



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

Mecanismos de tolerância à submersão em plantas de *Guazuma
ulmifolia* Lam. (Malvaceae) do Cerrado e da Amazônia

Babeky N'debi dos Santos Thito

Orientador (a): Cristiane Silva Ferreira

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

BABEKY N'DEBI DOS SANTOS THITO

Mecanismos de tolerância à submersão em plantas de *Guazuma
ulmifolia* Lam. (Malvaceae) do Cerrado e da Amazônia

Dissertação apresentado como requisito para
obtenção do grau de mestre em Botânica pelo
Programa de Pós-Graduação em Botânica da
Universidade de Brasília

Orientador (a): Dra. Cristiane Silva Ferreira

Brasília – DF

2021

BABEKY N'DEBI DOS SANTOS THITO

Mecanismos de tolerância à submersão em plantas de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) do Cerrado e da Amazônia

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Cristiane da Silva Ferreira - Universidade de Brasília – UnB
(Orientadora, Presidente da Banca Examinadora)

Prof.^a. Dr.^a Luzia Valentina Modolo – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
(Membro externo)

Prof.^a. Dr.^a – Christina Cleo Vinson Williams - Universidade de Brasília – UnB
(Membro Interno)

Prof.^a. Dr.^a – Micheline Carvalho Silva - Universidade de Brasília – UnB
(Membro Interno)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal, que financiou o projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, responsável por fornecer a bolsa de auxílio para pós-graduação.

Agradeço a minha orientadora Cristiane por ter me recebido no laboratório desde a graduação até o final do meu mestrado, por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos e pelo apoio durante todos esses anos, que foi fundamental na minha vida acadêmica. Serei eternamente grato.

Ao Professor Augusto, por ter sido a primeira pessoa do departamento de botânica que tive contato logo no início da graduação, por onde tive a chance de realizar também dois projetos junto ao Prof. Dr. Antônio Carlos Torres, e principalmente, com o delineamento experimental.

Sou grato ao Professor Thomas, que me auxiliou no experimento do perfil metabólico, que completara minha dissertação para publicação do artigo.

Aos técnicos Mendes e Fábio Nakamura que me ajudaram de alguma forma seja na coleta de material feita pelo Mendes, ou até a compra e transportes de materiais para estação experimental da Unb feita pelo Fabio. Aos estagiários Giovana, Humberto, Ingrid, Leticia e Mylene

Aos meus colegas de laboratório André, Carolina, Janderson, Josivaldo, Elson, Bruna e Laísa, por estarem sempre presentes e fazerem dessa jornada mais fácil e divertida.

À minha família, principalmente, por toda dedicação, amor e carinho. Sempre ofereceram o melhor que podiam para que eu pudesse estudar. Sem você nada disso seria possível. Muito obrigada.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	15
3. JUSTIFICATIVA.....	26
4. OBJETIVO GERAL	27
5. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	27
6. HIPÓTESE	28
7. MATERIAIS E METODOS	28
7.1 Obtenção de sementes e produção de plântulas	28
7.2 Delineamento experimental	30
7.3 Experimento I: crescimento, morfologia, biomassa das plantas	31
7.4.1 Ensaio da atividade da ADH (EC 1.1.1.1):.....	33
7.5 Experimento III: Atividades de enzimas do estresse oxidativo.....	34
7.5.1. Produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs)	34
7.5.1 Ensaio e quantificação de enzimas antioxidantes	34
8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
9. RESULTADOS.....	36
9.2 Biomassa.....	41
9.3 Metabolismo anaeróbico: análise da enzima ADH	43
9.4 Atividade de enzimas do estresse oxidativo: APX, CAT e SOD.....	44
10. DISCUSSÃO.....	48
11. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

O alagamento do solo é um dos principais estresses abióticos que impacta negativamente o crescimento e a produtividade das plantas. O excesso de água no solo reduz o oxigênio, necessário para a respiração aeróbica das plantas e induz alterações, como a alteração de vias metabólicas para sobreviver em condições de hipóxia ou mesmo anoxia nesses ambientes. e na fisiologia da planta com a ativação da enzima chave do metabolismo anaeróbico, a álcool desidrogenase (ADH), e as enzimas antioxidantes.

