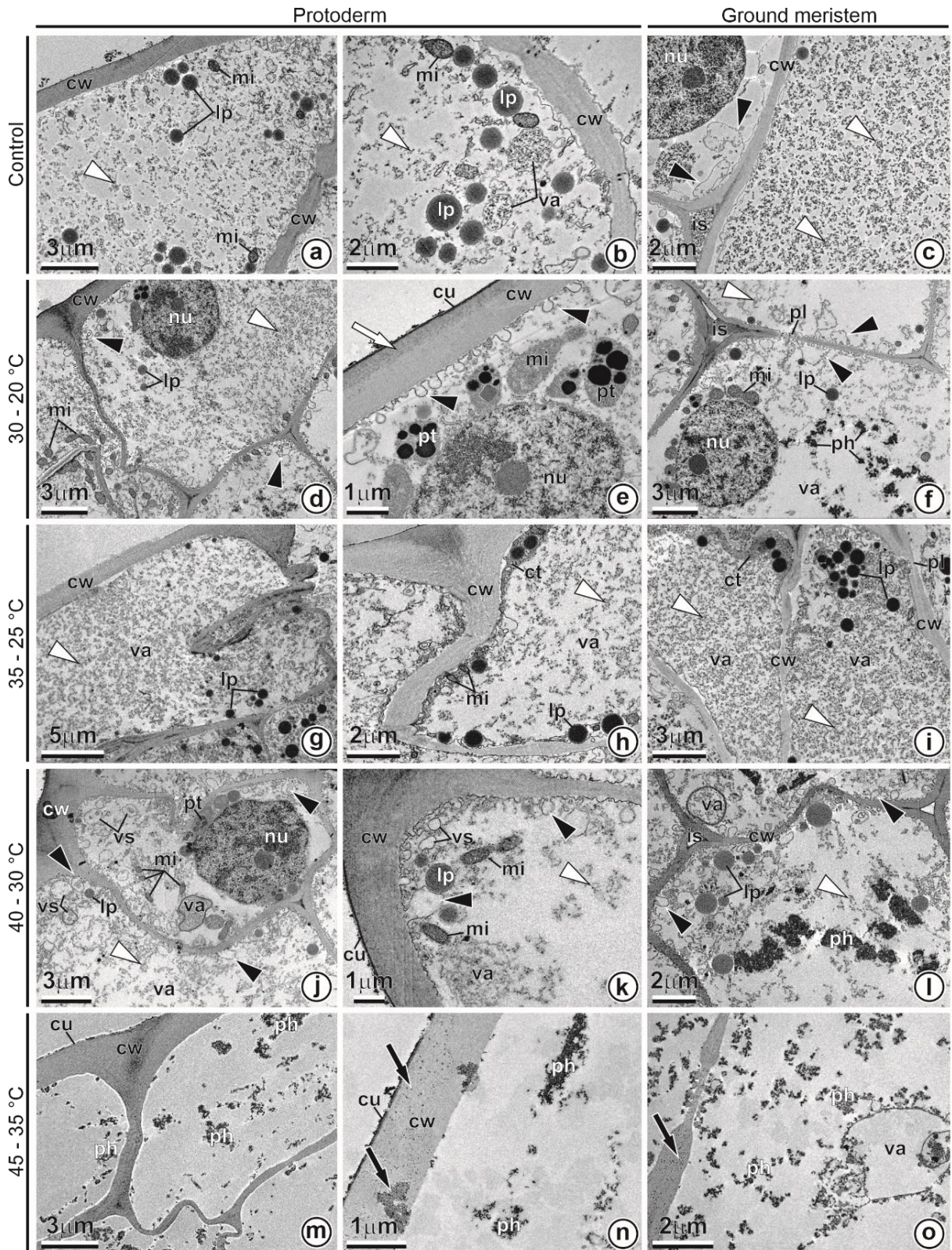


Fig. 10 Imagem de MET de pecíolo cotiledonar de *Mauritia flexuosa* em sementes na condição inicial e submetidas aos termoperíodos de 30/20, 35/25, 40/30 e 45/35°C, por 60 dias. (a) Célula protodérmica de embriões recém-dispersos com parede celular externa espessa, (b) e mitocôndrias e gotículas de lipídeos dispostas periféricamente. (c) Células do meristema fundamental com vacúolos proeminentes eletrodensos. (d,e) Proliferação de mitocôndrias e plastídeos em células protodérmicas de embriões mantidos a 30/20°C., e (e) proliferação de vesículas (pontas de seta pretas) e transporte de produtos de mobilização de reserva do endosperma através da parede celular (seta branca). (f) Acúmulo de compostos fenólicos em células do meristema fundamental. (g-i) Células de embriões submetidos a 35/25°C com grandes vacúolos ricos em mucilagem (pontas de seta brancas) e acúmulo de lipídeo no citossol periférico. (j-k) Células da protoderme de embriões do termoperíodo 40/30°C, mostrando proliferação de vesículas (pontas de setas pretas) e vacúolos autofágicos associados com quantidades reduzidas de mucilagem (pontas de setas brancas). (l) Células mais internas do pecíolo cotiledonar mostram vacúolos autofágicos e acúmulo de compostos fenólicos. (m-o) Protoplasto colapsado e organelas ausentes em células de embriões de 45/35°C. Setas pretas apontam para remanescentes de produtos de mobilização de reserva nas paredes celulares. lp, lipídeos; mi, mitocôndria; cw, parede celular; va, vacúolo; is, espaço intercelular; nu, núcleo; cu, cutícula; pt, plastídeo; ph, compostos fenólicos; ct, citosol; pl, plasmodesma.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência e o estabelecimento bem sucedido de *Mauritia flexuosa* no Cerrado brasileiro podem ser atribuídos à adaptação das estratégias reprodutivas da espécie ao clima sazonal, e não está condicionada apenas às características de micro-habitat que se assemelham às encontradas em sua região de origem. A espécie, apesar de produzir sementes recalcitrantes, forma bancos de sementes persistentes no solo em ambientes de vereda (novidade entre angiospermas que produzem sementes recalcitrantes). A germinação das sementes de buriti é modulada pelos regimes hidrológicos e térmicos observados no bioma do Cerrado.

