



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

Departamento de Botânica

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



**ELISA MONTEZE BICALHO**

**FISIOLOGIA DA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM**  
**SEMENTES DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*),**  
**ARECACEAE**

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

**Área de Concentração: Fisiologia Vegetal**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2016**



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

Departamento de Botânica

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



**ELISA MONTEZE BICALHO**

**FISIOLOGIA DA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM**  
**SEMENTES DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*),**  
**ARECACEAE**

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

**Área de Concentração Fisiologia Vegetal**

**Orientador: Profa. Dra. Queila de Souza Garcia**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo A. Amaral da Silva**  
**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2016**

043

Bicalho, Elisa Monteze.

Fisiologia da superação de dormência em sementes de macaúba (*Acrocomiaaculeata*), Areaceae [manuscrito] / Elisa Monteze Bicalho. – 2016. 72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Queila de Souza Garcia. Co-orientador: Edvaldo A. Amaral da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica.

1. Macaúba - Semente - Dormência - Teses. 2. Germinação - Teses. 3. Bancos de sementes - Teses. 4. Vitamina E - Teses. 5. Sinalização oxidativa. 6. Fitohormônios. 7. Botânica - Teses. I. Garcia, Queila de Souza. II. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica. IV. Título.

CDU: 581



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal  
Universidade Federal de Minas Gerais  
ICB - Departamento de Botânica

*Tese defendida e aprovada em 18 de fevereiro de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:*

*Garcia*

*Dra. Queila de Souza Garcia (UFMG)*

*Monteiro*

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

*Carvalho*

*Dra. Maria Laene Moreira Carvalho (UFLA)*

*Faria*

*Dr. José Marcio Rocha Faria (UFLA)*

*Marcelo Pedrosa Gomes*  
*Dr. Marcelo Pedrosa Gomes (UFMG)*

## Agradecimentos

À UFMG, ao ICB, ao Departamento de Botânica e ao Programa de pós-graduação em Biologia Vegetal, à CAPES pela concessão da bolsa e ao REUNI pela oportunidade.

À minha orientadora, Profa. Queila de Souza Garcia, pela oportunidade do trabalho, pela confiança, paciência, ajuda incondicional, diálogo e conhecimentos transmitidos.

Ao meu coorientador, Prof. Edvaldo Amaral da Silva, pelas produtivas discussões e pela disponibilidade, mesmo à distância.

Ao professor Sergi Munné-Bosch pela excelente supervisão dos trabalhos durante o período sanduíche e pela consideração.

À Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Florestal pela concessão de espaço físico para execução dos experimentos de armazenamento.

Aos professores do departamento, especialmente Denise Oliveira, Fernando Silveira, Fernando Vale, Luzia Modolo e Adaíses Maciel pelo auxílio e incentivo ao exercício da docência através do REUNI, que levarei por toda a vida.

Ao prof. Leonardo Monteiro Ribeiro e ao Dr. Marcelo Pedrosa Gomes pela ajuda e troca de experiências durante a execução dos experimentos.

Aos professores Maria Laene Carvalho e José Márcio Faria, pelas contribuições nesse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Botânica, em especial Denise, Cristina e Isabella.

Aos colegas Raquel Viveros, Sarah Reis, Rafaella Cardoso e ex-colegas Renê Carneiro, Thiago Magalhães e Vinícius Kuster pelas experiências em docência compartilhadas.

Aos ex-colegas Ana Laura Lamounier, Bárbara Castro, Daniela Duarte, e colegas do laboratório Ailton Rodrigues, Brenda Rodrigues, Felipe Viégas, Fernanda Vieira, Isabela Diamantino, Marcelo Gomes, Túlio Oliveira pelo companheirismo, e em especial à Leilane Barreto pela ajuda e intensas jornadas de trabalho juntas.

Às queridas “chicas” Laura Siles, Marta Pintó e Melanie Morales e aos demais colegas da Universitat de Barcelona pela companhia e por terem alegrado meus dias fora de casa.

Aos colegas que compartilham o laboratório, Fernanda Gomes, Cristiane Sarmento, Cristiane Jovelina, Lívia Horta, Matheus Maza e Alexandre Duarte, pela troca de experiências.

A todos os colegas e amigos que ajudaram a “quebrar cocos”.

Às queridas “marmiteiras” Rafa, Dedé, Sarete e Leidi pela companhia durante as refeições.

Às minhas amigas de sempre, Clau, My e Ju, por vocês existirem na minha vida.

Às famílias de Ubá e de Montes Claros: aos meus pais, Maurício e Nilce, meus irmãos Marley e Mauriley, meus sobrinhos Carol, Duda, Pedro, Luísa, João Victor, Marina e Mariana, meus cunhados e ao meu sogro, pela eterna torcida.

Ao meu marido, Eduardo, pela companhia e torcida incondicionais, pelo amor e carinho, pela compreensão, pela ajuda profissional e intensas leituras e releituras dos meus textos.

Aos meus cachorros, Tobias e Flora, pelo amor e fidelidade gratuitos.

À Deus, por ter me concedido a oportunidade de mais uma vitória.

Muito obrigada!

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| Resumo .....   | 1  |
| Abstract.....  | 2  |
| Introdução geral.....  | 3  |
| Referências .....  | 6  |
| Capítulo I.....  | 8  |
| Abstract .....   | 10 |
| Introduction .....   | 11 |
| Methods.....   | 13 |
| <i>Plant material</i> .....  | 13 |
| <i>Germination conditions</i> .....                                  | 13 |
| <i>Experimental design</i> .....                                     | 13 |
| <i>Hormonal profiles</i> .....                                       | 14 |
| <i>Antioxidants and lipid peroxidation</i> .....                     | 14 |
| <i>Data analysis</i> .....   | 14 |
| Results .....  | 15 |
| <i>Gibberellin effects in macaw palm seed germination</i> .....      | 15 |
| <i>Changes in hormones and antioxidants during germination</i> ..... | 15 |
| Discussion .....   | 16 |
| References .....   | 20 |
| Figures and legends.....   | 24 |
| Capítulo II.....   | 29 |
| Abstract .....   | 31 |
| Introduction .....   | 32 |
| Material and Methods.....  | 33 |
| <i>Plant material and storage conditions</i> .....                   | 33 |

|  |    |
|--|----|
| <i>Germination experiment, sampling and embryo viability and</i> .....             | 34 |
| <i>Biochemical analyses</i> .....  | 34 |
| <i>Statistical analyses</i> .....  | 35 |
| Results .....  | 35 |
| <i>Viability and germination</i> .....   | 35 |
| <i>Changes in vitamin E, JA and SA levels</i> .....                                | 35 |
| <i>Changes in GAs and ABA levels</i> .....   | 36 |
| Discussion .....   | 36 |
| References .....   | 40 |
| Figures and legends.....   | 44 |
| Capítulo III .....   | 50 |
| Resumo.....  | 51 |
| 1.    Introdução .....   | 52 |
| 2.    Material e métodos.....  | 53 |
| 2.1 <i>Material vegetal</i> .....  | 53 |
| 2.2 <i>Experimentos de germinação e viabilidade</i> .....                          | 53 |
| 2.3 <i>Amostragem</i> .....  | 54 |
| 2.4 <i>Análises bioquímicas</i> .....  | 54 |
| 2.5 <i>Análises estatísticas</i> .....   | 56 |
| 3.    Resultados .....   | 56 |
| 3.1 <i>Germinabilidade e sinalização oxidativa</i> .....                           | 56 |
| 3.2 <i>Efeitos dos tratamentos de superação de dormência (sementes de 2014)</i> 57 |    |
| 4.    Discussão .....  | 58 |
| 5.    Referências.....   | 61 |
| Considerações finais .....   | 71 |



## Resumo

Macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira neotropical, cujas sementes possuem dormência primária e apresentam germinação lenta. Esse trabalho foi realizado com o objetivo de estudar componentes fisiológicos durante os processos de superação de dormência e germinação de sementes de macaúba. No primeiro capítulo foram estudados o papel dos fitormônios ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), auxina (IAA), citocininas (CK), ácido jasmônico (JA) e salicílico (SA) e do precursor do etileno, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), além da vitamina E e peroxidação lipídica (MDA, malondialdeído) em sementes secas, embebidas, germinadas e não germinadas tratadas e não tratadas (controle) com GA<sub>3</sub>. Nesse capítulo concluiu-se que a germinação em macaúba envolve redução no conteúdo de ABA e consequente aumento da razão GA/ABA, e que a vitamina E e MDA indicam sinalização oxidativa para a germinação. No segundo capítulo, foram analisados os níveis de ABA, GA, JA, SA e vitamina E, em embriões de sementes (nas fases seca, embebida, germinada e não germinada) provenientes de frutos recém colhidos e armazenados em viveiro (simulando condições naturais) e laboratório (com e sem aplicação de GA<sub>3</sub>). Em sementes armazenadas em viveiro, os níveis de GA e vitamina E aumentaram durante a embebição, sem redução nos níveis de ABA. Esses resultados sugerem que a vitamina E esteja envolvida em mecanismos de reparo durante os ciclos naturais de hidratação/desidratação e que o ABA é importante na manutenção da dormência em bancos de sementes de macaúba. No terceiro capítulo, foram utilizados embriões de frutos formados em dois anos consecutivos para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e MDA, a partir de sementes controle e após a aplicação de tratamentos de superação da dormência (GA<sub>3</sub> e retirada do opérculo). Em sementes formadas no primeiro ano foram analisadas as atividades das enzimas do sistema antioxidante (SOD – superóxido dismutase, CAT - catalase, APX – ascorbato peroxidase e GR – glutationa redutase), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA, durante a embebição. Sementes do segundo ano apresentaram menor germinabilidade, maior nível de dormência e menor sensibilidade à GA exógena. O acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sementes dos tratamentos que apresentaram maior germinabilidade sugere o envolvimento da molécula na sinalização da germinação em macaúba. Conclui-se que os fatores ambientais influenciam a fisiologia das sementes de *A. aculeata* na pré e pós dispersão, sinalizando os processos de superação da dormência e germinação através da dinâmica de fitormônios, ROS e moléculas antioxidantes.

**Palavras-chave:** macaúba, dormência, germinação, fitormônios, GA/ABA, vitamina E, banco de sementes, sinalização oxidativa.

## **Abstract**

Macaw palm (*Acrocomia aculeata*) is a Neotropical palm specie, whose seeds have primary dormancy and show slow germination. We aimed to study physiological components during the process of overcoming dormancy and germination of macaw palm seeds. In the first chapter, we studied the role of phytormones abscisic acid (ABA), gibberellins (GA), auxin (IAA), cytokinins (CK), jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA) and the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), also vitamin E and lipid peroxidation (MDA, malondialdeide) in dry, imbibed, germinated and non-germinated seeds treated or not (control) with GA<sub>3</sub>. In this chapter we concluded that germination in macaw palm involve reduction in ABA content and consequently increase in GA/ABA ratio, and vitamin E and MDA indicate oxidative signaling to germination. In the second chapter, we analyzed the levels of ABA, GA, JA, SA and vitamin E in embryos from seeds (in dry, imbibed, germinated and non-germinated phases) of recently harvested fruits and stored in nursery (simulating natural conditions) and laboratory (with and without GA<sub>3</sub> treatment). In seeds from nursery, the levels of GA and vitamin E increased during imbibition without diminished ABA levels. These results suggest that vitamin E may be involved in repair mechanism during natural hydration/dehydration cycles and ABA is an important dormancy maintainer in soil seed banks of macaw palm. In the third chapter, we used embryos from fruits developed in two consecutive years to quantify hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and MDA levels, from seeds of control and after dormancy overcome treatments (GA<sub>3</sub> application and removal of the operculum). Seeds developed in the first year showed lower germinability, higher dormancy level and less sensibility to exogenous GA. The increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in seeds from treatments with higher germinability suggest involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in germination signaling in macaw palm. We conclude that environmental factors influence the physiology of *A. aculeata* seeds in pre- and post-dispersion phases signaling the control of overcoming dormancy and germination by dynamics of phytormones, ROS and antioxidant molecules.

**Key words:** macaw palm, dormancy, germination, phytormones, GA/ABA balance, vitamin E, soil seed bank, oxidative signaling.

## Introdução geral

A germinação de sementes consiste de um processo fisiológico complexo, que é iniciado pela embebição e consequente retomada do metabolismo, e culmina com a protrusão do embrião (germinação visível), através dos tecidos adjacentes (Bewley et al. 2013). Este processo é influenciado por fatores ambientais, como luz, temperatura, oxigênio, e por fatores fisiológicos intrínsecos à semente, como fitormônios, dentre os quais destacam-se as giberelinas (GA) e o ácido abscísico (ABA). As GA são descritas como promotoras da germinação, pois estimulam o crescimento do embrião por alongamento celular e ativam a síntese de enzimas que degradam a parede celular dos tecidos adjacentes (Bewley 1997, Kucera et al. 2005, Miransari e Smith, 2014). O papel do ABA consiste no controle da dormência de sementes, atuando de forma antagônica às GA. Para muitas espécies, o balanço entre ambos os hormônios (GA/ABA) é o que determina a germinação (Kucera et al. 2005, Nambara et al. 2010, Rodríguez-Gacio et al. 2009). A interação entre GA e ABA com outros hormônios pode também influenciar o controle da germinação ou a manutenção da dormência. Etileno e brassinosteroides contrapõem os efeitos do ABA e promovem a germinação (Kucera et al. 2005). O ácido jasmônico ainda não tem uma função elucidada na germinação, podendo ser estimulatório ou inibitório em espécies distintas (Linkies e Leubner-Metzger 2012). O ácido salicílico pode estar envolvido na síntese de enzimas antioxidantes e interage com o ABA na manutenção do vigor das sementes (Rajjou et al. 2006). O papel das citocininas e auxinas em processos de divisão e alongamento celular é bem conhecido, sendo, portanto, importantes fitormônios em eventos pós-germinativos (Díaz-Vivancos et al. 2013).

Apesar da evidente importância dos fitormônios como sinalizadores no processo de germinação, outras moléculas também podem desempenhar essa função. Durante a embebição, a retomada do metabolismo das sementes leva ao aumento da respiração celular, à beta-oxidação e outros processos que geram espontaneamente espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) (Bailly et al. 2008). Moléculas de ROS podem interagir com fitormônios, como ABA e etileno, e atuar na sinalização do alívio da dormência e germinação (Liu et al. 2010). Entretanto, se a formação de ROS aumenta, antioxidantes são recrutados pelas células para eliminar o excesso de moléculas reativas (Bailly et al. 2008). Os antioxidantes são classificados em não enzimáticos, como tocoferóis e tocotrienóis (vitamina E), ascorbato (vitamina C) e glutatona, enquanto os

enzimáticos constituem as enzimas catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutathione redutase, principalmente. Se a produção de ROS for maior que a capacidade dos antioxidantes em eliminá-las, o excesso pode causar danos oxidativos em lipídios e proteínas, perda de integridade das membranas celulares (De Gara et al. 1997) e alterações no metabolismo hormonal (Díaz-Vivancos et al. 2013). Dessa forma, a homeostase redox em sementes é crucial para garantir o sucesso da germinação. Tanto sementes que permanecem no solo após a dispersão (banco de sementes), sujeitas às variações sazonais de umidade, precipitação e temperatura, como sementes mantidas em condições controladas de armazenamento, podem apresentar danos oxidativos por formação de ROS, levando à deterioração (Rajjou e Debeaujoun 2008). Dessa forma, a atuação de antioxidantes em sementes *in situ* ou que passam por algum tipo de armazenamento (*ex situ*) pode garantir a viabilidade das mesmas por redução dos danos oxidativos (Tommasi et al. 2006, Pukacka e Ratajczak 2007).

Grande parte da literatura sobre fisiologia de sementes está relacionada a plantas cultivadas, espécies daninhas e/ou invasoras ou utiliza plantas modelo, com a finalidade de aplicar o conhecimento gerado na agricultura. O número de trabalhos com plantas nativas não domesticadas é pequeno, principalmente em grupos específicos, como as palmeiras (família Arecaceae). No Brasil, a biodiversidade de Arecaceae nativas oferece desafios à ciência e alternativas à economia de comunidades que vivem do extrativismo. *Acrocomia aculeata* (macaúba) é uma palmeira nativa, amplamente distribuída no Brasil, que apresenta alta capacidade adaptativa e plasticidade fisiológica (Pires et al. 2013). É uma espécie com potencial para o mercado de biocombustíveis devido a alta concentração de lipídios no mesocarpo e na semente (Hiane et al. 2005). Entretanto, a exploração sustentável da macaúba depende da propagação, cuja limitação é a germinação de suas sementes, que são dispersas com dormência primária (Ribeiro et al. 2011), a qual é lentamente superada no ambiente.

Os frutos de macaúba (pirênios) podem permanecer no solo e formar bancos, uma vez que as sementes mantêm a viabilidade quando armazenadas por longos períodos (Ribeiro et al. 2012, Barreto et al. 2014). Entretanto, ainda não se sabe se o vigor e a germinabilidade/superação de dormência de sementes de macaúba são alterados após passarem por algum tipo de armazenamento, seja *in situ* ou *ex situ*. O tipo de dormência apresentado pelas sementes de macaúba ainda está sob discussão (Ribeiro et al. 2011, Baskin e Baskin, 2013), mas sabe-se que existem componentes fisiológicos que impedem que a germinação ocorra (Ribeiro et al. 2015). Dentre os métodos de superação de

dormência de sementes de macaúba já testados, dois se destacam. A exposição das sementes a altas concentrações de GA<sub>3</sub> promove entre 30 a 50% de germinação (Ribeiro et al. 2011, Oliveira et al. 2013) e a retirada do opérculo remove a barreira mecânica e possibilita a germinação de cerca de 80% das sementes em poucos dias (Ribeiro et al. 2015). Entretanto, pouco se sabe como estes métodos afetam os processos fisiológicos que culminam na germinação das sementes de macaúba.

Dessa forma, a motivação desse estudo foi investigar as bases fisiológicas dos processos de dormência e germinação, tomando *A. aculeata* como espécie representativa da família Arecaceae, cujas sementes apresentam dormência primária. Com esse trabalho objetivou-se identificar e quantificar os principais componentes fisiológicos e bioquímicos durante o processo germinativo, da pré-embebição à germinação visível, em sementes de macaúba recém colhidas e armazenadas, utilizando os métodos de superação de dormência mais eficientes.

Para atingir os objetivos propostos, a tese foi dividida em três capítulos. No primeiro capítulo, intitulado “Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance” são discutidas as funções de fitormônios endógenos, principalmente do ABA e das GA bioativas, em fases fisiológicas da germinação de macaúba, além de relacionar o papel da vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e da peroxidação lipídica (MDA) com o processo germinativo. Esse trabalho está publicado na revista *Plant Biology* (doi: 10.1111/plb.12332).

No segundo capítulo, intitulado “Fruit storage conditions determine changes in hormonal and vitamin E profiles during germination process of macaw palm seeds”, objetivou-se estudar o papel da vitamina E e as mudanças nos perfis dos hormônios ABA, GA, ácido salicílico e ácido jasmônico durante a germinação de sementes de macaúba recém colhidas e provenientes de frutos armazenados em viveiro, expostos às variações de temperatura e precipitação e em laboratório (armazenamento a seco), tratadas ou não com GA<sub>3</sub>. O manuscrito resultante deste estudo foi escrito nas normas do periódico *Seed Science Research*.

No terceiro capítulo, intitulado “Efeito do ano de produção na germinabilidade de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae)”, objetivou-se avaliar as diferenças na germinabilidade e no nível de dormência de sementes produzidas em anos consecutivos. Neste estudo foi investigado como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o sistema antioxidante enzimático (catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutathione redutase) e a peroxidação lipídica (estimada por MDA) atuam na sinalização da germinação e superação de dormência de

sementes de macaúba. Esse capítulo foi escrito nas normas do periódico Flora.

## Referências

- 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 Rendues Biologie* 331, 806-814.
- Barreto L. C., Garcia Q. S., Morales M., Müller M., Munné-Bosch S.** (2014). Vitamin E and defense-related phytohormones are reliable markers of embryo growth in macaw palm fruits exposed to various storage conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 118, 203-213.
- Baskin J.M., Baskin C.C.** (2013). What kind of seed dormancy might palms have? *Seed Science Research*, 24, 17-22.
- Bewley D.** (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9, 1055-1066.
- Bewley D., Bradford K.J., Hilhorst H.W.M., Nonogaki H.** (2013). *Seeds – Physiology of development, germination and dormancy*, New York, Springer. 3rd ed.
- De Gara L, De Pinto M.C., Arrigoni O.** (1997) Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum*, 100, 894-900.
- Díaz-Vivancos P., Barba-Espín G., Hernández J.A** (2013). Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. *Plant Cell Reports*, 32, 1491-1502.
- Hiane P.A., Ramos-Filho M.M., Ramos M.I.L., Macedo M.L.R.** (2005). Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., Pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8, 256-259.
- Kucera B., Cohn M.A., Leubner-Metzger G.** (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15, 281-307.
- Linkies A., Leubner-Metzger G.** (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* 31,253–270.
- Liu Y., Ye N., Liu R., Chen M., Zhang J.** (2010) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*, 61, 2979-2990.
- Miransari M., Smith D.L.** (2014) Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110–121.
- Nambara E., Okamoto M., Tatematsu K., Yano R., Seo M., Kamiya Y.** (2010)

Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 20, 55–67.

