Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

A mobilização das reservas é afetada diferencialmente pela restrição hídrica e pelo estresse térmico durante o estabelecimento da plântula em *P. moniliformis*

Hanieri Alves da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Silvicultura e Manejo Florestal

Piracicaba
2020

Hanieri Alves da Silva
Engenheiro Florestal

A mobilização das reservas é afetada diferencialmente pela restrição hídrica e pelo estresse térmico durante o estabelecimento da plântula em *P. moniliformis*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **EDUARDO LUIZ VOIGT**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Silvicultura e Manejo Florestal

Piracicaba
2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Hanieri Alves da

A mobilização das reservas é afetada diferencialmente pela restrição hídrica e pelo estresse térmico durante o estabelecimento da plântula em *P. moniliformis* / Hanieri Alves da Silva - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

60 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Caatinga 2. Carboidratos não estruturais 3. Enzimas hidrolíticas 4. Relação fonte-dreno 5. Status hídrico I Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Marcia e Valderci**,

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de primeiramente agradecer aos meus pais, Marcia e Valderci, meus irmãos e familiares por serem a minha base de vontade de buscar ser uma pessoa melhor e lutar por isso.

Eu agradeço ao meu orientador de graduação e mestrado, professor Eduardo Luiz Voigt por ser minha fonte de inspiração científica, professor e amigo, sendo fundamental na minha construção do pensamento científico, obrigado.

Agradeço aos funcionários da estação experimental de Itatinga, Rildo Moreira, Lourival, Elaine e aos estagiários de férias, pela troca de experiência e conhecimento.

Agradeço ao Jefferson Polizel, por sempre ser disponível, conversas e café.

Eu agradeço à secretaria e coordenação do programa Recursos Florestais, em especial a Giovana Oliveira e ao professor Demóstenes, por toda assistência aos alunos de pós graduação nas reuniões e conversas, esse trabalho é fundamental, muito obrigado.

Em especial, agradeço aos amigos Ciro Ribeiro, Manuela Franco, Humberto Tadeu, Victor Moura e Nathan Barreto pela ajuda e conversas descontraídas.

Em especial, agradeço aos amigos incríveis que a vida me proporcionou na academia: Ciro Ribeiro, Ana Paula Avelino e Danilo Flademir.

Agradeço a coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão e financiamento da bolsa de estudo.

*“A escola será cada vez melhor,
na medida em que cada ser se comportar como colega,
como amigo, como irmão.”*

Paulo Freire

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. DESENVOLVIMENTO	19
2.1 <i>Pityrocarpa moniliformis</i> (BENTH) LUCKOW & R.W JOBSON	19
2.2 Estabelecimento da planta e mobilização das reservas	20
2.3 Estresse hídrico	22
2.4 Estresse térmico	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Obtenção de sementes e condições de cultivo	27
3.2 Experimento I- Mobilização de reservas e partição de metabólitos durante o estabelecimento da plântula sob estresse osmótico	27
3.3 Experimento II- Efeito da temperatura sobre o crescimento da plântula, a mobilização de reservas e a partição de metabólitos	28
3.4 Avaliação do crescimento	28
3.5 Conteúdo relativo de água (CRA)	28
3.6 Clorofilas e carotenoides	28
3.6 Carboidratos não estruturais (CNE)	29
3.7 Proteínas solúveis e aminoácidos livres totais (AALT)	29
3.8 Atividades enzimáticas	30
3.9 Delineamento experimental e análise estatística	30
4. RESULTADOS	33
4.1 O estresse osmótico induzido por manitol retarda o estabelecimento da plântula, mas não afeta negativamente o status hídrico em <i>P. moniliformis</i>	33
4.2 A exposição ao manitol 200 mM retarda a mobilização do amido nos cotilédones e reduz a disponibilidade de CNE na raiz	34
4.3 O retardo da mobilização de proteínas nos cotilédones é acompanhado pela redução da disponibilidade de proteínas e aminoácidos na raiz de plantulas expostas ao manitol 200 mM	35
4.4 O estresse térmico afeta o crescimento da plântula e retarda o estabelecimento do aparato fotossintético em <i>P. moniliformis</i>	36
4.5 A exposição à temperatura elevada não retarda a mobilização do amido e não compromete a disponibilidade de CNE na raiz de <i>P. moniliformis</i>	38
4.6 O aumento da temperatura não retarda a mobilização de proteínas nos cotilédones, mas reduz o conteúdo de proteínas no eixo da plântula	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	51

RESUMO

A mobilização das reservas é afetada diferencialmente pela restrição hídrica e pelo estresse térmico durante o estabelecimento da plântula em *P. moniliformis*

O aquecimento da Ecosfera devido às mudanças climáticas vem intensificando as condições de estresse térmico e déficit hídrico nas comunidades de plantas. Tendo em vista que o estabelecimento é o momento de maior mortalidade de plântulas durante a colonização do ambiente, o trabalho buscou testar a hipótese de que os estresses hídrico e térmico são capazes de retardar o estabelecimento da espécie nativa da Caatinga *Piptadenia moniliformis* (Benth.) Luckow & R.W. Jobson e a mobilização das reservas, devido a alterações na relação fonte-dreno. Para tanto, utilizou-se uma abordagem integrada considerando crescimento da plântula, status hídrico, mobilização das reservas, partição de metabólitos e atividade de hidrolases. Os resultados encontrados mostram que quando as plântulas são expostas ao estresse osmótico induzido por manitol de forma isolada, o retardo do crescimento não é acompanhado pela alteração do status hídrico, mas está associado ao atraso da mobilização das reservas nos cotilédones e à diminuição da disponibilidade de carboidratos não estruturais na raiz. De forma contrastante, o estresse térmico é capaz de atrasar o estabelecimento do aparato fotossintético e comprometer a atividade de enzimas hidrolíticas, mesmo que o uso das reservas não tenha sido alterado nos cotilédones. Desta forma, sob as condições utilizadas neste trabalho, os estresses osmótico e térmico são capazes de retardar o estabelecimento da plântula de *P. moniliformis* e de afetar diferencialmente a mobilização das reservas majoritárias nos cotilédones. Não há evidências claras de que a alteração da relação fonte-dreno medeia o atraso na mobilização das reservas das plântulas sob estresse osmótico. Ainda, as plântulas de *P. moniliformis* são capazes de conservar as principais reservas de nitrogênio sob alta temperatura. Considerando a ausência de mortalidade, sugere-se que *P. moniliformis* apresenta tolerância aos estresses osmótico e térmico nas condições testadas durante o estabelecimento da plântula e que a manutenção dos status hídrico e a utilização das reservas de carboidratos não estruturais podem estar relacionadas à estratégia de sobrevivência para esta espécie.

Palavras-chave: Caatinga, Carboidratos não estruturais, Enzimas hidrolíticas, Relação fonte dreno, Status hídrico

ABSTRACT

The mobilization of reserves is differentially affected by water deficit and heat stress during seedling establishment in *P. moniliformis*

The Ecosphere warming due to climate changes have been intensifying the conditions of heat stress and water deficit in plant communities. Considering that seedling establishment is the developmental stage in which high mortality takes place during environment colonization, this work aimed to test the hypothesis that osmotic and heat stresses are capable to retard seedling establishment and reserve mobilization in the Caatinga native species *Piptadenia moniliformis* (Benth.) Luckow & R.W. Jobson, due to changes in the source-sink relation. In this way, an integrated analysis of seedling growth, water status, reserve mobilization, metabolite partitioning, and hydrolyse activity was carried out. The obtained results show that in the seedlings exposed to osmotic stress induced by mannitol, growth retardation is not accompanied by alterations in water status, but it is associated with a delay in reserve mobilization in the cotyledons and a decrease in the availability of non-structural carbohydrates in the root. By contrast, heat stress is able to retard the establishment of the photosynthetic apparatus and compromise the activity of hydrolytic enzymes, even though the reserve use has not been changed in the cotyledons. Thus, according to the conditions utilized in this work, osmotic and heat stress are capable to retard seedling establishment in *P. moniliformis* by differentially affecting the mobilization of major reserves in the cotyledons. There are no clear evidences that changes in the source-sink relation mediate the delay of reserve mobilization in the seedlings submitted to osmotic stress. In addition, the seedlings are able to conserve nitrogen reserves under high temperature. Considering the absence of mortality, it is suggested that *P. moniliformis* may be tolerant to osmotic and heat stress in the tested conditions during seedling establishment, and the maintenance of water status and the use of non-structural carbohydrate reserves could be strategies utilized by this species to survive.

Keywords: Caatinga, Nonstructural carbohydrates, Hydrolytic enzymes, Source-sink relation, Water status

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Aspecto morfológico (A), conteúdo de massa seca (B), comprimento (C) e conteúdo relativo de água (D) em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse osmótico induzido por manitol..... 34
- Figura 2** - Conteúdo de amido (A), conteúdo de açúcares solúveis totais (B), conteúdo de açúcares não redutores (C) e atividade de amilases (D), em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse osmótico induzido por manitol.....35
- Figura 3** - Conteúdo de proteínas solúveis (A), conteúdo de aminoácidos livres totais (B), atividade de proteases ácidas (C) de plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse osmótico induzido por manitol. 36
- Figura 4** - Aspecto morfológico (A), conteúdo de massa seca em cotilédones, hipocótilo e raiz (B), comprimento de hipocótilo e raiz (C) e conteúdo de pigmentos fotossintéticos em cotilédones (D) de plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico..... 37
- Figura 5** - Conteúdo de amido (A), conteúdo de açúcares solúveis totais (B), conteúdo de açúcares não redutores (C), e atividade de amilases nos cotilédones (D) nos diferentes órgãos: cotilédones, em hipocótilo e a raiz em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico..... 39
- Figura 6** - Conteúdo de proteínas solúveis (A), aminoácidos livres totais (B), atividade de proteases ácidas nos cotilédones (C) de plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico. 39

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AALT – Aminoácidos livres totais

ANR – Açúcares não redutores

AR – Açúcares redutores

AST – Açúcares solúveis totais

CNE – Carboidratos não estruturais

CRA – Conteúdo relativo de água

DAE – Dias após a embebição

MF – Massa fresca

MS – Massa seca

PS – Proteínas solúveis

1. INTRODUÇÃO

Ações antrópicas têm alterado as condições climáticas da Terra em relação ao período pré-industrial e o crescimento populacional humano preocupa os cientistas (FAO, 2018). Dentro deste contexto, o aquecimento da Ecosfera em 1,5° C se torna inevitável até 2050, devido ao aumento de gases do efeito estufa como CO₂ e CH₄. Esta situação trás à tona a necessidade do aprimoramento dos compromissos climáticos para os próximos anos (IPCC, 2018). Este fenômeno representa para o ambiente uma alteração no balanço de radiação solar e recursos hídricos, intensificando as condições de estresse térmico e de déficit hídrico (Feller, 2016). Estes estresses acarretam impactos na sobrevivência e intensificam as causas de mortalidades para as plantas (McDowell et al., 2008, Dolferus et al., 2014; Hartmann e Trumbore, 2016). Diante deste cenário, estudar a relação entre os efeitos dos estresses hídrico e térmico no metabolismo vegetal representa um passo chave para a produção agrícola e à conservação das florestas (O'Brien et al., 2014; FAO, 2018; IPCC 2018).