As características associadas à recalcitrância e dormência garantem alto nível de homeostase às sementes (descrito com mais detalhes no Capítulo I). O acúmulo de mucilagem e compostos com atividade antioxidante previnem a dessecação e atuam no controle de estresse oxidativo. Paredes celulares espessadas e ricas em manano no endosperma conferem maior rigidez e resistência mecânica, garantido a proteção do embrião e tendo papel importante na restrição da germinação.

Nossos esforços contribuem para aumentar o conhecimento sobre a ecofisiologia de sementes recalcitrantes, e dão pistas importantes para elucidar alguns aspectos ecológicos e evolutivos a respeito da recalcitrância em sementes de plantas que ocorrem em ambientes mais secos e sazonais, e a instigante associação com a dormência. Além disso, com base nas avaliações fisiológicas e citológicas das sementes, este trabalho se soma a outros esforços na tentativa de caracterizar os tipos de dormência encontrados nas palmeiras e seus padrões peculiares de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas. As metodologias desenvolvidas e adaptadas para a execução do presente trabalho poderão ser úteis para a ampliação dos estudos sobre bancos de sementes de espécies recalcitrantes. Os resultados alcançados permitem sugerir como propostas para trabalhos futuros o aprofundamento do estudo da resposta dos embriões de *M. flexuosa* ao estresse abiótico com incorporação de indicadores genéticos e moleculares, além do estudo sobre os efeitos do estresse ambiental sobre o estabelecimento das plântulas.

Embora o buriti seja uma das palmeiras mais abundantes do neotrópico, suas populações no Cerrado, e os ambientes de veredas associados, encontram-se altamente ameaçados. Espera-se que a constante ampliação do arcabouço de conhecimentos científicos sobre esta icônica palmeira contribua para sua conservação e utilização sustentável.