**Oliveira T.G.S., Rodrigues-Junior A. G., Souza P. P., Ribeiro L. M.** (2013) Use of phytohormones in overcoming macaw palm seed dormancy. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35, 505-511.

**Pires T. P., Souza E. S., Kuki K. N., Motoike S. Y.** (2013). Ecophysiological traits of the macaw palm: a contribution towards the domestication of a novel oil crop. *Industrial Crops Production*, 44, 200-210.

**Pukacka S., Ratajczak E.** (2007) Age-related biochemical changes during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Seed Science Research*, 17, 45–53.

**Rajjou L., Belghzi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C., Job D.** (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology*, 141,910-923.

**Rajjou L., Debeaujon I.** (2008) Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendues Biologies*, 331, 796-805.

**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.

**Ribeiro, L.M., Oliveira, T.G.S., Carvalho, V.S., Silva, P.O., Neves, S.C., Garcia, Q.S.** (2012) The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. *Seed Science and Technology*, 40, 344–353.

**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 Science and Technology*, 39, 303-317.

**Rodríguez-Gacio M.C., Matilla-Vázquez M.A., Matilla A.J.** (2009) Seed dormancy and ABA signaling, the breakthrough goes on. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 1035-1048.

**Tommasi F., Paciolla C., Pinto M.C., De Gara L.** (2006) Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 359–368.

## **Capítulo I**

Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance\*

\*Publicado no periódico Plant Biology (doi: 10.1111/plb.12332)



## **Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance**

Elisa M. Bicalho<sup>1</sup>, Marta Pintó-Marijuan<sup>2</sup>, Melanie Morales<sup>2</sup>, Maren Müller<sup>2</sup>, Sergi Munné-Bosch<sup>2</sup>, Queila S. Garcia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Spain

## **Abstract**

The hormonal mechanisms involved in palm seed germination are not fully understood. To better understand how germination is regulated in Arecaceae, we used macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) seed as a model. Endogenous hormone concentrations, tocopherol and tocotrienol and lipid peroxidation during germination were studied separately in the embryo and endosperm. Evaluations were performed in dry (D), imbibed (I), germinated (G) and non-germinated (NG) seeds treated (+GA<sub>3</sub>) or not treated (control) with gibberellins (GA). With GA<sub>3</sub> treatment, seeds germinated faster and to a higher percentage than control seeds. The +GA<sub>3</sub> treatment increased total bioactive GA in the embryo during germination relative to the control. Abscisic acid (ABA) concentrations decreased gradually from D to G in both tissues. Embryos of G seeds had a lower ABA content than NG seeds in both treatments. The GA/ABA ratio in the embryo was significantly higher in G than NG seeds. The +GA<sub>3</sub> treatment did not significantly affect the GA/ABA ratio in either treatment. Cytokinin content increased from dry to germinated seeds. Jasmonic acid (JA) increased and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) decreased after imbibition. In addition, α-tocopherol and α-tocotrienol decreased, while lipid peroxidation increased in the embryo during germination. We conclude that germination in macaw palm seed involves reductions in ABA content and, consequently, increased GA/ABA in the embryo. Furthermore, the imbibition process generates oxidative stress (as observed by changes in vitamin E and MDA).

**Keywords:** abscisic acid, gibberellins, lipid peroxidation, tocopherols, auxin, cytokinins.

**Abbreviations:** ABA, abscisic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; CKs, cytokinins; DHZ, dihydrozeatin; DHZR, dihydrozeatin riboside; DW, dry weight; GA, gibberellin; IAA: indole-3-acetic acid; IPA, isopentenyl adenosine; JA, jasmonic acid; MDA, malondialdehyde; SA, salicylic acid; Z, zeatin; ZR, zeatin riboside.

## **Introduction**

Germination is a complex process mediated through biochemical networks and integrated by signalling molecules, such as reactive oxygen species (ROS), antioxidants (El-Maarouf-Bouteau & Bailly 2008) and hormones, mainly abscisic acid (ABA) and gibberellins (GA) as inhibitor and stimulator compounds, respectively (Kucera et al. 2005). Germination starts with water uptake followed by embryo growth, and the success of this process depends on hormone balance as well as other biochemical changes (Kucera et al. 2005). Seeds dormancy of some species is due to high ABA and/or low GA levels, and low sensitivity to GA can also delay germination (Bewley et al. 2013). Seeds with primary dormancy accumulate ABA during maturation and desiccation, and dormancy breaking depends on the hormone balance (mainly GA/ABA) and the interplay between ROS and antioxidant mechanisms (El-Maarouf-Bouteau & Bailly 2008).

Gibberellins stimulate germination by inducing synthesis or activation of cell wall loosening enzymes, acting as stimuli for embryo/radicle protrusion and allowing completion of germination (Bewley et al. 2013). ABA catabolism begins during imbibition in dormant and non-dormant seeds (Ali-Rachedi et al. 2004) and, unlike GA, ABA inhibits synthesis (or action) of cell wall loosening enzymes (Bewley et al. 2013). In addition, tissues surrounding the embryo (e.g. micropilar endosperm) can constitute mechanical barriers to oxygenation and hinder ABA catabolism (Benech-Arnold et al. 2006). Recent reviews have discussed germination processes in terms of not only endogenous GA and ABA levels but also GA/ABA ratio and the functions of each hormone (Nambara et al. 2010; Díaz-Vivancos et al. 2013).

Apart from GA and ABA, other hormones are involved during germination; however, little is known about their roles. Wang et al. (2011) demonstrated that cytokinins (CK) antagonize ABA effects at the transcriptional level and may play a role in cell division and elongation of emerging roots. Auxin involvement in dormancy alleviation and germination are still under investigation (Blake et al. 2002; Díaz-Vivancos et al. 2013). Ethylene has been shown to promote germination, being more important during its later phases, and counteracts the effects of ABA (Matilla & Matilla-Vázquez 2008). Jasmonic acid (JA) also controls seed dormancy (Blake et al. 2002), although its precise role is still unclear and controversial (Linkies & Leubner-Metzger 2012). Salicylic acid (SA) is involved in seed germination, antioxidant enzyme synthesis and interacts with ABA to effect seed vigour (Rajjou et al. 2006).

Germination is not only a consequence of complex hormonal interactions, but also involves changes in cell structure and activation of mechanisms to reduce lipid peroxidation and oxidative stress (Díaz-Vivancos et al. 2013). Tocopherol and tocotrienol, which are vitamin E compounds, are present in palm seeds (Siles et al. 2013), are important antioxidants that mitigate seed damage during early germination events by reducing lipid peroxidation (Sattler et al. 2004). Apart from inducing oxidative stress, ROS are important signalling molecules in seed germination, being related to ABA, GA protein metabolism and gene expression (El-Maarouf-Bouteau & Bailly 2008; Gomes et al. 2014). Increased ROS accumulation has been associated with lipid peroxidation and membrane damage during oxidative stress and loss of seed viability (Bailly et al. 2000). However, lipid peroxidation in oil seeds is transient during germination and is mediated by lipoxygenases (Feussner et al. 2001).

Studies to establish physiological mechanisms underlying seed germination are scarce in certain plant groups, such as Arecaceae. Palm seed can show different forms of dormancy, making the underlying process controversial within this family (Baskin & Baskin 2013). Studies have demonstrated that removing part of the operculum, combined with GA treatment, can stimulate total or partial germination in palm species (Roberto & Habermann 2010; Ribeiro et al. 2011; Neves et al. 2013). Dormancy is an effective strategy to maximise long-term reproductive success (Baskin & Baskin 1998), but can also hinder establishment of important commercial crops, increasing the risk of over-exploitation of natural populations.

Here, we examined palm seed germination physiology in *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.; macaw palm) as a model; a species in which the type of dormancy is still under investigation (see Baskin & Baskin 2013). *A. aculeata* is distributed throughout the tropical Americas and adapted to a wide range of environmental conditions, with physiological attributes providing considerable ecological plasticity (Pires et al. 2013). The high oil content of macaw palm fruits (Hiane et al. 2005) makes them potentially valuable as a biofuel crop in tropical regions, but seed dormancy has limited their wider commercial use. Germination in macaw palm is very slow, with a low percentage even when seed is removed from the fruit (Ribeiro et al. 2011). A recent study of macaw palm reported that operculum removal can overcome dormancy, increasing both percentage and rate of germination (>80% in few days) and promoting hormone changes in different tissues of germinated seeds (Ribeiro et al. 2014). However, the roles of hormones in macaw palm seed during natural germination are not fully understood. To better

understand the physiological mechanisms of macaw palm seed germination, we examined, for the first time, the dynamics of hormones and antioxidants at different stages of germination in seeds with or without GA treatment, simulating natural conditions.

## **Methods**

### *Plant material*

*Acrocomia aculeata* (macaw palm) fruits were collected from a wild population in Mirabela 16°20'45"S 44°13'17"W, Minas Gerais State, Brazil. The fruits were kept at room temperature for approximately 30 days, long enough for the seeds could be removed from the endocarp without causing damage and that does not interfere with seeds germination potential and vigor (Barreto et al. 2014). Only intact seeds were used for experiments.

### *Germination conditions*

Seeds were surface-sterilized with a 6% sodium hypochlorite (NaClO) solution for 15 min, rinsed three times in distilled water, and planted in sterile vermiculite humidified to 90% of its field capacity. The experiments were conducted in growth-chambers at 30°C, under a 12 hour photoperiod ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photon flux) during 21 weeks. All seeds were evaluated daily and the criteria adopted for germination was the appearance of the cotyledonary petiole, as described by Ribeiro et al. (2011).

### *Experimental design*

The experiment was designed to examine the dynamics of the endogenous hormones and antioxidant levels in seeds and to evaluate the extent of lipid peroxidation during germination in seeds treated (+GA<sub>3</sub>) and non-treated (control) with GA<sub>3</sub>. Four physiological phases were chosen for biochemical analyses: dry seeds – D (before imbibition); totally imbibed – I (12 days after sowing); germinated – G (each seed, individually identified, as soon as the cotyledonary petiole appeared); and non-germinated – NG (intact remaining seeds without damage and high viability – above 80%, according to tetrazolium test carried out at the end of the experiment, after 21 weeks). To evaluate the effects of gibberellin treatment on germination, completely imbibed seeds (12 days after sowing) were separated into two treatment groups: control and +GA<sub>3</sub>. Seeds in the latter treatment group were totally submerged in 2000 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) solution during 24 h at room temperature, as described by Ribeiro et al. (2011). Cumulative

germination and final germination percentage were calculated. Each treatment consisted of 8 sets of 100 seeds (n=8).

At each physiological phase, the seeds were dissected into the embryo and endosperm and both tissues were used in all the biochemical analyses. The samples (n=4) were frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until analyzed. At each physiological phase the water percentage was measured in embryo and endosperm (n=4). Samples were weighed before and after drying at 105 °C for 24 hours. Biochemical results were expressed on a dry weight basis.

#### *Hormonal profiles*

Levels of abscisic acid (ABA), gibberellins (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> and GA<sub>4</sub>), cytokinins (*t*-Z, *t*-ZR, IPA, DHZ, and DHZR), auxin (IAA), the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), jasmonic acid (JA), and salicylic acid (SA) were determined as described (Müller and Munné-Bosch 2011). Samples were analyzed by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode; quantification was performed by running calibration curves for the internal standards of each labeled and unlabeled plant hormone.

#### *Antioxidants and lipid peroxidation*

The levels of tocopherols and tocotrienols (vitamin E) were measured in methanolic extracts by HPLC, as described by Cela et al. (2011). The extent of lipid peroxidation was determined spectrophotometrically by estimating malondialdehyde (MDA) levels, as described by Du and Bramlage (1992).

#### *Data analysis*

Statistical analyses were performed using Statistica 7 software (StatSoft, Inc., USA); the significance level was set at  $P < 0.05$ . For data on the D, I, G (control), G (+GA<sub>3</sub>), NG (control) and NG (+GA<sub>3</sub>) treatments of each tissue were analyzed using one-way analyses of variance (ANOVA) with “treatment” being the only factor. Data on the G and NG phases of both treatments (control and +GA<sub>3</sub>) in each tissue were also analyzed using a one-way ANOVA. When significant differences were found for any factor, the Tukey post-hoc comparison was applied to determine individual differences between the means.

Significant differences are marked with different letters (lower case for general ANOVA; upper case for comparisons between G and NG treatments) in the figures.

## Results

### *Gibberellin effects in macaw palm seed germination*

The major effects induced by GA<sub>3</sub> treatment were observed in seed germination dynamics and endogenous hormone levels. +GA<sub>3</sub> treatment resulted in a 4-fold increase in germination percentage (Fig. 1) and was accompanied by a reduction in the germination time compared to the control. Cumulative germination percentage differences between treatments were already evident in the second week after GA<sub>3</sub> application, however, asynchronous germination was observed in both treatments. The increase in germination percentage in GA<sub>3</sub> treatment was clearly discernible by the 11<sup>th</sup> week. From 12<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> week, the effect of exogenous GA<sub>3</sub> was not marked and the slopes of control and +GA<sub>3</sub> treatment were similar (Fig. 1).

Dry seeds showed water contents around 8%. In I, G and NG phases, the water content was significantly different in embryo and endosperm. Embryo reached more than 40% water while endosperm reached around 11%, but the water content in each tissue individually was higher in I, G and NG phases than in D seeds.

### *Changes in hormones and antioxidants during germination*

Major biochemical alterations were observed during the germination of macaw palm seeds. Comparative analyses of the hormonal levels in embryos and endosperm during germination revealed that embryo tissues experienced the strongest changes. The +GA<sub>3</sub> treatment increased total active GAs (GA<sub>1</sub>+GA<sub>3</sub>+GA<sub>4</sub>) of the embryo in the G phase ( $P < 0.01$ ; Fig. 2). No differences were observed in GAs concentration between control and +GA<sub>3</sub> treatment in embryos of NG phase (Fig. 2). ABA concentrations decreased gradually from D to G in both tissues ( $P < 0.01$ ; Fig. 2). ABA concentrations were highest in the embryo, ranging from 555 ng.g<sup>-1</sup> dry weight (DW) in the D seeds to 7.29 ng.g<sup>-1</sup> DW in G seeds (control). Embryos of G seeds showed less than 20% ABA content of NG seeds in both treatments, with significant differences ( $P < 0.01$ ) between G and NG phases. The GAs/ABA ratio in the embryo was significantly higher in G than NG seeds ( $P < 0.01$ ; Fig. 2). The +GA<sub>3</sub> treatment did not significantly affect GAs/ABA ratios (Fig. 2).

Total cytokinin levels increased in the embryos from D to G in both treatments (Fig. 3), being mainly due to increases in Z and IPA (data not shown). Cytokinin levels did

not show significant differences in endosperm. IAA was detected in both tissues without significant changes in embryo and increased during phase I in the endosperm ( $P < 0.01$ ; Fig. 3). ACC concentrations decreased in the embryo during imbibition and kept low during the other phases, whereas the endosperm showed changes in ACC levels (Fig. 3). JA levels, on the other hand, increased during imbibition in the embryo, attaining their maximum levels ( $> 3000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$ ) in phase I. JA levels in the endosperm showed no significant differences between phases. SA levels did not vary in the embryo and in the endosperm (Fig. 3).

Concerning vitamin E levels and extent of lipid peroxidation, both  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol were detected in the embryo, with higher levels of  $\alpha$ -tocopherol than  $\alpha$ -tocotrienol (Fig. 4). The concentration of  $\alpha$ -tocopherol increased in phase I, but later decreased in phase G; its concentration in NG embryos remained similar to those of phase I (Fig. 4).  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocotrienols showed their highest concentrations in the endosperm, followed by  $\beta$ -tocotrienol. The extent of lipid peroxidation, which was estimated by MDA levels, increased in the embryos from the D to G phases ( $P < 0.01$ ). Both I, G (+GA<sub>3</sub>) and NG (control and +GA<sub>3</sub>) embryos showed similar values, being lower than in G phase control seeds.

## Discussion

Even though GA<sub>3</sub> application is a widely used method to increase germination percentage in dormant palm seeds (Ali-Rachedi et al. 2004, Neves et al. 2013, Roberto and Habermann 2010, Ribeiro et al. 2011), it did not totally promote germination in macaw palm seeds [as observed by Ribeiro et al. (2011) and confirmed in the present study]. It is known that some species may produce seeds physiologically heterogeneous (Baskin and Baskin 1998), and the loss of dormancy will occur differently in individual seeds within the population (Batlla and Benech-Arnold 2005). The low germinability of macaw palm seeds treated with GA<sub>3</sub> suggests different depths of dormancy and, consequently, sensitivity to gibberellins within the seed population. However, GA<sub>3</sub> treatment increased the germination rate, such that the +GA<sub>3</sub> seeds reached in four weeks the maximum germination obtained by the control seeds at 18<sup>th</sup> week, result also reported by Chen et al. (2008). Another relevant observation about levels of dormancy within macaw palm seed populations is asynchronous germination. From the third to the 21<sup>th</sup> experimental week, macaw palm seeds germinated without reached a plateau in both treatments (as shown in



Fig. 1). Considerable variation in germination time (asynchrony) can be a selective advantageous trait to maintain high variability (Baskin and Baskin 1998).

Major changes in hormone levels of macaw palm seed endosperm were manifested in ABA content, and in some alterations in IAA, JA and SA levels. ABA decreases were probably related to imbibition effects, which is in agreement with Ali-Rachedi et al. (2004). ABA inhibits the synthesis and action of cell wall hydrolases (Amaral da Silva et al. 2008, Queiroz et al. 2012), and their reduction during the imbibition allows the action of these enzymes during storage mobilization. The tissues surrounding the embryo are sites of cell wall weakening by mannanases, galactosidases, and mannosidases, although these can also represent a mechanical defense (Bewley et al. 2013). As such, the endosperm is more directly involved in reserve mobilization and embryo protection than in early germination process. JA and SA are important signaling molecules for triggering defense responses against pathogens once seed moisture content has increased. Thereby, the hormonal changes observed in this study are not conclusive if the endosperm actively participates in the macaw palm seed germination, although recent works show embryo-endosperm interaction during the germination process (Nonogaki 2014, Ribeiro et al. 2014, Yan et al. 2014).

The embryo is the focus of the biochemical reactions leading to macaw palm seed germination, as was demonstrated in this study for control and +GA<sub>3</sub> seeds, and by Ribeiro et al. (2014) for seeds without operculum. Higher GAs concentration observed in G seeds treated with GA<sub>3</sub> was also observed by Ribeiro et al. (2014), which can be attributed to GA<sub>3</sub> input. Although Ribeiro et al. (2014) suggested that GAs increase has a central role in germination and the absence of GAs synthesis contribute to dormancy maintenance, our data did not show significant GAs increases during germination (G control seeds). The results obtained in this study provide new insights into the crucial changes driving the germination process in macaw palm: ABA and the balance GAs/ABA. Reduced ABA contents in macaw palm seeds after imbibition is independent of their successful germination. Decreases in ABA contents during imbibition have been described in seeds of other species with effects not strictly related to germination (Ali-Rachedi et al. 2004). However, ABA concentrations were significantly lower in embryos of G seeds compared to remaining NG seeds after 21 weeks of imbibition, in both treatments. Although GAs concentration did not differ in embryos of G and NG seeds (both treatments), the higher decreases of ABA contents in G seeds resulted in an increase of the GAs/ABA ratio, which allowed germination of macaw palm seeds. The higher GAs content in embryos of G

treated seeds suggests that the input of GA<sub>3</sub> could contribute to the fact that embryos reached the adequate GAs/ABA ratio faster than embryos of control seeds, and consequently, a higher germination rate.

GA<sub>3</sub> application increased total active GA and IAA contents in G embryos, however, no changes were observed in the balance between GAs and ABA or in cytokinin levels between treated and non-treated seeds. Increases in CKs contents have been associated with the completion of germination and post-germination events (Chiwocha et al. 2005), antagonizing ABA effects at a transcriptional level and facilitating the roles of GAs in germination (Wang et al. 2011). The role of auxin in promoting embryo cell elongation during germination is relatively well known (Taylor et al. 2007), but little information is currently available concerning the involvement of auxins in promoting germination. The role of IAA was not so clear in macaw palm seeds, but it could be related to post-germination events, since GA<sub>3</sub> treatment accelerated the germination.