Nas florestas de várzea da Amazônia, muitas plantas estão sujeitas a períodos de alagamento do solo. Essas espécies de plantas conseguiram se adaptar, e tolerar longos períodos de exposição a esse estressor, se tornando modelos para estudos. O presente trabalho avaliou plantas jovens de *Guazuma ulmifolia*, nativas de ecossistemas secos do Cerrado e das várzeas da Amazônia, foram submersas por longos períodos, e observar se existe diferenças no crescimento, biomassa, morfologia e bioquímica, e relacionar com a tolerância da planta ao alagamento. As plantas de *G. ulmifolia* do Cerrado ou da Amazônia, com idade de 60 dias, foram submetidas a dois tratamentos: (1) Controle (regas diárias até a capacidade de campo), (2) Submersão total da planta em diferentes tempos (0, 24 h, 48h, 7 dias, 14 dias, 30 dias 60 das). Independente da origem, Amazônia ou Cerrado, a submersão induziu nas plantas a clorose e queda das folhas nas primeiras semanas, paralisação do crescimento e reduções significativas de biomassa quando comparadas com as plantas do controle, que mantiveram o crescimento contínuo. Ao final dos 30 dias, as plantas do Cerrado mostraram necrose dos tecidos do caule, o que não ocorreu com as plantas da Amazônia, que apresentavam aparência saudável. Ao fazer as análises da álcool desidrogenase (ADH), enzima chave do metabolismo anaeróbico, foi possível observar que a enzima tem sua maior atividade no tempo de 48 horas de submersão ($P \leq 0.05$), principalmente nas plantas da Amazônia onde tiveram os maiores picos de atividade da ADH se comparado com as plantas do Cerrado, após esse tempo a enzima tem sua atividade reduzida. Devido as condições de estresse causadas pelo alagamento impostas às plantas, a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos às estruturas celulares e mesmo acarretar a morte da planta. O presente trabalho também analisou a atividade de algumas enzimas antioxidantes que fazem parte de um eficiente sistema de defesa antioxidante, que envolve as seguintes enzimas Ascorbato peroxidase (APX), Catalase (CAT) e a Superóxido dismutase (SOD). Utilizando o mesmo tratamento da biomassa e com tempo final de 30 dias, os órgãos das plantas analisadas foram as folhas e raízes. Nas folhas, os valores de APX e CAT não diferiram entre as plantas do Cerrado ou da Amazônia ($P \geq 0.05$). Foi observado um

aumento significativo ($P \leq 0.05$) na atividade da APX a partir de 48h apenas nas plantas do Cerrado, que se manteve elevada até 7 dias. A atividade da APX nas raízes se mostrou variável tanto ao longo do tempo quanto entre as plantas de diferentes procedências. Tanto nas plantas procedentes da Amazônia e Cerrado, o aumento ($P \leq 0.05$) na atividade da APX foi observada apenas no tempo de 7 dias, sendo reduzida de maneira significativa apenas para a planta da Amazônia na avaliação que ocorreu aos 14 dias ($P \leq 0.05$). A atividade da SOD nas raízes aumentou nas primeiras 48h após a submersão, mas esse aumento só foi significativo ($P \leq 0.05$) nas plantas do Cerrado, cujos valores foram mais elevados ($P \leq 0.05$) que nas plantas do Amazônia.

Desta forma foi observado que ao tentar preservar condições mínimas para a que a planta sobreviva, devido as condições de estresse mencionadas anteriormente, tanto as plantas do ecotipo da Amazônia e do Cerrado de *G. ulmifolia* se comportaram de maneira parecida, porém apresentaram diferenças nas respostas bioquímicas sugerindo uma atividade imediata de algumas das plantas da Amazônia quando exposta ao alagamento, indicando tolerar de maneira mais eficiente ao alagamento.

Palavras-chave: Alagamento, Guazuma, Oxigênio, Biomassa, Enzima, Antioxidantes

ABSTRACT

Soil flooding is one of the main abiotic stresses that negatively impacts plant growth and productivity. Excess water in the soil reduces the concentration of oxygen, necessary for the maintenance of aerobic respiration of plants and induces changes in their morphology and/or physiology, such as the alteration of metabolic pathways to survive in hypoxia or even anoxia conditions in these environments. and in plant physiology with the activation of alcohol dehydrogenase (ADH), key enzyme of anaerobic metabolism, and antioxidant enzymes.

