



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Os efeitos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos causados pelo alagamento de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* Lam. oriundas da Amazônia e do Cerrado**

Isadora Matos Ribeiro

Brasília - DF

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA - PPGBOT

ISADORA MATOS RIBEIRO

**Os efeitos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos causados pelo alagamento de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* Lam. oriundas da Amazônia e do Cerrado**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Botânica pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica - PPGBOT da Universidade de Brasília.

**Orientador:** Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Brasília - DF

2018

ISADORA MATOS RIBEIRO

**Os efeitos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos causados pelo alagamento de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* Lam. oriundas da Amazônia e do Cerrado**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Botânica, e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília.

**Aprovada em 22 de junho de 2018.**

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams (Orientador)

---

Profa. Dra. Cristiane da Silva Ferreira (Membro Titular Interno)

---

Dra. Aline Lopes (Membro Titular Externo)

---

Dr. Marcelo Claro de Souza (Suplente)

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Isadora Matos

Os efeitos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos causados pelo alagamento de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* Lam. oriundas da Amazônia e do Cerrado / por Isadora Matos Ribeiro, 2018

95 f.; il.

Orientador: Thomas Christopher Rhys Williams

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 2018

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

RIBEIRO, I. R. **Os efeitos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos causados pelo alagamento de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* Lam. oriundas da Amazônia e do Cerrado.** 2018. 95 f., il. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DA AUTORA: Isadora Matos Ribeiro

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Os efeitos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos causados pelo alagamento de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* Lam. oriundas da Amazônia e do Cerrado.

GRAU: Mestre

ANO: 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito da autora. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

---

E-mail: *isaribeiro.bio@gmail.com*

*A todas as mulheres que lutaram  
para que, hoje, mulheres como eu  
pudessem concluir um mestrado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Franzé e Katarina, que fomentaram em mim o desejo de aprender sempre mais desde a minha tenra infância, que me apoiam em todos os meus projetos e me oferecem todo o amor do mundo. À minha mãe especialmente, pois cuidou da minha filha com o maior carinho do mundo para que eu pudesse terminar a escrita desta dissertação.

Agradeço também a minha irmã, Carol, minha parceira de investigações e aprendizados desde os meus três anos de idade. Apesar da carinha de 12 anos, é fera nas técnicas laboratoriais e me tirou várias dúvidas ao longo desses anos de trabalho intenso.

Sou grata ao meu esposo, Gian, meu amor e parceiro para todas as horas. Por estar comigo comemorando todas as minhas vitórias e me apoiando nas derrotas. Por cuidar de mim durante momentos sombrios e tirar da minha cabeça a possibilidade de desistir. Por cuidar da nossa filha com amor e carinho para que eu pudesse trabalhar, inclusive por caminhar pela UnB inteira com ela para que eu pudesse ter minhas reuniões com o Tom. Por ser o super editor e diagramador deste manuscrito, que só está tão organizado assim por causa dele.

Sou grata também à minha filha, Luna Clara, a maior surpresa que recebi durante o mestrado, por me acompanhar no trabalho durante nove meses sem me dar quase nenhum mal-estar. Por ser uma bebê boazinha demais, dormir à noite e deixar a mamãe trabalhar bem mesmo durante o dia.

Agradeço ao Prof. Thomas, por ser um orientador tão dedicado, competente e compreensivo. Agradeço por estar sempre disposto a ensinar seus alunos, a nos fazer crescer e nos tornar pessoas melhores. Acima de tudo, agradeço por nos tratar com a simplicidade e a naturalidade de um amigo. Serei eternamente grata ao meu orientador, que, junto com a Prof.<sup>a</sup> Christina, me ofereceu apoio durante momentos difíceis que enfrentei durante o mestrado; eles me mantiveram confiante de que eu seria capaz de terminar este trabalho com êxito.

Sou grata à Prof.<sup>a</sup> Christina, por se disponibilizar a dar continuidade ao meu trabalho, deixando-o ainda mais completo. Juntamente com as alunas Mylene, Letícia e Bárbara, a Prof.<sup>a</sup> Christina está trabalhando na parte enzimática que complementarás perfeitamente todas as análises já apresentadas nesta dissertação.

Agradeço o suporte dos professores do Departamento de Botânica da UnB: Em especial, à Prof.<sup>a</sup> Sarah, pelo apoio e amizade desde que nos conhecemos, quando eu ainda era sua aluna de graduação. À Prof.<sup>a</sup> Cristiane, pelo apoio e orientação durante muitas etapas do meu trabalho,

ao Prof. Eduardo, por me ajudar com a estatística, e ao Prof. Augusto, por ser coordenador do projeto de pesquisa financiado pela FAP-DF no qual meu mestrado está inserido, obrigada.

Agradeço a doce convivência com todos do laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal. Sou grata especialmente ao Guilherme, por ter me acompanhado nos experimentos e em partes imprescindíveis do trabalho laboratorial, me substituindo em análises perigosas para gestantes. À Marina, que, mesmo depois de partir para o Mato Grosso, sempre esteve disponível para me socorrer com o IRGA, para me presentear com sua amizade e até para ficar grávida junto comigo! Ao Thiago, meu amigo desde o primeiro dia, sempre disponível para tirar minhas dúvidas, ouvir minhas reclamações e falar que eu estava indo embora cedo demais (“Mas já?”). Às meninas do laboratório: Karen, Carol, Laísa e Hérica, por aliviarem meus dias com ótimas risadas. Ao William, que desmontou o IRGA para ver se conseguia consertá-lo antes do fim do meu experimento – e conseguiu! Ao Fábio, por resolver os pepinos do departamento.

Agradeço também à FAP-DF, por financiar o projeto de pesquisa que deu origem à temática do meu mestrado e a minha participação no Congresso Nacional de Botânica – que ocorreu no Rio de Janeiro –, e à CAPES, por financiar as bolsas que recebi durante o tempo integral de pós-graduação.

Sem vocês, eu poderia até ter conseguido chegar ao fim de um mestrado, mas certamente teria sido muito mais difícil. Sou sinceramente grata a todos os envolvidos.

## RESUMO

O alagamento é um importante fator estressor que prejudica o desenvolvimento e a sobrevivência de muitas espécies de plantas. Entretanto, algumas espécies conseguem tolerar longos períodos de exposição a esse estressor, mostrando-se interessantes modelos de estudo. O Painel Intergovernamental de Mudança Climática (IPCC) alertou que as mudanças climáticas intensificarão a frequência de fortes precipitações e a atividade de ciclones tropicais. Isso propiciará um aumento da frequência de eventos de inundação, o que fará com que as plantas sejam mais comumente expostas ao estresse de alagamento. Nota-se, deste modo, a urgência no estudo da tolerância a esse estresse abiótico. O alagamento provoca a baixa oferta de oxigênio para as plantas e, para lidar com essa situação, o indivíduo precisa ajustar seu metabolismo, fisiologia e morfologia. Neste trabalho, objetivou-se avaliar respostas morfológicas, fisiológicas e metabólicas de *Guazuma ulmifolia* exposta ao alagamento parcial por 32 dias, seguida por 17 dias de recuperação pós-estresse. Além disso, objetivou-se comparar essas respostas em plantas provenientes de duas populações: a população amazônica, usualmente exposta a estresse de alagamento, e a população do Cerrado, adaptada ao ambiente seco. Para isso, utilizou-se 160 plantas jovens de *G. ulmifolia* organizadas em quatro tratamentos; Controle Amazônia (CoA), Alagado Amazônia (AIA), Controle Cerrado (CoC) e Alagado Cerrado (AIC). AIA e AIC foram submetidos a alagamento parcial e recuperação, enquanto CoA e CoC foram mantidos com regas diárias. Os parâmetros morfológicos mensurados foram o incremento da parte aérea, fração de massa radicular, número de folhas, diâmetro do caule e o aparecimento de lenticelas e raízes adventícias. Os dados fisiológicos avaliados foram fotossíntese máxima ( $A_{max}$ ), condutância estomática ( $G_s$ ), transpiração ( $E$ ), carbono interno ( $C_i$ ) e alocação de carbono e nitrogênio. Já os parâmetros metabólicos observados foram a porcentagem de amido e o perfil metabólico das raízes e folhas. Observou-se que as plantas do grupo AIA apresentaram maior  $A_{max}$  em relação a CoA do 7º até o 35º dia de experimento e as do grupo AIC exibiram maior  $A_{max}$  do 14º dia até o 35º em relação a CoC. Até o 7º dia de alagamento, os indivíduos AIA apresentaram maior  $A_{max}$  que os AIC. Indivíduos do grupo AIA apresentaram maior  $G_s$  que CoA do 7º ao 21º dia de alagamento. Já as plantas AIC mostraram menor  $G_s$  às 24h e 48h de alagamento em comparação com CoC, mas apresentaram maior  $G_s$  no 21º dia. Portanto, sob alagamento parcial, *G. ulmifolia* parece fazer mais fotossíntese para manter o metabolismo anaeróbico radicular. A avaliação do metabolismo mostra aumento de alanina, GABA, succinato e citrato em plantas alagadas.



No 7º dia de alagamento AIC apresentou aumento em glicina, serina, treonina, cisteína e prolina, indicando ajuste metabólico frente ao estresse. O perfil metabólico foliar apresentou muito menos diferenças que o perfil radicular, sugerindo que as alterações metabólicas ficam restritas à raiz, que é diretamente afetada pelo alagamento parcial. A partir dos dados fisiológicos e bioquímicos, sugere-se que as respostas ao alagamento desenvolvidas pelas plantas amazônicas são iniciadas precocemente e com maior intensidade em relação às do Cerrado, o que indica uma capacidade de aclimação ao alagamento mais eficiente da população amazônica, ainda que as plantas de ambas as populações tenham mostrado alto grau de tolerância a esse estresse.

**Palavras-chave:** alagamento, fisiologia, bioquímica, perfil metabólico

## ABSTRACT

Flooding is an important stressor that impairs the development and survival of many plant species. However, some species can tolerate long periods of exposure to this stress and hence represent interesting models for study. The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) has warned that climate change will intensify the frequency of heavy rainfall and tropical cyclone activity. This will increase the frequency of flooding events and also the exposure of plants to flooding stress. Flooding causes a reduced supply of oxygen to plants, forcing them to adjust their metabolism, physiology and morphology in order to cope with this situation. The aim of this study was to evaluate the morphological, physiological and metabolic responses of *Guazuma ulmifolia* exposed to waterlogging for 32 days, followed by 17 days of recovery from stress. In addition, it we aimed to compare these responses in plants from two populations: the Amazon population, frequently exposed to flooding stress, and the Cerrado population, adapted to the dry environment. For this purpose, 160 young plants of *G. ulmifolia* were organized in four groups: Amazonian Control (CoA), Amazonian Flooded (AIA), Cerrado Control (CoC) and Cerrado Flooded (AIC). AIA and AIC were submitted to partial flooding and recovery, while CoA and CoC were maintained with daily watering. The morphological parameters assessed were shoot relative growth, root percentage, leaf number, stem diameter and emrgence of lenticels and adventitious roots. The physiological data evaluated were maximum photosynthesis ( $A_{max}$ ), stomatal conductance ( $G_s$ ), transpiration ( $E$ ), internal carbon ( $C_i$ ) and carbon and nitrogen allocation. The metabolic parameters observed were the leaf and root starch percentage and their metabolic profile. We observed that the plants of the AIA group presented higher  $A_{max}$  in relation to CoA from the 7th to the 35th day of experiment. Those of the AIC group showed higher  $A_{max}$  from the 14th day to the 35th in relation to CoC. Up until the 7th day of flooding, the AIA individuals presented a higher  $A_{max}$  than the AIC. Plants from the AIA group presented higher  $G_s$  than CoA from the 7th to the 21st day of flooding. AIC plants showed lower  $G_s$  at 24h and 48h of flooding compared to CoC, but showed higher  $G_s$  at day 21. Therefore, under partial flooding, *G. ulmifolia* seems to carry out more photosynthesis in order to maintain root anaerobic metabolism. The root metabolic profiling showed an increase of alanine, GABA, succinate and citrate in flooded plants. On the 7th day of waterlogging, AIC showed an increase in glycine, serine, threonine, cysteine and proline, indicating metabolic adjustment against stress. The leaf metabolic profile presented fewer alterations than the root profile, suggesting that the metabolic changes are restricted to the root, the part directly affected

by waterlogging. Based on the physiological and biochemical data, it is suggested that the Amazonian plants initiated flooding responses earlier and with greater intensity in relation to the Cerrado plants. This indicates that the Amazonian population presents a more efficient capacity to acclimatize to waterlogging stress, although plants of both populations revealed great capacity to tolerate this stress.

**Keywords:** waterlogging, physiology, biochemistry, metabolic profiling

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema não randomizado do experimento de alagamento com plantas jovens de *Guazuma ulmifolia*. Retângulos brancos representam grupo controle e os cinzas o grupo tratamento (alagado). Os círculos (C) representam indivíduos do Cerrado e os círculos (A) representam indivíduos da Amazônia. Os retângulos pretos simulam o funcionamento de um dia de coleta de material biológico. ----- 37
- Figura 2.** Organização do experimento de alagamento parcial de *Guazuma ulmifolia* na Estação Experimental da Biologia, Brasília - DF. ----- 38
- Figura 3.** Organização das plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* nas caixas para serem alagadas parcialmente. São três plantas provenientes da Amazônia e mais três plantas do Cerrado, totalizando seis plantas por caixa. ----- 39
- Figura 4.** Equação que demonstra a inferência de massa seca do órgão (raiz, caule e folhas), a partir de uma parte da amostra que foi efetivamente seca, onde  $MS_{(órgão)}$  é a massa seca do órgão observado,  $MS_{(parte\ seca)}$  é massa seca da parte separada para secagem,  $MF_{(órgão)}$  é a massa fresca medida com o órgão completo e  $MF_{(parte\ seca)}$  é a massa fresca da parte separada para secagem. ----- 40
- Figura 5.** Fotossíntese em diferentes densidades de fótons de fluxo fotossintético (PPDF) em *Guazuma ulmifolia*. As médias equivalem a 3 repetições provenientes de cada bioma  $\pm$  o desvio padrão. Como o valor máximo de fotossíntese foi aferido na intensidade luminosa de  $2000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , essa intensidade foi utilizada nas medições durante o experimento de alagamento. ----- 42
- Figura 6.** Incremento da parte aérea de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 49
- Figura 7.** Fração de massa radicular por massa seca de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos

marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 50

**Figura 8.** Fotossíntese máxima ( $A_{max}$ ) de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 52

**Figura 9.** Condutância estomática média de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 53

**Figura 10.** Transpiração média de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,06$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 54

**Figura 11.** Concentração de carbono intercelular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 55

**Figura 12.** Porcentagem de amido radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Não houve diferença significativa entre os grupos tratamento e controle. Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 57

**Figura 13.** Porcentagem de amido foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado

Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,065$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 57

**Figura 14.** Porcentagem de Carbono (C) por massa seca foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 59

**Figura 15.** Porcentagem de Carbono (C) por massa seca radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 59

**Figura 16.** Porcentagem de Nitrogênio (N) por massa seca foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 61

**Figura 17.** Porcentagem de Nitrogênio (N) por massa seca radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey. ----- 61

**Figura 18.** Perfil metabólico radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. A barra verde escura representa o grupo alagado Amazônia (AIA), a verde clara o grupo controle Amazônia (CoA), a vermelho escura o grupo alagado Cerrado (AIC) e a rosa o grupo controle Cerrado (CoC). Todos os gráficos representam os índices dos grupos AIA, AIC e CoA em relação ao CoC, exceto os gráficos

D, F, H, I e L, que foram calculados em relação ao grupo AIA. Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  erro padrão. As comparações marcadas com letras minúsculas se referem a diferenças entre os grupos dentro de cada tempo. Os gráficos que não possuem indicação de diferenças significativas, não apresentaram nenhuma diferença. ----- **64, 65, 66**

**Figura 19.** Perfil metabólico foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. A barra verde escura representa o grupo alagado Amazônia (AIA), a verde clara o grupo controle Amazônia (CoA), a vermelho escura o grupo alagado Cerrado (AIC) e a rosa o grupo controle Cerrado (CoC). Todos os gráficos representam os índices dos grupos AIA, AIC e CoA em relação ao CoC, exceto os gráficos D, F, H, I e L, que foram calculados em relação ao grupo AIA. Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  erro padrão. As comparações marcadas com letras minúsculas se referem a diferenças entre os grupos dentro de cada tempo. Os gráficos que não possuem indicação de diferenças significativas, não apresentaram nenhuma diferença. ----- **69, 70, 71**

**Figura 20.** Representação das duas possíveis rotas de produção de alanina em plantas submetidas a alagamento. A via azul (GABA transaminase + GABA shunt) interliga três compostos normalmente alterados em plantas alagadas: GABA, alanina e succinato. Já a via vermelha (Alanina aminotransferase), interliga somente dois dos metabólitos normalmente alterados em plantas alagadas (alanina e succinato), mas parece ser a via mais utilizada em *Guazuma ulmifolia*. ----- **80**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Delineamento para o experimento de alagamento com *Guazuma ulmifolia*, com duração de 49 dias, realizado na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília. (CoA) Controle Amazônia, (AlA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AlC) Alagado Cerrado. ----- **38**
- Tabela 2.** Cronograma de atividades realizadas durante o experimento de alagamento parcial de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* Lam. (✓) Parâmetro analisado na coleta, (x) parâmetro não analisado na coleta, (-) material biológico não coletado. ----- **40**
- Tabela 3.** Parâmetros utilizados no método de análise (SIM) do perfil metabólico foliar e radicular de *Guazuma ulmifolia* exposta a alagamento parcial. ----- **45**
- Tabela 4.** *P-values* para os valores de incremento da parte aérea de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AlA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AlC) Alagado Cerrado. ----- **48**
- Tabela 5.** *P-values* para os valores de fração de massa radicular por massa seca de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AlA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AlC) Alagado Cerrado. ----- **49**
- Tabela 6.** Valores médios para número de folhas e diâmetro caulinar relativos aos valores observados em t=0 de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. (CoA) Controle Amazônia, (AlA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AlC) Alagado Cerrado. ----- **51**
- Tabela 7.** *P-values* para os valores de fotossíntese máxima ( $A_{max}$ ) de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AlA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AlC) Alagado Cerrado. ----- **52**
- Tabela 8.** *P-values* para os valores de condutância estomática de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA



seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado. ----- 53

**Tabela 9.** *P-values* para os valores de transpiração de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.06 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado. ----- 54

**Tabela 10.** *P-values* para os valores de carbono interno de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado. ----- 56

**Tabela 11.** *P-values* para os valores de amido foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado. ----- 58

**Tabela 12.** *P-values* para os valores de porcentagem de carbono (C) foliar e radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado. ----- 60

**Tabela 13.** *P-values* para os valores de porcentagem de nitrogênio (N) foliar e radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado. ----- 62

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. FISILOGIA DO ESTRESSE	22
2.2. ESTRESSE POR ALAGAMENTO	24
2.3. CERRADO	29
2.4. AMAZÔNIA	30
2.5. <i>Guazuma ulmifolia</i>	31
2.5.1. DISTRIBUIÇÃO	31
2.5.2. MORFOLOGIA	32
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1. OBJETIVO GERAL	34
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. HIPÓTESES	35
6. MATERIAL E MÉTODOS	36
6.1. MATERIAL VEGETAL	36
6.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	36
6.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
6.4. CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS EM RESPOSTA AO ESTRESSE	40
6.4.1. BIOMASSA	40
6.4.2. MORFOLOGIA E CRESCIMENTO	41
6.4.3. FOTOSSÍNTESE, CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA, TRANSPIRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CO <sub>2</sub> INTERCELULAR	41
6.5. CARACTERIZAÇÃO DO METABOLISMO EM RESPOSTA AO ESTRESSE	42
6.5.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMIDO	42
6.5.2. PERFIL METABÓLICO	43
6.5.3. ALOCAÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO	46
7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
8. RESULTADOS	48
8.1. PARÂMETROS MORFOLÓGICOS	48

8.2. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS -----	51
8.3. AMIDO -----	56
8.4. ALOCAÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO -----	58
8.5. PERFIL METABÓLICO RADICULAR -----	62
8.6. PERFIL METABÓLICO FOLIAR -----	67
9. DISCUSSÃO -----	72
9.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS -----	72
9.2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS -----	74
9.3. ASPECTOS METABÓLICOS -----	77
9.3.1. AMIDO FOLIAR E RADICULAR -----	77
9.3.2. PERFIL METABÓLICO FOLIAR E RADICULAR -----	79
10. CONCLUSÃO -----	85
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	87

## 1. INTRODUÇÃO

Independentemente do local onde ocorram, as plantas estão sujeitas a uma enorme variedade de estresses que enfraquecem suas chances de sobrevivência e desenvolvimento. Situações estressoras promovem respostas em todos os níveis do organismo e quanto mais o estresse perdurar, mais a planta perderá vigor (Larcher, 2003).

O estresse causado por alagamento é relevante, pois estima-se que aproximadamente 6% da superfície terrestre do planeta seja propensa ao alagamento. Essas áreas incluem planícies alagáveis, pântanos, charcos e turfeiras; com águas doce, salobra ou salgada. Já que esses ambientes podem ser encontrados por todo o mundo e em diferentes altitudes, os regimes de alagamento apresentam grandes variações e interagem com os regimes de luz e temperatura, assim como tipos de sedimento (Armstrong *et al.*, 1994).

O Painel Intergovernamental de Mudança Climática (IPCC) alertou que as mudanças climáticas causadas pela ação antrópica intensificarão a frequência de fortes precipitações e a atividade de ciclones tropicais (Arnell & Liu, 2001). Isso propiciará um aumento da frequência de eventos de inundação no sudeste da Ásia, sul da Índia, leste da África, Sibéria e norte da América do Sul ainda neste século (IPCC, 2012) Além de afetar ecossistemas destas regiões, tal fato poderá causar grandes danos à produtividade de áreas agrícolas, pois a maioria das culturas não é capaz de tolerar alagamento (Voisenek & Bailey-Serres, 2015). Segundo o IBGE (2017), o excesso de chuvas na região Sul do Brasil foi um dos motivadores da redução na safra de feijão e trigo em 2017. Ademais, de acordo com o Relatório Geral de Acompanhamento da Safra Brasileira – Rio Grande do Sul (2017), produzido pela Conab, além do trigo, as plantações de canola também foram bastante afetadas pelas chuvas intensas, exigindo ressemeadura em muitas áreas.

Para as plantas, a primeira restrição imposta pelo alagamento é a dificuldade de trocas gasosas (Armstrong *et al.*, 1994). A taxa de difusão dos gases é menor na água que no ar, por isso, a concentração do oxigênio é muito maior em estado gasoso que no estado dissolvido (Armstrong *et al.*, 1994). Torna-se necessário, portanto, lidar com a dificuldade central gerada pelo baixo aporte de oxigênio: o requerimento de O<sub>2</sub> como acceptor final de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial (Kennedy *et al.*, 1992).

Quando a planta é submetida à hipóxia, a respiração se torna anaeróbica. Com a deficiência de oxigênio e consequente desorganização da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, é possível notar alterações relativas a três importantes enzimas do

metabolismo anaeróbico de plantas: piruvato descarboxilase (PDC), lactato desidrogenase (LDH) e desidrogenase alcoólica (ADH). Devido ao aumento da atividade dessas enzimas, lactato e etanol se acumulam (Kennedy *et al.*, 1992; Larcher, 2003).

Para sobreviver ao estresse causado pela redução na concentração de oxigênio, além das alterações relativas à respiração, as plantas alagadas também apresentam mudanças na produção de hormônios, sendo ácido abscísico e etileno amplamente produzidos. A presença desses hormônios gera mudanças fisiológicas e morfológicas, como o fechamento parcial dos estômatos, epinastia, abscisão foliar e formação de aerênquima (Larcher, 2003).

Atributos das espécies não são homogêneos nem no espaço e nem no tempo. Muitas espécies exibem caracteres diferenciados entre populações, respondendo a gradientes ambientais (Moran *et al.*, 2015). A variação de caracteres dentro de uma mesma espécie pode ser consequência de diferenças herdáveis entre indivíduos ou de plasticidade fenotípica (Moran *et al.*, 2015). A plasticidade fenotípica possibilita um ajuste rápido de atributos fenotípicos, o que pode proteger a população de mudanças ambientais abruptas e pode diminuir o custo para dispersão da espécie (Moran *et al.*, 2015). Um exemplo de espécie que pode apresentar plasticidade fenotípica é a *Guazuma ulmifolia* que coloniza diversos ambientes e é capaz de suportar diferentes estresses.

*Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) foi a espécie utilizada como modelo para este trabalho. É comumente conhecida como mutamba e é amplamente distribuída pela América tropical. No Brasil, pode ser encontrada em pelo menos 19 unidades da federação, colonizando Mata Atlântica, Amazônia, Cerrado, Caatinga e Pantanal (Carvalho, 2007). Tais biomas diferem de forma drástica quanto a diversos fatores bióticos e abióticos, e a capacidade de *G. ulmifolia* de colonizá-los sugere uma potencial plasticidade fenotípica nessa espécie.

Como citado anteriormente, um dos biomas colonizados por *G. ulmifolia* é o Cerrado, que apresenta duas estações bem definidas: o verão chuvoso e o inverno seco, com média anual de precipitação de 1500 mm (Ribeiro & Walter, 1998). Após a estação chuvosa, segue a estação seca, quando a umidade relativa é baixa, a evaporação é muito alta e a precipitação chega a zero (Joly *et al.*, 1999). Outro bioma colonizado por *G. ulmifolia* é a Amazônia, que apresenta altos níveis de precipitação. A sazonalidade das chuvas combinada com o baixo relevo da área provoca alagamento sazonal nos territórios vizinhos aos grandes rios amazônicos. (Wittmann *et al.*, 2010). O período de alagamento pode durar

até 210 dias contínuos, com mudanças de nível de água que chegam a 10 cm por dia (Junk, 1989).

A Amazônia é um ambiente bastante peculiar, pois as espécies que colonizam áreas alagadas desse ecossistema apresentam elevado grau de tolerância ao alagamento. Entretanto, estudos com foco nas respostas e adaptações ao alagamento em espécies arbóreas conduzidos até o momento fornecem apenas uma visão superficial sobre o assunto. Isso se dá, pois, das mais de 1000 espécies de árvores tolerantes a alagamento parcial e total que existem nas áreas alagadas da Amazônia, somente uma quantidade diminuta foi analisada (Parolin, 2009). Portanto, há uma necessidade do estudo de mais espécies ocorrentes em ambientes propensos ao alagamento, para que se revelem novos atributos adaptativos nos âmbitos fisiológico, bioquímico e molecular (Parolin, 2009). A Amazônia, portanto, proporciona excelente oportunidade de estudo sobre tolerância ao alagamento, já que exhibe condições extremas.