It is well known that cytokinins and auxins are directly involved to growth events (cell cycle and elongation), that strongly participate in post-germination development, as demonstrated by Ribeiro et al. (2014) in macaw palm seeds without operculum after germination (seedlings). For this reason, significant changes in both hormones during early germination of macaw palm seeds were not observed in the present study. The decreased levels of ACC (the direct ethylene biosynthesis precursor) observed in the embryo during imbibition and germination could be related to ethylene production (an aspect to be investigated further). The direct role of ACC in germination is not very clear, however, decreases in ACC levels have been related to radicle emergence (Barba-Spín et al. 2011). Previous studies have produced controversial visions of the roles of JA in seed germination (revised by Linkies and Leubner-Metzger. 2012). JA and SA levels in macaw palm endosperm negatively correlated with embryo growth and were considered to act at the first barrier against biotic stress (Barreto et al. 2014). However, whether or not JA and SA are involved in promoting macaw palm seed germination remains unclear.

In addition to hormonal changes, macaw palm seed germination was characterized by oxidative stress, as indicated by decreased  $\alpha$ -tocopherol contents, as well as by lipid peroxidation dynamics. Oxidative stress is indicative of physiological alterations in macaw palm seeds, probably due to the increasing moisture contents of imbibing seeds leading to metabolic reactivation, and ROS formation. Vitamin E mutants (*vte*) of *Arabidopsis* demonstrated the irreplaceable functions of tocopherols as antioxidants during germination (Sattler et al. 2006) and vitamin E was considered to be an efficient marker to macaw palm

embryo protection during storage (Barreto et al. 2014). Lipid peroxidation in oil-rich seeds has been used as an indicator of oxidative damage (Sung 1996). Our results indicate that the oxidative stress occurring during germination does not necessarily result in oxidative damage neither in changes in ascorbate dynamic and oxidation state (data not shown). In macaw palm seeds, both vitamin E and lipid peroxidation dynamics let us to infer that an oxidative signaling occurs during germination. The ABA content decrease in G embryos coincides with high values of lipid peroxidation. The increase in lipid peroxidation is well documented to be caused by ROS formation and is related to ABA catabolism in seeds (Liu et al. 2010). An increase in MDA as well as a decrease in ABA contents were also found during imbibition of rice (Ye et al. 2011). In this study, GA<sub>3</sub> treatment did not cause increases in lipid peroxidation during germination in embryos, as observed in controls. These results suggest that natural germination of macaw palm seeds includes lipid peroxidation and the increase in germination rate promoted by GA<sub>3</sub> application may prevent oxidative stress.

In conclusion, germination in the macaw palm is stimulated by hormonal changes, being driven by ABA and GAs/ABA ratios, with a possible involvement of cytokinins and/or auxin (when seeds are treated with exogenous active GA<sub>3</sub>). The oxidative stress (changes in  $\alpha$ -tocopherol and MDA levels) noted in the germinated phase in macaw palm embryos seems to be a step in dormancy alleviation and may be related to hormonal signaling. The comparison between control seed germination and the common practice of applying GA<sub>3</sub> to dormant seeds indicates that no changes occurred in GA/ABA balance in both treatments. However GA<sub>3</sub> accelerated germination process without induct increase in lipid peroxidation. Both biochemical aspects strongly characterize early germination in macaw palm seeds. The remaining ABA concentration in NG seeds embryos is related to dormancy maintenance and may contribute to form seed banks, once high ABA content in macaw palm embryos protect them against biotic stress during storage (Barreto et al. 2014). The biochemical evaluations in NG seeds demonstrated that the dormancy in macaw palm seeds is functional for species success in their natural habitat.

### **Acknowledgements**

Support for this research was received through CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, process 560812/2010-8,) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, process PPM 00500-11), Brazil. We thank to Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Florestal to concede space

and infrastructure to process the macaw palm fruits. We thank to IBAMA to give permission to export seeds. E.M.B received a sandwich fellowship from CNPq and a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (Brazil) and Q.S.G. received a Produtividade em Pesquisa grant awarded from CNPq.

### **Financial Support**

Financial support was received through CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, process 560812/2010-8), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, process PPM 00500-11) and the ICREA Academia prize awarded to S.M.B. by the Generalitat de Catalunya.

### **References**

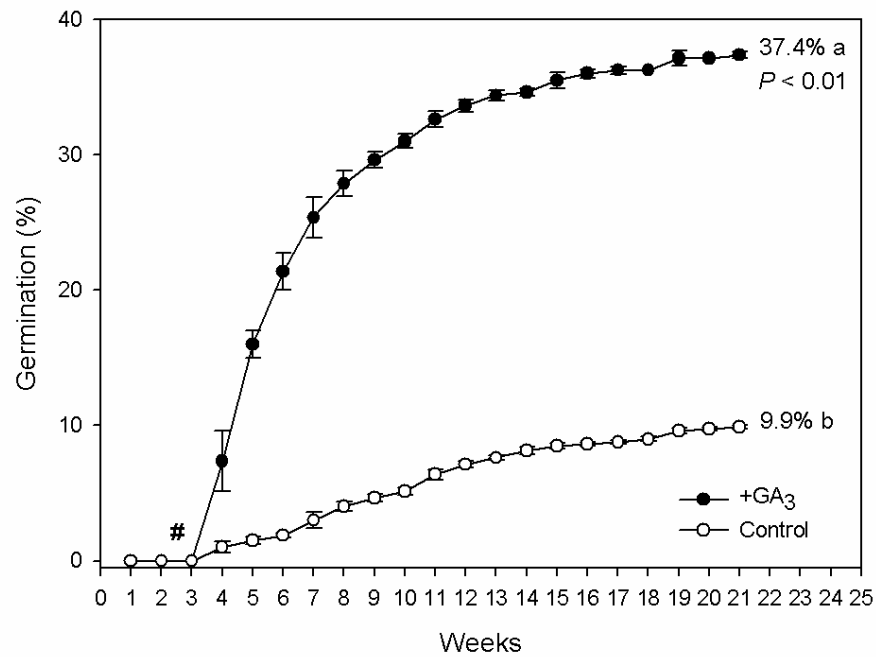
- Ali-Rachedi S., Bouinot D., Wagner, M., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P., Jullien, M. (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **219**, 479-488.
- Amaral da Silva E. A., Toorop P. E., Van Lammeren A. A. M., Hilhorst H. W. M. (2008) ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. *Annals of Botany*, **102**, 425-433.
- Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Côme D. (2000). Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Science Research*, **10**, 35-42.
- Barba-Spín G., Diaz-Vivancos P., Job D., Belghazi M., Job C., Hernández J. A. (2011). Understanding the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant Cell and Environment*, **34**, 1907-1919.
- Barreto L. C., Garcia Q. S., Morales M., Müller M., Munné-Bosch S. (2014). Vitamin E and defense-related phytohormones are reliable markers of embryo growth in macaw palm fruits exposed to various storage conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **118**, 203-213.
- Baskin J. M., Baskin C. C. (2013). What kind of seed dormancy might palms have? *Seed Science Research*, **24**, 17-22.
- Baskin C. C., Baskin J. M. (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*, first ed. Academic Press, San Diego: 666pp.

- Batlla D, Benech-Arnold RL. (2005). Changes in the light sensitivity of buried *Polygonum aviculare* seeds in relation to cold-induced dormancy loss: development of a predictive model. *New Phytologist*, **165**, 445–452.
- Benech-Arnold R., Gualano N., Leymarie J., Côme D., Corbineau F. (2006). Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1423-1430.
- Bewley D., Bradford K. J., Hilhorst H. W. M., Nonogaki H. (2013). *Seeds – Physiology of development, germination and dormancy*, third ed. Springer, New York: 392.
- Blake P. S., Taylor J. M., Finch-Savage W. (2002). Identification of abscisic acid, indole-3-acetic acid, jasmonic acid, indole-3-acetonitrile, methyl jasmonate and gibberellins in developing, dormant and stratified seeds of ash (*Fraxinus excelsior*). *Plant Growth Regulation*, **37**, 119-125.
- Cela J., Chang C., Munné-Bosch S. (2011). Accumulation of  $\gamma$ - rather than  $\alpha$ -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **52**, 1389-1400.
- Chen S. Y., Kuo, S. R., Chien, C. T. (2008). Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. *Tree Physiology*, **28**, 1431-1439.
- Chiwocha S. D. S., Cuttler A. J., Abrams S. R., Ambrose S. J., Yang J., Ross A. R. S., Kermodé A. R. (2005). The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinins and gibberellins metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *The Plant Journal*, **42**, 35-49.
- Díaz-Vivancos P., Barba-Espín G., Hernández J.A (2013). Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. *Plant Cell Reports*, **32**, 1491-1502.
- Du Z., Bramlage W. J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **40**, 1566-1570.
- El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling. & Behavior*, **3**, 175-182.
- Feussner I., Kühn H., Wasternack C. (2001). Lipoxynase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plant Science*, **6**, 268-273.

- Gomes M. P., Smedbol Ã., Carneiro M. M. L. C., Garcia Q. S., Juneau P. (2014). Reactive oxygen species and plant hormones. In Ahmad, P. (Ed.). *Oxidative damage to plants*. Academic Press, Hardbound: 65-88pp.
- Hiane P. A., Ramos Filho M. M., Ramos M. I. L., Macedo M. L. R. (2005). Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., Pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Brazilian Journal of Food Technology*, **8**, 256-259.
- Kucera B., Cohn M. A., Leubner-Metzger G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, **15**, 281-307.
- Linkies A., Leubner-Metzger G. (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports*, **31**, 253–270.
- Liu Y., Ye N., Liu R., Chen M., Zhang J. (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/erq125.
- Matilla A. J., Matilla-Vázquez M. A. (2008). Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Science*, **175**, 87-97.
- Müller M., Munné-Bosch S. (2011). Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods*, **7**, 37.
- Nambara E., Okamoto M., Tatematsu K., Yano R., Seo M., Kamiya Y. (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, **20**, 55-67.
- Neves S. C., Ribeiro L. M., Cunha L. R. G., Pimenta M. A. S., Mercadante-Simões M. O., Lopes P. S. N. (2013). Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Atallea vitrivir*). *Flora*, **208**, 68-78.
- Nonogaki, H. (2014). Seed dormancy and germination—emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 1-14.
- Pires T. P., Souza E. S., Kuki K. N., Motoike S. Y. (2013). Ecophysiological traits of the macaw palm: a contribution towards the domestication of a novel oil crop. *Industrial Crops Production*, **44**, 200-210.
- Queiroz S. E. E., Amaral da Silva E. A., Davide A. C., José A. C., Silva A. T., Fraiz A. C. R., Faria J. M. R., Hilhorst H. W. M. (2012). Mechanism and control of *Genipa americana* seed germination. *Physiologia Plantarum*, **144**, 263-276.
- Rajjou L. C., Belghzi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C., Job D. (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology*, **141**, 910-923.

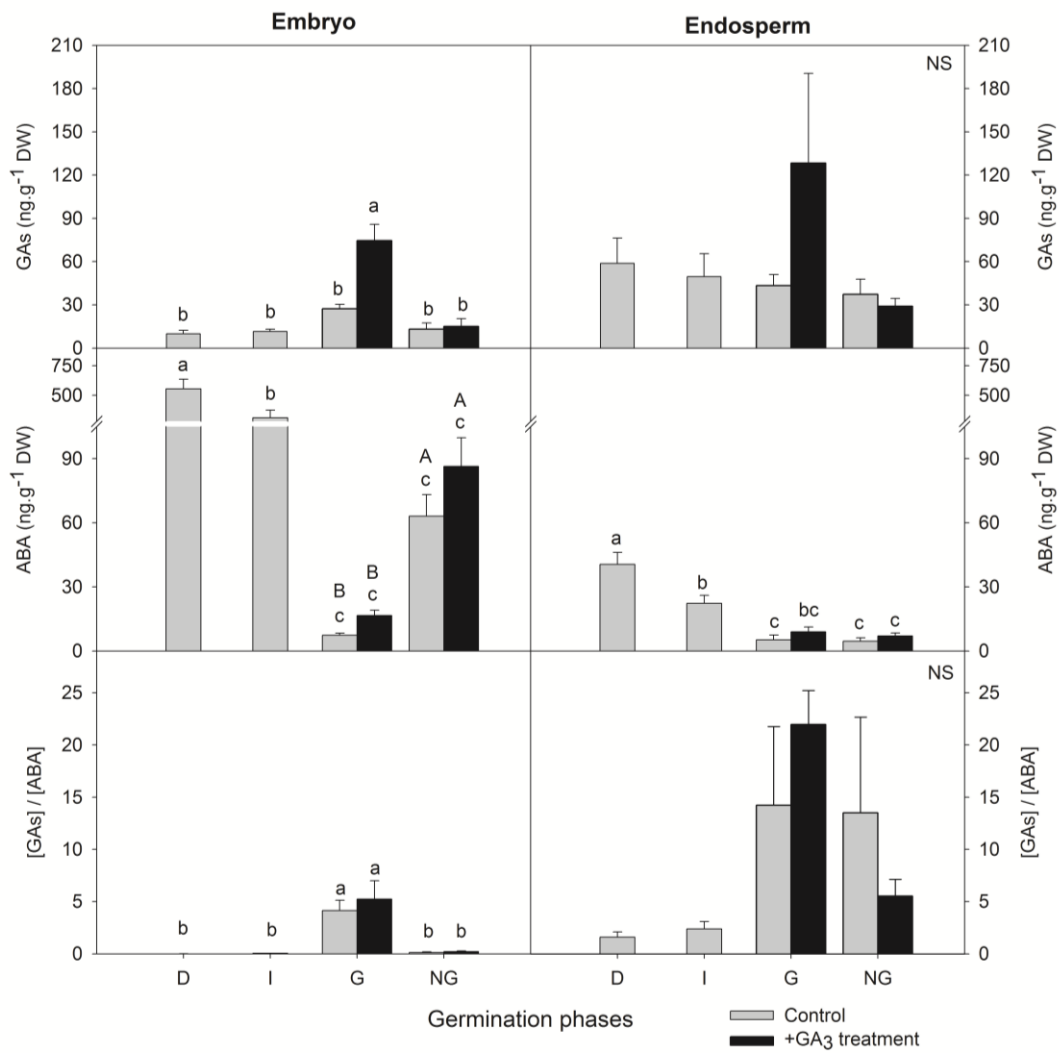
- Ribeiro L. M., Garcia Q. S., Müller M., Munné-Bosch S. (2014). Tissue-specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. *Physiologia Plantarum*. Doi: 10.1111/ppl.12269 (in press).
- Ribeiro L. M., Souza P. P., Rodrigues-Jr A. G., Oliveira T. G. S., Garcia Q. S.(2011). Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. *Seed Science Technology*, **39**, 303-317.
- Roberto G. G., Habermann G. (2010). Morphological and physiological responses of the recalcitrant *Euterpe edulis* seeds to light, temperature and gibberellins. *Seed Science Technology*, **38**, 367-378.
- Sattler S. E., Mène-Saffrané L., Farmer E. E., Krischke M., Mueller M. J., DellaPenna D. (2006). Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in Arabidopsis tocopherols-deficient mutants. *The Plant Cell*, **18**, 3706-3720.
- Sattler S. E., Gilliland L. U., Magallanes-Lundback M., Pollard M., DellaPenna D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell*, **16**, 1419-1432.
- Siles L., Cela J., Munné-Bosch S. (2013). Vitamin E analysis in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the Arecaceae family. *Phytochemistry*, **95**, 207-214.
- Sung J. M. (1996). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. *Physiologia Plantarum*, **97**, 85-89.
- Taylor N. J., Hills P. N., Staden J. (2007). Cell division versus cell elongation: the control of radicle elongation during thermoinhibition of *Tagetes minuta* achenes. *Journal of Plant Physiology*, **164**, 1612-1625.
- Wang Y., Li L., Ye T., Zhao S., Liu Z., Feng Y., Wu Y. (2011). Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of Arabidopsis by down regulating ABI5 expression. *The Plant Journal*, **68**, 249-261.
- Yan D., Duermeyer L., Leoveanu C., Nambara E. (2014). The functions of the endosperm during seed germination. *Plant & Cell Physiology*, **55**, 1521-1533.
- Ye N., Zhu G., Liu Y., Zhang A., Li Y., Liu R., Shi L., Jia L., Zhang J. (2011). Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/err336, 1-14.

## Figures and legends

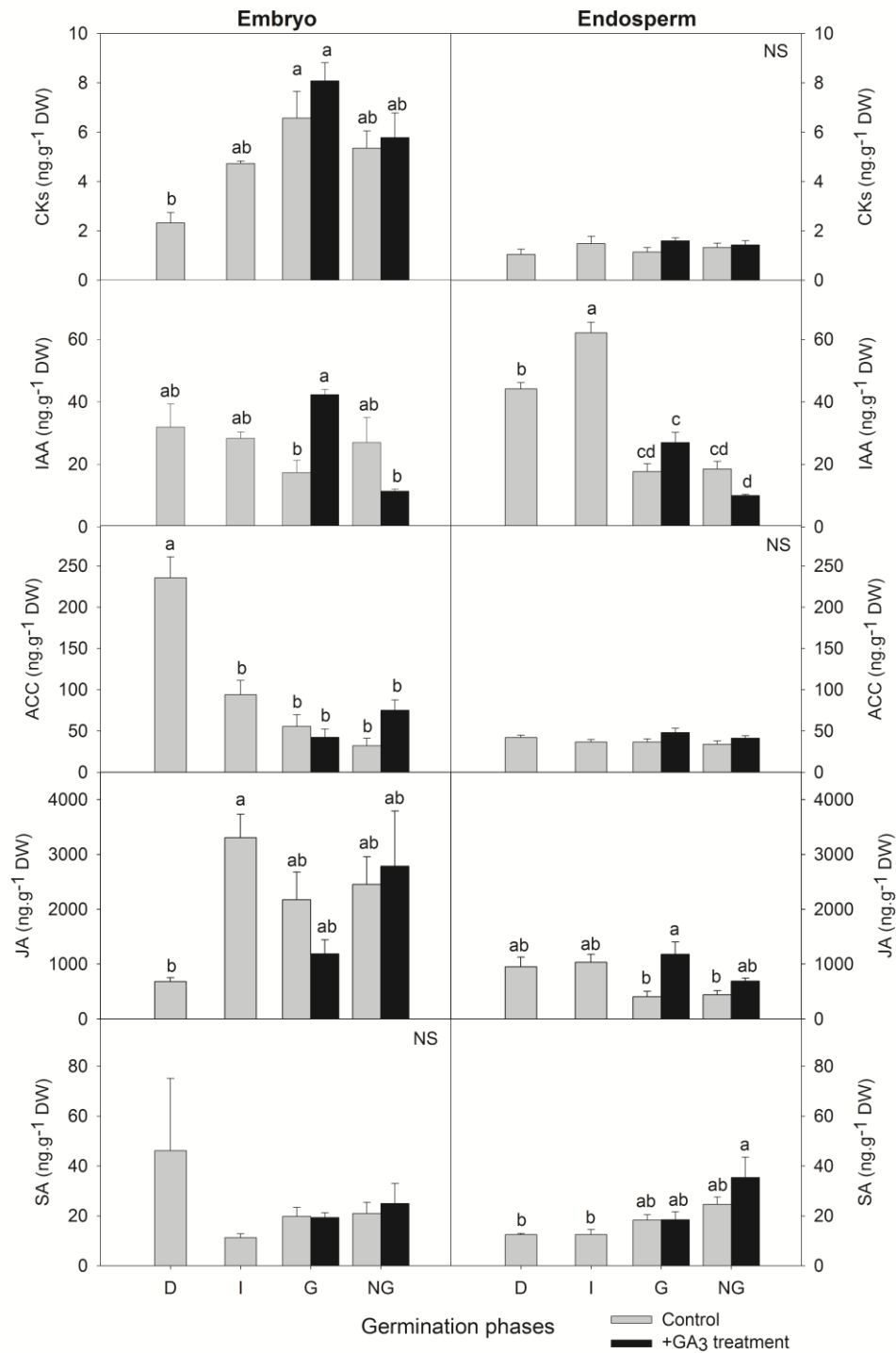


**Fig. 1.** Cumulative germination and final germination percentage of untreated (Control) and treated (+GA<sub>3</sub>) seeds of *Acrocomia aculeata* during 21 experimental weeks. The symbol (#) indicates the GA<sub>3</sub> application treatment. Values are means  $\pm$  standard errors (n=8). *P* value from one-way ANOVA denotes differences between treatments ( $P < 0.05$ ). Significant differences between treatments are marked with different letters.



