



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**UFMG**

Guilherme Pereira Dias

**ECOFISIOLOGIA DOS EMBRIÕES E PLÂNTULAS DE *Mauritia Flexuosa*  
(ARECACEAE) E O ESTRESSE INDUZIDO PELA SECA**

Belo Horizonte/MG

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**UFMG**

Guilherme Pereira Dias

**ECOFISIOLOGIA DOS EMBRIÕES E PLÂNTULAS DE *Mauritia Flexuosa*  
(ARECACEAE) E O ESTRESSE INDUZIDO PELA SECA**

**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. Marcel Giovanni Costa França**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro**  
**Universidade Estadual de Montes Claros**

Belo Horizonte/MG

2024

043

Dias, Guilherme Pereira.

Ecofisiologia dos embriões e plântulas de *Mauritia Flexuosa* (Arecaceae) e o estresse induzido pela seca [manuscrito] / Guilherme Pereira Dias. – 2024.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcel Giovanni Costa França. Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro.

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

1. Ecofisiologia Vegetal. 2. Buriti. 3. Sementes. 4. Secagem. 5. Germinação. 6. Dormência (Ecologia). I. França, Marcel Giovanni Costa. II. Ribeiro, Leonardo Monteiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**DEFESA DE TESE**

**GUILHERME PEREIRA DIAS**

**Título**

**"Ecofisiologia dos embriões e plântulas de *Mauritia Flexuosa* (Arecaceae) e o estresse induzido pela seca"**

**Matrícula 2020668615**

**CPF 119.891.166-20**

Data da defesa: 29 de agosto de 2024

**Comissão Examinadora**

Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro (Unimontes)

Dra. Neusa Steiner (Wood Landscape Plant Germplasm Repository - USDA, Beltsville, USA)

Dr. Ailton Gonçalves Rodrigues Junior (Universidade Estadual Paulista " Júlio de Mesquita Filho" UNESP )

Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes ( UFMG -ICA)

Dr. Claudio José Barbedo (Instituto de Pesquisas Ambientais - IPA)

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2024.

Assinaturas dos membros da Comissão Examinadora

Assinatura da coordenação



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Monteiro Ribeiro, Usuário Externo**, em 29/08/2024, às 12:45, 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 **Neusa Steiner, Usuário Externo**, em 29/08/2024, às 13:38, 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 **Claudio José Barbedo, Usuário Externo**, em 29/08/2024, às 15:07, 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 30/08/2024, às 13:41, 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 **Paulo Sergio Nascimento Lopes, Chefe**, em 30/08/2024, às 18:48, 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 **Juliane Karine Ishida, Subcoordenador(a)**, em 04/09/2024, às 14:16, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3465088** e o código CRC **F70B670A**.

**Aos meus pais, Adenildo e Esmeralda.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, pelo dom da minha vida e por ser o meu guia, pela capacitação para entender um pouco sobre o vasto e fascinante mundo das plantas.

À minha mãe pelo cuidado e doçura e por sempre me incentivar a ir cada vez mais longe naquilo que acredito, transmitindo o seu amor.

Ao meu pai, pelo exemplo de caráter, honestidade e perseverança, além do incentivo e apoio.

Ao meu irmão e ao mesmo tempo padrinho, Herick, pela amizade, carinho, exemplo e pela motivação.

À minha noiva, Ana Paula, por ser a minha maior fonte de incentivo e carinho e por tornar essa trajetória mais leve e empolgante.

Aos amigos dos laboratórios LAR e LAV, da UNIMONTES, e do laboratório de Fisiologia Vegetal da UFMG, que levarei para sempre. Agradeço pela valiosa contribuição intelectual como parte importante da minha evolução profissional, pelos momentos de descontração, e especialmente, pelo apoio nos procedimentos de rotina experimental, vocês são a família que a carreira acadêmica me concedeu. Aos amigos, Higor Salvador, Rodrigo, Patricia, Anne Caroline, Claudiana, Petronílio, Amabilly, Adriano, Maria Júlia, Samira, Yasmin, Aldinéia, Felipe, Áurea e João Figueiredo, por tornarem essa trajetória mais divertida.

Ao PELD-VEREDAS, em especial a sua coordenadora, professora Yule Roberta, pela confiança e contribuições.

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

Ao professor Leonardo, pela dedicação, paciência, tempo e pelos importantes ensinamentos transmitidos desde a graduação. Admiro o grande profissional que o senhor é.

Ao professor Marcel, pela valiosa orientação, amizade e confiança em meu trabalho.

À professora Maria Olívia, pelas contribuições valiosas no campo da anatomia e histoquímica de plantas, que foram base para a minha formação.

À professora Hellen Cássia, que teve um papel fundamental para construção dos meus conhecimentos em botânica estrutural, uma excelente anatomista.

Ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelas imagens de microscopia eletrônica.

À Unimontes, em nome do professor Leonardo e da professora Hellen por cederem o espaço para trabalho nos laboratórios de Reprodução Vegetal e Anatomia Vegetal.

À Fapemig, e CAPES pela concessão de bolsa e incentivo financeiro aos projetos.

Ao programa de PPGBV-UFMG pela oportunidade de cursar um doutorado de excelência, com corpo docente inestimável.

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

## RESUMO

A palmeira neotropical *Mauritia flexuosa* (buriti ou aguaje) é de origem amazônica, porém, seus domínios se expandiram para o clima sazonal do Cerrado, em fitofisionomias alagadas, conhecidas como veredas. A espécie produz sementes que apresentam a associação de recalcitrância e dormência. Apesar da intolerância a dessecação, as sementes podem formar bancos persistentes (viáveis por mais de dois anos) em microambientes alagados de vereda, e manter um banco de plântulas em solos mais drenados. O buriti tem grande importância ecológica e socioeconômica, além de potencial de uso agroindustrial, mas encontra-se ameaçado pelas mudanças climáticas e ações antrópicas, que perturbam a estabilidade hídrica de seus habitats, especialmente no Cerrado. Devido a isso, desordens funcionais relacionadas à manutenção de sementes no solo, e ao estabelecimento de plântulas, fase mais vulnerável do ciclo de vida vegetal, podem comprometer a perpetuação da espécie. Como os mecanismos envolvidos na persistência de bancos de sementes recalcitrantes ainda são pouco compreendidos, o capítulo 1 desta tese teve como objetivo avaliar a resposta de embriões de *M. flexuosa* a estresses de déficit hídrico e saturação. O capítulo 2 teve como objetivo avaliar o efeito da seca sobre a dinâmica de reservas seminais e o desenvolvimento pós-germinativo na espécie. Embriões de *M. flexuosa* com teor de água típico de dispersão ou submetidos à hidratação foram expostos a potenciais hídricos moderados e severos ( $\Psi_w = 1,5$  MPa e  $\Psi_w = 2,1$  MPa), além de saturação de água ( $\Psi_w = 0$  MPa). Avaliações anatômicas, histoquímicas e ultraestruturais foram realizadas nos embriões, após 24 h. Estimativa de integridade de membrana, atividade de endo- $\beta$ -mananase e indicadores de estresse oxidativo (conteúdos de  $H_2O_2$  e MDA, atividade de CAT, SOD e APX) também foram avaliados. A estrutura do endosperma contribui para a manutenção da hidratação do embrião, enquanto reservas abundantes de mucilagem favorecem a resiliência à dessecação. A hidratação pós-dispersão torna os embriões menos vulneráveis ao estresse oxidativo, que é devido ao sistema antioxidante não enzimático. Tanto o estresse hídrico moderado quanto a absorção de água pós-dispersão induzem um aumento no metabolismo e na mobilização de reservas, o que indica que os ciclos de hidratação/desidratação podem favorecer a superação da dormência. Os embriões de *M. flexuosa* mostram resiliência ao déficit hídrico, e isso é crucial para a persistência das sementes no solo em ambientes sazonais, no entanto, a germinação bem-sucedida depende de alta hidratação, o que previne danos estruturais e fisiológicos. Plântulas tiveram o potencial hídrico determinado na parte aérea e haustório (limbo cotiledonar), e foram cultivadas sob estresse moderado ( $\Psi_w = -0.9$  MPa) e severo ( $\Psi_w = -2.1$  MPa), por 30 dias.

Para a caracterização da mobilização de reservas seminais e do estresse oxidativo, foram realizadas avaliações estruturais e fisiológicas, similares às dos embriões. O haustório tem papel central na resiliência de plântulas de *M. flexuosa* à desidratação, uma vez que, ajusta seu potencial hídrico, de modo a manter a absorção de água e nutrientes, mesmo em condições de baixa disponibilidade hídrica. Em condição de déficit hídrico, o haustório tem crescimento restrito e ocorre acúmulo de reservas parcialmente degradadas na zona de digestão, o que favorece a retenção de água na semente. A atividade de endo- $\beta$ -mananase se eleva no endosperma (rico em manano) adjacente ao embrião, sob estresse hídrico moderado, o que favorece a retenção de água pelo recrutamento de ósmólitos. Também sob estresse moderado, o desenvolvimento de raízes é priorizado em relação à parte aérea, o que contribui para manutenção de um status hídrico favorável. As plântulas apresentam sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos responsivos ao estresse hídrico, tanto na parte aérea quanto no haustório, que auxiliam na promoção da homeostase oxidativa. A resiliência das plântulas de *M. flexuosa* ao estresse hídrico envolve sofisticado ajuste na dinâmica de reservas e atuação de sistema antioxidante eficiente, o que contribui para seu sucesso reprodutivo e adaptação a ambientes sazonais.

**Palavras chave:** Ecofisiologia de sementes; Sensibilidade à dessecação; Germinação e dormência; estabelecimento de plântulas.

## ABSTRACT

The neotropical palm *Mauritia flexuosa* (buriti or aguaje) is of Amazonian origin; however, its range has expanded to the seasonal climate of the Cerrado, in flooded phytophysiognomies known as veredas. The species produces seeds that exhibit a combination of recalcitrance and dormancy. Despite their intolerance to desiccation, the seeds can form persistent banks (viable for more than two years) in the flooded microenvironments of veredas, and maintain a seedling bank in more drained soils. The buriti palm has great ecological and socioeconomic importance, as well as potential for agroindustrial use, but it is threatened by climate change and anthropogenic actions that disrupt the water stability of its habitats, especially in the Cerrado region. As a result, functional disorders related to seed maintenance in the soil and seedling establishment, the most vulnerable phase of the plant life cycle, may compromise the perpetuation of the species. Since the mechanisms involved in the persistence of recalcitrant seed banks are still not well understood, Chapter 1 of this thesis aimed to evaluate the response of *M. flexuosa* embryos to water deficit and saturation stresses. Chapter 2 aimed to assess the effect of drought on the dynamics of seed reserves and post-germinative development in the species. Embryos of *M. flexuosa* with typical water content for dispersal or subjected to hydration were exposed to moderate and severe water potentials ( $\Psi_w = 1.5$  MPa and  $\Psi_w = 2.1$  MPa), as well as water saturation ( $\Psi_w = 0$  MPa). Anatomical, histochemical, and ultrastructural evaluations were conducted on the embryos after 24 hours. Estimates of membrane integrity, endo- $\beta$ -mannanase activity, and indicators of oxidative stress ( $H_2O_2$  and MDA contents, and the activities of CAT, SOD, and APX) were also assessed. The structure of the endosperm contributes to the maintenance of the embryo's hydration, while abundant reserves of mucilage enhance resilience to desiccation. Post-dispersal hydration makes the embryos less vulnerable to oxidative stress, which is due to the non-enzymatic antioxidant system. Both moderate water stress and post-dispersal water absorption induce an increase in metabolism and the mobilization of reserves, indicating that hydration/desiccation cycles may favor the overcoming of dormancy. The embryos of *M. flexuosa* show resilience to water deficit, which is crucial for seed persistence in the soil in seasonal environments. However, successful germination depends on high hydration, which prevents structural and physiological damage. Seedlings had their water potential determined in the aerial part and haustorium (cotyledon blade), and were cultivated under moderate ( $\Psi_w = -0.9$  MPa) and severe ( $\Psi_w = -2.1$  MPa) stress for 30 days. For the characterization of the mobilization of seed reserves and oxidative stress, structural and physiological assessments

were conducted, similar to those of the embryos. The haustorium plays a central role in the resilience of *M. flexuosa* seedlings to dehydration, as it adjusts its water potential in order to maintain the absorption of water and nutrients, even under conditions of low water availability. Under drought conditions, the haustorium experiences restricted growth and there is an accumulation of partially degraded reserves in the digestion zone, which favors water retention in the seed. The activity of endo- $\beta$ -mannanase increases in the endosperm (rich in mannan) adjacent to the embryo under moderate water stress, which favors water retention through the recruitment of osmolytes. Also, under moderate stress, root development is prioritized over the aerial part, contributing to the maintenance of a favorable water status. The seedlings exhibit enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems responsive to water stress, both in the aerial part and in the haustorium, which assist in promoting oxidative homeostasis. The resilience of *M. flexuosa* seedlings to water stress involves a sophisticated adjustment in the dynamics of reserves and the action of an efficient antioxidant system, contributing to their reproductive success and adaptation to seasonal environments.

**Keywords:** Seed Ecophysiology; Desiccation Sensitivity; Germination and Dormancy; Seedling Establishment.

## SUMÁRIO

<b>Introdução Geral</b> .....	<b>16</b>
<b>Capítulo I: Water stress resilience in <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae) embryos: new insights into the persistence of recalcitrant seed banks</b>	
<b>Abstract</b> .....	<b>20</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>21</b>
<b>2. Materials &amp; methods</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1. Collection and preliminary procedures</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.2. Embryo water relations</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.3. Viability evaluation</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1.4. Definition of <math>\Psi_w</math> for cytological and physiological evaluations</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2. Cytological evaluations</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3. Physiological evaluations</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3.1. Membrane integrity estimation</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3.2 Evaluation of endo-<math>\beta</math>-mannanase activity</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4. Oxidative stress evaluation</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4.1. Quantification of hydrogen peroxide (<math>H_2O_2</math>)</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4.2. Evaluation of the antioxidant system enzymes activity</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4.3. Malondialdehyde (MDA) quantification</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5. Statistical analysis</b> .....	<b>29</b>
<b>3. Results</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Embryo water relations</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2. Viability and germination</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3. Anatomical evaluation</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4. Histochemical evaluation</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5. Ultrastructural evaluation</b> .....	<b>33</b>
<b>3.6. Micromorphometry</b> .....	<b>34</b>
<b>3.7. Estimation of the integrity of cell membranes</b> .....	<b>34</b>
<b>3.8. Activity of endo-<math>\beta</math>-mananase</b> .....	<b>35</b>
<b>3.9. Oxidative stress</b> .....	<b>35</b>
<b>4. Discussion</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1. Water dynamics in embryos under water stress</b> .....	<b>36</b>

4.2. <i>Structural, cytological and physiological responses of embryos to water stress</i> .....	37
4.3. <i>Effects of post-dispersal hydration on the response to water deficit and embryo metabolism</i> .....	39
<b>5. Conclusions</b> .....	41
<b>Author's contributions</b> .....	41
<b>Data availability</b> .....	41
<b>Acknowledgements</b> .....	42
<b>References</b> .....	42
<b>Figures</b> .....	50
<b>Capítulo II: A dinâmica de reservas seminais e o sistema antioxidante modulam a resiliência ao estresse hídrico em plântulas de <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae)</b>	
<b>Resumo</b> .....	69
<b>1. Introdução</b> .....	70
<b>2. Material e métodos</b> .....	71
2.1 <i>Coleta e procedimentos preliminares</i> .....	71
2.2. <i>Determinação do potencial hídrico de estruturas das plântulas</i> .....	72
2.3 <i>Avaliações biométricas e sobrevivência das plântulas</i> .....	73
2.4 <i>Definição dos <math>\Psi_{ws}</math> para as avaliações estruturais e fisiológicas</i> .....	74
2.5 <i>Avaliações estruturais</i> .....	74
2.5.1 <i>Avaliações anatômicas e histoquímicas</i> .....	74
2.6. <i>Avaliações fisiológicas</i> .....	75
2.6.1. <i>Avaliação da atividade de endo-<math>\beta</math>-mananase</i> .....	75
2.6.2. <i>Quantificação de peróxido de hidrogênio (<math>H_2O_2</math>)</i> .....	75
2.6.3. <i>Localização histoquímica in situ do radical ânion superóxido (<math>O_2^-</math>)</i> .....	76
2.6.4 <i>Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante</i> .....	76
2.6.5 <i>Quantificação do indicador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA)</i> .....	77
2.7. <i>Análise estatística</i> .....	77
<b>3. Resultados</b> .....	78
3.1. <i>Relações hídricas das plântulas</i> .....	78
3.2. <i>Biometria e sobrevivência das plântulas</i> .....	78
3.3. <i>Anatomia</i> .....	81
3.4. <i>Histoquímica</i> .....	82
3.5. <i>Atividade da endo-<math>\beta</math>-mananase</i> .....	83

<b>3.6. Localização histoquímica in situ do radical ânion superóxido (<math>O_2^-</math>)</b> .....	<b>83</b>
<b>3.7. Estresse oxidativo</b> .....	<b>83</b>
<b>4. Discussão</b> .....	<b>84</b>
<b>4.1. Dinâmica de mobilização de reservas seminais em condições de déficit hídrico</b> .....	<b>85</b>
<b>4.2. Respostas fisiológicas ao estresse oxidativo devido ao estresse hídrico</b> .....	<b>88</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>89</b>
<b>Referências</b> .....	<b>90</b>
<b>Figuras</b> .....	<b>98</b>
<b>Considerações finais</b> .....	<b>109</b>
<b>Referências</b> .....	<b>109</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Sementes recalcitrantes são intolerantes à dessecação e a baixas temperaturas e, representam cerca de 50% das sementes produzidas, por espécies de florestas tropicais (Marques et al., 2018). Estas sementes são dispersas com elevado teor de água e metabolicamente ativas e, comumente são programadas para iniciarem o processo germinativo após a dispersão (Berjak e Pammenter et al., 2007). Nestes casos, a rápida germinação previne danos celulares potencialmente letais e o estresse oxidativo, causados pela exposição temporal aos fatores ambientais (Berjak e Pammenter, 2013; Marques et al., 2018). Deste modo, são raras as espécies com sementes recalcitrantes que mantêm bancos persistentes no solo (Salvador et al., 2022), ou seja, viáveis por mais de um ano (um conceito de, Thompson et al., 1998 e Csontos and Tamás, 2003). Muito esforço tem sido empregado para aumentar a longevidade das sementes recalcitrantes (Berjak e Pammenter, 2013), isto é, manutenção da viabilidade em condições laboratoriais, *ex situ* (Rajjou e Debeaujon, 2008) por outro lado, existem poucos estudos sobre a manutenção *in situ* destas sementes, que é determinada por fatores intrínsecos e extrínsecos que definem o tempo de vida da semente em um banco de sementes no solo (Walters, 2015; Marques et al., 2018). Informações como estas, são valiosas para predizer os efeitos do clima, especialmente em espécies de ecossistemas tropicais, fortemente ameaçados pela elevação da temperatura global, e a irregularidade hídrica.

O buriti, *Mauritia flexuosa* L.f., (Arecaceae) é considerada a palmeira mais abundante do Brasil, de ocorrência em toda a Amazônia, Brasil Central, Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Piauí e São Paulo (Lorenzi et al. 2010). Suas grandes populações homogêneas ocorrem sobre terrenos baixos inundáveis e podem formar densos buritizais. Mesmo sendo uma espécie de adaptação restrita a ambientes úmidos, *M. flexuosa* é extremamente bem sucedida em relação à reprodução, tendo estendido sua distribuição para além da Amazônia, seu centro de origem, a ambientes pantanosos do bioma Cerrado (Lorenzi et al. 2010; Melo et al., 2018). As sementes apresentam a combinação de recalcitrância e dormência, o que é considerado um aspecto fisiológico raro (Tweddle et al., 2003; Silva et al., 2014). Entretanto, características de tolerância à dessecação foram observadas no embrião como, reservas simplásticas abundantes, especialmente proteicas (Velooso et al., 2016; Dias et al., 2020). Estudos ecofisiológicos recentes evidenciaram a capacidade de formação de banco de sementes persistentes pela espécie (Porto et al., 2018; Salvador et al., 2022), o que é uma

característica pouco compreendida entre espécies com sementes recalcitrantes (Tweddle et al., 2003; Obroucheva et al., 2016).

As palmeiras possuem grandes quantidades de reservas no embrião e endosperma, especialmente carboidratos, lipídios e proteínas, que são mobilizadas durante a germinação e o estabelecimento das plântulas (DeMason, 1985; Panza et al. 2004; Moura et al. 2010; Mazzottini dos Santos et al., 2017; Dias et al., 2020). Embora tenha sido descrito o processo de mobilização de reservas nas sementes recalcitrantes, ricas em heteromananos, do buriti (Silva et al., 2014; Moura et al., 2019; Dias et al., 2020), são escassos os estudos sobre os efeitos da seca durante o processo. A persistência de *M. flexuosa*, 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), especialmente nas veredas que são ambientes sensíveis à seca. Estudos sobre estratégias de propagação da palmeira e dos efeitos de mudanças climáticas sobre as sementes e plântulas podem subsidiar a definição de práticas adequadas de manejo, com vistas em sua conservação, e contribuirão para aumentar o conhecimento a respeito da ecofisiologia de sementes recalcitrantes.

Esta tese foi dividida em dois capítulos, onde foi detalhadamente descrita a resposta dos embriões e plântulas ao déficit hídrico, osmoticamente induzido. Os resultados apresentados neste estudo fornecem um modelo sólido para sementes recalcitrantes e plântulas de palmeiras em desenvolvimento inicial, sob o efeito da desidratação na estrutura celular embrionária e na fisiologia, bem como, o processo de mobilização de reservas seminais.

## Capítulo I

**Water stress resilience in *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) embryos: new insights into the persistence of recalcitrant seed banks \***

\*Artigo publicado no periódico Environmental and Experimental Botany.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2024.105930>

## **Water stress resilience in *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) embryos: new insights into the persistence of recalcitrant seed banks**

Guilherme Pereira Dias <sup>a</sup>, Leonardo Monteiro Ribeiro <sup>b</sup>, Hellen Cássia Mazzottini dos Santos <sup>b</sup>, Yule Roberta Ferreira Nunes <sup>b</sup>, Marcel Giovanni Costa França <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*

<sup>b</sup> *Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Rui Braga, Vila Mauricéia, 39401-089, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil*

### **Highlights**

*Mauritia flexuosa* embryos are dispersed hydrated and are sensitive to dehydration

The endosperm structure and mucilaginous reserves promote resilience to dehydration

Post-dispersal hydration and moderate water deficit increase embryo metabolism

Mixed phenolic compounds contribute to mitigating oxidative stress

Hydration/dehydration cycles possibly favor overcoming seminal dormancy

## Abstract

The neotropical palm *Mauritia flexuosa* produces seeds that show the association between recalcitrance and dormancy. Despite the intolerance to desiccation, the seeds can maintain persistent banks in flooded environment soils (veredas) in the Cerrado biome. As the mechanisms involved in the persistence of recalcitrant seed banks are still poorly understood, the objective of this work was to evaluate the response of *M. flexuosa* embryos to water deficit and saturation stresses. Embryos of *M. flexuosa* with water content typical of dispersion or subjected to hydration were exposed to moderate and severe water potentials ( $\Psi_w = -1.5$  MPa and  $\Psi_w = -2.1$  MPa), in addition to water saturation ( $\Psi_w = 0$  MPa). Anatomical, histochemical and ultrastructural evaluations were performed on the embryos after 24h. Membrane integrity estimation, endo- $\beta$ -mannanase activity and oxidative stress indicators ( $H_2O_2$  and MDA contents, CAT, SOD and APX activity) were also evaluated. The endosperm structure contributes to the maintenance of embryo hydration, while abundant mucilage reserves favor resilience to desiccation. Post-dispersal hydration makes embryos less vulnerable to oxidative stress, which is due to the non-enzymatic antioxidant system. Both moderate water stress and post-dispersal water absorption induce an increase in metabolism and the mobilization of reserves, which indicate that hydration/dehydration cycles can favor overcoming dormancy. *M. flexuosa* embryos show resilience to water deficit, and that is crucial for the persistence of seeds in the soil in seasonal environments, however, successful germination is dependent on high hydration, which prevents structural and physiological damage.

**Keywords:** Germination and dormancy; Oxidative stress; Palm seeds; Seed ecophysiology; Sensitivity to desiccation

## 1. Introduction

Recalcitrant seeds dispersed with high water contents, do not tolerate dehydration below a certain limit ( $0.33 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$ ), which compromises their ability to maintain seed banks in the soil, their use in propagation and the conservation of genetic resources (Hoekstra et al., 2001; Obroucheva et al., 2016; Marques et al., 2018). The loss of viability in these seeds, when dehydrated, is usually related to changes in the plasticity of cell walls (Woodenberg et al., 2015; 2018) and lipid peroxidation of membranes, due to oxidative stress (imbalance between production and removal of reactive oxygen species ROS) (Bailly, 2004; Berjak and Pammenter, 2007). There is great variability in terms of desiccation sensitivity and longevity among recalcitrant seeds, and this is due to structural and cytological particularities, the degree of maturation during dispersion and the efficiency of the antioxidant system (Varghese et al., 2011; Subbiah et al., 2019). Despite advances in research in recent decades, knowledge about the cytological and physiological responses of recalcitrant seed embryos to water stress is still limited, especially for neotropical tree species (Marques et al., 2018).

In regions with seasonal tropical climates, soils commonly go through cycles, with alternation between high precipitation and drought that usually cause water stress (WS), either due to lack or excess of water for the seeds incorporated into the soil seed bank (Baskin and Baskin, 2014; Gonçalves et al., 2020). Oxidative stress due to WS is often fatal to recalcitrant seeds. However, if controlled by enzymatic pathways, especially by catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) activity, and non-enzymatic pathways, oxidative stress can generate ROS levels capable of inducing metabolic responses related to mobilization of reserves (Bailly, 2004; Wojtyla et al., 2016; Dias et al., 2018), dormancy control (Bewley et al., 2013) and tolerance to abiotic stresses (Huang et al., 2008; Ozfidan et al., 2012). This way, the control of oxidative stress in recalcitrant seeds is crucial, both for their persistence in the soil and for germination control, which directly affects the dynamics of seed banks.

*Mauritia flexuosa* L. f. (buriti or aguaje) is widely distributed in tropical South America and is the most abundant palm in Brazil, occurring in the Amazon biome and in the Cerrado, in wetlands known as veredas (Silva et al., 2014; Melo et al., 2018). The species has ecological and socioeconomic importance, as well as agro-industrial potential (Lorenzi et al., 2010; Horn et al., 2012; Endress et al., 2013). The seeds of *M. flexuosa* show the combination of recalcitrance and dormancy, which is a rare physiological aspect among angiosperms

(Tweddle et al., 2003; Silva et al., 2014; Veloso et al., 2016), but which has been identified in several species of *Arecaceae* (Jaganathan, 2021). Trait associated with resistance to desiccation were observed in the embryo, such as slow dehydration and abundant symplastic reserves, especially protein and mucilage (Veloso et al., 2016; Dias et al., 2020). Recent studies have shown the ability of *M. flexuosa* to form a persistent seed bank (Porto et al., 2018; Salvador et al., 2022), in which seeds can remain viable for more than a year (a concept from Thompson et al., 1998 and Csontos and Tamás, 2003). This characteristic indicates a peculiarity between species with recalcitrant seeds (Tweddle et al., 2003; Marques et al., 2018), and raises questions about long-term resilience strategies.

In the seasonal climate of the Cerrado, the veredas show fluctuations in the soil water content, which favors the formation of xeric to hydromorphic microenvironments (Porto et al., 2018) (Fig.1). As *M. flexuosa* seeds are sensitive to desiccation, this variation in water availability can impose stressful or even lethal conditions (Gonçalves et al., 2020; Salvador et al., 2022). Contrastingly, water variation in the soil can act as a signal for metabolism activation related to overcoming seed dormancy (El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008; Porto et al., 2018). Understanding the response of *M. flexuosa* embryos to WS may contribute knowledge expansion about the biology of recalcitrant seeds, in addition to providing insights for the conservation of flooded environments, which are threatened by local anthropization and global climate change.

The objective of this research was to evaluate the response of *M. flexuosa* embryos to stresses of water deficit and excess, simulated experimentally. The following questions were addressed: 1) What are the water dynamics like in embryos under water stress? 2) What are the structural, cytological and physiological responses of embryos to stress? 3) What are the effects of post-dispersal hydration on embryos regarding metabolism and stress responses?

## **2. Materials & methods**

### *2.1. Collection and preliminary procedures*

Freshly dispersed fruits of *M. flexuosa* were collected in May 2020, in a natural population, located in the Environmental Protection Area of Rio Pandeiros, municipality of Bonito de Minas, Minas Gerais, Brazil (15°19'49.70"S; 44°57'20.20"O). The fruits were collected from the ground, after natural abscission, from more than 100 individuals, arranged along a route of

approximately 2000m. The yellowish abscission scar was considered as indicative of recent dispersion.