REFERÊNCIAS

- Anderson, T.M., Schütz, M., Risch, A.C., 2012. Seed germination cues and the importance of the soil seed bank across an environmental gradient in the Serengeti. *Oikos* 121, 306-312
- Andrade, L.A.Z. de, Miranda, H.S., 2014. The dynamics of the soil seed bank after a fire event in a woody savanna in central Brazil. *Plant Ecol.* 215, 1199-1209
- Ávila, M.A, Souza, S.R., Veloso, M.D.M, Santos, R.M. Fernandes, L.A., Nunes, Y.R.F., 2016. Structure of natural regeneration in relation to soil properties and disturbance in two swamp forests. *CERNE* 22, 1-10
- Barbedo, C.J., 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *J. Seed Sci.* 40, 221-236
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, 2nd ed. Elsevier/AP, San Diego, CA.
- Bastos, L.L.S., Ferraz, I.D.K., Lima Junior, M.J.V., Pritchard, H.W., 2017. Variation in limits to germination temperature and rates across the seed-seedling transition in the palm *Oenocarpus bataua* from the Brazilian Amazon. *Seed Sci. Technol.* 45, 1-13
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Ann. Bot.* 101, 213–228
- Christoffoleti, P.J., Caetano, R.S.X., 1998. Soil seed banks. *Sci. Agric.* 55, 74-78
- Cristaudo, A., Catara, S., Mingo, A., Restuccia, A., Onofri, A., 2019. Temperature and storage time strongly affect the germination success of perennial *Euphorbia* species in Mediterranean regions. *Ecol. Evol.* 9, 10984–10999
- Dransfield, J., Uhl, N.W., Lange, C., Baker, W.J., Harley, M., Lewis, C., 2008. *Genera Palmarum. The evolution and classification of palms.* International Palm Society, London
- Endress, B.A., Horn, C.M., Gilmore, M.P., 2013. *Mauritia flexuosa* palm swamps: Composition, structure and implications for conservation and management. *For. Ecol. Manag.* 302, 346–353

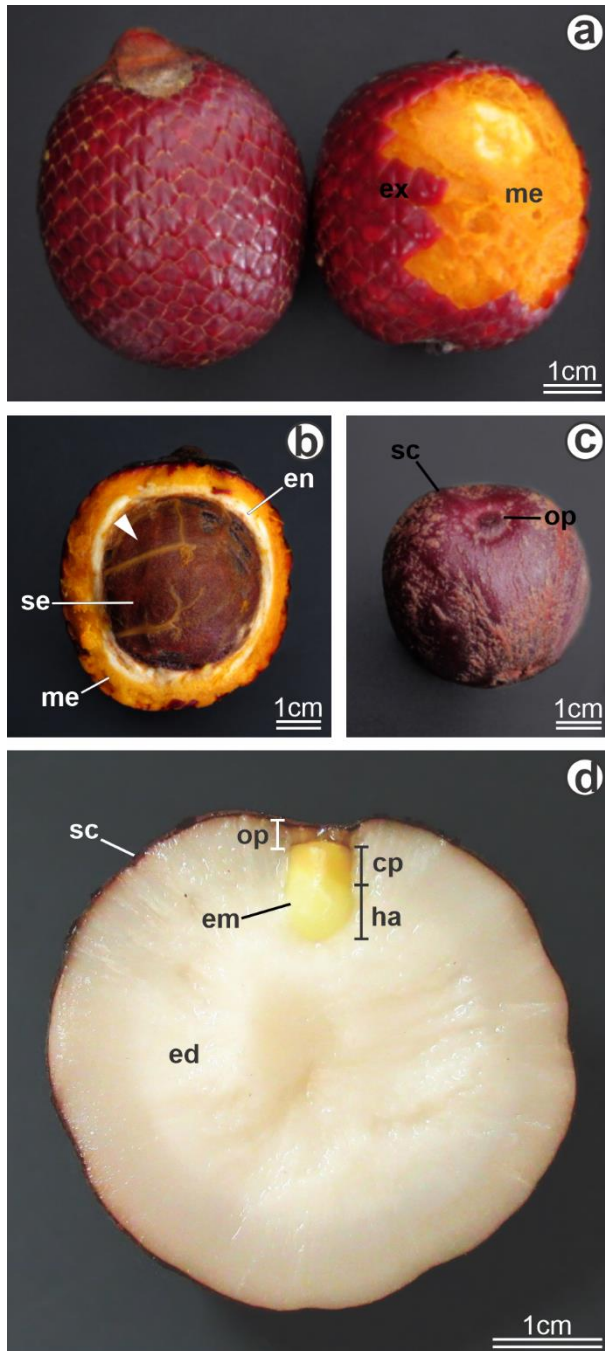
- Esser, L.F., Neves, D.M., Jarenkow, J.A., 2019. Habitat-specific impacts of climate change in the Mata Atlântica biodiversity hotspot. *Divers. Distrib.* 25, 1846–1856
- Ferrandis, P., Bonilla, M., Osorio, L. del C., 2011 Germination and soil seed bank traits of *Podocarpus angustifolius* (Podocarpaceae): an endemic tree species from Cuban rain forests *Rev. Biol. Trop.* 59, 1061-1069
- Garwood, N.C., 1989. Tropical Soil Seed Banks: a Review. In: Leck, M.A., Parker, T.V., Simpson, R.L. (eds) *Ecology of Soil Seed Banks*. Academic Press
- Guimarães, A.J.M., Araújo, G.M., Corrêa, G.F., 2002. Estrutura fitossociológica em área natural e antropizada de uma vereda em Uberlândia, MG. *Acta Bot. Bras.* 16, 317-329
- Hong, T.D., Ellis, R.H., 1996. A Protocol to Determine Seed Storage Behavior. IPGRI. Technical Bulletin No. 1. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Lima, N.E. de, Lima-Ribeiro, M.S., Tinoco, C.F., Terribile, L.C., Collevatti, R.G., 2014. Phylogeography and ecological niche modelling, coupled with the fossil pollen record, unravel the demographic history of a Neotropical swamp palm through the Quaternary. *J. Biogeogr.* 41, 673–686
- Long, R.L., Gorecki, M.J., Renton, M., Scott, J.K., Colville, J., Goggin, D.E., Commander, L.E., Westcott, D.A., Cherry, H., Finch Savage, W.E., 2015. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biol. Rev.* 90, 31-59
- Lorenzi, H., Noblick, L., Kahn, F., Ferreira, E., 2010. *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeira)*. Nova Odessa: São Paulo
- Marques, A., Buijs, G., Ligterink, W., Hilhorst, H., 2018. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. *Funct. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1071/FP18022>
- Nielsen, D.L., Campbell, C., Rees, G.N., Durant, R., Littler, R., Petrie, R., 2018. Seed bank dynamics in wetland complexes associated with a lowland river. *Aquat. Sci.* 80, 23
- Oliveira, T.G.S., José, A.C., Ribeiro, L.M., Faria, J.M.R., 2015. Longevity and germination of *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) seeds and its ecological implications. *Rev. Biol. Trop.* 63, 333-340