In the lowland forests of the Amazon, many plants are subject to periods of flooding of the soil. These plant species were able to adapt, and tolerate long periods of exposure to this stressor, becoming models for studies. The present work *evaluated young plants of Guazuma ulmifolia*, Malvaceae from seeds collected from plants, native to dry ecosystems of the Cerrado and amazonian floodplains, were submerged for long periods, and to verify whether there were differences in growth, biomass, morphology and biochemistry, and to relate to the tolerance of the plant to flooding. The plants of *G. ulmifolia* from the Cerrado or amazonian, aged 60 days, were submitted to two treatments: (1) Control (daily watering up to field capacity), (2) Total submersion of the plant at different times (0, 24 h, 48h, 7 days, 14 days, 30 days 60 of). Regardless of origin, Amazon or Cerrado, the submersion induced chlorosis and leaf fall in the plants in the first weeks, growth stoppage and significant biomass reductions when compared with the control plants, which maintained continuous growth. At the end of the 30 days, the cerrado plants showed necrosis of the stem tissues, which did not occur with the plants of the Amazon, which presented a healthy appearance. When doing the analysis of alcohol dehydrogenase (ADH), a key enzyme of anaerobic metabolism, it was possible to observe that the enzyme has its highest activity in the time of 48 hours of submersion ($P \leq 0.05$), especially in plants in the Amazon where they had the highest peaks of activity of ADH when compared to cerrado plants, after this time the enzyme has its activity reduced. Due to the stress conditions caused by flooding imposed on plants, they induce overproduction of reactive oxygen species (EROs), causing damage to cellular structures and even causing the death of the plant. The present work also analyzed the activity of some antioxidant enzymes that are part of an efficient antioxidant defense system, which involves the following enzymes Ascorbate peroxidase (APX), Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD). Using the same biomass treatment and with a final time of 30 days, the organs of the plants analyzed were the leaves and roots. In the leaves, the Values of APX and CAT did not differ between the cerrado or amazonian plants ($P \geq 0.05$). A significant increase ($P \leq 0.05$) was observed in the activity of APX from 48h only in cerrado plants, which remained elevated up to 7 days. The activity of APX in the roots was variable both over time and between plants of different origins. Both in plants from the Amazon and Cerrado, the increase ($P \leq 0.05$) in the activity of APX was observed only in the time of 7 days, being significantly reduced only for the Amazon plant in the evaluation that occurred at 14 days ($P \leq SOD$ activity in the roots increased in the first 48h after submersion, but this increase was only significant ($P \leq 0.05$) in cerrado plants, whose values were higher ($P \leq 0.05$) than in Amazonian plants.

Thus, it was observed that when trying to preserve minimum conditions for the plant to survive, due to the stress conditions mentioned above, both the Amazon and Cerrado biomebed similarly, but presented differences in biochemical responses suggesting an immediate activity of some of the amazon iana plants when exposed to flooding, indicating to tolerate flooding more efficiently.

Keywords: Flooding, Guazuma, Oxygen, Biomass, Enzyme

Lista de Figuras

- FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DOS BALDES COM AS PLANTAS DENTRO DA CASA DE VEGETAÇÃO. LOCALIZAÇÃO DEFINIDA POR SORTEIO. CERRADO: ⊗ TRATAMENTO CONTROLE, ○ TRATAMENTO DE SUBMERSÃO; AMAZÔNIA: ⊗ TRATAMENTO CONTROLE, ○ TRATAMENTO DE SUBMERSÃO. 32
- FIGURA 2. CRESCIMENTO MÉDIO DAS PLANTAS JOVENS DE GUAZUMA ULMIFOLIA DA AMAZÔNIA E DO CERRADO, AO LONGO DE 59 DIAS DE SUBMERSÃO. 37
- FIGURA 3. DETALHE DO SISTEMA RADICULAR E PARTE DO CAULE DAS PLANTAS DE GUAZUMA ULMIFOLIA DO CERRADO DEPOIS DE 30 DIAS NOS TRATAMENTOS: (A) CONTROLE, SEM APARÊNCIA DE DANOS OU NECROSE DOS TECIDOS; (B) SUBMERSÃO, MOSTRANDO O DESCOLAMENTO DA EPIDERME DO CAULE E A NECROSE DOS TECIDOS, EXPONDO O XILEMA CAULINAR (CÍRCULO). 38
- FIGURA 4. APARÊNCIA DAS PLANTAS DE GUAZUMA ULMIFOLIA DO CERRADO (A-B) E DA AMAZÔNIA (C-D), NOS TRATAMENTOS CONTROLE (A, C) E APÓS 30 DIAS DE SUBMERSÃO (B, D). AS PLANTAS SUBMERSAS DO CERRADO (B) E DA AMAZÔNIA (C) PERDERAM AS FOLHAS. A SETA (B) INDICA A EPIDERME NECROSADA NA BASE DO CAULE EM PLANTAS DO CERRADO. 40
- FIGURA 5. ATIVIDADE DA ENZIMA ADH NAS PLANTAS NOS TEMPOS 0 (INÍCIO OU CONTROLE), 24 HORAS, 48 HORAS E 7 DIAS, 14 DIAS E 30 DIAS DE SUBMERSÃO. LETRAS MAIÚSCULAS COMPARAM AS PLANTAS DE MESMA ORIGEM, AO LONGO DO TEMPO, QUANDO SUBMERSAS. LETRAS MINÚSCULAS COMPARAM PLANTAS DE ORIGENS DIFERENTES (CERRADO OU AMAZÔNIA), NO MESMO INTERVALO DE TEMPO. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($P \leq 0.05$). I = ERRO PADRÃO DA MÉDIA. 43
- FIGURA 6. EFEITO DA INUNDAÇÃO NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES APX E CAT NAS FOLHAS. LETRAS MAIÚSCULAS COMPARAM AS PLANTAS DE MESMA ORIGEM, AO LONGO DO TEMPO, QUANDO SUBMERSAS. LETRAS MINÚSCULAS COMPARAM PLANTAS DE ORIGENS DIFERENTES (CERRADO OU AMAZÔNIA), NO MESMO INTERVALO DE TEMPO. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($P \leq 0.05$). I = ERRO PADRÃO DA MÉDIA. 45
- FIGURA 7. EFEITO DA INUNDAÇÃO NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES APX, CAT E SOD, NAS RAÍZES. LETRAS COMPARAM AS PLANTAS DE MESMA ORIGEM, AO LONGO DO TEMPO, QUANDO SUBMERSAS. LETRAS MINÚSCULAS COMPARAM PLANTAS DE ORIGENS DIFERENTES (CERRADO OU AMAZÔNIA), NO MESMO INTERVALO DE TEMPO. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($P \leq 0.05$). I = ERRO PADRÃO DA MÉDIA. 47