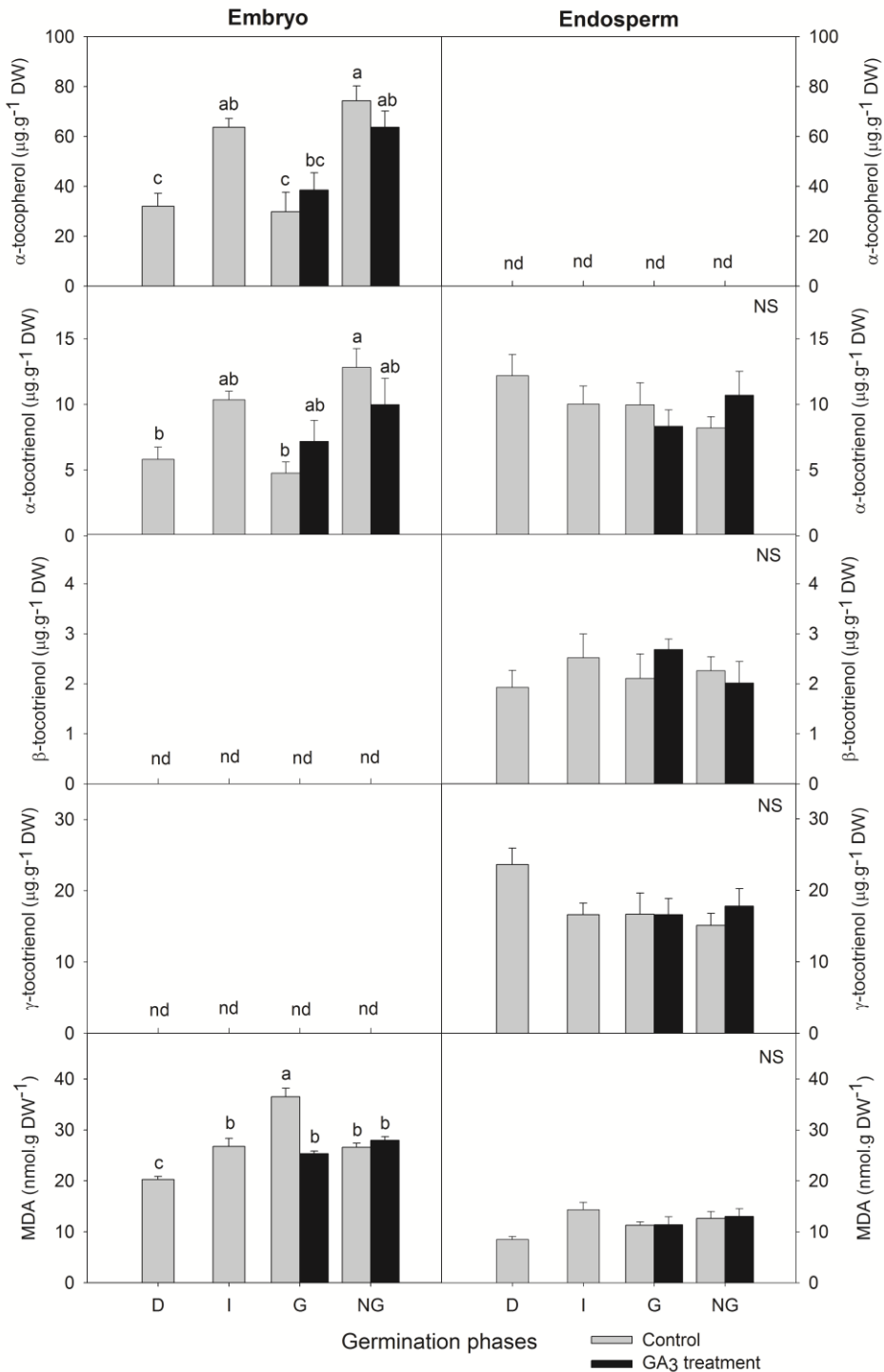


**Fig. 2.** GAs (gibberellins) and ABA (abscisic acid) levels and GAs/ABA ratio in embryo (left column) and endosperm (right column) of *Acrocomia aculeata* seeds in dry (D), imbibed (I), germinated (G) and non-germinated (NG) phases. Gray bars mean control seeds and black bars mean +GA<sub>3</sub> treatment. Values are means  $\pm$  standard errors (n=4). *P* value from one-way ANOVA denotes differences between stages in the same tissue (*P*<0.05). Significant differences between phases or treatments are marked with different lowercase and significant differences between G and NG phases of both treatment are marked with uppercase. NS, not significant.



**Fig. 3.** CKs (cytokinins), IAA (indole-3-acetic acid), ACC (1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid), JA (jasmonic acid) and SA (salicylic acid) levels in embryo (left column), and endosperm (right column) of *Acrocomia aculeata* seeds in dry (D), imbibed (I), germinated (G) and non-germinated (NG) phases. Gray bars indicate control seeds and black bars the +GA<sub>3</sub> treatment. Values are means ± standard errors (n = 4). *P* value from one-way ANOVA denotes differences between phases or treatments in the same tissue (*P* <

0.05). Significant differences between phases are marked with different letters. NS, not significant.



**Fig. 4.** Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocotrienol) and estimation of lipid peroxidation by MDA (malondialdehyde) levels in embryo (left column) and endosperm (right column) of *Acrocomia aculeata* seeds in dry (D), imbibed (I), germinated (G) and

non-germinated (NG) phases. Gray bars indicate control seeds and black bars the +GA<sub>3</sub> treatment. Values are means ± standard errors (n = 4). *P* value from one-way ANOVA denotes differences between phases or treatments in the same tissue (*P* < 0.05). Significant differences between phases are marked with different letters. NS, not significant; nd, not detected.

## **Capítulo II**

Fruit storage conditions determine changes in hormonal and vitamin E profiles during germination process of macaw palm seeds\*

\*Manuscrito escrito nas normas do periódico Seed Science Research

# **Fruit storage conditions determine changes in hormonal and vitamin E profiles during germination process of macaw palm seeds**

Running head title: Storage affects macaw palm seed germination

Elisa Monteze Bicalho<sup>1</sup>, Sergi Munné-Bosch<sup>2</sup>, Queila Souza Garcia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

## Financial support

Support for this research was received through CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, process 560812/2010-8), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, process PPM 00500-11) and the ICREA (Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats) Academia prize awarded to S.M.B. by the Generalitat de Catalunya. E.M.B received a sandwich fellowship from CNPq and a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (Brazil), Q.S.G. received a Produtividade em Pesquisa grant from CNPq.

## Abstract

Fruit storage for long periods can result in physiological alterations on germination. In this work, we studied macaw palm (*Acrocomia aculeata*, which seeds are dormant) germination after fruit storage during 210 days in nursery (exposed to natural hydration/dehydration cycles on soil) and in laboratory conditions. Seeds from control (non-stored), nursery and laboratory were used in germination experiments. Furthermore, half of the imbibed seeds from laboratory were treated with GA<sub>3</sub> solution. The germination experiment was followed for 22 weeks and during this period we collected embryos from dry (D - before imbibition), imbibed (I), early germinated (G) and non-germinated (NG, end of the experiment) phases. We quantified the endogenous levels of precursors and active forms of gibberellins (GAs), abscisic (ABA), jasmonic (JA) and salicylic acid (SA) by UPLC-MS/MS. The levels of vitamin E components ( $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol) were analyzed by HPLC. Results showed that seeds treated with GA<sub>3</sub> showed the highest germination percentage (50%) and velocity index among treatments. After storage, the levels of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol were higher in the nursery. SA levels were higher in embryos from nursery in I and G phases. Higher levels of bioactive GAs were shown in embryos of I phase from nursery. ABA levels were reduced during imbibition only in control and laboratory treatments. Results confirmed the importance of vitamin E to macaw palm embryos during pre- and post-imbibition events and suggest that in macaw palm seed banks ABA is important to keeping dormancy for long enough until the seeds are able to germinate.

Key words: abscisic acid, dormancy, gibberellins, hydration/dehydration cycles, soil seed persistence,  $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocotrienol.

## **Introduction**

The maintenance of seed viability for long time in seed banks depends on environmental (like moisture and temperature) and biotic factors (predation), as well as intrinsic factors of the physiological status of seeds in each species (Baskin and Baskin 1998). Variations in soil humidity and temperature, common in tropical regions, make difficult the permanence of viable seeds in banks by accelerating their aging (Murdoch and Ellis 2000). Fruit storage under natural and controlled conditions are interesting strategies for rational use of tropical species of commercial interest (Hay and Probert 2013).

Under natural conditions, the diaspores are subject to imbibition and drying cycles over time. Metabolism recovery during seed imbibition induces repair mechanisms that includes the spontaneous reorganization of plasma membrane phospholipids (Tilden and West, 1985) and other macromolecules such as DNA and proteins (Kranmer et al. 2010). During these processes, reactive oxygen species (ROS) are produced, inducing biosynthesis and activations of ROS scavenging systems (Bailly 2008). However, prolonged imbibition over time under unfavorable conditions for germination can lead to ROS formation above the scavenger capacity and the cellular maintenance systems could fail (Villiers 1974), leading to seed deterioration and loss of vigor and germination capacity (Rajjou and Debeaujon 2008).

ROS scavenger systems include the action of enzymatic and non-enzymatic antioxidants, such as vitamin E (tocopherols and tocotrienols), which are components broadly distributed in seeds (Sattler et al. 2004, Rajjou and Debeaujon 2008, Siles et al. 2013, Bicalho et al. 2015). Vitamin E, especially  $\alpha$ -tocopherol, has been described as an important redox signal during germination (Sattler et al. 2004, Bicalho et al. 2015); furthermore, it prevents lipid peroxidation and oxidative stress during this process (Havaux et al. 2005, Sattler et al. 2006, Barreto et al. 2014). Apart from vitamin E, phytohormones, like salicylic (SA) and jasmonic acid (JA), are related to defense responses against oxidative stress in seeds (Rajjou et al. 2006, Barba-Espín et al. 2010, Barreto et al. 2014).

Time and storage conditions can directly influence the balance of major phytohormones involved on germination, such as abscisic acid (ABA) and gibberellins (GAs) (Holdsworth et al. 2008), which are negative and positive regulators of germination, respectively. During after-ripening, seeds can overcome dormancy by modulating GAs and ABA metabolism and sensitivity (Carrera et al. 2008) or by ABA leaching during periods of hydration and dehydration (Gendreau et al. 2008). GAs increase embryo growth potential and activate cell wall degrading enzymes leading to micropilar endosperm



weakening, allowing germination (Bewley 1997). High ABA levels inhibit bioactive GA action, therefore keeping seed dormancy (Bewley et al. 2013).

*Acrocomia aculeata* (macaw palm) is a species of the Arecaceae family, with a huge economical interest for biofuel production due to the high amounts of lipids stored on fruits and seeds (Hiane et al. 2005). Macaw palm produces seeds with a very marked dormancy, whose classification is still under discussion (Ribeiro et al. 2011, Baskin and Baskin 2013), as well as a high capacity to form seed banks (Ribeiro et al. 2012). Recent studies have shown that ABA has an important role in keeping macaw palm seed dormancy and that GA<sub>3</sub> treatment partially overcomes it by increasing the GAs/ABA ratio (Bicalho et al. 2015, Ribeiro et al. 2015).

The viability of macaw palm seeds can be maintained after long periods of time under different storage conditions (Ribeiro et al. 2012, Barreto et al. 2014). However, there is still little information about how storage conditions can affect germinability of macaw palm seeds and the underlying mechanisms. Therefore, this work aimed at evaluating the germination process of macaw palm seeds using two storage conditions: (i) in a nursery, with seeds subjected to natural conditions of humidity and temperature, and (ii) in the laboratory. We aimed to answer the following questions: to what extent are vitamin E and phytohormones (JA and SA) levels altered during pre and post-imbibition of stored seeds? Do the different storage conditions interfere on ABA and GA levels during germination? Is GA<sub>3</sub> application effective for overcoming dormancy of macaw palm seeds after dry storage?

## **Material and Methods**

### *Plant material and storage conditions*

Recently harvested fruits from a natural population of macaw palm located in Minas Gerais state, Brazil, were used for experiments. The fruits were divided into two groups, one for storage experiment (Fig. 1A) and the other for germination experiment (Fig. 1B) of the control (non-stored). In the storage experiment, the fruits were stored in fiber bags in two conditions: in a nursery and in the laboratory (Fig. 2A and 2B). For the nursery treatment, fruits were kept under shade (50% incident solar radiation), above the soil and subjected to natural temperature and humidity variations (Fig. 2A). Fruits were kept in those conditions from February to September (middle of rainy to the end of dry season), for a total of 210 days. Data of temperature (maximum, minimum and average) and precipitation were recorded by a weather station located 100 m from the nursery (Fig. 2C).

Fruits under laboratory conditions (Fig. 2B) remained dry and protected from the sunlight at temperature of  $25\pm 2$  °C.

#### *Germination experiment, sampling and embryo viability and*

The germination experiments were conducted with seeds from control (non-stored) and stored fruits (from nursery and laboratory conditions after storage time, see Fig. 1A). Seeds were sterilized with sodium hypochlorite solution 6% (NaClO) during 15 minutes and washed in sterile deionized water three times. Seeds were sown in autoclaved vermiculite at 90% field capacity in transparent polystyrene boxes. After complete imbibition – 12 days – seeds were transferred to autoclaved vermiculite at 70% field capacity. Seeds stored in laboratory conditions were divided into two treatments after complete imbibition. To test the response of exogenous GA after dry storage, half of the seeds were submersed in 2000 mg L<sup>-1</sup> gibberellin (GA<sub>3</sub>) solution (LAB+GA<sub>3</sub>) during 24 hours at 25 °C (Ribeiro et al. 2011). Some fruits from nursery were predated and there were not enough seeds after storage to perform GA<sub>3</sub> treatment. Each treatment consisted of eight replicates of 100 seeds. The germination experiment was conducted in a germination chamber at 30 °C and 12 h photoperiod (30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> photon flux density) for 22 weeks.

The number of germinated seeds per treatment were counted daily to estimate the final germination percentage and germination velocity index, GVI (Maguire 1962). Four different physiological germination phases were chosen for embryo sampling (see Fig. 1B): (1) D phase (dry seeds, before imbibition); (2) I phase (totally imbibed seeds, after 12 days of imbibition); (3) G phase (early-germinated, after appearance of the cotyledonary petiole (Ribeiro et al. 2011)); (4) NG phase (non-germinated seeds, viable remaining seeds at the end of the experiment). In each phase of each treatment, lots of 50 or 80 mg of fresh weight of embryos (n = 4) were collected, frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until biochemical analyses.

Fifty seeds of each treatment (n = 10) were used for dry weight, calculated on fresh basis according to Brasil (2009). The viability of the embryos was measured in recently harvested seeds (control) and after storage (laboratory and nursery) through embryos culture, in which 50 embryos (n = 10) of control, nursery and laboratory were placed in culture media according to Ribeiro et al. (2012). The percentage of elongated embryos was used as a parameter of viability, as described by Barreto et al. (2014).

#### *Biochemical analyses*

Levels of abscisic acid (ABA), bioactive gibberellins (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> and GA<sub>4</sub>), gibberellin precursors (GA<sub>9</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub> and GA<sub>24</sub>), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) were determined as described by Müller and Munné-Bosch (2011). Samples of 80 mg of embryos were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The quantification was made using calibration curves for internal standards (Sigma-Aldrich) of each labelled and unlabeled hormone. For vitamin E analyses, tocopherols and tocotrienols were extracted in 50 mg of embryos by using methanolic extracts and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), as described by Cela et al. (2011).

#### *Statistical analyses*

The results were expressed as the averages of four replicates. For germination tests, the results were expressed as percentages and submitted to normality (Shapiro–Wilk) and homogeneity (Brown-Forsythe) testing using JMP 7.0 software (SAS Institute Ins.). Biochemical data were statistically evaluated using one-way analysis of variance. Means were compared using the Student *t* test at a 5 % level of probability.

## **Results**

#### *Viability and germination*

Recently harvested (control) seeds showed 11% moisture content and 100% of viability. After 22 weeks of storage, nursery seeds showed higher average moisture content (9.6%) and lower viability (64.6%) than seeds from laboratory (8.3% and 82.1%, respectively [ $P < 0.05$ ]). Control, nursery and laboratory seeds showed all of them a germination percentage below 10% (Fig. 3). Seeds treated with GA<sub>3</sub> showed a much higher germination percentage (50.4%,  $P < 0.01$ ) and GVI (9.7,  $P < 0.01$ ) than the other treatments. Germination of seeds treated with GA<sub>3</sub> stabilized around 5<sup>th</sup> week after GA<sub>3</sub> application (Fig. 3). In the other treatments, the germination percentage did not stabilize until the 22<sup>nd</sup> week of experiments (Fig. 3).

#### *Changes in vitamin E, JA and SA levels*

The vitamin E components,  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol, were detected in embryos of all analyzed phases and treatments, being the former present at higher levels than the latter

(Fig. 4). The dynamics of both compounds was, however, similar between phases in each treatment (Fig. 4). In control  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol increased at I phase and decreased in G seeds ( $P < 0.05$ ). The levels of both compounds in embryos of seeds stored in nursery were higher than those under control conditions and after storage under laboratory conditions in the dry seeds (D phase, Fig. 4). In NG phase,  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol were increased in embryos of seeds under laboratory conditions treated with GA<sub>3</sub> (Lab+GA<sub>3</sub>) (Fig 4).

In exception to the G phase, JA levels did not change significantly between treatments, but increased from I phase onwards in control and laboratory treatments. Embryos from laboratory at the G phase showed higher values of JA in relation to the other treatments ( $P < 0.01$ , Fig. 5). SA levels did not differ between treatments in the D and NG phase. However, SA levels increased in embryos from nursery during the I and G phases (Fig. 5).

#### *Changes in GAs and ABA levels*

The levels of GA precursors did not change after storage in embryos at the D phase, but they were lower in embryos from nursery after imbibition (I) ( $P < 0.01$ , Fig. 6). The levels of GA precursors in embryos of control were significantly lower in the G phase than in the other phases; while in embryos from nursery the highest values were detected in the G phase ( $P < 0.01$ , Fig. 6). The levels of GA precursors were significantly lower in control when compared to nursery and laboratory embryos in G phase. For bioactive GAs, no differences in D phase were observed after storage. Higher values of bioactive GAs were detected for embryos of I phase from nursery and of G phase from seeds treated with GA<sub>3</sub> (Fig. 6). In control embryos, bioactive GAs only increased in the G phase ( $P < 0.01$ , Fig. 6). No differences in ABA levels were observed between treatments in the D phase. In the I and G phases, ABA levels were lower in control embryos. ABA levels were gradually reduced in embryos from I to G phases ( $P < 0.01$ ). In GA<sub>3</sub> treated-embryos, ABA levels were greater in the NG phase (Fig. 6). The ratio GAs/ABA (considering bioactive GAs only) was higher than 1 at the G phase in all treatments, and significant differences between treatments were observed in embryos of I and G phases only, whose higher value was observed in embryos of nursery and GA<sub>3</sub> treated-embryos, respectively (Fig. 6).

#### **Discussion**

The results of this study reveal contrasting differences on germinability of macaw palm

seeds from fruits stored in a nursery and in the laboratory. In relation to control seeds, the viability of embryos after storage in the laboratory and in a nursery was reduced in approximately 20 and 35% respectively, results that confirm those from Ribeiro et al. (2012) and Barreto et al. (2014). Macaw palm fruits kept in a nursery were exposed to cycles of precipitation and drying, which resulted in repeated hydration (imbibition) and dehydration of the seeds. Despite of the lignified endocarp (Reis et al. 2012), which could be a barrier to water uptake, macaw palm seed imbibition inside the fruits, even if slow, is enabled by endocarp germination pore (Mazzottini-dos-Santos et al. 2015). In dry tissues (as in seeds kept under laboratory conditions), the turnover and repair mechanisms can be temporary inactive, thus leading to the damage of macromolecules and even organelles (Villiers 1974). At the same time, intermittent hydration-dehydration cycles (by which nursery fruits passed), can reduce the cellular repair capacity leading to reduced viability and vigor (Kranner et al. 2010, Villiers 1974). Hydration and dehydration cycles generate ROS that contribute to increase oxidative stress and seed viability loss (Bailly 2008), however, it can extend seed persistence and longevity by reinstating antioxidant capacity (Kranner et al. 2010, Lung et al. 2011). Sensible seeds spend reserves during these processes and lose viability quickly in a few hydration and dehydration cycles (Berrie and Drennan 1971). The results of viability presented here indicate that within the macaw palm seed population studied, a higher percentage of seeds (~ 15% more) lost the viability in the soil after several cycles of hydration and dehydration than in the dry stored seeds.