A princípio, o estresse térmico pode comprometer funções básicas das plantas, como o transporte hídrico e de nutrientes, através da alteração ou distúrbio nas estruturas de membranas celulares, no funcionamento de proteínas por meio da desnaturação e a organização do citoesqueleto (Wahid et al., 2007; Ruelland e Zachowski, 2010; Grover et al., 2013). No aparato fotossintético, a temperatura máxima para operação dos fotossistemas se encontra numa faixa de 35 a 42°C e temperaturas acima deste patamar podem acarretar injúrias na fotossíntese de alguns vegetais (Wise et al., 2004). Nos cloroplastos, as membranas dos tilácóides são sensíveis ao calor, podendo ocorrer processos de fotoinibição no fotossistema II e indução da fotorrespiração (Camejo et al., 2005). Este efeito se deve ao aumento da solubilidade do O₂ nos cloroplastos mais do que CO₂, aumentando assim, a oxigenação da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) em decréscimo da carboxilação; adicionalmente, o aumento de espécies reativas ao oxigênio (EROs) põem em risco o funcionamento celular (Wise et al., 2004; Wahid et al., 2007). Desta forma, a alta temperatura pode alterar a fisiologia e o desenvolvimento das plantas em diferentes estágios do ciclo de vida. Por exemplo, a longa exposição ao estresse térmico pode atrasar a germinação, causar perda de vigor, reduzir a emergência e o estabelecimento da plântula (Wahid et al., 2007). Para plântulas de *Arabidopsis*, o

estresse térmico é capaz de inibir a formação de cotilédones verdes durante o estabelecimento e causar mortalidade nas plântulas (Silva-Correia, 2014). Para *Ricinus communis* (Ribeiro et al., 2015) e para as Asteraceae *Eupatorium catarium*, *Ageratum conyzoides*, *Tridax procumbens*, *Synedrella nodiflora* (Hou et al., 2014), o distúrbio térmico é capaz de causar mortalidade, além de diminuir o crescimento do eixo de plântulas de milho (Sikder et al., 2009).

Nos ecossistemas florestais, a interação com as variáveis climáticas é constante e o aumento da temperatura pode intensificar o estresse hídrico nas plantas (Chapin et al., 1990; Hartmann e Trumbore, 2016). Sob déficit hídrico, o vegetal pode utilizar mecanismos que intensificam a exploração do recurso hídrico no ambiente e a conservação do seu grau de hidratação. Neste período, a exploração de água no solo pode aumentar através do crescimento da raiz, enquanto nas folhas o ajustamento osmótico é uma resposta comum para evitar o fechamento dos estômatos para manutenção da fotossíntese (Corlett, 2016). Quando o déficit hídrico causa danos mais severos ao metabolismo do vegetal, para manter os processos celulares este utiliza como estratégia conservativa o fechamento dos estômatos e até abscisão das folhas (Gilbert e Medina, 2016). Nesta condição, o potencial osmótico celular e do xilema se tornam mais negativos e o risco de morte por falha hidráulica é aumentado (McDowell et al., 2008). Fundamentalmente, algumas hipóteses de sobrevivência das plantas mostram que a mortalidade está associada à privação das reservas de carbono não estrutural (CNE), pois estas reservas, tal como açúcares e amido, são combustíveis básicos, geram blocos de construção de biomassa e podem atuar na osmorregulação celular (McDowell et al., 2008; O' Brien et al., 2014; Maguire e Kobe 2015; Corlett, 2016; Hartmann e Trumbore, 2016; Piper e Farjado, 2016). Para plantas arbóreas tropicais intolerantes à seca, como *Durio oxleyanus* e *Switenia macrophylla*, quando submetidas à restrição hídrica, ocorre maior mortalidade em menor tempo e a redução das reservas de CNE, enquanto que em espécies tolerantes, como *Shorea argentifolia* e *Hopea nervosa*, a sobrevivência está relacionada às maiores concentrações de CNE, sendo atribuída maior eficiência na osmorregulação celular e função hidráulica (O' Brien et al., 2014). Para plântulas de *A. pseudoplatanus* (Piper e Farjado, 2016), a restrição hídrica acarreta o acúmulo das reservas de CNE, assim como espécies tolerantes à seca como *Quercus rubra*, *Quercus velutina*, *Acer rubrum* apresentam

maior conteúdo de açúcares solúveis quando comparado com espécies não tolerantes (Maguire e Kobe, 2015).

Em dicotiledôneas, o mecanismo envolvido na regulação da mobilização de reservas envolve sinalização por retroalimentação negativa mediada pela atividade de enzimas hidrolíticas. Neste mecanismo, as reservas localizadas nos tecidos de armazenamento são mobilizadas por meio de reações hidrolíticas e os produtos de hidrólise são particionados para os tecidos em crescimento, os quais atuam como drenos destas reservas, caracterizando assim a relação fonte-dreno (Bewley et al., 2013). Outros estudos ressaltam a participação hormonal como sinalizador na mobilização das reservas, entretanto em dicotiledôneas essa hipótese ainda é controversa e carece de maior elucidação (Davies e Slack, 1980; Black et al., 2006; Bewley et al., 2013). A força de dreno dos órgãos importadores é fundamental para manutenção do fornecimento das reservas pela fonte. Experimentos clássicos com plântulas de pepino durante o estabelecimento têm mostrado que, após amputação do eixo embrionário, ocorre acúmulo de açúcares nos cotilédones, acompanhado da diminuição das atividades de enzimas hidrolíticas. Este processo demonstra como a privação de açúcares é importante componente na sinalização da mobilização das reservas (Bewley et al, 2013).

O estresse abiótico pode alterar a relação fonte-dreno na plântula através de mudanças na partição e na alocação das reservas (Dong e Beckles, 2019). A seca e a alta temperatura podem causar desidratação e disfunção na obtenção dos recursos hídrico e nutricional da planta. Os açúcares podem atuar como osmoprotetores, abastecendo as células de solutos, para conservação da turgidez celular, evitando o fechamento dos estômatos e preservação da expansão celular. Este fenômeno foi encontrado em plantas de *Jatropha curcas*, espécie classificada como tolerante à seca, além do aumento do conteúdo relativo de água (CRA) (Silva et al., 2009; Silva et al., 2010). Além disso, os açúcares também são utilizados para manutenção da respiração celular (Thalmann e Santelia, 2017). O' Brien et al., (2014) investigaram como a sobrevivência de dez espécies tropicais arbóreas estava relacionada com a concentração das reservas de CNE; as plantas mais tolerantes ao estresse osmótico apresentam maior concentração destas reservas, entretanto não houve acúmulo nas folhas, sendo a maior parte alocada no eixo das plantas. Neste sentido, as reservas contidas nos tecidos de armazenamento das plântulas também podem ser utilizadas como mecanismo de defesa para sustentar a respiração celular

e as funções osmóticas em situação de déficit de carbono, uma vez que o aparato fotossintético não esteja estabelecido ou danificado (Davies e Slack, 1980; Bewley et al., 2013).

Em virtude de o estabelecimento da plântula ser uma fase dependente das reservas e de maior mortalidade na comunidade vegetal, é impressionante como poucos trabalhos têm abordado o papel das reservas sob os estresses hídrico e térmico em espécies arbóreas (Soriano et al., 2013). Durante o estabelecimento, o vegetal encontra-se em transição da heterotrofia para autotrofia e vulnerável às variações ambientais. A fase de estabelecimento resulta em intensas alterações morfológicas, de estrutura celular, metabolismo e expressão genética (Soriano et al., 2013; Wingler, 2018). Para espécies cultivadas, como o trigo, a restrição hídrica é capaz de reduzir a massa de reservas mobilizadas (Harb, 2013), enquanto para plântulas de alfafa reduz o conteúdo de açúcares solúveis e não redutores, proteínas, amilases e o crescimento do hipocótilo (Zeid e Shedeed, 2006). Para lentilha, o estresse osmótico é capaz de reduzir o crescimento da raiz, o conteúdo de água da plântula e a atividade de enzimas hidrolíticas, como α -amilases e β -amilases, durante o estabelecimento (Musculo et al., 2014). Pouco se sabe sobre o efeito dos estresses hídrico e térmico em dicotiledôneas e espécies florestais durante o estabelecimento da plântula.

Desta forma, a Base de Pesquisa em Estresses Abióticos em Plantas da UFRN, iniciou investigações sobre o papel da relação fonte-dreno na regulação da mobilização de reservas durante o crescimento pós-germinativo em *Helianthus annuus* L. (girassol), uma dicotiledônea. Barros-Galvão et al. (2017), investigando o efeito modulatório de metabólitos (sacarose e glutamina) e hormônios (ácido giberélico e ácido abscísico) durante o estabelecimento em plântulas de girassol, destaca que a sacarose e a glutamina exógenas atrasam não somente a mobilização de reservas de carbono (lipídios e amido), mas também a degradação das reservas de nitrogênio nos cotilédones. Diferente dos metabólitos, o ácido abscísico retarda somente o uso dos lipídios e proteínas de reserva, enquanto que o ácido giberélico não é capaz de alterar a mobilização das reservas e consumo dos metabólitos. Avelino et al. (2017), investigando o atraso na mobilização de reservas em girassol no escuro contínuo, evidencia que a mobilização de reservas nas plântulas é regulada por mecanismos de percepção de luz e privação de carbono, ajustando

assim o uso das reservas de acordo com a demanda de energia a ser utilizada para sobrevivência das plântulas.

Trabalhos com espécies florestais, frequentemente expostas a estresses abióticos e privação de carbono, foram iniciados procurando entender como estas respondem em termos de ajustes entre a mobilização das reservas e a partição dos produtos de mobilização durante o estabelecimento da plântula. Sendo assim, investigações com *Piptadenia moniliformis* (Benth) Luckow & R.W. Jobson, espécie florestal pioneira e nativa da Caatinga, floresta tropical seca e formação única do Brasil, foram realizados simulando efeito do estresse salino em ambiente controlado durante o estabelecimento da plântula. Os resultados encontrados mostram que a salinidade altera a relação fonte-dreno, acarretando acúmulo de proteínas em cotilédones, entretanto o conteúdo de amido é mobilizado e acumulado na raiz de plântulas expostas ao NaCl 100 mM, indicando algum mecanismo de mitigação da salinidade por reservas de amido (Alves-da-Silva et al., 2019). Motivado por estes resultados, este trabalho visou dar continuidade às investigações pioneiras sobre os mecanismos responsáveis por ajustes no uso das reservas e na partição de seus produtos de mobilização sob estresse hídrico e térmico em *P. moniliformis*. Para tanto, o trabalho fundamenta-se nas seguintes hipóteses:

- (1) O estresse osmótico, induzido por diferentes concentrações de manitol, pode retardar o estabelecimento da plântula e a mobilização das reservas em *P. moniliformis*, devido a alterações na relação fonte-dreno;
- (2) O estresse térmico pode retardar o estabelecimento da plântula e a mobilização das reservas em *P. moniliformis*, dependendo da relação fonte- dreno.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH) LUCKOW & R.W JOBSON

A espécie *P. moniliformis* conhecida popularmente como catanduba, catanduba, rama-de-bezerro (Azeredo et al., 2011), angico-de-bezerro, muquem, surucucu, quipembe e carrasco (Benedito et al., 2011), pertence à família Fabaceae e à subfamília Mimosoideae (Lorenzi et al., 2002), é nativa da Caatinga (Benedito et al., 2011; Silva et al., 2019), sendo constantemente encontrada em zonas semiáridas do Brasil (Lorenzi et al., 2002; Azeredo et al., 2016).

Escolhida como modelo experimental deste estudo, *P. moniliformis* possui porte arbustivo a arbóreo, com altura entre 4 a 10 metros (Benedito et al., 2011). A espécie tem sido utilizada como forragem para bovinos e ovinos e como forma de matéria prima para construção civil e marcenaria leve, apresentando característica da madeira de textura e resistência média, grã reversa e boa durabilidade (Benedito et al., 2011).

A frutificação de *P. moniliformis* ocorre no período chuvoso e os frutos são de tipo deiscente, curvados, com 4 a 10 cm centímetros de comprimento. A dispersão das sementes é contínua e irregular (Lorenzi, 2002). Em condições naturais, a germinação e a emergência acontece em um período de tempo de duas a três semanas (Benedito et al., 2011) e com temperatura ideal entre 25 a 30 °C (Azeredo et al., 2016). Entretanto, devido à dormência por impermeabilidade do tegumento, a escarificação mecânica na região oposta ao hilo é capaz de superá-la, permitindo a germinação (Silva et al., 2019).

Durante a germinação, as sementes de *P. moniliformis* tem-se destacado por suportar restrição hídrica no substrato com ordem de -0,6 MPa (Benedito et al., 2011) e salinidade moderada e severa com mecanismos de mobilização de CNE durante o estabelecimento da plântula (Alves-da-Silva et al., 2019). Destarte, esta também é classificada como pioneira e rústica, de rápido crescimento, com características de decídua e heliófita (Lorenzi, 2002). Apresenta assim, potencial para programas de reflorestamento e recuperação de solos (Azeredo et al., 2011). Visto que a fase de germinação e estabelecimento da plantula é a de maior mortalidade durante o ciclo de vida do vegetal (Soriano et al., 2013), a identificação de espécies e mecanismos de mitigação da restrição hídrica e do estresse térmico, como as espécies do bioma Caatinga, urge no contexto de mudanças climáticas.