- Porto, K.C.N., Nunes, Y.R.F., Ribeiro L.M., 2018. The dynamics of recalcitrant seed banks of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) reveal adaptations to marsh microenvironments. *Plant. Ecol.* 219, 199-207
- Rajendran, P.A., Avarachan, S.E., Krishnannair, S.K., 2021. Desiccation studies in seeds of *Arenga wightii* Griff., an endemic vulnerable palm of Southern Western Ghats. *Res. J. Biotech* 16:(9)
- Rull, V., Montoya, E., 2014. *Mauritia flexuosa* palm swamp communities: natural or human-made? A palynological study of the Gran Sabana region (northern South America) within a neotropical context. *Quat. Sci. Rev.* 99, 17-33
- Sampaio, M.B., Ticktin, T., Seixas, C.S., Santos, F.A.M. dos, 2012. Effects of socioeconomic conditions on multiple uses of swamp forests in central Brazil. *Hum. Ecol.* 40, 821-831
- Silva, R.S., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Nunes, Y.R.F., Lopes, P.S.N., 2014. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*) – the swamp palm. *Flora* 209, 674-685
- Souza, J.N., Agostinho, C. de O., Ribeiro, L.M., Azevedo, A.M., Lopes, P.S.N., 2019. Edaphic and climatic control of macaúba palm seed bank dynamics. *Ind. Crops Prod.* 141:111802 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111802>
- Spera, M.R.N., Cunha, R., Teixeira, J.B., 2001. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti. *Pesq. Agropec. Bras.* 36, 1567-1572
- Thompson, K., Grime, J.P., 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *J. Ecol.* 67, 893-921
- Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91, 294–304
- Veloso, M.D.M., Fernandes, L.A., Ávila, M.A., Nunes, Y.R.F., Frazão, L.A., 2018. Soil Attributes in Anthropized Hygrophilous Forest in Northern Minas Gerais State, Brazil. *J. Agric. Sci. Technol. B* 8, 311-319