Vitamin E levels in dry embryos (D phase) from nursery - exposed to precipitation and drying - were significantly higher than other treatments and phases. High levels of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol are associated with protection of lipids reserves against oxidative damage (Horvath et al. 2006), which is especially important for macaw palm, in which lipid reserves constitute 50% of seed dry mass (including embryos) (Hiane et al. 2005). Besides that, vitamin E was also previously related to prevention of non-enzymatic lipid peroxidation and was positively correlated to viability of macaw palm seed embryos submitted to different storage conditions (Barreto et al. 2014). Although viability in embryos from nursery was lower than in seeds from laboratory, in this study, the increase in vitamin E components during storage in nursery could protect embryos from deep loss of viability and helped keeping macaw palm diaspores on seed bank.

Interestingly, we observed that JA levels increased from I phase onwards in all storage conditions (Fig. 5). These results indicate the synthesis of JA in embryos upon imbibition. During JA biosynthesis,  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3) released by phospholipases

from plastid galactolipids is oxidised to 13(*S*)-epoxy-octadecatrienoic acid [13(*S*)-HPOT] by lipoxygenase, which in turns, is converted to 12,13(*S*)-epoxy-octadecatrienoic acid [12,13(*S*)-EOT] by allene oxide synthase (the first committed step of JA biosynthesis) (Meesters and Kombrink, 2014). Subsequently, 12,13(*S*)-EOT is metabolized in peroxisome and its byproducts enter in the fatty acid  $\beta$ -oxidation machinery, resulting in the formation of JA precursor jasmonyl-COA (Meesters and Kombrink, 2014). Once macaw palm seed embryo is greatly constituted by lipids (Bicalho, personal communication) and therefore, lipid metabolism ( $\beta$ -oxidation) is essential in reserve mobilization, JA biosynthesis and reserve metabolism could be related processes during seed germination of macaw palm. Indeed, JA was proposed to activate lipases during early events of reserve mobilization in apple embryos (Ranjan and Lewak 1992). The high levels of JA (greater than 1000 ng g<sup>-1</sup> DW) in relation to the other studied hormones in germinating embryos upon imbibition corroborate to this hypothesis.

The significantly higher levels of SA were observed in imbibed and germinated embryos from the nursery treatment. It has been shown that SA contributes to maintaining redox homeostasis through regulation of antioxidant enzymes (Slaymaker et al. 2002, Vicente and Plasencia 2011), which could be indeed a possible role for this phytohormone for macaw palm seed during germination after storage. Moreover, the metabolism recovery during imbibition generates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bailly et al. 2008), and SA biosynthesis can be stimulated by increasing levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Leon et al. 1995). However, the increased levels of SA observed in embryos from the nursery suggest repair induction during imbibition. In a previous study, the role of JA and SA in macaw palm seeds subjected to storage was associated with protection against biotic stress (Barreto et al. 2014).

ABA levels in D phase did not differ between treatments, indicating no ABA catabolism in the studied storage conditions. These results reinforced the idea that dormancy in macaw palm seeds is not overcome by dry storage (after-ripening), which differs from that described for other palm species (Carpenter 1988, Yang et al. 2007). Contrary to that observed for control and laboratory treatments, high levels of ABA were maintained after imbibition in embryos from the nursery, and seeds from this treatment showed a delay in germination. ABA is responsible for maintenance of dormancy (Finch-Savage and Leubner-Metzger 2006), allowing the persistence of viable seeds in seed banks for a long time. Barreto et al. (2014) related positive correlation between ABA levels and embryo viability of macaw palm seeds during storage. Dormant seeds may be more resistant than non-dormant seeds to ageing, thus they can persist longer in the soil seed

bank (Long et al. 2015).

After imbibition, control and embryos from fruits stored under laboratory conditions showed higher concentrations of GA precursors, while embryos from the nursery showed significantly higher levels of bioactive GAs. These results suggest alterations on seed metabolism provoked by hydration/dehydration cycles during storage in the nursery. Although there are differences on ABA and GAs levels, early germinated seeds (G phase) of all treatments showed a GAs/ABA ratio, considering bioactive GAs only, above 1. This confirms results obtained by Bicalho et al. (2015), showing that macaw palm seed germination is driven by GAs/ABA ratio. Half of the seeds from laboratory treated with GA<sub>3</sub> overcame dormancy in a few days, with a velocity and germination percentage higher than that observed by Bicalho et al. (2015) for recent recovered seeds. It is known that dry storage can reduce the sensitivity to ABA and/or increase the sensitivity to GA, alleviating dormancy (Bianco et al. 1994). Our results suggest that laboratory treatment can contribute to increase the sensitivity to GAs and reducing the asynchrony of germination.

This study showed that storage conditions interfered on viability and germination velocity of macaw palm seeds and confirmed the importance of vitamin E -  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol -, as active antioxidants during imbibition and germination in this species. The dynamics of vitamin E observed in the present study suggest that this can be one of the repair mechanisms (as membrane lipid protector against ROS) activated during hydration/dehydration cycles, which macaw palm seeds are naturally exposed on the soil after dispersion. The role of JA is still unclear, but SA seems to be related to preventing damage during imbibition, mainly in seeds exposed to hydration/dehydration cycles. The storage under nursery conditions interfered on GA (precursor and bioactive) and ABA metabolism during germination. None of the storage conditions overcame dormancy, but dry stored probably increased the sensitivity of the seeds to exogenous GA, improving the germinability and the germination rate. Once laboratory conditions help keeping high viability and capacity of response to exogenous GA, this treatment can be indicated to plantlets production with low cost. We conclude that macaw palm seed banks are composed by dormant seeds with high viability, conferred by maintenance of high ABA levels and repair mechanisms during hydration and dehydration cycles, as showed by vitamin E results. Seed dormancy has a fundamental role for seed banks and allows a long-term slow recruitment of macaw palm in nature environments.

## References

- 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 Rendues Biologie* 331,806-814.
- Barba-Espín, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M.J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., Pérez-Alfocea, F., Hernández, J.A.** (2010). Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant Cell and Environment* 33,981–994.
- Barreto, L. C., Garcia, Q. S., Morales, M., Müller, M., Munné-Bosch, S.** (2014). Vitamin E and defense-related phytohormones are reliable markers of embryo growth in macaw palm fruits exposed to various storage conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118, 203-213.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C.** (2013). What kind of seed dormancy might palms have? *Seed Science Research* 24,17-22.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M.** (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, Academic Press.
- Berrie, A.M.M., Drennan, D.S.R.** (1971) The effect of hydration-dehydration on seed germination. *New Phytologist* 70,135-142.
- Bewley, D.** (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9,1055-1066.
- Bewley, D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., Nonogaki, H.** (2013). *Seeds – Physiology of development, germination and dormancy*, New York, Springer. 3rd ed.
- Bianco, J., Garello, G., Le Page-Degivry, T.** (1994) Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. *Seed Science Research* 4,57-62.
- Bicalho, E.M., Pintó-Marijuan, M., Morales, M., Müller, M., Munné-Bosch, S., Garcia, Q.S.** (2015) Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance. *Plant Biology* 17,990-996.
- Brasil** (2009) Regras para análises de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.  
[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/2946\\_regras\\_analise\\_\\_sementes.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise__sementes.pdf).
- Carpenter, W.J.** (1988) Seed after-ripening and temperature influence *Butia capitata* germination. *HortScience* 23,702-703.
- Carrera, E., Holman. T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, F.L., Holdsworth, M.J.** (2008) Seed after-ripening is a discrete developmental pathway



associated with specific gene networks in Arabidopsis. *Plant Journal* 53,214-224.

**Cela, J., Chang, C., Munné-Bosch, S.** (2011). Accumulation of  $\gamma$ - rather than  $\alpha$ -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 52, 1389-1400.

**Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G.** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171,501-523.

**Gendreau, E., Romaniello, S., Barad, S., Leymarie, J., Benech-Arnold., Corbineau, F.** (2008) Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *Journal of Experimental Botany* 59,203-212.

**Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., Dörmann, P.** (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17,3451-3469.

**Hay, F.R., Probert, R.J.** (2013) Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation Physiology*, doi:10.1093/conphys/cot030.

**Hiane, P.A., Ramos-Filho, M.M., Ramos, M.I.L., Macedo, M.L.R.** (2005). Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., Pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Brazilian Journal of Food Technology* 8,256-259.

**Holdsworth, M.J., Bentsink, L., Soppe, W.J.J.** (2008) Molecular networks regulation Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179,33-54.

**Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Monica, H., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., Horemans, N.** (2006) Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Albert Lavallée). *Plant Physiology and Biochemistry* 44,724–731.

**Kranner, I., Minibayeva, F.V., Beckett, R. P., Seal, C. E.** (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist* 188, 655-673.

**Leon, J., Lawton, M.A., Raskin, I.** (1995) Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 108, 1673-1678.

**Linkies, A., Leubner-Metzger, G.** (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* 31,253–270.

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

- Long, R.L., Kranner, I., Panetta, F. D., Birtic, S., Adkins, S. W., Steadman, K. J.** (2011). Wet-dry cycling extends seed persistence by re-instating antioxidant capacity. *Plant and Soil* 338,511-519.
- Maguire, J.D.** (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2,176-177.
- Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Sant'Anna-Santos, B.F.** (2015) Ontogenesis of the pseudomonomerous fruits of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits. *Trees* 29,199-214.
- Meesters, E., Kombrink, E.** (2014). Jasmonic Acid. In: Audenaert, D. and Overvoorde, P. (eds) *Plant Chemical Biology*. Pp.160-183. New Jersey, John Wilwy and Sons, Inc.
- Müller, M., Munné-Bosch, S.** (2011). Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 7,37.
- Murdoch, A.J., Ellis, R.H.** (2000) Dormancy, viability and longevity. In: Fenner M (ed.) *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*, 2nd ed.
- Rajjou, L., Debeaujon, I.** (2008) Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendues Biologies* 331:796-805.
- Rajjou, L.C., Belghzi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D.** (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology* 141,910-923.
- Ranjan, R., Lewak, S.** (1992). Jasmonic acid promotes germination and lipase activity in non-stratified apple embryos. *Physiologia Plantarum* 86,335-339.
- Reis, S.B., Mercadante-Simões, M.O., Ribeiro, L.M.** (2012) Pericarp development in the macaw palm *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Rodriguésia* 63,541-549.
- 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.
- Ribeiro, L.M., Garcia, Q.S., Oliveira, D.M.T.** (2012) Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. *Trees* 26,851-863.
- Ribeiro, L.M., Oliveira, T.G.S., Carvalho, V.S., Silva, P.O., Neves, S.C., Garcia, Q.S.** (2012) The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. *Seed Science and Technology* 40,344-353.
- 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 Science and Technology* 39,303-317.

**Vicente, R.S.M., Plasencia, J.** (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62,3321-3338.

**Villiers, T.A.** (1974) Seed aging: chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. *Plant Physiology* 53, 875-878.

**Sattler, S.E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E.E., Krischke, M., Mueller, M.J., DellaPenna, D.** (2006). Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in Arabidopsis tocopherols-deficient mutants. *Plant Cell* 18,3706-3720.

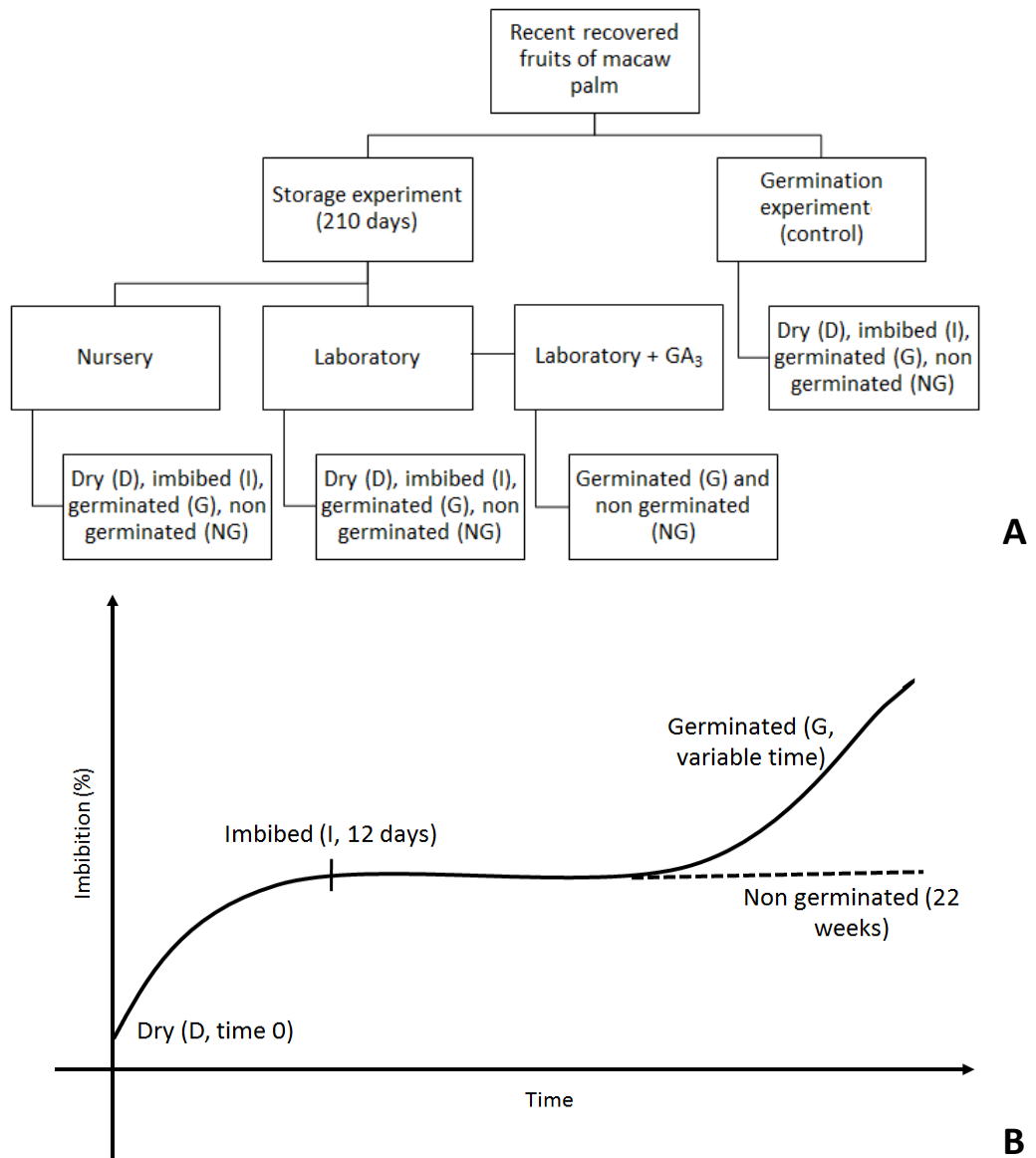
**Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., DellaPenna, D.** (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16,1419-1432.

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

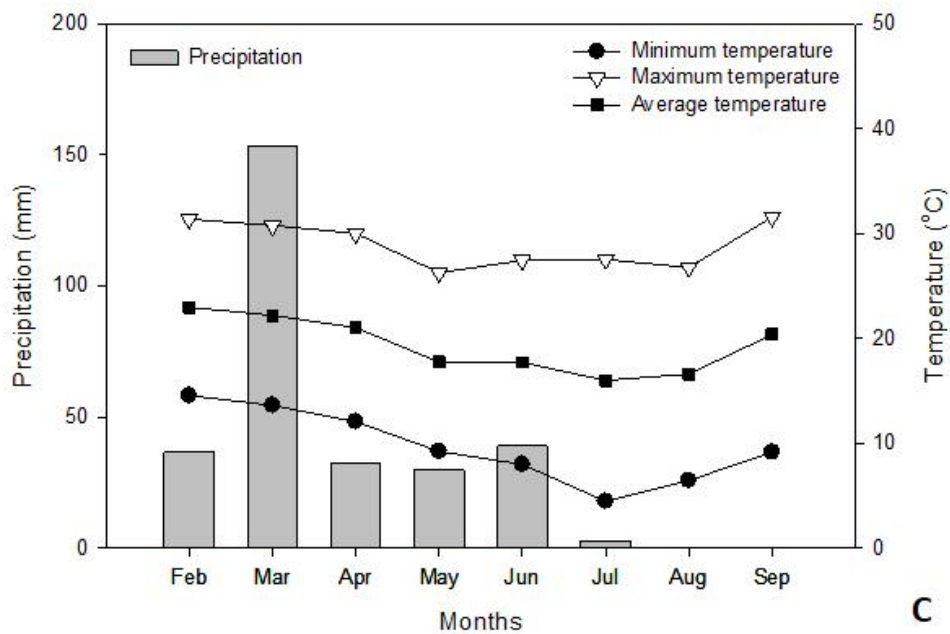
**Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., Pozo, O., Martin, G.B., Klessig, D.F.** (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99,11640-11645.

**Yang, Q., Ye, W., Yin, X.** (2007) Dormancy and germination of *Areca triandra* seeds. *Scientia Horticulturae* 113,107-111.

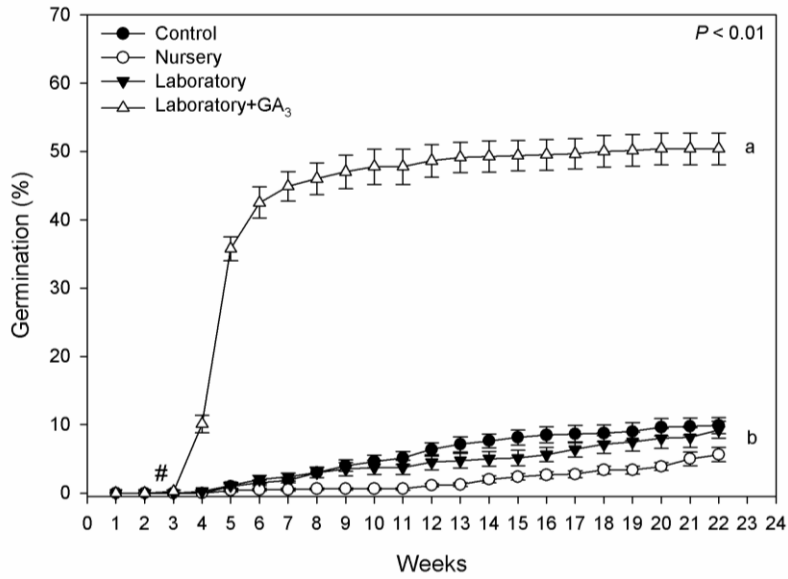
**Figures and legends**



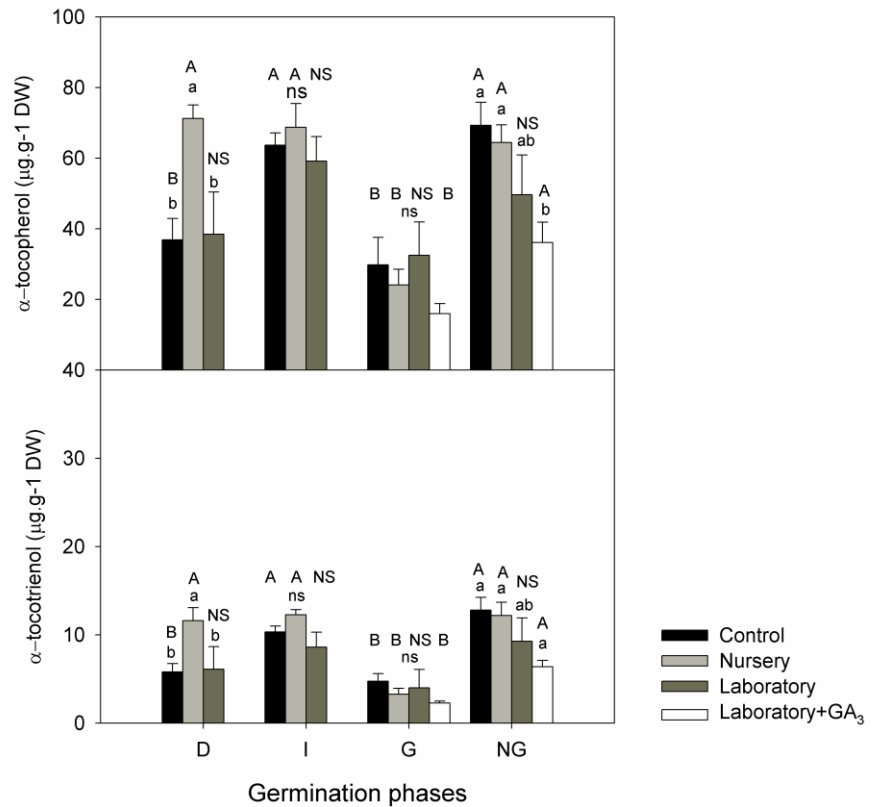
**Fig. 1.** Design of macaw palm fruits storage and seed germination experiments. (A) Storage experiment and sampling. (B) Germination phases in which embryos were collected for biochemical analysis.