2.2 Estabelecimento da plântula e mobilização das reservas

Após a germinação, intensifica-se o crescimento do eixo da plântula, resultando no alongamento do hipocótilo e da raiz. Durante este estágio, as reservas contidas nos tecidos de armazenamento, como cotilédones e/ou endosperma são fundamentais para sustentar o crescimento inicial. Desta forma, após a germinação, as plântulas são frequentemente classificadas em dois tipos básicos de crescimento: (1) epígeo, no qual os cotilédones permanecem fora do solo com o crescimento do hipocótilo e podem se tornar as primeiras folhas e fotossintéticos; e (2) hipógeo, onde os cotilédones permanecem abaixo do solo durante o alongamento do hipocótilo (Bewley et al., 2013). Neste sentido, a planta é considerada estabelecida uma vez que o aparato fotossintético se encontra formado e a planta seja capaz de se manter de forma autrófica na comunidade florestal (Soriano et al., 2013).

O estabelecimento da plântula resulta em intensas alterações morfológicas, de estrutura celular e mobilização das reservas (Bewley et al., 2013; Soriano et al., 2013). Em dicotiledôneas, a mobilização das reservas envolve a sinalização por retroalimentação negativa. Durante este processo, as reservas de CNE e nitrogênio acumuladas nos tecidos fonte são hidrolisadas por meio de ação de enzimas hidrolíticas, como amilases e proteases e, por conseguinte, os produtos solúveis são mobilizados e alocados em sincronia com crescimento do eixo da plântula, que funciona como um dreno das reservas (Thedoulou e Eastmond, 2012; Bewley et al., 2013). Também é possível que exista participação hormonal na sinalização da mobilização das reservas, entretanto, para dicotiledôneas, esta via carece de maior elucidação (Davies e Slack, 1980; Black et al., 2006). Em síntese, as reservas são utilizadas como combustíveis celulares para sustentar o crescimento da plântula e o desenvolvimento do aparato fotossintético, uma vez que esta se encontra em transição entre a heterotrofia e a autotrofia (Bewley et al., 2013).

As reservas majoritárias encontradas nas sementes e utilizadas para germinação e estabelecimento da plântula correspondem a grupos específicos de substâncias como carboidratos, lipídios e proteínas (Bewley et al., 2013). Os carboidratos correspondem à sacarose, aos oligossacarídeos da série rafínósica (OSRs) e ao amido. Localizados no citosol, sacarose e OSRs, são degradados por invertases e α -galactosidases durante o processo de germinação (Bewley et al., 2013). O amido se encontra sob a forma de grânulos no interior de amiloplastos, formado por polímeros de glicose com estrutura tridimensional semicristalina. A

degradação do amido ocorre pela ação de enzimas hidrolíticas como α -amilases, β -amilases, fosforilases do amido e enzimas desramificadoras (Orzechowski, 2008).

Os lipídios encontrados nos tecidos de armazenamento correspondem aos triacilgliceróis (TAGs). Estes são armazenadas em oleossomos, constituídos de uma monocamada de fosfolipídios associada a proteínas estruturais (Theodoulou e Eastmond, 2012). A degradação destes ocorre por meio da hidrólise dos TAGs, através do metabolismo inter-organelar, envolvendo os oleossomos, os glioxissomos e as mitocôndrias (Graham, 2008).

Nas dicotiledôneas, as proteínas de reservas são classificadas de acordo com a sua solubilidade, segundo a abordagem clássica de Osborne (1924). Nesse sentido, estas são, majoritariamente, as albuminas, as quais são solúveis em água ou tampões diluídos com pH neutro, e as globulinas, que são solúveis em soluções com alta força iônica. Estas proteínas são produzidas pelo sistema de endomembranas e são depositadas nos vacúolos de estocagem de proteínas (VEPs) (Tan-Wilson e Wilson, 2012). A mobilização das proteínas depende de enzimas hidrolíticas como as proteases ácidas, as quais são ativadas ou sintetizadas *de novo* depois da germinação. Desta maneira, estas enzimas, como as endopeptidases, atuam na hidrólise das ligações peptídicas localizadas dentro das cadeias polipeptídicas, ao passo que as aminopeptidases e carboxipeptidases clivam em regiões N-terminal e C-terminal da cadeia, nesta ordem (Bewley et al., 2013). Os aminoácidos liberados podem ser transformados em amidas ou utilizados como substratos para a respiração (Lehmann e Ratajczak, 2008; Borek et al., 2011).

Algumas sementes de espécies nativas da Caatinga classificadas como pioneiras foram caracterizadas conforme as reservas mais proeminentes nos tecidos de armazenamento, como em *Cnidosculus phyllacanthus* (Cavalcanti et al., 2009), *Caesalpinia peltophoroides Benth* (Corte et al., 2006) e *Caesalpinia pyramidalis* (Mayworm et al., 1998) são majoritariamente ricas em reservas de lipídios em suas sementes, enquanto *Schinopsis brasiliensis* (Dantas et al., 2008) e *Erythrina speciosa* (Melo et al., 2010) são ricas em amido e açúcares solúveis totais. Tendo em vista que as sementes possuem quantidades e reservas de distinta composição, é razoável presumir que essas estratégias estariam relacionadas com a sobrevivência imposta pelas condições ambientais.

2.3 Estresse hídrico

Em zonas secas, o sucesso na colonização do ambiente pelas plantas depende dos seus aspectos morfológicos e anatômicos, bem como da habilidade de captar e utilizar o recurso hídrico (Santos, et al., 2014) para realizar fotossíntese (Feller, 2016). A seca é um estresse abiótico que limita a produção da biomassa vegetal e causa mortalidade das plantas (McDowell et al., 2008; He et al., 2014; Corlett, 2016). Diante do cenário de mudanças climáticas (IPCC, 2018), este estresse pode ser definido pela diminuição da precipitação ou pela limitação da reserva hídrica disponível no solo (Corlett, 2016), causando redução do potencial osmótico no solo (Merino-Martín et al., 2017) e, muitas vezes, é acompanhado de elevadas temperaturas na atmosfera (Feller, 2016), deixando o vegetal com menor turgidez, reduzindo a expansão celular e consequentemente o crescimento da planta (Feller, 2016).

A dinâmica de assimilação e partição de carbono nas plantas tem sido investigada, uma vez que essa é alterada sob estresse (Piper e Farjado, 2016). Algumas hipóteses têm sido estabelecidas para explicar os mecanismos de sobrevivência e mortalidade das plantas sob estresse hídrico, como a falha hidráulica e a privação de carbono (McDowell et al., 2008; Maguire e Kobe, 2015; Piper e Farjado, 2016). A falha hidráulica é causada pela restrição hídrica no solo e na atmosfera, gerando um potencial hídrico negativo e aumentando a tensão nos vasos no xilema, acarretando em embolia e na falha hidráulica (McDowell et al., 2008). A privação de carbono tem sido relatada como a utilização de CNE durante os primeiros estágios de estresse hídrico para manter os processos de respiração e o crescimento da planta (McDowell et al., 2008; Corlett, 2016). Outros trabalhos têm mostrado que a seca e a privação de luminosidade intensificam o esgotamento das reservas de CNE para manutenção do crescimento nos primeiros estágios de crescimento da planta (Maguire e Kobe, 2015; Piper e Farjado, 2016).

Nos estágios iniciais de vida do vegetal, uma vez que o aparato fotossintético não esteja estabelecido (Soriano et al., 2013), este depende da mobilização das reservas de carbono e nitrogênio, que sustentam o crescimento inicial da plântula (Tan-Wilson and Wilson, 2012; Bewley, 2013). Durante o estabelecimento, é bem descrito para monocotiledôneas que a restrição hídrica pode causar redução do status hídrico e do crescimento da plântula (Yagmur e Kayadan, 2008). Para *Sorghum bicolor* (Sheykhabglou et al., 2014) e *Secale montanum*

(Ansari et al., 2013), o estresse osmótico causa redução do crescimento das plântulas e da mobilização da massa seca, enquanto que para *Panicum miliaceum* causa redução do crescimento das plântulas, atraso na mobilização das reservas e aparecimento de anomalias. Adicionalmente, para *Triticosecale Wittm* (Yagmur e Kayadan, 2008), o estresse também ocasiona a redução do crescimento do eixo das plântulas, sendo acompanhado do menor conteúdo relativo de água (CRA).

As espécies florestais também respondem de distintas formas quando submetidas ao estresse hídrico (Santos et al., 2014). Para *Erythrina velutina*, a diminuição do potencial osmótico do solo para -0,6 MPa não é capaz de causar efeito negativo, pois a espécie mantém 96% de germinação, entretanto causa atraso na degradação e mobilização das reservas durante os dez primeiros dias (Reis et al., 2012). Estas mesmas condições de potencial osmótico não afetam a germinação de sementes de *P. moniliformis*, porém, potenciais mais baixos como -1,2 MPa, são capazes de promover anomalias e inibir a emergência das plântulas durante aos 21 DAE de estágio (Benedito et al., 2011).

Trabalhos com *Jatropha curcas*, planta classificada como tolerante à seca, têm mostrado que a acumulação de solutos compatíveis durante o estresse osmótico, colabora para o ajustamento osmótico, sendo acompanhado do aumento do CRA (Silva et al., 2010; Silva et al., 2012). Para espécies tolerantes à seca, como *Acer rubrum* e *Quercus rubra*, a privação de carbono imposta pelo estresse hídrico, durante os primeiros estágios do crescimento, promove a mobilização dos CNE (Maguire e Kobe, 2015). Piper e Farjado (2016) ressaltam a importância das reservas de CNE para o estresse hídrico, contribuindo para estratégia de sobrevivência em *Acer pseudoplatanus* durante os primeiros estágios de vida da espécie.

2.4 Estresse térmico

A situação de aquecimento global e mudanças climáticas (IPCC, 2018), põem em preocupação a produção de alimentos e a conservação das florestas (FAO, 2018). O aumento da concentração de CO₂ na atmosfera promove não somente o aumento da temperatura média, levando a eventos extremos de ondas de calor e períodos de seca (Feller, 2016), como a alteração das estruturas celulares das plantas (Ruelland e Zachowski, 2010). Para os ecossistemas florestais, este aumento representa um risco para o crescimento e a reprodução vegetal (Larcher et

al., 2000). O aumento da temperatura acarreta distúrbios nas estruturas básicas de membranas celulares, estrutura tridimensional de proteínas e organização do citoesqueleto (Ruelland e Zachowski, 2010; Grover et al., 2013).

Para sobreviver ao estresse causado por temperaturas elevadas, uma das respostas das plantas é a aceleração do metabolismo e a mobilização dos recursos para sustentar o crescimento (Dolferus, 2014). A temperatura afeta diretamente a estrutura em mosaico de proteínas e lipídios das membranas, desta forma pode acelerar o movimento dos fluidos (Ruelland e Zachowski, 2010). Para a semente recalcitrante de *Trichilia ematica*, espécie florestal nativa da África, o aumento da temperatura a 29 °C não compromete a germinação e o estabelecimento da plântula, porém acelera o processo de germinação e a produção de biomassa durante os 30 dias após a embebição (Sershen et al., 2014).

A temperatura é um fator chave que também influencia na germinação e no crescimento inicial da plântula (Ribeiro et al., 2015). A princípio, este efeito térmico no vegetal, além dos efeitos na fluidez das membranas com o aumento da energia cinética das moléculas, o transporte através das membranas como a obtenção de água e nutrientes são alterados (Ruelland e Zachowski, 2010). A temperatura ótima pode variar entre espécies para manutenção da homeostase celular (Ribeiro et al., 2015). Em milho, quando comparado o aumento da temperatura de 24 para 36°C, este teve efeito positivo na germinação aos 5 DAE, com aumento da massa seca e comprimento da raiz e eixo (Sikder et al., 2009). O mesmo autor atribui esses resultados ao aumento da atividade de hidrolases como α -amilase e mobilização das reservas com o aumento da temperatura. Para *Ricinus communis*, quando submetida à temperatura de 35 °C, as sementes apresentaram alta germinação, entretanto durante o estabelecimento da plântula ocorreu aumento da mortalidade (Ribeiro et al., 2015).