The fruits were stored in water for three days and were pulped, with the aid of a high-pressure washer (Powerwash Eco EWS30, Electrolux, Sweden). Seeds obtained that showed with signs of deterioration by microorganisms and/or insect predation were discarded. The selected seeds were disinfected with a 6% sodium hypochlorite solution for 15 min, washed three times in running water and treated with a 2% fungicide solution (Derosal plus, Bayer). The water content was determined in 5 replications of 10 seeds, using the oven method, comparing their fresh and dry weights after dehydration at 105°C for 24 h (Brasil, 2009); the results were expressed on a dry basis. The viability of the lot was evaluated by the germination test in 5 replications of 10 seeds, which had the operculum removed to overcome dormancy (Silva et al., 2014), under aseptic conditions, and grown in plastic containers (17 cm x 12 cm x 6 cm) with lid, containing autoclaved sand moistened at 80% of field capacity. The material was kept in a germination chamber (EL 202/4, Eletrolab, São Paulo, Brazil), at 30°C, in the dark (Silva et al., 2014; Dias et al., 2020). The protrusion of the cotyledonary petiole was considered as a morphological indicator of germination (Ribeiro et al., 2011).

After preliminary tests, the seeds were stored in impermeable polyethylene bags (400µm thick), in a cold room at 20°C (conditions that allow the maintenance of the physiological status of the seeds, Veloso et al., 2016) for up to 30 days, until the beginning of the experiments.

### 2.1.2. Embryo water relations

*Mauritia flexuosa* is a basal palm belonging to the subtribe Mauritiinae, subfamily Calamoidae (Dransfield et al., 2008; Reis et al., 2017). The species has a papyraceous and thin endocarp. After fruit abscission, the oleaginous mesocarp and the endocarp are quickly consumed by dispersers and the isolated seed persists in the environment, consisting of the secondary dispersal unit. Dormant seeds incorporated into the seed bank, are subject to water cycles in the soil, inducing water saturation or scarcity (WS) in seeds (Fig.1). Considering this dynamic, we evaluated the response to WS in isolated embryos. Embryos from newly dispersed seeds were also considered ‘newly dispersed’, while newly dispersed embryos submitted to immersion in ultrapure water for 24 h were considered ‘hydrated’, and this terminology will be used from here on. The water content of newly dispersed or hydrated

embryos was determined, as previously described, by the oven method (Brasil, 2009), in 5 replicates of 10 embryos.

For the determination of water potential ( $\Psi_w$ ) and simulation of WS conditions, newly dispersed or hydrated embryos were immersed in different osmotic solutions prepared with polyethylene glycol 6000 (PEG 6000), an inert, non-toxic osmotic agent that does not penetrate in cell membranes (Michel and Kaufman, 1973). The PEG 6000 concentrations were adjusted to provide  $\Psi_w = 0, -0.3, -0.6, -0.9, -1.2, -1.5, -1.8$  and  $-2.1$  MPa - potentials that occur in soils ranging from waterlogged to extremely dry, according to Kirkham (2005). Embryos were kept in the dark at 25°C, as a reference temperature (Michel and Kaufman, 1973). The fresh weights of the embryos were measured in the initial condition and after 6, 12 and 24 h of immersion in the osmotic solutions, using 5 replicates of 10 embryos for each concentration of PEG 6000. Water absorption curves were prepared. The  $\Psi_w$  was estimated at each evaluated time interval, by adapting the quadratic equation, considering that the absence of water flow indicates  $\Psi_w \text{ embryo} = \Psi_w \text{ solution}$  (Gonçalves et al., 2020).

### 2.1.3. Viability evaluation

After 24 h of immersion of the embryos in the osmotic solutions, the tetrazolium test was used to assess viability. The embryos were immersed in a 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride solution for 4 h, in the absence of light at a temperature of 35 °C, and viability was defined by staining patterns (Spera et al., 2001; Ribeiro et al., 2010). Additionally, the embryonic respiratory activity was estimated after the period of immersion in tetrazolium. Five mL of 95% alcohol were added to each tube containing the embryos and the material remained incubated for 15 days, at 10°C, for triphenylformazan extraction. A 3 mL aliquot was taken from the solution and analyzed in a spectrophotometer (Uv-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan), at 490nm (Serksen et al., 2016). The absorbance values obtained were adjusted, considering a blank prepared using boiled dead embryos. The dry mass of the embryos was obtained after dehydration in a forced air circulation oven and the results expressed in absorbance  $\text{g}^{-1}$  DM.

Intact seeds were immersed in solutions with the same water potential applied to embryos and germination was evaluated. For analyzes corresponding to newly dispersed embryos, intact seeds were submerged in osmotic solutions for 10 days. After this period, to overcome dormancy, the operculum was removed and the seeds were cultivated, as described in the

preliminary evaluations of the seed lot. Moreover, the seeds had the operculum previously removed and were cultivated immersed in ultrapure water for 3 days to induce extra water absorption and change in the embryos water status. After this period, the seeds were submerged in the same osmotic solutions for 10 days and transferred to conventional cultivation conditions. In both conditions, germination was evaluated after seven days (Silva et al., 2014) and embryos from non-germinated seeds were submitted to the tetrazolium test.

#### *2.1.4. Definition of $\Psi_w$ for cytological and physiological evaluations*

For the cytological and physiological evaluations described hereinafter, the following were selected: the  $\Psi_w=0$ , applied to hydrated embryos and the  $\Psi_w$  capable of providing moderate and severe WS (Gonçalves et al., 2020, adapted). We considered the hydration curves of the embryos after application of osmotic treatments (Fig. 3A-B) and the results of the viability test (Fig. 3C). Moderate WS was considered to be that which induced reduction in water capacity, i.e., ability of newly dispersed embryos to absorb water and hydrated embryos to retain water (Fig. 3A-B), combined with a reduction in viability to average levels close to 60% (Fig. 3C). Severe WS was considered to be that which caused a reduction in viability to approximately 30%. Therefore, both for newly dispersed and hydrated embryos, the  $\Psi_w$  that provided moderate and severe WS were, respectively, -1.5 and -2.1 MPa.

#### *2.2. Cytological evaluations*

For each of the described treatments, cubic fragments (3 mm edges) of the median portion of the haustorium (Fig. 2A) were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965), dehydrated in an ethylic series and included in (2-hydroxyethyl) methacrylate (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), according to Paiva et al. (2011). Cross-sections (5  $\mu\text{m}$  thick) were obtained using a rotating microtome and stained with 0.05% toluidine blue, pH 4.7 (O'Brien et al., 1964, modified); the slides were mounted in acrylic resin (Itacril, Itaquaquecetuba, Brazil).

Histochemical tests were performed with periodic acid and Schiff's reagent (PAS) (Feder and O'Brien, 1968), to identify polysaccharides; choriphosphine, under UV light (Weis et al., 1988), for pectins; Xilidine-Ponceau (Vidal, 1970), for proteins; Fehling's reagent (Sass, 1951), for reducing sugars; neutral red, under UV light (Kirk, 1970), for lipids and ferric

chloride (Johansen, 1940) for identification of phenolic compounds. The sections were evaluated under a photomicroscope (Scope A1/Axiocam 105 Color, Zeiss, Jena, Germany).

For transmission electron microscopy analyses, cubic fragments (2 mm edges) from the median region of the haustorium, including the protoderm and adjacent ground meristem, were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965) for 24 h, transferred to phosphate buffer of sodium, 0.1 M, pH 7.3 and kept at 8 °C. The material was post-fixed in 1% osmium tetroxide, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 (Roland, 1978). Ultrathin cross sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a transmission electron microscope (TEM) (Tecnai G2-12-Spirit TEM, Philips/FEI CoMPany, Netherlands), at 80 kV.

Micromorphometric evaluations were carried out on haustorium fragments from 10 embryos from each treatment, processed as described for histochemical evaluations. In cross-sections, the area of 10 randomly selected cells was evaluated in each of 4 regions: protoderm; outer layer of ground meristem; lateral ground meristem and central ground meristem (Fig. 9A). The evaluations were performed using image analysis software (Zen, Zeiss, Jena, Germany).

### *2.3. Physiological evaluations*

#### *2.3.1. Membrane integrity estimation*

Four replicates of 10 embryos from each treatment were immersed in ultrapure water for 4 h and kept in a germination chamber at 30°C. Electrolyte release was evaluated by means of quantification of electrical conductivity, using a conductivity meter (AKSO, AK83, São Leopoldo, Brazil), according to the methodology adapted from Gomes-Copeland et al. (2012). Results were expressed on the basis of dry mass.

#### *2.3.2. Evaluation of endo- $\beta$ -mannanase activity*

Endo- $\beta$ -mannanase is the main enzyme involved in the mobilization of mannans, the most abundant carbohydrates in the cell walls of palm seeds (Buckeridge et al., 2000; Buckeridge 2010). The enzyme activity was evaluated, considering the possible role in cell wall

carbohydrate dynamics in the response to WS and/or the activation of developmental pathways related to germination. For each treatment, 5 mg samples were obtained from 4 replicates of 5 haustoria each. Evaluations were performed according to the protocol established by Pinho et al. (2014). The samples were macerated with a crucible and homogenized in 1 mol L<sup>-1</sup> sodium acetate buffer. The material was centrifuged for 45 min at 16,000 g at 4 °C. The supernatant was removed, added to the Locust Bean Gum Galactomannan 0.25% solution (Sigma, USA) prepared in 0.1 mol L<sup>-1</sup> of sodium acetate buffer pH 4.7 and maintained in a thermostatic bath with magnetic stirring (SI-153, Solab, Piracicaba, Brazil), at 40 °C, for 3 h. The sugars formed from hydrolysis were subjected to a 0.5% (w/v) solution of hydroxydobenzoic acid - acid hydrazide (Sigma, USA), 5% (w/v) prepared in an acid medium HCl 0.5 mol L<sup>-1</sup> and diluted in NaOH 0.5 mol L<sup>-1</sup>; the mixture was kept for 5 min in a thermostatic bath at 95 °C. In the solution used to eliminate interferences from the extract that react with acid hydrazide (white), Locust Bean Gum Galactomannan (Sigma, USA) was not added. Readings were performed in a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) at 398 nm. The results obtained from the calibration curve were converted into  $\mu\text{M}$  equivalent of reducing sugars  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FM}$ .

#### *2.4. Oxidative stress evaluation*

##### *2.4.1. Quantification of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )*

Four replicates of 30 mg of embryos from each treatment were macerated in liquid nitrogen. In 2 mL Eppendorf tubes, 400  $\mu\text{L}$  of trichloroacetic acid (TCA) 0.1% (w/v) were added. The plant extract was homogenized in a vortex for 1 min and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C. A 250  $\mu\text{L}$  aliquot of the supernatant was extracted and added to 250  $\mu\text{L}$  of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) and 1000  $\mu\text{L}$  of 1 M potassium iodide. The tubes with the solution were placed on ice in the dark for 1 h. Samples remained in the dark at room temperature for 20 min for reaction stabilization, and were analyzed in a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) at 390 nm. The amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was expressed in  $\text{mM g}^{-1} \text{FM}$ , based on a pre-established standard curve (Alexieva et al., 2001).

##### *2.4.2. Evaluation of the antioxidant system enzymes activity*

Four replicates of 20 mg of embryos from each treatment were obtained after maceration in liquid nitrogen. The plant extract was homogenized in polyvinylpyrrolidone (PVPP) 10% m/v, 500  $\mu$ L of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, 10  $\mu$ L of 100  $\mu$ M edetic acid (EDTA) and 490  $\mu$ L of deionized water, in vortex, for 1 min. The extracts were centrifuged at 10,000 g, at 4°C, for 15 min. Catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) activity were evaluated in 100  $\mu$ L of the supernatant.

SOD activity was determined by adding the extract to a solution containing 13mM methionine, 75 $\mu$ M nitroblue tetrazolium (NBT), 100 $\mu$ M EDTA, 2 $\mu$ M riboflavin and 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8. The tubes were illuminated in chambers composed of 15 W fluorescent tubes at 25°C. After 10 min of incubation, activity termination was determined by light interruption. Control reactions were kept in the dark for 10 min. The blue formazan compound was analyzed in a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) at 575 nm. One SOD unit was defined as the amount of enzyme required to inhibit 50% of NBT photoreduction. Results were demonstrated in U min  $\text{mg}^{-1}$  protein (Giannopolitis and Ries, 1977).

To determine the CAT activity, the extract was added to a 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, with freshly prepared H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added (12.5 mM) at the time of analysis. The analysis was performed in a spectrophotometer at 240 nm for 1 min. CAT activity was estimated using the molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) equal to 39.4  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Cakmak and Horst, 1991) and the results were expressed in  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein.

APX activity was determined by adding the extract to potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) and, at the time of analysis, 0.25 mM ascorbate and 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The ascorbic acid oxidation rate was monitored for 1 min, recording the absorbance values at 290 nm every 10 s in a spectrophotometer. APX activity was determined using  $\epsilon$  equal to 2.8  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , and the results were expressed in  $\mu\text{M ascorbate min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein (Nakano and Asada, 1981).

#### 2.4.3. Malondialdehyde (MDA) quantification

Four replicates of 30 mg of embryos from each treatment were macerated in liquid nitrogen and added to 1.5 mL of trichloroacetic acid (TCA) 0.1% (w/v). After vortexing for 1 min, the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 15 min. A 1 mL aliquot of the supernatant was added

to a 3 mL aliquot of a 0.5% (w/v) thiobarbituric acid solution prepared in 20% TCA. The solution remained for 60 min at 95 °C and then cooled on ice for 10 min. The samples were analyzed in a spectrophotometer at wavelengths of 532 and 660 nm. Interfering elements were eliminated by subtracting the values obtained at 532-660 nm and the amount of MDA was expressed in  $\text{nM g}^{-1}$  FM (Health and Packer, 1968, adapted).

### 2.5. Statistical analysis

Data were evaluated in a factorial scheme, considering factor A, as the  $\Psi_w$  employed, and factor B as the hydric status of the newly dispersed or hydrated embryo. Means were submitted to analysis of variance and, when significant differences were found, they were compared using the Duncan test ( $P \leq 0.05$ ). Biochemical data for newly dispersed or hydrated embryos were subjected to Spearman correlation analysis ( $P \leq 0.05$ ). The R software version 4.2.2 (Easynova package, version 8.0) was used.

## 3. Results

The *M. flexuosa* seed lot showed 100% germination, in eight days, after mechanical removal of the operculum (treatment to overcome dormancy). The seeds were dispersed with a water content of 48.7% ( $0.95 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$ ).

### 3.1. Embryo water relations

The newly dispersed seeds of *M. flexuosa* are globose and have a dark brown and thin seminal envelope, which covers the abundant and whitish endosperm with distinct shades between the peripheral and lateral portions (Fig. 2A). The endosperm completely surrounds the embryo, which is located in the micropylar region and adhered to the operculum. The embryo is divided into two regions: the yellowish proximal one, corresponding to the cotyledonary petiole, and the whitish distal one, corresponding to the haustorium (cotyledonary blade). The dry mass of the whole seed is 6.41 g and the dry mass of the isolated embryo is 0.012 g. Thus, the embryo represents 0.2% of the dry mass of the seed.

Freshly dispersed embryos had  $4.44 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$  and, when subjected to  $\Psi_w = 0 \text{ MPa}$  for 24 h, increased water content to  $7.12 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$  (Fig. 2B). With the gradual reduction of the  $\Psi_w$  of the osmotic solutions, there was a reduction in the water absorption capacity of the newly dispersed embryos, however, even in the embryos subjected to  $\Psi_w = -0.9 \text{ MPa}$ , it was possible to observe increases in the water content (Fig. 3A). Reductions in the water content of newly dispersed embryos occurred after treatment with  $\Psi_w = -1.2 \text{ MPa}$ , and the osmotic solution capable of providing severe stress  $\Psi_w = -2.1 \text{ MPa}$  induced a reduction in water content in the embryo to  $2.72 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$  after 24 h.

Embryos hydrated and submitted to  $\Psi_w = 0 \text{ MPa}$ , for another 24 h, markedly increased the water content (gain of  $2.93 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$ ) which provided hyperhydration between 12 and 24 h of immersion (Fig. 3B). All applied  $\Psi_w$  caused a reduction in water content in hydrated embryos, however, in the cases of application of  $\Psi_w = -0.3$  and  $-0.6 \text{ MPa}$ , there was water absorption and partial recovery of water status, from 12 h of immersion. When  $\Psi_w = -2.1 \text{ MPa}$  was applied, the intensity of reduction in water content of the hydrated embryo was lower between 6 and 12h, when compared to the effects of  $\Psi_w = -1.5$  and  $-1.8 \text{ MPa}$ . However, after this period, the reduction in water content was intensified in embryos submitted to  $\Psi_w = -2.1 \text{ MPa}$ .

The  $\Psi_w$  of the newly dispersed embryo increased by 22% between 6 and 24h, with an average between the evaluated times, equal to  $-1 \text{ MPa}$  (Fig. 3A). Hydration promoted an increase of about 90% in the  $\Psi_w$  of the embryos, which reached  $-0.09 \text{ MPa}$ , after 24 h (Fig. 3B).

### 3.2. Viability and germination

Both in newly dispersed and hydrated embryos, viability began to reduce after the application of  $\Psi_w = -1.5 \text{ MPa}$ , with an approximate average of 60%, with no difference between conditions (Fig. 3C). Viability was reduced to about 30%, in embryos with both water status, with the application of  $\Psi_w = -2.1 \text{ MPa}$ . Freshly dispersed embryos showed greater viability, when compared to hydrated ones, when submitted to  $\Psi_w = 0, -0.9$  and  $-1.2 \text{ MPa}$ .

Embryonic respiratory activity gradually decreased in newly dispersed embryos, from the application of  $\Psi_w = -1.5 \text{ MPa}$  (Fig. 3D). In the case of hydrated embryos, embryonic

respiration was reduced only when they were subjected to severe stress. Freshly dispersed embryos, compared to hydrated ones, maintained higher respiratory rates after treatments with  $\Psi_w = 0, -0.3, -0.6$  MPa. The opposite occurred in embryos subjected to  $\Psi_w = -1.8$  MPa, a situation in which the respiratory rate was higher for hydrated embryos.

Freshly dispersed seeds showed 100% germination when cultivated with pure water, and there was a reduction in the germination rate to 38%, when they were cultivated in osmotic solutions with  $\Psi_w = -1.5$  and  $-2.1$  MPa (Fig. 3E). In the case of previously hydrated seeds, the percentage of germination reduced when subjected to  $\Psi_w = -1.5$  MPa, remaining similar to newly dispersed seeds. However, when osmotic solution that induced severe stress was used, the germination percentage dropped dramatically, with an average of 7.5%. Thirty and 20% of the newly dispersed seeds, respectively, did not germinate when subjected to  $\Psi_w = -1.5$  and  $-2.1$  Mpa. However, 80 and 50% of the embryos from these seeds showed viability (respectively to  $\Psi_w = -1.5$  and  $-2.1$ ), when evaluated by the tetrazolium test. The other seeds, freshly dispersed or hydrated, that did not germinate showed a deteriorated embryo, a condition that prevented the evaluation of viability by the tetrazolium test, therefore, they were considered dead after going through the water deficit.

### *3.3. Anatomical evaluation*

The newly dispersed embryos presented radially elongated protodermal cells, juxtaposed, and with evident nuclei (Fig. 4A). Two to three layers of subprotodermal cells in the ground meristem were hyaline; the other cell layers showed a voluminous vacuole containing mucilage with a floccular appearance, peripheral extravacuolar cytoplasm and the intercellular spaces were inconspicuous (Fig. 4 A-B). In embryos subjected to moderate stress ( $\Psi_w = -1.5$  Mpa), there was vacuolation in the cells of the lateral ground meristem, indicating mobilization of reserves and the cell walls showed sinuosity (Fig. 4C). In the central region of the ground meristem, there were no evident cellular alterations (Fig. 4D). When the embryos were subjected to severe stress ( $\Psi_w = -2.1$  Mpa) the cells of the protoderm and underlying ground meristem showed sinuosity in the cell wall, and only a few cells of the ground meristem showed vacuolation (Fig. 4E) and the stored content remained preserved (Fig. 4F).

Hydrated embryos showed sinuosity in the cell walls of the protoderm cells and partial mobilization of reserves (Fig. 4G-H). In response to moderate and severe stress in hydrated embryos, there was mobilization of reserves stored in ground meristem cells (Fig. 4I-L) and

accumulation of droplets with mixed content (phenolic compounds and mucilages) in the vacuoles (Fig. 4I, K). Severe stress induced sinuosity in the cell walls of the protoderm and lateral ground meristem (Fig. 4K). Embryos that underwent hyperhydration showed disruption of the cell wall with extravasation of contents into the intercellular space in the ground meristem (Fig. 4M). Reserve material in the vacuoles was scarce and was usually associated with mixed phenolic compounds (Fig. 4M-O).

### 3.4. Histochemical evaluation

The newly dispersed *M. flexuosa* embryos showed mixed reserve content composed of proteins and carbohydrates in the protoplast of the protoderm cells and in the vacuoles of the ground meristem cells (Fig. 5A-D). Some cells of the lateral ground meristem, close to the protoderm, showed vacuolation indicating mobilization of proteins (Fig. 5A) and cell walls composed of carbohydrates (Fig. 5C-D). In the haustorium of newly dispersed embryos subjected to moderate stress ( $\Psi_w = -1.5$  MPa) no obvious changes were observed in relation to protein reserves (Fig. 5E-F). Carbohydrates were mobilized in some layers of the lateral ground meristem, underlying the protoderm; cell walls presented sinuosities (Fig. 5G), and no alterations were observed in the central region of the ground meristem (Fig. 5H). In embryos submitted to severe stress ( $\Psi_w = -2.1$  MPa) the configuration of the reserves remained similar in comparison with the newly dispersed embryos (Fig. 5I-L), however, the protoplasts underwent retraction (Fig. 5I) and cell walls were sinuous (Fig. 5K).

Hydration of the embryos promoted partial mobilization of reserves, accumulation of mixed protein and carbohydrate compounds in association with phenolic compounds (Fig. 5M-P) and cell wall sinuosities (Fig. 5O-P). All treatments to which the hydrated embryos were submitted induced mobilization of reserves and accumulation of phenolics associated with proteins and carbohydrates (Fig. 5Q-B1). The exception was observed in embryos subjected to moderate stress, in which mixed carbohydrates with phenolics did not occur and the cell walls showed sinuosity (Fig. 5S-T). In the hydrated embryos that remained in the water, there was disruption of the cell wall in the fundamental meristem and leakage of the contents into the intercellular space (Fig. 5 A1-B1).

The newly dispersed embryos did not show accumulation of phenolic compounds (Fig. 6A) and reducing sugars (Fig. 6B). Pectins were labeled as structural components in protodermal cell walls and ground meristem (Fig. 6C). With the application of moderate

stress, there was no labeling of phenolics (Fig. 6D), but reducing sugars and pectins were present in ground meristem cells (Fig. 6E-F). In embryos subjected to severe stress there was no identification of phenolic compounds and reducing sugars (Fig. 6G-H), but pectic cell walls showed sinuosity (Fig. 6I). All treatments applied to hydrated embryos promoted the accumulation of phenolics conjugated with reducing sugars and pectins (Fig. 6J-U). Lipids were not detected by the neutral red test in any of the evaluated conditions.

### 3.5. Ultrastructural evaluation

In newly dispersed embryos, the protoderm showed cells with an outer periclinal wall thicker than the others, and plasmodesmata connecting adjacent cells (Fig. 7A-B). The protoplast was poor in organelles, containing mitochondria with poorly developed cristae, reduced vacuoles and dispersed lipid droplets. The cytoplasm was filled with floccular mucilages and small vesicles were present on the periphery of the cell. Ground meristem cells presented a voluminous vacuole containing mucilage (Fig. 7C). The extravacuolar cytoplasm was not very dense and restricted to a narrow band containing some plastids and lipid droplets (Fig. 7C, D). In newly dispersed embryos submitted to moderate stress ( $\Psi_w = -1.5$  Mpa), the external periclinal cell wall of the protoderm presented layers with different electron densities, and there was an accumulation of vesicles in the periplasmic space and in the periphery of the cytoplasm (Fig. 7E). The cytoplasm was dense, rich in organelles, especially mitochondria with developed cristae and plastids that predominantly occurred around the nucleus (Fig. 7F-G). Small vacuoles containing reserve remnants were commonly flanked by lipid droplets (Fig. 7G). In the ground meristem it was possible to observe cell wall sinuosities (Fig. 7H), the formation of vacuoles and the presence of small mitochondria and proplastids in the periphery of the cytoplasm and around the nucleus (Fig. 7I-J). Severe stress ( $\Psi_w = -2.1$  MPa) caused major changes in the embryo cells (Fig. 7K-S), especially the strong retraction of the plasma membrane, with accumulation of substances in the periplasmic space (Fig. 7K, P), conspicuous sinuosity in the cell wall (Fig. 7M, P, S), dense, peripheral cytoplasm and accumulation of phenolic compounds in the vacuoles (Fig. 7 K, L, N, S). The nucleus presented a destructured envelope (Fig. 7K-L).

In hydrated embryos, there was a reduction in the reserve content, with evidence of mobilization, associated with plasma membrane retraction, and accumulation of substances in the periplasmic space (Fig. 8A-B). Lipid droplets and plastids with lipid accumulation

occurred around the nucleus, and amyloplasts were dispersed in the cytosol. In the cells of the ground meristem there was a slight retraction of the membrane; plastids, lipid droplets, and numerous vesicles occurred at the cell periphery, and phenolic compounds were present in the vacuole (Fig. 8C-D). Embryos hydrated and subjected to moderate and severe stress, in general, contained less stored reserve content compared to cells from freshly dispersed embryos (Fig. 8 E-P), however, vacuolization and accumulation of phenolic compounds were observed (Fig. 8H, L, N, O). The greatest structural deleterious effects were related to cell wall sinuosity (Fig. 8E) and damage to the plasma membrane with protoplast retraction (Fig. 8F, I, K). Severe stress caused disruption of the nuclear envelope of protodermal cells (Fig. 8I, M).

In hyperhydrated embryos, protoderm cells showed enhanced metabolic activity (Fig. 8Q-R). Many vesicles, mitochondria, amyloplasts and endoplasmic reticulum were observed close to the prominent nucleus. In the ground meristem cells there were phenolic compounds stored in the hyaline vacuole and some vesicles were also observed (Fig. 8S-T). Starch grains and lipid droplets occurred in the peripheral cytoplasm.

### 3.6. *Micromorphometry*

The cross-sectional areas of the haustorium protoderm cells did not show variations in the embryos evaluated in the two water statuses, freshly dispersed or hydrated, after being submitted to different values of  $\Psi_w$  ( $M= 533.33 \mu\text{m}^2$ ;  $P= 0, 5766$ ) (Fig. 9A). The same occurred in the cells of the lateral ground meristema ( $M= 1244.65 \mu\text{m}^2$ ;  $P= 0.9801$ ). In the outer region of the ground meristem, the cells showed greater area in hydrated embryos, compared to newly dispersed embryos (Fig. 9B), however, the applications of osmotic treatments did not influence this characteristic. In the central ground meristem, the cells showed an increase in area with hydration (Fig. 9C), however, with the application of solutions that induced moderate and severe stress, no variations were observed, compared to the initial condition. In hydrated embryos, the cellular area remained constant when they were submitted to different osmotic solutions. Hydrated embryos showed greater cell area in the central region of the fundamental meristem, in the control condition and after being submitted to severe water stress.

### 3.7. *Estimation of the integrity of cell membranes*

A significant increase in electrical conductivity was observed in the testing solutions only when the newly dispersed embryos were subjected to  $\Psi_w = 0$  (hydration), and also when they were subjected to severe stress with an osmotic solution of -2.1 MPa (Fig. 10). Moderate stress did not alter the functionality of the cell membranes of the embryos, compared to the freshly dispersed condition. In the case of hydrated embryos, immersion in ultrapure water (hyperhydration) and in the evaluated osmotic solutions, promoted increases in solute leaching. Hydrated embryos submitted to different  $\Psi_w$  had higher levels of solute leaching, compared to freshly dispersed embryos.

### 3.8. Activity of endo- $\beta$ -mannanase

In newly dispersed embryos, submitted to different  $\Psi_w$ , the activity of endo- $\beta$ -mannanase was not verified (Fig. 11). However, for hydrated embryos, severe stress ( $\Psi_w = -2.1$  MPa) induced enzyme activity.

### 3.9. Oxidative stress

Hydration of newly dispersed embryos promoted reductions in  $H_2O_2$  contents, whereas with the application of  $\Psi_w = -1.5$  and  $-2.1$  MPa the contents increased (Fig. 12A). For hydrated embryos, hyperhydration did not affect the levels of  $H_2O_2$ , however, in embryos under moderate and severe stress, there was a significant increase in the levels of this molecule. The production of  $H_2O_2$  was significantly higher in newly dispersed embryos, in relation to those hydrated, in the control treatment (initial condition), and when they were submitted to osmotic solutions that caused moderate and severe stress.

APX activity was higher in the freshly dispersed embryos than in the hydrated embryos, respectively, 5.025 and 2.33  $\mu\text{mol of ascorbate min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$  ( $P=0.0457$ ); there was no effect from the application of osmotic treatments ( $P= 0.906$ ). CAT activity did not show significant variations within each condition, except for a reduction in its activity in hydrated embryos subjected to moderate stress  $\Psi_w=-1.5$  MPa (data not shown). There was no difference in CAT activity between freshly dispersed and hydrated embryos,  $M= 5360.8 \mu\text{Mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$  ( $P= 0.75$ ). SOD activity did not vary among newly dispersed

embryos subjected to the stressed conditions (Fig. 12B). However, for hydrated embryos, SOD activity increased significantly, similarly under conditions of moderate and severe stress.

The concentration of the lipid peroxidation indicator MDA increased significantly when newly dispersed embryos were subjected to moderate and severe stress conditions (Fig. 12C). For hydrated embryos, no osmotic condition altered MDA levels. MDA levels were higher in newly dispersed embryos, submitted to moderate and severe stress compared to hydrated embryos.