O presente trabalho visa analisar se há diferença na tolerância ao alagamento entre populações de *G. ulmifolia* provenientes da Amazônia e do Cerrado, com um enfoque morfológico, fisiológico e bioquímico. Objetivamos investigar se a população que coloniza o Cerrado é mais sensível ao alagamento parcial e de que forma essa população é mais afetada que a população amazonense. Tais estudos sobre tolerância a estresse são fundamentais para motivar uma melhor preparação para o panorama ambiental futuro, pois oferecem elementos que podem aprimorar ações de conservação.

Para Pedersen e colaboradores (2017), plantas oriundas de ambientes alagados podem servir de importante inspiração para biólogos que trabalham com melhoramento de cultivares que precisam ser mais tolerantes ao estresse causado por alagamento. Assim sendo, a observação dos pontos chave de ajuste metabólico diante de situações ambientais desfavoráveis, estudados no presente trabalho, pode subsidiar futuros estudos acerca de possíveis mudanças na expressão gênica sob condições de estresse, contribuindo indiretamente com estudos de melhoramento genético.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. FISIOLOGIA DO ESTRESSE

Plantas são organismos sésseis que desenvolveram uma extensa diversidade de respostas de defesa contra situações estressoras (Potters *et al.*, 2007). De acordo com Larcher (2003), as variadas condições adversas, não necessariamente prontamente letais, que ocorrem tanto esporadicamente quanto permanentemente numa localidade, podem ser consideradas situações de estresse.

Parâmetros como disponibilidade de água, temperatura, radiação solar e pH do solo, se desviados de suas condições ótimas para as plantas, impõem estresse abiótico. Além desses, poluição do ar, alta concentração de sais, presença de metais pesados no solo e pesticidas também figuram como estressores abióticos. Já os estresses bióticos contemplam a alelopatia, herbivoria e o ataque por patógenos (Gaspar *et al.*, 2002).

Dois tipos de resposta ao estresse podem ser observados em plantas: adaptação e aclimatação. Adaptação ocorre por meio de diversos mecanismos, ao longo de várias gerações e no nível genético das **populações**. Por outro lado, plantas possuem uma incrível capacidade de ajustar sua fisiologia e seus atributos morfológicos, em um curto espaço de tempo, sem modificações genóticas – isso é aclimatação. Aclimatação é uma resposta fenotípica a diferentes condições ambientais desenvolvida ao nível de **indivíduo**. Plasticidade fenotípica é um índice de quanta aclimatação é possível dentro de um único genótipo. Tanto adaptação quanto aclimatação ocorrem através de uma combinação de processos comportamentais, morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos, que dependem de processos moleculares (Gaspar *et al.*, 2002).

Exposição a estresse pode prejudicar processos celulares e moleculares. Entretanto, eventos estressores podem induzir tolerância através da promoção de respostas de aclimatação que estão conectadas a diversas respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que diminuem a exposição ao estresse, limitam o dano ou facilitam o reparo do maquinário danificado (Potters *et al.*, 2007).

A exposição das plantas a estresses bióticos e abióticos é custosa do ponto de vista fisiológico e provoca redução de produtividade. Estresses abióticos promovem um grande impacto no crescimento e, conseqüentemente, são responsáveis por perdas severas na produção agrícola. A redução no crescimento resultante desse processo pode ser maior que

50% para diversas espécies (Rejeb *et al.*, 2014), podendo, inclusive, gerar perdas totais de safra.

Um passo crucial para a defesa contra estresse é a sua rápida percepção, que possibilite a implementação de respostas eficientes. Depois do reconhecimento do estresse, os mecanismos basais de defesa das plantas ativam cascatas complexas de sinalização que variam de um estresse para outro. Após a exposição ao estressor, espécies reativas de oxigênio (ROS) se acumulam, assim como fitormônios como ácido abscísico (ABA), ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Tais fatos provocam reprogramação da maquinaria genética, que resulta no aumento da tolerância para que se minimizem os danos (Rejeb *et al.*, 2014).

Além do acúmulo de fitormônios e ROS, outros exemplos de respostas inespecíficas a estresse são: mudanças nas atividades das enzimas desintoxicantes (peroxidase, glutatona redutase, deidroascorbato redutase, etc.), acúmulo de antioxidantes (ácido ascórbico, tocoferol), biossíntese de proteínas do estresse, de poliaminas e compostos secundários (polifenóis e flavonoides) e aumento da respiração, diminuição da fotossíntese e senescência prematura (Larcher, 2003).

Quando se fala de estratégias usadas pelas plantas face ao estresse, existem os indivíduos que escapam do estresse, os que evitam o estresse, e os que de fato o toleram. Quanto ao estresse por alagamento, acredita-se que haja duas grandes estratégias de sobrevivência, que são: (1) a estratégia quiescente (LOQS), caracterizada pela restrição do metabolismo celular e do crescimento – a qual seria categorizada no grupo dos indivíduos que toleram o estresse; (2) a estratégia de escape (LOES), caracterizada pelo rápido alongamento caulinar ou foliar, de modo a manter o tecido fotossintético fora da água rasa. Ambas as estratégias são mediadas pela sinalização de etileno, que é essencial para promoção de respostas ao alagamento (Bailey-Serres *et al.*, 2012).

As respostas promovidas em face a uma situação estressora são parte do processo de evolução por seleção natural. Portanto, uma das maiores forças que moldam a estrutura e função das plantas é o estresse ambiental. A significância das respostas adaptativas ao estresse é corroborada pelas diversas similaridades em forma e função entre espécies não correlacionadas filogeneticamente, que são normalmente consequência de evolução convergente direcionada pelo ambiente (Gaspar *et al.*, 2002).



## 2.2. ESTRESSE POR ALAGAMENTO

Grandes áreas são temporariamente inundadas pelas cheias de grandes rios e até mesmo riachos e córregos que transbordam de seus leitos. Tundras, charcos, pântanos e outras depressões ficam alagadas, principalmente durante o degelo. Além disso, solos são constantemente compactados e impermeabilizados devido a construções humanas (Larcher, 2003), dificultando a percolação da água e favorecendo o alagamento.

Ao aumentar-se o conteúdo de água no solo, diminui-se a taxa de difusão da maioria dos gases. Num ambiente alagado, as trocas gasosas entre o solo e a atmosfera são aproximadamente  $10^4$  vezes mais lentas e, conseqüentemente, o suprimento de  $O_2$  é interrompido e os gases formados pelo metabolismo dos seres que vivem no solo se acumulam. Em poucas horas de alagamento, microrganismos e raízes utilizam a maior parte do  $O_2$  disponível, assegurando a formação de condições anaeróbicas. Após a depleção do  $O_2$  do solo, seres anaeróbicos facultativos e obrigatórios se proliferam, transformando o solo alagado em ambiente redutor com a presença de  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $NH_4^+$ , e  $S^{2-}$ . Além disso, o alagamento modifica a disponibilidade de nitrogênio no solo, já que em poucos dias a maior parte do nitrato do solo é perdida pelo processo de desnitrificação (Ponnamperuma, 1984). A redução das concentrações de nitrogênio nos tecidos vegetais se deve tanto à diminuição de nitrogênio disponível para as plantas no solo, quanto à redução da absorção de nitrato causada pela desorganização do metabolismo das raízes em anóxia (Koslowski & Pallardy, 1984).

Como consequência do alagamento, células e tecidos são expostos à variação interna de  $O_2$  e  $CO_2$  e à elevação no nível de etileno, de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio. A produção de ROS é induzida pela deficiência de  $O_2$ , como consequência da inibição do transporte de elétrons na mitocôndria (Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

Em situação de hipóxia o crescimento radicular é interrompido e partes mais novas da raiz morrem, enquanto partes mais velhas desenvolvem intumescências de cortiça e lenticelas (Larcher, 2003). Alterações comuns na anatomia de plantas submetidas ao alagamento incluem a formação de espaços interconectados preenchidos com ar (aerênquimas) nas raízes. Aerênquimas efetivos possibilitam que raízes sustentem fosforilação oxidativa e concentrações normais de ATP. A formação desses espaços depende de sinalização de etileno,  $Ca^{2+}$  e ROS (Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

Além de mudanças morfológicas e anatômicas, plantas alagadas mostram diferenças quanto a biossíntese de hormônios como ácido abscísico (ABA) e etileno. A produção desses hormônios é estimulada, favorecendo o fechamento parcial dos estômatos, epinastia e abscisão foliar (Larcher, 2003). O fechamento dos estômatos pode ser decorrente dos hormônios anteriormente citados bem como devido à seca fisiológica causada pela diminuição da condutividade hidráulica radicular no ambiente anóxico. (Kozlowski & Pallardy, 1984).

O fechamento dos estômatos gera decréscimo na taxa de transpiração, bem como diminuição da fotossíntese. O dano ao processo fotossintético deve-se também a redução da clorofila foliar, senescência foliar precoce, diminuição da atividade e abundância da RubisCO, redução da capacidade fotossintética das plantas estressadas e acúmulo de carboidratos solúveis nas folhas, causado pela diminuição da translocação de fotoassimilados das fontes para os diversos drenos (Kozlowski & Pallardy, 1984; Kreuzwiser & Rennenberg, 2014). A exposição ao alagamento reduz a eficiência quântica máxima do fotossistema II, o que pode implicar dano fotoquímico ou capacidade fotossintética diminuída de forma crônica ou reversível (Reginfo *et al.*, 2008).

Num estudo feito com indivíduos de *Genipa spruceana* submetidos a alagamento parcial e total, Gonçalves e colaboradores (2013) observaram reduções no valor de fotossíntese máxima ( $A_{max}$ ) e nas taxas de assimilação de carbono no grupo alagado parcialmente. Esse efeito pode estar associado a limitações estomáticas, hipótese que é corroborada pela diminuição da taxa de condutância estomática observada ao longo do experimento.

Para as plantas, torna-se necessário combater o problema central gerado pela situação de anaerobiose: o requerimento de oxigênio como acceptor final de elétrons da cadeia respiratória (Kennedy *et al.*, 1992), o que fornece a maioria do ATP para o metabolismo celular, regenerando  $NAD^+$  a partir de NADH (Geigenberger, 2003).

Numa situação de baixa disponibilidade de  $O_2$  já existe um decréscimo significativo do fornecimento de ATP, entretanto nessa situação há diminuição da glicólise e as vias fermentativas continuam inibidas. Somente em situação de hipóxia ou anóxia é que a glicólise e a fermentação são estimuladas, produzindo o efeito Pasteur (Geigenberger, 2003). Assim, para manter a homeostase celular numa situação de anóxia ou hipóxia, ocorrem aumento da glicólise, fermentação alcoólica e láctica, bem como modificações no

ciclo do ácido tricarbóxico visando a manutenção do fornecimento de ATP necessário para diversos processos metabólicos indispensáveis (Voeselek & Bailey-Serres, 2015).

A baixa disponibilidade de ATP gerada pela inibição da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é acompanhada de uma inibição de processos que consomem energia associados com divisão celular e crescimento, incluindo síntese de DNA, proteínas, ribossomos e parede celular (Voeselek & Bailey-Serres, 2015). Ademais, a economia de energia é alcançada em algumas plantas através do aumento na produção de enzimas que usam pirofosfato inorgânico no lugar de ATP (Bailey-Serres *et al.*, 2012).

Geigenberger e colaboradores (2000) avaliaram respostas a baixas concentrações de O<sub>2</sub> em tubérculos de batata e perceberam que o estresse resultou numa inibição progressiva da biossíntese de sacarose, aminoácidos, proteínas e lipídios. Entretanto, a síntese de amido continuou alta comparada como os outros fluxos biossintéticos, o que pode ser explicado devido à inativação da glicólise e acúmulo de 3-fosfoglicerato em baixas concentrações de O<sub>2</sub>. Chang e colaboradores (2000) avaliaram a síntese proteica em raízes de plântulas de milho e também verificaram sua diminuição em situação de hipóxia a partir da diminuição da incorporação de aminoácidos marcados nessas moléculas.

A respiração aeróbica produz até 39 moléculas de ATP por hexose catabolisada, enquanto a fermentação produz no máximo três moléculas de ATP (Geigenberger, 2003). Ainda assim, na impossibilidade de haver respiração aeróbica, o substrato necessário para a produção de ATP advém da regeneração do NAD<sup>+</sup> via fermentação do piruvato a lactato e etanol (Bailey-Serres *et al.*, 2012). A produção de lactato é desvantajosa, pois provoca acidificação do citosol. Produção de etanol é também desvantajosa ao permitir perda de carbono por difusão. Em contrapartida, a produção de alanina pode conservar carbono e facilitar a produção de ATP (Bailey-Serres *et al.*, 2012), pois previne o acúmulo de piruvato (Rocha *et al.*, 2010). Entretanto, a síntese de alanina não contribui diretamente para a reciclagem de NAD<sup>+</sup>.

Em consonância com as alterações metabólicas supracitadas, nota-se mudanças relativas a atividade de três importantes enzimas do metabolismo anaeróbico: (1) piruvato descarboxilase (PDC), que catalisa a descarboxilação do piruvato, gerando CO<sub>2</sub> e acetaldeído; (2) desidrogenase alcoólica (ADH), que catalisa a formação de etanol a partir de acetaldeído e cuja atividade aumenta na maioria das plantas durante anóxia; (3) lactato desidrogenase (LDH), que catalisa a formação de lactato a partir de piruvato e cuja

atividade é induzida por um curto espaço de tempo logo após a passagem da condição aeróbica para anaeróbica (Kennedy *et al.*, 1992; Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

De acordo com a teoria metabólica de tolerância ao alagamento de Crawford, de 1971, a tolerância ao alagamento se deve a uma produção diminuída de etanol devido à baixa atividade de ADH. Deste modo, haveria uma redução dos efeitos tóxicos do etanol. Outra hipótese para explicar tolerância ao alagamento foi a de Davies-Roberts, de 1980. Essa hipótese discute que a regulação fina do pH citoplasmático é a chave para tolerância ao alagamento. A razão entre síntese de etanol e lactato dependeria do pH citoplasmático; portanto, em condições anaeróbicas, piruvato seria inicialmente convertido para lactato. Entretanto, com o decréscimo do pH, a atividade da LDH é inibida e a atividade da ADH predomina (Kennedy *et al.*, 1992). Para Kennedy e colaboradores (1992), parece claro que ocorre a acidificação pronunciada do citoplasma e que ela é um indicador de estresse anaeróbico, principalmente em plantas sensíveis a alagamento.

Ferreira e colaboradores (2009) compararam populações de *Himatanthus sucuuba* de terra firme e de áreas alagadas da Amazônia. Enquanto plântulas de várzea mantiveram altos níveis de ADH durante quatro meses de alagamento, as de terra firme tiveram um pico de atividade da enzima no 15º dia de tratamento, seguido de um decréscimo contínuo de sua atividade e a morte de todas as plantas. Os autores atestam que esse resultado sugere que o alagamento de grande duração pode representar uma pressão seletiva relevante o bastante para resultar em grandes diferenças fenotípicas nas populações que vivem em diferentes habitats.

Além das modificações nas atividades das enzimas fermentativas, a carência de O<sub>2</sub> eleva a produção de mRNAs codificantes de enzimas de vias metabólicas ligadas ao consumo de amido (amilases), catabolismo de sacarose (sacarose sintase), glicólise (fosfofrutoquinase), produção de alanina (alanina aminotransferase), ácido gama-aminobutírico (GABA) (glutamato descarboxilase) e succinato (Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

A produção da alanina em plantas submetidas a alagamento ocorre por meio da enzima alanina aminotransferase, que utiliza glutamato e piruvato para produzir 2-oxoglutarato e alanina. 2-Oxoglutarato é componente do ciclo do ácido tricarboxílico e é usado como substrato da 2-oxoglutarato desidrogenase, gerando succinato e ATP, enquanto utiliza NAD<sup>+</sup>. O NAD<sup>+</sup> requerido para essa reação é fornecido pela malato desidrogenase, que trabalha na reação reversa a normal quando em situação de alagamento.

Operando desta forma, o ciclo do ácido tricarboxílico otimiza a produção de ATP. Essa reorganização metabólica deve ser considerada de suma importância para a resistência ao alagamento, assim como as vias fermentativas (Narsai *et al.*, 2011).

Sweetlove e colaboradores (2010) defendem que o ciclo do ácido tricarboxílico desempenha inúmeros papéis no metabolismo celular, como fornecer poder redutor, ATP e esqueletos carbônicos. Por isso, a priori, não há nenhuma razão para que o ciclo do ácido tricarboxílico convencional seja a forma dominante da via. Possivelmente, o fluxo das reações nessa via reflete o contexto metabólico e fisiológico da célula onde está operando. Para os autores, os modelos alternativos de fluxos são vantajosos pois conferem flexibilidade metabólica.

Antônio e colaboradores (2016) avaliaram modificações no metabolismo anaeróbico radicular de soja através da utilização de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Com esse método, os autores puderam confirmar a ativação da via de fermentação láctica, bem como a conversão de piruvato à alanina (através da atividade da alanina aminotransferase) e de glutamato a GABA. Em seguida, existe a conversão de GABA a succinato através da *GABA shunt*. Além disso, esse trabalho acrescentou evidências que corroboram com a ideia de que a regulação no ciclo do ácido tricarboxílico é modulada via mecanismos redox envolvidos com a atividade da tioredoxina.

Em um estudo realizado com *Lotus japonicus* submetido a alagamento, Rocha e colaboradores (2010) analisaram o perfil metabólico dos indivíduos e perceberam um aumento de alanina, GABA, glutamato e succinato durante o período de estresse. Após o período de alagamento, esses compostos tiveram seus níveis reduzidos para os valores pré-estresse. O aumento nos níveis desses compostos já foi encontrado em diversas espécies (Dongen *et al.*, 2009; Barding Jr *et al.*, 2012; Kreuzwiser *et al.*, 2009; Narsai *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2012), o que indica que é bastante conservado.

É interessante lembrar que o fim do alagamento não significa o fim de todas as adversidades com as quais as plantas têm que lidar. Mesmo após o estresse de alagamento, o metabolismo da planta pode não retornar à condição pré-alagamento rapidamente. No momento da reoxigenação ocorre um aumento na produção de superóxidos no complexo III (citocromo  $bc_1$ ) da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, como um resultado do *lag* na reativação do complexo IV (citocromo c oxidase). Deficiência em antioxidantes nessa fase pode levar a danos na membrana celular, comprometendo a integridade das células (Larcher, 2003; Voisenek & Bailey-Serres, 2015).

### 2.3. CERRADO

O Cerrado apresenta duas estações bem definidas: o verão chuvoso e o inverno seco. A média anual de precipitação é de 1500 mm, com maior pluviosidade de outubro a março (Ribeiro & Walter, 1998). Após a estação chuvosa (outubro a março), segue a estação seca (abril a setembro), quando a umidade relativa é baixa, a evaporação é muito alta e a precipitação chega a zero. A extensa época de seca varia de 3 a 7 meses, dependendo da proximidade da Amazônia ou da Caatinga, entretanto, a maior parte do Cerrado apresenta 5 a 6 meses de seca (Joly *et al.*, 1999).

Durante os meses frios a temperatura supera 18 °C (Ribeiro & Walter, 1998). A distribuição do Cerrado numa larga faixa latitudinal e em alturas variáveis de relevo faz com que esse bioma tenha uma diversificação térmica notável (Ribeiro & Walter, 1998).

Devido à sua dimensão e à proximidade com vários outros biomas tropicais, o Cerrado exibe uma biodiversidade relevante (Joly *et al.*, 1999), com cerca de 12.140 plantas, 199 mamíferos, 864 aves, 180 répteis, 150 anfíbios, 1.200 peixes e 90.000 espécies de invertebrados; entretanto, a despeito de tal riqueza biológica, a atenção reservada para a conservação desse bioma é menor do que a dispensada à Amazônia e à Mata Atlântica (Klink & Machado, 2005; WWF, 2017). Estima-se que 20% das espécies do Cerrado ameaçadas ou endêmicas não ocorrem dentro de áreas protegidas, além de que pelo menos 55% desse bioma foram desmatados ou transformados por ação humana, como indicam as imagens feitas em 2002 pelo satélite MODIS (Klink & Machado, 2005).

Ao observar o Cerrado, pode-se notar diversas fitofisionomias – aspectos da vegetação de um bioma –, com formações savânicas, campestres e florestais, como afirmam Ribeiro & Walter (1998). São estas fitofisionomias: Mata Ciliar, Mata de Galeria (inundável e não-inundável), Palmeirais, Cerradão, Mata Seca (sempre-verde, semidecídua e decídua), Cerrado Típico, Cerrado Denso, Cerrado Ralo, Cerrado Rupestre, Parque de Cerrado, Vereda, Campo Sujo (seco, úmido e com murundus), Campo Limpo (seco, úmido e com murundus) e Campo Rupestre (Ribeiro & Walter, 1998). Nota-se, deste modo, que a maioria das fisionomias do Cerrado são associadas à seca, ainda que se possam notar ambientes propensos ao alagamento.

De acordo com Joly e colaboradores (1999), os fatores que determinam a manutenção, estrutura e funcionamento do Cerrado são as propriedades do solo, a variabilidade climática, a frequência de fogo e o papel da biota. Para lidar com esses

fatores, por vezes estressores, a vegetação do Cerrado apresenta inúmeras adaptações, como cascas grossas com cortiça, presença de xilopódio, folhas com cutículas, estômatos em cavidades, tecidos lignificados e até silicificados (Oliveira-Filho & Ratter, 2002), maior investimento em produção de raízes do que em parte aérea para potencializar captação de água, acúmulo de alumínio para lidar com sua alta disponibilidade no solo (Scariot *et al.*, 2005), etc. Entretanto, pouco se conhece sobre adaptações a situações de alagamento, e algumas espécies de Cerrado são tidas como sensíveis a esse estressor (Joly & Crawford, 1982; Gregório *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2015).

#### 2.4. AMAZÔNIA

As florestas inundáveis da Amazônia são as mais ricas em espécies no mundo (Wittmann *et al.*, 2010). Tal fato pode ser explicado pela grande diversidade de habitats, assim como por fatores geo-hidrológicos, biogeográficos e condições relativamente estáveis (Wittmann *et al.*, 2010).

Um dos tipos de florestas inundáveis é a de várzea. Estas ocorrem ao longo de rios que drenam a região andina e são ricos em matéria em suspensão, que é depositada ao longo das suas margens, leitos, remansos e barragens. Por causa dessa deposição anual de sedimentos, os rios de água branca formam um sistema altamente dinâmico, com cursos que migram constantemente, criando uma infinidade de micro-habitats florestais. As florestas de várzea são extremamente ricas em nutrientes, e sua vegetação possui alta produtividade primária (Wittmann *et al.*, 2010).

A extensão média dos alagamentos varia ao longo do curso do rio e depende da precipitação, dos regimes de fluxos e da topografia da área. O pulso de alagamento é bem definido, gerando períodos de cheia e de seca durante o ano. Essa inundação periódica determina a composição de espécies e a distribuição de árvores nas florestas alagáveis. Quanto maior a altura da coluna d'água durante o alagamento, menor a riqueza de espécies (Wittmann *et al.*, 2010).

As características ambientais amazônicas mais restritivas ao crescimento de plantas nas áreas alagáveis são: (a) o alagamento longo e ininterrupto, que pode durar até 210 dias todo ano; (b) grandes amplitudes de alagamento, visto que todo ano o nível dos rios aumenta e diminui em até 10 m, provocando o pulso de alagamento; (c) mudança rápida do nível de água, que aumenta em média 50 mm por dia; (d) hipóxia (concentração média

de oxigênio na água de  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); (e) alta sedimentação, pois as águas brancas ricas em matéria suspensa geram altas taxas de deposição de sedimentos, aumentando a severidade da hipóxia; (f) temperatura mais alta da água (em média  $27\text{--}29 \text{ }^\circ\text{C}$ ), que a faz suportar menos oxigênio dissolvido que a água fria; (g) dano mecânico, visto que a dinâmica do rio pode danificar as árvores e dificultar estabelecimento de plântulas (Parolin, 2009).

## 2.5. *Guazuma ulmifolia*

### 2.5.1. DISTRIBUIÇÃO

*Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae), comumente conhecida como mutamba, é uma espécie arbórea amplamente distribuída pela América tropical. A mutamba pode ser encontrada em, pelo menos, 21 unidades da Federação Brasileira (Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo, Sergipe, Amapá e Rondônia). (Carvalho, 2007; Queiroz & Machado, 2008; Rodrigues *et al.*, 2007).

Visto que a *G. ulmifolia* está presente em grande parte do território brasileiro, pode-se inferir que essa espécie está inserida em diversos biomas e suas respectivas fitofisionomias. De acordo com Carvalho (2007), *G. ulmifolia* pode ser encontrada na Mata Atlântica, Amazônia, Cerrado, Caatinga e Pantanal. Sendo assim, é capaz de suportar diversos regimes pluviais, temperaturas e agentes estressores.

Essa habilidade de colonizar desde ambientes propensos ao alagamento (Amazônia) até os com características mais secas (Cerrado) é interessante, já que pode significar que essa espécie apresenta grande plasticidade fenotípica. O presente trabalho objetiva avaliar a tolerância ao alagamento parcial de *G. ulmifolia* proveniente da Amazônia (adaptada ao alagamento) e provenientes do Cerrado (sem eventos de alagamento). Deste modo, testaremos a capacidade de aclimação das plantas provenientes do Cerrado a estresses incomuns ao seu ecossistema e se as respostas ao estressor são semelhantes, independentemente da população de origem.



### 2.5.2. MORFOLOGIA

Os indivíduos dessa espécie apresentam hábito arbóreo. Suas folhas são alternas, simples, de ovaladas a lanceoladas, membranáceas, com margem denteada ou crenada e face abaxial pilosa. Produzem inflorescência em panícula, com até 40 flores pequenas, amarelo-claras, monoicas (Carvalho, 2007). Seus frutos são do tipo cápsula loculicida, globosa, seca, de cor preta. Os frutos contêm em média 87 sementes, arredondadas, de cor acinzentada (Sobrinho & Siqueira, 2008).