Plantas reajustam a maquinaria bioquímica para se adaptar e sobreviver ao estresse térmico (Ruelland e Zachowski, 2010). A adaptação das plantas ao estresse envolve tanto a produção de proteínas de choque térmico (HSPs), incluindo chaperonas, como enzimas envolvendo a desintoxicação de espécies reativas ao oxigênio e produção de solutos compatíveis para evitar a desidratação e manter a turgidez celular (Gower et al., 2013; Feller, 2016). A acumulação e a compartimentalização de solutos como prolina, betaína e glicinabetaína também são importantes para a osmorregulação (Feller, 2016). Para *Anacardium occidentale* L.,

uma espécie nativa da Caatinga, o aumento da temperatura em 35°C durante os estágios iniciais do ciclo de vida ocasiona estresse oxidativo e, em temperaturas de 45 e 50°C, há um aumento do conteúdo de proteínas solúveis e da atividade de enzimas oxidativas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Silva, 2008). Para *Moringa oleífera*, o aumento da temperatura para 30 °C, é capaz de acelerar a germinação da semente e a emergência da plântula. Este efeito é acompanhado do aumento das atividades de α -amilases, mobilização de açúcares, prolina e enzimas antioxidantes como SOD e CAT (Tesfay et al., 2016).

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de sementes e condições de cultivo

O presente trabalho foi realizado utilizando sementes de *P. moniliformis* obtidas a partir de vagens maduras coletadas de cinco árvores matrizes localizadas em uma unidade de conservação da Caatinga, registrada como Instituto Chico Mendes, na Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta (RN) (S 6°50'12.4"S 35°11'04"W). O clima da área de coleta é classificado como BSh, segundo a classificação de Koppen, com precipitação e temperatura média anual variando entre 650 e 800 mm e 26,5°C (ALVARES et al., 2014). As vagens coletadas foram abertas manualmente e as sementes foram acondicionadas em frascos plásticos e mantidas sob refrigeração a 8 °C até a realização dos experimentos.

Com intuito de obter uniformidade durante a germinação, foi realizada a escarificação mecânica das sementes na região oposta ao hilo, para superar a dormência tegumentar. Estas sementes foram submetidas à assepsia por imersão em detergente comercial diluído (duas gotas por litro) durante 30 s e enxaguadas em água corrente. Os procedimentos foram continuados em câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram expostas a etanol 70% (v/v) durante 30 s, seguido de hipoclorito de sódio 0,25% (m/v) por mais 3 min, sob agitação intermitente. Em seguida, as sementes foram enxaguadas três vezes e embebidas durante 1 h em água destilada estéril. A semeadura foi realizada em placas de Petri com 100 mm de diâmetro, contendo ágar-água 10 g L⁻¹. As sementes foram cultivadas em câmara de crescimento sob condições controladas (radiação fotossinteticamente ativa de 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12/12 h e temperatura de 28 $\pm$ 2 °C) por 2 dias. Após este período, as sementes germinadas foram utilizadas em dois experimentos.

3.2 Experimento I- Mobilização de reservas e partição de metabólitos durante o estabelecimento da plântula sob estresse osmótico

Dois dias após a embebição (DAE), as plântulas foram transferidas para frascos de vidro com tampa de plástico transparente, contendo ágar-água 5 g•L⁻¹ sem adições (controle) ou adicionado de manitol 100 ou 200 mM, cujo potencial osmótico é equivalente a -0,249 e -0,498 MPa, respectivamente. Cinco plântulas foram distribuídas por frasco, sendo mantidas durante 4 dias sob as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente. Seis DAE, as plântulas foram

coletadas e seccionadas em cotilédones, hipocótilo e raiz. O material coletado foi congelado e mantido a -20 °C até a realização das determinações bioquímicas.

3.3 Experimento II- Efeito da temperatura sobre o crescimento da plântula, a mobilização de reservas e a partição de metabólitos

Plântulas obtidas após 2 DAE foram transferidas para ágar-água 5 g•L⁻¹ contido em frascos de vidro com tampa de plástico transparente e cultivadas a 27°C (controle) ou 42 °C (estresse térmico), em incubadora do tipo B.O.D. (do inglês, Biochemical Oxygen Demand) sob fotoperíodo de 12/12 h, durante 4 dias. No final do experimento, as plântulas foram coletadas e acondicionadas como descrito anteriormente.

3.4 Avaliação do crescimento

Durante as coletas, o aspecto morfológico das plântulas foi fotografado e o comprimento do hipocótilo e da raiz foi mensurado com auxílio de um paquímetro. Além disso, amostras de cotilédones, hipocótilo e raiz foram mantidas em estufa a 65°C durante 3 dias e pesadas para obtenção da massa seca (MS).

3.5 Conteúdo relativo de água (CRA)

Para a determinação do CRA, amostras das diferentes partes da plântula, cuja massa fresca (MF) foi medida previamente, foram imersas em água destilada e mantidas à temperatura ambiente durante 90 min. Após secagem em papel toalha, as amostras foram pesadas para a obtenção da massa túrgida (MT) e incubadas a 60°C durante 3 dias, para a obtenção da MS. O CRA foi calculado segundo BARRS e WEATHERLEY (1962) pela fórmula $CRA = \{(MF-MS)/(MT-MS)\} \times 100$ e os resultados foram apresentados em porcentagem.

3.6 Clorofilas e carotenoides

Para a extração de clorofilas totais e carotenoides totais, amostras de cotilédones com cerca de 200 mg de MF congelada foram maceradas com 1,5 mL de acetona 80% (v/v), sob luminosidade reduzida e centrifugadas a 10.000 xg durante 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e os precipitados foram re-extraídos, gerando 3 mL de extrato total. As leituras foram realizadas a 450, 645 e 663 nm. Os conteúdos de clorofilas totais e carotenoides totais foram

determinados conforme Arnon (1949) e Jaspars (1965), respectivamente e expressos em mg g⁻¹ MS.

3.6 Carboidratos não estruturais (CNE)

Os metabólitos solúveis foram extraídos de amostras com aproximadamente 200 mg de MF congelada, as quais foram cortadas em fragmentos e transferidas para tubos contendo 1,5 mL de etanol 80% (v/v). Os tubos foram selados hermeticamente e incubados a 60 °C por 30 min. Após a remoção dos sobrenadantes, os resíduos foram re-extraídos sob as mesmas condições descritas anteriormente. No final dos procedimentos, os sobrenadantes foram reunidos, rendendo 3 mL de extrato por amostra, enquanto que os resíduos foram utilizados para a extração do amido.

Os açúcares solúveis totais (AST) foram determinados com o reagente da antrona (MORRIS, 1948; YEMM e WILLIS, 1954), utilizando D-glicose como padrão, ao passo que os açúcares não redutores (ANR) foram quantificados por uma modificação do método da antrona (VAN HANDEL, 1968), empregando uma curva padrão de sacarose. O conteúdo de ambos os metabólitos foi expresso em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

O amido foi extraído a partir dos resíduos gerados após a remoção dos metabólitos solúveis. Estes resíduos foram macerados com ácido perclórico 30% (v/v) gelado e foram centrifugados a 10.000 xg por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e os precipitados foram extraídos mais duas vezes, perfazendo 1,5 mL de extrato total por amostra ao final destes procedimentos. O amido foi quantificado utilizando o reagente da antrona (MORRIS, 1948; YEMM e WILLIS, 1954), conforme uma curva padrão de D-glicose. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator 0,9 para conversão em amido segundo McCREADY et al. (1950), sendo expressos em mg parte⁻¹.

3.7 Proteínas solúveis e aminoácidos livres totais (AALT)

Uma fração enriquecida em proteínas de reserva foi extraída de amostras contendo cerca de 200 mg de cotilédones congelados. Estas amostras foram maceradas com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 contendo NaCl 500 mM e β -mercaptoetanol 2 mM e os homogenatos foram centrifugados a 10.000 xg por 10 min. Estes procedimentos foram realizados a 4 °C. Depois da coleta dos

sobrenadantes, os precipitados foram extraídos novamente duas vezes, totalizando 1,5 mL de extrato por amostra. As proteínas solúveis do hipocótilo e da raiz foram extraídas de amostras com aproximadamente 100 mg de MF congelada, utilizando tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0, conforme descrito acima. O conteúdo de proteínas solúveis foi mensurado pelo método de Bradford (1976), calculado com base em uma curva padrão de albumina sérica bovina e expresso em mg parte⁻¹.

Os AALT presentes nos extratos de metabólitos solúveis foram determinados pelo método da ninidrina (YEMM e COCKING, 1955), utilizando L-glutamina como padrão. O conteúdo destes metabólitos foi apresentado em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

3.8 Atividades enzimáticas

Para a extração de amilases, cerca de 200 mg de cotilédones congelados foram macerados com 0,6 mL de tampão acetato de potássio 100 mM pH 6,0 suplementado com CaCl_2 5 mM. Após centrifugação a 10.000 xg por 20 min, os sobrenadantes foram coletados e empregados como fontes de enzimas. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C. A atividade de amilases foi estimada pela liberação de açúcares redutores (AR) a partir de amido solúvel como substrato (ELARBI et al., 2009). A quantidade AR foi determinada pelo método do 3,5-dinitro-salicilato (MILLER, 1959) e a atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol de AR g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$.

Para determinar a atividade de proteases ácidas, aproximadamente 200 mg de cotilédones congelados foram macerados com 0,6 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2 contendo β -mercaptoetanol 2 mM. Os extratos brutos foram centrifugados a 10.000 xg por 20 min e os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático. Estes procedimentos foram conduzidos a 4 °C. A atividade de proteases foi estimada pela liberação de aminoácidos livres (AAL) a partir de caseína como substrato (BEEVERS, 1968 – com modificações), utilizando o reagente da ninidrina (YEMM e COCKING, 1955) e expressa em $\mu\text{mol de AAL g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$.

3.9 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cada tratamento contendo cinco repetições. A unidade

experimental consistiu em um frasco de cultura contendo cinco plântulas, adotando amostras compostas, com material proveniente de plântulas distintas. A normalidade dos resultados obtidos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, foi realizado o teste de tukey, fixando-se o nível de significância em 5%, pelo programa Software R versão 4.3.4.

4. RESULTADOS

4.1 O estresse osmótico induzido por manitol retarda o estabelecimento da plântula, mas não afeta negativamente o status hídrico em *P. moniliformis*

No experimento I, o aumento da concentração externa de manitol restringiu a expansão dos cotilédones, o crescimento da gema apical e o alongamento do eixo (Figura 1A), especialmente em plântulas tratadas com manitol 200 mM, quando comparadas com o controle. Embora o estresse osmótico tenha retardado o estabelecimento da plântula, não foi observada mortalidade no decorrer do período avaliado.

Além das alterações morfológicas observadas, o estresse osmótico modificou a partição de MS entre o hipocótilo e a raiz e diminuiu o comprimento do hipocótilo, mas não afetou negativamente o status hídrico nos diferentes órgãos de *P.moniliformis* (Figura 1). Nas plântulas tratadas com manitol 100 e 200 mM, o conteúdo de MS do hipocótilo reduziu 29 e 17% (Figura 1B), em concordância com a diminuição do comprimento desta parte em 28 e 24% (Figura 1C), respectivamente, em relação ao controle. Em contraponto, o conteúdo de MS da raiz aumentou 3 vezes nas plântulas expostas ao manitol 200 mM (Figura 1B), em referência ao das plântulas não tratadas, ainda que não tenha havido aumento do comprimento deste órgão (Figura1C). Surpreendentemente, o CRA das diferentes partes da plântula não foi reduzido pela adição de manitol ao meio de cultura, mesmo na concentração de 200 mM (Figura 1D).

Figura 1 - Aspecto morfológico (A), conteúdo de massa seca (B), comprimento (C) e conteúdo relativo de água (D) em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse osmótico induzido por manitol. Dois DAE, as sementes germinadas foram transferidas para ágar-água 5 g L⁻¹ sem adições (controle) ou suplementado com manitol 100 e 200 mM por 4 dias sob condições controladas. Os valores marcados com mesmo caracter não diferem estatisticamente de acordo com teste de Tukey ($P < 0.05$).