**Fig. 2.** Macaw palm (*Acrocomia aculeata*) fruits stored in (A) a nursery over the soil, in shadow conditions (50% incident solar radiation) and exposed to humidity and temperature variations, (B) the laboratory, kept at temperatures ranging  $25 \pm 2$  °C and shadow. (C) Precipitation, maximum, minimum and average temperature recorded by weather station closest to the nursery. Source: INMET (available in <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>).

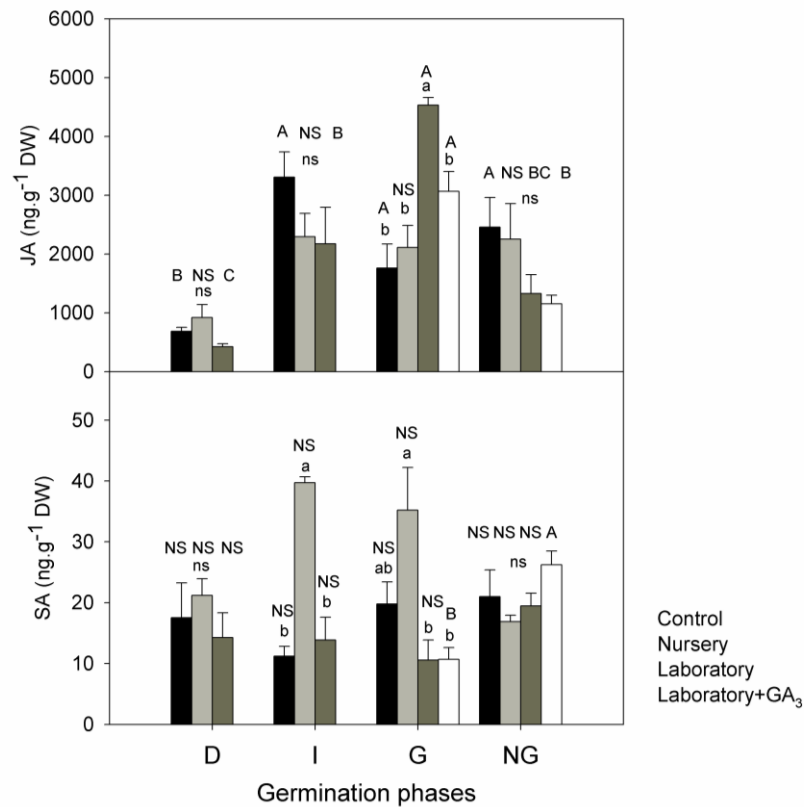


**Fig. 3.** Cumulative germination of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds from control, nursery, laboratory, and laboratory + GA<sub>3</sub> treatments during 22 weeks. Different letters indicate significant differences, as indicated by the Student *t* test at a 5% significance level. (#) shows the time of GA<sub>3</sub> application.

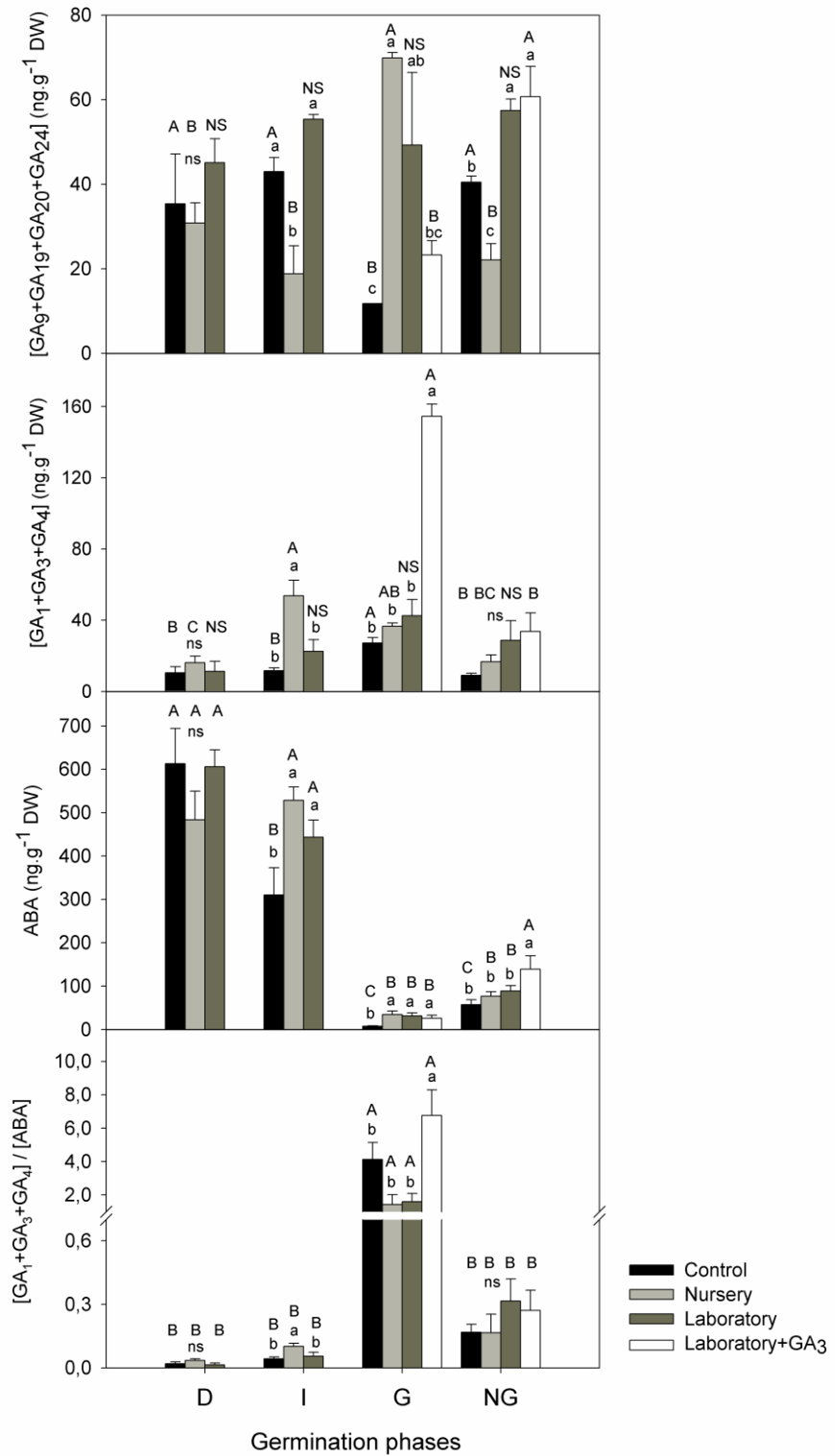


**Fig. 4.** Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol) levels in embryos of *Acrocomia*

*aculeata* (macaw palm) seeds of control, nursery, laboratory, and laboratory + GA<sub>3</sub> (set after I phase) treatments during germination. Data are the mean ± SE (n=4). Different lowercase letters in columns for each different phases (D, I, G and NG) represent significant differences between storage treatments ( $P<0.05$ ), based on the Student *t* test. Different capital letters in the columns for each storage treatment (control, nursery, laboratory and laboratory+GA<sub>3</sub>) represent significant differences between phases of evaluation ( $P<0.05$ ), based on the Student *t* test. NS, non-significant; D, dry; I, imbibed; G, germinated; NG, non-germinated.



**Fig. 5.** Jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) levels in embryos of *Acrocomia aculeata* (macaw palm) seeds of control, nursery, laboratory, and laboratory + GA<sub>3</sub> (set after I phase) treatments during germination. Data are the mean ± SE (n=4). Different lowercase letters in columns for each different phases (D, I, G and NG) represent significant differences between storage treatments ( $P<0.05$ ), based on the Student *t* test. Different capital letters in the columns for each storage treatment (control, nursery, laboratory and laboratory+GA<sub>3</sub>) represent significant differences between phases of evaluation ( $P<0.05$ ), based on the Student *t* test. NS, non-significant; D, dry; I, imbibed; G, germinated; NG, non-germinated.



**Fig. 6.** Levels of gibberellin precursors (GA<sub>9</sub>+GA<sub>19</sub>+GA<sub>20</sub>+GA<sub>24</sub>), bioactive gibberellins (GA<sub>1</sub>+GA<sub>3</sub>+GA<sub>4</sub>), abscisic acid (ABA) and the GAs/ABA ratio (including active GAs only) in embryos of *Acrocomia aculeata* (macaw palm) seeds from control, nursery, laboratory, and laboratory + GA<sub>3</sub> (set after I phase) treatments during germination. Data



are the mean  $\pm$  SE (n=4). Different lowercase letters in columns for each different phases (D, I, G and NG) represent significant differences between storage treatments ( $P < 0.05$ ), based on the Student *t* test. Different capital letters in the columns for each storage treatment (control, nursery, laboratory and laboratory+GA<sub>3</sub>) represent significant differences between phases of evaluation ( $P < 0.05$ ), based on the Student *t* test. NS, non-significant; D, dry; I, imbibed; G, germinated; NG, non-germinated.

### **Authorship**

E.M.B. executed the experiments, performed the biochemical analysis, executed the statistical analysis and graphics and wrote the manuscript. S.M.-B. provided reagents and equipment, participated in the experimental design, and revised and drafted the final text. Q.S.G. proposed the work and the experimental design, discussed the results, and revised the text.

### **Acknowledgments**

We thank Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Florestal for providing space and infrastructure to process macaw palm fruits. We thank IBAMA for permission to export seeds. We thank to Melanie Morales, Marta Pintó-Marijuan and Maren Müller to assistance on vitamin E and phytohormones analysis. We thank to Leilane C. Barreto to assist the *in vitro* culture of the embryos.

**Conflicts of interest:** none

### **Capítulo III**

Efeito do ano de produção na germinabilidade de sementes de macaúba  
(*Acrocomia aculeata*, Arecaceae)\*

\*Manuscrito escrito nas normas do periódico Flora (Jena).

## **Efeito do ano de produção na germinabilidade de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae)**

### **Resumo**

*Acrocomia aculeata* (macaúba) é uma palmeira com ampla distribuição na América tropical, cujas sementes têm dormência primária. Sementes de uma população de macaúba produzidas em dois anos consecutivos (2013 e 2014) foram utilizadas neste estudo, com o objetivo de avaliar o efeito do ano de produção na germinabilidade e na sinalização oxidativa durante a germinação. Embriões de sementes recém colhidas, dos dois anos, submetidas a tratamentos de superação de dormência, +GA<sub>3</sub> (imersão das sementes em solução de GA<sub>3</sub> por 48h após a embebição) e –opérculo (remoção do opérculo no 10<sup>o</sup> dia) e do controle foram avaliados em relação à germinabilidade e viabilidade e utilizados para a quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA (0, 2 e 7 dias após os tratamentos). Com o lote de 2014 foram também quantificados H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA e a atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, APX e GR) aos 0, 4, 8, 12, 17, 34 e 56 dias de embebição. Sementes produzidas em 2013 apresentaram maior germinabilidade que as do lote de 2014 nos três tratamentos. Os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sementes tratadas (+GA<sub>3</sub> e –opérculo) do lote de 2013 (23 e 78% de germinação, respectivamente), foram significativamente superiores aos do controle. Em sementes de 2014, os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram maiores nos embriões do tratamento –opérculo (40% de germinação) em relação aos de +GA<sub>3</sub> e controle (germinabilidade inferior a 2%). No lote de 2014, houve aumento da peroxidação lipídica nos três tratamentos em relação ao tempo 0 do mesmo lote. Em todos os tratamentos foi observado aumento da atividade da SOD e menor acúmulo de O<sub>2</sub><sup>-</sup> aos 56 dias. A atividade da GR foi maior somente em embriões de sementes germinadas no tratamento –opérculo. Os resultados sugerem efeito dos anos de produção no nível de dormência das sementes de macaúba e indicam que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua como sinalizador do processo germinativo desta espécie.

Palavras-chave: níveis de dormência, anos de produção, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, embebição, sistema antioxidante, sinalização oxidativa.

## 1. Introdução

O processo germinativo de sementes maduras inicia com a embebição e consequente retomada do metabolismo, culminando com a protrusão de alguma estrutura do embrião através dos tecidos adjacentes (Bewley et al., 2013). A retomada do metabolismo gera naturalmente espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species, ROS), que derivam da redução do oxigênio, produzindo ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (Bailly, 2004; Gomes e Garcia, 2013). A reativação da atividade mitocondrial é provavelmente a maior fonte de produção de ROS, seguida por cloroplastos (que são inativados rapidamente) e glioxissomos, que estão envolvidos na mobilização de lipídios, além das NADPH oxidases de membrana que transferem elétrons ao oxigênio (Gomes e Garcia, 2013). Antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase) e não enzimáticos (tocoferóis e tocotrienóis, ascorbato, glutathione) são recrutados pelas células com o objetivo de conter a ação de ROS (Bailly et al., 2008). Quando produzidos em excesso, além da capacidade de controle dos sistemas antioxidantes, como nos casos de envelhecimento acelerado ou armazenamento a longo prazo, ROS podem causar estresse oxidativo, peroxidação de lipídios, danos em membranas e levar à morte celular (Bailly et al., 2008).

Além da função deletéria que tem sido atribuída às ROS, sabe-se que a sinalização de diversas vias metabólicas em plantas são mediadas por estas moléculas, em especial pelo  $H_2O_2$  (revisado por Pitzschke et al. 2006). Em sementes, tem sido relatado que o  $H_2O_2$  age como sinalizador da germinação, uma vez que induz a expressão de genes da biossíntese de giberelinas (GA, o hormônio indutor da germinação), bem como de genes responsáveis pelo catabolismo de ácido abscísico (ABA, inibidor da germinação) durante a superação de dormência (Liu et al., 2010). O metabolismo de ambos os hormônios durante o processo germinativo e a razão GA/ABA, em muitas espécies, determinam a manutenção ou a superação da dormência (Finch-Savage e Leubner-Metzger, 2006).

Tem sido demonstrado que as condições ambientais podem influenciar o nível de dormência das sementes (Fenner, 1991), o qual varia entre espécies (Gualano e Benech-Arnold, 2009) e entre anos de produção (Schütz e Rave, 2003), por meio de alterações no balanço hormonal (Benech-Arnold et al., 1991; Zhang et al., 2006). Dessa forma, a germinabilidade das sementes pode ser afetada pelas condições ambientais a que estão

expostas a planta mãe durante a fase reprodutiva (Fenner, 1991; Hoyle et al., 2008). Macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira de ampla ocorrência que apresenta alta plasticidade ecofisiológica (Pires et al., 2013). Segundo Mazzottini-dos-Santos et al. (2015), a formação completa dos frutos de macaúba tem duração aproximada de um ano e o acúmulo de biomassa e a maturação das sementes ocorre durante o período seco e início do período chuvoso subsequente. As sementes de macaúba apresentam dormência primária imposta por altos níveis de ABA (Bicalho et al., 2015; Ribeiro et al., 2015), a qual pode ser parcialmente superada pela aplicação de GA (Oliveira et al., 2013; Ribeiro et al., 2011) ou quase totalmente pela remoção do opérculo (Ribeiro et al., 2015). Apesar destes tratamentos de superação de dormência aumentarem a razão GA/ABA, não está elucidado o tipo de sinalização que contribui para a redução dos níveis de ABA e/ou o aumento dos níveis de GA em sementes de macaúba.

Este estudo foi delineado com a finalidade de avaliar (i) se há influência dos anos de produção nos níveis de dormência e, conseqüentemente na germinabilidade de sementes de macaúba, (ii) se ocorre sinalização oxidativa durante o processo germinativo dessas sementes e (iii) se a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o nível de peroxidação lipídica e a atividade de enzimas do sistema antioxidante durante a embebição e após tratamentos de superação de dormência (aplicação de GA<sub>3</sub> e retirada do opérculo) podem ser considerados marcadores bioquímicos da germinação de sementes de macaúba.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Material vegetal*

Frutos de *A. aculeata* de dois anos consecutivos de produção, 2013 e 2014, foram coletados de população natural em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Dados de temperatura e precipitação da região relativos ao período de formação dos frutos (obtidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia, INMET) mostram que, embora a temperatura tenha variado pouco entre os anos avaliados, a precipitação total a que as plantas estiveram expostas durante o período de desenvolvimento das sementes (incorporação de biomassa e maturação) foi de 407,2 mm no ano de 2013 e de apenas 271,1 mm em 2014 (Fig. 1).

### *2.2 Experimentos de germinação e viabilidade*

Os frutos foram quebrados com auxílio de torno manual e as sementes extraídas esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 5% por 15

minutos e enxaguadas em água deionizada estéril três vezes e imediatamente utilizadas nos experimentos de germinação, que foram montados em dois anos consecutivos. As sementes foram embebidas em água deionizada estéril por um período de oito dias (completa embebição). Em seguida, foram dispostas em caixas de poliestireno transparentes forradas com papel de filtro umedecido com solução de nistatina 0.5% (Oliveira e Garcia, 2011) e mantidas em câmaras de germinação a 30 °C sob fotoperíodo de 12 horas ( $30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Após a embebição completa (oitavo dia de experimento), as sementes de cada ano de produção foram divididas em três tratamentos, sendo um deles o controle. Um terço das sementes foi imersa em solução de GA<sub>3</sub> 2000 mg.L<sup>-1</sup> por 48 horas (as sementes de 2014 receberam uma segunda aplicação de GA<sub>3</sub> no 32º dia de experimento). No 10º dia, outro terço das sementes foi submetido ao tratamento de retirada manual do opérculo (segundo descrito por Ribeiro et al., 2015). Os experimentos foram conduzidos por 56 dias e durante esse período as sementes (4 repetições de 20 sementes por análise) foram retiradas em dias pré-determinados (Fig. 2), de acordo com os dados obtidos a partir da curva de embebição e dos tratamentos de superação de dormência aplicados previamente. A viabilidade dos embriões foi estimada pelo teste de tetrazólio (segundo Ribeiro et al., 2010), realizado com as sementes remanescentes do controle e dos tratamentos de superação de dormência (+GA<sub>3</sub> e - opérculo).

### *2.3 Amostragem*

Com a finalidade de comparar os dois anos de produção na germinação, amostras de sementes de 2013 e 2014 foram tomadas aos 0, 12 e 17 dias (2 e 7 dias após os tratamentos de superação de dormência). Sementes de 2014 foram também avaliadas aos 0, 4, 8 dias de embebição e 12, 17, 34 e 56 dias, que correspondem respectivamente a 2, 7, 24 e 46 dias após a imposição dos tratamentos de superação de dormência (Fig. 2). Tanto as sementes recém germinadas (emergência do pecíolo cotiledonar), quanto as tomadas nos tempos supra citados foram coletadas e seccionadas longitudinalmente para a remoção do embrião. Amostras de embriões foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer (-80 °C) até a realização das análises bioquímicas.

### *2.4 Análises bioquímicas*

Foram realizadas análises dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da extensão da peroxidação lipídica (estimada pelos níveis de MDA) com sementes produzidas em 2013 e em 2014. A

quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada com quatro repetições de 15 embriões, segundo Velikova et al. (2000). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em TCA 0,1% e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos. O sobrenadante (0,5 mL) foi utilizado para reação com 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 e 1 mL de KI a 1 M. A absorbância foi lida em 390 nm e o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado pela curva padrão.

Para a estimativa da peroxidação lipídica, amostras de 50 mg de embriões foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1mL de etanol 80%. Foram realizadas três extrações e do volume final foi utilizado 1mL para reação com 1mL de solução de TCA 20%, TBA 0,65% e BHT 0,01%. A extensão da peroxidação lipídica foi determinada espectrofotometricamente pela estimativa dos níveis de malondialdeído (MDA), como descrito por Du e Bramlage (1992).

Com as sementes produzidas em 2014, amostras de embriões coletadas ao longo dos dias de embebição (Fig. 1) foram avaliadas também em relação à atividade de enzimas do sistema antioxidante e histolocalização do O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Para a extração das enzimas (catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD, ascorbato peroxidase - APX e glutathione redutase - GR), 15 embriões (aproximadamente 100mg) por amostra foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados com 1mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8 adicionado de 100 mM de EDTA, 1 mM de ácido ascórbico e 5% de PVP (Gomes et al., 2014). A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). A atividade da CAT foi determinada em meio contendo tampão fosfato de potássio 67 mM (pH 7,0), 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e quantidade adequada de extrato enzimático. O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorado na absorbância de 240 nm ( $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Anderson et al., 1995). A atividade da SOD foi medida em meio contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 13 mM de L-metionina, 0,1 mM de EDTA, 0,002 mM de riboflavina e 0,075 mM de NBT (Giannopolitis e Ries, 1977). O meio de reação foi mantido por 10 minutos em temperatura ambiente sob luz fluorescente direta de 15 W, enquanto o controle foi mantido no escuro. A formação do azul de formazan, derivado da redução do NBT, foi medido a 575 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do NBT. A atividade da APX foi medida em meio contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 0,5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e quantidade adequada de extrato enzimático. A oxidação do ascorbato foi monitorada a 290 nm ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Nakano e Asada, 1981). A atividade da GR foi conduzida em meio com 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 50 mM de glutathione oxidada,

5 mM de NADPH e quantidade adequada de extrato enzimático. A oxidação do NADPH foi monitorada a 340 nm ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Foyer e Halliwell 1976).