A germinação da mutamba é epígea, iniciada aproximadamente quatro dias após a sementeira. 30 dias após emergir do solo, a planta atinge altura média de 5,0 cm e apresenta dois pares foliares. Aos 60 dias de idade, a planta tem altura média de 8,0 cm e três pares foliares. O sistema radicular apresenta comprimento semelhante ao da parte aérea e é formado por raiz principal e diversas raízes secundárias e terciárias (Sobrinho & Siqueira, 2008).

Os frutos da mutamba são comestíveis e possuem sabor similar ao de figo seco. O chá de suas folhas é utilizado contra problemas gastrointestinais, problemas de próstata e também como facilitador de parto (Carvalho, 2007). A mutamba pode ser utilizada em reflorestamentos destinados a restauração de áreas degradadas, pois cresce rapidamente e fornece frutos atrativos para a fauna (Lorenzi, 1992). Além disso, *G. ulmifolia* apresenta ação anti-hipertensiva e vasodilatadora de longa duração em ratos (Magos *et al.*, 2008) e ação antibacteriana em extratos etanólicos e metanólicos de casca (Camporese *et al.*, 2013) e extratos etanólicos de folha (Cáceres *et al.*, 1990). Camporese e colaboradores (2003) ponderam que a atividade antibacteriana nos extratos de casca advém da presença de proantocianidinas.

Pires (2015) observou plantas jovens de *G. ulmifolia* (provenientes de área de várzea na Amazônia e de cerrado no Cerrado) sob condições de alagamento parcial e total com um enfoque morfológico e anatômico. A autora verificou aparecimento de lenticelas hipertrofiadas, raízes adventícias e aerênquima nas plantas tratadas. Plantas oriundas do Cerrado param crescimento em alagamento parcial, enquanto as provenientes da Amazônia continuaram crescendo. Em condição de alagamento parcial, as plantas com origem no Cerrado apresentaram maior quantidade de açúcares solúveis totais (AST) que as da Amazônia.

### 3. JUSTIFICATIVA

As plantas são seres sésseis e, por isso, apresentam diversas estratégias de defesa contra condições ambientais quase sempre desfavoráveis. Essa capacidade de lidar com estresses através de adaptação ou aclimatação é determinante no âmbito da sobrevivência e reprodução das espécies. Espécies amplamente distribuídas ocorrem em meio a uma miríade de diferentes fatores ambientais e podem sobreviver a ambientes desde secos a alagados. As variadas estratégias de sobrevivência evidenciadas nas diferentes populações dessas espécies fazem com que essas plantas se configurem como bons modelos de estudo de plasticidade fenotípica condicionada às características do habitat. *Guazuma ulmifolia* Lam. é uma espécie amplamente distribuída pela América tropical e está presente em vários biomas brasileiros, em ecossistemas secos ou úmidos, tolerando inclusive longos períodos de alagamento. Por isso, é um bom modelo para estudo de tolerância e plasticidade fenotípica vinculada a fatores ambientais. Em meio a um cenário de mudanças climáticas, estudos sobre tolerância a alagamento são fundamentais para motivar uma melhor preparação para o panorama ambiental futuro, pois oferecem elementos que podem aprimorar ações de conservação. Ademais, a observação dos pontos chave de ajuste metabólico de espécies adaptadas ao alagamento pode subsidiar futuros estudos acerca de possíveis mudanças na expressão gênica sob condições de baixo fornecimento de oxigênio, contribuindo indiretamente com estudos de melhoramento genético de cultivares susceptíveis a esse estresse.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

- O presente trabalho objetiva avaliar os mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de tolerância ao alagamento parcial, desenvolvidos por plantas de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) provenientes de populações nativas da Amazônia ou do Cerrado.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar o efeito do alagamento sob o incremento da parte aérea e do diâmetro caulinar, a fração de massa radicular, número de folhas e o aparecimento de lenticelas hipertrofiadas e raízes adventícias.
- Examinar fotossíntese máxima, condutância estomática, transpiração e carbono interno foliar das plantas submetidas ao experimento, durante estresse e pós-estresse.
- Examinar a alocação de carbono e nitrogênio ao longo da exposição ao estresse e durante a fase de recuperação.
- Analisar o perfil metabólico das plantas jovens de *G. ulmifolia* durante os períodos de alagamento e, com isso, identificar processos metabólicos alterados pelo estresse.

## 5. HIPÓTESES

- Haverá aparecimento de lenticelas e raízes adventícias nas plantas provenientes das duas populações. Além disso, as plantas do Cerrado submetidas a alagamento devem apresentar menor crescimento e menor número de folhas.
- Será possível observar decréscimo na condutância estomática e, conseqüentemente, na fotossíntese das plantas submetidas a alagamento.
- Deverá haver um aumento de amido foliar e uma diminuição do amido radicular nas plantas submetidas ao alagamento devido à dificuldade de translocação de fotoassimilados no sentido fonte dreno, somada a uma grande utilização de carboidratos nas vias fermentativas nas raízes alagadas.
- A redução na assimilação de carbono devido à menor condutância estomática e fotossíntese devem provocar diminuição do acúmulo desse elemento nas plantas submetidas a alagamento. O mesmo deve ocorrer com o nitrogênio, já que a absorção desse nutriente pelas raízes é comprometida no alagamento.
- Deve-se perceber alteração do perfil metabólico dos indivíduos alagados, com aumento de metabólitos ligados ao metabolismo anaeróbico, como lactato, alanina, GABA e succinato.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. MATERIAL VEGETAL

A espécie utilizada no experimento foi *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae), escolhida por ser amplamente distribuída por diversos biomas brasileiros (Carvalho, 2007), especialmente por ser encontrada em dois ecossistemas geograficamente distantes e com condições hídricas contrastantes – as florestas alagáveis da Amazônia e as áreas de Cerradão no Brasil Central. Os frutos provenientes da Amazônia foram coletados em agosto de 2015, na ilha da Marchantaria, próxima a Manaus - AM, em áreas de várzea que são alagadas pelo rio Solimões (3°1'28.36"S; 60°8'48.12"O). Os frutos provenientes do Cerrado foram coletados também em 2015, em uma área de Cerradão em Brasília – DF (15° 34'42.3" S; 47°51'09.2"O). Depois de coletados, os frutos de pelo menos cinco matrizes de cada local foram beneficiados e as sementes provenientes de um mesmo bioma foram misturadas para formar lotes compostos.

As sementes foram submetidas a choque de temperatura (água a 80° C por 1 min) para quebrar dormência e colocadas em uma bandeja com substrato vermiculita em câmara de germinação (25 °C, fotoperíodo de 12 horas, regas diárias até capacidade de campo). Após 20 dias, as plântulas (do Cerrado e da Amazônia) foram colocadas em recipientes plásticos de 500 mL contendo solo Bioplant® e transferidas para a sala de crescimento do Departamento de Botânica (IB-UnB), onde foram mantidas por 15 dias com regas diárias e luz branca artificial. Após esse período, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação onde permaneceram por 63 dias para aclimação. Em seguida, os experimentos de alagamento parcial foram conduzidos.

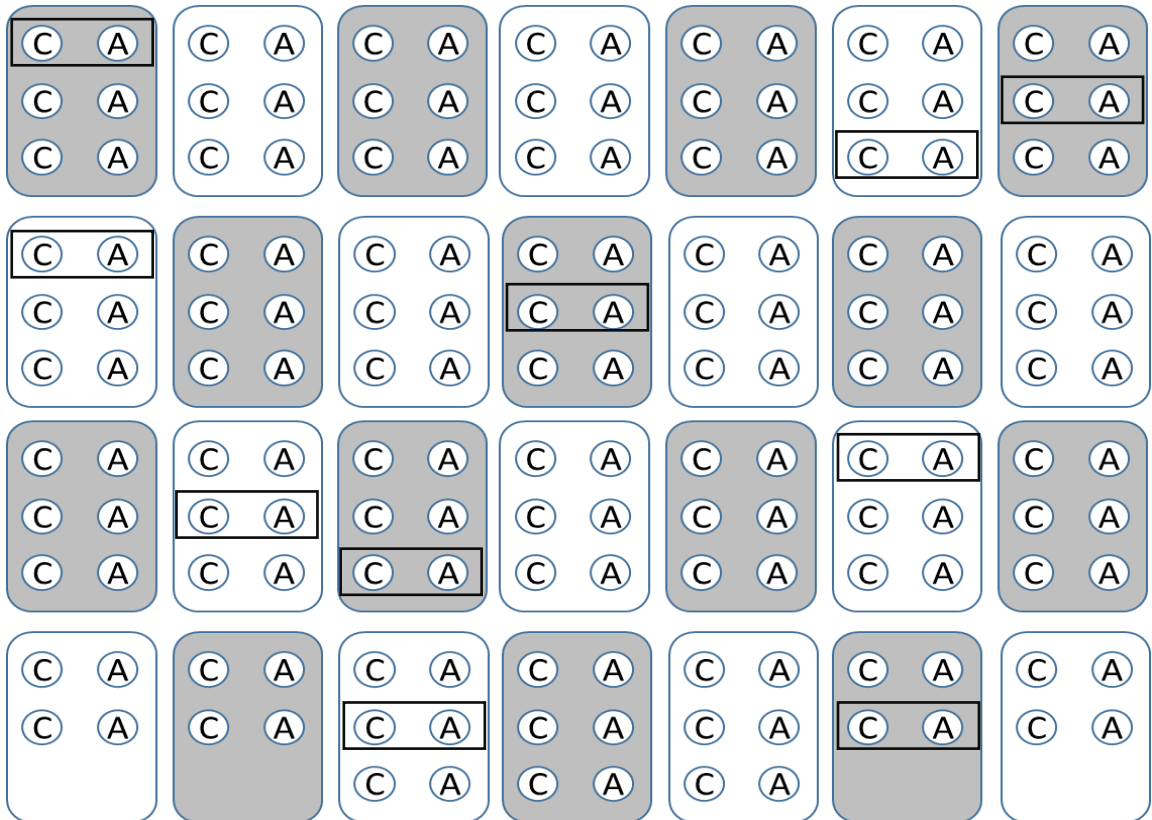
### 6.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília. O local se encontra na Gleba C da área da UnB, próximo ao final da Asa Norte, Brasília - DF.

### 6.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação na casa de vegetação, plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* provenientes de matrizes da Amazônia e do Cerrado do grupo **tratamento** foram expostas a duas condições: (1) tratamento de alagamento parcial por 32 dias e, posteriormente, (2) recuperação pós-estresse com duração de mais 17 dias. Assim, o tempo total do experimento foi de 49 dias. Concomitantemente, as plantas da Amazônia e do Cerrado pertencentes ao grupo **controle** foram mantidas com regas diárias, sob as mesmas condições de luminosidade do grupo tratamento. As plantas foram aleatoriamente distribuídas entre os grupos tratamento e controle.

Foram utilizadas ao todo 160 plantas jovens de *G. ulmifolia* (Tabela 1), medindo de 5 a 20 cm. Desse total, 80 plantas eram provenientes de matrizes da Amazônia e 80 provenientes de matrizes do Cerrado. De cada conjunto de 80 plantas, 40 foram expostas às condições 1 e 2 supracitadas e 40 formaram o grupo controle (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Esquema não randomizado do experimento de alagamento com plantas jovens de *Guazuma ulmifolia*. Retângulos brancos representam grupo controle e os cinzas o grupo tratamento (alagado). Os círculos (C) representam indivíduos do Cerrado e os círculos (A) representam indivíduos da Amazônia. Os retângulos pretos simulam o funcionamento de um dia de coleta de material biológico.



**Figura 2.** Organização do experimento de alagamento parcial de *Guazuma ulmifolia* na Estação Experimental da Biologia, Brasília - DF.

**Tabela 1.** Delineamento para o experimento de alagamento com *Guazuma ulmifolia*, com duração de 49 dias, realizado na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

Área	Grupo	Nº de coletas	Nº de amostras/coleta	Total de plantas
<b>Amazônia</b>	Controle (CoA)	8	5	40
	Tratamento (AIA)	8	5	40
<b>Cerrado</b>	Controle (CoC)	8	5	40
	Tratamento (AIC)	8	5	40
<b>Total</b>				<b>160</b>

As plantas foram organizadas de seis em seis (três da Amazônia e três do Cerrado) em caixas plásticas (18,91 x 44,10 x 29,70 cm) cobertas com rede para evitar insetos (Figura 1 e 3). As plantas submetidas ao tratamento de alagamento parcial permaneceram alagadas até a base do caule. Após os 32 dias de exposição ao estresse, as plantas restantes foram retiradas do alagamento para verificação da recuperação pós-estresse, sendo mantidas na casa de vegetação com regas diárias até capacidade de campo.

Foram coletadas cinco plantas de cada bioma e de cada grupo (controle e tratamento) nos tempos: zero (início dos experimentos), 24 e 48 horas; 7, 14, 28, 35 e 49 dias contados a partir do início dos experimentos. Cada indivíduo (amostra) foi separado em raiz, caule e folhas. As raízes foram lavadas para retirada do máximo de solo residual. Os órgãos foram pesados e depositado em nitrogênio líquido para ser transportados para o laboratório, onde foram armazenados em freezer a -80 °C para posterior análise.

A partir do material coletado foram feitas análises em relação à alocação de C e N (avaliada em folhas e raízes coletadas em  $t = 7, 14, 28$  e  $49$  dias), perfil metabólico (avaliado em folhas e raízes coletadas em  $t = 24$  e  $48$  horas;  $7$  e  $14$  dias) e porcentagem de amido (em folhas e raízes de todos os tempos) (Tabela 2).



**Figura 3.** Organização das plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* nas caixas alagadas parcialmente no 21º dia de experimento. São três plantas provenientes da Amazônia e mais três plantas do Cerrado, totalizando seis plantas por caixa.

---

As alterações morfofisiológicas foram avaliadas através de censos, por meio do acompanhamento dos 20 indivíduos que foram coletados no ultimo dia de experimento. Foram avaliados o crescimento da parte aérea e do diâmetro do caule, alterações no numero de folhas, a sobrevivência das plantas e o aparecimento de lenticelas e raízes adventícias. Além disso, foram medidas a fotossíntese máxima ( $A_{max}$ ), condutância estomática ( $G_s$ ),



transpiração (E) e concentração de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>) através da utilização do Infrared Gas Analyser (IRGA LI-6400XT LI-COR® Biosciences).

**Tabela 2.** Cronograma de atividades realizadas durante o experimento de alagamento parcial de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* Lam. (✓) Parâmetro analisado na coleta, (x) parâmetro não analisado na coleta, (-) material biológico não coletado.

TEMPO	MORFOLOGIA	FISIOLOGIA	AMIDO	C:N	PERFIL
0h	✓	✓	x	x	x
24h	x	✓	✓	x	✓
48h	x	✓	✓	x	✓
7d	✓	✓	✓	✓	✓
14d	✓	✓	✓	✓	✓
21d	✓	✓	-	-	-
28d	✓	x	✓	✓	x
32d		Retirada do alagamento			
35d	✓	✓	✓	x	x
42d	✓	✓	-	-	-
49d	✓	✓	✓	✓	x

#### 6.4. CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS EM RESPOSTA AO ESTRESSE

##### 6.4.1. BIOMASSA

Após o corte de cada planta e separação em raiz, caule e folhas, tais componentes foram pesados para a obtenção de massa fresca (MF<sub>(órgão)</sub>). Cada componente foi dividido em duas partes, uma que foi seca e outra que foi mantida fresca. A parte destinada a secagem foi rapidamente repesada para obtenção de sua massa fresca após o corte (MF<sub>(parte seca)</sub>). Após sua secagem, essa parte foi pesada novamente para obtenção de sua massa seca (MS<sub>(parte seca)</sub>) e posterior extrapolação para massa seca total de cada órgão (MS<sub>(órgão)</sub>) (Figura 4). A preservação de uma parte do material fresco foi necessária para o funcionamento do ensaio enzimático para verificar a atividade da Álcool Desidrogenase (ADH) que será conduzido posteriormente utilizando o mesmo material.

$$MS(org\tilde{a}o) = \frac{MS(parte\ seca) \cdot MF(org\tilde{a}o)}{MF(parte\ seca)}$$

**Figura 4.** Equação que demonstra a inferência de massa seca do órgão (raiz, caule e folhas), a partir de uma parte da amostra que foi efetivamente seca, onde  $MS_{(órgão)}$  é a massa seca do órgão observado,  $MS_{(parte\ seca)}$  é massa seca da parte separada para secagem,  $MF_{(órgão)}$  é a massa fresca medida com o órgão completo e  $MF_{(parte\ seca)}$  é a massa fresca da parte separada para secagem.

#### 6.4.2. MORFOLOGIA E CRESCIMENTO

Foram realizados 8 censos durante o tempo total de experimentação, nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias, objetivando avaliar crescimento da parte aérea, diâmetro caulinar, modificação na quantidade de folhas, surgimento de lenticelas e raízes adventícias, além da sobrevivência das plantas. Os indivíduos analisados foram os 20 (Amazônia e Cerrado, tratamento e controle) coletados no dia 49.

Para quantificar o crescimento da parte aérea (base ao ápice do caule), utilizou-se uma régua milimetrada. Para diâmetro da base do caule foi utilizado paquímetro. Já para a observação de mudança na quantidade de folhas (queda ou produção das mesmas), empregou-se o método de contagem. Foram observados também o aparecimento de lenticelas hipertrofiadas, raízes adventícias e a sobrevivência das mudas.

Para calcular o incremento da parte aérea, do diâmetro caulinar e do número de folhas, o valor obtido no  $t = 0$  foi reduzido do valor obtido de cada um dos tempos seguintes.

#### 6.4.3. FOTOSÍNTESE, CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA, TRANSPIRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CO<sub>2</sub> INTERCELULAR

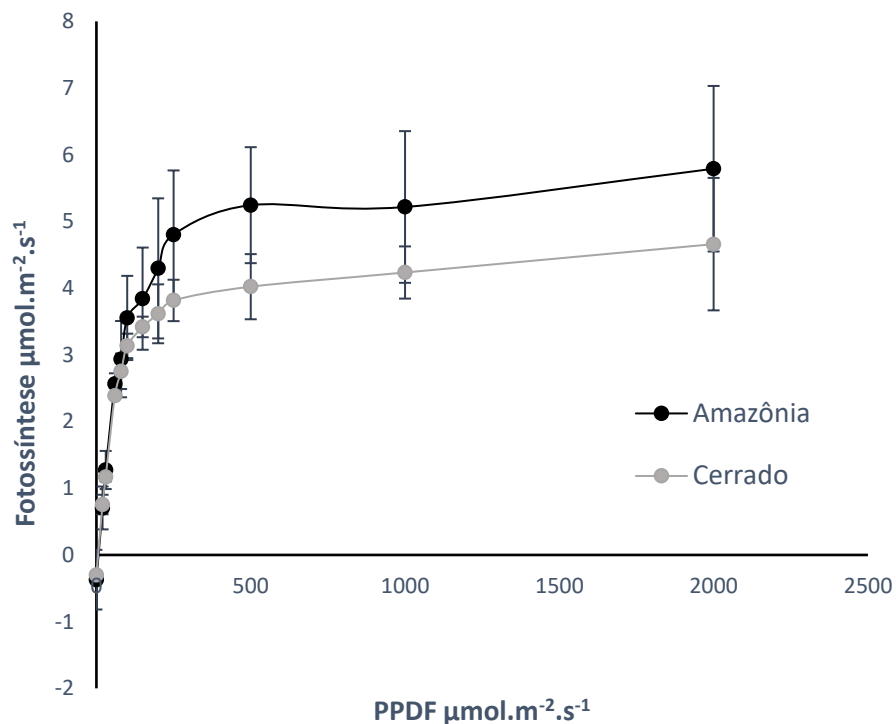
Utilizando um analisador de gás por infravermelho (IRGA LI-6400XT LI-COR<sup>®</sup> Biosciences), foram analisadas a fotossíntese máxima, condutância estomática, transpiração e concentração de CO<sub>2</sub> intercelular de 20 indivíduos (10 do grupo tratamento e 10 do grupo controle), que foram coletados no  $t = 49$  dias.

Foram feitas 10 medidas, ao longo dos 49 dias de experimento, incluindo o tempo inicial ( $t = 0$ ). As medidas ocorreram sempre na parte da manhã, entre 8h00 e 11h00, usando sempre a mesma folha (aquela expandida completamente por último antes da primeira medida) e evitando inclusão da nervura principal foliar.

Foram salvos 5 registros de fotossíntese para cada folha, com intervalos de 1 segundo entre as marcações. De forma a padronizar o tempo de início da coleta de dados, contou-se 33 segundos desde o primeiro valor positivo de fotossíntese para então salvar o

primeiro dado. Desses 5 valores coletados para cada planta, somente o maior valor foi considerado.

O IRGA foi ajustado com os seguintes parâmetros para a medição: Flow = 500  $\mu\text{mol/s}$ ,  $\text{CO}_2$  de Referência = 400 ppm, Par = 2.000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ . O fluxo de fótons fotossintéticos (PPDF) foi ajustado para 2.000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  baseado nas curvas de luz produzidas anteriormente ao experimento, pois corresponde ao maior valor de fotossíntese atingido pelos indivíduos (Figura 5).



**Figura 5.** Fotossíntese em diferentes densidades de fótons de fluxo fotossintético (PPDF) em *Guazuma ulmifolia*. As médias equivalem a 3 repetições provenientes de cada bioma  $\pm$  o desvio padrão. Como o valor máximo de fotossíntese foi aferido na intensidade luminosa de 2000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ . Essa intensidade foi utilizada nas medições durante o experimento de alagamento.

## 6.5. CARACTERIZAÇÃO DO METABOLISMO EM RESPOSTA AO ESTRESSE

### 6.5.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMIDO

O protocolo seguido para a referida extração adotou o método enzimático da  $\alpha$ -amilase (Amaral *et al.*, 2007).

Primeiramente foram extraídos os açúcares solúveis das amostras através da adição de 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80%. Após adição do solvente as amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos, em seguida permaneceram em banho-maria a 80°C por 30 minutos. Após o processo, descartou-se sobrenadante e repetiu-se todo o processo por mais 3 vezes.

Adicionou-se à biomassa restante da extração de AST, 450  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (120  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em tampão fosfato-salino (PBS, 10 mM, pH 6,5). Em seguida, incubou-se as amostras a 75 °C por 30 minutos. Adicionou-se novamente 450  $\mu\text{L}$  de solução de  $\alpha$ -amilase, repetindo a incubação.

Seguidamente, acrescentou-se às amostras 450  $\mu\text{L}$  de amiloglucosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (30  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em tampão acetato de sódio (100 mM, pH 4,5), incubando-as a 50 °C por 30 minutos. Repetiu-se a adição de AMG e a incubação a 50 °C por 30 minutos.

Com o objetivo de parar as reações, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 0,8 M aos tubos e centrifugou-se as amostras a 10.000 rpm por 10 minutos.

A quantificação do amido foi avaliada através da glicose liberada em sua hidrólise. Coletou-se 20  $\mu\text{L}$  de extrato (logo após sua centrifugação) e pipetou-se em poço de microplaca (96 poços). Adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  do reagente Glicose PAP Liquiform® (CENTERLAB®, Brasil), contendo as enzimas glicose-oxidase ( $\sim 11.000 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e peroxidase ( $\sim 700 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 290  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol (pH 7,5). Depois de 15 minutos, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro de microplaca a 510 nm.

Para fazer a curva padrão, preparou-se uma solução estoque de glicose a 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e, a partir dela, montou-se alíquotas nas concentrações de 0; 2,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Coletou-se 20  $\mu\text{L}$  de cada alíquota, pipetou-se no poço da microplaca e acrescentou-se 300  $\mu\text{L}$  da solução de Glicose PAP. Cada amostra foi adicionada três vezes à microplaca, gerando triplicatas.

Os dados coletados foram depois corrigidos pela massa inicial utilizada na extração de amido para evitar detecção de diferenças oriundas do método.

### 6.5.2. PERFIL METABÓLICO

O protocolo de extração e derivatização para o perfil metabólico seguiu o método metanol-ribitol (Lisec *et al.*, 2006) modificado. Pesou-se 5 mg de material vegetal

liofilizado e adicionou-se solvente de extração a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O solvente de extração consiste de  $1.400\text{ }\mu\text{L}$  de metanol PA e  $60\text{ }\mu\text{L}$  de adonitol a  $0,2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em água Milli-Q® (quantidade para uma amostra). A mistura foi incubada a  $1.000\text{ rpm}$  a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos em um termoagitador. Em seguida, centrifugou-se as amostras a  $10000\text{ g}$  por 10 minutos. Coletou-se  $750\text{ }\mu\text{L}$  de sobrenadante, que foi depositado em microtubo de vidro. Acrescentou-se ao microtubo de vidro  $375\text{ }\mu\text{L}$  de clorofórmio a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $750\text{ }\mu\text{L}$  de água Milli-Q® a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Agitou-se as amostras por 10 segundos e centrifugou-se a  $2.600\text{ rpm}$  por 15 minutos. Da parte superior da solução, coletou-se  $400\text{ }\mu\text{L}$ , que foram depositados em microtubo plástico. Em seguida, esses tubos foram levados a um concentrador a vácuo a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Manteve-se as amostras a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a sua derivatização.

Antes da derivatização, levou-se as amostras novamente ao concentrador a vácuo por 30 minutos. Após a secagem, adicionou-se  $40\text{ }\mu\text{L}$  de cloridrato de metoxiamina a  $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em piridina PA (preparado imediatamente antes de sua adição) e agitou-se as amostras por 2 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $900\text{ rpm}$ . Adicionou-se ao microtubo  $70\text{ }\mu\text{L}$  de N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) e incubou-se as amostras a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos a  $900\text{ rpm}$ .

Após as incubações, restaram reagentes condensados nas paredes dos tubos, portanto centrifugou-se os tubos antes de continuar para o próximo passo.

Em seguida, coletou-se  $100\text{ }\mu\text{L}$  da solução derivatizada e alocou-se em tubos de microvolume de vidro (*inserts*) para análise com cromatografia gasosa (GC/MS). Cada amostra passou por duas corridas, uma com o método Scan (sensível a maior quantidade possível de compostos) e outra com o método SIM (sensível a compostos previamente selecionados).