A significant correlation was found between SOD activity and the amount of MDA ( $S=0.754$ ,  $P=0.005$ ) in newly dispersed embryos. In the case of hydrated embryos, the correlations between SOD activity and amount of MDA ( $S=0.628$ ,  $P=0.029$ ); SOD activity and amount of  $H_2O_2$  ( $S=0.685$ ,  $P=0.017$ ) and amounts of MDA and  $H_2O_2$  ( $S=0.856$ ,  $P<0.001$ ) were significant.

#### 4. Discussion

This is the first work addressing the influence of soil water cycles, experimentally simulated, on recalcitrant and dormant seeds, which form persistent seed banks. Through structural and physiological evaluations in embryos, characteristics that influence the longevity of *M. flexuosa* seeds were described. Although embryos show resilience to water stress, their persistence and successful germination are dependent on highly hydrated conditions, which highlight their vulnerability to environmental changes. A summary of the main responses to water stress identified in *M. flexuosa* embryos is presented in figure 13.

##### 4.1. Water dynamics in embryos under water stress

*Mauritia flexuosa* embryos are dispersed highly hydrated ( $4.44 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$ ) and begin to lose viability with a 22% decline in water content, when subjected to moderate stress ( $\Psi_w = -1.5 \text{ MPa}$ ) (Fig. 3A), which are considered indications of high recalcitrance (Berjak and Pammenter, 2007; Obroucheva et al., 2016). However, embryos show remarkable resilience to water stress. Even when subjected to severe stress, some embryos maintain viability (Fig. 3C, D) and seeds germinate at rates close to 40% (Fig. 3E). It is interesting to note that  $\Psi_w = -2.1$ , used here to simulate severe stress, is not common in soils and induces permanent wilting in several cultivated species (Roberts and Ellis, 1989; Kirkham, 2005).

The resilience to water deficit in the recalcitrant embryo of *M. flexuosa* is directly related to its ability to absorb and retain water. Most work on recalcitrant seeds has focused on water amounts bordering on desiccation tolerance (Marques et al., 2018; Obroucheva 2016), however, little is known about the cells' primary responses to dehydration (Walters, 2015). Our results confirm that homeostasis in *M. flexuosa* embryonic cells is dependent on maintaining abundant reserves of highly hydrophilic mixed mucilaginous reserves, composed of carbohydrates and proteins (Silva et al., 2014; Veloso et al., 2016; Dias et al., 2020). In addition, the structure of the endosperm also contributes to the preservation of the embryos water status. A recent study demonstrated that the peripheral endosperm preferentially stores water in the vacuoles, while the lateral portion (Fig. 2A; Fig.13A) is rich in mucilages (Dias et al. 2020). Furthermore, water moves easily through the endosperm by both apoplastic and symplastic flows. Thus, in a situation of water deficit, the peripheral water is more easily lost, due to the greater free energy, while the water present in the internal hydrophilic portions is preserved. This condition creates a buffer system that can be activated in a condition of water deficit, and helps to explain the slow dehydration tendency that the seeds present (Veloso et al., 2016) (Fig. 13A). The ability to keep the embryo hydrated is crucial for the persistence of recalcitrant seed banks in seasonal environments and is related to the reproductive success and wide distribution of *M. flexuosa*, which have been reported in some studies (Porto et al., 2018; Moura et al., 2019; Salvador et al., 2022).

#### 4.2. Structural, cytological and physiological responses of embryos to water stress

Moderate water stress increases the metabolic performance of *M. flexuosa* embryos, which favors the activation of germination pathways. The ultrastructural evaluation of embryos submitted to moderate water deficit shows cells in a more active metabolic state (Fig. 7E-J), compared to the newly dispersed condition (Fig. 7A-D), and the accumulation of reducing sugars (Fig. 6E). In addition, evidence of mucilage mobilization is observed by histochemical evaluations (Fig. 4C). In studies with varied species, it was demonstrated that, in response to mild dehydration, the germination rate increases in recalcitrant seeds (Pammmenter et al., 1998; Drew et al., 2000; Eggers et al., 2007). Our results allow us to propose that, under conditions of moderate water deficit, buriti embryos increase metabolism by accumulating osmolytes, such as reducing sugars, which reduces the embryonic  $\Psi_w$ , and promotes the absorption of water from the endosperm (Fig. 13B). The absorption of water and nutrients

from the endosperm by the embryos is considered one of the initial stages of germination in the species (Dias et al., 2020). Porto et al. (2018) observed that the germination rate and the formation of seedling banks of *M. flexuosa* is higher in drier microenvironments in the veredas, where the persistence of recalcitrant seeds would be compromised. Therefore, we conclude that external water is not required for the germination of these seeds, as occurs with other recalcitrant seeds that eventually germinate when stored (Berjak and Pammenter, 2000; 2013). Additionally, the ability to perceive and react to water signals constitutes an important adaptive strategy for the species in environments with seasonal climates.

Damage caused to newly dispersed *M. flexuosa* embryos subjected to severe water deficit is related to the lack of plasticity of cell walls, the absence of insoluble reserves and deficient antioxidant system (Fig.13 B, C). In this condition, the protoderm cells show strong protoplast retraction, leading to cytoplasmic condensation, as reported for other species (Hoesktra, 2001). This is particularly harmful to cellular structures, and can lead to molecular interactions that promote membrane fusion and protein denaturation. Rigid cell walls, which do not follow protoplast retraction, as it occurs in buriti embryos (Fig. 7K, P; 9C), contribute to the harmful effects of desiccation as evidenced by Woodenberg et al. (2018). Although lipids are common in *M. flexuosa* embryos, they probably do not generate volume buffering capacity, essential to alleviate stress damage to the plasma membrane, such as in orthodox seeds, rich in insoluble reserves (Berjak and Pammenter et al., 2013). The lipids present in buriti seeds belong to the terpenoid class (Silva et al., 2014), secondary compounds commonly associated with the stress response.

The enzymatic antioxidant system involving CAT, APX and SOD is not efficient in controlling oxidative stress in *M. flexuosa* embryos under water deficit (Fig.13C). Although SOD activity is correlated with the amount of MDA, indicating its activation in response to stress, the enzyme action was not efficient in reducing lipid peroxidation. Inefficient antioxidant systems are commonly reported for recalcitrant seeds under water deficit (Berjak and Pammenter et al., 2007). Here, it was observed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (one of the main ROS) and MDA (lipid peroxidation indicator) levels concomitantly increase in embryos under severe water stress, which is related to loss of cell membrane functionality and solute leaching. According to Sershen et al. (2016), the extravasation of electrolytes and the degree of vacuolation, which also occurred in these embryos under water deficit, can be used to quantify the damage induced by desiccation. Our results indicate that although *M. flexuosa*

embryos show some resilience, the maintenance of their structure and physiology is limited in severe water deficit conditions.

#### *4.3. Effects of post-dispersal hydration on the response to water deficit and embryo metabolism*

*Mauritia flexuosa* embryos that underwent post-dispersal hydration have a lower level of oxidative stress under water deficit, compared to newly dispersed embryos (Fig. 13C). In these embryos, under moderate and severe stress, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA levels are lower compared to newly dispersed embryos (Fig. 12A, C). This condition is not due to the enzymatic antioxidant system, since, among the main enzymes, only SOD activity was greater in hydrated embryos, and only under moderate stress (Fig. 12B). Furthermore, significant correlations were found between SOD activity and the amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA, which means that although the enzyme is activated, its action is not sufficient to control stress. In hydrated embryos under stress, there is an accumulation of phenolic compounds, especially associated with organic macromolecules (Fig. 6J-U). It is known that phenolic compounds act in the removal of ROS (Xu et al., 2020), especially during seed germination (Gan et al., 2016; Chen et al., 2016; Xu et al., 2018). Some studies have even revealed that the association with carbohydrates, forming conjugates, such as those identified in the present work, increase the antioxidant potential of phenolic compounds (Wang et al., 2016). It is noteworthy that controlled levels of ROS can favor the activation of enzymatic synthesis routes related to the mobilization of reserves and seed germination (Wojtyla et al., 2016).

The viability of post-dispersion hydrated embryos, when subjected to water stress, does not differ from that of freshly dispersed embryos, however, the solute leaching test indicates that the functionality of the membranes is affected (Fig. 10). This is possibly related to sudden variations in intracellular pressure, considering that the isolated embryos were placed directly in the solutions. It is interesting to note that, in an osmotic adjustment attempt, hydrated *M. flexuosa* embryos activate endo- $\beta$ -mannanase synthesis pathways when subjected to severe water deficit (Fig. 11). Endo- $\beta$ -mannanase is the main digestive enzyme of the endosperm cell wall in many Areaceae seeds (Buckeridge, 2010). Under normal water conditions, the activity rates of this enzyme do not change in the haustorium, but rather in the endosperm, during the mobilization of reserves (Demason et al., 1985; Mazzottini-dos Santos et al., 2017; Dias et al., 2020). This is the first record of increased activity levels of this enzyme in palm

tree embryos (Fig. 13B). The osmolytes produced as a result of the breakdown of mannans, possibly promote osmotic resistance to the embryos, in the period between 6 and 12 h of immersion in the polyethylene glycol 6000 solution (Fig. 3B).

The hyperhydration of *M. flexuosa* embryos promotes the intensification of metabolism and the mobilization of reserves, traits related to germination. At the end of 48h of exposure to  $\Psi_w = 0$  MPa, the water content of the embryos increases from 4.4 to 10.1 gH<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DM (Fig. 3A-B), which is related to cell expansion in the central region of the ground meristema (Fig. 9C). Hydraulic capacity (capacity of the cell to store water, according to Daint, 1976) in embryonic tissues controls cell expansion, a determining factor for the completion of germination in most seeds (Bewley et al., 2013), including buriti (Moura et al., 2019). The dynamics of compounds resulting from the hyperhydration of *M. flexuosa* embryos includes the accumulation of reducing sugars (Fig. 6K, T) and starch grains (Fig. 8A, Q), which constitute a transient reserve during the embryo/seedling transition in palms (Mazzotinni-dos-Santos et al., 2017). Moreover, ultrastructural evaluation reveals the intensification of cellular activity, which is considered a marker for changes in the physiological status of embryos (Fig. 13B) (Berjak and Pamenter, 2000).

Under natural conditions, it is likely that the increase in water content of buriti embryos is related to overcoming dormancy. In *M. flexuosa* seeds in which the operculum was mechanically removed, Dias et al. (2020) demonstrated that the water flow and reserves from the endosperm to the embryo is one of the main indicators of the beginning of the germination process. The pronounced morphophysiological dormancy (a concept from Baskin and Baskin 2014) of buriti seeds, as in other Areaceae seeds, is determined by the low growth potential of the embryo, which cannot overcome the resistance imposed by the operculum (Ribeiro et al., 2011; 2012; Magalhães et al., 2013; Neves et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Silva et al., 2014). Embryo extraction or removal of the operculum eliminates mechanical restriction and exposes the embryos to atmospheric oxygen (Mazottini-dos-Santos et al., 2018). Oxygen, in its most reactive forms (ROS), participates as a signal in metabolic pathways that increase the ratio between gibberellins (GAs) and abscisic acid (ABA), which promotes germination (Ribeiro et al., 2015; Dias et al., 2018).

In a study of recalcitrant *Aesculum hypocastanum* seeds, dormancy is treated as the inability of the embryo axes to absorb water to the level that triggers germination, even when an ideal supply of water is available (Obroucheva et al., 2004; Obroucheva et al., 2017). Therefore, even in recalcitrant seeds that are dispersed hydrated, water entry into embryos is

crucial for the germination completion. According to Salvador et al. (2022), *M. flexuosa* seeds that went through the seed bank showed embryo elongation and an increase in water content, in addition to greater germination capacity, compared to those recently dispersed - indicating a reduction in the dormancy level. The results obtained in the present work corroborate these findings and indicate that the water cycles experienced during the soil seed banks stay, which promote the mobilization of reserves and the modulation of oxidative stress, have a relevant role in attenuating dormancy in the species.

## 5. Conclusions

The *M. flexuosa* embryo is dispersed, highly hydrated and is sensitive to dehydration, which defines the recalcitrant condition of the seeds. However, seeds show remarkable resilience to dehydration, which is associated with the buffering effect promoted by the endosperm and the accumulation of hydrophilic mucilages in embryonic cells. Both post-dispersion water absorption and moderate water deficit induce the intensification of cellular activity and the mobilization of reserves. Embryos hydrated after dispersion, under water stress, are less vulnerable to oxidative stress due to the non-enzymatic antioxidant system. Although embryos present resilience traits, severe water stress causes structural (loss of cell wall and membrane functionality) and physiological (oxidative stress and blockage of reserve mobilization) damage that leads to loss of germination capacity and, in extreme cases, of viability. The water cycles experienced in the seed bank in the soil probably play a relevant role in overcoming buriti seed dormancy.

### Author's contributions

GPD: conceptualization, experimental design, investigation, writing of original draft, and manuscript review and editing. HCMS and YRFN: investigation. LMR and MGCF: investigation, supervision, project administration, funding acquisition, final manuscript review and editing.

### Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

The authors thank the Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais - CM/UFMG for making its infrastructure available for the electron microscopy analyses. 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 (Edital 093/2021); the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (APQ-03371-21); and the Ministry of Science, Technology and Innovations – MCTI, Brazil. The authors are grateful to CAPES for the doctoral scholarship granted to GPD, and to CNPq for the research productivity scholarships granted to LMR, MGCF 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14, 93–107. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego, USA.
- Berjak P., Pammenter N.W., 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds? *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 12, 22–55.
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2007. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective. *Ann. Bot.* 101, 213–228. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm168>
- 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., Nonogak, H. (Eds.), 2013. *Seeds Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer, New York.

- Brasil. Ministério da Agricultura, P. e Abastecimento S. de D.A., 2009. Regras para análise de sementes. Brasília, DF.
- Buckeridge, M.S., Pessoa Dos Santos, H., Tiné, M.A.S., 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 141–156. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00162-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00162-5)
- Buckeridge, M.S., 2010. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation. *Plant Physiology* 154, 1017–1023. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>
- 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*). *Physiologia Plantarum* 83, 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>
- Chen, Z., Yu, L., Wang, X., Gu, Z., Beta, T., 2016. Changes of phenolic profiles and antioxidant activity in canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) during germination. *Food Chemistry* 194, 608–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.060>
- Csontos, P., Tamás, J., 2003. Comparisons of soil seed bank classification systems. *Seed Sci. Res.* 13, 101–111. <https://doi.org/10.1079/SSR2003129>
- Dainty, J., 1976. Water Relations of Plant Cells, in: Lüttge, U., Pitman, M.G. (Eds.), *Transport in Plants II*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 12–35. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-66227-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-66227-0_2)
- DeMason, D.A., Sexton, R., Gorman, M., Reid, J.S.G., 1985. Structure and biochemistry of endosperm breakdown in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Protoplasma* 126, 159–167. <https://doi.org/10.1007/BF01281791>
- Dias, D.S., Ribeiro, L.M., Lopes, P.S.N., Melo, G.A., Muller, M., Munné-Bosch, S., 2018. Haustorium-endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae) seeds. *Ann. Bot.* 122, 267–277.
- Dias, G.P., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Ferreira Nunes, Y.R., Pimenta Bragança, G.P., Isaias, R.M.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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.031>
- 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.
- Drew, P.J., Pammenter, N.W., Berjak, P., 2000. 'Sub-imbibed' storage is not an option for extending longevity of recalcitrant seeds of the tropical species, *Trichilia dregeana* Sond. Seed Sci. Res. 10, 355–363. <https://doi.org/10.1017/S0960258500000398>
- Eggers, S., Erdey, D., Pammenter, N.W., Berjak, P., 2007. Storage and germination response of recalcitrant seeds subjected to mild dehydration. In: Adkins, S.W., Ashmore, S., Navie, S.C. (Eds.), Seeds: Biology, Development and Ecology. Proceedings of the Eighth International Workshop on Seeds, Brisbane, Australia, May 2005. CABI, UK, pp. 85–92. <https://doi.org/10.1079/9781845931971.0085>
- El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C., 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. Plant Signal. Behav. 3, 175–182. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5539>
- Endress, B.A., Horn, C.M., Gilmore, M.P., 2013. *Mauritia flexuosa* palm swamps: Composition, structure and implications for conservation and management. Forest Ecol. Manag. 302, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.03.051>
- Feder, N., O'Brien, T.P., 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. Am. J. Bot. 55, 123–142. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1968.tb06952.x>
- Gan, R.-Y., Wang, M.-F., Lui, W.-Y., Wu, K., Corke, H., 2016. Dynamic changes in phytochemical composition and antioxidant capacity in green and black mung bean (*Vigna radiata*) sprouts. Int. J. Food Sci. Technol. 51, 2090–2098. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13185>
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. Plant Physiol. 59, 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Gomes-Copeland, K.K.P., Lédo, A.D.S., Almeida, F.T.C.D., Miranda, R.P., Santos, I.R.I., 2012. Assessing the viability of cryopreserved coconut zygotic embryos by electrolytic conductivity and potassium leaching. Pesq. Agropec. Bras. 47, 8–13. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000100002>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103904>

- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J., 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends Plant Sci. 6, 431–438. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02052-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02052-0)
- Horn, C.M., Gilmore, M.P., Endress, B.A., 2012. Ecological and socio-economic factors influencing aguaje (*Mauritia flexuosa*) resource management in two indigenous communities in the Peruvian Amazon. Forest Ecol. Manag. 267, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.11.040>
- Huang, D., Wu, W., Abrams, S.R., Cutler, A.J., 2008. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. J. Exp. Bot. 59, 2991–3007. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern155>
- Jaganathan, G.K., 2021. Ecological insights into the coexistence of dormancy and desiccation-sensitivity in Arecaceae species. Annals of Forest Science 78, 10. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01032-9>
- Johansen, D.A. (1940) 'Plant microtechnique.' (McGraw-Hill Books: New York).
- Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27, 137A–138A.
- Kirk, P.W., 1970. Neutral Red as a Lipid Fluorochrome. Stain Technol. 45, 1–4. <https://doi.org/10.3109/10520297009063373>
- Kirkham, M.B., 2005. Principles of soil and plant water relations. Elsevier Academic Press, Amsterdam; New York.
- Lorenzi, H. (Ed.), 2010. Flora brasileira Lorenzi: arecaceae (palmeiras). Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, SP.
- Magalhães, H.M., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., Sant'Anna-Santos, B.F., Oliveira, D.M.T., 2013. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). Trees 27, 273–283. <https://doi.org/10.1007/s00468-012-0797-1>
- Marques, A., Buijs, G., Ligterink, W., Hilhorst, H., 2018. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. Funct. Plant Biol. 45, 1083. <https://doi.org/10.1071/FP18022>
- Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., 2018. Structural changes in the micropylar region and overcoming dormancy in Cerrado palms seeds. Trees 32, 1415–1428. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1723-y>

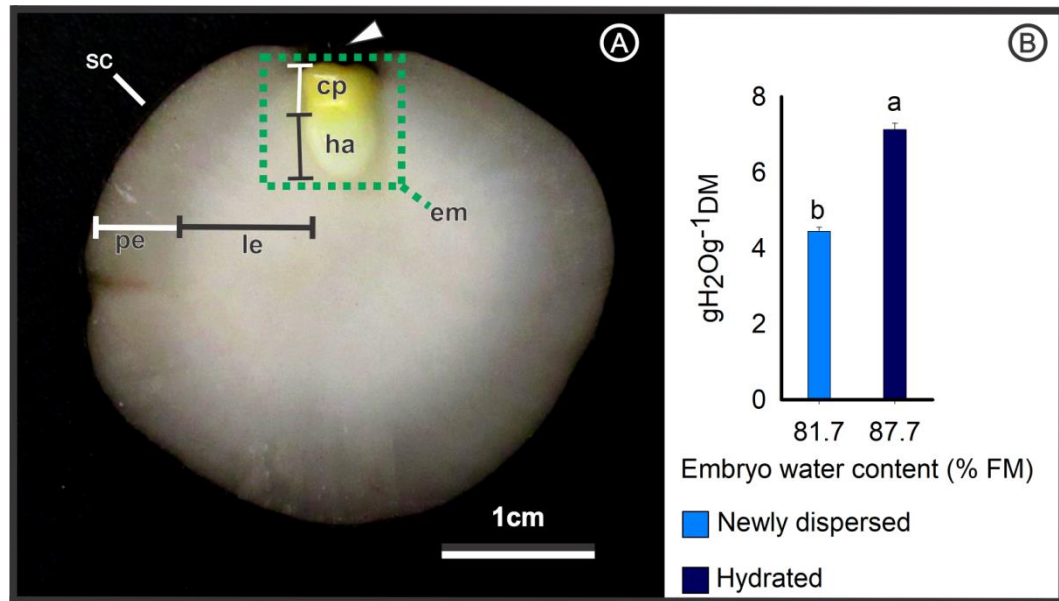
- Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., 2017. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. *Protoplasma* 254, 1563–1578. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1048-x>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0074-1>
- Michel, B.E., Kaufmann, M.R., 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 51, 914–916. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>
- 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 (5), 1299–1316.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, 1981. *Plant Cell Physiol.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Neves, S.D.C., Ribeiro, L.M., Da 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. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2012.12.007>
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- Obroucheva, N., Sinkevich, I., Lityagina, S., 2016. Physiological aspects of seed recalcitrance: a case study on the tree *Aesculus hippocastanum*. *Tree Physiol.* 36, 1127–1150. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw037>
- Obroucheva, N.V., Antipova, O.V., 2004. The role of water uptake in the transition of recalcitrant seeds from dormancy to germination. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 848–856. <https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000047835.84851.b1>
- Obroucheva, N.V., Sinkevich, I.A., Lityagina, S.V., Novikova, G.V., 2017. Water relations in germinating seeds. *Russ. J. Plant Physiol.* 64, 625–633. <https://doi.org/10.1134/S102144371703013X>

- Oliveira, N.C.C., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., Mercandante-Simões, M.O., Oliveira, L.A.A., Silvério, F.O., 2013. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees* 27, 1633–1645. <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0910-0>
- Ozfidan, C., Turkan, I., Sekmen, A.H., Seckin, B., 2012. Abscisic acid-regulated responses of *aba2-1* under osmotic stress: the abscisic acid-inducible antioxidant defence system and reactive oxygen species production: Effects of ABA on the ABA-deficient mutant *aba2-1* under stress. *Plant Biol.* 14, 337–346. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00496.x>
- Paiva, E.A.S., Pinho, S.Z.D., Oliveira, D.M.T., 2011. Large Plant Samples: How to Process for GMA Embedding? In: Chiarini-Garcia, H., Melo, R.C.N. (Eds.), *Light Microscopy*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 37–49. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5_3)
- Pammenter, N.W., Greggains, V., Kioko, J.I., Wesley-Smith, J., Berjak, P., Finch-Savage, W.E., 1998. Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. *Seed Sci. Res.* 8, 463–471. <https://doi.org/10.1017/S0960258500004438>
- Pinho, G.P., Matoso, J.R.M., Silvério, F.O., Mota, W.C., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., 2014. A new spectrophotometric method for determining the enzymatic activity of endo- $\beta$ -mannanase in seeds. *J. Braz. Chem. Soc.* <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140102>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11258-017-0788-9>
- Reis, S.B., Mello, A.C.M.P., Oliveira, D.M.T., 2017. Pericarp formation in early divergent species of Arecaceae (Calamoideae, Mauritiinae) and its ecological and phylogenetic importance. *Plant Syst Evol* 303, 675–687. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1399-6>
- Ribeiro, L.M., Garcia, Q.S., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2015. Tissue-specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. *Physiol. Plant.* 153, 627–642. <https://doi.org/10.1111/ppl.12269>
- 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. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000400003>
- Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., Garcia, Q.S., 2012. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. *Trees* 26, 851–863. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0659-2>

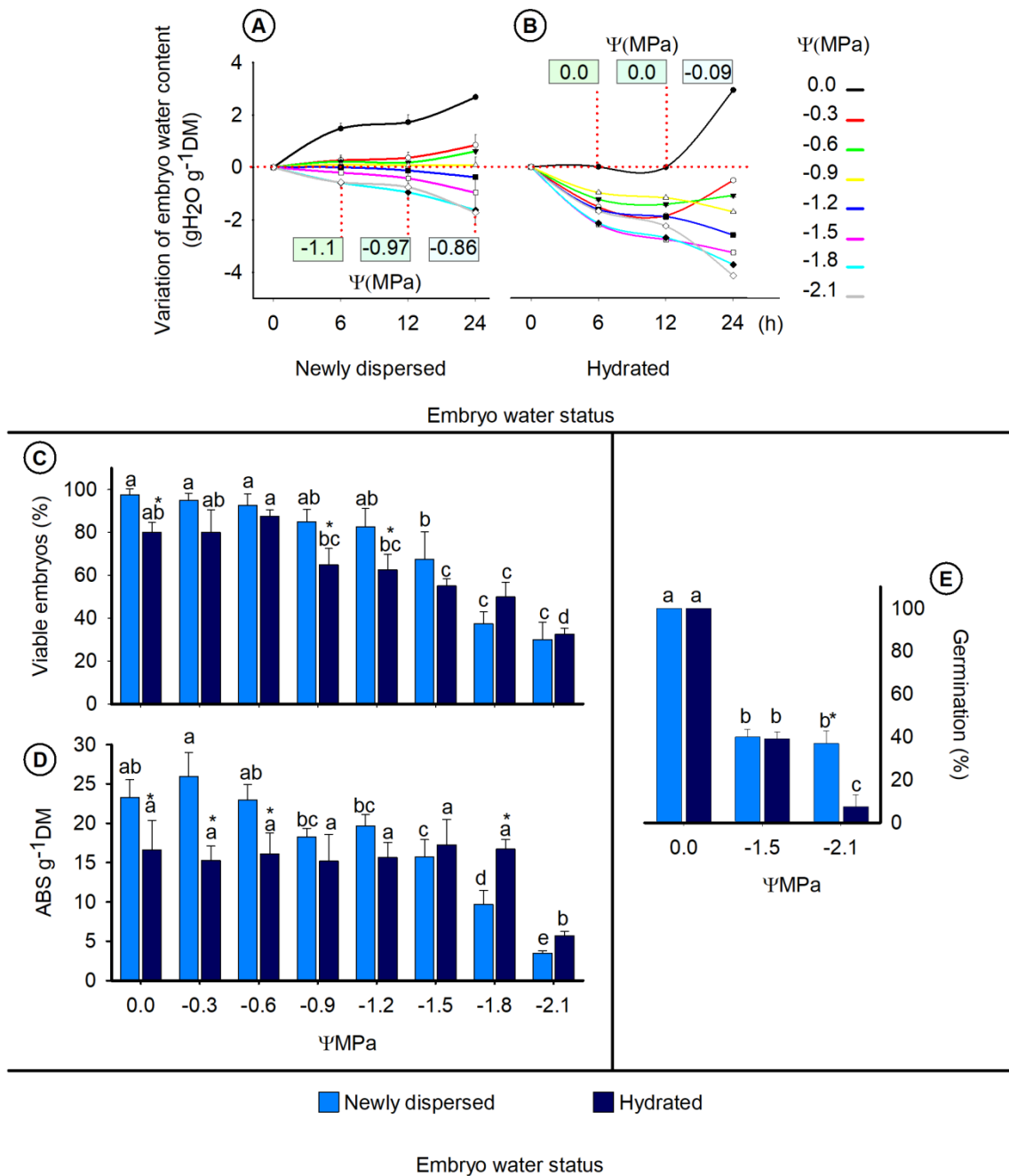
- Ribeiro, L.M., Souza, P.P., Rodrigues Jr., A.G., Oliveira, T.G.S., Garcia, Q.S., 2011. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. *Seed Sci. Technol.* 39, 303–317. <https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.2.04>
- Roberts, E.H., Ellis, R.H., 1989. Water and Seed Survival. *Ann. Bot.* 63, 39–39. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087727>
- Roland, A.M. (1978). General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL (Ed) *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, New York. Não tem pg?
- 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. *Forest Ecol. Manag.* 511, 120155. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120155>
- Sass, J.E. (1951) *Botanical microtechnique*. Iowa State College Press, Ames
- Sershen, Varghese, B., Naidoo, C., Pammenter, N.W., 2016. The use of plant stress biomarkers in assessing the effects of desiccation in zygotic embryos from recalcitrant seeds: challenges and considerations. *Plant Biol. J.* 18, 433–444. <https://doi.org/10.1111/plb.12428>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.08.012>
- Spera, M.R.N., Cunha, R.D., Teixeira, J.B., 2001. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). *Pesq. Agropec. Bras.* 36, 1567–1572. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001001200015>
- Subbiah, A., Woodenberg, W.R., Varghese, B., Pammenter, N.W., Sershen, 2019. The influence of seed morpho-physiological and meristematic cell wall traits on seed desiccation sensitivity in three angiosperm tree species. *Flora* 261, 151490. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151490>
- 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>

- Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91, 294–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00760.x>
- Varghese, B., Sershen, Berjak, P., Varghese, D., Pammenter, N.W., 2011. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. *Physiol. Plant.* 142, 326–338. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01469.x>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2194-7>
- Vidal, B. C., 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Ann. Histochim.* 15, 289–296.
- Walters, C., 2015. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242, 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2312-6>
- Wang, Y., Li, M., Xu, F., Chai, L., Bao, J., Shen, S., 2016. Variation in polyphenols, tocots,  $\gamma$ -aminobutyric acid, and antioxidant properties in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) as affected by different germination time. *Cereal Chem.* 93, 268–274. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-08-15-0171-R>
- Weis, K.G., Polito, V.S., Labavitch, J.M., 1988. Microfluorometry of pectic materials in the dehiscence zone of almond (*Prunus dulcis* [Mill.] DA Webb) fruits. *J. Histochem. Cytochem.* 36, 1037–1041. <https://doi.org/10.1177/36.8.3392393>
- Wojtyła, Ł., Lechowska, K., Kubala, S., Garnczarska, M., 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00066>
- Woodenberg, W.R., Pammenter, N.W., Farrant, J.M., Driouich, A., Berjak, P., 2015. Embryo cell wall properties in relation to development and desiccation in the recalcitrant-seeded *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae) Dyer and Verdoorn. *Protoplasma* 252, 245–258. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0672-6>
- Woodenberg, W.R., Sershen, Varghese, B., Pammenter, N., 2018. Zygotic embryo cell wall responses to drying in three gymnosperm species differing in seed desiccation sensitivity. *Protoplasma* 255, 1461–1475. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1243-z>



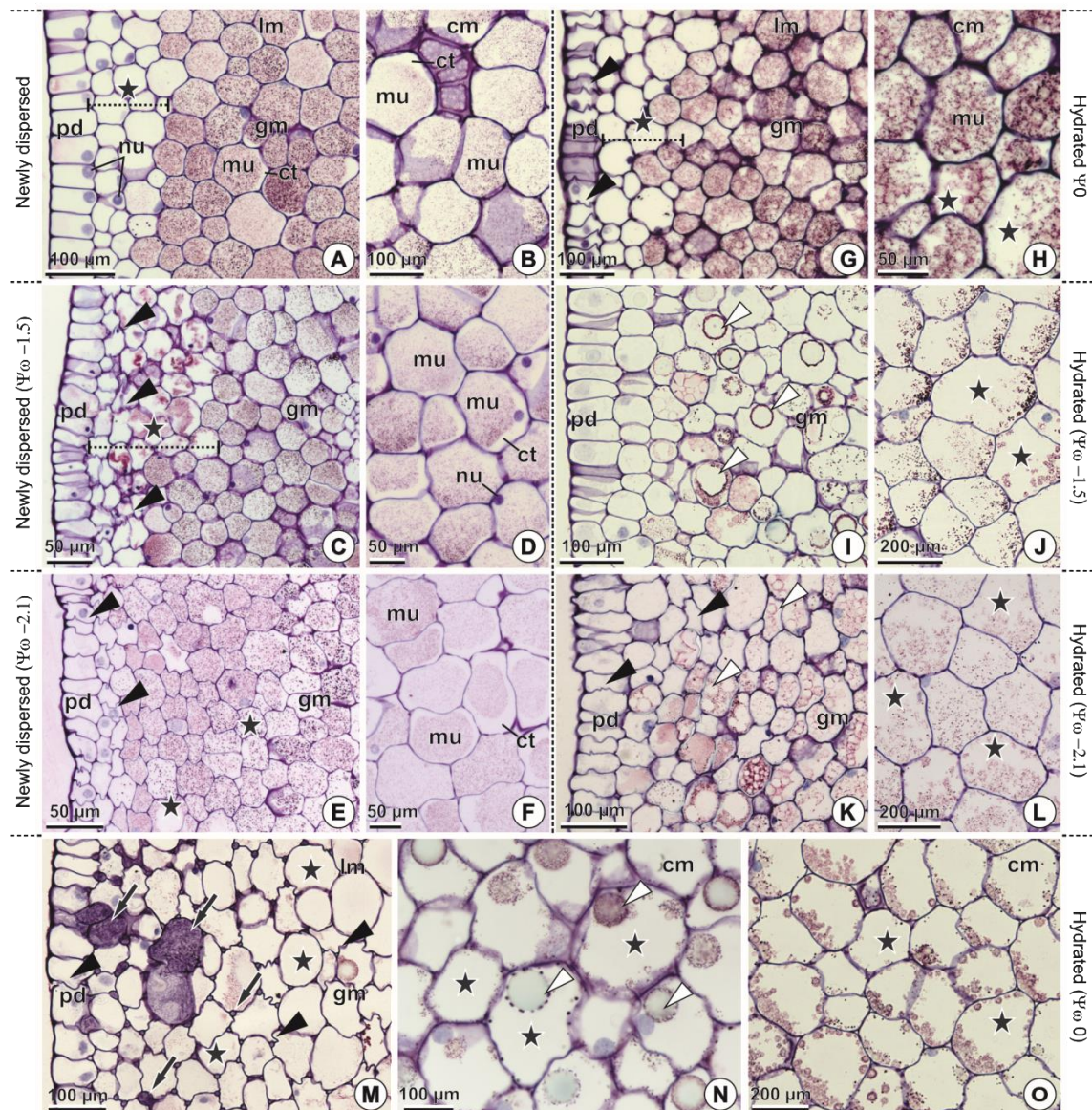


**Fig. 2.** Longitudinal section of a newly dispersed *Mauritia flexuosa* seed; white arrowhead indicates the operculum (A). Water status of embryos used in the experiments expressed on a dry basis (B). Different letters indicate statistical difference between treatments using the Duncan test ( $P \leq 0,05$ ). Bars represent standard error of the mean. cp, cotyledonary petiole; em, embryo; ha, haustorium; le, lateral endosperm; pe, peripheral endosperm; sc, seed coat.



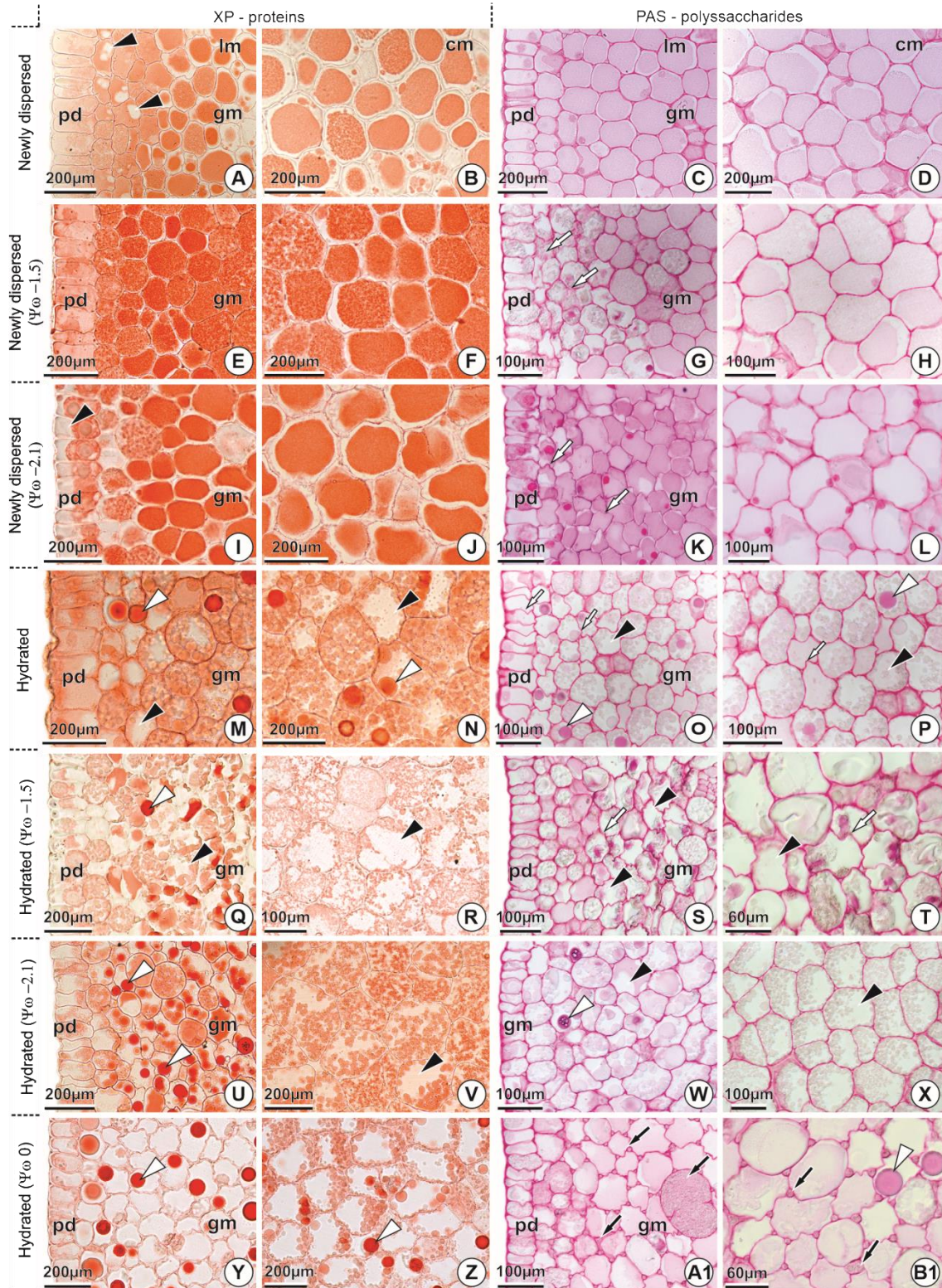
**Fig. 3.** Variations in water content and  $\Psi_w$  of *Mauritia flexuosa* embryos, freshly dispersed (A) or hydrated after dispersion (B), evaluated over 24h after immersion in different osmotic solutions. The  $\Psi_w$  values of the osmotic solutions are represented at the end of the curves. The values in the rectangles represent the  $\Psi_w$  of the embryo in each time evaluated; Viability percentages (C) and triphenylformazan absorbance rates (D); Germination percentages after immersion of freshly dispersed or hydrated *Mauritia flexuosa* seeds in osmotic solutions with different  $\Psi_w$  (E). Different letters within each freshly dispersed or hydrated condition indicate that the osmotic treatments differed statistically from each other; the asterisk (\*) indicates the

difference between freshly dispersed and hydrated treatments, according to the Duncan test, ( $P \leq 0,05$ ). Bars represent standard error of the mean.

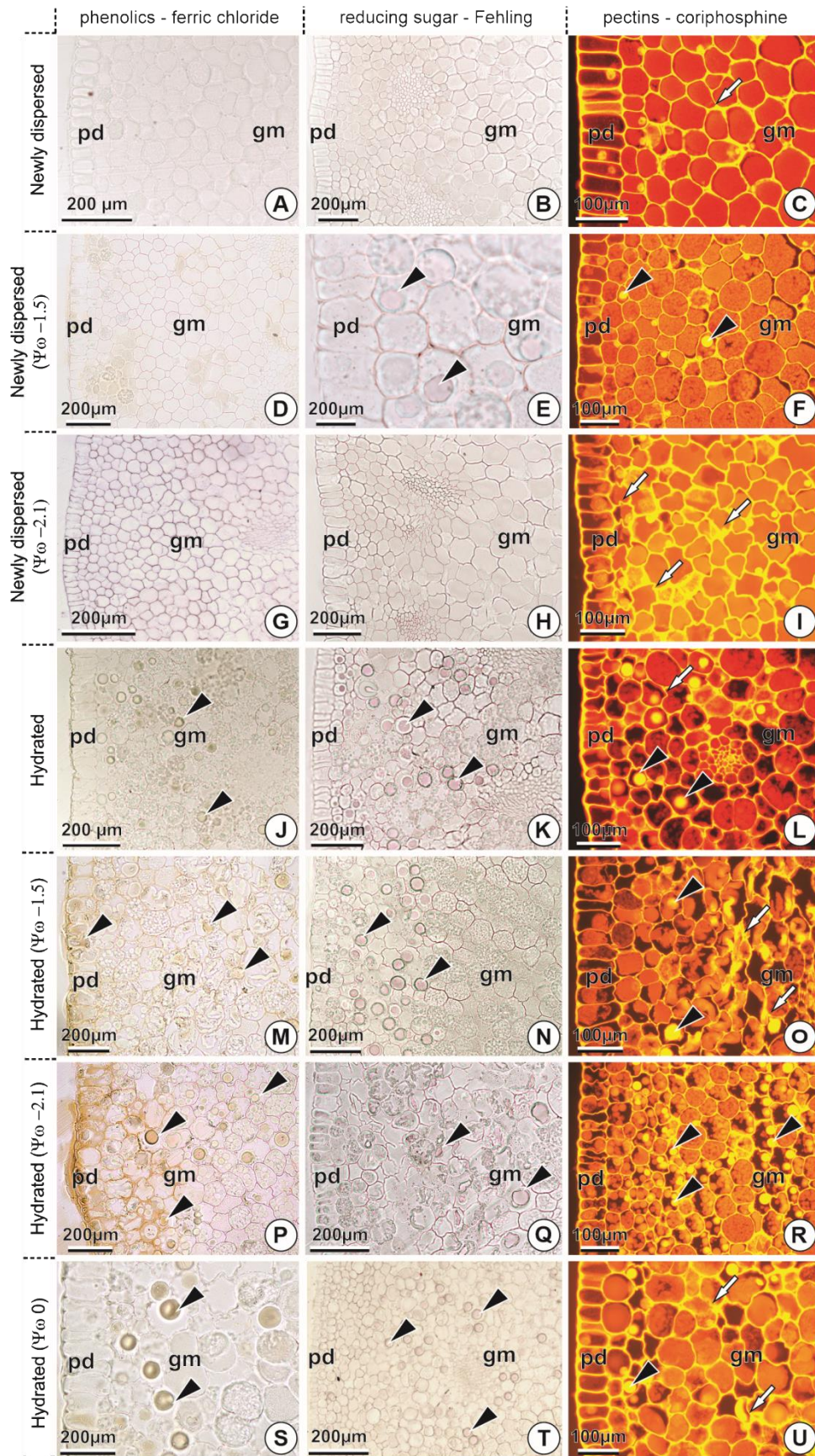


**Fig. 4.** Cross sections of the haustorium of freshly dispersed or hydrated *Mauritia flexuosa* embryos, after immersion in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Region of the protodermis and lateral ground meristem (A, C, E, G, I, K, M). Ground meristem in the central region of the haustorium (B, D, F, H, J, L, N, O). Layers with hyaline cells adjacent to protodermis (dashed lines); mobilization of simplast content (stars); association of phenolic compounds and reserve content (white arrowheads); cell wall sinuosities (black arrowheads); disruption of cell walls and accumulation of substances in the intercellular space (black arrows). cm, central

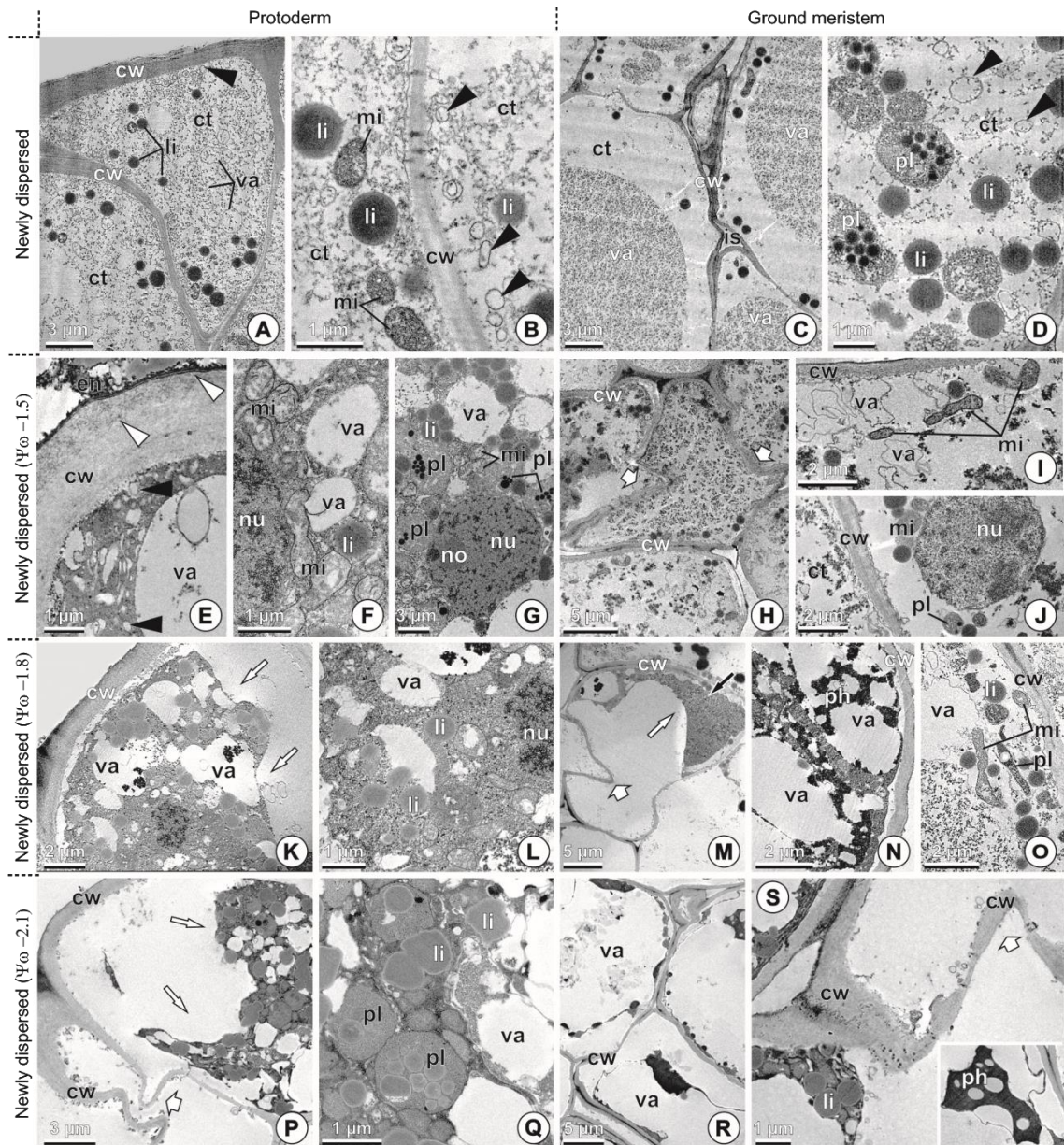
ground meristema; gm, ground meristema; lm, lateral ground meristema; mu mucilage; pd, protoderm.



**Fig. 5.** Cross sections of the median portion of the haustorium of freshly dispersed or hydrated *Mauritia flexuosa* embryos, after immersion in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Proteins associated with the protodermis and lateral ground meristem, revealed by the reddish color in reaction to the Xylidine-Ponceau (XP) reagent (A, E, I, M, Q, U, Y). Proteins associated with the central ground meristem of the haustorium (B, F, J, N, R, W, Z). Carbohydrates associated with the cell walls and protoplasts of the protodermis and lateral fundamental meristem, revealed by magenta staining with periodic acid and Schiff reagent (PAS) (C, G, K, O, S, V, A1). Carbohydrates stored in the central ground meristem cells of the haustorium (D, H, L, P, T, X, B1). Vacuolation indicating mobilization of reserves (black arrowhead); association of proteins or carbohydrates with phenolic compounds (white arrowhead); disruption of the cell wall and accumulation of carbohydrates in the intercellular space (black arrow); cell wall sinuosities (white arrow). cm, central ground meristem; lm, lateral ground meristem; pd, protoderm; gm, ground meristem.

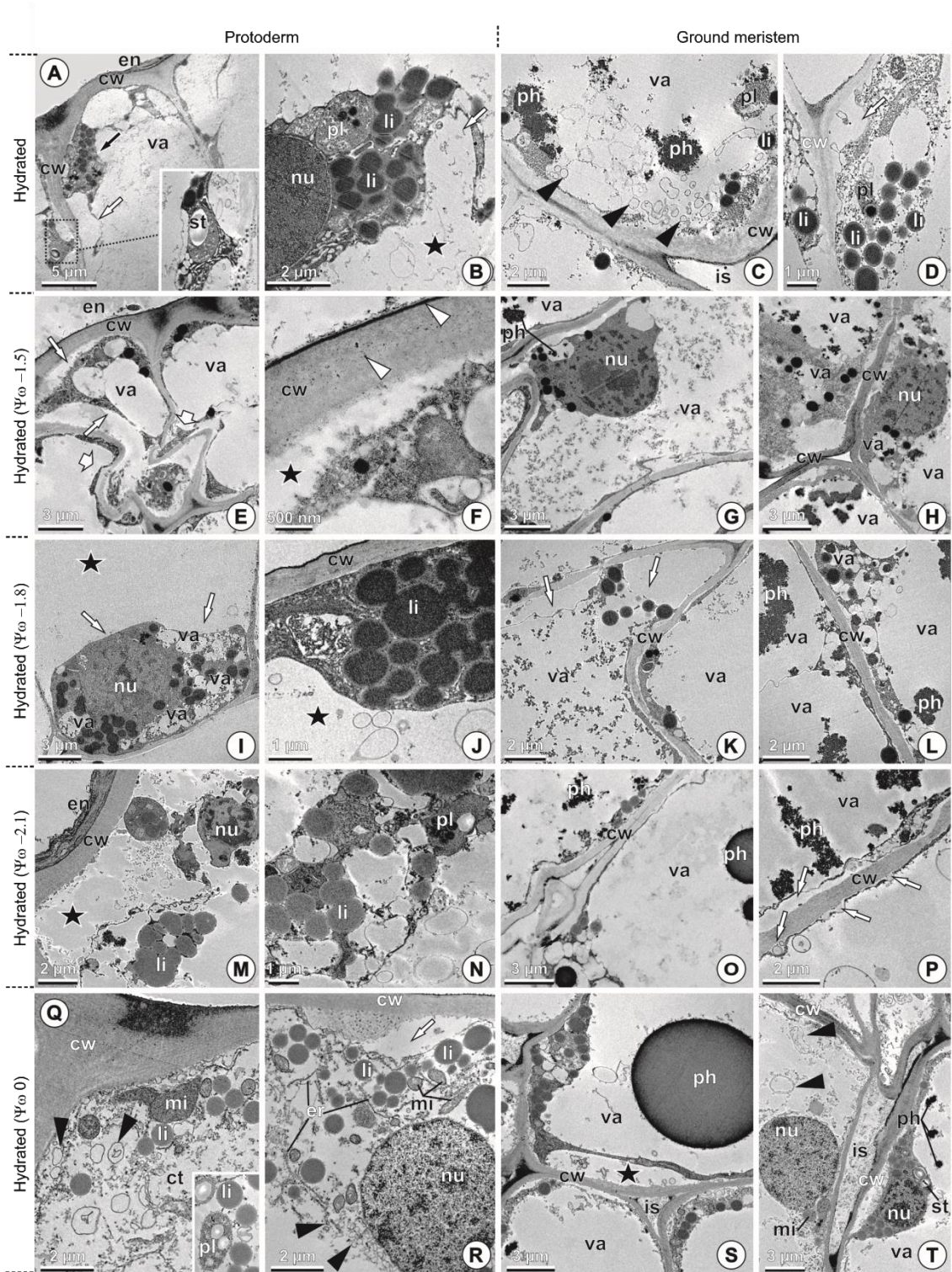


**Fig. 6.** Cross sections of the protodermis and ground lateral meristem, in the median portion of the haustorium of freshly dispersed or hydrated *Mauritia flexuosa* embryos, after immersion in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Phenolic compounds marked brown in reaction to ferric chloride (black arrowhead) (A, D, G, J, M, P, S). Reducing sugars revealed by red color, in reaction to Fehling's reagent (black arrowhead) (B, E, H, K, N, Q, T). Acidic polysaccharides revealed by the orange secondary fluorescence reaction, after reaction with corifosphina reagent, under UV light (C, F, I, L, O, R, U). Cell wall (white arrow); association of acidic polysaccharides and phenolic compounds (black arrowhead). pd, protoderm; gm, ground meristem.

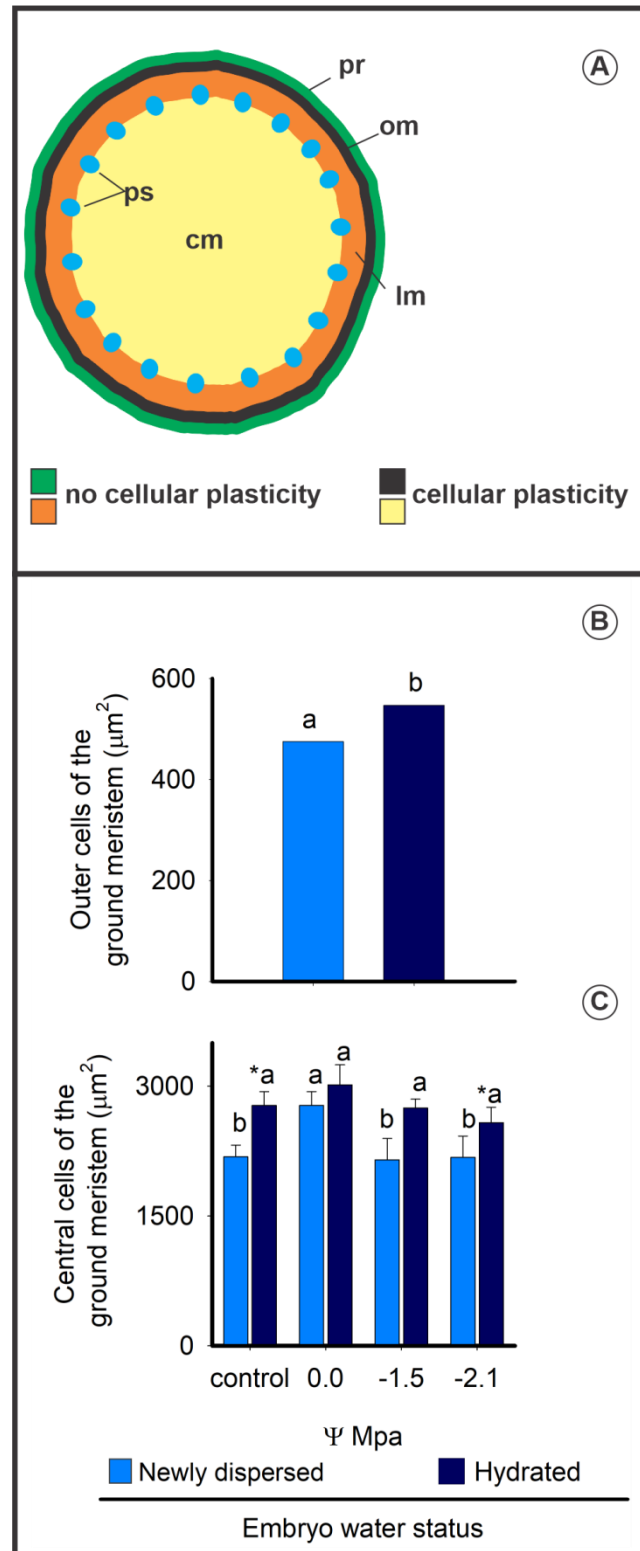


**Fig. 7.** Ultrastructure of the protodermis and ground meristem of the haustorium, after immersion of freshly dispersed *Mauritia flexuosa* embryos in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Cells with a thick outer periclinal wall, mucilage in the cytoplasm, lipids and poorly developed mitochondria (A-B). Cells with thin walls, large central vacuole containing mucilage (C). Periphery of the cell with small vesicles (black arrowhead), plastids and lipid droplets (D). Proliferation of mitochondria with developed cristae; plastids and lipid droplets around the nucleus; vacuolization; more electron-dense regions in the wall (indication of substance transport) (white arrowhead); sinuities in the cell wall indicating cell collapse (wide arrow); cell periphery and periplasmic space with small vesicles (black arrowhead) (E-J). Retraction of the plasma membrane (white arrow) and condensation of the protoplast with accumulation of lipid droplets and plastids; vacuolation and accumulation of phenolic

compounds in the vacuole; protoplast contraction (black arrow); sinuosities in the cell wall indicating cell collapse (wide arrow) (K-S). ct, cytoplasm; cw, cell wall; en, endosperm; is, intercellular space; li, lipids; mi, mitochondria; no, nucleolus; nu, nucleus; ph, phenolic compounds; pl, plastids; st, starch; va, vacuole.

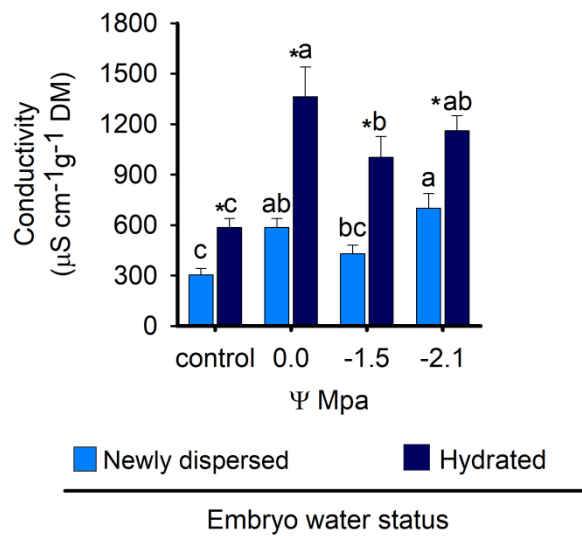


**Fig. 8.** Ultrastructure of the protodermis and ground meristem after immersion of hydrated *Mauritia flexuosa* embryos in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Vacuolation showing mobilization of reserves; the inset indicates starch grains; contraction of the dense protoplast (black arrow); plasma membrane retraction (white arrow); periplasmic space with accumulation of substances (black star); lipid droplets and plastids with stored material, close to the nucleus (A-B). Accumulation of vesicles at the periphery of the cytoplasm (black arrowhead); phenolic compounds in the vacuole; plasma membrane retraction (white arrow); lipid droplets and plastids were present in the cytoplasm (C-D). Damaging effect of treatment with strong cell wall sinuosity (wide arrow); plasma membrane retraction (white arrow); indication of substance transport (white arrowhead); periplasmic space with accumulation of substances (black star); collapse of the plasma membrane and nucleus (E-F). Maintenance of cellular structure, with reserves of mucilage and phenolics in the vacuole, peripheral cytoplasm with an evident nucleus (G-H). Strong retraction of the plasma membrane (white arrow); dense and peripheral cytoplasm; substances in the periplasmic space (black star); nuclear envelope collapse; coalescence of lipid droplets, phenolics in vacuoles (I-P). Membrane retraction and accumulation of substances (white arrow). Cytoplasm rich in organelles; notable proliferation of the endoplasmic reticulum, usually associated with ribosomes, adjacent to the plasma membrane and around the nucleus; numerous vesicles dispersed in the cytoplasm and around the nucleus (Q-R). Strong cell wall sinuosity, accumulation of substances in the periplasmic space, phenolic compounds in the vacuole (S-T). ct, cytoplasm; cw, cell wall; em, endosperm; is, intercellular space; li, lipids; mi, mitochondria; no, nucleolus; nu, nucleus; ph, phenolics; pl, plastids; st, starch; va, vacuole.