4.2 A exposição ao manitol 200 mM retarda a mobilização do amido nos cotilédones e reduz a disponibilidade de CNE na raiz

As diferentes partes da plântula de *P. moniliformis* responderam de forma distinta ao estresse osmótico induzido por manitol em relação ao conteúdo de CNE (Figura 2). Nos cotilédones, o conteúdo de amido (Figura 2A) e de AST (Figura 2B) aumentou 41 e 52%, respectivamente, enquanto que o conteúdo de ANR diminuiu 23% (Figura 2C), nas plântulas tratadas com manitol 200 mM em relação ao controle. A retenção de amido nos cotilédones das plântulas expostas ao manitol 200 mM não foi acompanhada pela diminuição da atividade de amilases, em referência às plântulas não tratadas (Figura 2D).

No hipocótilo, o estresse osmótico não foi capaz de reduzir os conteúdos de amido (Figura 2A), AST (Figura 2B) e ANR (Figura 2C). Em contraste, o

tratamento com manitol 200 mM restringiu a acumulação de CNE na raiz, reduzindo o conteúdo de amido (Figura 2A), AST (figura 2B) e ANR (Figura 2C) em 49, 69 e 80%, nesta ordem, em relação ao das plântulas não tratadas.

Figura 2 - Conteúdo de amido (A), conteúdo de açúcares solúveis totais (B), conteúdo de açúcares não redutores (C) e atividade de amilases (D), em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse osmótico induzido por manitol. Dois DAE, as sementes germinadas foram transferidas para ágar-água 5 g L⁻¹ sem adições (controle) ou suplementado com manitol 100 e 200 mM por 4 dias sob condições controladas. Os valores marcados com mesmo caracter não diferem estatisticamente de acordo com teste de Tukey (P < 0.05).

4.3 O retardo da mobilização de proteínas nos cotilédones é acompanhado pela redução da disponibilidade de proteínas e aminoácidos na raiz de plantulas expostas ao manitol 200 mM

O estresse osmótico induzido por manitol causou alterações no conteúdo de proteínas solúveis e AALT nas diferentes partes das plântulas de *P. moniliformis* (Figura 3). De fato, o conteúdo de proteínas solúveis nos cotilédones, correspondente a uma fração enriquecida em proteínas de reserva, aumentou em 37% (Figura 3 A) devido à exposição ao manitol 200 mM, em relação ao controle. Em concordância com a retenção desta reserva nos cotilédones, a atividade de proteases ácidas diminuiu 28% nestes órgãos em plântulas submetidas ao manitol 200 mM, quando comparada ao controle (Figura 3C). Curiosamente, a despeito das alterações verificadas no conteúdo de proteínas solúveis e na atividade de próteses

ácidas nas plântulas cultivadas com manitol 200 mM, o conteúdo de AALT nos cotilédones não reduziu em referência às plântulas não tratadas (Figura 3 B).

No hipocótilo e na raiz, o tratamento com manitol 200 mM reduziu o conteúdo de proteínas solúveis em cerca de 29% (Figura 3A), em relação ao controle. De forma adicional, o aumento da concentração externa de manitol reduziu progressivamente o conteúdo de AALT na raiz. De fato, o conteúdo destes metabólitos diminuiu 52 e 81% na presença de manitol 100 e 200 mM, nesta ordem, em relação a sua ausência (Figura 3B).

Figure 3 - Conteúdo de proteínas solúveis (A), conteúdo de aminoácidos livres totais (B), atividade de proteases ácidas (C) de plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse osmótico induzido por manitol. Dois DAE, as sementes germinadas foram transferidas para ágar-água 5 g L⁻¹ sem adições (controle) ou suplementado com manitol 100 e 200 mM por 4 dias sob condições controladas. Os valores marcados com mesmo caracter não diferem estatisticamente de acordo com teste de Tukey (P < 0.05).

4.4 O estresse térmico afeta o crescimento da plântula e retarda o estabelecimento do aparato fotossintético em *P. moniliformis*

Ao final do experimento II, as plântulas crescidas a 42 °C apresentaram cotilédones fechados e cloróticos, retardo no crescimento da gema apical e diminuição no comprimento do eixo, quando comparadas às plântulas mantidas a

27 °C (Figura 4A), evidenciando efeitos do estresse térmico. Apesar das mudanças morfológicas, nas plântulas incubadas a 42 °C, a MS dos cotilédones se manteve inalterada (Figura 4B), bem como não houve diminuição no conteúdo de MS (Figura 4B) e no comprimento do hipocótilo (Figura 4C), em relação às plântulas crescidas a 27 °C. Em contraponto, a temperatura de 42 °C foi capaz de causar 30% de aumento no conteúdo de MS da raiz (Figura 4B) e reduzir o seu comprimento em 27% (Figura 4C), em referência à temperatura de 27 °C. Além disso, o conteúdo de clorofilas totais nos cotilédones foi 39% menor nas plântulas sob estresse térmico em comparação com aquele nas plântulas crescidas a 27 °C, mesmo que não tenha havido diferença no conteúdo de carotenoides totais entre estes tratamentos (Figura 4D).

Figura 4 - Aspecto morfológico (A), conteúdo de massa seca em cotilédones, hipocótilo e raiz (B), comprimento de hipocótilo e raiz (C) e conteúdo de pigmentos fotossintéticos em cotilédones (D) de plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico. Sementes germinadas foram transferidas e mantidas para meio ágar-água 5 g L⁻¹ em 27 °C (controle) ou 42 °C (estresse térmico) por 4 dias sob condições controladas em incubadora tipo BOD. Os valores marcados com o mesmo caráter não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.5 A exposição à temperatura elevada não retarda a mobilização do amido e não compromete a disponibilidade de CNE na raiz de *P. moniliformis*

Nos cotilédones, a exposição das plântulas de *P. moniliformis* ao estresse térmico ocasionou respostas distintas para os diferentes CNE, em comparação com o controle (Figura 5). De fato, o conteúdo de amido se manteve inalterado (Figura 5A), enquanto que o conteúdo de AST (Figura 5B) reduziu 48% e o conteúdo de ANR aumentou 58% (Figura 5C), nas plântulas submetidas a 42 °C em referência àquelas expostas a 27 °C. Apesar de que o estresse térmico não tenha alterado a acumulação de amido nos cotilédones (Figura 5A), a atividade de amilases foi reduzida em 58% a 42 °C em referência a 27 °C (Figura 5D).

No hipocótilo, a temperatura de 42 °C levou à redução de 37% no conteúdo de amido em comparação com o controle (Figura 5A), enquanto que os conteúdos de AST (Figura 5B) e ANR (Figura 5C) não apresentaram diferenças significativas entre estes tratamentos. Ainda, o estresse térmico não comprometeu a disponibilidade de CNE na raiz, uma vez que o conteúdo de amido (Figura 5A), AST (Figura 5B) e ANR (Figura 5C) não diferiu estatisticamente entre as temperaturas testadas.

Figura 5 - Conteúdo de amido (A), conteúdo de açúcares solúveis totais (B), conteúdo de açúcares não redutores (C) e atividade de amilases nos cotilédones (D) em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico. Sementes germinadas foram transferidas e mantidas para meio ágar-água 5 g L⁻¹ em 27 °C (controle) ou 42 °C (estresse térmico) por 4 dias sob condições controladas em incubadora tipo BOD. Os valores marcados com o mesmo caráter não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (P <0,05).

4.6 O aumento da temperatura não retarda a mobilização de proteínas nos cotilédones, mas reduz o conteúdo de proteínas no eixo da plântula

Nos cotilédones, o conteúdo de proteínas solúveis, correspondente a uma fração enriquecida em proteínas de reserva, não apresentou diferenças significativas entre as temperaturas testadas (Figura 6A). No entanto, o estresse térmico aumentou em 35% o conteúdo de AALT nestes órgãos (Figura 6B), em relação ao controle. Embora a mobilização das proteínas de reserva não tenha sido afetada pelo estresse térmico, a atividade de proteases ácidas nos cotilédones reduziu 25% sob esta condição, em relação à temperatura 27 °C (Figura 6C).

No hipocótilo, o estresse térmico foi capaz de reduzir o conteúdo de proteínas solúveis (Figura 6A) e de AALT (Figura 6B) em 40 e 24%, nesta ordem, em referência ao controle. Na raiz, o conteúdo de proteínas solúveis reduziu 30% (Figura 6A), mas o conteúdo de AALT aumentou 30% (Figura 6B), nas plântulas crescidas a 42 °C em comparação com aquelas mantidas a 27 °C.

Figure 6 - Conteúdo de proteínas solúveis (A), aminoácidos livres totais (B), atividade de proteases ácidas nos cotilédones (C) de plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico. Sementes

germinadas foram transferidas e mantidas para meio ágar-água 5 g L⁻¹ em 27 °C (controle) ou 42 °C (estresse térmico) por 4 dias sob condições controladas em incubadora tipo BOD. Os valores marcados com o mesmo caracter não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (P <0,05).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstra-se que as plântulas de *P. moniliformis* apresentam respostas distintas à restrição hídrica e à temperatura elevada, aplicadas de forma isolada, durante o início do estabelecimento. Quando as plântulas são expostas ao estresse osmótico induzido por manitol, o retardo do crescimento (Figura 1A e C) não é acompanhado pela alteração do status hídrico (Figura 1D), mas está associado ao atraso da mobilização das reservas nos cotilédones (Figuras 2A e 3A) e à diminuição da disponibilidade de CNE na raiz (Figura 2A, B e C). De forma contrastante, o estresse térmico é capaz de atrasar o estabelecimento do aparato fotossintético (Figura 4A e D) e comprometer a atividade de enzimas hidrolíticas (Figuras 5D e 6D), mesmo que o uso das reservas não tenha sido alterado nos cotilédones (Figuras 5A e 6A).

A restrição hídrica e a temperatura elevada não causam a mortalidade das plântulas de *P. moniliformis*, mas afetam diferencialmente o seu crescimento

A mortalidade é uma das primeiras respostas perceptíveis em plântulas submetidas a condições estressantes (Soriano et al., 2013). Neste sentido, é notável que não há mortalidade das plântulas de *P. moniliformis* mantidas nas condições testadas, incluindo a exposição ao manitol 200 mM, equivalente ao potencial osmótico de -0,498 MPa, e à temperatura de 42 °C. Em relação ao estresse osmótico, estes resultados corroboram aqueles obtidos previamente, de acordo com os quais apenas potenciais osmóticos inferiores a -0,600 MPa comprometem a formação de plântulas normais em *P. moniliformis* (Azerêdo et al., 2016). Em outras Fabaceae lenhosas, como *Acacia acuminata*, *Acacia assimilis*, *Acacia erinacea* e *Acacia microbotrya*, a diminuição do potencial hídrico do meio externo também restringe a emergência das plântulas (Merino-Martín et al., 2017). Além disso, a sobrevivência das plântulas de *Acer pseudoplatanus* é diminuída sob suspensão de rega (Piper e Farjado, 2016), assim como a temperatura elevada é capaz reduzir a sobrevivência das plântulas de *Ricinus communis* (Ribeiro et al., 2015) e das Asteraceae *Pterocypsela indica*, *Sonchus arvensis*, *Senecio scandens*, *Eupatorium fortune* (Hou et al., 2014). Considerando a ausência de mortalidade, sugere-se que *P. moniliformis* apresenta tolerância aos estresses osmótico e térmico, nas condições testadas, durante o estabelecimento da plântula.

A exposição à restrição hídrica e à temperatura elevada provoca efeitos distintos sobre o crescimento das plântulas de *P. moniliformis*. O comprimento do eixo é afetado pela redução do alongamento do hipocótilo nas plântulas tratadas com manitol (Figura 1C), enquanto que o estresse térmico afeta o comprimento do eixo limitando o alongamento da raiz (Figura 4C). O crescimento do hipocótilo também é reduzido pela restrição hídrica em plântulas de *Lotus tenuis* (García e Mendoza, 2014), *Brassica juncea* (Toosi et al., 2014) e *Juglans regia* (Lotfi et al., 2019), ao passo que o estresse térmico também diminui o alongamento da raiz em plântulas de milho (Sikder et al., 2009) e das Asteraceae *P. indica*, *S. arvensis*, *S. scandens*, *E. fortune* (Hou et al., 2014), assim como reduz a emergência da radícula em plântulas de *Arabidopsis thaliana* (Silva-Correia et al., 2014).