Os parâmetros de cromatografia gasosa seguiram o protocolo de Lisec e colaboradores (2006). Injetou-se  $1\text{ }\mu\text{L}$  da amostra a  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  no modo Split 30:1, com Split flow de  $18\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O gás carreador utilizado foi o hélio com fluxo de  $1,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (constante e com o controle de pressão eletrônico). A coluna utilizada foi do tipo capilar, com  $30\text{ m}$  HP-5. O programa iniciou com a temperatura de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos aumento até  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$  numa taxa de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , e depois foi imediatamente reduzido para  $330\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura na qual permaneceu por 5 minutos. A faixa de massa registrada foi de  $m/z\ 70$  para  $m/z\ 600$  e o filamento foi polarizado com uma corrente de  $-70\text{ V}$ . A voltagem do detector foi de aproximadamente  $1700\text{-}1850\text{ V}$ .

Foi utilizado o método SIM (*Selective Ion Monitoring*) para produção do perfil metabólico radicular e foliar. Esse método é adequado quando se quer analisar variações em compostos com baixa concentração, pois escolhe-se íons alvo para serem detectados em tempos de retenção específicos. Ao aumentar especificidade de detecção do GC/MS, aumenta-se também a sua sensibilidade para percepção de compostos em menor concentração. Os parâmetros utilizados no método encontram-se na Tabela 3.

Os dados de perfil metabólico foram calculados em relação ao pico do padrão interno de cada amostra, de modo a diminuir o erro advindo da diferença na sensibilidade do GC/MS, que pode não permanecer constante em diferentes corridas (amostras). Em seguida, os dados foram novamente corrigidos pela massa inicial utilizada na extração de metabólitos.

**Tabela 3.** Parâmetros utilizados no método de análise (SIM) do perfil metabólico foliar e radicular de *Guazuma ulmifolia* exposta a alagamento parcial.

Grupo	Tempo de início (min)	Metabólitos alvo	Íons alvo (m/z)	Dwell/ion (ms)
1	9.00	Lactato, Piruvato, Alanina, Glicina (2TMS)	102, 115, 116, 117, 133, 174, 176, 190, 191, 204, 218.	30
2	12.50	Valina	100, 144, 218	30
3	15.00	Glicerol, Leucina, Isoleucina, Glicina (3TMS), Succinato	102, 117, 158, 172, 174, 205, 218, 232, 247, 248, 276.	30
4	17.70	Fumarato, Alanina, Serina	100, 114, 143, 188, 204, 217, 218, 245, 262.	30
5	19.00	Treonina	117, 218, 291	30
6	20.50	Malato	233, 245	30
7	22.30	Piroglutamato, Aspartato, Ácido gama-aminobutírico	156, 174, 202, 216, 218, 230, 232, 258, 304.	30
8	23.26	Cisteína, Prolina, Fenilalanina	100, 117, 142, 192, 218, 220, 266.	30
9	25.60	Xilose, Ramnose, Ribitol	103, 117, 160, 217, 277, 307, 319.	30
10	28.50	Citrato, Asparagina	114, 188, 202, 211, 273, 375, 405.	30
11	30.40	Frutose, Galactose, Lisina, Manitol, Tirosina	156, 157, 160, 174, 179, 217, 218, 280, 307, 317, 319.	30
12	34.00	Inositol, Triptofano	191, 202, 218, 291, 305, 318.	30
13	38.00	Glicose-6-fosfato, Sacarose, Trealose	169, 191, 299, 357, 361, 387, 437, 351.	30

### 6.5.3. ALOCAÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO

A análise da alocação de carbono e nitrogênio foi feita através da combustão de biomassa em analisador de carbono, nitrogênio e enxofre (CN-628S, Leco<sup>®</sup>, St. Joseph – MI, EUA). Foram utilizados 100 mg de material liofilizado para folhas e raízes. A secagem foi feita em estufas a 60 °C por no mínimo 12 horas. A pesagem das amostras ocorreu em folhas de estanho que, em seguida, foram vedadas para a retirada de ar.

A combustão ocorre a 950 °C. O gás hélio (He) ( $H_2O < 3$  ppm,  $O_2 < 2$  ppm) foi o carreador à pressão de 669 mm·Hg. A curva padrão foi feita empregando folha de pomar seca em estufa (Leco 502-055 – 44 a 52% C e 2,0 a 2,8% N) para os pontos mais baixos da curva e fenilalanina (Leco 502-642 – 65,4% C e 8,5% N) para os pontos mais altos.

## 7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente foi testada a normalidade dos dados com o teste Shapiro-Wilk. Os dados de  $A_{max}$ ,  $C_i$  e amido foliar não necessitaram ser normalizados. Os dados de Gs e os de amido radicular foram normalizados utilizando a função do software R “sqrt(sqrt)” e a função “sqrt”, respectivamente. Os dados de E foram normalizados utilizando a função “log”. Cada componente analisado no perfil metabólico radicular foi normalizado usando um tipo de função: para piruvato, alanina, prolina, glicina, cisteína, serina, lisina, treonina, GABA, fumarato, malato, citrato e trealose usou-se “sqrt”; para lactato, succinato, glicose-6-P, glicose e sacarose usou-se “log<sub>2</sub>”.

Para as análises morfológicas, bioquímicas e fisiológicas foi feita ANOVA para testar a diferença dentro de cada bloco temporal quanto aos grupos (tratamento x controle) e biomas (Amazônia x Cerrado) na variável dependente alvo. Comparou-se, deste modo, os grupos AmazôniaAlagado x AmazôniaControle x CerradoAlagado x CerradoControle. O teste *a posteriori* utilizado foi o Tukey. Para as análises, foi utilizado o *software* R 3.3.0.



## 8. RESULTADOS

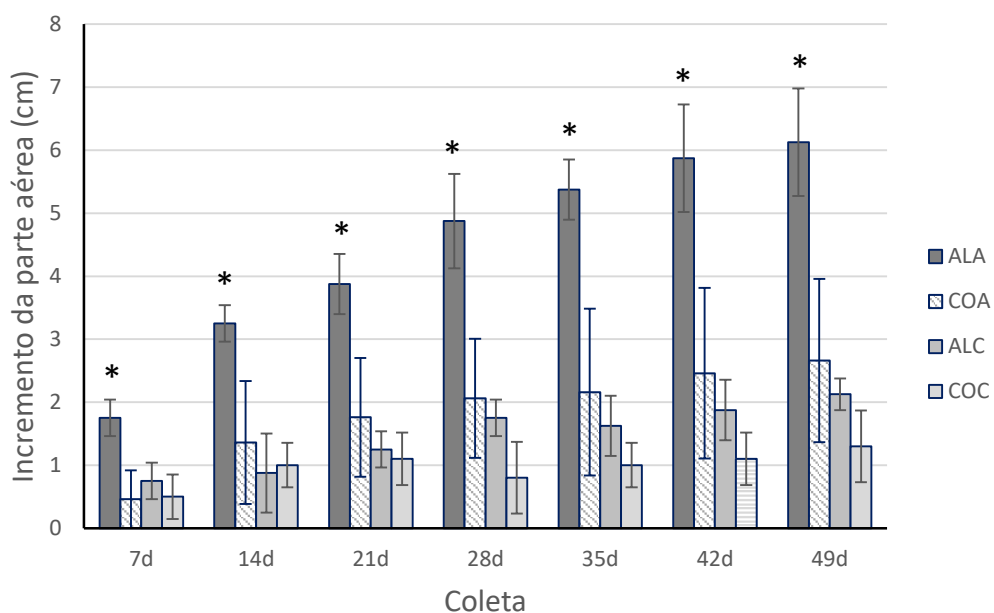
### 8.1. PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

Durante o experimento de alagamento parcial, foram avaliadas diversas medições morfológicas, além dos parâmetros fisiológicos. Essas medições foram: Diâmetro do caule, altura da parte aérea, número de folhas e presença de lenticelas e raízes adventícias. Em alguns desses parâmetros (número de folhas e diâmetro relativo do caule), não foram observadas diferenças oriundas do tratamento de alagamento parcial, mas existem duas características que merecem atenção: o incremento da parte aérea e a fração de massa radicular.

O incremento da parte aérea das plantas alagadas da Amazônia foi, desde o sétimo dia de experimento, maior que o incremento do seu controle e que os dois grupos provenientes do Cerrado. Em contrapartida, as plantas alagadas e controle do Cerrado cresceram de forma uniforme, sem diferenças causadas pelo alagamento (Tabela 4; Figura 6). Isso impacta no dado de fração de massa radicular em relação a massa seca total das plantas. O grupo amazônico, que mostrou o maior crescimento da parte aérea desde o sétimo dia de alagamento, também teve uma menor fração de massa radicular que seu controle a partir do mesmo dia, chegando a apresentar cerca de 10% menos raiz que o controle (Tabela 5; Figura 7). Isso demonstra maior investimento em crescimento da parte aérea pelas plantas amazônicas. Já as plantas alagadas do Cerrado só apresentaram uma fração de massa radicular mais baixa no 28º dia de alagamento, o que não foi acompanhado pelo crescimento da parte aérea.

**Tabela 4.** *P-values* para os valores de incremento da parte aérea de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

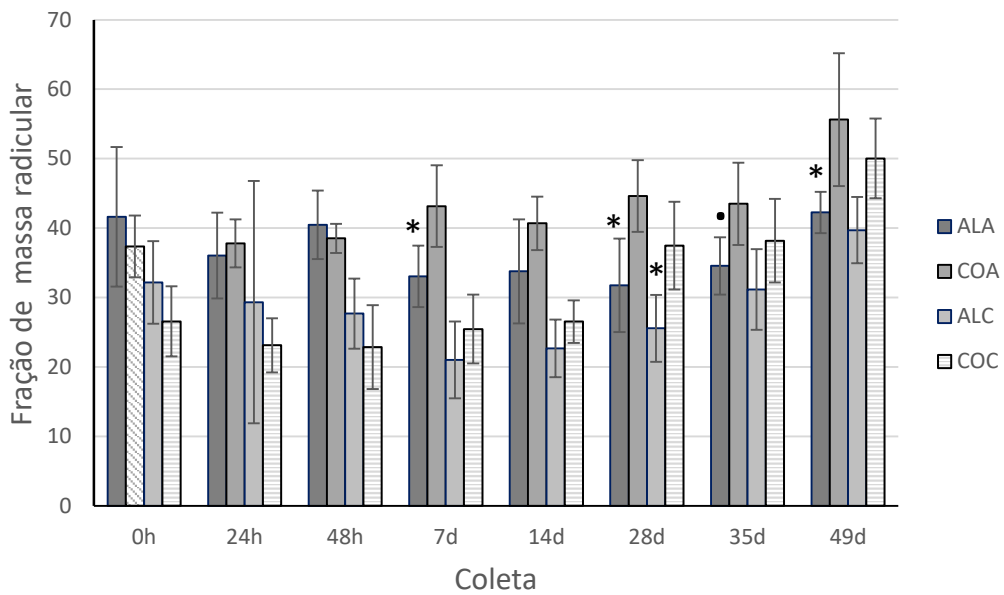
Incremento da parte aérea	AIA x CoA	CoA x CoC	AIA x AIC	AIC x CoC
7d	<b>0.016</b>	0.962	0.257	0.749
14d	<b>0.048</b>	0.954	<b>0.007</b>	0.874
21d	<b>0.005</b>	0.418	<b>0.002</b>	0.962
28d	<b>0.012</b>	<b>0.040</b>	<b>0.008</b>	0.110
35d	<b>0.002</b>	0.163	<b>0.001</b>	0.523
42d	<b>0.001</b>	<b>0.067</b>	<b>0.000</b>	0.337
49d	<b>0.002</b>	<b>0.075</b>	<b>0.001</b>	0.304



**Figura 6.** Incremento da parte aérea de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), ALC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.

**Tabela 5.** *P-values* para os valores de fração de massa radicular por massa seca de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores  $< 0.05$  indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

% raiz	AIA x CoA	CoA x CoC	AIA x AIC	AIC x CoC
0h	0.750	<b>0.093</b>	0.160	0.571
24h	0.992	0.115	0.689	0.740
48h	0.911	<b>0.001</b>	<b>0.003</b>	0.437
7d	<b>0.051</b>	<b>0.001</b>	<b>0.012</b>	0.597
14d	0.175	<b>0.004</b>	<b>0.015</b>	0.673
28d	<b>0.014</b>	0.251	0.363	<b>0.024</b>
35d	<b>0.088</b>	0.452	0.763	0.222
49d	<b>0.019</b>	0.557	0.916	0.108



**Figura 7.** Fração de massa radicular por massa seca de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), ALC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.

Percebeu-se que o tratamento de alagamento parcial não interferiu significativamente nos parâmetros de crescimento relativo do diâmetro do caule e o número relativo de folhas. Nesse caso, o fator mais importante foi o bioma do qual as plantas são provenientes. O crescimento relativo do diâmetro caulinar das plantas do Cerrado é maior que o das plantas da Amazônia, independentemente do tratamento (Tabela 6). Em relação ao número relativo de folhas, as plantas da Amazônia não perderam folhas e as do Cerrado perderam folhas ao longo do experimento, independentemente do tratamento (Tab. 6). Deste modo, percebe-se que as plantas amazônicas finalizaram o experimento com mais folhas que as plantas do Cerrado.

Avaliou-se também o aparecimento de lenticelas e raízes adventícias nas plantas alagadas. Para ambos os grupos se observou que 4 de 5 plantas apresentavam raízes adventícias no 21º dia de experimento. Já quanto ao aparecimento de lenticelas, todas as plantas alagadas de ambos os grupos já as apresentavam desde o 7º dia de experimento.

**Tabela 6.** Valores médios para número de folhas e diâmetro caulinar relativos aos valores observados em  $t = 0$  de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

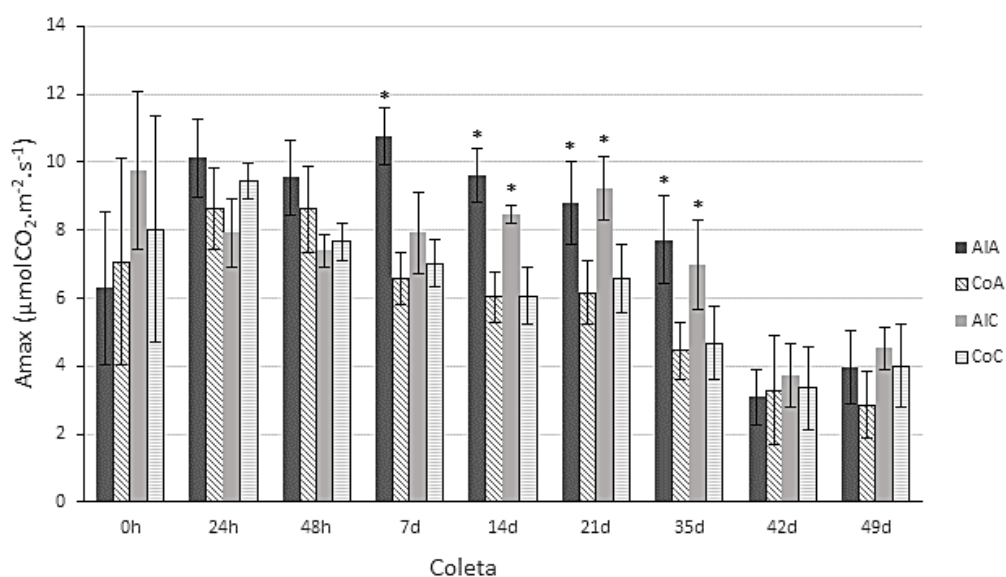
Coleta	7d	14d	21d	28d	35d	42d	49d
<b>Média do número de folhas relativo a medida em <math>t=0</math></b>							
AIA	0	0	-0.4	-0.4	-0.2	-0.6	-0.4
CoA	0.2	0.6	-0.2	0.2	0.2	0	-0.8
AIC	-0.8	-2.4	-2	-2.2	-2.4	-2.2	-2.4
CoC	0	-1	-1.4	-1.6	-2	-3.8	-3.2
<b>Média do incremento do diâmetro do caule (mm)</b>							
AIA	0.1	0.9	1.1	1.5	1.8	1.8	2.3
CoA	0.3	0.9	1.0	1.4	1.5	1.8	2.1
AIC	0.4	1.3	2.1	2.6	3.3	3.1	3.8
CoC	0.8	1.2	1.7	2.4	2.3	2.9	3.6

## 8.2. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

A partir da utilização do Infrared Gas Analyser (IRGA) foi possível medir diversos parâmetros foliares *in vivo*, em um procedimento não destrutivo. Mediu-se desta forma os índices de fotossíntese máxima ( $A_{max}$ ), condutância estomática (Gs), transpiração (E) e carbono interno ( $C_i$ ) das plantas alagadas e controles.

A partir dessas medidas verificou-se que os dois grupos submetidos ao tratamento de alagamento parcial apresentaram maior  $A_{max}$ , Gs e E que os respectivos controles nas medições dos dias 7, 14, 21 e 35 do experimento, sendo os três primeiros dias pertencentes ao período de alagamento e o último pertencente ao período de recuperação, respectivamente. O aumento dessas taxas parece ser influenciado pelo alagamento parcial, já que o último dia em que é verificado (35º) é o segundo dia após a retirada do alagamento.

As plantas do grupo AIA apresentaram maior  $A_{max}$  em relação a CoA do 7º até o 35º dia do experimento e as plantas do grupo AIC exibiram maior  $A_{max}$  do 14º dia até o 35º em relação a CoC (Figura 8). Nota-se, portanto, um atraso do aumento da taxa fotossintética nas plantas do cerrado em resposta ao estresse de alagamento, quando comparadas às plantas da Amazônia. Outra evidência da resposta fotossintética mais rápida nas plantas amazônicas foi que, de 24h até o 7º dia de alagamento, os indivíduos AIA apresentaram maior  $A_{max}$  que os AIC (Tabela 7).



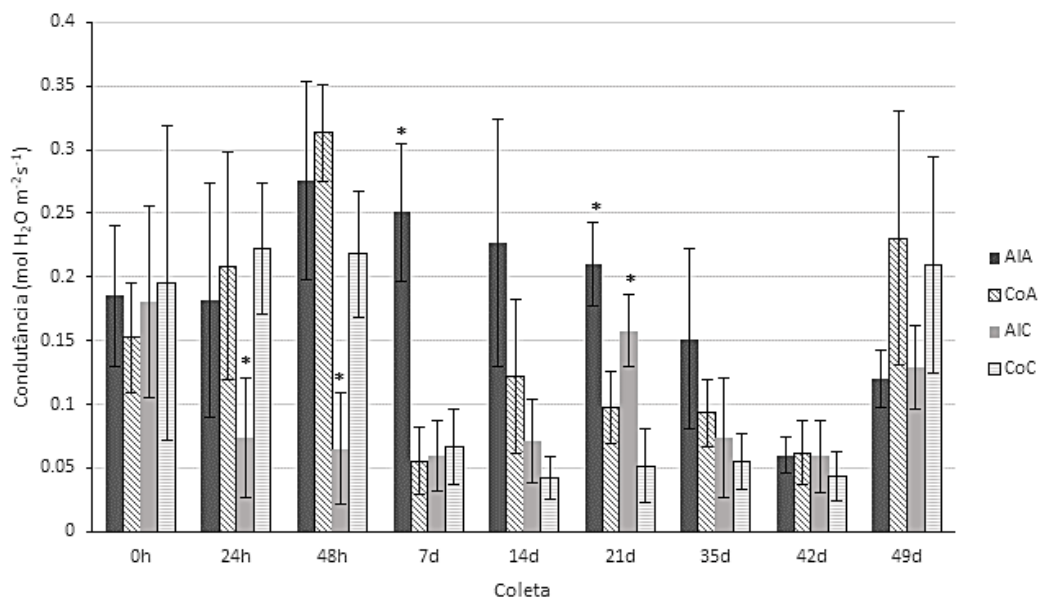
**Figura 8.** Fotossíntese máxima ( $A_{max}$ ) de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.

**Tabela 7.** *P-values* para os valores de fotossíntese máxima ( $A_{max}$ ) de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores  $< 0.05$  indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

$A_{max}$	AIA x CoA	CoA x CoC	AIA x AIC	AIC x CoC
0h	0.971	0.945	0.235	0.756
24h	0.129	0.582	<b>0.016</b>	0.119
48h	0.397	0.379	<b>0.009</b>	0.970
7d	<b>0.000</b>	0.864	<b>0.001</b>	0.404
14d	<b>0.000</b>	0.100	<b>0.078</b>	<b>0.000</b>
21d	<b>0.005</b>	0.920	0.904	<b>0.004</b>
35d	<b>0.002</b>	0.991	0.759	<b>0.026</b>
42d	0.994	0.938	0.838	0.100
49d	0.336	0.303	0.805	0.303

Indivíduos do grupo AIA apresentaram maior condutância estomática que CoA do 7º ao 21º dia de alagamento. Já as plantas do grupo AIC mostraram menor condutância às 24h e 48h de alagamento em comparação com CoC, mas chegaram a maiores níveis de condutância no 21º dia (Figura 9). As restrições estomáticas apresentadas nas primeiras horas de alagamento somente pelas plantas alagadas do cerrado, indicam novamente um atraso dos mecanismos de resposta ao estresse, o que não parece existir nas plantas amazônicas.

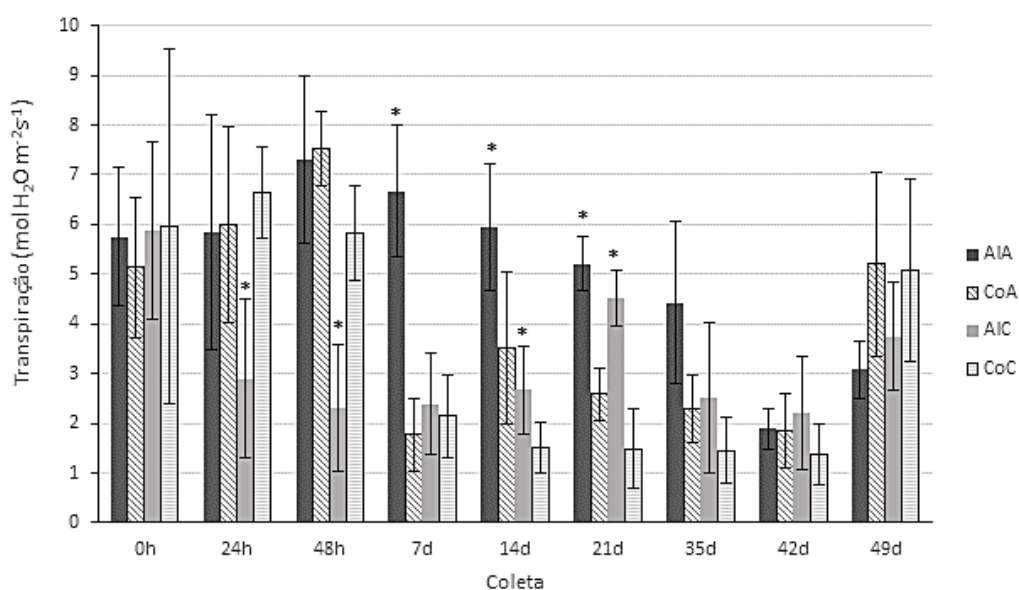
Além de não apresentar restrições estomáticas quando alagadas, a condutância em AIA foi maior que em AIC de 48h até 21 dias de alagamento (Tabela 8). As medidas de transpiração seguiram os mesmos padrões de diferenças que as de condutância, exceto pelo fato de que plantas do grupo AIA apresentaram maior transpiração do que AIC apenas de 48h até 14 dias após o início do alagamento (Figura 10 e Tabela 9).



**Figura 9.** Condutância estomática média de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.

**Tabela 8.** *P-values* para os valores de condutância estomática de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores  $< 0.05$  indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

Condutância	AIA x CoA	CoA x CoC	AIA x AIC	AIC x CoC
0h	0.953	0.999	0.999	0.995
24h	0.928	0.983	0.056	<b>0.008</b>
48h	0.853	0.273	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
7d	<b>0.000</b>	0.903	<b>0.000</b>	0.959
14d	<b>0.078</b>	<b>0.016</b>	<b>0.002</b>	0.412
21d	<b>0.002</b>	<b>0.019</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
35d	0.440	0.354	0.074	0.934
42d	0.100	0.991	0.993	0.531
49d	0.053	0.089	0.993	0.967



**Figura 10.** Transpiração média de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,06$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.

**Tabela 9.** *P-values* para os valores de transpiração de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores  $< 0.06$  indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

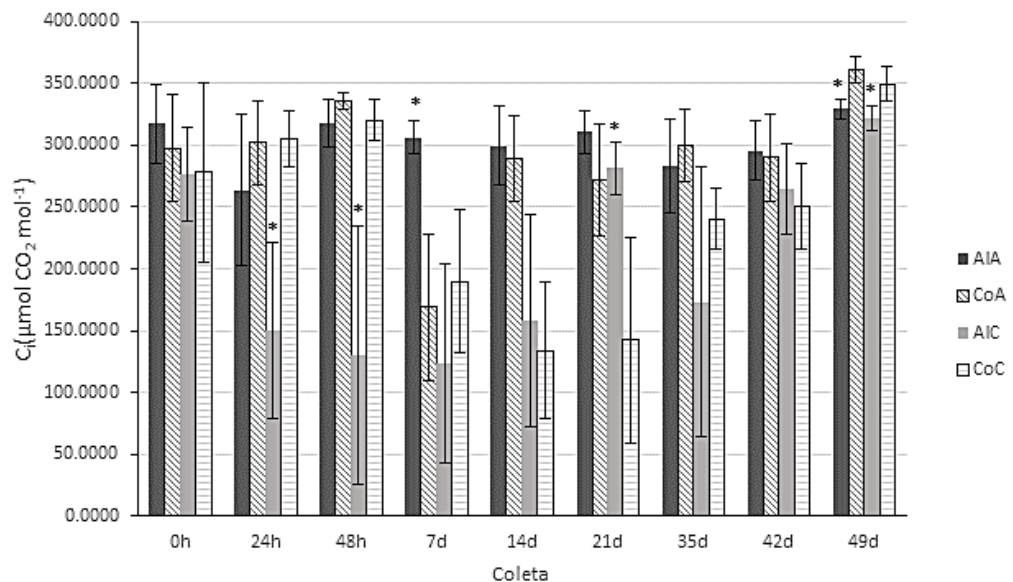
Transpiração	AIA x CoA	CoA x CoC	AIA x AIC	AIC x CoC
0h	0.986	0.991	1.000	0.924
24h	0.993	0.951	<b>0.050</b>	<b>0.010</b>
48h	0.993	0.586	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
7d	<b>0.000</b>	0.848	<b>0.001</b>	0.989
14d	<b>0.057</b>	<b>0.006</b>	<b>0.005</b>	<b>0.059</b>
21d	<b>0.007</b>	<b>0.015</b>	0.871	<b>0.000</b>
35d	0.213	0.369	0.159	0.464
42d	0.995	0.692	0.999	0.466
49d	0.953	0.100	0.793	0.486

Somente  $A_{max}$  se manteve diferente entre grupos controle e tratamento três dias após a retirada do alagamento (no 35º dia). Já a condutância estomática e a transpiração dos indivíduos dos grupos tratamento mostraram-se iguais aos dos grupos controle desde a primeira medição do período de recuperação.