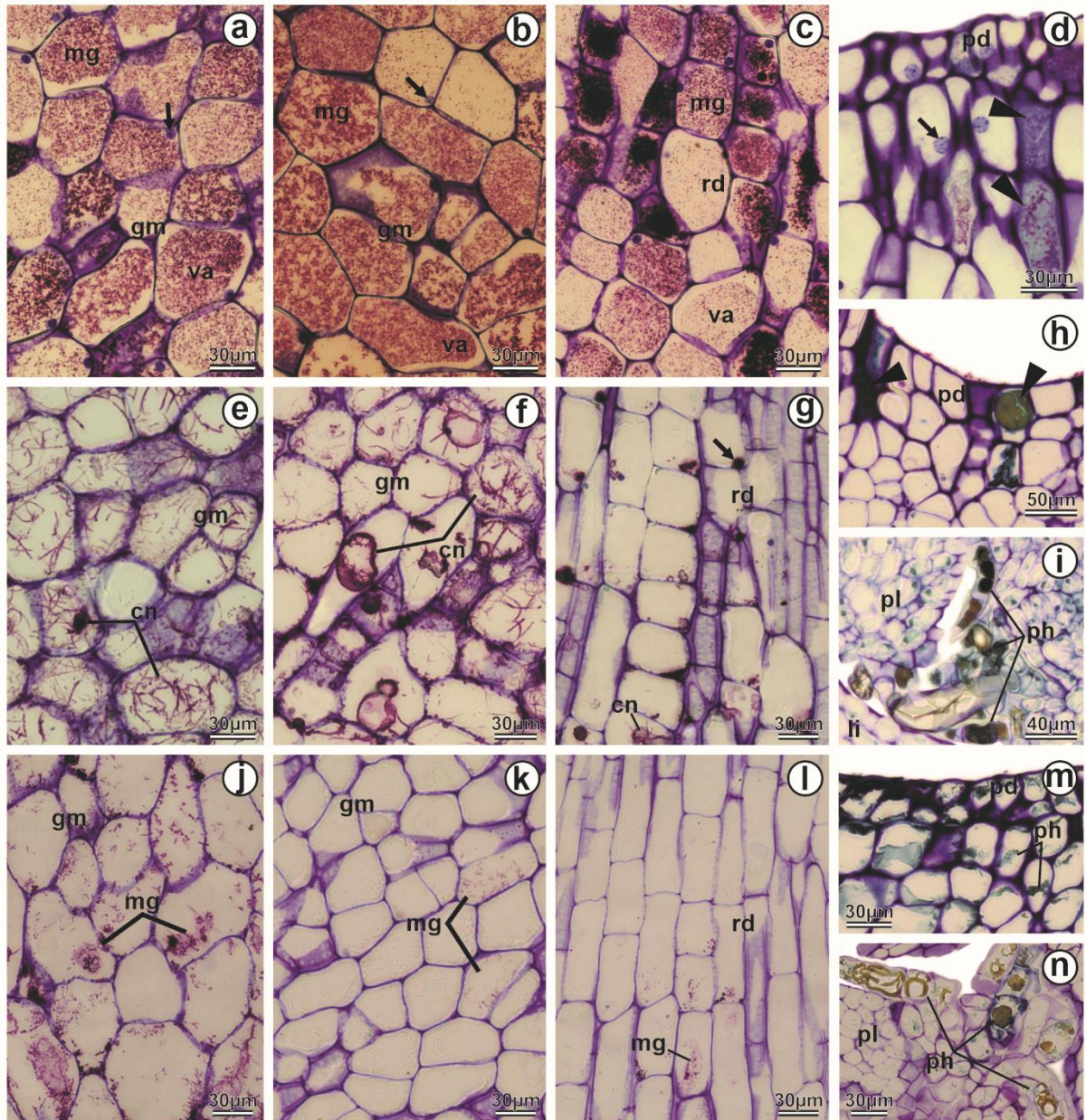
Virapongse, A., Endress, B.A., Gilmore, M.P., Horn, C., Romulo, C., 2017. Ecology, livelihoods, and management of the *Mauritia flexuosa* palm in South America. *Glob. Ecol. Conserv.* 10, 70–92