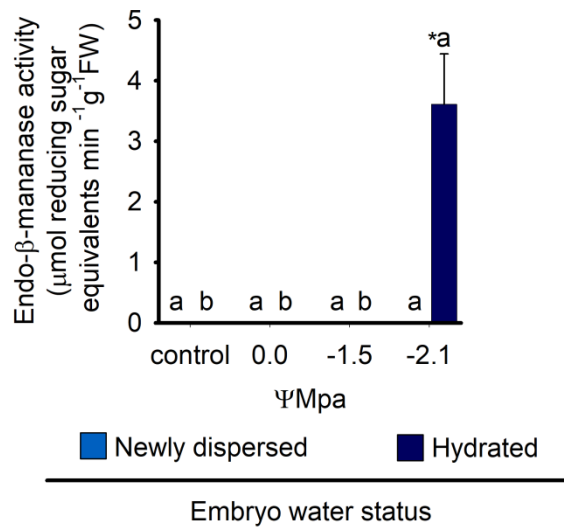


**Fig. 9.** Cellular micromorphometry of the median portion in cross section of the haustorium after immersion of freshly dispersed or hydrated *Mauritia flexuosa* embryos in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Cross-sectional diagram of the median region of the haustorium showing the four regions evaluated (A). Cross-sectional area of cells in the outer layer of the ground meristem (B). Cross-sectional area of the central cells of the ground meristem (C).

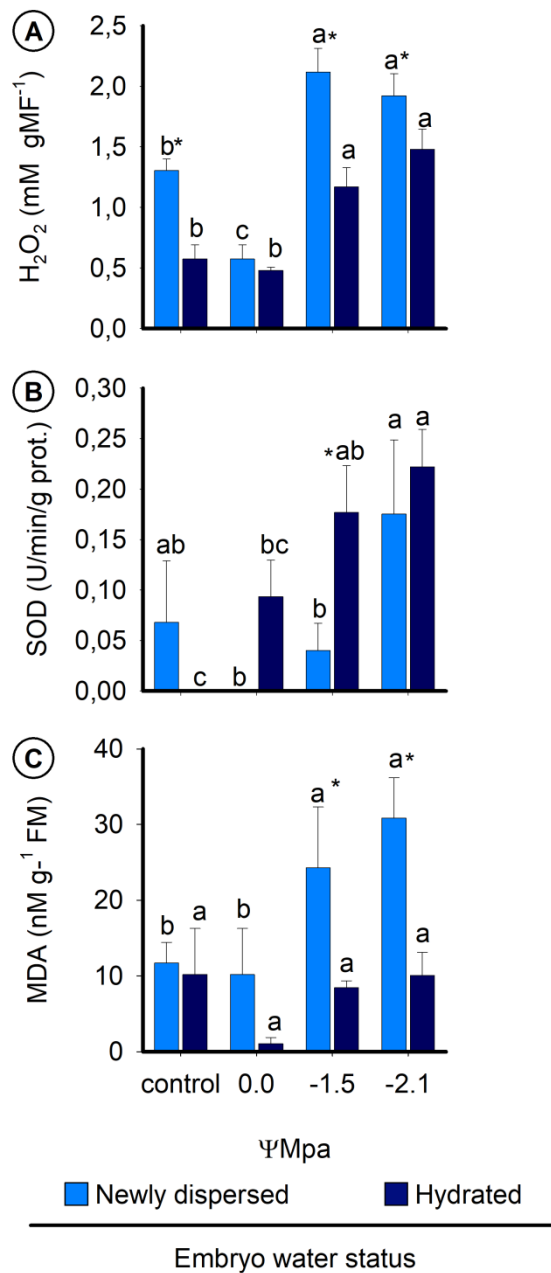
Different letters within each freshly dispersed or hydrated condition indicate that the treatments differed statistically from each other; asterisk (\*) indicates difference between freshly dispersed and hydrated treatments by Duncan's test, ( $P \leq 0,05$ ). Bars represent standard error of the mean. cm, central ground meristem; lm, lateral ground meristem; om, outer layer of the ground meristem; pr, protoderm; ps, procambial strands.



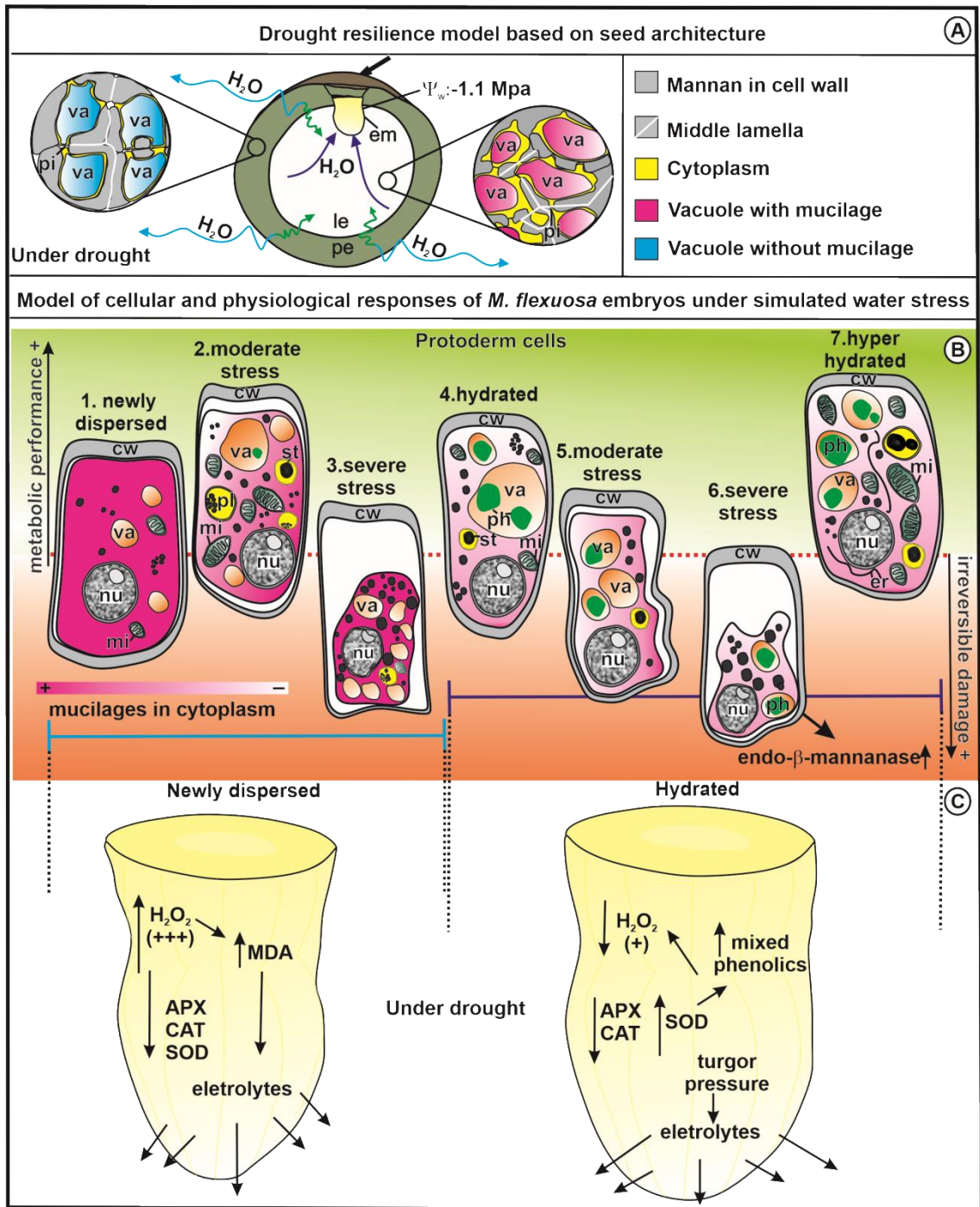
**Fig. 10.** Electrical conductivity of the test solution, after immersion of freshly dispersed or hydrated *Mauritia flexuosa* embryos in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Different letters within each freshly dispersed or hydrated condition indicate that the treatments differed statistically from each other; asterisk (\*) indicates difference between freshly dispersed and hydrated treatments by Duncan's test, ( $P \leq 0,05$ ). Bars represent standard error of the mean.



**Fig. 11.** Endo-β-mannanase activity after immersion of freshly dispersed or hydrated *Mauritia flexuosa* embryos in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Different letters within each freshly dispersed or hydrated condition indicate that the treatments differed statistically from each other; asterisk (\*) indicates difference between freshly dispersed and hydrated treatments by Duncan's test, ( $P \leq 0,05$ ). Bars represent standard error of the mean.



**Fig. 12.** Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) contents (A), SOD activity (B) and MDA contents (C) after immersion of freshly dispersed or hydrated *Mauritia flexuosa* embryos in osmotic solutions with different  $\Psi_w$ . Different letters within each freshly dispersed or hydrated condition indicate that the treatments differed statistically from each other; asterisk (\*) indicates difference between freshly dispersed and hydrated treatments by Duncan's test, ( $P \leq 0,05$ ). Bars represent standard error of the mean.



**Fig. 13.** Scheme representing cytological and physiological responses of *M. flexuosa* embryos to water stress. Dehydration resilience model based on seed architecture (A): water exit from peripheral endosperm in drought conditions (blue arrows); water influx into the lateral endosperm (green arrows); influx of water into the embryo (purple arrows). Protodermal cells of *M. flexuosa* embryos under different water stress conditions (B): dashed red line, represents the control condition, variations in the position of the cells up or down,

represent increased metabolic performance or irreversible damage, respectively. Representation of the physiological status of *M. flexuosa* embryos under water stress conditions (C). cw, cell wall; em, embryo; er, endoplasmic reticulum; le, lateral endosperm; mi, mitochondria; nu, nucleus; pe, peripheral endosperm; ph, mixed phenolics; pl, plastid; st, starch; va, vacuole.

## Capítulo II

**A dinâmica de reservas seminais e o sistema antioxidante modulam a resiliência ao estresse hídrico em plântulas de *Mauritia flexuosa* (Arecaceae)**

\*Artigo escrito nas normas do periódico Plant Diversity.

**A dinâmica de reservas seminais e o sistema antioxidante modulam a resiliência ao estresse hídrico em plântulas de *Mauritia flexuosa* (Arecaceae)**

Guilherme Pereira Dias <sup>a</sup>, Leonardo Monteiro Ribeiro <sup>b</sup>, Hellen Cássia Mazzottini dos Santos <sup>b</sup>, Yule Roberta Ferreira Nunes <sup>b</sup>, Marcel Giovanni Costa França <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*

<sup>b</sup> *Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Rui Braga, Vila Mauricéia, 39401-089, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil*

**Resumo:** *Mauritia flexuosa* é uma palmeira neotropical de origem amazônica que expandiu seus domínios para o ambiente sazonal do Cerrado. A espécie, típica de ambientes alagados, produz sementes recalcitrantes (sensíveis à dessecação), mas plântulas tolerantes ao déficit hídrico. Nosso objetivo foi avaliar o efeito desse estresse sobre a dinâmica de reservas seminais e o desenvolvimento pós-germinativo na espécie. Plântulas tiveram o potencial hídrico determinado na parte aérea e haustório (limbo cotiledonar), e foram cultivadas sob estresse moderado ( $\Psi_w = -0.9$  MPa) e severo ( $\Psi_w = -2.1$  MPa), por 30 dias. Foram realizadas avaliações biométricas, anatômicas, histoquímicas e fisiológicas por meio da quantificação de  $H_2O_2$  e MDA, histolocalização do  $O_2^-$ , avaliação da atividade de endo- $\beta$ -mananase e de enzimas do sistema antioxidante - CAT, SOD e APX. O haustório tem papel central na resiliência de plântulas de *M. flexuosa* à desidratação, uma vez que ajusta seu potencial hídrico, de modo a manter a absorção de água e nutrientes, mesmo em condições de baixa disponibilidade hídrica. Em condição de déficit hídrico, o haustório tem crescimento restrito e ocorre acúmulo de reservas parcialmente degradadas na zona de digestão, o que favorece a retenção de água na semente. A atividade de endo- $\beta$ -mananase se eleva no endosperma rico em manano e adjacente ao embrião, sob estresse hídrico moderado. Também sob estresse moderado, o desenvolvimento de raízes é priorizado em relação à parte aérea, o que contribui para manutenção de um *status* hídrico favorável. As plântulas apresentam sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos responsivos ao estresse hídrico, tanto na parte aérea quanto no haustório, que auxiliam na promoção da homeostase oxidativa. A resiliência das plântulas de *M. flexuosa* ao estresse hídrico envolve sofisticado ajuste na dinâmica de reservas e atuação de sistema antioxidante eficiente, o que contribui para seu sucesso reprodutivo e adaptação a essa sazonalidade ambiental.

**Palavras chave:** Sensibilidade à dessecação; Estresse abiótico; Estabelecimento de plântulas

## 1. Introdução

O estabelecimento das plântulas no ambiente compreende a fase mais vulnerável do ciclo de vida das plantas (Tarnawa et al.2023; Chaib et al., 2023). Fatores bióticos (herbivoria e infecção por patógenos) ou abióticos (seca, salinidade, temperatura e toxicidade por metais) podem causar estresses capazes de induzir alterações celulares estruturais e metabólicas, especialmente durante o desenvolvimento pós-germinativo. O déficit hídrico é especialmente prejudicial, uma vez que, após a germinação, normalmente, ocorre redução na tolerância à dessecação e as vias de translocação de reservas seminais ocorrem em meio aquoso (Dias et al.,2020). Em ambientes tropicais sazonais como o Cerrado, a germinação está, na maioria dos casos, alocada na estação chuvosa (Escobar et al 2018). Entretanto, estiagens ocasionais podem ocorrer nestas ocasiões, o que é cada vez mais recorrente, em função das mudanças climáticas globais (Lewandrowski et al., 2021; Chaib et al., 2023). Além disto, as queimadas, comuns nestes habitats, podem amplificar ainda mais o estresse (Oliveira et al., 2005). Este cenário ambiental inevitavelmente restringe o desenvolvimento de plântulas e oferece desafios à perpetuação de espécies nativas.

Em resposta ao déficit hídrico, em sementes e plântulas, são comuns desordens metabólicas como o estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS), altamente danosas aos sistemas de membranas celulares (Mittler, 2002; Bailly, 2004; et al., 2008). Enzimas componentes do sistema antioxidante, principalmente catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX), contribuem para neutralização dos efeitos nocivos das principais ROs, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o íon superóxido ( $O_2^-$ ) (Mittler, 2002; Das and Roychoudhury, 2014). Compostos fenólicos também são antioxidantes poderosos e sua produção pode ser estimulada durante o desenvolvimento inicial em resposta a desidratação (Chen et al., 2016; Xu et al.,2018). Por outro lado, quando bem controladas, as ROs atuam como mensageiras químicas e promovem a atividade de enzimas relacionadas à mobilização de reservas (Das and Roychoudhury, 2014; Wojtyla et al., 2016; Dias et al.,2018). A compreensão das respostas fisiológicas ao estresse oxidativo, promovido pela desidratação, em espécies de ambientes tropicais, ainda são limitadas, especialmente nos estágios de estabelecimento das plântulas.

As sementes em *Arecaceae* são consideradas modelos para o estudo da mobilização de reservas, pela variedade e abundância de compostos armazenados, no simplasto e apoplasto

(Dias et al.,2018; Dias et al.,2020). Durante o desenvolvimento pós germinativo das palmeiras, vias antagônicas de desenvolvimento são estabelecidas: o crescimento do haustório (limbo cotiledonar especializado na mobilização de reservas) e a degradação e translocação dos compostos do endosperma para o eixo vegetativo (Mazzottini dos Santos et al.,2017). O endosperma de Arecaceae é rico em mananos, nas paredes celulares, cuja mobilização é intermediada pela endo- $\beta$ -mananase, principal enzima de digestão no apoplasto (Buckridge et al.,2000; 2010; Dias et al.,2020). O haustório é o órgão centralizador do processo digestivo, responsável pela ativação das mananases (previamente armazenadas no simplasto do endosperma), um processo mediado por ROS (Dias et al.,2018). Além disto, a estrutura atua no catabolismo, absorção; transporte e armazenamento transitório de reservas (Demason et al.,1985; Alang et al. 1988; Ribeiro et al.,2015). Embora o mecanismo de mobilização de reservas em sementes de palmeiras seja conhecido, os estudos consideraram condições hídricas ótimas, portanto, não se sabe qual é a influência da seca sobre a dinâmica de reservas seminais, especialmente sobre como a mananase opera em condições de estresse hídrico.

*Mauritia flexuosa*, buriti, é considerada a palmeira mais abundante do Brasil; de origem amazônica, a espécie ocorre também no bioma Cerrado (de clima marcadamente sazonal), em ambientes de vereda, um ecossistema pantanoso (Silva et al., 2014; Porto et al.,2018). As sementes de buriti são recalcitrantes (*i.e* intolerantes à desidratação) e a adaptação da espécie em ambientes constantemente úmidos, selecionou um metabolismo de reservas singular, com a dependência de altos níveis de hidratação, sobretudo, para a digestão das espessas paredes celulares (Dias et al.,2020). Estudos recentes demonstram a resiliência à desidratação em plantas jovens de *M. flexuosa* (Almeida et al., 2024), entretanto, o desenvolvimento pós germinativo não foi ainda investigado, especialmente sobre a perspectiva da dinâmica de reservas.

Nosso objetivo foi avaliar o efeito do estresse hídrico durante o desenvolvimento pós-germinativo de *M. flexuosa*. As seguintes questões foram endereçadas: i) Como é a dinâmica de mobilização de reservas seminais sob condições de déficit hídrico? ii) Quais são as respostas fisiológicas ao estresse oxidativo, devido ao estresse hídrico das plântulas?

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Coleta e procedimentos preliminares**

Frutos recém-dispersos de *M. flexuosa* foram coletados em setembro de 2023, em uma vereda localizada na Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros, município de Bonito de Minas, Minas Gerais, Brasil (15°19'49.70"S; 44°57'20.20"O). A cicatriz de abscisão de coloração amarelada foi considerada como indicativo de dispersão recente. Os frutos foram armazenados em água, durante 15 dias, para facilitar o despoldamento e com auxílio de estilete, foram despoldados manualmente e as sementes desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio 6%, por 15 min, seguido de três lavagens em água corrente. Sementes com sinal de deterioração por microrganismos e ou predação por insetos foram descartadas, as demais sementes foram armazenadas em sacos plásticos sob temperatura de 20°C, até o início dos experimentos (Veloso et al., 2016). O teor de água do lote de sementes foi determinado, em cinco repetições de cinco sementes, pelo método da estufa, comparando suas massas frescas e secas após desidratação a 105°C, por 24h (Brasil, 2009). A viabilidade do lote foi avaliada pelo teste de germinação, em cinco repetições de 10 sementes, que tiveram o opérculo removido para superação da dormência, em condições assépticas e, cultivadas em recipientes plásticos (17 cm x 12 cm x 6 cm) com tampa, contendo areia autoclavada e umedecida a 80% da capacidade de campo (Fig. 1B, C). O material foi mantido em câmara de germinação (EL 202/4, Eletrolab, São Paulo, Brasil), a 30°C, no escuro (Silva et al., 2014; Dias et al., 2020). A protrusão de 2 mm do pecíolo cotiledonar, foi considerada como indicativo morfológico da germinação (Ribeiro et al., 2011).

As veredas são fitofisionomias singulares que emergem em meio ao Cerrado, tipicamente savânico, onde ocorre o afloramento do lençol freático. Nestes ambientes, ocorrem variações na disponibilidade hídrica no solo que proporcionam a formação de zonas transicionais entre savana e pântano que, em conjunto com a sazonalidade, modulam a dinâmica dos bancos de sementes e plântulas (Porto et al., 2018; Salvador et al., 2022) (Fig. 1A). Considerando estas peculiaridades, avaliamos o desenvolvimento de plântulas de *M. flexuosa* submetidas a um gradiente hídrico, simulado experimentalmente, sobre a perspectiva da dinâmica de reservas seminais.

## **2.2 Determinação do potencial hídrico de estruturas das plântulas**

As sementes de *M. flexuosa* foram novamente desinfestadas e cultivadas como descrito anteriormente, até a emissão da primeira bainha foliar (Fig.1B-D). As plântulas foram retiradas das sementes e seccionadas em parte aérea e haustório. Para a determinação do potencial hídrico ( $\Psi_w$ ), as partes das plântulas foram imersas em soluções osmóticas distintas, preparadas com polietileno glicol (PEG 6000), agente osmótico inerte, atóxico e que não penetra nas membranas celulares (Michel e Kaufman, 1973), em concentrações ajustadas para induzir um déficit hídrico correspondente aos  $\Psi_{ws} = -0,3; -0,6; -0,9; -1,2; -1,5; -1,8$  e  $-2,1$  MPa. As plântulas foram mantidas no escuro à 25°C, como temperatura de referência (Michel e Kaufman, 1973). As massas frescas das plântulas foram mensuradas na condição inicial e após, 6, 12 e 24 horas de imersão nas soluções osmóticas, usando quatro repetições de 5 plântulas para cada concentração de PEG, a fim de se determinar a umidade e construir curvas de absorção de água. As variações dos teores de água do haustório e parte aérea foram calculadas e expressas em base seca. O  $\Psi_w$  foi estimado em cada intervalo de tempo avaliado, considerando-se a condição de equilíbrio do fluxo de água, pela adequação da equação quadrática, quando o  $\Psi_w \text{ plântula} = \Psi_w \text{ solução}$ , inferindo a estagnação do fluxo de água (Gonçalves et al., 2020).

### 2.3 Avaliações biométricas e sobrevivência das plântulas

Plântulas obtidas como descrito anteriormente, foram transferidas para recipientes plásticos com tampa e, vedados com plástico filme, contendo areia autoclavada e umedecida com água ultrapura (controle) e com soluções osmóticas, formuladas com PEG (Fig. 1D). Avaliações biométricas de comprimento e diâmetro, na porção mediana, foram realizadas da parte aérea, haustório e raiz principal, após 15 e 30 dias de cultivo. O teor de água dessas estruturas e do endosperma+envoltório seminal foi mensurado, pelo método da estufa (Fig.1E). As avaliações foram realizadas em quatro repetições de 5 plântulas para cada tratamento osmótico. A morfologia das plântulas, em secção longitudinal, foi documentada com câmera digital (sx520 hs, Canon, Tóquio, Japão), após 15 dias de cultivo. Adicionalmente, após 30 dias de cultivo em soluções osmóticas, quatro repetições de 5 plântulas foram transferidas para cultivo em areia umedecida com água, à 80% da capacidade de campo, por mais 30 dias, para se avaliar a sobrevivência e o potencial de recuperação das plântulas pelo desenvolvimento da parte aérea e da raiz, por parâmetros visuais.

## 2.4. Definição dos $\Psi_{ws}$ para as avaliações estruturais e fisiológicas

Para as avaliações estruturais e fisiológicas descritas a seguir, foram selecionados os  $\Psi_{ws}$  capazes de induzir estresses moderado e severo, além da condição controle em plântulas hidratadas. Segundo Walters et al, (2015) é importante considerar o estresse osmótico imposto, como modo de quantificar a resposta celular à desidratação. Os estresses foram definidos pela curva de absorção ou perda de água pela plântula, no haustório e parte aérea (Fig. 2), da seguinte forma; estresse moderado: restringe a absorção de água pela plântula, porém, não a bloqueia completamente ( $\Psi_w=-0.9\text{MPa}$ ); estresse severo: bloqueia a absorção de água e a capacidade de retenção pelas células, de modo que, há fluxo de água entre célula e solução de PEG ( $\Psi_w=-2.1\text{MPa}$ ).

## 2.5 Avaliações estruturais

### 2.5.1 Avaliações anatômicas e histoquímicas

Para cada um dos tratamentos descritos, fragmentos transversais da porção mediana do haustório aderido ao endosperma circundante foram seccionados com auxílio de guilhotina e estilete após: 3; 7 e 15 dias de cultivo e, foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965), desidratados em série etílica e incluídos em (2-hidroxietil) metacrilato (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), de acordo com Paiva et al. (2011). Secções transversais (5  $\mu\text{m}$  de espessura) foram obtidas com uso de micrótomo rotativo, coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien et al., 1964, modificado) e as lâminas foram montadas em resina acrílica (Itacril, Itaquaquetuba, Brasil).

Testes histoquímicos foram realizados com ácido periódico e reagente de Schiff (PAS) (Feder e O' Brien, 1968), para identificação de polissacarídeos e Xilidine-Ponceau (Vidal, 1970), para proteínas. A heterocromasia do azul de toluidina foi utilizada para localização de

compostos fenólicos (Ribeiro e Leitão, 2020). As secções avaliadas em microscópio de luz e documentadas fotograficamente (Scope A1/Axiocam 105 Color, Zeiss, Jena, Alemanha).

## **2.6 Avaliações fisiológicas**

### **2.6.1 Avaliação da atividade de endo- $\beta$ -mananase**

Para as plântulas submetidas às diferentes condições experimentais, após 15 e 30 dias de cultivo, amostras de 5 mg foram obtidas, a partir de quatro repetições biológicas, compostas por cinco fragmentos de endosperma adjacente ao haustório, cada. As avaliações foram realizadas, segundo protocolo estabelecido por Pinho et al. (2014) onde as amostras foram maceradas com cadinho e homogeneizadas em tampão acetato de sódio a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . O material foi centrifugado por 45 min a  $16000 \text{ g}$  em temperatura de  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi removido, adicionado à solução de Locust Bean Gum Galactomannan 0,25% (Sigma, USA) preparado em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão acetato de sódio pH de 4,7 e mantido em banho termostático com agitação magnética (SI-153, Solab, Piracicaba, Brasil), a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 3 h. Os açúcares formados a partir da hidrólise foram submetidos à solução de 0,5% (p/v) de ácido hidroxibenzoico - hidrazida ácida (Sigma, EUA), 5% (p/v) preparada em meio ácido HCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e diluída em meio alcalino NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e a mistura mantida por 5 min em banho termostático a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . Na solução usada para eliminar interferentes do extrato que reagem com hidrazida ácida (branco), não foi adicionado o Locust Bean Gum Galactomannan (Sigma, USA). As análises foram realizadas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japão), no comprimento de onda de 398 nm. Os resultados obtidos a partir da curva de calibração foram convertidos para micromols ( $\mu\text{M}$ ) equivalentes de açúcares redutores por min / grama de massa fresca.

### **2.6.2 Quantificação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Após 3, 7 e 15 dias de cultivo, quatro repetições de 30 mg do haustório e da parte aérea de cada tratamento, foram maceradas em nitrogênio líquido. Em tubos Eppendorf de 2 mL foram

adicionadas 400  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O extrato vegetal foi homogeneizado em vortex por 1 min, e centrifugado a 10000 x g, durante 15 min, a 4°C. Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi extraída e adicionada a 250  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 1000  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio 1 M. Os tubos com a solução foram colocados no gelo sob ausência de luz por 1 h. As amostras permaneceram no escuro, em temperatura ambiente durante 20 min, para a estabilização da reação. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 390 nm e a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi expressa em  $\text{mM g}^{-1}$  de massa fresca, baseado em curva padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pré-estabelecida (Alexieva et al., 2001).

### **2.6.3 Localização histoquímica *in situ* do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ )**

Plântulas de *M. flexuosa* foram separadas do endosperma com auxílio de guilhotina e estilete, após 3 e 7 dias de cultivo, para cada tratamento ósmótico. As plântulas foram imersas em tampão de fosfato de sódio (Na) 10 mM (pH 7,8) contendo 0,1% de NBT (v/v). Em seguida, foram iluminadas por 30 min para a formação de manchas azul-escuras (precipitados de formazan azul). O material foi armazenado em solução de glicerol-etanol (1:4, v/v) até ser fotografado (Shi et al., 2010).