As medidas de concentração de carbono intercelular ( $C_i$ ) acompanharam parcialmente as tendências vistas nas medições de condutância estomática e transpiração (Figura 11). No 7º dia do experimento, os indivíduos AIA apresentaram maior  $C_i$  que seus

respectivos controles, seguindo o aumento de Gs e E (Tabela 10). Entretanto, nos dias 14 e 21 não se pôde notar diferença significativa entres esses grupos quanto as medidas de  $C_i$ , ainda que os índices significativamente maiores de condutância e transpiração em AIA tenham permanecido.

Os indivíduos AIC apresentaram  $C_i$  significativamente menor que seus respectivos controles às 24h e 48h de experimento e significativamente maior no 21º dia, seguindo parâmetros previamente apresentados para Gs e E. O grupo AIA apresentou  $C_i$  significativamente maior que os do grupo AIC, de 48h até 14 dias de alagamento, tendência vista também para  $A_{max}$ , Gs e E. Isso é um indício de que a resposta fisiológica das plantas da Amazônia, quando submetidas ao alagamento, é mais intensa que a das plantas do Cerrado, no sentido de intensificação da fotossíntese.



**Figura 11.** Concentração de carbono intercelular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.



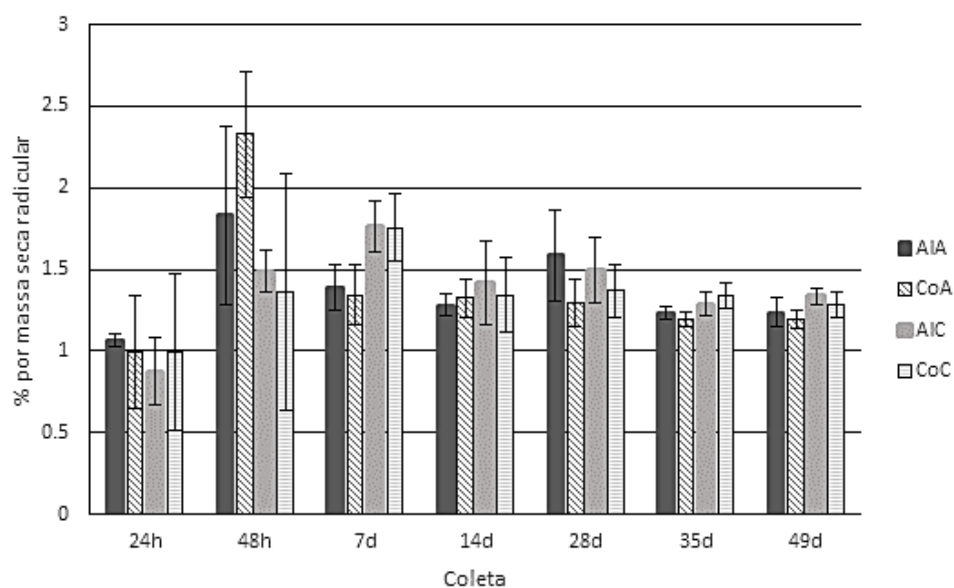
**Tabela 10.** *P-values* para os valores de carbono interno de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

C <sub>i</sub>	AIA x CoA	CoA x CoC	AIA x AIC	AIC x CoC
0h	0.921	0.920	0.575	0.100
24h	0.622	0.100	0.241	<b>0.027</b>
48h	0.932	0.954	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>
7d	<b>0.008</b>	0.934	<b>0.008</b>	0.881
14d	0.989	<b>0.003</b>	<b>0.005</b>	0.904
21d	0.597	<b>0.004</b>	0.783	<b>0.002</b>
35d	0.974	0.437	<b>0.049</b>	0.334
42d	0.993	0.269	0.467	0.908
49d	<b>0.001</b>	0.342	0.699	<b>0.005</b>

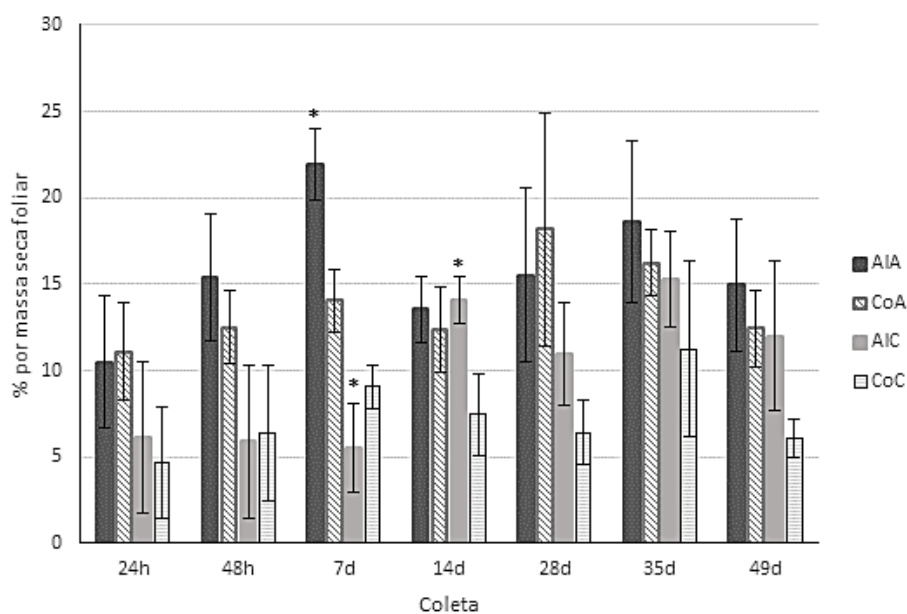
### 8.3. AMIDO

O amido dosado a partir do material radicular se mostrou constante durante todo o período de experimento (Figura 12). Já o amido dosado a partir do material foliar apresentou variações estatisticamente significativas (Figura 13).

No 7º dia de experimento, os indivíduos AIA apresentaram amido foliar significativamente maior que os indivíduos CoA. Nesse mesmo dia, os índices de amido foliar em AIC foram significativamente menores em relação a CoC, tornando-se significativamente maiores somente no 14º dia de alagamento (Tabela 11). Os dias em que AIA e AIC apresentaram mais amido foliar que seus respectivos controles foram também os primeiros dias em que esses grupos apresentaram maior  $A_{max}$  que seus controles, entretanto essa percentagem de amido foliar não permaneceu alta nos dias subsequentes de maiores índices fotossintéticos dos grupos alagados.



**Figura 12.** Porcentagem de amido radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Não houve diferença significativa entre os grupos tratamento e controle. Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de teste de Tukey.



**Figura 13.** Porcentagem de amido foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), AIC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,065$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.

**Tabela 11.** *P-values* para os valores de amido foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

Amido foliar	AIA x CoA	CoA x CoC	AIA x AIC	AIC x CoC
24h	0.992	0.070	0.250	0.929
48h	0.617	<b>0.034</b>	<b>0.005</b>	0.995
7d	<b>0.025</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.063</b>
14d	0.803	<b>0.013</b>	0.974	<b>0.001</b>
28d	0.824	<b>0.005</b>	0.456	0.421
35d	0.748	0.239	0.518	0.404
49d	0.621	<b>0.049</b>	0.498	0.070

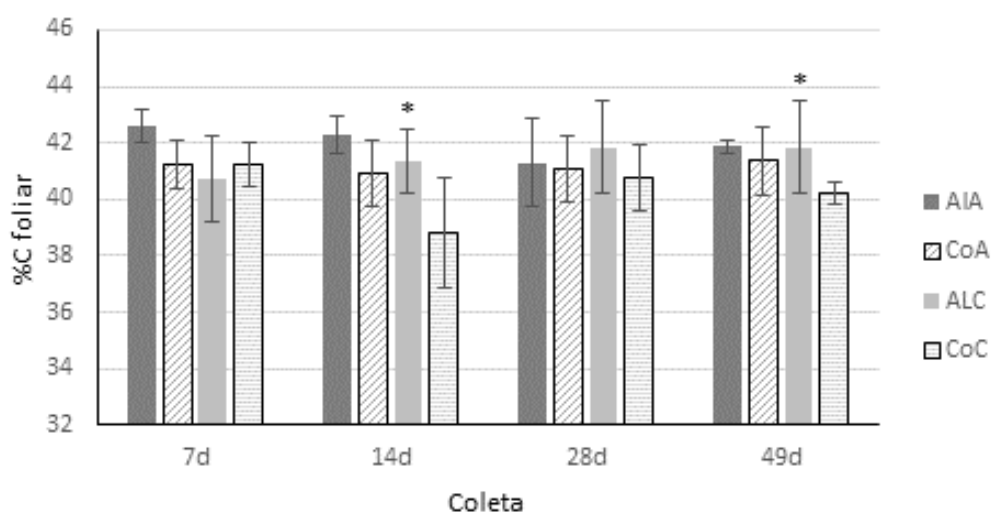
#### 8.4. ALOCAÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO

A partir da análise de biomassa foliar e radicular seca em analisador elementar foi possível visualizar a porcentagem de Carbono e Nitrogênio presentes nos tecidos avaliados. Essa porcentagem fornecida é equivalente ao total do elemento presente no órgão, compondo uma miríade de moléculas e estruturas.

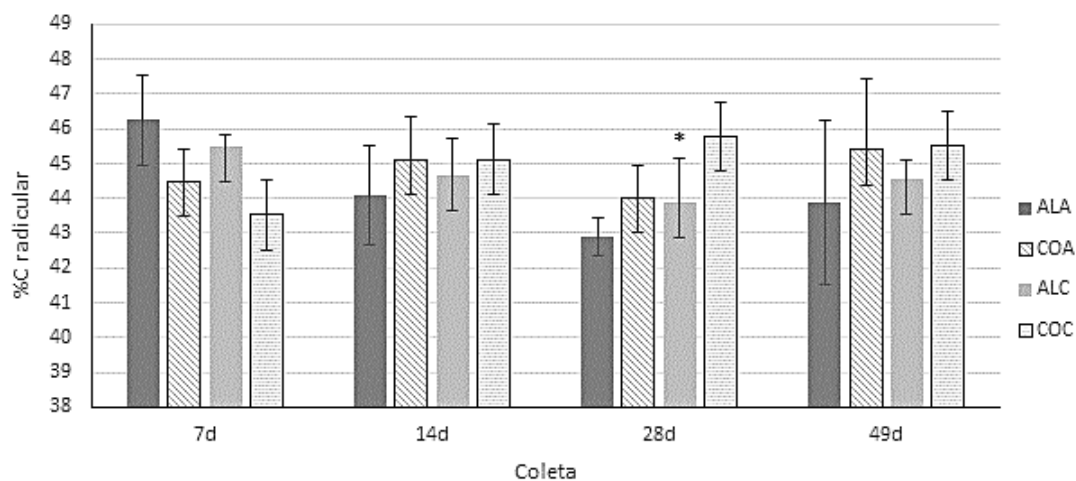
Para o carbono foliar, verificamos diferenças significativas entre o grupo alagado do Cerrado e seu respectivo controle nos dias 14, período ainda alagado, e 49, último dia de experimento (período de recuperação) (Figura 14; Tabela 12). Nesses dias, o grupo alagado deteve mais carbono foliar que o grupo controle. No dia 7 também verificou-se que o grupo alagado da Amazônia apresentou mais carbono foliar que o grupo alagado do Cerrado. Nesse dia, as árvores alagadas da Amazônia já exibiam taxa fotossintética maiores que as árvores alagadas do cerrado (Fig. 8).

Quanto a porcentagem de carbono radicular nota-se pouca diferença significativa entre os grupos alagados e controles. O que chama atenção é que no 28º dia de alagamento (quase o último dia de imposição de estresse) as plantas alagadas do cerrado apresentaram menos %C radicular que seu grupo controle (Figura 15; Tab. 12). É importante lembrar que a porcentagem de amido se mostrou indiferente nesse dia para esses mesmos grupos (Fig. 12), indicando que a diminuição de C se deu através da perda de outros compostos.

Ao observar as figuras 14 e 15 percebe-se que o tratamento de alagamento não influenciou os estoques de C foliares e radiculares das plantas provenientes da Amazônia. O grupo tratamento da Amazônia não exibe diferenças significativas quando comparados ao seu respectivo controle.



**Figura 14.** Porcentagem de Carbono (C) por massa seca foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), ALC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.



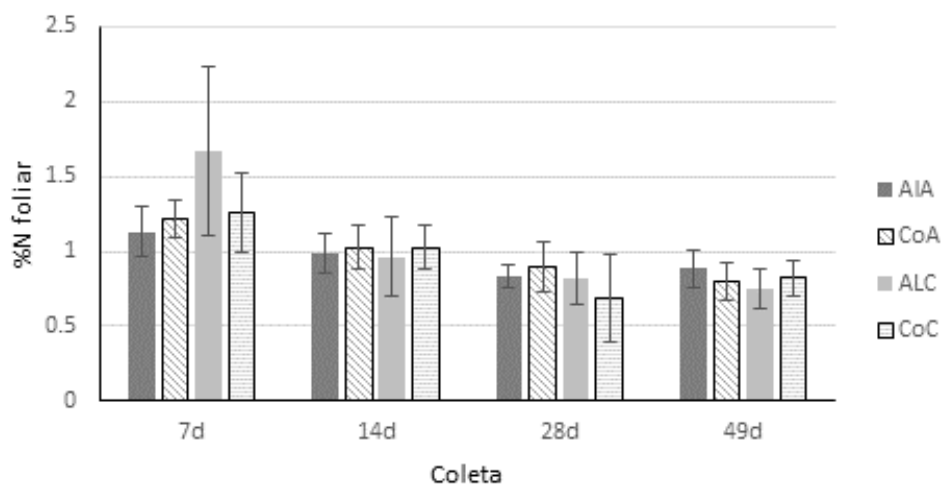
**Figura 15.** Porcentagem de Carbono (C) por massa seca radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são ALA (Alagado Amazônia), COA (Controle Amazônia), ALC (Alagado Cerrado) e COC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.

**Tabela 12.** *P-values* para os valores de porcentagem de carbono (C) foliar e radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.06 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

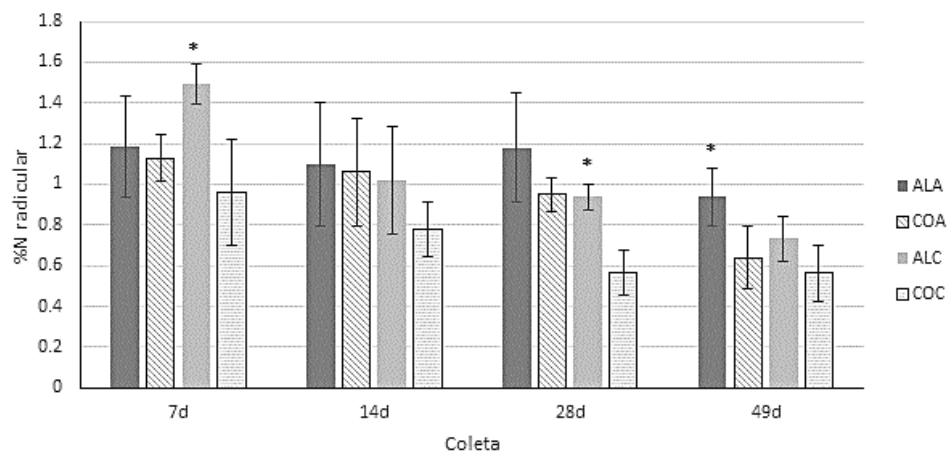
<b>% C foliar</b>	<b>AIA x CoA</b>	<b>CoA x CoC</b>	<b>AIA x AIC</b>	<b>AIC x CoC</b>
7d	0.166	1.000	<b>0.042</b>	0.874
14d	0.354	0.098	0.641	<b>0.040</b>
28d	0.991	0.983	0.925	0.594
49d	0.717	0.146	0.899	<b>0.057</b>
<b>% C radicular</b>				
7d	0.084	0.676	0.663	0.151
14d	0.644	0.999	0.908	0.953
28d	0.274	<b>0.055</b>	0.368	<b>0.038</b>
49d	0.632	0.999	0.953	0.854

Analisando a porcentagem de nitrogênio foliar, verificamos que o tratamento não influenciou o estoque deste elemento nas folhas, indicando não haver perda significativa de capacidade fotossintética (Figura 16; Tabela 13). Já quando se observa a porcentagem de N radicular, percebe-se que os grupos alagados do cerrado apresentam maior porcentagem de N que seus controles no 7º e 28º dias de alagamento (Figura 17; Tab. 13). Veremos a seguir que, também no 7º dia, as plantas alagadas do cerrado apresentaram aumento de aminoácidos (alanina, prolina, glicina, cisteína, serina, treonina e GABA) em relação ao seu grupo controle (Figura 18).

Ainda sobre %N radicular, percebe-se que, aos 49 dias de experimento, as plantas amazônicas que haviam sido alagadas apresentam maior porcentagem deste elemento que seu respectivo controle (Fig. 17). Durante todos os outros dias de experimento, incluindo os dias de alagamento e de recuperação, o tratamento não influenciou na porcentagem de N radicular das plantas provenientes da amazônia. Desta forma, assim como para a porcentagem de C, percebemos que o alagamento gera pouca influencia no estoque de nitrogênio dessas plantas.



**Figura 16.** Porcentagem de Nitrogênio (N) por massa seca foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), ALC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.



**Figura 17.** Porcentagem de Nitrogênio (N) por massa seca radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. Os grupos representados são AIA (Alagado Amazônia), CoA (Controle Amazônia), ALC (Alagado Cerrado) e CoC (Controle Cerrado). Cada barra equivale a média de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos marcam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos alagados e seus respectivos controles. ANOVA seguida de teste de Tukey.

**Tabela 13.** *P-values* para os valores de porcentagem de nitrogênio (N) foliar e radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a 32 dias de alagamento parcial e 17 dias de recuperação. Os valores < 0.05 indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tempo de coleta. Foi feita uma ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey. (CoA) Controle Amazônia, (AIA) Alagado Amazônia, (CoC) Controle Cerrado, (AIC) Alagado Cerrado.

<b>% N foliar</b>	<b>AIA x CoA</b>	<b>CoA x CoC</b>	<b>AIA x AIC</b>	<b>AIC x CoC</b>
7d	0.939	0.999	0.067	0.237
14d	0.993	0.999	0.974	0.907
28d	0.981	0.301	0.999	0.559
49d	0.790	0.996	0.361	0.807
<b>%N radicular</b>				
7d	0.985	0.682	0.166	<b>0.039</b>
14d	0.996	0.343	0.967	0.458
28d	0.161	<b>0.003</b>	0.132	<b>0.003</b>
49d	<b>0.018</b>	0.788	0.166	0.197

## 8.5. PERFIL METABÓLICO RADICULAR

O perfil metabólico verificado a partir do material radicular de *G. ulmifolia* apresentou diversas alterações entre as primeiras 24 horas e o 14º dia de experimento (Fig. 18). O lactato do grupo AIC mostrou-se mais de 15 vezes maior que CoC 24h depois do início do alagamento parcial (Fig. 18B). Este composto é produzido no metabolismo anaeróbico mediante a fermentação láctica e apresenta função importante principalmente no início do estresse por alagamento.

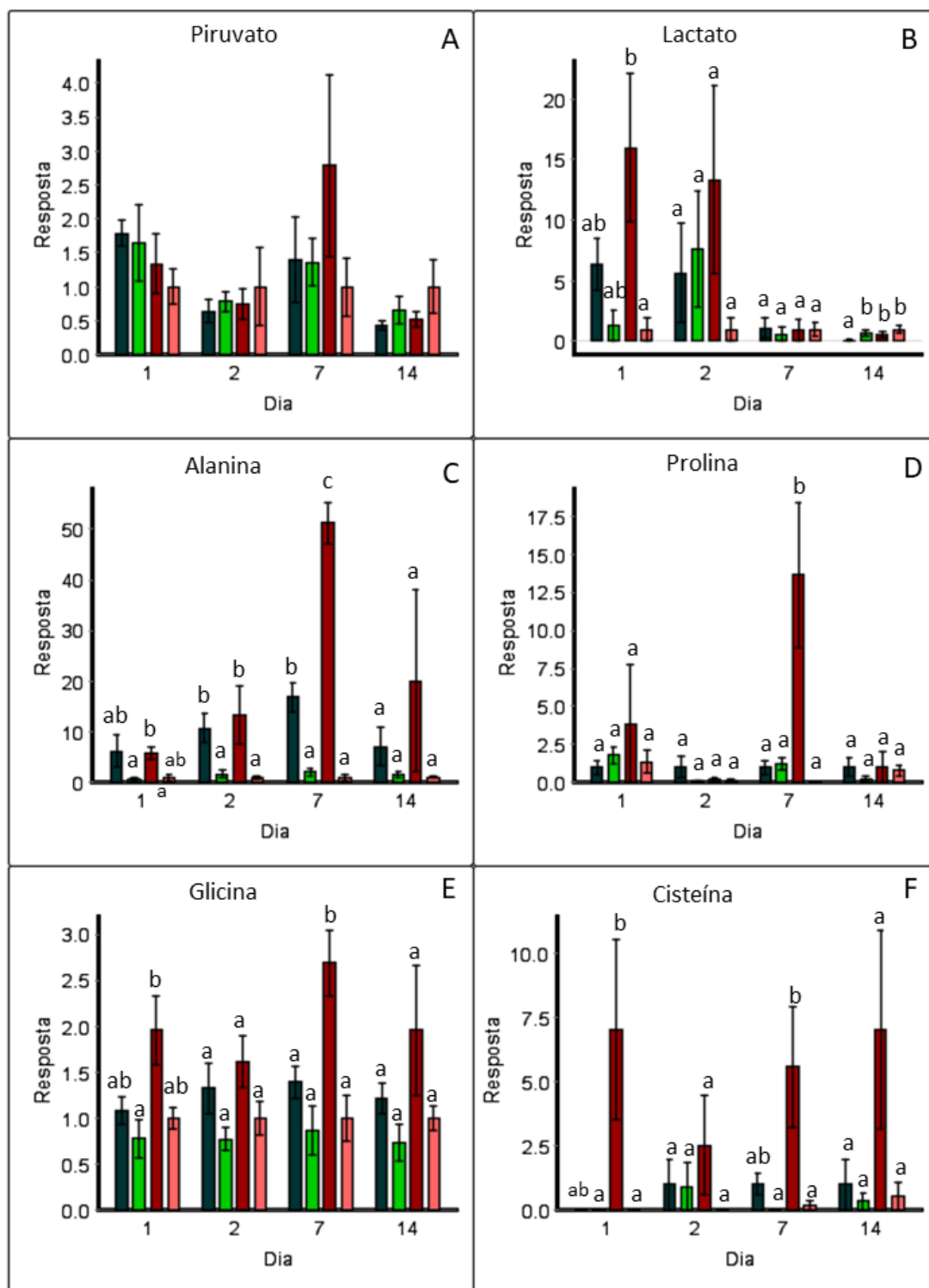
Outro metabólito intimamente relacionado ao metabolismo anaeróbico e que apresentou importantes alterações no perfil metabólico dos indivíduos submetidos ao alagamento foi alanina (Fig. 18C). Após 48h de alagamento, alanina em AIC apresentou resposta cerca de 15 vezes maior que CoC e chegou a ser 50 vezes maior que seu controle no 7º dia de estresse. Também no 7º dia de alagamento, alanina do grupo AIA mostrou-se mais de 16 vezes maior que seu controle.

Entre 24h e o 7º dia do experimento houve também um aumento significativo de succinato nos grupos alagados em relação aos seus controles (Fig. 18K). Apenas 24h após o início do alagamento, os indivíduos do grupo AIC e AIA apresentaram quase o dobro de succinato que que seus respectivos controles. Após 48h de alagamento, a quantidade de succinato do grupo AIA foi cerca de 6 vezes maior que a de CoA. Esse índice se manteve até o 7º dia de experimento, enquanto no grupo AIC o succinato chegou a ser mais de 4 vezes maior que em CoC.