Em plântulas de *P. moniliformis*, o estresse osmótico altera a alocação de MS entre o hipocótilo e a raiz (Figura 1B). Quando a relação hipocótilo/raiz é calculada em base de MS, é equivalente a 5,05 nas plântulas não tratadas, mas reduz para 2,70 e 1,49 nas plântulas tratadas com manitol 100 e 200 mM, respectivamente. De forma semelhante, a relação parte aérea/raiz é reduzida progressivamente com a severidade da restrição hídrica em plântulas de *Sophora davidii* (Wu et al., 2008), *L. tenuis* (García e Mendoza, 2014) e *J. regia* (Lotfi et al., 2019). Em espécies arbóreas de florestas secas, o maior investimento em biomassa radicular e profundidade das raízes pode consistir em uma estratégia para garantir a captação de água em camadas mais profundas do solo (Markestijn e Poorter, 2009). Embora as plântulas de *P. moniliformis* tenham investido mais biomassa na raiz sob estresse osmótico (Figura 1B), este investimento não é acompanhado pelo aumento do comprimento deste órgão (Figura 1C). Considerando que o tratamento com manitol 200 mM reduz o conteúdo de amido (Figura 2A), AST (Figura 2B), ANR (Figura 2C), proteínas (Figura 3A) e AALT (Figura 3B) na raiz em relação ao controle, é possível que a acumulação de MS esteja relacionada ao espessamento das paredes celulares. Alguns estudos demonstram que a restrição hídrica é capaz de aumentar a deposição de lignina e suberina em raízes para minimizar a perda de água e a desidratação dos tecidos (Brunner et al., 2015).

O estabelecimento da plântula em *P. moniliformis* pode ser classificado como epígeo fanerocotiledonar, no qual os cotilédones emergem do substrato devido ao alongamento do hipocótilo, se expandem e se tornam verdes (Bewley et al., 2013). Esta transição de fase é concluída quando as reservas são utilizadas para

estabelecer o aparato fotossintético nos cotilédones (Soriano et al., 2013). Neste sentido, a temperatura de 42 °C é capaz de retardar o estabelecimento do aparato fotossintético nas plântulas de *P. moniliformis*, uma vez que os cotilédones não se abrem, se mantêm pálidos e apresentam menor conteúdo de clorofilas em comparação com aqueles das plântulas crescidas a 27 °C (Figura 4A e D). O estresse térmico também atrasa o estabelecimento da plântula em *A. thaliana* (Silva-Correia et al., 2014) e cultivares de canola (Zhang et al., 2015), limitando a acumulação de clorofilas nos cotilédones.

As plântulas de *P. moniliformis* são capazes de manter o status hídrico frente aos estresses osmótico e térmico

Sob condições semiáridas, a habilidade de manter o status hídrico por longos períodos é uma característica de espécies tolerantes (Santos et al., 2014). Em *P. moniliformis*, uma espécie nativa do Semiárido Nordeste, é notável que o CRA não tenha diminuído nas diferentes partes da plântula sob estresse osmótico promovido por manitol 200 mM (Figura 1D). De forma semelhante, o CRA das plântulas de *P. moniliformis* também não é afetado negativamente quando elas são crescidas sob condição isosmótica de salinidade (NaCl 100 mM) (Silva et al., 2019) ou sob 42 °C (este trabalho, dados não mostrados). As plântulas de *S. davidii* (Wu et al., 2008) e *Jatropha curcas* (Silva et al., 2010), ambas espécies lenhosas de climas secos, também são capazes de evitar a diminuição do CRA quando a disponibilidade hídrica é reduzida. No entanto, a restrição hídrica diminui o CRA em espécies arbóreas de climas temperados, como *J. regia* (Lotfi et al., 2019) e *Quercus ilex* (Simova-Stoilova et al., 2018). A manutenção do status hídrico nas plântulas de *P. moniliformis* sob estresse osmótico induzido por manitol pode estar relacionada ao ajustamento osmótico, no qual a desidratação dos tecidos é evitada devido à acumulação de solutos compatíveis nas células e a consequente redução do seu potencial osmótico (Shinozaki et al., 2015). Caso tenha ocorrido ajustamento osmótico em plântulas de *P. moniliformis* tratadas com manitol, é possível que a acumulação de AST (Figura 2B), ANR (Figura 2C) e AALT (Figura 3C) nos cotilédones e no hipocótilo cumpra algum papel. Considerando que K⁺ e ácidos orgânicos são os principais osmólitos envolvidos no ajustamento osmótico em *A. thaliana* em resposta à diminuição da disponibilidade hídrica no solo (Hummel et

al., 2010), não é possível descartar que estes osmólitos também contribuam para a manutenção do CRA em plântulas de *P. moniliformis*, especialmente na raiz.

A mobilização das reservas majoritárias é afetada diferencialmente pela restrição hídrica e pela alta temperatura nos cotilédones das plântulas de *P. moniliformis*.

A despeito de que o estresse osmótico e o estresse térmico tenham atrasado o estabelecimento da plântula em *P. moniliformis* (Figuras 1 e 4), a mobilização do amido e das proteínas de reserva nos cotilédones é retardada na presença de manitol 200 mM (Figuras 2A e 3A), mas não é afetada a 42 °C (Figuras 5A e 6A). O estresse osmótico também causa a retenção do amido nos cotilédones das plântulas de *Cicer arietinum* (Kaur et al., 1998; Kaur et al., 2000) e de *Medicago sativa* (Baranova et al., 2007), mas acelera a mobilização desta reserva nos cotilédones das plântulas de *Cucumis sativus* (Todaka et al., 2000). De maneira adicional, a redução da disponibilidade hídrica intensifica a hidrólise das proteínas de reserva nos cotilédones de *M. sativa* durante o estabelecimento (Zeid e Shedeed, 2006), assim como o aumento da temperatura reduz a acumulação do amido no remanescente da semente em plântulas de *R. communis* (Ribeiro et al., 2015).

Em um trabalho anterior, é demonstrado que o estresse salino induzido por NaCl 100 mM é capaz de acelerar a mobilização do amido e atrasar a hidrólise das proteínas de reserva nos cotilédones de *P. moniliformis* (Silva et al., 2019). Ainda que o estresse salino também apresente efeitos decorrentes da elevada osmolaridade do substrato sobre as plantas e, assim, compartilhe vias de sinalização com o estresse osmótico (Yang e Guo, 2018), é notável as respostas apresentadas por *P. moniliformis* quanto à mobilização das reservas tenham sido distintas sob estes estresses. Neste sentido, parece que esta espécie é mais apta a lidar com a restrição hídrica do que com a salinidade ou o calor durante o estabelecimento da plântula, em respeito à conservação das reservas de carbono e nitrogênio.

Está bem estabelecido que os mecanismos responsáveis pela regulação da mobilização das reservas nos tecidos de armazenamento modulam a atividade de enzimas hidrolíticas (Bewley et al., 2013). Dentre estas enzimas, as amilases apresentam papel central na clivagem dos glucanos constituintes dos grânulos de amido (MacNeill et al., 2017), assim como as proteases ácidas atuam na hidrólise das proteínas de reserva nos vacúolos de estocagem de proteínas (Tan-Wilson e Wilson, 2011; Thalmann e Santelia, 2017). Neste estudo, o retardo na mobilização

do amido induzido por manitol 200 mM nos cotilédones das plântulas de *P. moniliformis* (Figura 2A) não é acompanhado pela diminuição da atividade de amilases (Figura 2D), porém a retenção das proteínas de reserva (Figura 3A) ocorre em paralelo com a diminuição da atividade de proteases ácidas (Figura 3D). Estes resultados corroboram aqueles encontrados anteriormente, os quais indicam que a mobilização do amido e a hidrólise das proteínas de reserva são processos regulados de forma independente em *P. moniliformis* (Silva et al., 2019). Mesmo que não seja possível precisar quais mecanismos modulam as atividades hidrolíticas nos cotilédones das plântulas de *P. moniliformis*, os resultados apresentados indicam que o estresse osmótico pode ter modulado a atividade de amilases em nível pós-traducional e a de proteases ácidas em nível transcricional. Alguns trabalhos demonstram que as amilases podem sofrer regulação redox mediada por tiorredoxinas (Skryhan et al., 2018) e modulação por açúcares (Li et al., 2017), ao passo que a ação das proteases ácidas na mobilização das proteínas de reserva em leguminosas depende, pelo menos em parte, da síntese de novo (Müntz et al., 2001).

Não há evidências claras de que alterações na relação fonte-dreno medeiam o atraso na mobilização das reservas induzido pelo estresse osmótico nos cotilédones das plântulas de *P. moniliformis*

Segundo a relação fonte-dreno, a mobilização das reservas contidas nos tecidos de armazenamento (fontes) é regulada de acordo com o crescimento do eixo embrionário (dreno), ajustando a atividade das enzimas hidrolíticas à demanda pelos metabólitos utilizados como fontes de energia ou blocos de construção (Bewley et al., 2013). Embora a identidade das moléculas que medeiam a sinalização fonte-dreno ainda seja incerta, experimentos clássicos indicam que os metabólitos derivados do processo de mobilização podem apresentar algum papel neste fenômeno (Kern e Chrispeels, 1978; Davies e Chapman, 1979). Em plântulas de *C. arietinum* expostas ao PEG, o retardo na mobilização do amido, associado à diminuição da atividade de amilases nos cotilédones, pode ser atribuído a alterações na relação fonte-dreno, uma vez que a menor alocação de MS no eixo indica a redução da força do dreno. Além disso, é possível que açúcares solúveis atuem na sinalização destas alterações, porque estes metabólitos são acumulados em todas as partes da plântula em resposta ao tratamento com PEG (Kaur et al., 1998; Kaur et

al., 2000). De forma similar, a diminuição da atividade de amilases causada pelo PEG em sementes germinadas de diferentes genótipos de *Lens culinaris* está relacionada à redução do alongamento da raiz e à acumulação de açúcares solúveis (Muscolo et al., 2014).

Em plântulas de *P. moniliformis*, mesmo que o tratamento com manitol 200 mM tenha alterado a alocação de MS entre o hipocótilo e a raiz, o investimento de MS no eixo não é alterado (Figura 1B), indicando que a relação fonte-dreno é mantida entre os cotilédones e o eixo, pelo menos em termos de transferência de MS. Tendo em vista que o conteúdo de AST (Figura 2C), ANR (Figura 2D) e AALT (Figura 3C) é diminuído na raiz das plântulas, não é possível sugerir que o atraso na mobilização do amido e das proteínas de reserva causado pelo manitol 200 mM seja mediado pela acumulação destes metabólitos devido a sua menor demanda. Desta forma, a mobilização das reservas nos cotilédones das plântulas de *P. moniliformis* sob estresse osmótico deve ser regulada por outros mecanismos, como a sinalização hormonal. Ainda que o conteúdo de fitormônios não tenha sido acessado neste trabalho, é razoável considerar que o ácido abscísico (ABA) pode estar envolvido na retenção de amido e proteínas de reserva nos cotilédones, pois está bem estabelecido que este fitormônio medeia respostas em plantas sob restrição hídrica (Manavalan e Nguyen, 2017). Estudos anteriores corroboram esta sugestão, pois o ABA exógeno retarda a mobilização dos lipídios e proteínas de reserva nos cotilédones das plântulas de *Helianthus annuus* (Barros-Galvão et al., 2017), bem como o aumento da concentração externa de PEG é capaz de aumentar o conteúdo de ABA no eixo embrionário durante o crescimento pós-germinativo em genótipos de *J. regia* (Lotfi et al., 2019).