### **2.6.4 Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante**

Após 3, 7 e 15 dias de cultivo, amostras de 20 mg de haustório e da parte aérea, de cada tratamento, em quatro repetições, foram obtidas com maceração em nitrogênio líquido. O extrato vegetal foi homogeneizado em PVPP 10% m/v, 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8, 10  $\mu\text{L}$  de EDTA 100  $\mu\text{M}$  e 490  $\mu\text{L}$  de água desionizada, em vortex, por 1 min. Os extratos foram centrifugados a 10000 g, a 4°C, por 15 min. A atividade da CAT, APX e SOD foi determinada em 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante. A atividade SOD foi determinada adicionando-se o extrato a uma solução contendo metionina 13 mM, NBT 75  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  de EDTA de riboflavina 2  $\mu\text{M}$  e tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8. Os tubos foram iluminados em câmaras compostas por tubos fluorescentes de 15 W a 25 °C. Após 10 min de incubação, o término da atividade foi determinado pela interrupção da luz. Reações controle foram mantidas no escuro por 10 min. O composto azul de formazana foi analisado em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 575 nm. Uma unidade de SOD foi

definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50 % da fotorredução do NBT. Os resultados foram demonstrados em U min / mg proteína (Giannopolitis e Ries, 1977). Para a determinação da atividade CAT foi adicionado o extrato ao tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, acrescido no momento da análise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recém preparado (12,5 mM). A análise foi realizada em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 240 nm, por 1 min. A atividade da CAT foi estimada, usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) igual a 39,4 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Cakmak e Horst, 1991) e os resultados foram expressos em  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min / mg proteína. A atividade APX foi determinada pela adição do extrato ao tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,8) e no momento da análise, ascorbato 0,25 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0 mM. A taxa de oxidação do ácido ascórbico foi acompanhada por 1 min, registrando os valores de absorvância a 290 nm a cada 10 s em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japão). A atividade de APX foi determinada utilizando  $\epsilon$  igual a 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e os resultados foram expressos em  $\mu$ M de ascorbato min / mg proteína (Nakano e Asada, 1981).

#### **2.6.5. Quantificação do indicador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA)**

Após 3, 7 e 15 dias de cultivo, quatro repetições de 30 mg do haustório e da parte aérea, de cada tratamento, foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionadas a 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % (m/v). Após homogeneização em vórtex por 1 min as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 min. 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 min a 95 °C e, em seguida, foi resfriada no gelo, por 10 min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japão) em comprimentos de onda de 532 e 660 nm. Interferentes foram eliminados pela subtração dos valores 532-660 e a quantidade de MDA foi expressa em nM / g massa fresca (Health e Packer, 1968, adaptado).

#### **2.7. Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e avaliado em esquema fatorial, considerando-se o fator A como o tempo de cultivo e o fator B como os potenciais hídricos

aplicados. As médias foram submetidas à análise de variância e, quando constatadas diferenças significativas, foram agrupadas pela similaridade pelo teste de Scott-knott, para parâmetros biométricos. Para as avaliações bioquímicas (estresse oxidativo e atividade da endo- $\beta$ -mananase), as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, ( $P \leq 0,05$ ). Foi utilizado o software R versão 4.2.2. Pacote *Easyanova*, versão 8.0.

### 3. Resultados

#### 3.1 Relações hídricas das plântulas

Na fase de emissão da primeira bainha foliar, após 10 dias da germinação, o haustório das plântulas apresentou teor de água de  $4,94 \text{ gH}_2\text{O gDM}^{-1}$  e  $\Psi_w = -1,5 \text{ MPa}$ , após 24h de avaliação (Fig. 2A). Quando submetido a soluções com  $\Psi_w$  igual ou superior a  $-1,8 \text{ MPa}$ , no período de 0 a 6 horas, o haustório foi capaz de absorver água. Entre 6 e 12 horas, a absorção de água pelo haustório foi observada em soluções com  $\Psi_w$  igual ou superior a  $-1,5 \text{ MPa}$ , de modo que, a capacidade para absorção de água, foi gradativamente reduzida ao longo do tempo e, ao final de 24 h, soluções com  $\Psi_{ws}$  iguais ou inferiores à  $-1,2 \text{ MPa}$  foram capazes de retirar água do haustório. A parte aérea apresentou teor de água de  $6,49 \text{ gH}_2\text{O / gDM}^{-1}$  e,  $\Psi_w = -1 \text{ MPa}$ , após 24h. No período compreendido entre 0 e 6 h, a parte aérea absorveu água em soluções com  $\Psi_w$  igual ou superior a  $-1,2 \text{ MPa}$ , com redução gradativa da capacidade hídrica, de modo que, entre 12 e 24 horas,  $\Psi_{ws}$  iguais ou inferiores à  $-0,9 \text{ MPa}$  foram capazes de remover água (Fig. 2B). Para as avaliações descritas a seguir, para ambas as estruturas, a partir da curva de absorção/perda de água (Fig. 2A-B) foram definidos os estresses moderado aquele que reduz a capacidade de absorção de água e o severo aquele que bloqueia totalmente a capacidade de absorver e reter água), cujos potenciais hídricos respectivos foram  $-0,9 \text{ MPa}$  e  $-2,1 \text{ MPa}$ .

#### 3.2 Biometria e sobrevivência das plântulas

As plântulas da condição inicial, 10 dias após a germinação, apresentaram uma estrutura bulbosa, correspondente à lígula expandida (Moura et al., 2019), que envolve a primeira bainha foliar (Fig. 3A). O desenvolvimento pós germinativo é do tipo adjacente ligular,

caracterizado pelo alongamento restrito do pecíolo cotiledonar. O haustório cresce para o interior do endosperma e, na interface, se estabelece a zona de digestão. O envoltório seminal é marrom escuro e reveste o endosperma, o qual apresenta uma porção periférica acinzentada, e uma porção lateral esbranquiçada, ambas, extremamente rígidas.

As plântulas de *M. flexuosa* cultivadas sob diferentes condições hídricas, apresentaram diferenças no padrão morfológico de desenvolvimento ao longo do tempo (Fig. 3A-F). Após 15 dias de cultivo, as plântulas não submetidas ao estresse osmótico, apresentaram crescimento pronunciado da primeira bainha foliar, haustório e da raiz principal (Fig. 3B). Com a aplicação dos potenciais hídricos decrescentes, houve a estagnação gradual do desenvolvimento de plântulas (Fig. 3C-F). O estresse severo ( $\Psi_w = -2.1$  MPa) promoveu a formação de uma conspícua zona de digestão (Fig. 3F).

As médias dos atributos biométricos foram agrupadas por similaridade, em letras ordenadas decrescentes, pelo teste de Scott Knott, tendo o controle como referência. Os valores absolutos e relativos podem ser vistos nas Figuras 4A-F e 5A-G. Todos os  $\Psi_{ws}$  aplicados reduziram a capacidade de crescimento em comprimento da parte aérea em comparação com a condição controle (Fig. 4A). Houve diferença estatística entre 15 e 30 dias, evidenciando a capacidade de desenvolvimento da parte aérea até o  $\Psi_{ws}$  de  $-0.6$  MPa, ao longo do tempo. Aos 30 dias de cultivo, o grupo ‘d’, que englobou o estresse moderado, reduziu 73% da capacidade de crescimento em comparação ao controle e, o grupo ‘e’ do estresse severo,  $\Psi_{ws}$  inferiores à  $-0.9$  MPa, reduziram 82,2%. O diâmetro foi maior aos 15 dias, comparado aos 30 dias, em todos os  $\Psi_{ws}$  aplicados, exceto na condição controle (Fig. 4D). A massa seca da parte aérea aumentou no controle e, quando plântulas foram submetidas a  $\Psi_w = -0.3$  MPa, entre 15 e 30 dias, sendo que, aos 30 dias, plântulas submetidas à  $\Psi_{ws}$  inferiores à  $-0,6$  MPa, apresentaram a massa seca da parte aérea similar, com redução de 85% comparado ao controle (Fig. 5A). O teor de água da parte aérea não variou entre 15 e 30 dias ( $M = 3,83 \text{ gH}_2\text{O} / \text{gDM}^{-1}$   $P = 0,28$ ), porém, reduziu 55% com a aplicação dos  $\Psi_{ws}$  que promoveram estresse moderado e severo (grupo ‘d’), de forma similar (Fig. 5D).

O haustório apresentou desenvolvimento contínuo, em comprimento, independente do  $\Psi_w$  empregado no cultivo das plântulas, ao longo do tempo (Fig. 4B). Todos os potenciais hídricos aplicados promoveram redução do comprimento do haustório, em comparação ao controle, de modo que, aos 30 dias de cultivo, o haustório de plântulas submetidas aos estresses moderado e severo reduziram 23% e 36%, respectivamente, da capacidade de

desenvolvimento, em relação ao controle. O crescimento em diâmetro foi limitado, entre 15 e 30 dias, com a aplicação de  $\Psi_{ws}$  menores do que -1.2 MPa, com exceção do  $\Psi_w=-0.9$ MPa (Fig. 4E). Aos 30 dias, o diâmetro do haustório reduziu 51%, de forma similar, para plântulas submetidas aos estresses moderado e severo. A massa seca do haustório aumentou entre 15 e 30 dias em plântulas do tratamento controle e, quando as mesmas foram submetidas aos  $\Psi_{ws}=-0,3, -0,6, -0,9$  e  $-2,1$  Mpa. Aos 30 dias de cultivo, haustórios de plântulas submetidas aos estresses moderado e severo reduziram 58 e 69%, respectivamente, a massa seca, em relação ao controle (Fig. 5B). O teor de água do haustório aumentou 6% entre 15 e 30 dias (Fig. 5E), porém, não houve interação significativa entre tempo e  $\Psi_{ws}$  ( $P=0,0972$ ). Entretanto, houve diferença entre os  $\Psi_{ws}$ , com aumento de 9% do teor de água do controle em relação à condição inicial e, uma redução gradual com a aplicação de todos os  $\Psi_{ws}$  negativos, exceto no estresse severo, onde houve recuperação do teor de água para níveis similares aos encontrados no haustório de plântulas sob estresse moderado (Fig. 5 F).

As raízes apresentaram crescimento contínuo em comprimento entre 15 e 30 dias, com a imposição de  $\Psi_{ws}$  até -0.9 MPa (Fig.4C). Aos 30 dias, o estresse moderado causou redução de 78% no potencial de crescimento da raiz, comparado às plantas de referência e, o estresse severo, 92% (grupo 'e'), cujo desenvolvimento, estagnou a partir da aplicação do  $\Psi_w=-1.2$  MPa. Apenas o  $\Psi_w=-2.1$  MPa, promoveu redução do diâmetro das raízes. Não houve diferença estatística entre as médias dos diâmetros de raízes ao longo dos tempos avaliados ( $M=2,79$  mm;  $P=0.8299$ ) (Fig. 4F). A massa seca das raízes aumentou de forma correspondente ao crescimento em comprimento, entre 15 e 30 dias, demonstrando que, mesmo em  $\Psi_{ws}$  até -0,9 MPa houve aumento da massa ao longo do tempo. Aos 30 dias, a massa seca das raízes de plântulas sob estresse moderado diminuiu 72% e quando sob estresse severo 93% (Fig. 5C). A redução do teor de água das raízes foi gradativa, com redução de 41% para plântulas sob estresse moderado e, 78% sob estresse severo (Fig. 5G). O endosperma não apresentou variação no teor de água com a aplicação dos  $\Psi_{ws}$  ( $M=0,8674$  g H<sub>2</sub>O/g MS;  $P=0,4108$ ) e tempo ( $M=0,8674$  g H<sub>2</sub>O/g MS;  $P=0,3361$ ).

Plântulas reidratadas, por 30 dias, após passarem pelos estresses moderado e severo, apresentaram o percentual de sobrevivência de 85 e 34%, respectivamente, e todas apresentaram recuperação do desenvolvimento da parte aérea. Entretanto, do total de plântulas sobreviventes, 80% apresentaram recuperação do desenvolvimento da raiz, para o estresse moderado e, 25% para o estresse severo.

### 3.3 Anatomia

O haustório de *M. flexuosa*, após três dias de cultivo, apresentou células da epiderme alongadas radialmente e, justapostas, com núcleos evidentes (Fig.6A) As células parenquimáticas do haustório eram globosas e, visivelmente menores nas camadas subepidérmicas, com aumento gradual das dimensões, em direção centrípeta. Células epidérmicas e, camadas de células parenquimáticas adjacentes à epiderme, apresentaram divisões celulares e, feixes vasculares margeavam a estrutura. O endosperma lateral apresentou células com paredes celulares notavelmente espessas e, vacúolo volumoso, contendo mucilagens coradas intensamente de roxo. O citoplasma era restrito a uma fina camada na periferia do protoplasto, contendo inúmeros campos de pontuação primários, fazendo a conexão entre as células. O endosperma adjacente ao haustório apresentou a zona de digestão, composta por células colapsadas na interface com o haustório e, camadas de células circunvizinhas, hialinas, com conteúdo mobilizado. Após sete dias de cultivo, na condição controle, não foram observadas alterações visíveis no haustório (Fig. 6B). A zona de digestão do endosperma adjacente apresentou pequeno aumento no número de camadas de células hialinas, comparado aos três dias. Após 15 dias, na condição controle, o haustório apresentou compostos fenólicos na epiderme, mucilagens foram marcadas nos feixes vasculares e espaços intercelulares foram evidenciados no parênquima (Fig. 6C). No endosperma, o número de camadas de células colapsadas aumentou significativamente, em relação aos períodos anteriores (Fig. 6D).

Plântulas submetidas ao estresse moderado ( $\Psi_w = -0,9$  MPa), após três dias de cultivo, apresentaram compostos fenólicos na epiderme do haustório (Fig. 6E) e, inúmeras divisões celulares, as quais, também foram observadas no parênquima. A zona de digestão do endosperma foi maior em comparação ao controle ( $\Psi_w = 0$  MPa), no mesmo período de avaliação. Após sete dias de cultivo sob estresse moderado, não foram observadas alterações visuais na anatomia do haustório em comparação à três dias (Fig. 6F). A zona de digestão do endosperma era visivelmente menor, comparada ao período anterior de avaliação (Fig. 6G). Aos 15 dias de cultivo sob estresse moderado, o haustório apresentou conspícuos espaços intercelulares no parênquima e, compostos fenólicos foram marcados na epiderme (Fig. 6H). A zona de digestão tinha extensão similar ao observado aos três dias, entretanto, comparado

ao controle, as células colapsadas do endosperma eram menos sobrepostas (menor grau de colapsamento) (Fig. 6I).

Para as plântulas submetidas ao estresse severo ( $\Psi_w = -2,1$  MPa), após três dias de cultivo, os aspectos anatômicos do haustório foram similares aos da condição controle (Fig. 6J). A zona de digestão apresentou apenas duas a três camadas de células hialinas. Após sete dias de cultivo, havia acúmulo de fenólicos no parênquima do haustório (Fig. 6K), e o número de camadas de células hialinas aumentou no endosperma, comparado aos três dias de cultivo (Fig. 6L). Após 15 dias de cultivo, em plântulas submetidas ao estresse severo, a epiderme do haustório apresentou inúmeras divisões anticlinais e células pouco expandidas, comparado ao controle (Fig. 6M). No endosperma, observou-se apenas uma fina camada de células colapsadas circundando o haustório; as demais camadas de células hialinas da zona de digestão, apresentavam-se com paredes celulares mais delgadas, comparado aos 15 dias da condição de plântulas não submetidas ao estresse e estresse moderado. Estes resultados indicam que, o baixo potencial de crescimento do haustório, limita o esmagamento das células do endosperma adjacente.

### 3.4 Histoquímica

Em todos os tempos de avaliação, em função dos potenciais hídricos aplicados, proteínas foram identificadas na periferia do haustório (células epidérmicas, feixes vasculares e parênquima subepidérmico), e no endosperma (Fig. 7 A-O). Após três dias de cultivo, na condição controle, proteínas foram evidenciadas compondo a mucilagem, nos vacúolos das células do endosperma lateral e, na fina camada do citoplasma, restrito a periferia do protoplasto (Fig. 7A, C). A região de transição entre endosperma lateral e endosperma adjacente, foi claramente evidenciada pela mobilização do conteúdo do vacúolo e pela presença de proteínas que se internalizam nas paredes celulares, a partir do citoplasma (Fig. 7C). A continuidade desse processo estabelece a zona de digestão (Fig. 7A, D- E, G- H, J, L, M-N, O-P).

Após três dias de cultivo, polissacarídeos neutros, marcados com PAS, estavam presentes nas células do haustório compondo as paredes celulares, e no protoplasto das células da epiderme (Fig. 8A). Grãos de amido também foram evidenciados nas células da epiderme e do parênquima do haustório. No endosperma lateral, carboidratos foram marcados no

vacúolo, compondo a mucilagem, na fina camada de citoplasma e na porção interna da parede celular. Nas células do endosperma adjacente (zona de digestão), toda a extensão da parede celular foi corada intensamente. Este padrão de detecção de carboidratos descrito foi observado para todas as condições de cultivo, ao longo do tempo (Fig. 8 A-N). Variações na abundância de acúmulo de grãos de amido foram observadas, destacando-se o aumento expressivo aos sete e 15 dias, em haustórios de plântulas, sob estresse severo (Fig. 8 L, N), comparado aos mesmos períodos de avaliação na condição controle e estresse moderado.

### 3.5 Atividade da endo- $\beta$ -mananase

Aos 15 dias de cultivo, não foi observada diferença entre as médias de atividade da endo- $\beta$ -mananase no endosperma adjacente das plântulas submetidas aos diferentes  $\Psi_{ws}$  ( $M= 84,74$   $\mu\text{m}$  equivalentes de açúcares redutores /  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$ ;  $P=0,1081$ ). Entretanto, aos 30 dias de cultivo, houve aumento da atividade enzimática, em plântulas submetidas ao estresse moderado (Fig. 9).

### 3.6 Localização histoquímica *in situ* do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ )

O ânion superóxido foi localizado apenas no haustório das plântulas controle e das plântulas submetidas ao estresse moderado e severo, aos 3 e 7 dias de cultivo (Fig.10).

### 3.7 Estresse oxidativo

Os teores de peróxido de hidrogênio aumentaram na parte aérea de plântulas submetidas ao estresse severo (Fig. 11A), entretanto, não houve diferença entre os tempos avaliados ( $M=0,56 \text{ mM g}^{-1} \text{MF}$ ;  $P=0,0822$ ). A atividade de CAT também aumentou concomitantemente ao aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , na parte aérea de plântulas submetidas ao estresse severo (Fig. 11 B). As médias de atividade de CAT para as plântulas submetidas ao estresse moderado foram similares aos valores obtidos no estresse severo. Não houve diferença estatística na atividade

de CAT entre os tempos avaliados ( $M= 610 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg} . \text{prot}$ ;  $P=0,0626$ ). As médias da atividade de APX para a parte aérea, não seguiram a distribuição normal pelo teste de Shapiro Wilk ( $P=0,0014$ ) e, foram submetidas ao teste de Kruskal Wallis, que indicou diferença apenas, entre os tempos avaliados, com aumento da atividade da enzima aos 7 dias (Fig. 11 C), comparado aos demais, pelo teste de T. A aplicação dos potenciais hídricos não influenciou na atividade da enzima, na parte aérea ( $M=0,2574 \mu\text{mol AsA} / \text{mg prot.} / \text{min}$ ;  $P=0,3141$ ). A atividade de SOD, não variou na parte aérea, com a aplicação dos  $\Psi_{ws}$  ( $M=0,0512 \text{ U/min/g prot.}$ ;  $P=0,4368$ ), porém, variou entre os tempos avaliados, com maior atividade aos três dias de cultivo comparado à sete e 15 dias (Fig. 11 D), cujas as médias foram similares. Os teores de MDA não variaram na parte aérea, em função do tempo ( $M=268,69 \text{ nM g}^{-1} \text{ MF}$ ;  $P=0,2038$ ) e potenciais hídricos aplicados ( $M=268,69 \text{ nM g}^{-1} \text{ MF}$ ;  $P=0,2213$ ).

As médias dos teores de peróxido de hidrogênio não apresentaram diferenças ao longo do tempo ( $M=0,1443 \text{ mM g}^{-1} \text{ MF}$ ;  $P=0,1078$ ) e, com a aplicação dos  $\Psi_{ws}$  ( $M=0,1443 \text{ mM g}^{-1} \text{ MF}$ ;  $P=0,6664$ ). CAT também não apresentou variação da atividade, para nenhum dos fatores avaliados no haustório, sendo o tempo ( $M=654,27 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg} . \text{prot}$ ;  $P=0,741$ ) e  $\Psi_{ws}$  ( $M=654,27 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg} . \text{prot}$ ;  $P=0,776$ ), assim como, APX ao longo do tempo ( $M=0,341 \mu\text{mol AsA} / \text{mg prot} / \text{min}$ ;  $P=0,99$ ) e com aplicação dos  $\Psi_{ws}$  ( $M=0,341 \mu\text{mol AsA} / \text{mg prot} / \text{min}$ ;  $P=0,1587$ ). A atividade de SOD aumentou no haustório, com a aplicação de estresse moderado e severo, de forma similar, em relação ao controle (Fig. 11F). Entretanto, a atividade da enzima foi maior aos 3 dias, comparado aos demais (Fig. 11G). Os teores de MDA aumentaram gradativamente no haustório, com o estresse imposto (Fig. 11E), porém, não houve diferença ao longo do tempo ( $M=16,9 \text{ nM g}^{-1} \text{ MF}$ ;  $P=0,3593$ ).

#### 4. Discussão

Este manuscrito constitui o primeiro relato sobre a influência do déficit hídrico sobre a mobilização de reservas seminais, durante o desenvolvimento pós-germinativo em palmeiras. Uma representação sintética dos principais efeitos do estresse moderado e severo, sobre a dinâmica de reservas, bem como, os mecanismos de resiliência em sementes de *M. flexuosa*, pode ser vista na figura 12

#### 4.1 Dinâmica de mobilização de reservas seminais em condições de déficit hídrico

O haustório tem papel central na resiliência de plântulas de *M. flexuosa* à desidratação. Dez dias após a germinação, o haustório apresentou  $\Psi_w = -1,5$  MPa, o qual é capaz de induzir a absorção de água e nutrientes, mesmo em condições de baixa disponibilidade hídrica (Fig. 2A; Fig. 12A). É interessante notar que, o haustório é a única estrutura da plântula que, mesmo submetida à escassez hídrica, desenvolve-se ao longo do tempo (Fig. 4B, E), embora o seu crescimento seja correspondente à quantidade de água alocada para si (Fig. 5F). Diversos trabalhos já haviam estabelecido as funções de absorção aos haustórios das palmeiras (Demason et al., 1985; Alang, 1988; Mazzottini dos Santos et al., 2017; Dias et al., 2018; Dias et al., 2020; Fonseca et al., 2023), no entanto, nenhum deles determinou o  $\Psi_w$  definidor da capacidade hídrica, *i.e.*, capacidade de absorver ou reter água (Gonçalves et al., 2020), o que é crucial para a dinâmica das reservas seminais. Dias et al. (2024) relataram que embriões de buriti, embora altamente recalcitrantes, respondem positivamente ao estresse hídrico moderado, pelo incremento do metabolismo, culminando na eventual germinação e no desenvolvimento pós-germinativo nestas condições. Os resultados apresentados a seguir, permitem a compreensão de alguns mecanismos de resiliência que podem auxiliar no entendimento da estratégia de adaptação da espécie que forma banco de plântulas em microambientes mais secos das veredas (Fig. 1A) (Porto et al., 2018; Salvador et al., 2022).

Em condição de déficit hídrico as reservas parcialmente degradadas e não absorvidas pelo haustório de *M. flexuosa*, concentram-se na zona de digestão, este mecanismo promove a redução do  $\Psi_w$  e favorece a retenção de água na semente. O bloqueio da entrada água em plântulas sob estresse severo (Fig. 2A-B) limita o crescimento do haustório (Fig. 3F; Fig. 4B, E; Fig. 5B), deste modo, a pressão contra o endosperma adjacente é atenuada e a zona de células colapsadas (zona absorptiva), não é continuamente estabelecida. No entanto, sinais para a mobilização do endosperma adjacente ao haustório são emitidos, o que promove um raio extenso de células com conteúdo hidrolisado na zona pré-absortiva, com redução do potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) (Fig. 6 M; Fig.7 O-P; Fig. 8 N; Fig. 12A). O elevado conteúdo de água, característico das sementes recalcitrantes (Berjak e Pammenter, 2007), é então direcionado para a zona de digestão, pelo fluxo de energia livre, cuja força de atração entre as moléculas torna-se expressiva o suficiente para promover a homeostase hídrica da semente (Fig. 12 A-B). Além disso, a presença de mucilagens altamente hidrofílicas nos vacúolos das células

endospérmicas de *M. flexuosa*, também contribui para o aprisionamento da água no simplasto (Dias et al., 2020; 2024).

No caso de plântulas sob estresse moderado, a dinâmica é similar, porém, a força de atração gerada pelos osmólitos na zona de digestão, permite que a água externa, mesmo condicionada à resistência ( $\Psi_w = -0.9\text{MPa}$ ), seja alocada para dentro da semente (Fig. 12 A), propiciando o crescimento atenuado da plântula (Fig. 3D; Fig. 4A-C). Sabe-se que, a mobilização de reservas em sementes de palmeiras é iniciada por algum sinal, proveniente do haustório (Demason et al., 1985; Mazzottini dos Santos et al., 2017). Dias et al. (2018) sugeririam que o  $\text{O}_2$  assimilado nos embriões, a partir de estômatos diferenciados no pecíolo cotiledonar (Silva et al., 2014), e posteriormente direcionado ao haustório, participa das rotas de sinalização, através de suas formas modificadas e reativas, as ROs. Estas moléculas podem induzir a ativação das endo- $\beta$ -mananases, pré-armazenadas em vacúolos das células do endosperma adjacente (Demason et al., 1985; Sekhar e DeMason 1990; Zienkiewicz et al. 2014; Mazzottini dos Santos et al., 2017) e, assim iniciar um fluxo contínuo de mobilização. Embora o mecanismo de formação da zona de digestão seja conhecido, especialmente para sementes ortodoxas de palmeiras, nenhum trabalho investigou os efeitos da escassez hídrica na sua dinâmica, como relatado aqui, para as sementes recalcitrantes de *M. flexuosa*.

Dias et al. (2020) sugeriram um modelo de mobilização de paredes celulares ricas em mananos, no endosperma de *M. flexuosa*, sob condições hídricas ótimas, corroborado pelos nossos resultados (Fig. 12B). O processo inicia-se com a mobilização das mucilagens no vacúolo, via simplasto e, com o aumento de osmólitos compatíveis, a água é internalizada para si, favorecendo a turgidez do vacúolo e a pressão contra a fina camada do citoplasma, restrito à periferia do protoplasto, que abriga as endo- $\beta$ -mananases, promovendo assim, a internalização do conteúdo para a parede celular e a digestão centrífuga dos mananos (Fig. 7C, P; Fig. 12B). Em complemento a este modelo, nossos resultados permitem sugerir que a translocação da água das camadas periféricas de células endospérmicas, para as células da zona de digestão, seja preferencialmente via apoplástica, devido às propriedades hidrofílicas dos heteromananos (Buckeridge et al., 2010; Rodríguez-Gacio et al., 2012). Estes polissacarídeos são os principais componentes das matrizes das espessas paredes celulares em palmeiras, capazes de reter grandes quantidades de água, que pode ser translocada através dos poros, formados durante a deposição dos compostos (Buckeridge et al., 2000; 2010). Segundo Buckley (2015) o transporte apoplástico predomina substancialmente sobre o simplástico

durante a transpiração, o que reforça a nossa proposição. Além disso, em situações de déficit hídrico, a água aprisionada nas paredes celulares do endosperma de *M. flexuosa*, pode ser requerida mais facilmente, sem o dispêndio energético da via simplástica, que passa pela ação controladora da membrana plasmática. É provável que, a via transmembranar ocorra preferencialmente na zona de digestão, para a translocação de reservas, pelos numerosos campos primários de pontoação, após a sinalização influenciada pelo haustório (Fig. 12B).

Em condições de estresse severo, o haustório de *M. flexuosa* atua no armazenamento transitório de quantidades expressivas de amido (Fig. 8L, N), comprovado pelo aumento da sua massa seca entre 15 e 30 dias (Fig. 5B). Em condições hídricas ótimas, Dias et al. (2020), não observaram aumento significativo da massa seca do haustório, durante a mobilização de reservas de *M. flexuosa*, indicando que, o amido não acumula expressivamente, devido a rápida metabolização das paredes celulares e, do carregamento contínuo dos produtos de hidrólise para o eixo vegetativo. Em sementes ortodoxas de palmeiras é comum o acúmulo de amido no haustório, durante a mobilização de reservas (Alang et al., 1988; Oliveira et al. 2013; Mazzottini-dos-Santos et al., 2017) pois, grande parte da reserva celular dessas espécies são lipídios, que possuem maior energia de estoque, seus produtos de hidrólise são convertidos em açúcares via gliconeogênese no haustório e, precisam ser estocados temporariamente (Alang et al., 1988). O açúcar convertido na forma de amido pode constituir uma defesa para evitar a glicosilação inespecífica aos elementos celulares, que ocorre quando monômeros de açúcares estão livres (Buckeridge, 2000). Além disso, o amido pode ser uma fonte energética estratégica, de rápida metabolização, quando os percentuais ótimos de água forem atingidos na semente do buriti, após reidratação.

Os níveis de atividade de endo- $\beta$ -mananase se elevam no endosperma adjacente das sementes de *M. flexuosa* sob estresse hídrico moderado, o que auxilia no recrutamento de osmólitos, a partir da digestão da parede celular (Fig. 9). Níveis aumentados da atividade da mananase também foram observados por Dias et al. (2024), quando embriões foram submetidos ao estresse hídrico, o que parece ser uma tendência de resposta desta enzima nas sementes de buriti. Por outro lado, em sementes de feno grego, a atividade da mananase foi diminuída quando estresse hídrico foi imposto (Spyropoulos e Reid, 1988). Existem diversas isoformas de mananase na natureza, porém, apenas uma pequena porcentagem foi descrita para plantas, deste modo, os mecanismos de regulação, espécie específicas, carecem de estudos mais aprofundados (Rodríguez-Gacio et al., 2012).