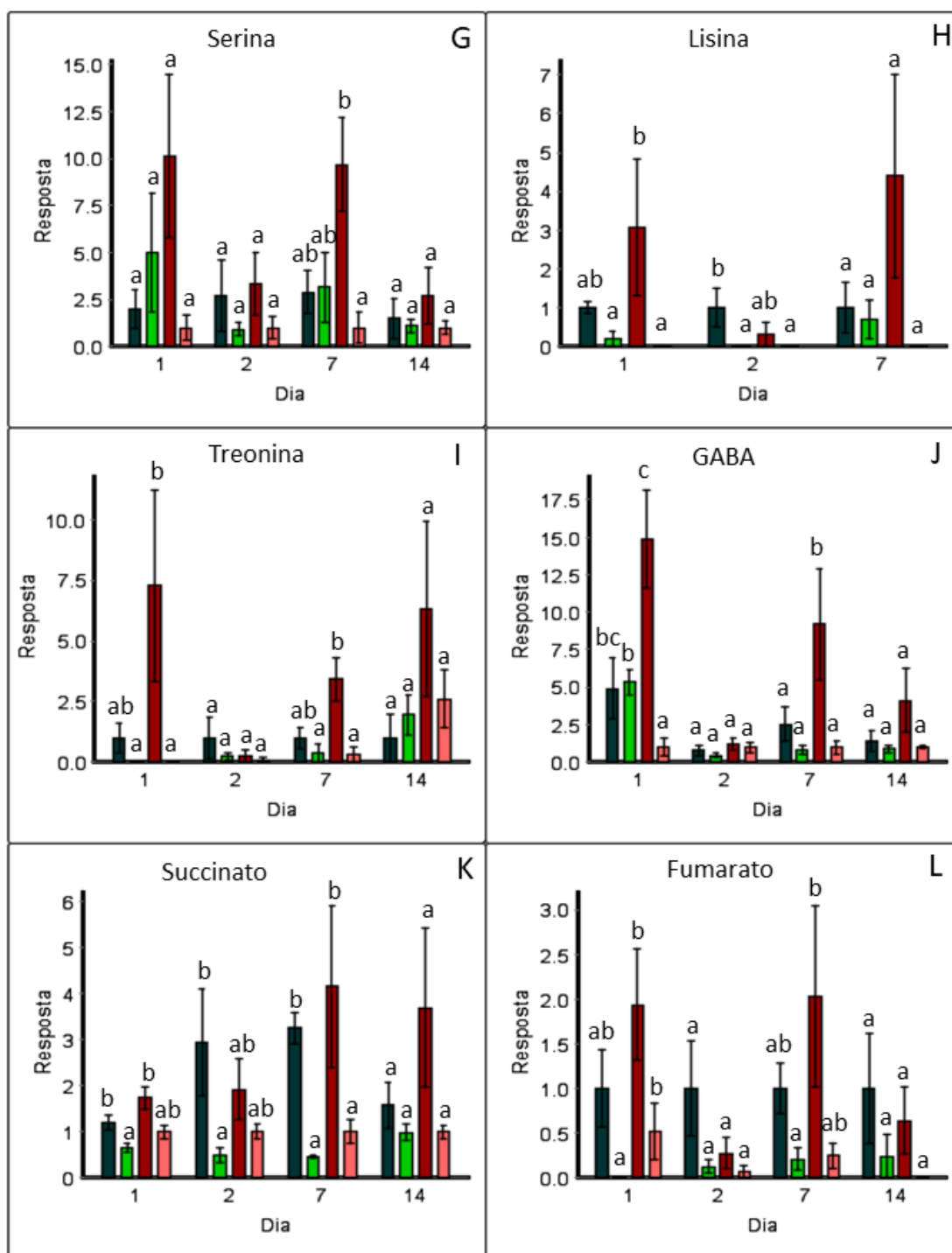
O ácido gama-aminobutírico (GABA) é frequentemente associado a diversas situações de estresse e no contexto desse experimento de alagamento parcial apresentou alterações significativas nas 24h iniciais e no 7º dia de tratamento (Fig. 18J). Logo nas primeiras 24h, os indivíduos do grupo AIC apresentaram 15 vezes mais GABA que os indivíduos CoC. Com 48h de experimento esse índice parece ter voltado ao normal, porém, no 7º dia de alagamento, AIC volta a apresentar altos índices de GABA (cerca de 10 vezes mais que seu controle). É também no 7º dia de tratamento que o grupo AIA apresenta mais que o dobro de GABA em relação a CoA.

Outro ponto importante a se frisar é que no 7º dia de alagamento o grupo AIC apresentou aumento em cinco aminoácidos, quando comparado ao seu controle. São esses aminoácidos: glicina (2,75 vezes maior em AIC); serina (10 vezes maior em AIC); treonina (cerca de 7 vezes maior em AIC); cisteína (cerca de 12 vezes maior em AIC) e prolina (mais de 12 vezes maior em AIC) (Figs. 18E, 18G, 18I, 18F e 18D).

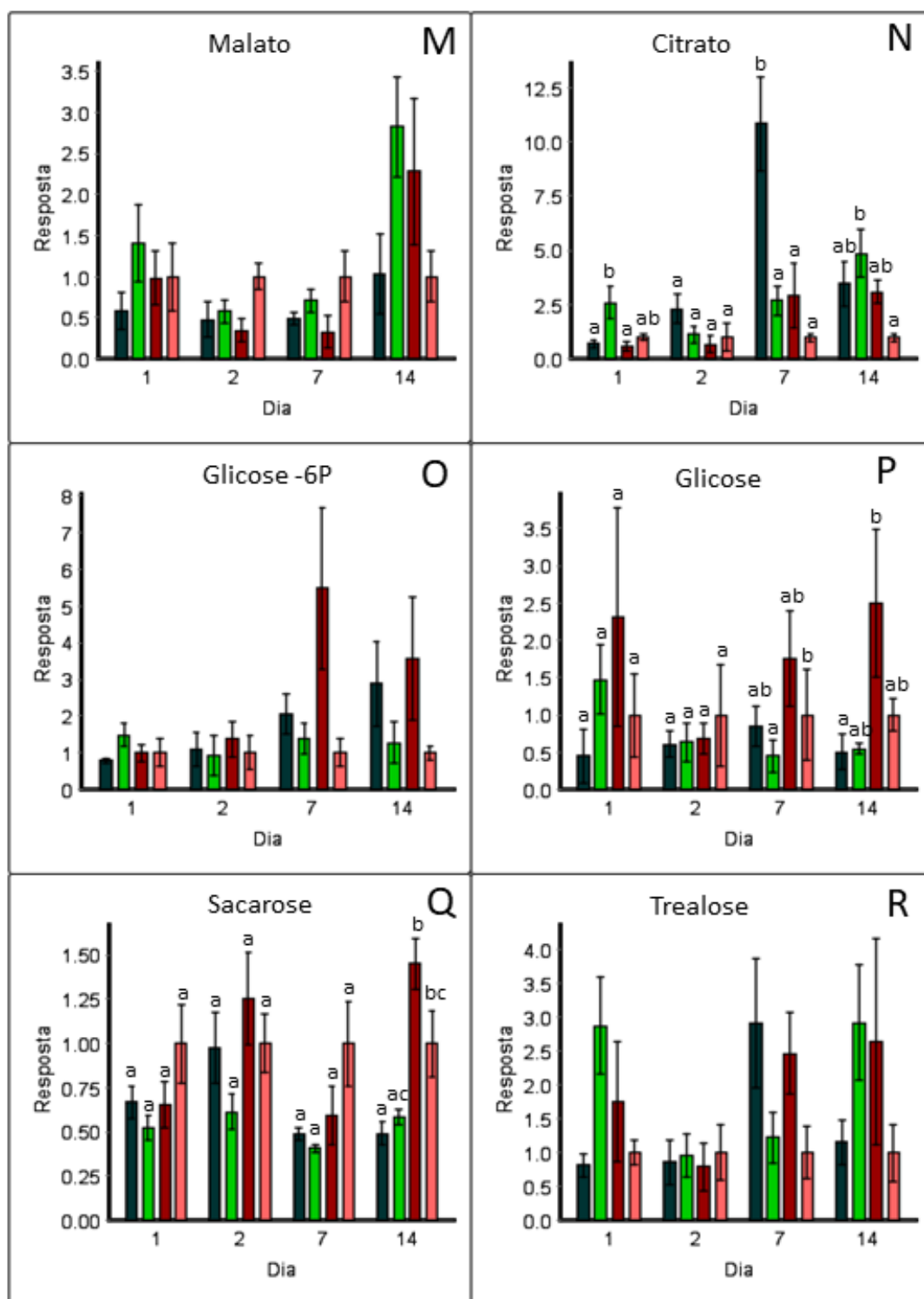




**Figura 18.** Perfil metabólico radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. A barra verde escura representa o grupo alagado Amazônia (AIA), a verde clara o grupo controle Amazônia (CoA), a vermelho escura o grupo alagado Cerrado (AIC) e a rosa o grupo controle Cerrado (CoC). Todos os gráficos representam os índices dos grupos AIA, AIC e CoA em relação ao CoC, exceto os gráficos D, F, H, I e L, que foram calculados em relação ao grupo AIA. Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  erro padrão.  $p$  significativo  $< 0,05$ . As comparações marcadas com letras minúsculas se referem a diferenças entre os grupos dentro de cada tempo. Os gráficos que não possuem indicação de diferenças significativas, não apresentaram nenhuma diferença.



**Figura 18 (continuação).** Perfil metabólico radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. A barra verde escura representa o grupo alagado Amazônia (AIA), a verde clara o grupo controle Amazônia (CoA), a vermelho escura o grupo alagado Cerrado (AIC) e a rosa o grupo controle Cerrado (CoC). Todos os gráficos representam os índices dos grupos AIA, AIC e CoA em relação ao CoC, exceto os gráficos D, F, H, I e L, que foram calculados em relação ao grupo AIA. Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  erro padrão.  $p$  significativo  $< 0,05$ . As comparações marcadas com letras minúsculas se referem a diferenças entre os grupos dentro de cada tempo. Os gráficos que não possuem indicação de diferenças significativas, não apresentaram nenhuma diferença.



**Figura 18 (continuação).** Perfil metabólico radicular de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. A barra verde escura representa o grupo alagado Amazônia (A1A), a verde clara o grupo controle Amazônia (CoA), a vermelho escura o grupo alagado Cerrado (A1C) e a rosa o grupo controle Cerrado (CoC). Todos os gráficos representam os índices dos grupos A1A, A1C e CoA em relação ao CoC, exceto os gráficos D, F, H, I e L, que foram calculados em relação ao grupo A1A. Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  erro padrão.  $p$  significativo  $< 0,05$ . As comparações marcadas com letras minúsculas se referem a diferenças entre os grupos dentro de cada tempo. Os gráficos que não possuem indicação de diferenças significativas, não apresentaram nenhuma diferença.

## 8.6. PERFIL METABÓLICO FOLIAR

Como já era esperado, o perfil metabólico foliar apresentou muito menos alterações que o perfil metabólico radicular (Figura 19). Isso pode ser explicado pela natureza do estresse que foi imposto às plantas do grupo tratamento, que foi alagamento parcial, atingindo especificamente a raiz das plantas.

Assim como na raiz, o piruvato não apresentou alterações significativas causadas pelo alagamento parcial (Fig. 19A). Já o lactato, que havia apresentado diferenças significativas entre controle e tratamento na raiz, não repetiu essas diferenças nas folhas, mostrando que as alterações causadas pelo alagamento ficaram restritas ao órgão afetado (Fig. 19B).

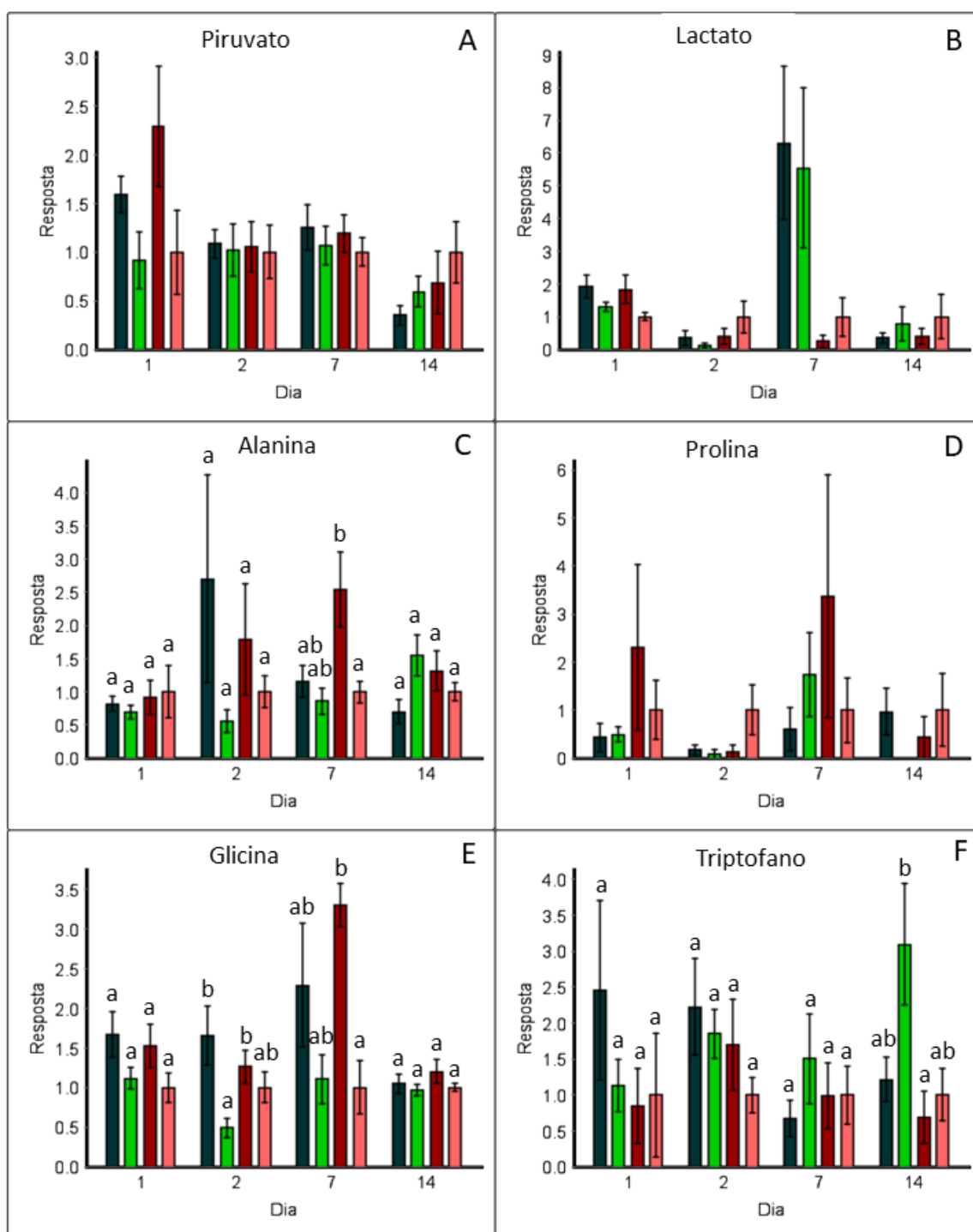
Alanina foliar mostrou diferenças significativas entre o grupo alagado e controle provenientes do Cerrado no 7º dia de experimento (Fig. 19C). O grupo alagado do Cerrado apresentou cerca de 2,5 vezes a mais alanina que o seu controle, um aumento muito menor que o mostrado na raiz (50x), mas mesmo assim significativo.

Outro aminoácido que continuou mostrando alterações para parte foliar, além da radicular, foi a glicina. O grupo alagado da Amazônia (AIA) apresentou um aumento de cerca de três vezes em relação ao seu controle no segundo dia de experimento. Já o grupo alagado do Cerrado apresentou aumento semelhante somente no 7º dia de alagamento (Fig. 19E), repetindo o índice já verificado para raiz.

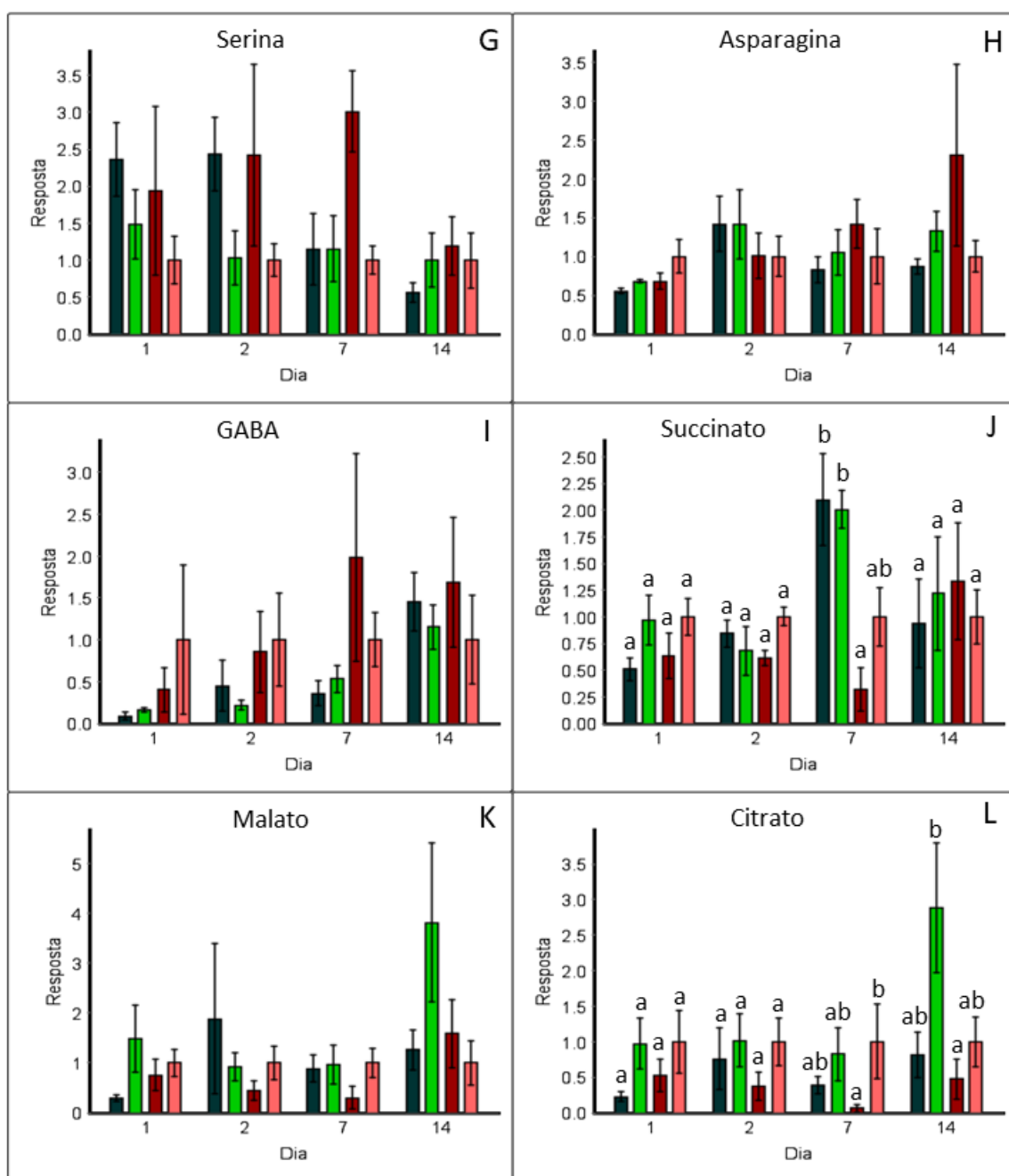
Os demais aminoácidos detectados no perfil metabólico foliar: prolina, triptofano, serina, asparagina e GABA; não apresentaram alterações significativas causadas pelo estresse de alagamento parcial (Figs. 19D, 19F, 19G, 19H e 19I). Assim, percebe-se que os aumentos em prolina, serina e GABA ficaram restritos a parte radicular.

Adentrando aos componentes do ciclo do ácido cítrico, percebe-se que as plantas do grupo alagado da Amazônia mostram cerca de oito vezes mais succinato que as plantas do grupo alagado do Cerrado no 7º dia de experimento (Fig. 19J). Entretanto, os grupos tratamento não são diferentes dos seus respectivos controles. Outro componente que apresentou diferenças significativas foi o citrato (Fig. 19L). No 7º dia de alagamento, o grupo alagado do Cerrado apresentou menos citrato que seu respectivo controle, o que não havia sido detectado na parte radicular. Não foram detectadas diferenças significativas quanto ao malato (Fig. 19K), de forma semelhante ao que ocorreu na raiz, mostrando que esse composto não é afetado pelo estresse de alagamento em *G. ulmifolia*.

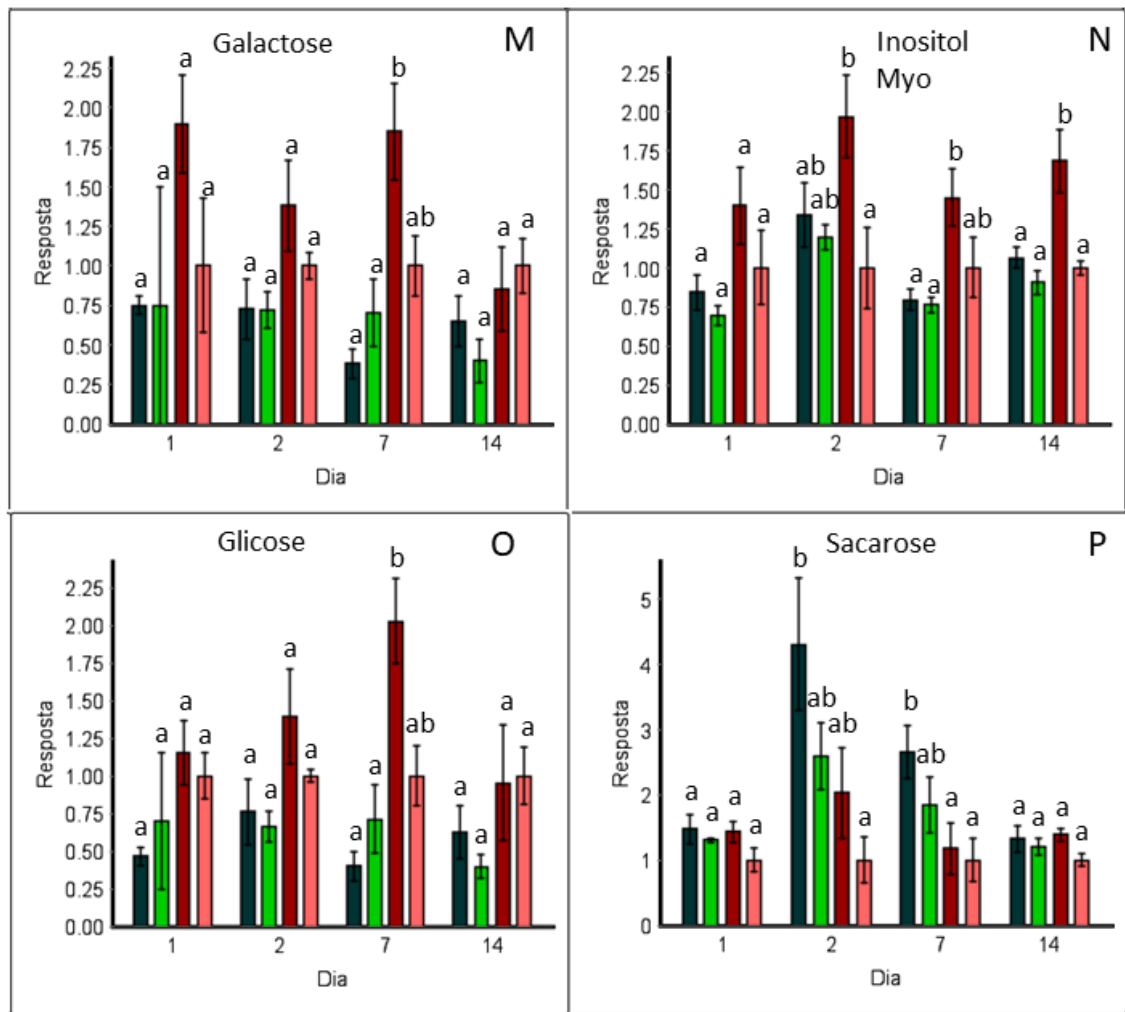
O perfil metabólico foliar apontou algumas diferenças significativas para alguns carboidratos. No 7º dia de alagamento parcial o grupo alagado da Amazônia apresentou cerca de quatro vezes menos glicose e galactose que o grupo alagado cerrado (Figs. 19O e 19M), mas apresentou cerca de duas vezes mais sacarose que AIC. Dessa forma, nota-se que a planta do Cerrado deve estar metabolizando mais carboidratos e por isso apresenta mais monossacarídeos que a planta da Amazônia. O grupo alagado do Cerrado apresentou cerca de duas vezes mais myo inositol que seu controle, nos 2º e 14º dias de experimento (Fig. 19N).



**Figura 19.** Perfil metabólico foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. A barra verde escura representa o grupo alagado Amazônia (AIA), a verde clara o grupo controle Amazônia (CoA), a vermelho escura o grupo alagado Cerrado (AIC) e a rosa o grupo controle Cerrado (CoC). Todos os gráficos representam os índices dos grupos AIA, AIC e CoA em relação ao CoC. Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  erro padrão.  $p$  significativo  $< 0,05$ . As comparações marcadas com letras minúsculas se referem a diferenças entre os grupos dentro de cada tempo. Os gráficos que não possuem indicação de diferenças significativas, não apresentaram nenhuma diferença.



**Figura 19 (continuação).** Perfil metabólico foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. A barra verde escura representa o grupo alagado Amazônia (AIA), a verde clara o grupo controle Amazônia (CoA), a vermelho escura o grupo alagado Cerrado (AIC) e a rosa o grupo controle Cerrado (CoC). Todos os gráficos representam os índices dos grupos AIA, AIC e CoA em relação ao CoC. Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  erro padrão.  $p$  significativo  $< 0,05$ . As comparações marcadas com letras minúsculas se referem a diferenças entre os grupos dentro de cada tempo. Os gráficos que não possuem indicação de diferenças significativas, não apresentaram nenhuma diferença.



**Figura 19 (continuação).** Perfil metabólico foliar de *Guazuma ulmifolia* submetida a alagamento parcial por 32 dias e recuperação por 17 dias. A barra verde escura representa o grupo alagado Amazônia (AIA), a verde clara o grupo controle Amazônia (CoA), a vermelho escura o grupo alagado Cerrado (AIC) e a rosa o grupo controle Cerrado (CoC). Todos os gráficos representam os índices dos grupos AIA, AIC e CoA em relação ao CoC. Cada barra equivale à média de 5 repetições  $\pm$  erro padrão.  $p$  significativo  $< 0,05$ . As comparações marcadas com letras minúsculas se referem a diferenças entre os grupos dentro de cada tempo. Os gráficos que não possuem indicação de diferenças significativas, não apresentaram nenhuma diferença.



## 9. DISCUSSÃO

### 9.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Como as plantas são seres sésseis, a sua exposição a eventos estressores produz alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas que visam aclimação ao estressor, tentando impedir que o organismo seja prejudicado. Neste trabalho, duas populações de *Guazuma ulmifolia* diferentes foram avaliadas: as plantas amazônicas, que são naturalmente expostas ao alagamento, e as do Cerrado, que convivem mais comumente com situações de seca. Ao analisar os dados metabólicos e fisiológicos a seguir, é imprescindível ter esse fator ecológico em mente, fator este que provavelmente explica muitas das diferenças obtidas entre as respostas dos organismos dos diferentes biomas.