A histolocalização do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) foi realizada com embriões frescos de todos os tempos e tratamentos. Dez embriões por tratamento foram imersos em 10 mM de tampão TRIS-HCl (pH 7,0) com 1 mM de NBT à temperatura ambiente por 30 minutos (Oracz et al., 2012). Em seguida foram lavados no mesmo tampão (sem NBT) e fotografados. O positivo do teste foi determinado por regiões marcadas em azul.

### 2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio de *one-way* ANOVA, com nível de significância  $P < 0,05$  para as seguintes comparações: porcentagem de germinação de cada lote (2013 e 2014) entre tratamentos e entre os lotes em cada tratamento; comparações entre tratamentos no mesmo tempo (2 e 7 dias) e entre o mesmo tratamento de lotes diferentes. Dados ao longo dos dias de embebição (0, 4, 8, 12, 17, 34, 56 dias) em cada análise bioquímica dentro de cada tratamento de germinação foram comparados por meio de MANOVA de medidas repetidas. Quando diferenças significativas foram encontradas, *contraste* foi aplicado para determinar diferenças individuais entre as médias.

## 3. Resultados

### 3.1 Germinabilidade e sinalização oxidativa

As sementes de macaúba apresentaram percentuais de germinação significativamente diferentes entre os anos de produção, em todos os tratamentos, incluindo o controle. Comparadas ao lote de 2014, as sementes de 2013 apresentaram maior germinabilidade, evidenciada especialmente pelo efeito positivo dos tratamentos para a superação da dormência nestas sementes (incremento de 93% em  $+\text{GA}_3$  e de 50% em  $-\text{opéculo}$ ;  $P < 0,01$ ; Fig. 2). Os lotes de 2013 e 2014 também apresentaram diferenças quanto à viabilidade. Enquanto 2,5% das sementes do controle, 22,5% de  $+\text{GA}_3$ , e 27,5% de  $-\text{opéculo}$  do lote de 2013 perderam a viabilidade ( $P = 0,01$ ), as sementes de 2014 mantiveram 90% de viabilidade nos três tratamentos, ao final do experimento.

Embriões de sementes do lote de 2013, submetidas aos tratamentos  $+\text{GA}_3$  e  $-\text{opéculo}$ , apresentaram maiores níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que o controle, dois dias (2d) após a imposição dos tratamentos ( $P = 0,028$ ). Neste mesmo tempo (2d), os embriões das



sementes do lote de 2014 mostraram maiores níveis de  $H_2O_2$  no tratamento –opérculo ( $P < 0.01$ ; Fig. 3). No tempo de 2d no tratamento +GA<sub>3</sub> e no tempo de 7d nas sementes do controle, os níveis de  $H_2O_2$  foram superiores no lote de 2013 em relação aos de 2014 ( $P = 0,02$  e  $P < 0,01$ , respectivamente; Fig. 3).

Os níveis de MDA foram maiores em embriões de sementes submetidas ao tratamento +GA<sub>3</sub>, em relação ao controle, 7d após a aplicação dos tratamentos no lote de 2013 ( $P = 0,03$ ). No lote de 2014 houve diferença significativa entre MDA de embriões do controle e do tratamento –opérculo no 7º dia ( $P = 0,02$ ; Fig. 3). Em geral, os níveis de MDA entre os respectivos tratamentos foram maiores nos embriões do lote de 2013, em relação aos de 2014, com exceção do controle de ambos os lotes aos 7d (Fig. 3).

### 3.2 Efeitos dos tratamentos de superação de dormência (sementes de 2014)

Houve aumento da massa fresca das sementes de macaúba até o 8º dia de embebição (fase I), a partir do qual a massa se estabilizou. O aumento da umidade das sementes durante a fase I não resultou em alterações significativas nos parâmetros bioquímicos analisados (Fig. 4). Não houve interação significativa entre o tempo de embebição e nenhum parâmetro bioquímico avaliado ( $H_2O_2$ , MDA, SOD e GR). Os níveis de  $H_2O_2$  nos embriões do controle após 56 dias foram superiores aos demais tempos avaliados ( $P = 0.047$ , Fig. 4). Não houve diferenças significativas nos níveis de  $H_2O_2$  ao longo do tempo em embriões de sementes do tratamento +GA<sub>3</sub>, enquanto nos embriões do tratamento -opérculo os níveis de  $H_2O_2$  foram superiores no 12º dia, em relação aos demais dias (Fig. 4). Os níveis de MDA, que indicam a extensão da peroxidação lipídica, mostraram uma tendência de aumento ao longo do tempo de embebição em todos os tratamentos ( $P = 0.02$ ), com maiores valores aos 56 dias (Fig. 4). Quanto às enzimas do sistema antioxidante, a atividade da CAT apresentou valores entre 1,5 e 4 mM  $H_2O_2$  min<sup>-1</sup> mg ptn<sup>-1</sup>, entretanto, sem diferenças significativas entre tempos de embebição dentro dos tratamentos (dados não mostrados). Não foi detectada atividade da APX em nenhum tempo de embebição ou tratamento. A atividade da SOD foi maior no 56º dia em relação aos demais tempos, em todos os tratamentos ( $P = 0.01$ , Fig. 4). A atividade da GR não foi significativamente diferente entre tempo de embebição em cada tratamento, entretanto, embriões de sementes germinadas apresentaram um aumento de 4x em relação aos demais tempos ( $P < 0.01$ , Fig. 4).

A histolocalização (coloração azul) evidenciou maior acúmulo de  $O_2^-$  nos tempos de 0 a 34 dias em todos os tratamentos (Fig. 5A-F), principalmente na região do haustório.

Na região do pecíolo cotiledonar a coloração ocorreu em pequenas regiões pontuais, sem padrão específico. Embriões coletados após 56 dias de embebição apresentaram coloração menos acentuada que os demais tempos, em todos os tratamentos (Fig. 5G).

#### 4. Discussão

As sementes de macaúba são dispersas com dormência primária (Bicalho et al., 2015; Ribeiro et al., 2015) e este estudo evidenciou diferenças marcantes na germinabilidade de sementes desta espécie produzidas em dois anos consecutivos. Resposta germinativa dependente do ano de produção é um fenômeno bem conhecido (Andersson e Milberg, 1998; Fernández-Pascual et al., 2012; Giménez-Benavides et al., 2005; Schütz e Rave, 2003), que pode estar associado às condições ambientais que prevalecem durante a época de maturação da semente (Carta et al. 2015). Ademais das diferenças observadas nas sementes não tratadas (controle), este estudo mostrou que ambos os tratamentos para a superação de dormência (+ GA<sub>3</sub> e -opérculo) foram menos efetivos para as sementes produzidas em 2014, reforçando a evidência de maior nível de dormência das sementes deste lote em relação às de 2013. Durante o período de desenvolvimento das sementes de macaúba, correspondente ao acúmulo de massa seca e maturação de acordo com Mazzotini-dos-Santos et al. (2015), no ano de 2014 as plantas receberam aproximadamente 35% menos chuva (ca 140 mm) que em 2013 (Fig. 1). Deste modo, as diferenças encontradas nos níveis de dormência entre os anos de produção sugerem que o suprimento hídrico disponível para as plantas durante o desenvolvimento das sementes de macaúba pode ter contribuído para a variação na germinabilidade e na resposta aos tratamentos de superação de dormência observadas neste estudo. Uma vez que *A. aculeata* é uma espécie amplamente distribuída no Brasil, sendo encontrada naturalmente em ambientes com déficit hídrico sazonal (Motta et al. 2002), são necessários estudos para avaliar mais profundamente como o ambiente parental afeta a dormência de suas sementes e as consequências a curto e longo prazo para a espécie num cenário de mudanças climáticas globais.

O nível de dormência pode ser avaliado não só pelo percentual de germinação, mas também por meio da sensibilidade aos fatores que promovem a superação da dormência (Bewley et al., 2006; Hoyle et al., 2008). Os resultados deste estudo sugerem que a dormência mais profunda das sementes de 2014 pode estar relacionada a uma menor sensibilidade à GA, uma vez que duas aplicações de GA<sub>3</sub> não foram suficientes para

promover a germinação no mesmo percentual atingido pelas sementes de 2013 com apenas uma aplicação. Além disso, como a retirada do opérculo (tratamento que reduz os níveis de ABA; segundo Ribeiro et al., 2015), resultou em apenas 50% da germinabilidade obtida com as sementes do lote de 2013, a dormência das sementes do lote de 2014 também poderia estar relacionada a níveis mais altos de ABA na fase de dispersão ou alteração do seu catabolismo após o tratamento.

A germinabilidade das sementes de macaúba produzidas em 2013 após os tratamentos para a superação de dormência (+GA<sub>3</sub> e –opérculo) corroboram os relatados por Ribeiro et al. (2011), Oliveira et al. (2013), Ribeiro et al. (2015) e Bicalho et al. (2015). Nos tratamentos de superação de dormência em que foram observados maiores porcentagens de germinação em relação ao controle (+GA<sub>3</sub> e –opérculo de 2013 e –opérculo de 2014), foi também constatado aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dois dias após a imposição dos tratamentos. A função de ROS, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na germinação e alívio da dormência de sementes é bastante relatado na literatura (Diaz-Vivancos et al., 2013; El-Maarouf-Bouteau e Bailly, 2008; Gomes e Garcia, 2013). Segundo Liu et al. (2010), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua tanto na sinalização do catabolismo de ABA quanto da síntese de GA durante a superação de dormência. Os resultados obtidos neste estudo indicam que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está envolvido na sinalização oxidativa para o alívio da dormência e a germinação de sementes de macaúba.

. O aumento da peroxidação lipídica em sementes do lote de 2013 tratadas com GA<sub>3</sub>, em relação ao de 2014, sete dias após a aplicação do tratamento, pode não estar relacionada diretamente a danos em membranas por estresse oxidativo, mas ser produto da reação de peroxidação de lipídios de reserva (Bailly, 2004). Em sementes com alto teor de lipídios, como a macaúba (Hiane et al., 2005), a  $\beta$ -oxidação é um evento crucial para o crescimento e pode ser inibida por ABA durante a germinação (Graham, 2008). O aumento da peroxidação lipídica verificada neste estudo, ao longo do tempo de embebição em todos os tratamentos, indica que a formação de MDA pode estar relacionado à sinalização e preparação para a mobilização de reservas, evento que já foi relatado em outros estudos (Bicalho et al., 2015; Feng et al., 2011). Em sementes de macaúba, a dinâmica da peroxidação lipídica, bem como de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) foram relacionadas à sinalização oxidativa durante a germinação (Bicalho et al., 2015). A peroxidação de lipídios e a oxidação de ácidos graxos têm sido apontados como sinalizadores de diversas vias metabólicas em plantas (Berger et al., 2001; Griffiths et al., 2000).

A retomada do metabolismo durante a embebição de sementes de macaúba (0 a 8 dias, fase I) produzidas em 2014 não foi acompanhada por alterações significativas na atividade das enzimas do sistema antioxidante no embrião. O aumento da atividade da SOD, observado após 56 dias do início da embebição em todos os tratamentos, sugere que esta enzima esteja relacionada aos eventos de pós embebição e início da mobilização de reservas. A histolocalização do ânion superóxido em embriões foi mais evidente (coloração mais intensa que corresponde ao acúmulo de  $O_2^-$ , segundo Oracz et al. 2012) no haustório, região do embrião que contém reservas utilizadas nos estádios iniciais de crescimento do embrião e de desenvolvimento da plântula (Moura et al., 2010). O aumento da atividade da SOD coincidiu com a diminuição do  $O_2^-$  (coloração azul menos intensa) nos embriões. Ambos não foram influenciados pelos tratamentos de superação de dormência e, portanto, podem ser considerados característicos do metabolismo de germinação de sementes de macaúba. Aumento da atividade da SOD durante a embebição foi relatado por Cakmak et al. (1993) em trigo e por Wojtyla et al. (2006) em ervilha, cujas sementes apresentam germinação rápida. Aumento da atividade da GR foi observada apenas em embriões de sementes de macaúba recém germinadas, sem alterações significativas durante a embebição. Este resultado corrobora os obtidos por Tommasi et al. (2001) para sementes de *Pinus pinea*, entretanto são contrários aos de Cakmak et al. (1993), que relatam aumento da atividade de GR durante a embebição de sementes de trigo, mas não durante a germinação. O aumento da atividade de SOD e de GR em embriões de macaúba após a embebição e na fase pós-germinativa, respectivamente, sugere que as duas enzimas estão envolvidas nos processos de germinação e de mobilização de reservas, momento em que o metabolismo é intensificado. O catabolismo de lipídios nos glioxissomos constitui um dos sítios de formação de ROS em sementes (Kumar et al., 2015) e é especialmente importante para sementes oleaginosas, como a macaúba. O aumento da atividade da GR durante a germinação indica aumento na disponibilidade de NADPH, que doa elétrons para a enzima e é formada na via das pentose-fosfato, a qual torna-se ativa nos primeiros estádios da germinação (Puntarulo et al., 1988).

Já foi evidenciado que o par detoxificador de ROS, ascorbato-glutationa, tem importante papel durante a germinação, como descrito por Tommasi et al. (2001) para *Pinus pinea*. Em sementes de macaúba, apesar da evidente importância da atividade da GR durante a germinação, não foi detectada atividade da APX em nenhuma fase ou tratamento amostrados. Testes anteriores (e como descrito por Bicalho et al. 2015) mostraram níveis mais baixos de ascorbato e deidroascorbato durante a embebição e

germinação de sementes de macaúba em relação aos descritos para sementes (Sung, 1996; Tommasi et al., 2001), o que sugere que o sistema de detoxificação de ROS utilizado pelas sementes de macaúba não envolve ascorbato. A atividade da CAT apresentou pequenas flutuações ao longo da embebição em todos os tratamentos e não foi relacionada aos níveis de  $H_2O_2$ . Diante desses resultados, sugere-se que a detoxificação de ROS durante o processo germinativo de sementes de macaúba envolve as enzimas SOD e GR nos estádios tardios da embebição ou início da germinação, quando o metabolismo aumenta. Além das enzimas descritas nesse trabalho, a germinação de sementes de macaúba também envolve a ação de antioxidantes não enzimáticos, como o  $\alpha$ -tocoferol, como já relatado para a espécie (Bicalho et al., capítulo 2; Bicalho et al., 2015).

Existe diferença na sinalização oxidativa após os tratamentos para a superação da dormência entre os lotes de sementes avaliados. Os resultados indicam que  $H_2O_2$  é uma molécula sinalizadora da superação da dormência/germinação de sementes de macaúba, estando em maiores níveis em lotes ou tratamentos que resultaram em maior germinabilidade. O papel da peroxidação lipídica e o aumento da atividade das enzimas SOD e GR em embriões de sementes de macaúba podem estar relacionados às fases mais tardias da embebição e início da germinação, indicando mobilização de reservas para o crescimento do embrião. A produção de sementes com níveis diferenciais de dormência em resposta ao ambiente parental pode conferir sucesso à macaúba frente às mudanças climáticas globais. Assim, verificar como a dormência das sementes responde ao clima local, a curto e a longo prazo, é crucial para avaliar seu potencial para responder às mudanças das condições ambientais e entender como o recrutamento da espécie poderá ser afetado a longo prazo.

## 5. Referências

- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R., 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109, 1247-1257.
- Andersson, L., Milberg, P., 1998. Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. *Seed Science Research* 8, 29-38.
- Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14, 93-107.

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.

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

Benech-Arnold, R.L., Fenner, M., Edwards, P.J., 1991. Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. induced by water stress during grain filling. *The New Phytologist* 118, 339-347.

Berger, S., Weichert, H., Porzel, A., Wasternack, C., Kühn, H., Feussner, I., 2001. Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1533, 266-276.

Bewley, J.D., Black, M., Halmer, P., 2006. *The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology And Uses*. CABI.

Bewley, J.D., Bradford, K., Hilhorst, H., Nonogaki, H., 2013. *Seeds - Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3 ed. Springer-Verlag, New York.

Bicalho, E.M., Munné-Bosch, S., Garcia, Q.S., capítulo 2. Fruits storage conditions determine changes in hormonal and vitamin E profiles during pre and post-imbibition events of macaw palm seeds. UFMG.

Bicalho, E.M., Pintó-Marijuan, M., Morales, M., Müller, M., Munné-Bosch, S., Garcia, Q.S., 2015. Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance. *Plant Biology* 17, 990-996.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Cakmak, I., Strbac, D., Marschner, H., 1993. Activities of Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes in Germinating Wheat Seeds. *Journal of Experimental Botany* 44, 127-132.

Carta, A., Probert, R., Puglia, G., Peruzzi, L., Bedini, G., 2016. Local climate explains degree of seed dormancy in *Hypericum elodes* L. (Hypericaceae). *Plant Biology* 18, 76-82.

Diaz-Vivancos, P., Barba-Espín, G., Hernández, J.A., 2013. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. *Plant Cell Reports* 32, 1491-1502.

Du, Z., Bramlage, W.J., 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1566-1570.

- El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C., 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior* 3, 175-182.
- Ellis, R.H., Yadav, G., 2016. Effect of simulated rainfall during wheat seed development and maturation on subsequent seed longevity is reversible. *Seed Science Research FirstView*, 1-10.
- Feng, C., LanJu, M., XiaoLong, A., Shun, G., Lin, T., Fang, C., 2011. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. *International Journal of Agriculture and Biology* 13, 25-30.
- Fenner, M., 1991. The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Science Research* 1, 75-84.
- Fernández-Pascual, E., Jiménez-Alfaro, B., García-Torrico, A.I., Pérez-García, F., Díaz, T.E., 2012. Germination ecology of the perennial *Centaureum somedanum*, a specialist species of mountain springs. *Seed Science Research* 22, 199-205.
- Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171, 501-523.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology* 59, 309-314.
- Giménez-Benavides, L., Escudero, A., Pérez-García, F., 2005. Seed germination of high mountain Mediterranean species: altitudinal, interpopulation and interannual variability. *Ecological Research* 20, 433-444.
- Gomes, M.P., Garcia, Q.S., 2013. Reactive oxygen species and seed germination. *Biologia* 68, 351-357.
- Gomes, M.P., Soares, A.M., Garcia, Q.S., 2014. Phosphorous and sulfur nutrition modulate antioxidant defenses in *Myracrodruom urundeuva* plants exposed to arsenic. *Journal of Hazardous Materials* 276, 97-104.
- Graham, I.A., 2008. Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology* 59, 115-142.
- Griffiths, G., Leverentz, M., Silkowski, H., Gill, N., Sánchez-Serrano, J.J., 2000. Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of Experimental Botany* 51, 1363-1370.
- Gualano, N.A., Benech-Arnold, R.L., 2009. The effect of water and nitrogen availability during grain filling on the timing of dormancy release in malting barley crops. *Euphytica* 168, 291-301.

- Heisler-White, J.L., Blair, J.M., Kelly, E.F., Harmony, K., Knapp, A.K., 2009. Contingent productivity responses to more extreme rainfall regimes across a grassland biome. *Global Change Biology* 15, 2894-2904.
- Hiane, P., Ramos Filho, M., Ramos, M., Macedo, M., 2005. Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Brazilian Journal of Food Technology* 8, 256-259.
- Hoyle, G.L., Steadman, K.J., Daws, M.I., Adkins, S.W., 2008. Pre- and post-harvest influences on seed dormancy status of an Australian Goodeniaceae species, *Goodenia fascicularis*. *Annals of Botany* 102, 93-101.
- Kumar, S.P.J., Prasad, S.R., Banerjee, R., Thammineni, C., 2015. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany* 116, 663-668.
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., Zhang, J., 2010. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* 61, 2979-2990.
- Mawdsley, J.R., O'Malley, R., Ojima, D.S., 2009. A review of climate-change adaptation strategies for wildlife management and biodiversity conservation. *Conservation Biology* 23, 1080-1089.
- Mazzottini-dos-Santos, H.C., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O., Sant'Anna-Santos, B.F., 2015. Ontogenesis of the pseudomonomerous fruits of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits. *Trees* 29, 199-214.
- Motta, P.d., Curi, N., Oliveira-Filho, A.d., Gomes, J.B.V., 2002. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37, 1023-1031.
- Moura, E.F., Ventrella, M.C., Motoike, S.Y., 2010. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67, 399-407.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., Kamiya, Y., 2010. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research* 20, 55-67.
- Oliveira, P.G., Garcia, Q.S., 2011. Germination characteristics of *Syngonanthus* seeds (Eriocaulaceae) in *campos rupestres* vegetation in south-eastern Brazil. *Seed Science Research* 21, 39-45.