As raízes de *M. flexuosa* parecem ser os órgãos mais vulneráveis a desidratação severa, uma vez que, plântulas nestas condições, após 30 dias de cultivo, com posterior reidratação por mais 30 dias, apresentaram uma pequena porcentagem de regeneração e, destas, apenas 25% retomou o desenvolvimento das raízes. Para superar esta fragilidade, em situações de estresse moderado, limiar de absorção de água pela plântula (Fig. 2A-B), o desenvolvimento de raízes é priorizado em relação à parte aérea, entre 15 e 30 dias, como uma estratégia para o restabelecimento da hidratação (Fig. 4A, C; Fig. 5. A, C).

#### 4.2 Respostas fisiológicas ao estresse oxidativo devido ao estresse hídrico

As plântulas de *M. flexuosa*, em desenvolvimento pós-germinativo, apresentam sistemas antioxidantes responsivos ao estresse hídrico, tanto na parte aérea quanto no haustório, que auxiliam na promoção da homeostase. Sistemas antioxidantes enzimáticos ineficientes configuram um dos principais problemas, que afetam a longevidade em sementes recalitrantes (Berjak e Pammenter, 2007; Obroucheva et al., 2016; Leprince e Buitink, 2015). No entanto, Salvador et al., (2022) e Dias et al., (2024) relataram que *Mauritia flexuosa*, que forma bancos de sementes persistentes, apresenta embriões com sistemas antioxidantes eficientes, regulados por vias enzimáticas e, especialmente não enzimáticas (fenólicos), que são responsivos a estresses abióticos e, permitem a manutenção de sementes no solo por longos períodos. Nossos resultados indicam que, as plântulas preservam estes mecanismos, uma vez que, os níveis de  $H_2O_2$  e CAT apresentaram interação positiva na parte aérea, quando estresse hídrico severo foi imposto (Fig. 11 A-B). A atividade eficiente da enzima constitui uma via crucial de controle da peroxidação lipídica, comprovada pelos níveis de MDA, que não se alteraram no tecido. As atividades de APX e SOD não apresentaram relação com o estresse hídrico, porém, variaram ao longo do tempo, integrando a resposta ao estresse oxidativo. Segundo Hasanuzzaman et al. (2020), em casos de estresses abióticos os sistemas antioxidantes enzimáticos, são as principais vias de eliminação de ROs em plantas.

No haustório, por outro lado, houve acúmulo de superóxido (Fig. 10), um radical livre extremamente danoso aos sistemas de membranas (Bailly, 2004). Entretanto, em *feedback* positivo, níveis de SOD se elevaram (Fig. 11F) mas, não foram suficientes para evitar danos às membranas celulares, indicado pelo aumento gradual, em resposta ao estresse, nos níveis de MDA (Fig. 11E), um marcador da peroxidação lipídica (Heath e Packer, 1968; Hasanuzzaman et al. 2020). Digno de nota foi a presença do radical superóxido em haustórios

da condição controle, essa molécula pode atuar em processos envolvidos na morte controlada, de células parenquimáticas no haustório, com intuito de promover a formação de espaços intercelulares esquizolisígenos, importantes para o acúmulo de O<sub>2</sub> de reserva, em caso de hipóxia por inundação (Dias et al., 2020). É interessante notar que os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram mantidos estáveis no haustório, o que possivelmente, possibilitou o desencadeamento de eventos que controlam a dinâmica de reservas, mesmo sob estresse hídrico, uma vez que, níveis controlados de ROs atuam como mensageiros químicos, eficientes na ativação de enzimas relacionadas à mobilização de reservas, em especial o peróxido de hidrogênio (Das e Roychoudhury, 2014; Wojtyła et al., 2016; Dias et al., 2018; Bailly, 2019). É provável que compostos fenólicos observados nos haustórios de plântulas (Fig. 6F, H, K, M) contribuam para a homeostase oxidativa em situações de estresse, assim como ocorre nos embriões de buriti submetidos à seca (Dias et al., 2024).

Plântulas de *M. flexuosa* em desenvolvimento pós-germinativo são tolerantes a condições de progressivo déficit hídrico, assim como as plantas jovens (Almeida et al., 2024). A dinâmica da mobilização de reservas, em conjunto com sistemas antioxidantes responsivos, favorece a formação do banco de plântulas da espécie, em ambientes secos da vereda, como uma estratégia complementar a formação do banco de sementes persistentes, em ambientes úmidos (Porto et al., 2018 e Salvador et al., 2022). Estes resultados podem auxiliar na compreensão dos fatores que possibilitaram a colonização do Cerrado brasileiro, tipicamente savânico, por uma palmeira originalmente Amazônica (Melo et al., 2018).

## 5. Conclusão

O haustório tem papel central na promoção da resiliência de plântulas de *M. flexuosa* à desidratação, devido ao seu  $\Psi_w = -1,5$  MPa, capaz de induzir a absorção de água e nutrientes, mesmo em condições de baixa disponibilidade hídrica. O crescimento reduzido do haustório, em condição de seca, favorece o acúmulo de reservas parcialmente degradadas e não absorvidas, que se concentram na zona de digestão; este mecanismo contribui para a retenção de água na semente. A atividade de endo- $\beta$ -mananase se eleva no endosperma adjacente das sementes de *M. flexuosa* sob estresse hídrico moderado o que auxilia no recrutamento de osmólitos, a partir da digestão da parede celular, rica em manano. Em situações de estresse moderado, o desenvolvimento de raízes é priorizado em relação à parte aérea, entre 15 e 30 dias, como uma estratégia para o restabelecimento da hidratação. As plântulas de *M. flexuosa*, em desenvolvimento pós-germinativo, apresentam sistemas antioxidantes enzimáticos e não

enzimáticos responsivos ao estresse hídrico, tanto na parte aérea quanto no haustório, que auxiliam na promoção da homeostase oxidativa. Em conjunto estas características favorecem o estabelecimento de plântulas em microambientes sujeitos ao estresse hídrico e contribuem para o sucesso reprodutivo e adaptação da espécie em ambientes sazonais.

## Referências

- Alang, Z.C., Moir, G.F.J., Jones, L.H., 1988. Composition, Degradation and Utilization of Endosperm During Germination in the Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Annals of Botany* 61, 261–268. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087553>
- 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 & Environment* 24, 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Almeida, T.D.S., Ribeiro, L.M., De Paula Santos Martins, C., Barbosa, T.L., Mercadante-Simões, M.O., De Oliveira Vieira, E., Nunes, Y.R.F., Lopes, P.S.N., 2024. Structural and physiological responses to water availability provide insights into the maintenance of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) seedling banks. *Forest Ecology and Management* 561, 121881. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.121881>
- Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14, 93–107. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>
- Bailly, C., 2019. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal* 476, 3019–3032. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190159>
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F., 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus. Biologies* 331, 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>
- Berjak, P., Pammenter, N.W., 2007. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective. *Annals of Botany* 101, 213–228. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm168>

Brasil. Ministério da Agricultura, P. e Abastecimento S. de D.A., 2009. Regras para análise de sementes. Brasília, DF.

Buckeridge, M.S., 2010. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation. *Plant Physiology* 154, 1017–1023. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>

Buckeridge, M.S., Pessoa Dos Santos, H., Tiné, M.A.S., 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 141–156. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00162-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00162-5)

Buckley, T.N., 2015. The contributions of apoplastic, symplastic and gas phase pathways for water transport outside the bundle sheath in leaves. *Plant Cell & Environment* 38, 7–22. <https://doi.org/10.1111/pce.12372>

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*). *Physiologia Plantarum* 83, 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>

Chaib, A.M., Gomes, A.S., Borghetti, F., 2023. Early development of two savanna tree species under simulated dry spells. *Flora* 301, 152241. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2023.152241>

Chen, Z., Yu, L., Wang, X., Gu, Z., Beta, T., 2016. Changes of phenolic profiles and antioxidant activity in canaryseed (*Phalaris canariensis L.*) during germination. *Food Chemistry* 194, 608–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.060>

Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

DeMason, D.A., 1985. Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera L.*). *Protoplasma* 126, 168–177. <https://doi.org/10.1007/BF01281792>

DeMason, D.A., Sexton, R., Gorman, M., Reid, J.S.G., 1985. Structure and biochemistry of endosperm breakdown in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Protoplasma* 126, 159–167. <https://doi.org/10.1007/BF01281791>

Dias, D.S., Monteiro Ribeiro, L., Sérgio Nascimento Lopes, P., Aclécio Melo, G., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2018. Haustorium–endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae) seeds. *Annals of Botany* 122, 267–277. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy065>

Dias, G.P., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Ferreira Nunes, Y.R., Pimenta Bragança, G.P., Mary Dos Santos Isaias, R., 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 Physiology and Biochemistry* 156, 445–460. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.031>

Dias, G.P., Ribeiro, L.M., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Nunes, Y.R.F., França, M.G.C., 2024. Water stress resilience in *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) embryos: New insights into the persistence of recalcitrant seed banks. *Environmental and Experimental Botany* 226, 105930. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2024.105930>

Escobar, D.F.E., Silveira, F.A.O., Morellato, L.P.C., 2018. Timing of seed dispersal and seed dormancy in Brazilian savanna: two solutions to face seasonality. *Annals of Botany* 121, 1197–1209. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy006>

Feder, N., O'Brien, T.P., 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American J of Botany* 55, 123–142. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1968.tb06952.x>

Fonseca, P.P., Mazzottini-dos-Santos, H.C., De Azevedo, I.F.P., Nunes, Y.R.F., Ribeiro, L.M., 2024. Histogenesis and reserve dynamics during the maintenance of dormancy and germination in seeds of the basal palm *Mauritiella armata*. *Protoplasma* 261, 425–445. <https://doi.org/10.1007/s00709-023-01905-y>

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>

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. *Environmental and Experimental Botany* 169, 103904. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103904>

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Parvin, K., Bhuiyan, T.F., Anee, T.I., Nahar, K., Hossen, Md.S., Zulfiqar, F., Alam, Md.M., Fujita, M., 2020. Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *IJMS* 21, 8695. <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>

Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

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

Leprince, O., Buitink, J., 2015. Introduction to desiccation biology: from old borders to new frontiers. *Planta* 242, 369–378. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2357-6>

Lewandrowski, W., Stevens, J.C., Webber, B.L., Dalziell, E., Trudgen, M.S., Bateman, A.M., Erickson, T.E., 2021. Global change impacts on arid zone ecosystems: Seedling establishment processes are threatened by temperature and water stress. *Ecology and Evolution* 11, 8071–8084. <https://doi.org/10.1002/ece3.7638>

Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., 2018. Structural changes in the micropylar region and overcoming dormancy in Cerrado palms seeds. *Trees* 32, 1415–1428. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1723-y>

Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., 2017. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae):

dynamics of reserve mobilization and accumulation. *Protoplasma* 254, 1563–1578. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1048-x>

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. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0074-1>

Michel, B.E., Kaufmann, M.R., 1973. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiol.* 51, 914–916. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)

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. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01375-1>

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. 1981. *Plant Cell Physiol.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.

O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>

Obroucheva, N., Sinkevich, I., Lityagina, S., 2016. Physiological aspects of seed recalcitrance: a case study on the tree *Aesculus hippocastanum*. *Tree Physiol* 36, 1127–1150. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw037>

Oliveira, N.C.C., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Oliveira, L.A.A., Silvério, F.O., 2013. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees* 27, 1633–1645. <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0910-0>

Oliveira, R.S., Bezerra, L., Davidson, E.A., Pinto, F., Klink, C.A., Nepstad, D.C., Moreira, A., 2005. Deep root function in soil water dynamics in cerrado savannas of central Brazil. *Functional Ecology* 19, 574–581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2005.01003.x>

Paiva, É.A.S., Pinho, S.Z.D., Oliveira, D.M.T., 2011. Large Plant Samples: How to Process for GMA Embedding?, in: Chiarini-Garcia, H., Melo, R.C.N. (Eds.), *Light Microscopy*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 37–49. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5_3)

Pinho, G.P., Matoso, J.R.M., Silvério, F.O., Mota, W.C., Lopes, P.S.N., Ribeiro, L.M., 2014. A New Spectrophotometric Method for Determining the Enzymatic Activity of endo- $\beta$ -mannanase in Seeds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140102>

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. <https://doi.org/10.1007/s11258-017-0788-9>

Ribeiro, L.M., Garcia, Q.S., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2015. Tissue-specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. *Physiologia Plantarum* 153, 627–642. <https://doi.org/10.1111/ppl.12269>

Ribeiro, L.M., Souza, P.P., Rodrigues Jr., 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. <https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.2.04>

Ribeiro, V.C., Leitão, C.A.E., 2020. Utilisation of Toluidine blue O pH 4.0 and histochemical inferences in plant sections obtained by free-hand. *Protoplasma* 257, 993–1008. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01473-0>

Rodríguez-Gacio, M.D.C., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., Matilla, Á.J., 2012. Softening-up mannan-rich cell walls. *Journal of Experimental Botany* 63, 3976–3988. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers096>

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. *Forest Ecology and Management* 511, 120155. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120155>

Sekhar, K.N.C., DeMason, DarleenA., 1990. Identification and immunocytochemical localization of  $\beta$ -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181. <https://doi.org/10.1007/BF00202324>

Shi, J., Fu, X.-Z., Peng, T., Huang, X.-S., Fan, Q.-J., Liu, J.-H., 2010. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiology* 30, 914–922. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq030>

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 - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 209, 674–685. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.08.012>

Spyropoulos, C.G., Reid, J.S.G., 1988. Water stress and galactomannan breakdown in germinated fenugreek seeds. Stress affects the production and the activities in vivo of galactomannan-hydrolysing enzymes. *Planta* 174, 473–478. <https://doi.org/10.1007/BF00634475>

Tarnawa, Á., Kende, Z., Sghaier, A.H., Kovács, G.P., Gyuricza, C., Khaeim, H., 2023. Effect of Abiotic Stresses from Drought, Temperature, and Density on Germination and Seedling Growth of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plants* 12, 1792. <https://doi.org/10.3390/plants12091792>

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. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2194-7>

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

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

<https://doi.org/10.1007/s00425-015-2312-6>

Wojtyła, Ł., Lechowska, K., Kubala, S., Garnczarska, M., 2016. Different Modes of Hydrogen Peroxide Action During Seed Germination. *Front. Plant Sci.* 7.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00066>

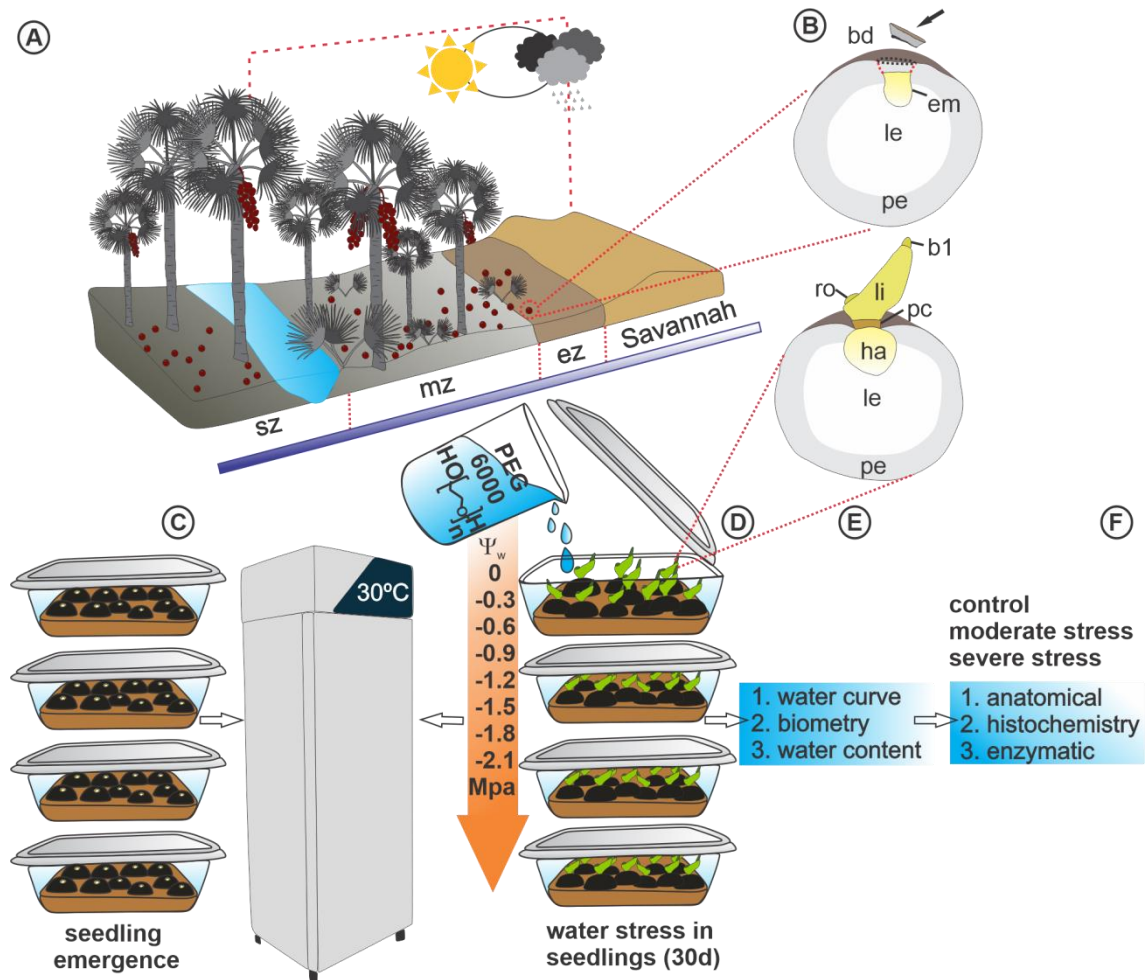
Xu, M., Jin, Z., Ohm, J.-B., Schwarz, P., Rao, J., Chen, B., 2018. Improvement of the Antioxidative Activity of Soluble Phenolic Compounds in Chickpea by Germination. *J. Agric. Food Chem.* 66, 6179–6187.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02208>

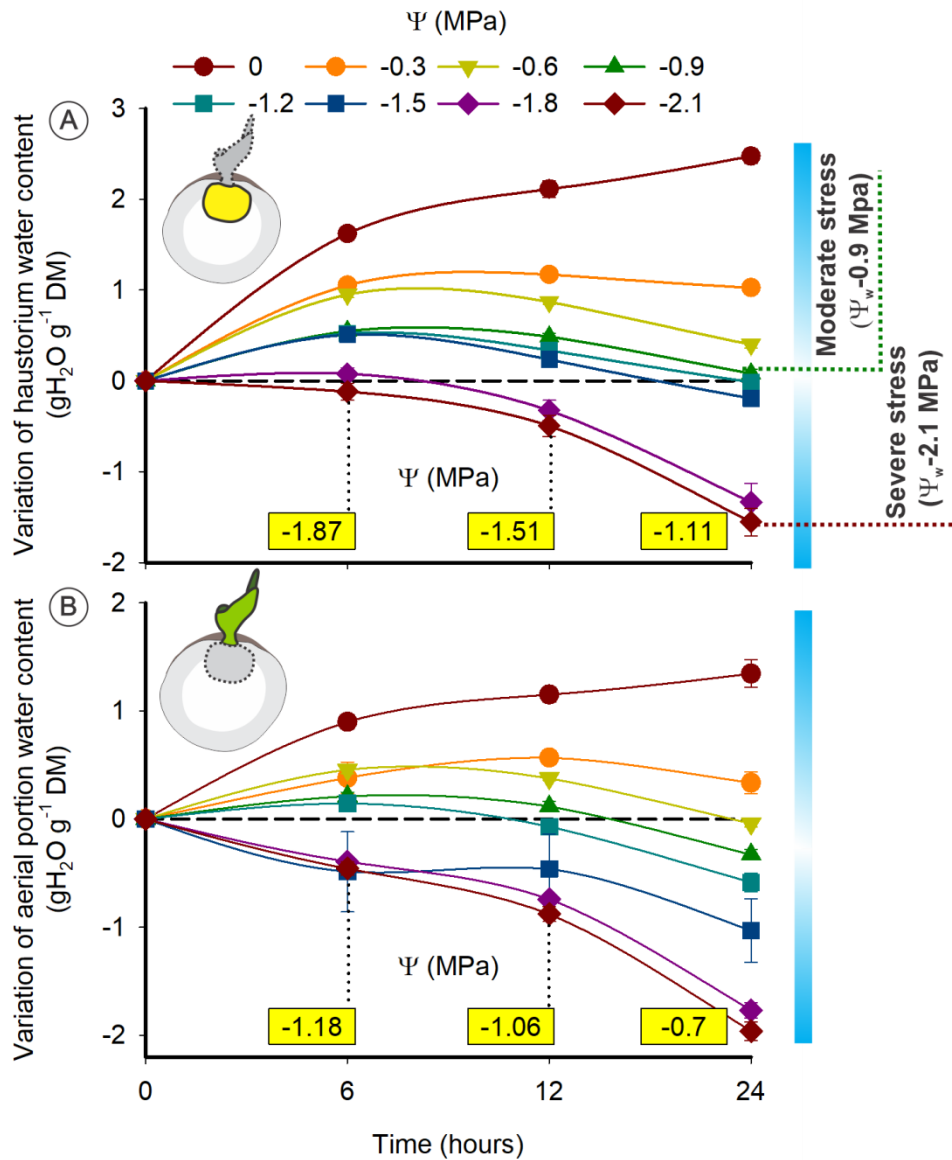
Zienkiewicz, A., Zienkiewicz, K., Rejón, J.D., De Dios Alché, J., Castro, A.J., Rodríguez-García, M.I., 2014. Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *Journal of Experimental Botany* 65, 103–115.

<https://doi.org/10.1093/jxb/ert355>

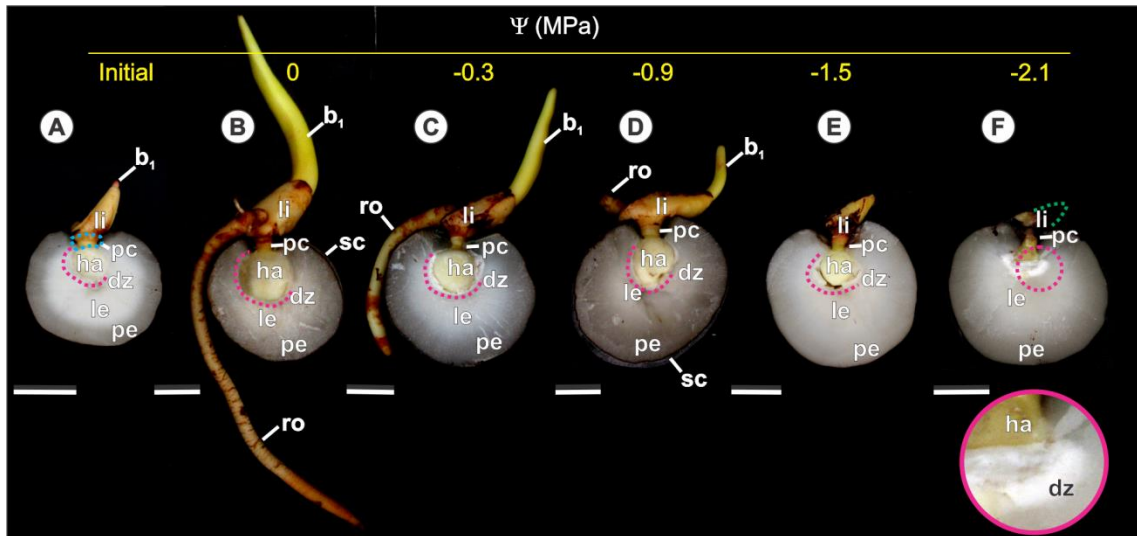
## Figuras



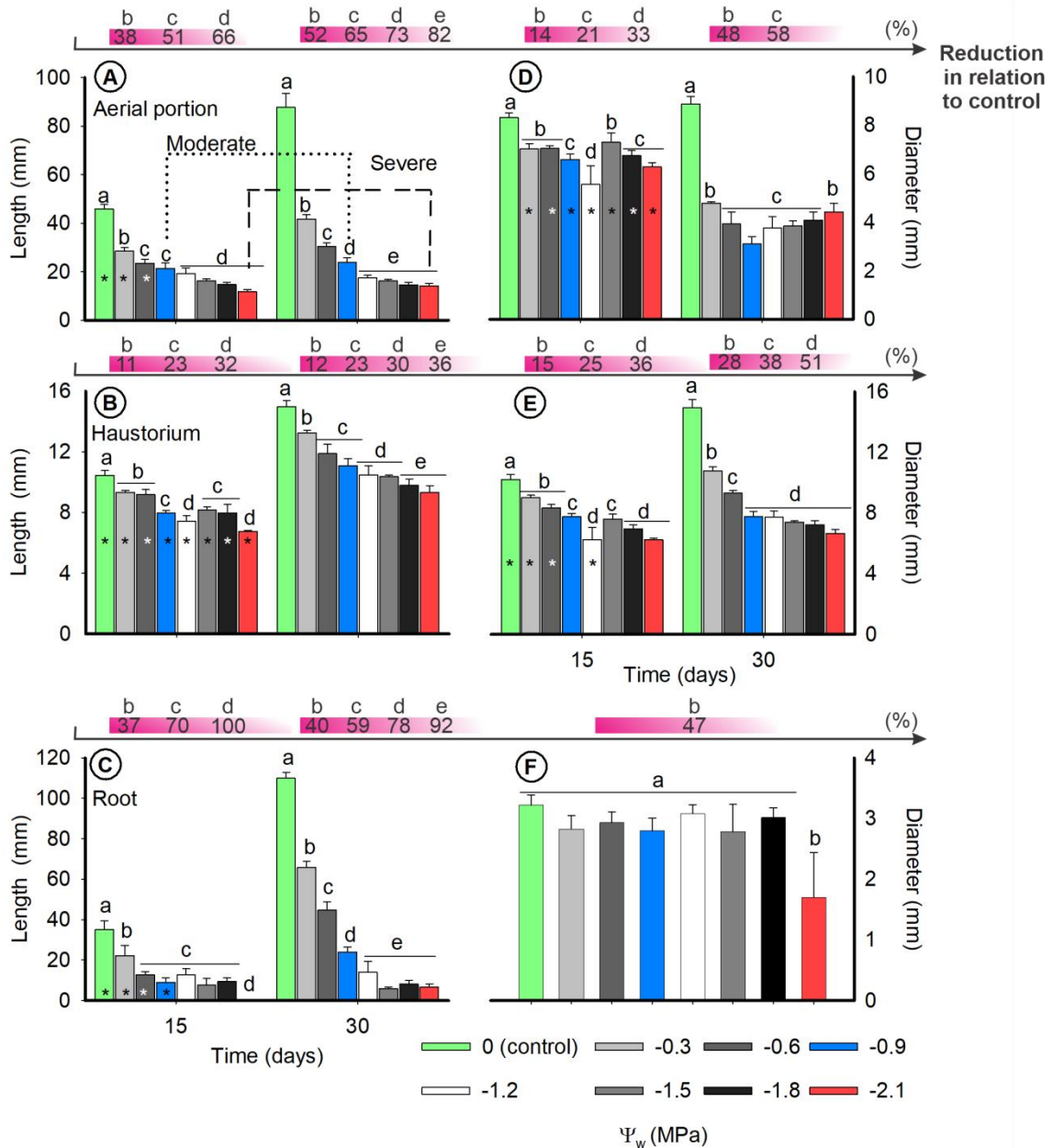
**Figura 1.** Representação esquemática dos ambientes de veredas, destacando-se as zonas transicionais (A). Modelo em secção longitudinal da semente de *M. flexuosa*, a seta preta aponta para a remoção do opérculo, como técnica utilizada para quebra de dormência (B). Esquema sintético do delineamento experimental (C-F). Secção longitudinal da plântula de *M. flexuosa*. b1 primeira bainha foliar, bd quebra de dormência, em embrião, ez zona de borda, ha haustório, le endosperma lateral, li lígula, mz zona de meio, pc pecíolo cotiledonar, pe endosperma periférico, ro raiz, sz zona pantanosa.