É amplamente conhecido que plantas submetidas ao estresse de alagamento sofrem importantes mudanças morfológicas, visando aclimação ao estressor. A primeira área obviamente afetada pelo alagamento parcial é a raiz, que pode apresentar redução da sua biomassa, tamanho e diâmetro (Oliveira *et al.*, 2015). *G. ulmifolia* apresentou queda na fração de massa radicular em relação a massa seca total desde o sétimo dia de alagamento até o fim do experimento para a planta amazônica e no 28º dia de alagamento para a planta do Cerrado (Fig. 7). Apesar do prejuízo radicular parecer maior para as plantas alagadas da Amazônia, isso pode ser um reflexo de um maior investimento em crescimento da parte aérea em detrimento da raiz. Esse fenômeno não ocorreu com as plantas do Cerrado, que apresentaram menor fração de massa radicular no 28º dia de alagamento mesmo sem incremento na parte aérea (Fig. 6).

Oliveira e colaboradores (2015) verificaram a redução da massa seca de raiz em *Handroanthus chrysotrichus*, *Myracrodruon urundeuva* e *Copaifera langsdorffii*, espécies típicas do Cerrado, alagadas parcialmente por 30 dias. Para os autores, ainda que *C. langsdorffii* não exiba injúrias aparentes na parte aérea, a redução da biomassa radicular somada a marcas necróticas na raiz são indícios de que alagamentos mais duradouros seriam prejudiciais para a espécie. Da mesma forma, acredita-se que alagamentos mais longos afetariam mais fortemente as plantas de *G. ulmifolia*, já que os danos radiculares provocados pelo alagamento de 33 dias foram similares aos encontrados no trabalho supracitado.

O crescimento (ou estagnação) da parte aérea é uma alteração morfológica causada pelo alagamento que divide as plantas tolerantes em dois grupos com estratégias diferentes. As plantas que adotam a estratégia quiescente (LOQS) possuem uma restrição do crescimento da parte aérea quando submetidas ao estresse e maiores modificações metabólicas. Já as plantas que adotam a estratégia de escape (LOES), mais energeticamente custosa, caracterizam-se pelo rápido alongamento do caule para escapar do alagamento pouco profundo (Bailey-Seres *et al.*, 2012; Voisenek e Bailey-Seres, 2015). Assim, hipotetiza-se que as plantas amazônicas adotem parcialmente uma resposta do tipo LOES, já que apresentaram um grande incremento da parte aérea durante o alagamento e recuperação pós estresse, sem aceleração do crescimento radicular ou aumento do número de folhas. Tal resposta não foi vista nas plantas do Cerrado, que continuaram crescendo de forma similar ao controle e apresentaram maiores modificações metabólicas.

Ao investigar respostas morfofisiológicas de *Eucalyptus camaldulensis*, proveniente de áreas alagadas australianas, alagados parcialmente por 88 dias, Argus e colaboradores (2015) perceberam que a massa seca radicular das plantas alagadas era cerca de 60% menor que a das plantas controle. Esse número foi muito maior que o verificado para *G. ulmifolia* (ca. de 10%), mas convém considerar que os autores submeteram suas plantas a um estresse muito mais duradouro. Além disso, *E. camaldulensis* cresceu rapidamente até o 42º dia do tratamento de alagamento parcial, assim como as plantas da Amazônia. Entretanto, nos dias subsequentes, as plantas estressadas cresceram num ritmo menos acelerado que seus controles (Argus *et al.*, 2015). Assim, se as plantas amazônicas fossem submetidas a um alagamento mais duradouro, provavelmente apresentariam redução do crescimento.

Além das alterações do crescimento da raiz e da parte aérea, é interessante avaliar o aparecimento de lenticelas hipertrofiadas (a partir do 7º dia de alagamento) e a formação de raízes adventícias (em 80% das plantas alagadas no 21º dia de alagamento) observada para *G. ulmifolia* de ambas as origens. A formação de lenticelas na base do caule é comum em plantas alagadas. Essas estruturas rompem o felogênio profundamente resistente a passagem de gases, possibilitando a troca gasosa entre o caule e o ambiente (Kreuzwieser & Rennenberg, 2014). Essas trocas gasosas funcionam em ambos os sentidos, absorvendo oxigênio e liberando dióxido de carbono, acetaldeído e etanol (Kreuzwieser & Rennenberg, 2014). As raízes adventícias também facilitam a aeração em situações de alagamento parcial e sua formação é controlada pelo etileno quando o sistema radicular primário está danificado por causa do estresse (Bailey-Seres *et al.*, 2012).

## 9.2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS

A concentração de carbono intercelular ( $C_i$ ) depende do fluxo de  $\text{CO}_2$  através do estômato e é determinada pela concentração de  $\text{CO}_2$  do ar, pela fotossíntese ( $A$ ) e pela condutância estomática ( $G_s$ ). Desta forma,  $C_i$  diminui se a assimilação aumentar, bem como  $G_s$  aumenta se  $C_i$  diminuir (Morison, 1987). A diminuição de  $G_s$  causada pelo fechamento estomático é uma resposta comum entre as plantas sensíveis ao alagamento e pode ocorrer devido ao aumento da produção de ABA, mudanças no pH da seiva vinda da raiz de plantas estressadas ou devido à perda da condutividade hidráulica radicular, provocando seca fisiológica (Jackson, 2002; Kozlowski & Pallardy, 1984).

Com base nesses conhecimentos se sugere que as plantas provenientes do Cerrado demonstraram menor capacidade para lidar com as primeiras horas de alagamento. Tal sensibilidade pode ser visualizada na diminuição significativa da condutância estomática do grupo AIC nas primeiras 24h e 48h de alagamento parcial (Fig. 9), fator esse que, concomitantemente à manutenção da taxa de fotossíntese máxima (Fig. 8), gerou decréscimo na concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular (Fig. 11).

Já as plantas provenientes da Amazônia desenvolveram respostas de tolerância ao alagamento precocemente e com maior intensidade em relação às do Cerrado, o que indica uma capacidade de aclimatação ao estresse mais eficiente desta população. Desde o 7º dia de alagamento, as plantas AIA apresentaram maior  $A_{\text{max}}$ ,  $G_s$  e  $E$  que seus controles e, por muitas vezes, esses parâmetros foram maiores que os das plantas do Cerrado (Figs. 8, 9 e 10). Provavelmente o aumento desses índices nas plantas amazônicas alagadas foi o que sustentou o grande crescimento da sua parte aérea (Fig. 6). As plantas do grupo AIC apresentaram maior  $A_{\text{max}}$  que seus controles somente a partir do 14º dia de alagamento, uma semana após as plantas amazônicas. Essa diferença faz sentido já que o ambiente de várzea amazônica é propenso ao alagamento, diferente do cerrado. As áreas de várzea passam até 210 dias alagadas e essa mudança drástica de ecossistema terrestre para aquático causa alterações nas plantas que colonizam essas locais, resultando na aquisição de adaptações para sobrevivência ao alagamento parcial ou até mesmo total (Junk, 1989). As plantas provenientes de populações amazônicas, deste modo, necessitam ser capazes de alterar a fisiologia e o metabolismo rapidamente para sobreviver ao alagamento que pode durar bastante tempo.

É amplamente conhecido que, devido ao fechamento estomático provocado pelo alagamento e consequente redução do aporte de CO<sub>2</sub>, muitas plantas apresentam diminuição da taxa fotossintética (Kozlowski & Pallardy, 1984). Essa resposta é variável dependendo do grau de tolerância das espécies ao estresse. Gravatt & Kirby (1998) qualificaram espécies arbóreas em tolerantes, intermediárias e intolerantes ao alagamento e perceberam que quanto mais tolerantes as espécies eram, menos severa era a resposta de fechamento estomático e redução fotossintética. Assim, o fato de *G. ulmifolia* não ter apresentado restrições estomáticas durante a maior parte do experimento pode indicar que essa espécie é muito tolerante ao alagamento.

Ainda que o aumento da fotossíntese em resposta ao alagamento seja algo raro na literatura, *Senna reticulata* (Willd.) H.S.Irwin & Barneby e *Nectandra amazonum* Nees são espécies amazônicas que exibem aumento de fotossíntese quando submetidas a alagamento parcial e, somente quando submetidas a alagamento total, demonstram queda na taxa fotossintética (Parolin, 2001). *Drimys winteri*, *Blepharocalyx cruckshanksii* e *Myrceugenia exsucca*, que habitam florestas alagadas temperadas, também exibem aumento da fotossíntese quando alagadas parcialmente por 60 dias (Zúñiga-Feest *et al.*, 2017).

Para Gravatt & Kirby (1998) dados fotossintéticos e estomáticos em conjunção com dados de acúmulo de amido radicular e foliar podem ser ferramentas usadas para prever tolerância ao alagamento. Assim, uma espécie que acumula menos amido foliar, mais amido radicular e tem uma menor diminuição da fotossíntese, pode ser considerada mais tolerante. Nesse sentido, *G. ulmifolia* é tolerante ao alagamento, pois apresenta aumento fotossintético e só acumula amido foliar temporariamente.

Para sobreviver ao alagamento as plantas utilizam seus estoques de carboidratos nas vias fermentativas, que produzem ATP necessário para manutenção de atividades essenciais (Voesenek & Bailey-Serres, 2015). Assim, é possível conceber que plantas que sustentam um bom rendimento fotossintético mesmo em situação de estresse, abastecem seus estoques de carboidratos de forma a suprir com mais facilidade sua demanda fermentativa (Kreuzwiser *et al.*, 2004). Deste modo, *Senna reticulata*, *Nectandra amazonum* e *Guazuma ulmifolia* (espécies comuns em várzea amazônica) são bastante tolerantes ao alagamento parcial, fator ambiental frequente nas áreas que colonizam. Além de suprir a demanda fermentativa de *G. ulmifolia* proveniente da Amazônia, a alta taxa fotossintética dessas plantas quando expostas ao alagamento parcial deve ter sustentado o crescimento da parte aérea, processo também custoso do ponto de vista energético.

O estoque de carbono das plantas encontra-se nos compostos estruturais e nos não estruturais, que são carboidratos (açúcares simples, amido, oligossacarídeos e polissacarídeos), lipídeos e aminoácidos. Esses compostos não estruturais funcionam como fontes de energia e carbono para biossíntese (Hoch *et al.*, 2003). A sobrevivência de plantas lenhosas exige tolerância a muitos estresses. A necessidade de equilibrar essa capacidade de tolerância com a competição por recursos externos faz com que as plantas invistam carbono em tecidos de suporte lignificados, defesa e estoque (Dietze *et al.*, 2014). A forma com a qual as plantas dividem o carbono disponível entre esses diferentes aspectos depende de fatores ambientais, desenvolvimento da planta, hormônios, dentre outros (Dietze *et al.*, 2014).

O carbono medido neste trabalho e apresentado como porcentagem é referente ao total de carbono presente no tecido radicular e foliar, abrangendo C estrutural e não-estrutural. O estresse de alagamento parece ter influenciado mais o carbono foliar que o radicular e causou mais mudanças nas plantas provenientes do Cerrado que da Amazônia. Acredita-se por tanto que a medida de % C também corrobora com a hipótese de que as plantas do cerrado são mais impactadas pelo estresse de alagamento parcial, apresentando mais C foliar no 14º e 49º dias de experimento para o grupo alagado e menor % C radicular para o grupo alagado no 28º de experimento.

Além de mudanças no metabolismo do carbono, o estresse de alagamento pode gerar alterações também quanto a absorção de nitrogênio (Kreuzwiser *et al.*, 2004), pois o solo alagado perde muito nitrato e apresenta mais amônio (Xu *et al.*, 2012). O nitrogênio é o quarto elemento mais abundante nas plantas, atrás somente do carbono, oxigênio e hidrogênio; faz parte de muitos compostos estáveis inorgânicos e orgânicos – aminoácidos e nucleotídeos, que são constituintes das proteínas e ácidos nucleicos, respectivamente (Bloom, 2015).

Cerca de 50% das proteínas solúveis presentes nas folhas de plantas C3 são constituídas por RuBisCO, isso equivale a cerca de 20-30% do nitrogênio total foliar (Feller *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2012;). Deste modo, além da sua função na assimilação de carbono inorgânico, a RuBisCO funciona também como um grande estoque de N para a planta (Feller *et al.*, 2007). Assim, já que o tratamento de alagamento parcial não modificou a porcentagem de nitrogênio total foliar de *G. ulmifolia*, os estoques de RuBisCO provavelmente foram mantidos, possibilitando a alta taxa fotossintética.

Como já dito anteriormente, o nitrogênio é componente das moléculas de aminoácidos. Deste modo, o aumento de nitrogênio radicular das plantas alagadas do Cerrado no 7º dia de experimento é congruente com o aumento dos níveis de 7 aminoácidos detectados durante a produção do perfil metabólico dessas mesmas plantas. São eles alanina, prolina, glicina, cisteína, serina, treonina e GABA (Fig. 18). Esses aminoácidos detem diversas funções em situações de estresse como regulação do pH citoplasmático, osmorreguladores, estabilizantes de estruturas sub-celulares e anti-oxidantes (Bouché & Fromm, 2004; Hayat *et al.*, 2012; Mustroph *et al.*, 2014).

### 9.3. ASPECTOS METABÓLICOS

#### 9.3.1. AMIDO FOLIAR E RADICULAR

A função principal dos carboidratos de reserva é a manutenção do metabolismo mesmo na ausência de fotossíntese (Hook & Brown, 1973). Plantas adultas de arroz são tolerantes ao alagamento, pois reduzem o consumo de amido e utilizam esse estoque durante a fase de recuperação pós-estresse (Perata & Voeselek, 2007). Para *G. ulmifolia* da Amazônia e do Cerrado observou-se a manutenção das porcentagens de amido radicular, indicando que o alagamento parcial não gerou a necessidade da utilização desta fonte de carboidratos. Isso pode ter ocorrido devido a superprodução de fotoassimilados, gerados pela alta taxa fotossintética. Tal fato, somado a quantidade inexpressiva dessa reserva na raiz, faz com que o uso dessa pequena quantidade de amido seja possível somente em situações críticas. Deste modo, o estoque de amido estaria mantido para ser utilizado durante um aumento da severidade do estresse (alagamento total, somado a sombreamento) ou durante a fase de recuperação pós estresse.

Loreti e colaboradores (2017) testaram a submergência de um mutante de *Arabidopsis* que não produzia amido e perceberam que o estresse resultou em uma perda dramática de vitalidade. Os autores entenderam que na ausência de amido a indução dos genes do metabolismo anaeróbico é bastante comprometida. Assim, concluíram que a utilização dessa fonte de carboidrato é essencial para a sobrevivência da planta alagada. Já que *G. ulmifolia* não apresentou mudanças no padrão de amido radicular, mas também não exibiu perda de vitalidade, acredita-se que a planta esteja utilizando esse amido de forma usual, sem nenhuma alteração de seu metabolismo normal.

Em se tratando de amido presente nas folhas, uma resposta comum em plantas intolerantes ao alagamento é o aumento de amido foliar, causado por uma provável diminuição na translocação de fotoassimilados das folhas para a raiz (Wample & Davis, 1983). Gravatt & Kirby (1998), ao compararem espécies com diferentes graus de tolerância ao alagamento, notaram que a espécie menos tolerante demonstrou maior aumento de amido foliar.

O aumento de amido foliar foi detectado em apenas um dia em *G. ulmifolia* provenientes de ambos ecossistemas. As plantas provenientes da Amazônia apresentaram, no 7º dia de alagamento, um aumento significativo de amido foliar (Fig. 13) provavelmente decorrente da maior produção de carboidratos devido à maior taxa fotossintética (Fig. 8). Há também a possibilidade menos provável de que esse acúmulo se deva a menor translocação de fotoassimilados para os órgãos dreno causada em resposta ao estresse. Essa situação é normalizada nas medições seguintes, quando o amido foliar presente nos grupos alagados não é significativamente diferente do presente nos controles.

Para *G. ulmifolia* proveniente do Cerrado, o amido foliar do grupo AIC esteve significativamente maior que CoC somente no 14º dia de alagamento (Fig. 13). Esse é o mesmo dia em que foi detectado um aumento significativo da taxa fotossintética nas plantas alagadas. Ou seja, a possível falha na translocação da superprodução de fotoassimilados para os órgãos dreno somente ocorreu uma semana após o ocorrido para as plantas amazônicas, mas a porcentagem de amido também foi normalizada nas medições seguintes.

No 7º dia de alagamento, as plantas AIC apresentaram porcentagem de amido foliar significativamente menor que CoC (Fig. 13). Tal fato pode decorrer de uma maior carência de carboidratos na raiz, que provavelmente está se utilizando de vias fermentativas para manutenção do metabolismo. Tal hipótese é corroborada pelo aumento exacerbado (50x) de alanina no grupo AIC, ocorrido também no dia 7 do experimento (Fig. 18C). Alanina é comumente aumentada em órgãos desenvolvendo metabolismo fermentativo. Como a raiz de *G. ulmifolia* tem pouca reserva de amido (Fig. 12), os carboidratos, amplamente utilizados nas vias fermentativas, provavelmente advêm das reservas foliares.

Jaeger e colaboradores (2009) compararam a tolerância de *Fraxinus excelsior* provenientes de uma floresta ripária e de uma área montanhosa ao alagamento parcial, e verificaram que a *F. excelsior* montanhosa apresentou alta no conteúdo de amido foliar quando alagada por 10 dias. Já as plantas provenientes da floresta ripária apresentaram diminuição do conteúdo de amido e, por fim, *Fraxinus angustifolia* (planta tolerante ao

alagamento) não teve alteração padrão de amido foliar. O amido radicular permaneceu inalterado para as plantas montanhosas e para *F. angustifolia*, mas aumentou consideravelmente para as plantas da floresta ripária. *G. ulmifolia* assemelhou-se ao comportamento das plantas montanhosas, com alta no amido foliar e sem alteração no amido radicular. Nota-se ainda que o padrão de consumo do amido em plantas alagadas é muito heterogêneo, podendo se apresentar de forma muito diferente dependendo da espécie e ecótipo.

### 9.3.2. PERFIL METABÓLICO FOLIAR E RADICULAR

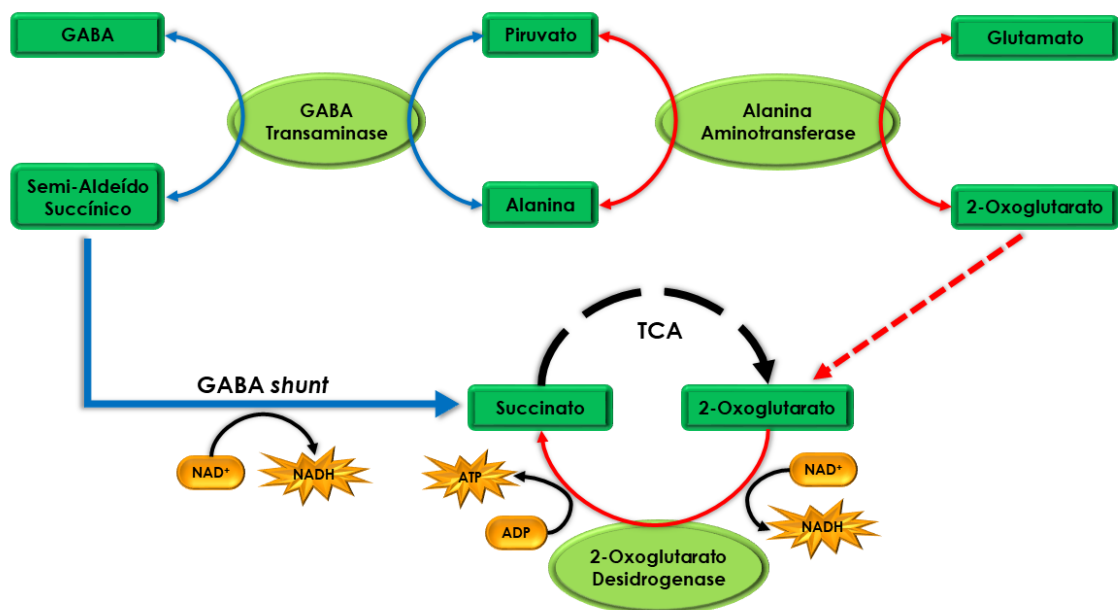
Para a avaliação do metabolismo de *G. ulmifolia* em situação de alagamento, foram feitos os perfis metabólicos radiculares e foliares das plantas submetidas ao tratamento e seus controles, em quatro diferentes tempos. Avaliando os dados de perfil metabólico radicular percebe-se maiores mudanças no grupo A1C do que no grupo A1A e o dia mais significativo aparenta ser o 7º.

Já que em ambientes alagados há o bloqueio da respiração mitocondrial devido à baixa concentração de oxigênio, existe o aumento da glicólise para que se supra a necessidade de ATP. Com a maior ativação da via glicolítica há maior produção de piruvato, que será utilizado nas vias fermentativas. Essas vias são responsáveis por reciclar o NAD<sup>+</sup> e normalizar os níveis de piruvato. Inicialmente esse piruvato é convertido a lactato, o que reduz o pH citoplasmático, ativando assim a fermentação alcoólica em vez da láctica (Sairam *et al.*, 2008). O aumento do lactato do grupo A1C nos primeiros dias de alagamento (Fig. 18B) sugere que essas plantas utilizam a fermentação láctica no início do estresse, alterando para outras vias fermentativas após esse período devido à acidificação citoplasmática.

Além de etanol e lactato, alanina também tende a ser amplamente produzida a partir do piruvato em plantas submetidas a alagamento. Esse aminoácido pode se acumular no citoplasma sem causar nenhum dano, ajudando a normalizar os níveis de piruvato (Rocha *et al.*, 2010). Para *G. ulmifolia*, o grupo A1C parece se utilizar dessa via a partir de 48h de alagamento, chegando ao seu pico no 7º dia de experimento juntamente com as plantas oriundas da Amazônia também alagadas (Fig. 18C). Nesse mesmo dia, observou-se o aumento da porcentagem de N radicular nas plantas alagadas do Cerrado, confirmando os dados coletados com o perfil metabólico.



A alanina pode ser produzida a partir do piruvato por uma reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase ou pela enzima GABA transaminase, que utiliza GABA como co-substrato, gerando, além de alanina, um precursor do succinato (Rocha *et al.*, 2010) (Figura 20). Alanina aminotransferase catalisa a conversão de piruvato e glutamato a alanina e 2-oxogluturato. Essa reação é reversível em condições normais e parece ter um papel importante na reutilização de alanina durante a re-aeração (Mustroph *et al.*, 2014). A atividade de alanina aminotransferase parece ter mais influência na produção de alanina que a de GABA transaminase, já que a segunda gera compostos tóxicos ao metabolismo celular que exigem utilização de  $\text{NAD}^+$  para sua conversão em succinato, sem produzir ATP (Mustroph *et al.*, 2014). Já o 2-oxogluturato produzido pela alanina aminotransferase pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico e ser convertido a succinato, consumindo  $\text{NAD}^+$ , mas produzindo também ATP.



**Figura 20.** Representação das duas possíveis rotas de produção de alanina em plantas submetidas a alagamento. A via azul (GABA transaminase + GABA shunt) interliga três compostos normalmente alterados em plantas alagadas: GABA, alanina e succinato. Já a via vermelha (Alanina aminotransferase), interliga somente dois dos metabólitos normalmente alterados em plantas alagadas (alanina e succinato), mas parece ser a via mais utilizada em *Guazuma ulmifolia*.

Assim como para alanina, os grupos alagados do Cerrado e da Amazônia exibiram aumento nos níveis de GABA e succinato nas 24h e 7 dias após o início do tratamento (Figs. 18J e 18K), indicando um aumento na via de produção de GABA e potencial atividade da GABA transaminase. Entretanto, a ativação da GABA transaminase é menos

provável para produção de alanina, que deve ser produzida através da ativação da alanina aminotransferase. O aumento do succinato deve estar relacionado à sua conversão a partir do 2-oxoglutarato, também produzido por alanina aminotransferase.

A produção de GABA é catalisada pela glutamato descarboxilase (GAD) a partir do ácido glutâmico. A GAD é ativada com a acidificação do citosol, a qual pode ocorrer devido ao estresse por alagamento (Kinnersley & Turano, 2000). Nas primeiras 24h após o início do alagamento, momento em que ocorre o pico de GABA nas plantas do grupo AIC, ocorre também o pico de lactato nesse mesmo grupo, o que pode ter contribuído inicialmente para a acidificação citoplasmática (Figs. 18B e 18J).

É amplamente conhecido que altos níveis de GABA se acumulam rapidamente quando os tecidos vegetais são expostos a diferentes estresses e esses níveis chegam a exceder os de aminoácidos constituintes de proteínas. O papel do GABA ainda é indefinido, mas sugere-se que esta molécula exerça a função de sinalizador intercelular (Kinnersley & Turano, 2000), reserva de C e N (juntamente com alanina), regulação do pH citoplasmático, osmorregulação e metabolismo de ROS (Bouché & Fromm, 2004; Fait *et al.*, 2008; Mustroph *et al.*, 2014).

O GABA pode ser convertido em succinato através da ativação da via denominada *GABA shunt*. Entretanto, para Rocha e colaboradores (2010), caso o pH citoplasmático esteja baixo a ponto de estimular a atividade da GAD, isso inviabilizaria as enzimas participantes da via *GABA shunt*. Assim, os autores postulam que o acúmulo de succinato visualizado em raízes alagadas de *Lotus japonicus* se deva à inibição da succinato desidrogenase em situação de hipóxia, o que diminuiria a conversão de succinato para fumarato no ciclo do ácido tricarboxílico. Para *G. ulmifolia*, o aumento de GABA não está sempre relacionando com o aumento de succinato, portanto acredita-se na inibição de succinato desidrogenase como explicação para o aumento desse composto, explicação compatível com o que foi discutido no trabalho de Rocha e colaboradores (2010).

O trabalho de António e colaboradores (2016), que avaliou as modificações no metabolismo anaeróbico radicular de soja através da utilização de carbono e nitrogênio marcados, vem de encontro ao que foi postulado por Rocha e colaboradores (2010). Utilizando o método de marcação, os autores puderam confirmar a conversão de GABA em succinato através da *GABA shunt* a partir da observação da adição progressiva de carbonos marcados de glutamato para GABA e então para succinato.

Van Dongen e colaboradores (2009) verificaram o perfil metabólico de raízes de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações diferentes de oxigênio e também perceberam aumento em alanina, prolina e GABA em suas medições após 48h de estresse. Nesse trabalho, os autores não fizeram medições em 24h de exposição à hipóxia, mas verificaram diferentes alterações nos níveis dos compostos relacionadas às diferentes concentrações de oxigênio no meio de cultura. Como as concentrações de oxigênio do experimento com *G. ulmifolia* não foram controladas, as alterações visualizadas no perfil metabólico podem estar relacionadas tanto com o tempo de exposição ao estresse, como também com a concentração de oxigênio presente no solo no dia da medição.