- Oliveira, T.G.S., Rodrigues-Junior, A.G., Souza, P.P., Ribeiro, L.M., 2013. Use of phytohormones in overcoming macaw palm seed dormancy. *Acta Scientiarum Agronomy* 35, 505-511.
- Oracz, K., Voegelé, A., Tarkowská, D., Jacquemoud, D., Turečková, V., Urbanová, T., Strnad, M., Sliwinska, E., Leubner-Metzger, G., 2012. Myriganone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant Cell Physiol.* 53, 81-95.
- Pires, T.P., dos Santos Souza, E., Kuki, K.N., Motoike, S.Y., 2013. Ecophysiological traits of the macaw palm: A contribution towards the domestication of a novel oil crop. *Industrial Crops and Products* 44, 200-210.
- Pitzschke, A., Forzani, C., Hirt, H., 2006. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 1757-1764.
- Puntarulo, S., Sánchez, R.A., Boveris, A., 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiology* 86, 626-630.
- 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.
- Ribeiro, L.M., Garcia, Q.S., Oliveira, D.M.T., Neves, S.C., 2010. Criteria for tetrazolium tests in the estimation of the germination potential of macaw palm. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45, 361-368.
- Ribeiro, L.M., Souza, P.P., Rodrigues-Junior, A.G., Oliveira, T.G.S., Garcia, Q.S., 2011. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. *Seed Science and Technology* 39, 303-317.
- Schütz, W., Rave, G., 2003. Variation in seed dormancy of the wetland sedge, *Carex elongata*, between populations and individuals in two consecutive years. *Seed Science Research* 13, 315-322.
- Sung, J.M., 1996. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. *Physiologia Plantarum* 97, 85-89.
- Tommasi, F., Paciolla, C., de Pinto, M.C., Gara, L.D., 2001. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *Journal of Experimental Botany* 52, 1647-1654.

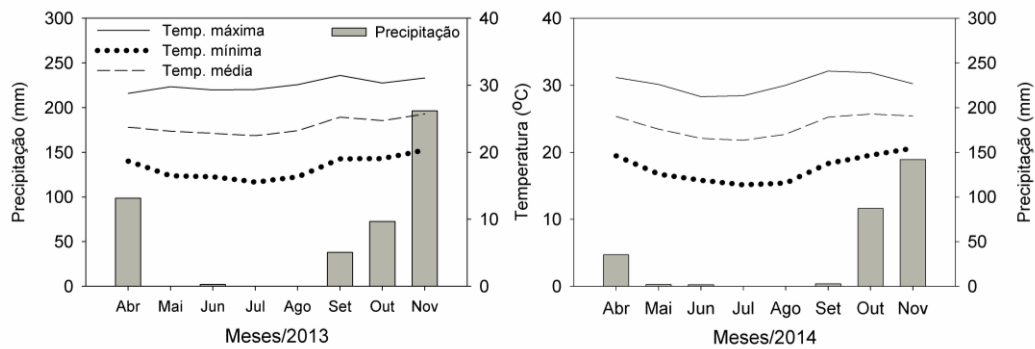
Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151, 59-66.

Walck, J.L., Hidayati, S.N., Dixon, K.W., Thompson, K.E.N., Poschlod, P., 2011. Climate change and plant regeneration from seed. *Global Change Biology* 17, 2145-2161.

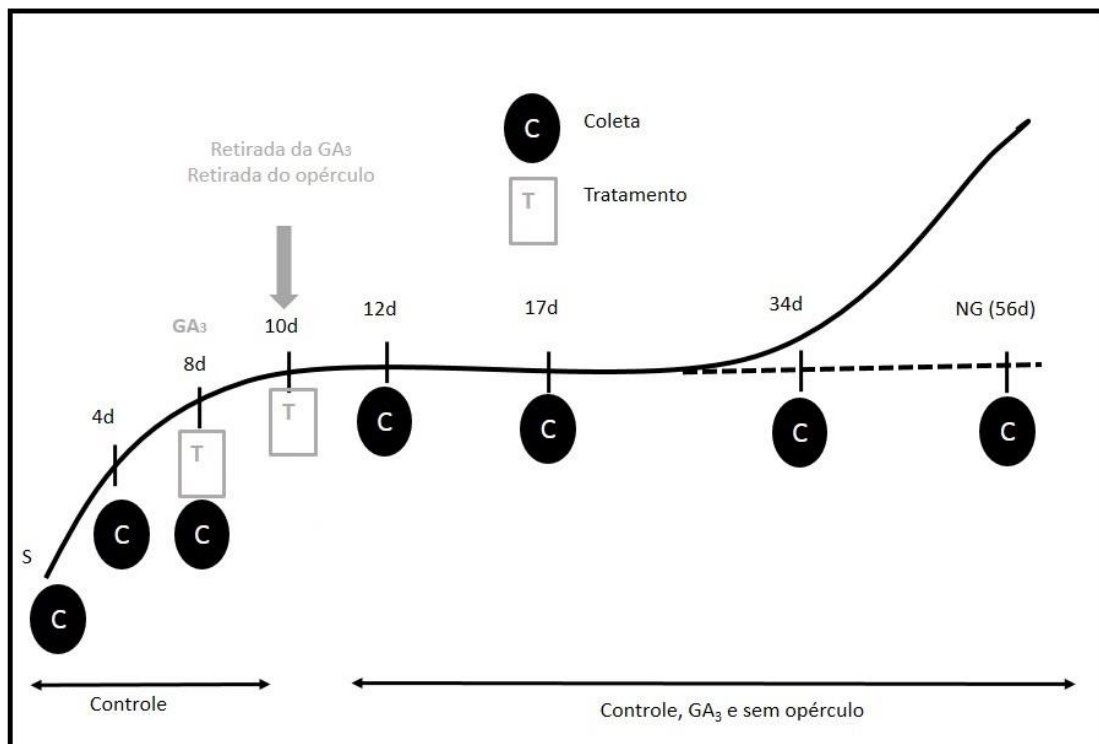
Wojtyła, Ł., Garneczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L., Jurga, S., 2006. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of Plant Physiology* 163, 1207-1220.

Zhang, J., Jia, W., Yang, J., Ismail, A.M., 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* 97, 111-119.

## Figuras e legendas.

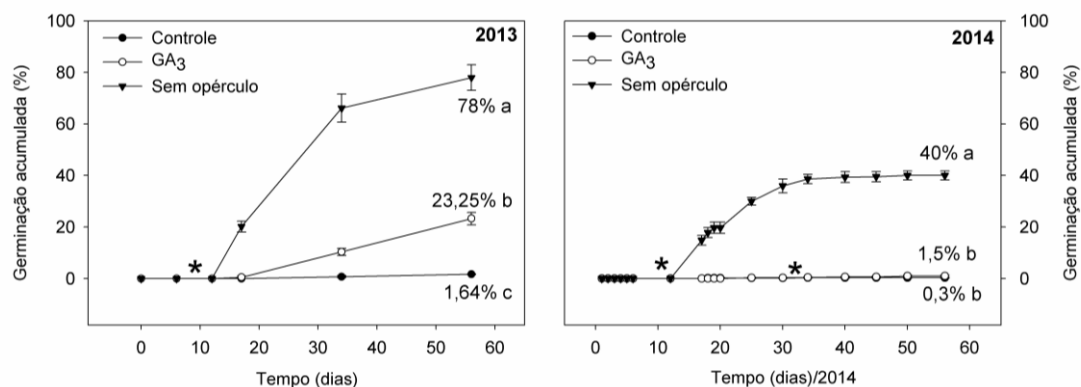


**Fig. 1.** Precipitação (mm)<sup>1</sup>, temperaturas (°C)<sup>1</sup> máxima, mínima e média durante o período de incorporação de massa seca e maturação das sementes (abril a novembro)<sup>2</sup> produzidas nos anos de 2013 e 2014 na região em que foram coletadas. <sup>1</sup>Fonte: (Instituto Nacional de Meteorologia, INMET. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. <sup>2</sup>Segundo descrito por Mazzottini-dos-Santos et al. (2015).

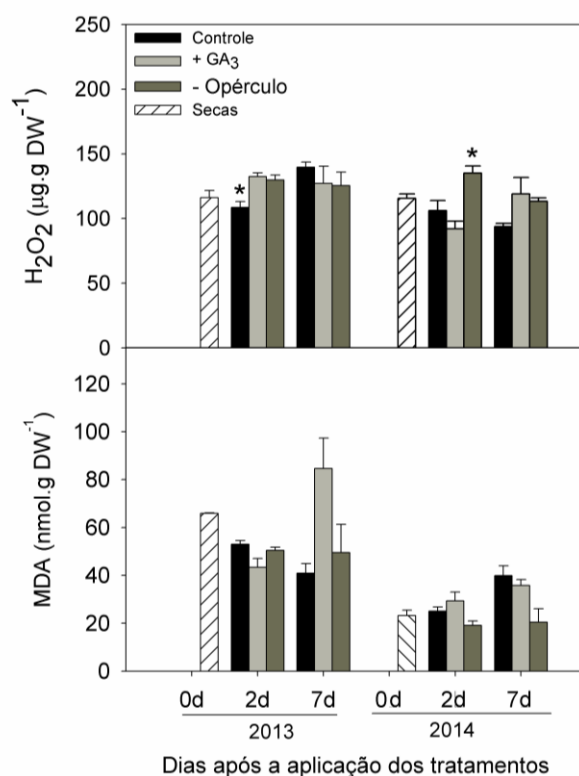


**Fig. 2.** Desenho do experimento realizado com sementes de *A. aculeata* (macaúba). A curva representa o aumento de água durante a embebição. Os retângulos abertos (T) representam a aplicação dos tratamentos de superação de dormência (imersão em solução

de GA<sub>3</sub> e retirada do opérculo). Os círculos negros (C) representam os dias amostrados em que embriões foram coletados para as análises bioquímicas.

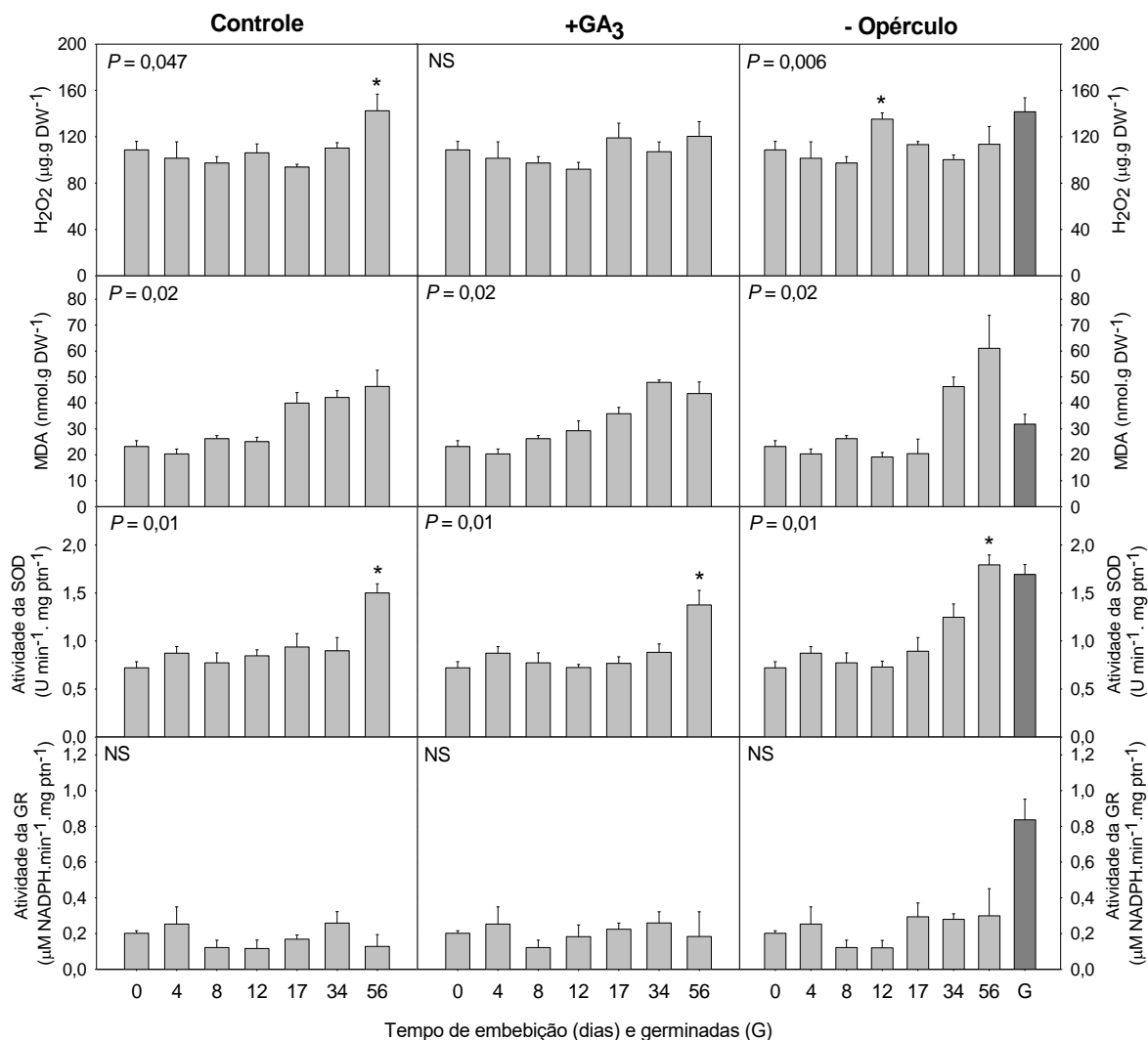


**Fig. 3.** Germinação acumulada das sementes produzidas nos anos de 2013 e 2014 do controle e submetidas aos tratamentos de superação de dormência (+GA<sub>3</sub> e -opérculo). Os pontos são médias  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Médias seguidas por letras diferentes no mesmo gráfico diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). (\*) Aplicações de GA<sub>3</sub>.

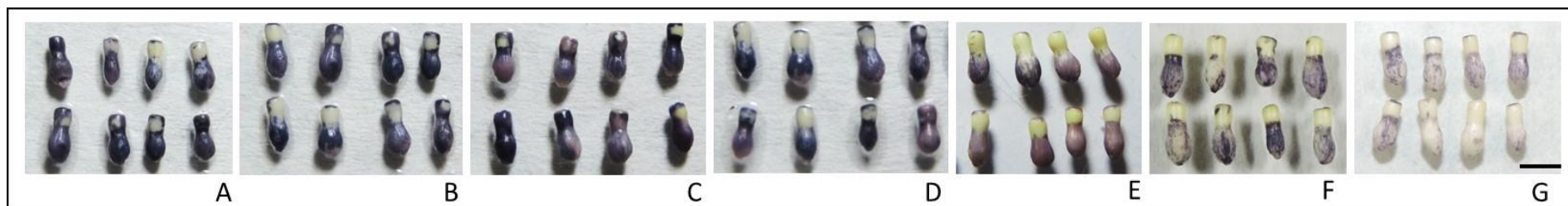


**Fig. 4.** Níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e estimativa da peroxidação lipídica (MDA) em embriões de *A. aculeata* de sementes formadas nos anos de 2013 e 2014 no controle e em cada tratamento de superação de dormência (+GA<sub>3</sub> e -opérculo) no tempo 0 (antes da embebição) e após 2 e 7 dias da imposição dos tratamentos. As barras são médias  $\pm$  erro padrão. Asteriscos (\*)

destacam médias diferentes entre tratamentos no mesmo tempo pelo teste de Tukey com probabilidade  $P < 0,05$ .



**Fig. 5.** Níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estimativa da peroxidação lipídica (MDA) e atividade das enzimas superóxido dismutase e glutatona redutase em embriões de *A. aculeata* nos tratamentos controle, +GA<sub>3</sub> e -opérculo (colunas da esquerda, do meio e da direita, respectivamente). Barras são médias ± erro padrão. Médias seguidas por asteriscos em cada gráfico diferem significativamente entre si por contraste com probabilidade  $P < 0,05$ . NS, não significativo.



**Fig. 6.** Histolocalização do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em embriões de *A. aculeata* em diferentes tempos de embebição (A – 0, B – 4, C – 8, D – 12, E – 17, F – 34, G – 56 dias). A coloração azul indica presença do ânion. Barra: 0,5 cm.

## Considerações finais

Os resultados obtidos nesse estudo agregaram conhecimento ao entendimento dos processos de dormência e germinação em sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*), tanto em relação aos aspectos bioquímicos como ecofisiológicos. Foi demonstrado o papel do embrião como o centro das reações bioquímicas e fisiológicas que regem a germinação de sementes de macaúba. O estudo do perfil hormonal das fases da germinação em embriões de sementes de macaúba demonstrou que o ácido abscísico (ABA) é o hormônio mantenedor da dormência e, para que haja germinação, a razão giberelinas (GA)/ABA deve ser superior a um. O perfil hormonal de sementes não germinadas, longo período após a embebição, mostrou que a superação da dormência está mais relacionada à redução dos níveis de ABA e consequente aumento da razão GA/ABA do que ao aumento dos níveis de GA bioativas. O uso de GA<sub>3</sub> exógena para a superação de dormência não alterou a razão GA/ABA em sementes recém germinadas em relação ao controle, entretanto, promoveu e acelerou a germinação de uma parcela da população de sementes. Esses resultados demonstraram que existem níveis diferenciados de dormência nas populações de sementes de macaúba, o que torna parte delas mais sensível à GA<sub>3</sub>. Auxinas e citocininas são importantes no estágio pós germinativo das sementes de macaúba, que corresponde às fases iniciais de crescimento do embrião, principalmente quando se aplica GA exógena.

Componentes da vitamina E (principalmente  $\alpha$ -tocoferol) e a peroxidação lipídica são importantes sinalizadores oxidativos do processo germinativo de macaúba. Os resultados indicam que  $\alpha$ -tocoferol tem papel protetor contra danos por estresse oxidativo em sementes provenientes de frutos mantidos no viveiro e que estiveram expostos a ciclos intermitentes de hidratação e desidratação, sugerindo sua ação em mecanismos de reparo. Sementes submetidas a estas condições mantiveram altos níveis de ABA durante a embebição e, mesmo com aumento dos níveis de GA, houve atraso na germinação em relação às sementes recém colhidas. Sementes armazenadas a seco se mostraram mais sensíveis à GA exógena. Os resultados da germinação pós armazenamento indicam que a viabilidade de pirênios de macaúba em bancos de sementes, ao longo do tempo, é mantida pelos níveis de  $\alpha$ -tocoferol e que o ABA é importante para a manutenção da dormência, o que permite que o recrutamento lento de indivíduos através da germinação.

Os resultados deste estudo sugerem que os níveis de dormência em sementes de macaúba podem estar relacionados com as condições ambientais que prevalecem durante o

desenvolvimento dos frutos. Os níveis de  $H_2O_2$  aumentaram dois dias após a aplicação dos tratamentos de superação de dormência (imersão em solução de  $GA_3$  e remoção do opérculo), o que constitui um importante indicativo do seu papel na sinalização para a germinação. A análise da atividade das enzimas do sistema antioxidante evidenciou algumas características do processo germinativo de macaúba, independente do tratamento de superação de dormência. A maior atividade da superóxido dismutase (SOD) no final do experimento coincidiu com o menor acúmulo do  $O_2^-$ , sugerindo seu papel na sinalização da mobilização de reservas. A glutatona redutase (GR) apresentou aumento de atividade somente em sementes recém germinadas e pode estar relacionada ao crescimento do embrião e à mobilização de reservas (evento pós germinativo). A via de detoxificação de ROS em sementes de macaúba possivelmente não envolve ascorbato ou ascorbato peroxidase (APX), os quais não foram detectados ou detectados em níveis muito baixos, como a APX.

Em conclusão, esse estudo demonstrou que as sementes de *A. aculeata* são dispersas com níveis distintos de dormência primária, determinada pelo alto conteúdo de ABA. O ambiente ao qual a planta está exposta durante o desenvolvimento dos frutos, bem como o ambiente pós-dispersão, podem interferir no nível de dormência e, portanto, na germinabilidade das sementes de macaúba. A espécie é capaz de formar bancos permanentes de sementes dormentes com alta viabilidade. A eficácia dos tratamentos de superação de dormência utilizados (aplicação de  $GA_3$  e retirada do opérculo) em promover a germinação depende do nível de dormência das sementes. Assim, os fatores ambientais pré e pós dispersão e as condições fisiológicas e bioquímicas interagem durante a germinação e superação de dormência de sementes de macaúba.