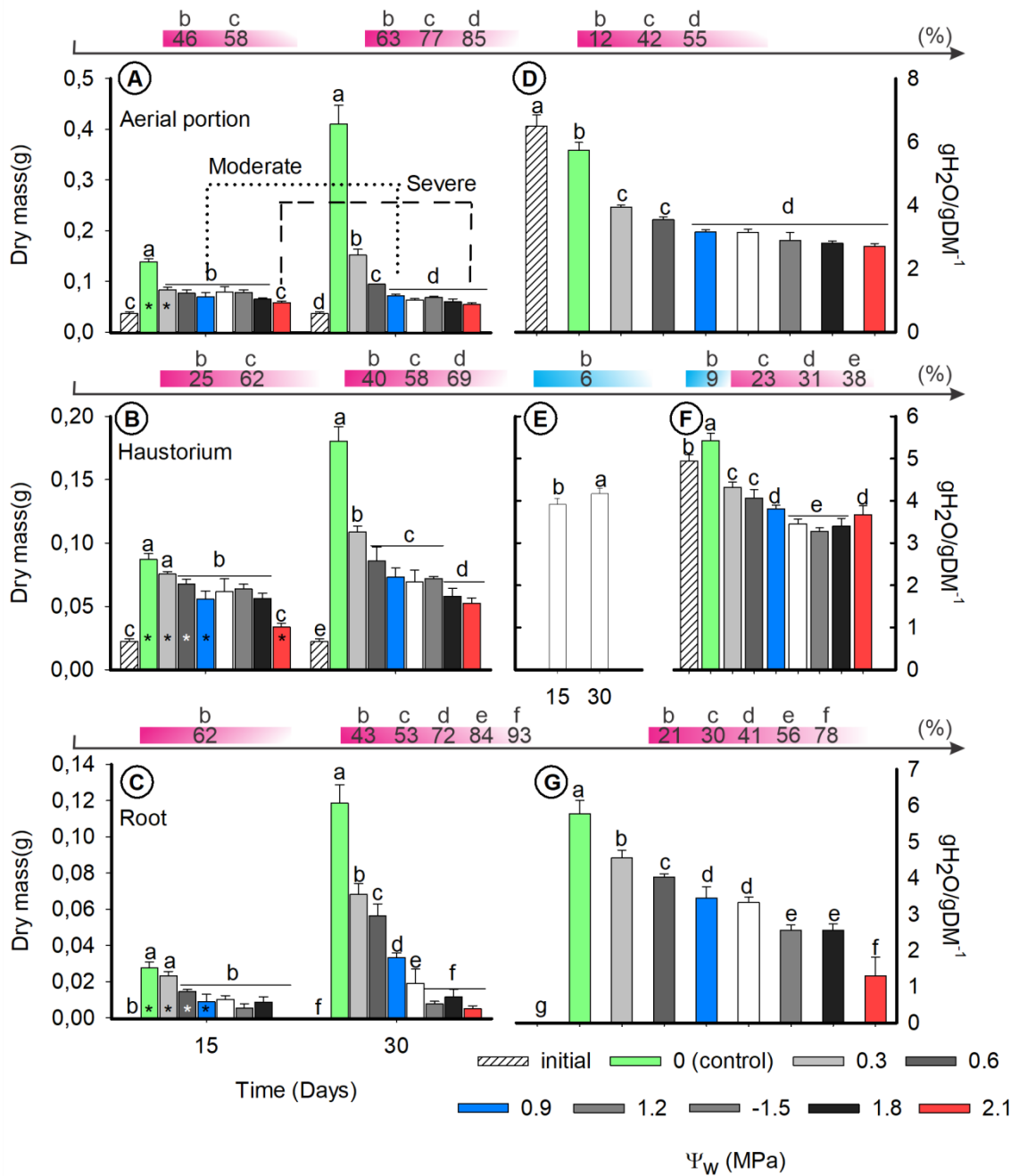
**Figura 2.** Variação dos teores de água em gH<sub>2</sub>O / gMS e dos Ψ<sub>ws</sub> (MPa) do haustório 4,94 gH<sub>2</sub>O / gMS (A) e da parte aérea 6,49 gH<sub>2</sub>O / gMS (B) de plântulas de *M. flexuosa*, 10 dias após germinação, avaliadas ao longo de 24h de imersão em soluções osmóticas distintas. Os valores dos Ψ<sub>ws</sub> das soluções osmóticas estão representados acima da curva de água. Os valores nos retângulos representam o Ψ<sub>w</sub> das regiões das plântulas, em cada intervalo de tempo avaliado. Os Ψ<sub>ws</sub> capazes de promover estresses moderado e severo estão destacados ao final da curva de água.



**Figura 3.** Secções longitudinais de semente e plântulas de *M. flexuosa* (A-F). As barras de escala, brancas e pretas, correspondem à 1cm. Plântula na condição inicial, após emissão da primeira bainha foliar; o endosperma apresenta-se distinto em duas regiões, lateral e periférico; o tracejado azul corresponde ao pecíolo cotiledonar; tracejado rosa, evidencia a zona de digestão. Plântulas após 15 dias de cultivo, nos respectivos  $\Psi_{ws}$  (B-F). b1 primeira bainha foliar, dz zona de digestão, ha haustório, le endosperma lateral, li lígula, pc pecíolo cotiledonar, pe endosperma periférico, ro raiz, sc envoltório seminal.

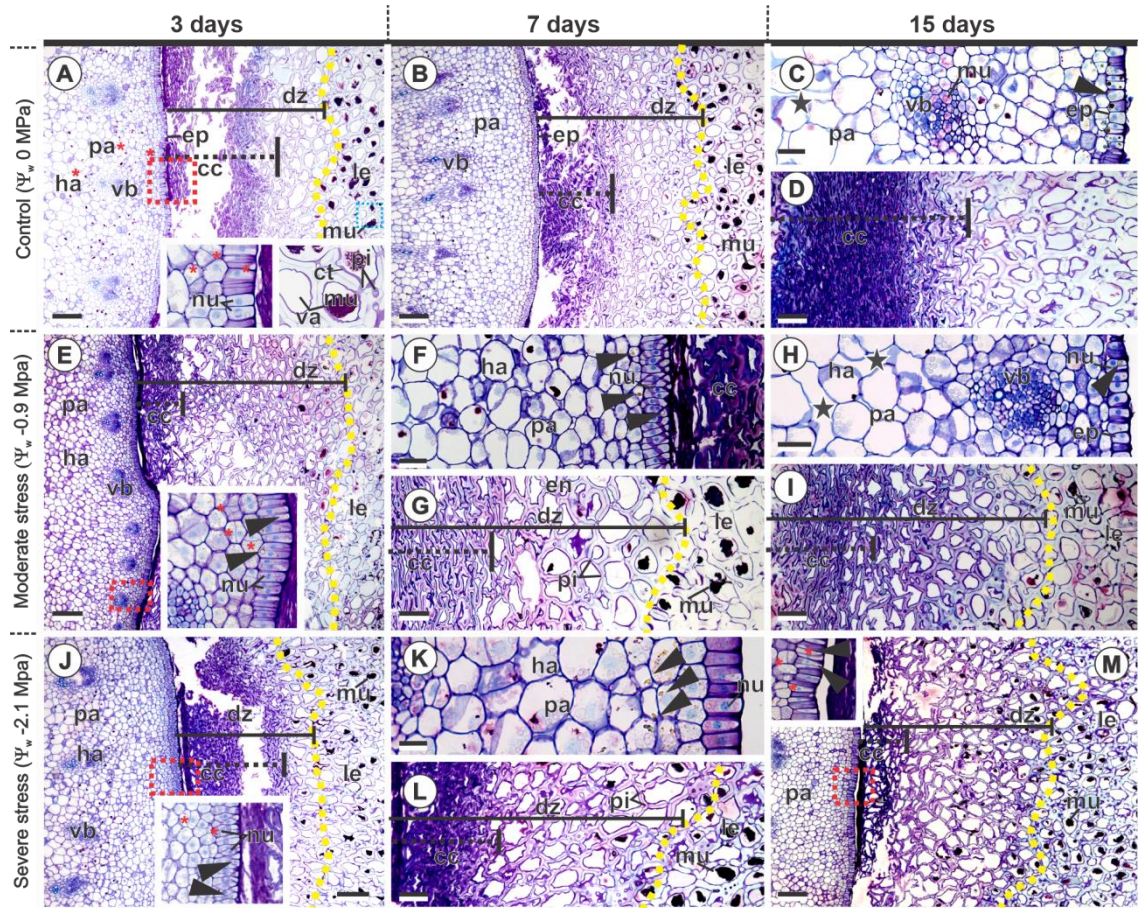


**Figura 4.** Parâmetros biométricos das estruturas de plântulas de *M. flexuosa* após 15 e 30 dias de cultivo mantidas com irrigação e, submetidas a soluções osmóticas com diferentes  $\Psi_{ws}$  (A-F). Comprimento da parte aérea (A), haustório (B) e raiz principal (C); Diâmetro da parte aérea (D), haustório (E) e raiz principal (F). Letras diferentes, dentro de cada tempo avaliado, indicam que os tratamentos diferiram estatisticamente entre si, asterisco (\*) indica diferença entre, 15 e 30 dias, pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão da média. Os percentuais de redução relativos, para cada parâmetro avaliado, podem ser observados (barras rosadas).

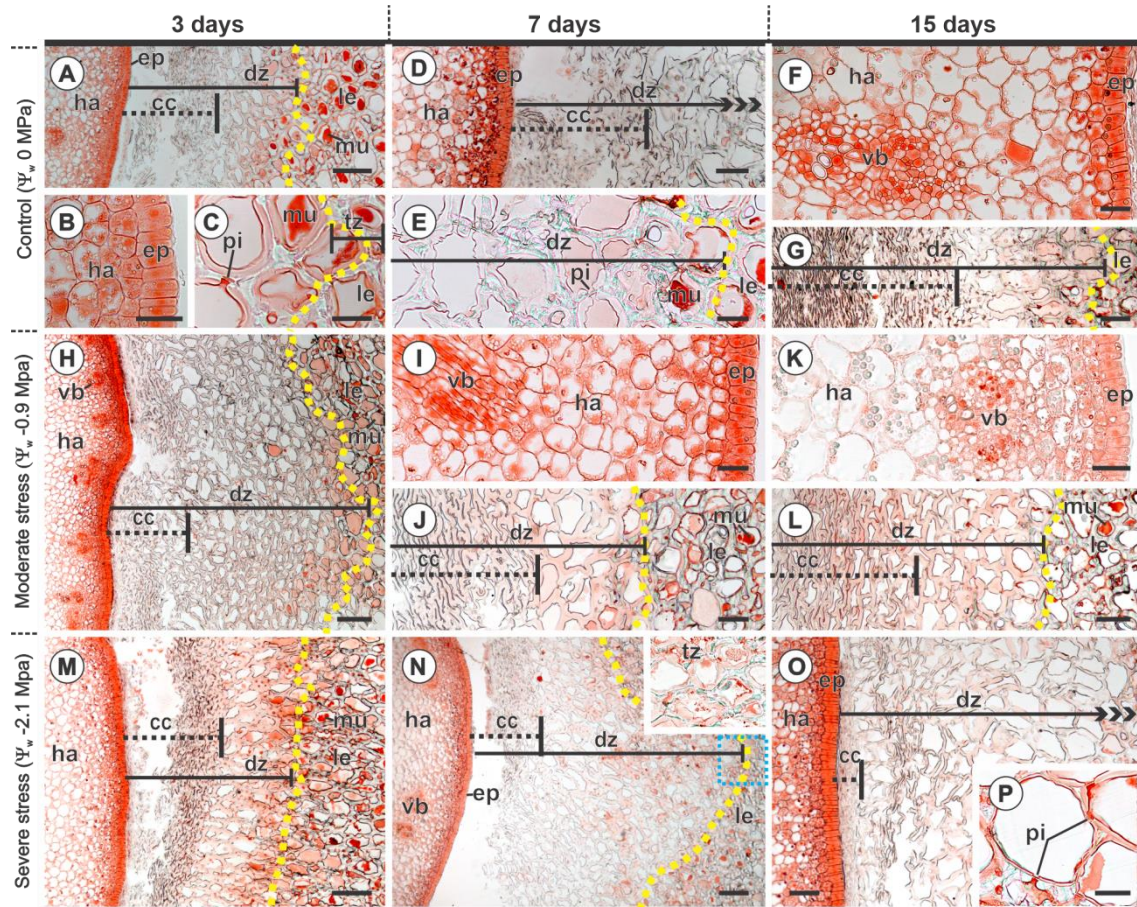


**Figura 5.** Parâmetros biométricos das estruturas de plântulas de *M. flexuosa* após 15 e 30 dias de cultivo mantidas com irrigação e submetidas a soluções osmóticas com diferentes  $\Psi_{ws}$  (A-G). Massa seca da parte aérea (A), haustório (B) e raiz principal (C); Teor de água da parte aérea (D), haustório (E-F) e raiz principal (G). Letras diferentes, dentro de cada tempo avaliado, indicam que os tratamentos diferiram estatisticamente entre si, asterisco (\*) indica diferença entre, 15 e 30 dias, pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro

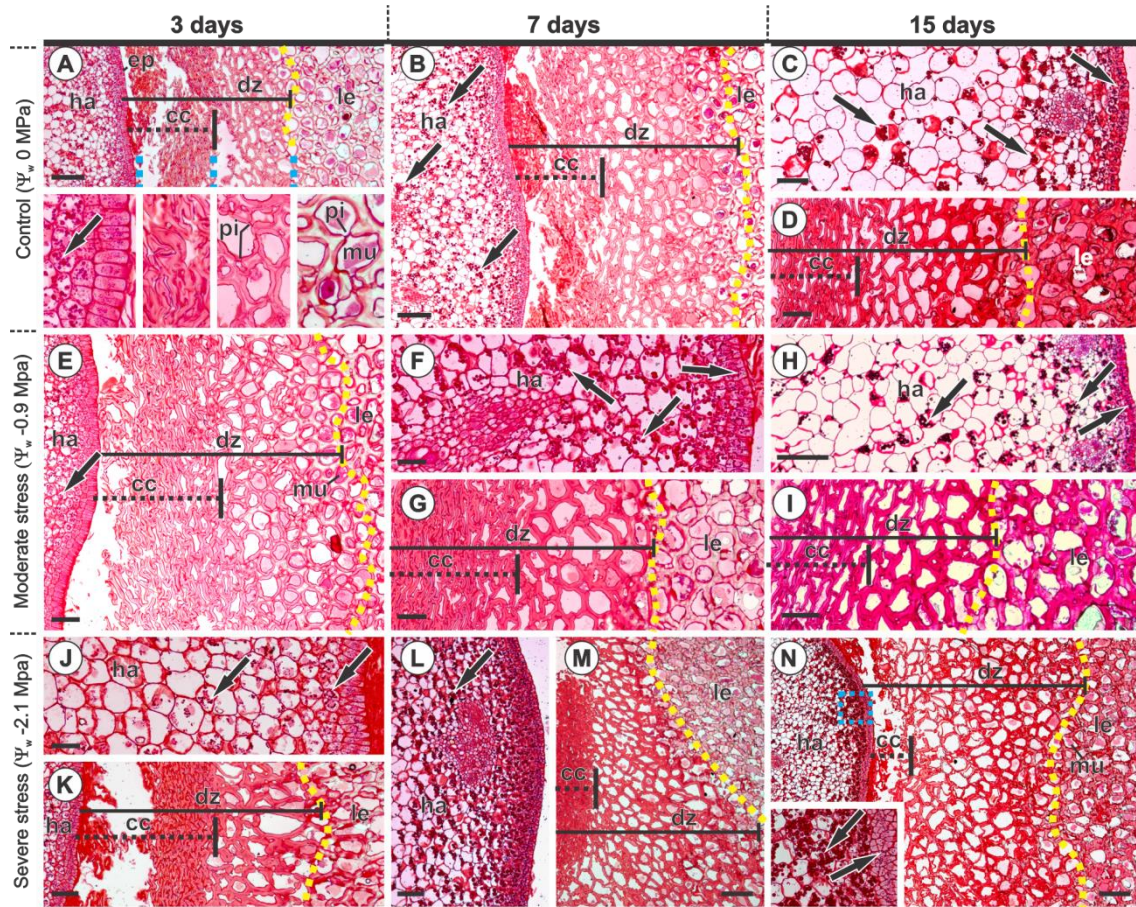
padrão da média. Os percentuais relativos de redução, para cada parâmetro avaliado, podem ser observados (barras rosadas: redução; barras azuis: incremento).



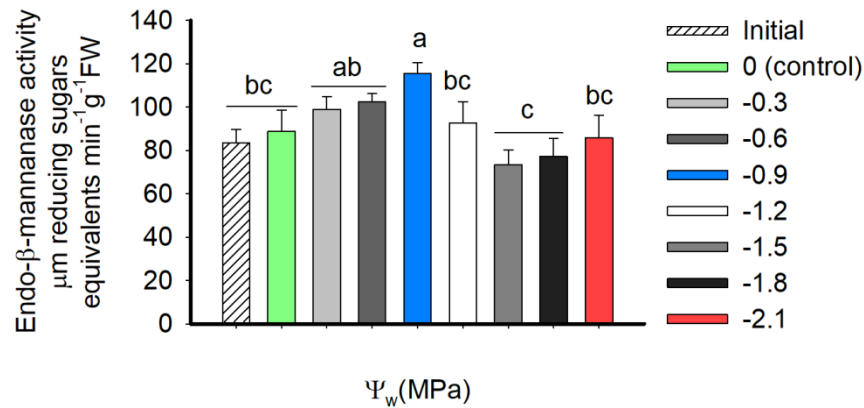
**Figura 6.** Secções transversais na porção mediana do haustório aderido ao endosperma de plântulas de *M. flexuosa* após 3, 7 e 15 dias de cultivo mantidas com irrigação (A-D) e submetidas a soluções osmóticas promotoras de estresse moderado (E-I) e estresse severo (J-M). As barras de escala, brancas e pretas, correspondem à 200  $\mu\text{m}$ . A linha tracejada amarela delimita a zona de digestão, cuja barra preta contínua demarca sua extensão; barra preta tracejada, delimita a porção de células colapsadas; retângulos vermelhos tracejados, indicam ampliação de pontos específicos (ver inserções); pontas de seta preta, indicam compostos fenólicos; estrela preta, indica espaços intercelulares; asteriscos vermelhos, apontam divisões celulares. dz zona de digestão, cc células colapsadas, en endosperma, ep epiderme, ha haustório, le endosperma lateral, mu mucilagem, nu núcleo, pa parênquima, pi campo primário de pontuação, vb feixe vascular.



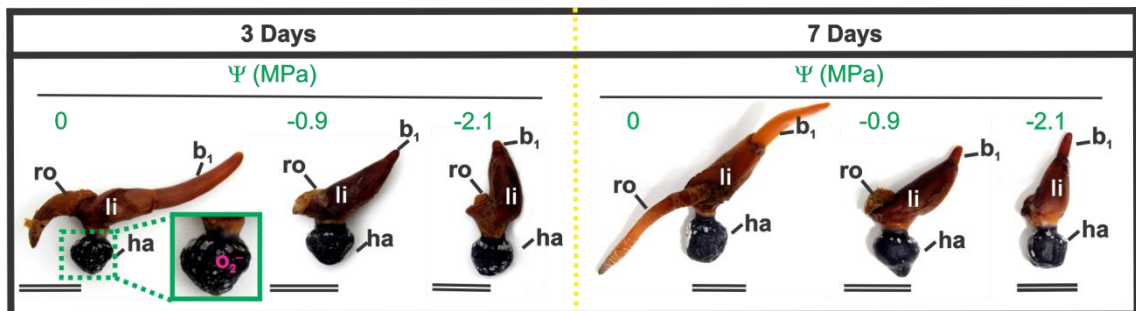
**Figura 7.** Secções transversais na porção mediana do haustório aderido ao endosperma de *M. flexuosa*, evidenciando proteínas de reservas associadas à epiderme e parênquima do haustório e ao endosperma, reveladas pela coloração avermelhada em reação ao reagente Xylidine-Ponceau (XP). Após 3, 7 e 15 dias de cultivo e mantidas sob irrigação (A-G) e, em soluções osmóticas promotoras de estresse moderado (H-L) e estresse severo (M-O). As barras de escala pretas, na base, correspondem à 200  $\mu\text{m}$ . A linha tracejada amarela delimita a zona de digestão, cuja barra preta contínua demarca sua extensão; barra preta tracejada, delimita a porção de células colapsadas; retângulos azuis tracejados, indicam ampliação de pontos específicos (ver inserções); dz zona de digestão, cc células colapsadas, em endosperma, ep epiderme, ha haustório, le endosperma lateral, mu mucilagem, nu núcleo, pa parênquima, pi campo primário de pontuação, tz zona de transição, vb feixe vascular.



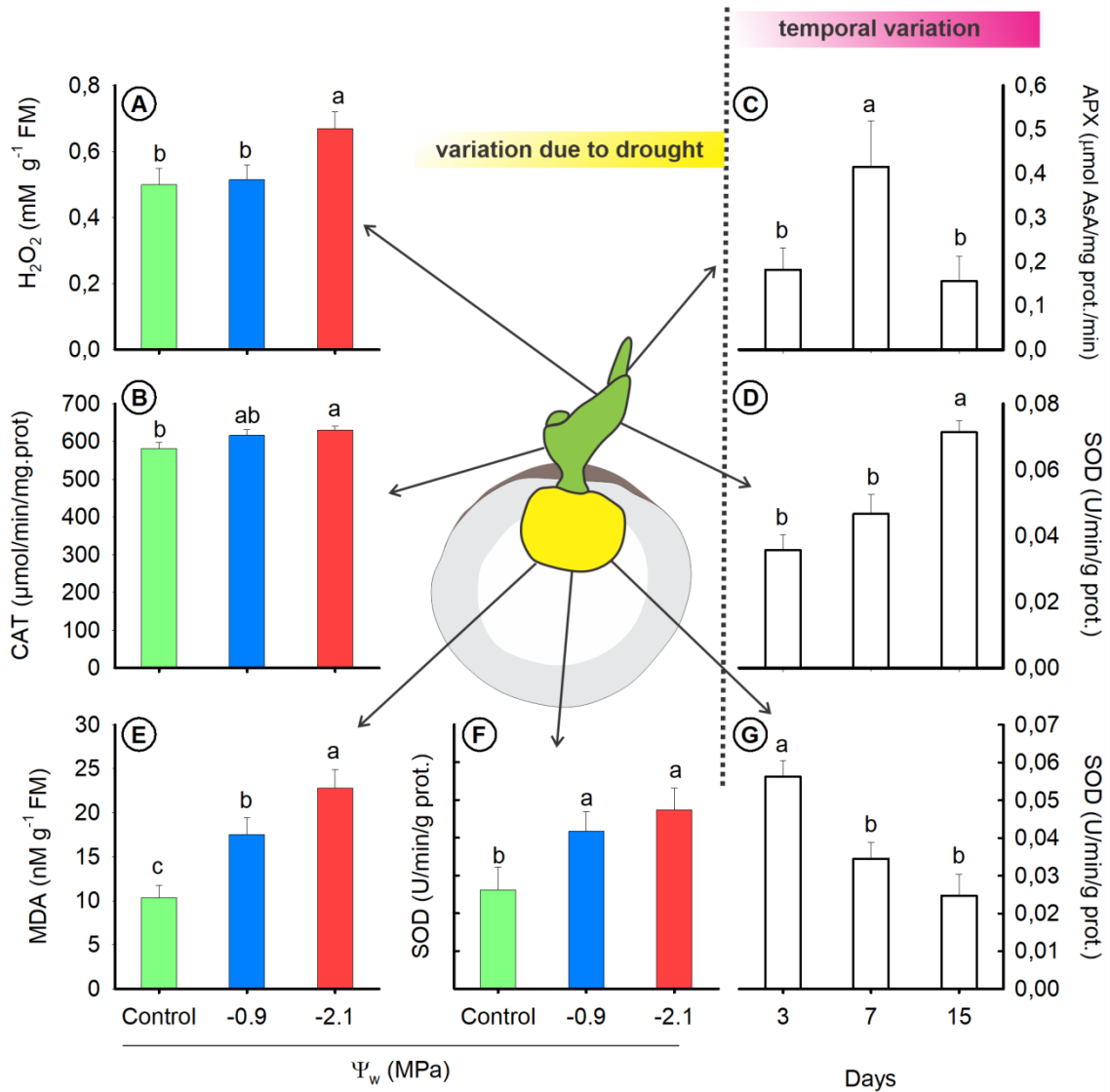
**Figura 8.** Secções transversais na porção mediana do haustório aderido ao endosperma de *M. flexuosa*, evidenciando carboidratos de reserva, associadas às paredes celulares e protoplastos das células epidérmicas e parenquimáticas, do haustório e ao endosperma, reveladas pela coloração magenta, em reação ao ácido periódico e o reagente de Schiff (PAS). Após 3, 7 e 15 dias de cultivo e mantidas com irrigação (A-D) e em soluções osmóticas promotoras de estresse moderado (E-I) e estresse severo (J-N). As barras de escala pretas, na base, correspondem à 200  $\mu\text{m}$ . A linha tracejada amarela delimita a zona de digestão, cuja barra preta contínua demarca sua extensão; barra preta tracejada, delimita a porção de células colapsadas; retângulos azuis tracejados, indicam ampliação de pontos específicos (ver inserções); setas pretas, apontam grãos de amido no haustório. dz zona de digestão, cc células colapsadas, en endosperma, ep epiderme, ha haustório, le endosperma lateral, mu mucilagem, nu núcleo, pa parênquima, pi campo primário de pontoação, vb feixe vascular.



**Figura 9.** Atividade da endo- $\beta$ -mananase expressa em base fresca, após 30 dias de cultivo de plântulas de *M. flexuosa*, mantidas com irrigação e em soluções osmóticas com diferentes valores de  $\Psi_{ws}$ . Letras diferentes indicam que os tratamentos diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan, ( $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão da média.



**Figura 10.** Histolocalização do ânion superóxido, após 3 e 7 dias de cultivo de plântulas de *M. flexuosa*, mantidas com irrigação e em soluções osmóticas com diferentes valores de  $\Psi_{ws}$ . O pontilhado verde (inserção) destaca a região do haustório, intensamente corada, indicando a presença do radical livre. b1 primeira bainha foliar, ha haustório, li lígula, ro raiz.



**Figura 11.** Estresse oxidativo da parte aérea: teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), CAT (B), APX (C) e SOD (D) e haustório: teores de MDA (E), SOD (F-G) de plântulas de *M. flexuosa*, após 3, 7 e 15 dias de cultivo mantidas com irrigação e em soluções osmóticas com diferentes valores de  $\Psi_w$ . Letras diferentes indicam que os tratamentos diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan, ( $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão da média.



**Figura 12.** Resumo sintético da dinâmica de mobilização de reservas em sementes de *M. flexuosa* sob gradiente hídrico (plântulas hidratadas; sob estresse hídrico moderado e sob estresse hídrico severo) (A). Representação esquemática celular da mobilização de reservas seminais (B).

### Considerações Finais

Nossos resultados fornecem *insights* para a compreensão do processo de colonização de *M. flexuosa* no Cerrado brasileiro a partir da Amazônia, seu centro de origem, uma vez que, apontam pistas importantes para elucidar as estratégias que permitiram a adaptação da espécie aos ambientes sazonais, mais secos (ver com mais detalhes nos capítulos I e II). Além disso, nossos esforços contribuem no entendimento da capacidade de manutenção de um banco de sementes persistentes pela espécie, cuja qual é uma novidade entre as angiospermas. Deste modo, sementes de *M. flexuosa* constituem-se como um modelo para outras sementes recalcitrantes e dormentes, especialmente em Areceaceae, onde a recalcitrância e a dormência podem ser recorrentes.

Os resultados alcançados fornecem uma base para o aprofundamento do estudo da resposta dos embriões e plântulas de *M. flexuosa* ao estresse hídrico, com a utilização de técnicas de biologia molecular, como uma proposta para trabalhos futuros. Embora o buriti seja uma das palmeiras mais abundantes do neotrópico, suas populações, especialmente dos ambientes de veredas do Cerrado brasileiro, encontram-se altamente ameaçadas. Espera-se que esforços futuros somados aos resultados encontrados neste trabalho, contribuam para a ampliação do arcabouço de conhecimentos científicos com vistas na conservação e utilização sustentável desta icônica palmeira.

### Referências

Berjak, P., Pammenter, N.W., 2007. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective. *Ann. Bot.* 101, 213–228. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm168>

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>

Csontos, P., Tamás, J., 2003. Comparisons of soil seed bank classification systems. *Seed Sci. Res.* 13, 101–111. <https://doi.org/10.1079/SSR2003129>

DeMason, D.A., 1985. Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera* L.). *Protoplasma* 126, 168–177. <https://doi.org/10.1007/BF01281792>

Dias, G.P., Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Ferreira Nunes, Y.R., Pimenta Bragança, G.P., Isaias, R.M.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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.031>

Endress, B.A., Horn, C.M., Gilmore, M.P., 2013. *Mauritia flexuosa* palm swamps: Composition, structure and implications for conservation and management. *Forest Ecology and Management* 302, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.03.051>

Lorenzi, H. (Ed.), 2010. *Flora brasileira Lorenzi: arecaceae (palmeiras)*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, SP.

Marques, A., Buijs, G., Ligterink, W., Hilhorst, H., 2018. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. *Funct. Plant Biol.* 45, 1083. <https://doi.org/10.1071/FP18022>

Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Oliveira, D.M.T., 2017. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. *Protoplasma* 254, 1563–1578. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1048-x>

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. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0074-1>

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. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01375-1>

Moura, E.F., Ventrella, M.C., Motoike, S.Y., 2010. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 67, 399–407. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162010000400004>

Obroucheva, N., Sinkevich, I., Lityagina, S., 2016. Physiological aspects of seed recalcitrance: a case study on the tree *Aesculus hippocastanum*. *Tree Physiol.* 36, 1127–1150. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw037>

Panza, V., Láinez, V., Maldonado, S., 2004. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145, 445–453. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00293.x>

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. <https://doi.org/10.1007/s11258-017-0788-9>

Rajjou, L., Debeaujon, I., 2008. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus. Biologies* 331, 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.021>

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. *Quaternary Science Reviews* 99, 17–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2014.06.007>

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. *Forest Ecol. Manag.* 511, 120155. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120155>

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. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.08.012>

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>

Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91, 294–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00760.x>

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. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2194-7>

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. *Global Ecology and Conservation* 10, 70–92. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.12.005>

Walters, C., 2015. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242, 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2312-6>