Kreuzwiser e colaboradores (2009) também produziram um perfil metabólico de *Populus x canescens* submetida ao alagamento e notaram aumento nos níveis de GABA e succinato, bem como de aminoácidos derivados do piruvato, como alanina, e de intermediários da glicólise, como glicina e serina. Para os autores, as mudanças na concentração de GABA radicular induzem adaptações morfológicas nas plantas alagadas, tais como lenticelas hipertrofiadas e aerênquima. Para *G. ulmifolia* foi observado que 9 de 10 plantas alagadas apresentavam lenticelas hipertrofiadas no 7º dia de alagamento, dia em que houve também aumento de GABA nos grupos AIC e AIA (diferença não significativa) (Fig. 18J). Assim, é possível que o aumento de GABA module o aparecimento de lenticelas, entretanto são necessários estudos mais aprofundados para que se conecte com certeza esses dois eventos, já que diversos outros compostos podem servir de moduladores para modificações morfológicas.

Quando plantas são submetidas a situações estressoras, normalmente apresentam mudanças no espectro de aminoácidos. Esses desempenham papéis importantes visando a retomada da homeostase celular, agindo como moléculas regulatórias e sinalizadoras (Rai, 2002).

A prolina, que teve um acúmulo 12 vezes maior em AIC quem em CoC no 7º dia de tratamento (Fig. 18D), parece estar envolvida em respostas a diversos estresses abióticos. Este aminoácido pode agir como osmólito (promovendo ajuste osmótico), como estabilizante de estruturas sub-celulares, como anti-oxidante e até como regulador de acidose citoplasmática, mantendo a razão  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  compatível com o metabolismo (Hayat *et al.*, 2012).

Outro aminoácido, além da alanina, que pode estar contribuindo para a manutenção dos níveis normais de piruvato nas plantas alagadas de *G. ulmifolia* é a serina, que teve

seus níveis aumentados quase 10 vezes nas plantas do grupo AIC após 7 dias de tratamento (Fig. 18G). Para Koppitz e colaboradores (2004), o produto final da via glicolítica pode ser removido através da transaminação do piruvato e do 3-fosfoglicerato em alanina e serina, respectivamente.

Glicina e cisteína, que também apresentaram níveis elevados para AIC no 7º dia de alagamento (Figs. 18E e 18F), são aminoácidos derivados da serina. A rota de produção da glicina contém somente uma reação enzimática. Já a produção de cisteína exige ativação da serina dependente de acetil-CoA, que depois reage com sulfeto para formar a cisteína (Umbarger, 1978).

Os aminoácidos são as unidades básicas constituintes das proteínas. O aumento de aminoácidos nas plantas AIC no 7º dia de tratamento pode ter ocorrido devido à diminuição de síntese proteica como forma de economizar energia. Sabe-se que, com a diminuição da respiração mitocondrial, os tecidos com baixa disponibilidade de O<sub>2</sub> sofrem com a redução da produção de ATP e por isso tendem a inibir processos custosos do ponto de vista energético (Geigenberger, 2003). Um processo que pode ser muito dispendioso é a produção de proteínas, que tende a decrescer devido ao estresse por alagamento (Ricard & Pradet, 1989; Chang *et al.*, 2000; Geigenberger *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2006).

Dixon e colaboradores (2006) observaram o metabolismo de *Potamogeton pectinatus* submetida à anóxia e verificaram que a incorporação de metionina marcada nas proteínas das plantas estressadas decresce muito se comparado com o controle. Isso indica que a taxa de síntese proteica das plantas tratadas chega a ser somente 13% da taxa observada nas plantas em condições aeróbicas. Para Chang e colaboradores (2000), essa modulação da produção proteica é crucial para desenvolvimento da aclimatação ao estresse anaeróbico.

Ao contrário do que foi observado no perfil metabólico radicular, o perfil metabólico foliar mostrou poucas alterações nas plantas alagadas em relação aos seus respectivos controles. Isso pode indicar que o alagamento parcial provoca danos localizados na raiz - órgão especificamente atingido pelo estresse. Além disso, ainda que haja aumento de metabólitos nas raízes, esses metabólitos não são translocados para as folhas. Para Kreuzwieser & Rennenberg (2014), ainda que a comunicação entre raiz e parte aérea seja muito importante, o transporte de metabólitos entre esses dois órgãos ainda não foi intensamente estudado em plantas alagadas parcialmente.

Em um dos escassos estudos que comparou alterações metabólicas foliares e radiculares de plantas alagada parcialmente, foi verificado que os altos índices de GABA,

alanina e glicina em raízes de Poplar geraram altas concentrações desses compostos na seiva do xilema (Kreuzwieser & Rennenberg, 2014). Para *G. ulmifolia* do Cerrado parece que o aumento de alanina e glicina pode ter gerado o aumento desses compostos também nas folhas, mas para confirmar que esses metabólitos estão de fato sendo transportados da raiz para a parte aérea, seria necessário avaliar o perfil metabólico da seiva xilemática ou promover experimentos com a presença desses compostos isotopicamente marcados.

Cruzando os dados morfológicos, metabólicos e fisiológicos, sugere-se que as plantas da Amazônia suportam melhor o estresse de alagamento, exibindo melhores índices fisiológicos e mudanças metabólicas mais brandas. Entretanto, mesmo apresentando mais dificuldades para se aclimatar ao alagamento, todas as plantas do Cerrado submetidas ao estresse sobreviveram sem maiores problemas. Ou seja, *G. ulmifolia*, independentemente do ambiente que coloniza, é tolerante ao alagamento e as plantas do Cerrado exibem plasticidade fenotípica, pois podem se aclimatar a um estresse raro no ambiente em que vivem.

## 10. CONCLUSÃO

Após avaliação das respostas morfológicas (incremento da parte aérea, fração de massa radicular, número de folhas e crescimento relativo do diâmetro caulinar), fisiológicas ( $A_{max}$ ,  $G_s$ ,  $E$ ,  $C_i$  e alocação de carbono e nitrogênio) e bioquímicas (perfil metabólico e porcentagem de amido) de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* submetidas a alagamento parcial, observou-se que:

- As plantas amazônicas apresentaram maior incremento da parte aérea que seus controles e que as plantas do Cerrado, o que contribuiu para uma fração radicular significativamente menor desse grupo amazônico. Essa resposta pode estar ligada ao fato de que na Amazônia os alagamentos parciais são seguidos do alagamento total das plantas jovens e o crescimento acelerado pode ajudar a permanecer mais tempo com as folhas fora da coluna d'água. As plantas do Cerrado cresceram de forma semelhante aos controles, apresentando redução da fração de massa radicular no 28º dia de alagamento. As plantas alagadas de ambas as origens desenvolveram lenticelas hipertrofiadas e raízes adventícias.
- Foi possível notar o decréscimo na condutância estomática nas plantas alagadas do Cerrado até o segundo dia de alagamento, mas isso não resultou em queda significativa da fotossíntese de nenhum grupo tratamento. Na verdade, observou-se resposta totalmente contrária à esperada, com o alagamento resultando em maiores índices fotossintéticos nas plantas provenientes de ambas as populações. Essa resposta se iniciou no 7º dia de alagamento para as plantas da Amazônia e no 14º dia para as plantas do Cerrado.
- As plantas alagadas da Amazônia apresentaram aumento do amido foliar no 7º dia de alagamento e as do Cerrado no 14º dia, provavelmente devido a superprodução de fotoassimilados. Não houve redução do amido radicular, provavelmente por que não houve necessidade de utilização dessa fonte energética.
- O carbono foliar mostrou-se aumentado para as plantas alagadas do cerrado no 14º e 49º dia de experimento, enquanto o carbono radicular foi menor que o controle para essas plantas no 28º dia (final do alagamento). O nitrogênio foliar não sofreu modificações causadas pelo alagamento e o radicular foi maior para as plantas alagadas do cerrado nos dias 7 e 28. Para as plantas alagadas da Amazônia

isso só ocorreu no dia 49 (já no período de recuperação). As mudanças nas porcentagens de C parecem estar relacionadas com o acúmulo de amido. Já as alterações na porcentagem de N devem estar, pelo menos em parte, relacionadas as flutuações dos níveis de aminoácidos da raiz.

- Percebeu-se o aumento de alanina e succinato nas plantas alagadas da Amazônia e o aumento de GABA, alanina e succinato para as plantas tratadas do Cerrado. Com destaque para o acréscimo de 50 vezes em alanina para as plantas alagadas do Cerrado, no 7º dia de experimento. GABA e alanina fazem parte de vias metabólicas que complementam a atividade do metabolismo fermentativo no consumo de piruvato de modo a evitar a inibição da via glicolítica. A aceleração da glicólise é essencial para o fornecimento do ATP para manutenção das atividades vitais das plantas alagadas.
- As plantas da Amazônia foram menos afetadas pelo alagamento parcial, apresentando respostas mais rápidas e eficientes que as plantas do cerrado.
- *G. ulmifolia* proveniente de qualquer das populações mostraram-se extremamente resistentes ao alagamento parcial de 32 dias, não havendo morte de nenhum indivíduo.
- As populações que colonizam o Cerrado exibem plasticidade fenotípica, sendo capazes de aclimatar-se a um estresse atípico do Cerrado.

Como visto, muitas das respostas ao alagamento apresentadas por *G. ulmifolia* não eram esperadas de acordo com a teoria do estresse de alagamento. Isso pode ter ocorrido, pois o conhecimento acerca das respostas de plantas ao alagamento é principalmente pautado em experimentos feitos com plantas herbáceas e, em sua maioria, grandes comódities alimentares.

Os estudos com plantas arbóreas que incluem as modificações do metabolismo causadas pelo alagamento parcial são escassos, bem como os estudos com espécies amazônicas. É imprescindível, portanto, que mais estudos sobre tolerância ao alagamento de espécies arbóreas sejam feitos, principalmente com plantas oriundas de áreas sazonalmente alagadas como a Amazônia. As estratégias utilizadas por essas plantas visando a sobrevivência ao alagamento podem ser valiosas para enriquecer a compreensão da tolerância a esse tipo de estresse e, deste modo, devem contribuir para o melhoramento de plantas interessantes para o mercado alimentar.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, L.I.V., Gaspar, M., Costa, P.M.F., Aidar, M.P.M., Buckeridge, M.S., 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34 (4), 425–431.
- António, C., Pöpke, C., Rocha, M., Diab, H., Limami, A.M., Obata, T., van Dongen, J.T., 2016. Regulation of Primary Metabolism in Response to Low Oxygen Availability as Revealed by Carbon and Nitrogen Isotope Redistribution. *Plant Physiology* 170 (1), 43–56.
- Argus, R.E., Colmer, T.D., Grierson, P.F., 2015. Early physiological flood tolerance is followed by slow post-flooding root recovery in the dryland riparian tree *Eucalyptus camaldulensis* subsp. *refulgens*. *Plant, Cell & Environment*, 38 (6), 1189–1199.
- Armstrong, W., Brändle, R., Jackson, M.B., 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* 43 (4), 307–358.
- Arnell, N.W., Liu, C., 2001. Hydrology and Water Resources. *In*: McCarthy, J.J., Canziani, O.F., Leary, N.A., Dokken, D.J., White, K.S. (Eds.), *Climate Change 2001: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 191–233.
- Bailey-Serres, J., Lee, S.C., Brinton, E., 2012. Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies. *Plant Physiology* 160 (4), 1698–1709.
- Bailey-Serres, J., Voesenek, L.A.C.J., 2008. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annual Review of Plant Biology* 59, 313–339.
- Barding Jr., G.A., Béni, S., Fukao, T., Bailey-Serres, J., Larive, C.K., 2012. Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *Journal of Proteome Research* 12 (2), 898–909.
- Bertani, A., Brambilla, I., Menegus, F., 1980. Effect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolic rate and fate of fermentation products. *Journal of Experimental Botany* 31 (1), 325–331.
- Bloom, A.J., 2015. The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. *Current Opinion in Plant Biology* 25, 10–16.
- Bouche, N., Fromm, H., 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science* 9 (3), 110–115.



- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B., Aguilar, L., 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 30, 55–73.
- Camporese, A., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R., Morsellino, N., de Simone, F., Tubaro, A., 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology* 87 (1), 103–107.
- Carvalho, P.E.R., 2007. Mutamba - *Guazuma ulmifolia* (Circular Técnica 141). Embrapa Florestas, Colombo - PR.
- Chang, W.W.P., Huang, L., Shen, M., Webster, C., Burlingame, A.L., Roberts, J.K.M., 2000. Patterns of protein synthesis and tolerance to anoxia in roots tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiology* 122, 295–317.
- Conab, 2017. Relatório Geral de Acompanhamento da Safra Brasileira - Rio Grande do Sul. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_10\\_13\\_14\\_23\\_03\\_relato1.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_10_13_14_23_03_relato1.pdf)>. Acesso em 15 de março de 2018.
- Dietze, M.C., Sala, A., Carbone, M.S., Czimczik, C.I., Mantooth, J.A., Richardson, A.D., Vargas, R., 2014. Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology* 65, 667–687.
- Dixon, M.H., Hill, S.A., Jackson, M.B., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., 2006. Physiological and metabolic adaptations of *Potamogeton pectinatus* L. tubers support rapid elongation of stem tissue in the absence of oxygen. *Plant and Cell Physiology* 47 (1), 128–140.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., Fernie, A.R., 2008. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* 13 (1), 14–19.
- Feller, U., Anders, I., Mae, T., 2007. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* 59 (7), 1615–1624.
- Ferreira, C.S., Piedade, M.T.F., Franco, A.C., Gonçalves, J.F.C., Junk, W.J., 2009. Adaptive strategies to tolerate prolonged flooding in seedlings of floodplain and upland populations of *Himatanthus sucuuba*, a Central Amazon tree. *Aquatic Botany* 90, 246–252.
- Field, C.B., Barros, V., Stocker, T.F., Qin, D., Dokken, D.J., Ebi, K.L., Mastrandrea, M.D., Mach, K.J., Plattner, G.-K., Allen, S.K., Tignor, M., Midgley, P.M., 2012. Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on

- Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, NY, USA.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37, 263–285.
- Geigenberger, P., 2003. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology* 6 (3), 247–256.
- Geigenberger, P., Fernie, A.R., Gibon, Y., Christ, M., Stitt, M., 2000. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biological Chemistry* 381, 723–740.
- Globo.com, 2015. Enchentes desabrigam famílias e prejudicam lavouras no RS. Disponível em: <<http://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2015/12/enchentes-desabrigam-familias-e-prejudicam-lavouras-no-rs.html>>. Acesso em 19 de julho de 2016.
- Gonçalves, J.F.C., Melo, E.G.F., Ferreira, M.J., da Silva, C.E.M., Gomes, I.B., 2013. Crescimento, partição de biomassa e fotossíntese em plantas jovens de *Genipa spruceana* submetidas ao alagamento. *Cerne Lavras* 19 (2), 193–200.
- Gravatt, D.A., Kirby, C.J., 1998. Patterns of photosynthesis and starch allocation in seedlings of four bottomland hardwood tree species subjected to flooding. *Tree Physiology* 18 (6), 411–417.
- Gregório, T.A., Gobbo, L.G., Cardoso, J.F., Demuner, V.G., Hebling, A.S., 2008. Efeito do alagamento sobre o crescimento inicial de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (Ipê-rosa). *Natureza On Line* 6 (2), 91–98.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior* 7 (11), 1456–1466.
- Hoch, G., Richter, A., Körner, C., 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell & Environment* 26, 1067–1081.
- Hoffman, N.E., Hanson, A.D., 1986. Purification and properties of hypoxically induced lactate dehydrogenase from barley roots. *Plant Physiology* 82 (3), 664–670.
- Hook, D.D., Brown, C.C., 1973. Root adaptations and relative flood tolerance of five hardwood species. *Forensic Science* 19, 225–229.
- IBGE, 2017. Em julho, IBGE prevê safra de grãos 31,1% maior que em 2016. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/15577-1.html>>. Acesso em 15 de março de 2018.

- Jackson, M.B., 2002. Long-distance signalling from roots to shoots assessed: the flooding story. *Journal of Experimental Botany* 53 (367), 175–181.
- Jaeger, C., Gessler, A., Biller, S., Rennenberg, H., Kreuzwieser, J., 2009. Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging. *Journal of Experimental Botany* 60 (15), 4335–4345.
- Joly, C.A., Aidar, M.P.M., Klink, C.A., McGrath, D., Moreira, A.G., Moutinho, P., Nepstad, D.C., Oliveira, A.O., Pott, A., Rodal, M.J.N., Sampaio, E.V.S.B., 1999. Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: Implications for biodiversity conservation. *Ciência e Cultura* 51 (5/6), 331–348.
- Joly, C.A., Crawford, R.M.M., 1982. Variation in Tolerance and Metabolic Responses to Flooding in some Tropical Trees. *Journal of Experimental Botany* 33 (4), 799–809.
- Junk, W.J., 1989. Flood tolerance and tree distribution in Central Amazonian floodplains. *In: Holm-Nielsen, L.B., Nielsen, I.C., Balslev, H. (Eds.), Tropical Forest: botanical dynamics, speciation and diversity. Academic Press, New York, pp. 47–64.*
- Kennedy, R.A., Rumpho, M., Fox, T.C., 1992. Anaerobic Metabolism in Plants. *Plant Physiology* 100 (1), 1–6.
- Kinnersley, A.M., Turano, F.J., 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19 (6), 479–509.
- Klink, C.A., Machado, R.B., 2005. A Conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade* 1 (1), 147–155.
- Koppitz, H., Dewender, M., Ostendorp, W., Schmieder, K., 2004. Amino acids as indicators of physiological stress in common reed *Phragmites australis* affected by an extreme flood. *Aquatic Botany* 79 (4), 277–294.
- Kozłowski, T.T., Pallardy, S.G., 1984. Effect of flooding on water, carbohydrate, and mineral relations. *In: Kozłowski, T.T. (Ed.), Flooding and plant growth. Academic Press, Orlando, pp. 165–193.*
- Kreuzwieser, J., Hauberg, J., Howell, K.A., Carroll, A., Rennenberg, H., Millar, A.H., Whelan, J., 2009. Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. *Plant Physiology* 149 (1), 461–473.
- Kreuzwieser, J., Papadopoulou, E., Rennenberg, H., 2004. Interaction of flooding with carbon metabolism of forest trees. *Plant Biology* 6, 299–306.
- Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., 2014. Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. *Plant, Cell & Environment* 37, 2245–2259.

- Larcher, W., 2003. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups* (4th Edition). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R., 2006. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1 (1), 387–396.
- Lorenzi, H., 1992. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. Plantarum, Nova Odessa - SP.
- Loreti, E., Valeri, M.C., Novi, G., Perata, P., 2018. Gene Regulation and Survival under Hypoxia Requires Starch Availability and Metabolism. *Plant Physiology* 176 (2), 1286–1298.
- Magos, G.A., Mateos, J.C., Páez, E., Fernández, G., Lobato, C., Márquez, C., Enríquez, R.G., 2008. Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* 117 (1), 58–68.
- Moraes, M.G., Alves, J.D., Oliveira, L.E.M., Vitorino, P.F.P.G., Magalhães, M.M., 2001. Caracterização do crescimento e da atividade das desidrogenases alcoólica e láctica em seis espécies herbáceas sob condições de hipóxia. *Ciência e Agrotecnologia* 25 (1), 86–95.
- Moran, E.V., Hartig, F., Bell, D.M., 2015. Intraspecific trait variation across scales: implications for understanding global change responses. *Global Change Biology* 22 (1), 137–150.
- Morison, J.I., 1987. Intercellular CO<sub>2</sub> Concentration and Stomatal Response to CO<sub>2</sub>. *In: Zeiger, E., Farquhar, G.D., Cowan, I.R. (Eds.), Stomatal function*. Stanford University Press, Stanford, p. 229.
- Medri, C., Pimenta, J.A., Ruas, E.A., Souza, L.A., Medri, P.S., Sayhun, S., Bianchini, E., Medri, M.E., 2012. O alagamento do solo afeta a sobrevivência, o crescimento e o metabolismo de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae)? *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde Londrina* 33 (1), 123–134.
- Mustroph, A., Kaiser, K.A., Larive, C.K., Bailey-Serres, J., 2014. Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in *Arabidopsis* with a focus on primary C- and N-metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 37 (10), 2366–2380.
- Nakamura, T., Yamamoto, R., Hiraga, S., Nakayama, N., Okazaki, K., Takahashi, H., Komatsu, S., 2012. Evaluation of metabolite alteration under flooding stress in soybeans. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 46 (3), 237–248.

- Narsai, R., Rocha, M., Geigenberger, P., Whelan, J., van Dongen, J.T., 2011. Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *New Phytologist* 190 (2), 472–487.
- Oliveira, A.S., Ferreira, C.S., Graciano-Ribeiro, D., Franco, A.C., 2015. Anatomical and morphological modifications in response to flooding by six Cerrado tree species. *Acta Botanica Brasilica* 29, 478–488.
- Oliveira-Filho, A.T., Ratter, J.A., 2002. Vegetation Physiognomies and Woody Flora of the Cerrado Biome. *In: Oliveira, P.S., Marquis, R.J. (Eds.), The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna.* Columbia University Press, New York, pp. 91–120.
- Parolin, P., 2001. Morphological and physiological adjustments to waterlogging and drought in seedlings of Amazonian floodplain trees. *Oecologia*, 128 (3), 326–335.
- Parolin, P., 2009. Submerged in darkness: Adaptations to prolonged submergence by woody species of the Amazonian floodplains. *Annals of Botany* 103 (2), 359–376.
- Pedersen, O., Perata, P., Voeselek, L.A., 2017. Flooding and low oxygen responses in plants. *Functional Plant Biology* 44 (9), iii-vi.
- Perata, P., Voeselek, L.A., 2007. Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like 581 gene. *Trends in Plant Science* 12, 43–46.
- Pires, H.R.A. Efeito do alagamento na germinação de sementes e no crescimento de plantas jovens de *Genipa americana* e *Guazuma ulmifolia* com ocorrência no Cerrado e na Amazônia. 2015. xii. 57 f., il. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília.
- Ponnamperuma, F.N., 1984. Effects of flooding on soils. *In: Flooding and plant growth*, 9–45.
- Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Palme, K.J., Jansen, M.A.K., 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12 (3), 98–105.
- Praxedes, S.C., DaMatta, F.M., Loureiro, M.E., Ferrão, M.A.G., Cordeiro, A.T., 2006. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56 (3), 263–273.
- Queiroz, J.A.L., Machado, S.A., 2008. Fitossociologia em Floresta de Várzea do Estuário Amazônico no Estado do Amapá. *Pesquisa Florestal Brasileira Colombo* 57, 5–20.

- Rai, V.K., 2002. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum* 45 (4), 481–487.
- Rejeb, I., Pastor, V., Mauch-Mani, B., 2014. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants* 3 (4), 458–475.
- Rengifo, E., Tezara, W., Herrera, A., 2005. Water relations, chlorophyll a fluorescence, and contents of saccharides in tree species of a tropical forest in response to flood. *Photosynthetica* 43 (2), 203–210.
- Ribeiro, J.F., Walter, B.M., 1998. Fitofisionomias do bioma cerrado. *In*: Sano, S.M., Almeida, S.P. (Eds.), *Cerrado: ambiente e flora*. Embrapa, Planaltina, pp. 89–166.
- Ricard, B., Pradet, A., 1989. Anaerobic protein synthesis in different organs of germinating rice seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 27, 761–768.
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R., Dongen, J.V., 2010. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 152, 1501–1513.
- Rodrigues, S., Caetano N., D.G., Caetano, C.M., 2007. Espécies frutíferas do centro-sul do Estado de Rondônia, Amazônia brasileira. *Acta Agronômica* 56 (2), 69–74.
- Roháček, K., Soukupová, J., Barták, M., 2008. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. *Plant Cell Compartments - Selected Topics* 661 (2), 41–114.
- Sairam, R.K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Deshmukh, P.S., Srivastava, G.C., 2008. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biologia Plantarum* 52 (3), 401–412.
- Santos, H., Buckeridge, M.S., 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany* 94 (6), 819–830.
- Scariot, A., Sousa-Silva, J.C., Felfili, J.M. (Orgs.), 2005. *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília - DF.
- Sobrinho, S.P., Siqueira, A.G., 2008. Caracterização morfológica de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam. - Sterculiaceae). *Revista Brasileira de Sementes* 30 (1), 114–120.
- Sweetlove, L.J., Beard, K.F., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G., 2010. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science* 15 (8), 462–470.

- Umbarger, H.E., 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual Review of Biochemistry* 47 (1), 533–606.
- Van Dongen, J.T., Fröhlich, A., Ramírez-Aguilar, S.J., Schauer, N., Fernie, A.R., Erban, A., Geigenberger, P., 2009. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of arabidopsis plants. *Annals of Botany* 103 (2), 269–280.
- Voesenek, L.A.C.J., Bailey-Serres, J., 2015. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist* 206 (1), 57–73.
- Voesenek, L.A.C.J., Rijnders, J.H.G.M., Peeters, A.J.M., Van de Steeg, H.M.V., De Kroon, H., 2004. Plant hormones regulate fast shoot elongation under water: from genes to communities. *Ecology* 85, 16–27.
- Wample, R.L., Davis, R.W., 1983. Effect of flooding on starch accumulation in chloroplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Physiology* 73 (1), 195–198.
- Wittmann, F., Schöngart, J., Junk, W.J., 2010. Phytogeography, species diversity, community structure and dynamics of central Amazonian floodplain forests. In: Junk, W.J., Piedade, M.T.F., Wittmann, F., Schöngart, J., Parolin, P. (Eds.), *Amazonian Floodplain Forests: Ecophysiology, Biodiversity and Sustainable Management*. Springer, Dordrecht, pp. 61–102.
- WWF Brasil, 2017. Cerrado – Rica Biodiversidade. Disponível em: [http://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/areas\\_prioritarias/cerrado/biodiversidade](http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/areas_prioritarias/cerrado/biodiversidade). Acesso em 23 de março de 2017.
- Xu, G., Fan, X., Miller, A.J., 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63, 153–182.
- Zúñiga-Feest, A., Bustos-Salazar, A., Alves, F., Martinez, V., Smith-Ramírez, C., 2017. Physiological and morphological responses to permanent and intermittent waterlogging in seedlings of four evergreen trees of temperate swamp forests. *Tree Physiology* 37 (6), 779–789.