Williams, P.R., Congdon, R.A., Grice, A.C., Clarke, P.J., 2005. Germinable soil seed banks in a tropical savanna: seasonal dynamics and effects of fire. *Austral Ecol.* 30, 79-90

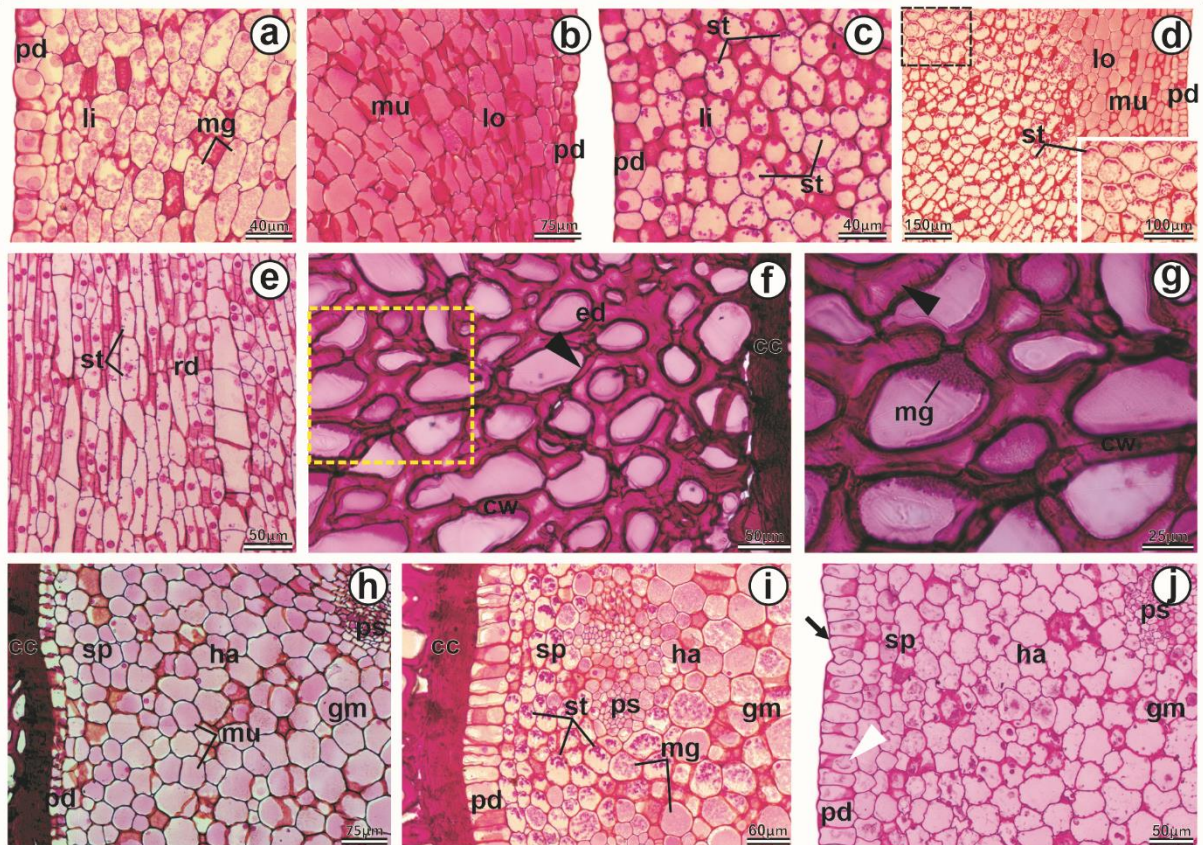
ANEXO – Material Suplementar



A1 Fruto de *Maurita flexuosa*. (a) Frutos maduros com exocarpo escamoso; (b, c) Regiões do pericarpo e semente (ponta de seta mostra vascularização da paucicalaza); (d) Corte longitudinal da semente evidenciando o embrião, com duas porções morfologicamente distintas: pecíolo cotiledonar (onde está localizado o eixo embrionário) e haustório. cp, pecíolo cotiledonar. ed, endosperma. em, embrião. en, endocarpo. ex, exocarpo. ha, haustório. me, mesocarpo. op, opérculo. sc, envoltório seminal. se, semente.