A restrição hídrica e a temperatura elevada afetam diferencialmente a disponibilidade de CNE nas plântulas de *P. moniliformis*

É notável que as plântulas de *P. moniliformis* não tratadas apresentam um padrão característico de alocação de CNE nos seus diferentes órgãos. De fato, o maior conteúdo de amido é encontrado nos cotilédones, seguido daquele no hipocótilo e o menor conteúdo é verificado na raiz (Figuras 2A e 5A), porém os AST (Figuras 2C e 5C) e os ANR (Figura 2D e 5D) apresentam o padrão inverso de alocação. Na presença de manitol 200 mM, o conteúdo de amido e AST aumenta nos cotilédones, mas a disponibilidade dos CNE se mantém no hipocótilo e diminui

na raiz (Figura 2), alterando o seu padrão de alocação. Em plântulas de *C. arietinum* (Kaur et al., 1998; Kaur et al., 2000), *A. thaliana* (Hummel et al., 2010), *L. culinaris* (Muscolo et al., 2014), *Acer rubrum*, *Fraxinus americana*, *Betula papyfera* (Maguire e Kobe, 2015) e *M. sativa* (Salemi et al., 2019), no entanto, há acumulação de açúcares solúveis em paralelo com a restrição do crescimento causada pelo déficit hídrico. Esta resposta tem sido atribuída ao desacoplamento entre o crescimento e a disponibilidade de carbono, pois a expansão dos órgãos dreno deve ser comprometida antes do seu metabolismo (Muller et al., 2011). Em comparação, a raiz das plântulas de *P. moniliformis* responde de forma inversa ao manitol 200 mM, uma vez que ocorre acumulação de MS (Figura 1B), o alongamento não é afetado (Figura 1C) e o conteúdo de amido (Figura 2A), AST (Figura 2C) e ANR (Figura 2D) diminui. Como mencionado anteriormente, é possível que estes CNE tenham sido utilizados no espessamento das paredes celulares em resposta à restrição hídrica (Brunner et al., 2015).

A despeito da importância do estresse térmico nas alterações climáticas (Zandalinas et al., 2018) e do estabelecimento da plântula na dinâmica das florestas (Soriano et al., 2013), é impressionante a carência de informações sobre as respostas das espécies lenhosas à alta temperatura quanto à disponibilidade de CNE durante esta transição de fase. Em um dos poucos trabalhos encontrados, as plântulas de *R. communis* cultivadas a 35 °C, em comparação com aquelas crescidas a 20 °C, sustentam o crescimento das primeiras folhas pelo consumo dos CNE nos cotilédones e principalmente na raiz (Ribeiro et al., 2015). Está bem estabelecido que a elevação da temperatura pode intensificar a respiração em plantas (Teskey et al., 2015) e que os carboidratos são os seus principais substratos (Zeeman, 2015). Curiosamente, nas plântulas de *P. moniliformis* expostas a 42 °C, em relação àquelas mantidas a 27 °C, a mobilização do amido (Figura 5A) nos cotilédones não é intensificada e a disponibilidade dos CNE na raiz (Figura 5) não é comprometida, a qual pode ter sido mantida devido ao consumo do amido no hipocótilo (Figura 5A). Levando em conta que a disponibilidade de CNE é fundamental para a sobrevivência de espécies lenhosas sob estresses (Maguire e Kobe, 2015), a preservação das principais reservas de carbono nos órgãos fonte (amido cotiledonar) pode ser uma das estratégias metabólicas utilizadas pelas plântulas de *P. moniliformis* para tolerar o estresse térmico.

As plântulas de *P. moniliformis* são capazes de conservar as principais reservas de nitrogênio sob alta temperatura

Os danos causados pela alta temperatura no metabolismo das células vegetais se devem primariamente ao aumento da fluidez das membranas e à desnaturação das proteínas, permitindo o desacoplamento de reações e comprometendo a atividade de enzimas. Neste sentido, o metabolismo das proteínas ocupa uma posição central nos mecanismos de danos e nas respostas apresentadas pelas plantas ao estresse térmico (Jajoo e Allakhverdiev, 2017). Nas plântulas de *P. moniliformis* cultivadas a 42 °C, em comparação com aquelas crescidas a 27 °C, a diminuição da atividade de amilases (Figura 2B) e de proteases ácidas (Figura 6B) aliada à acumulação de AALT (Figura 6C) nos cotilédones pode indicar o aumento da degradação das proteínas ativas, ou seja, alterações da proteostase, devido ao estresse térmico (Chandra e Grover, 2015). Mesmo que a alta temperatura tenha reduzido a população de proteínas solúveis no hipocótilo e na raiz, é notável que a mobilização das proteínas de reserva não tenha sido intensificada nos cotilédones (Figura 6A). Desta maneira, é possível sugerir que as plântulas de *P. moniliformis* são capazes de responder ao estresse térmico, pelo menos a curto prazo, conservando as reservas de nitrogênio nos órgãos fonte (proteínas de reserva cotiledonares).

6.CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, está claro que os estresses osmótico e térmico são capazes de retardar o estabelecimento de *P. moniliformis* e afetar diferencialmente a mobilização das reservas majoritárias nos cotilédones. Não há evidências claras de que a alteração da relação fonte-dreno medie o atraso na mobilização das reservas sob estresse osmótico. As plântulas de *P. moniliformis* são capazes de conservar as principais reservas de nitrogênio sob alta temperatura. Considerando a ausência de mortalidade, sugere-se que *P. moniliformis* apresenta tolerância aos estresses osmótico e térmico, nas condições testadas, durante o estabelecimento, e que a manutenção do status hídrico e a uso das reservas de CNE podem consistir em estratégias utilizadas por esta espécie para alcançar a sobrevivência.

REFERÊNCIAS

- AGHBOLAGHI, M. A.; SEDGHI, M. The effect of osmo and hormone priming on germination and seed reserve utilization of millet seeds under drought stress. **Journal of stress Physiology & Biochemistry**, v.10, p.214-221, 2014.
- ALVARES, C.A., STAPE, J.L, SENTELHAS, P.C., GONÇALVES, J.L.M. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorol**, v.22, p.711-728, 2013.
- ANSARI, O.; CHOCHARIZARDI, H. R.; SHARIFZADEH, F.; NAZARLI, H. Seed reserve utilization and seedling growth of treated seeds of mountain rye (*Secale montanum*) as affected by drought stress. **Certări Agronomice în Moldova**, v.XLV, p.43-48, 2012.
- ARAÚJO, E. D.; MELO, A. S.; ROCHA, M. S.; CARNEIRO, R. F.; ROCHA, M. M. Germination and initial growth of cowpea cultivars under osmotic stress and salicylic acid. **Rev. Caatinga**, v.31, p.80-89, 2018.
- ARJENAKI1, F. G.; JABBARI, R.; MORSHEDI A. Evaluation of Drought Stress on Relative Water Content, Chlorophyll Content and Mineral Elements of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 4, p.726-729, 2012.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p.1-15, 1949.
- AZERÊDO, G. A.; PAULA, R. C.; VALERI S. V. Germinação de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. sob estresse hídrico. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 193-202, 2016.
- AZERÊDO, G. A.; PAULA, R. C.; VALERI S. V. Viabilidade de sementes de *piptadenia moniliformis* Benth pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 061 - 068, 2011.
- BARROS-GALVÃO T., ALVES-DE-OLIVEIRA D.F., MACÊDO C.E.C., VOIGT E.L. Modulation of reserve mobilization by sucrose, glutamine, and abscisic acid during seedling establishment in sunflower. **Journal of Plant Growth Regulation**, 36, 11–21, 2017.
- BARRS, H. D. AN-D P. E. WEATHERLEY. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water cleficits in leaves. **Aulst. J. Biol. Sci.** v,15: 413-428.

- BENEDITO, C. P.; RIBEIRO M. C. C.; TORRES B. S.; CAMACHO R. G. V.; SOARES A. N. R.; GUIMARÃES L. M. S. Armazenamento de sementes de catanduba (*Piptadenia moniliformis* benth.) em diferentes ambientes e embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 028 - 037, 2011.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013.
- BLACK, M.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. **The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses**. Wallingford, USA: CAB International, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRITO G. G., SOFIATTI, V.; LIMA M. M. A.; CARVALHO, L. P.; FILHO, J. L. S. Physiological traits for drought phenotyping in cotton. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, p. 117-125, 2011.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. Mobilização de Reservas. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. *Germinação: do básico ao aplicado*, Porto Alegre: Artmed, 2004, p.31-50.
- CAMEJO, D.; RODRÍGUEZ, P.; MORALES, M.A.; DELLÁMICO, J.M.; TORRECILLAS, A.; ALARCÓN, J.J. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 281–289. 2005.
- CAVALCANTI, M. T.; BORA, P. S.; CARVAJAL, J. C. L. Propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da faveleira (*Cnidosculus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) com e sem espinhos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 3, p. 597-602, 2009.
- Chapin, F. S., Schulze, E-D., Mooney, H. A. The Ecology and Economics of Storage in Plants. **Annual Review of Ecology and System**, v.21, p.423-447, 1990.
- CHAPIN, F. S.; MATSON, P. A.; MOONEY, H. A. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. **Springer**, 2002.
- CORLETT, R.T. The Impacts of Droughts in Tropical Forests. **Trends in Plant Science**, v. 21, p.584-593, 2016.

- CORTE, B.V.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; ENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (*Leguminosae Caesalpinoideae*). **Revista Árvore**, v.30, p.941-949, 2006.
- DANTAS, B. F., SOARES, F. S. J., LÚCIO, A. A., ARAGÃO, C. A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Rev. bras. sementes**, Londrina , v. 30, n. 2, p. 214-219, 2008 .
- DAVIES, H. V., SLACK, P. T (1981). The Control of food mobilization in seeds of dicotyledonous plants. **New Phytologist**. v. 88, p. 41-51.
- DOLFERUS, R. To grow or not to grow: A stressful decision for plants. **Plant Science**, v.229, p.247-261, 2014.
- DONG, S., BECKLES, D. M. Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. **Journal of Plant Physiology**, v. 234, p.80-93, 2019.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 248-254, 1956.
- FAO. The state of the World's forests. Rome, 2018, p.12.
- FELLER, U. Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: Reversible and irreversible impacts. **Journal of Plant Physiology**, v. 203, p. 84-94, 2016.
- GARCÍA, I.; MENDONZA, R. Lotus tenuis seedlings subjected to drought or waterlogging in saline sodic soil. **Environmental and Experimental Botany**, v.98, p.47-55, 2014.
- GILBERT, M.E.; MEDINA,V. Drought Adaptation Mechanisms Should Guide Experimental Design. **Trends in Plant Science**, v.21, p.639-647, 2016.
- GROVER, A.; MITTAL, D.; NEGI, M.; LEVANIA, D. Generating high temperature tolerant transgenic plants: Achievements and Challenges. **Plant Science**, v.205, p.38-47, 2013.
- HARB, A. M. Reserve Mobilization, Total Sugars and Proteins in Germinating Seeds of Durum Wheat (*Triticum Durum* Desf.) under Water Deficit after Short Period of Imbibition. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.6, p.67-72, 2013.

- HARTMANN, H.; TRUMBORE, S. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. **New Phytologist**, v. 211, p. 386-403, 2016.
- HE, B.; CUI, X.; WANG, H.; CHEN, A. Drought: The most important physical stress of terrestrial ecosystems. **Acta Ecologica Sinica**, v. 34, p. 179-183, 2014.
- HOU, Q. Q.; CHEN, B. M.; PEN, S. L.; CHEN, L. Y. Effects of extreme temperature on seedling establishment of nonnative invasive plants. **Biol. Invasions**, v. 16, p. 2049-2061, 2014.
- HUMMEL, I.; PANTIN, F.; SULPICE, R.; PIQUES, M.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; CHRISTOPHE, A.; PERVENT, M.; BOUTEILLÉ, M.; STITT, M.; GIBON, Y.; MULLER, B. Arabidopsis Plants Acclimate to Water Deficit at Low Cost through Changes of Carbon Usage: An Integrated Perspective Using Growth, Metabolite, Enzyme, and Gene Expression Analysis. **Plant Physiology**, v. 154, pp. 357-372, 2010.
- IPCC. Global Warming of 1.5 °C. Switzerland, 2018, p. 18.
- JAJOO, A.; ALLAKHVERDIEV, S. I. High-Temperature Stress in Plants: consequences and Strategies for Protecting Photosynthetic machinery. In: *Plant Stress Physiology*, Ch. 5, p. 138-154, 2e (ed. S. Shabala), 2017.
- JASPARS, E. M. J. Pigmentation of tobacco crown-gall tissues cultured in vitro in dependence of the composition of the medium. **Physiologia Plantarum**, v. 18, p. 933-939, 1965.
- JESUS, M. C.; BORGES, R. L. B.; SOUZA, B. A.; BRANDÃO, H. N.; SANTOS, F. A. R. A study of pollen from light honeys produced in Piauí State, Brazil. *Palynology*, Dallas, v.39, n.1, p.110-124, 2015.
- Kaur, S.; Gupta, A. K.; Kaur, N. Effect of GA₃, kinetin and indole acetic acid on carbohydrate metabolism in chickpea seedlings germinating under water stress. **Plant Growth Regulation**, v. 30, p.61-70, 2000.
- KAUR, S.; GUPTA, A. K.; KAUR, N. Gibberellic acid and kinetin partially reverse the effect of water stress on germination and seedling growth in chickpea. **Plant Growth Regulation**, v. 25, p. 29-33, 1998.
- KOTTING, O.; KOSSMANN, J.; ZEEMAN, S.C.; LLOYD, J. R. Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? **Plant Biology**, v.13, p.321-329, 2010.