A2 Efeito do estresse térmico severo em sementes de *Maurita flexuosa*. Secções longitudinais do pecíolo cotiledonar de embriões antes (a-d) e depois de serem submetidos ao termoperíodo 45/35°C, por 30 (e-i) e 60 dias (j-n). (a, e, j) Meristema fundamental adjacente à radícula. (b, f, k) Meristema fundamental. (c, g, l) Região medular da radícula. (a-c) Células de embriões na condição inicial com grandes vacúolos contendo material flocular abundante e núcleos evidentes (setas); (e-g) Células de embriões mantidos a 45/35°C, por 30 dias, com núcleos colapsados e respectivo material granular disperso pelo protoplasto, indicando desorganização de membranas; o material flocular é escasso ou ausente; (j-l) Protoplasto colapsado e perda de conteúdo celular em embriões mantidos a 45/35°C, por 60 dias; (d, h, m) Região proximal do pecíolo cotiledonar (adjacente ao opérculo) mostrando acúmulo de compostos fenólicos (ponta de seta); (h, m) Células colapsadas e compostos fenólicos dispersos no protoplasto em embriões mantidos em temperaturas elevadas. (i, n) Plúmula de embriões submetidos a 45/35°C contendo compostos fenólicos. cn, núcleo colapsado. gm, meristema fundamental. li, lígula. mg, material granular. pd, protoderme. ph, compostos fenólicos. pl, plúmula. rd, radícula. va, vacúolo.



A3 Histoquímica em sementes de *Mauritia Flexuosa*. A coloração rosa ou magenta revela polissacarídeos neutros com o ácido periódico e reagente de Schiff (PAS). (a-e) Secções longitudinais do pecíolo cotiledonar. (f-j) Secções transversais do haustório e endosperma adjacente. (a) Região da lígula de embriões na condição inicial, mostrando início de consumo de reservas mucilaginosas; (b) Região oposta à lígula de embriões na condição inicial mostrando células com vacúolos volumosos contendo mucilagem, sem indicativo de processo de mobilização de reserva ativo; (c) Região da lígula de embriões mantidos a 30/20°C, por 30 dias, mostrando o progresso da mobilização de reservas e acúmulo de amido transitório; (d) Região oposta à lígula de embriões a 30/20°C, por 30 dias, mostrando o avanço do consumo de reservas mucilaginosas do meristema fundamental para a porção periférica do pecíolo. A polarização dos grãos de amido depositados nas células sugere o sentido da mobilização de reservas (detalhe); (e) Região medular da radícula de embriões mantidos a 35/25°C, por 30 dias, com redução do conteúdo de mucilagem e acúmulo de amido transitório, indicando o consumo de reservas e atividade metabólica intensos nesta região (eixo embrionário); (f, g) Endosperma de sementes mantidas em 40/30°C, por 30 dias, mostrando células com parede celular espessa contendo mucilagem. Há mobilização de reservas de parede celular (ponta de seta preta), e polarização de compostos de reserva, sugerindo o sentido da mobilização (note a camada de células colapsadas adjacente ao haustório); (g) Detalhe da porção delimitada em f; (h-j) Haustório de embriões na condição inicial (h), e após submeter as sementes aos termoperíodos de 30/20°C (i) e 45/35°C (j), por 30 dias. Note o avanço do consumo de reservas em embriões mantidos a 30/20°C; (j) Embriões mantidos a 45/35°C mostram descolamento da protoderme do haustório do endosperma adjacente (seta). Células do haustório colapsadas, evidenciado pela perda do formato original, rompimento de vacúolos (ponta de seta branca) e deterioração de membranas. cc, camada de células colapsadas. cw, parede celular. ed, endosperma. gm, meristema fundamental. ha, haustório. li, lígula. lo, região oposta à lígula. mg, material granular. mu, mucilagem. pd, protoderme. ps, cordões procambiais. rd, radícula. sp, subprotoderme. st, amido.