- LARCHER, W. Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups. 3ed. New York: Springer Verlag, 1995. 69 p. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RiMa, 2006. 42 p.
- LAVANIA, D.; DHINGRA, A.; SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; GROVER, A. Current status of the production of high temperature tolerant transgenic crops for cultivation in warmer climates. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.86, p.100-108, 2015.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Volume 2. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 368p.
- LOTfIA, N.; SOLEIMANIA,A.; VAHDATIB, K.; ÇAKMAKÇIC, R. Comprehensive biochemical insights into the seed germination of walnut under drought stress. **Scientia Horticulturae**, v.250, p.329-34, 2019.
- MAGUIRE, A.J.; KOBE, R. K. Drought and shade deplete nonstructural carbohydrate reserves in seedlings of five temperate tree species. **Ecology and Evolution**, v.23, p.5711-5721, 2015.
- MAIA, J. M. Restrição de crescimento induzida por estresse salino como uma estratégia de defesa oxidativa em raízes de feijão-caupi.2008, 159f., Doutorado (Doutorado em Bioquímica Vegetal) –Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L. ; VOIGT, E. L. ; MACÊDO, C. E. C. ; PONTE, L. F. A. ; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasílica** (Impresso), v. 26, p. 342-349, 2012.
- MANAVALAN, L. P.; NGUYEN, H. T. Drought Tolerance in Crops: Physiology to Genomics. In: *Plant Stress Physiology*, Ch. 1, p. 1-23, 2e (ed. S. Shabala), 2017.
- MARKESTEIJN, L.; POORTER L. Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. **Journal of Ecology**, v. 97, p. 311–325, 2009.
- MAYWORM, M. A. S.; NASCIMENTO, A. S.; SALATINO, A. Seeds of species from the Caatinga: proteins, oils and fatty acid contents. **Revta. brasil. Bot.**, v. 21, n. 3, p., 1998 .
- MCCREADY, R. M.; GUGGOLZ, A.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, p. 1156-1158, 1950.

MCDOWELL, N.; POCKMAN, W. T.; ALLEN, C. D.; BRESHEARS, D. D.; COBB, N.; KOLB, T.; PLAUT, J.; SPERRY, J. WEST, A.; WILLIAMS, D. G.; YEPEZ, E. A.. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. **New Phytologist**, v. 178, p.719-739, 2008.

MELLO, J.I.O.; BARBEDO, C.J.; SALATINO, A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.889-899, 2010.

MERINO-MARTIN, L; COURTAULD, C.; COMMANDER, L.; TURNER, S.; LEWANDROWSKI, W.; STEVENS, J. Interactions between seed functional traits and burial depth regulate germination and seedling emergence under water stress in species from semi-arid environments. **Journal of Arid Environments**, v.147, p.25-33, 2017.

Morris, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. **Science**, v. 107, p. 111-114, 1948.

MOTA, C. S.; CANO, M. A. O. Matter accumulation and photosynthetic responses of macaw palm to cyclical drought. **Rev. Caatinga**, v.29, p. 850-858, 2016.

Munns, R. Genes and Salt Tolerance: Bringing Them Together. **New Phytologist**, v. 167, p. 645–663, 2005.

NEGRÃO S., SCHMOKEL S.M., TESTER M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. **Annals of Botany**, v. 119,1 –11, 2017.

O'BRIEN, M. J.; LEUZINGER, S.; PHILIPSON, C. D.; TAY,J.; HECTOR A. Drought survival of tropical tree seedlings enhanced by non-structural carbohydrate levels. **Nature clima change**, v. 2281, p. 1-5, 2014.

PINHEIRO, F.M., NAIR, P.K.R. Silvopasture in the Caatinga biome of Brazil: A review of its ecology, management, and development opportunities. **Forest Systems**, v. 27, p. 16 , 2018.

PIPER, F. I.; FARJADO, A. Carbon dynamics of *Acer pseudoplatanus* seedlings under drought and complete darkness. **Tree Physiology**, v. 36, p.1400-1408, 2016.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- REIS, R. C. R.; DANTAS, B. F.; P. C. R. Mobilization of reserves and germination of seeds of *Erythrina velutina* Wild. (Leguminosae- Papilionoideae) under different osmotic potentials. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 580-588, 2012.
- RIBEIRO, P. R.; WILLEMS, L. A. J.; MUTIMAWURUGO, M. C.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. M. Metabolite profiling of *Ricinus communis* germination at diferente temperatures provides new insights into termo-mediated requirements for successful seedling establishment. **Plant Science**, v.239, p.180-191, 2015.
- RUELLAND, E.; ZACHOWSKI, A. How plants sense temperature. **Environmental and Experimental Botany**, v.69, p. 225-232, 2010.
- SANTOS, M. G.; OLIVEIRA, M. T.; FIGUEIREDO, K. V.; FALCÃO, H. M.; ARRUDA, C. P.; CORTEZ-ALMEIDA, J.; SAMPAIO, E. V. S. ; OMETTO, J.; P. H. B.; MENEZES, R. S. C.; OLIVEIRA, A. F. M.; POMPELLI, M. F.; ANTONINO, A. C. D. CAATINGA. The Brazilian dry tropical forest: can it tolerate climate changes? **Exp. Plant Physiol**, v. 26, p.83-99, 2014.
- SERSHEN, A.; PERUMAL, VARGHESE, B.; GOVENDER, P.; RAMDHANI, S.; BERJAK, P. Effects of elevated temperatures on germination and subsequeunte seedling vigour in recalcitrante *Trichilia emética* seeds. **South African Journal of Botany**, v.90, p.153-162, 2014.
- SHEYKHBAGLOU, R.; RAHIMZADEH, S.; ANSARI, O.; SEDGHI, M. The effect of salicylic acid and gibberellin on seed reserve utilization, germination and enzyme activity of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) seeds under drought stress. **Journal of stress Physiology & Biochemistry**, v. 10, p.5-13, 2014.
- SHINOZAKI, K., UEMURA, M., BAILEY-SERRES, J., BRAY, E. A. & WERETILNYK, E. In **Biochemistry and Molecular Biology of Plants** (eds Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L.) Ch. 22, p.1051–1100 (Wiley, Chichester, 2015).
- SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.69, p. 279-285, 2010.

- SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; SUYANNE, A. V.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Coordinate changes in photosynthesis, sugar accumulation and antioxidative enzymes improve the performance of *Jatropha curcas* plants under drought stress. **Biomass e Bioenergy**, v. 45, p.270-279, 2012.
- SILVA, H. A.; OLIVEIRA, D. F. A. AVELINO, A. P. ; MACÊDO, C. E. C.; BARROS-GALVÃO, T.; VOIGT E. L. Salt stress differentially regulates mobilisation of carbon and nitrogen reserves during seedling establishment of *Pityrocarpa moniliformis*. **Plant Biology**, 2019.
- SILVA-CORREIA, J.; FREITAS, S.; TAVARES R. M.; LINO-NETO, T.; AZEVEDO, H. Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling development. **Plant Methods**, v. 10:7, p. 1-11.
- SIMOVA-STOILOVA, L. P.; LÓPEZ-HIDALGO, C.; SANCHEZ-LUCASA, R.; VALERO-GALVANA, J.; ROMERO-RODRÍGUEZA, C.; JORRIN-NOVOA, J. V. Holm oak proteomic response to water limitation at seedling establishment stage reveals specific changes in different plant parts as well as interaction between roots and cotyledons. **Plant Science**, v. 276, p.1-13, 2018.
- SKIDER, S.; HASAN, M. A.; HOSSAIN, M. S. Germination characteristics and mobilization of seed reserves in Maize varieties as influenced by temperature regimes. **Journal of Agriculture & Rural Development**, v.7, p.51-56, 2009.
- SORIANO D., HUANTE P., BUEN A.G., OROZCO-SEGOVIA A. Seed reserve translocation and early seedling growth of eight tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. **Plant Ecology**, v. 214, p. 3161–3175, 2013.
- STITT, M., ZEEMAN, S. C. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. **Plant Biology**, v. 15, p.281-291, 2012.
- TAN-WILSON, A.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, v. 145, P. 140-153, 2012.
- TESFAY, S. Z.; MODI, A. T.; MOHAMMED, F. The effect of temperature in moringa seed phytochemical compounds and carbohydrate mobilization. **South African Journal of Botany**, v.102, p. 190-196, 2016.
- THALMANN, M., SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, p.943-951, 2017.
- TODAKA, D.; MATSUSHIMA, H.; MOROHASHI, Y. Water stress enhances β -amylase activity in cucumber cotyledons. **Journal of Experimental Botany**. v.51, p.739-745, 2000.

- TONINI PP, PURGATTO E, BUCKERIDGE MS. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). **Ann Bot** 106:607–616, 2010.
- TOOSI, A. F.; BAKAR, B. B.; AZIZI, M. Effect of drought stress by using peg 6000 on germination and early seedling growth of *brassica juncea* var. *ensabi*. **Series A. Agronomy**, v. LVII, p.60-6, 2014.
- TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Medicinal plants from brazilian caatinga: antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Caatinga*, Mossoró, v.27, n.3, p.264-271, 2014.
- VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v.22, p.280-283, 1968.
- VOIGT, E. L.; ALMEIDA, T. D.; CHAGAS, R. M.; PONTES L. F.; VIEGAS R. A.; SILVEIRA J. A. G. Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 80-89, 2009.
- WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M. E FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199–223. 2007.
- WISE, R.R., OLSON, A.J., SCHRADER, S.M. E SHARKEY, T.D. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. **Plant Cell Environ**, v. 27, p. 717–724. 2004.
- World Wilde Foundation. Living planet report 2012: biodiversity, biocapacity and better choice. Gland, 2002. 164 p.
- World Wilde Foundation. Living planet report 2018: Aiming higher. Gland, 2018. 27p.
- WU, F.; BAO, W.; LI, F.; WU, N. Effects of drought stress and N supply on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Sophora davidii* seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 248-255, 2008.
- YAGMUR, M.; KAYDAN, D. Alleviation of osmotic stress of water and salt in germination and seedling growth of triticale with seed priming treatments. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.2156-2162, 2008.

YEMM E.W., COCKING E.F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, 80, 209–213, 1955.

YU, S.M; LO, S.F; HO, T. H.D. Source-Sink Communication: Regulated by hormone, Nutrient, and Stress Cross-Signaling. **Trends in Plant Science**, v.20, p. 844-856, 2015.

ZEEMAN, S. C. in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L.) Ch. 13, p.950–998 (Wiley, Chichester, 2015).

ZEID, I. M.; SHEDEED, Z. A. Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. **BIOLOGIA PLANTARUM**, v. 50, p. 635-640, 2006.

ZHANG, J.; JIANG, F.; YANG, P.; LI, J.; YAN, G.; HU, L. Responses of canola (*Brassica napus* L.) cultivars under contrasting temperature regimes during early seedling growth stage as revealed by multiple physiological criteria. **Acta Physiol Plant**, v. 37:7, p.1-10, 2015.