Lista de Tabelas

- TABELA 1. NÚMERO DE PLANTAS DE GUAZUMA UMIFOLIA, PROVENIENTES DO CERRADO OU DA AMAZÔNIA, UTILIZADAS NOS TRÊS EXPERIMENTOS REALIZADOS NESTE ESTUDO. 30
- TABELA 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS PLANTAS DE GUAZUMA ULMIFOLIA APRESENTADAS AO LONGO DE 60 DIAS DE TRATAMENTO. (+) PRESENÇA, (-) AUSÊNCIA..... 37
- TABELA 3. MÉDIAS DOS VALORES, SEGUIDA DO ERRO PADRÃO, DA DISTRIBUIÇÃO DE BIOMASSA NAS PLANTAS DE GUAZUMA ULMIFOLIA DA AMAZÔNIA E DO CERRADO, QUANDO SUBMETIDAS À SUBMERSÃO POR 30 OU 60 DIAS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES, NA MESMA COLUNA, INDICAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS TEMPOS DE 30 E 60 DIAS, PARA CADA ÓRGÃO. LETRAS MAIÚSCULAS DIFERENTES, NA MESMA LINHA, INDICAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS TRATAMENTOS E A ORIGEM DAS PLANTAS. $P < 0.05$, $N = 5$ 42

1. INTRODUÇÃO

O alagamento do solo é um dos principais estresses abióticos que impacta negativamente o crescimento e a produtividade das plantas, tanto em ecossistemas naturais quanto agrícolas, causando grandes prejuízos econômicos e ambientais em muitas partes do mundo (Voesenek & Bailey-Serres, 2015). As projeções feitas pelo IPCC (2021) para o final deste século são de aumento na frequência dos eventos de precipitação intensa sobre a maioria das regiões do planeta, considerando todos os cenários de emissão, incluindo a região norte da América do Sul e extremo sul do Brasil (IPCC, 2013).

O excesso de água no solo reduz a concentração de gases, em especial o oxigênio necessário para a manutenção da respiração aeróbica das plantas que, que precisam desenvolver estratégias para sobreviver ao efeitos adversos causados pela exposição a eventos extremos de alagamento do solo, com alterações na sua fisiologia e morfonatomia (Jackson *et al.*, 2009; Yamauchi *et al.*, 2018).

Para um desenvolvimento de mecanismos eficientes que incluem a alteração de vias metabólicas para sobreviver em condições de hipóxia ou mesmo anoxia (Ferreira *et al.*, 2009; Jackson & Colmer, 2005).

Mudanças na estrutura do solo, após enchentes, geralmente incluem desagregação de sedimentos, defloculação de argilas e destruição de agentes sedimentadores (Hosokawa & Crespo, 2007). Os efeitos da inundação no solo são associados com mudanças químicas relacionadas com a baixa disponibilidade de O₂ (hipóxia) ou ausência dele (anóxia), acumulação de CO₂, solubilidade de minerais subsistentes, redução de Fe e Mn, decomposição de matéria orgânica e a formação de compostos tóxicos (Fukao *et al.*, 2019; Voesenek & Bailey-Serres, 2015)

A baixa disponibilidade de O₂ para as plantas tem efeito negativo na principal via metabólica de geração de energia necessária para o trabalho celular, tendo em vista que ele é o acceptor final na cadeia de transportes de elétrons na mitocôndria. Sua ausência leva a redução da produção de energia (ATP) e a ativação de vias metabólicas alternativas, com a indução de enzimas do metabolismo anaeróbico, como a álcool desidrogenase (ADH), uma das enzimas-chave nesse processo (Ferreira *et al.*, 2009; Ismond *et al.*, 2003). No entanto, essa estratégia bioquímica de manutenção do metabolismo gera compostos como o lactato, acetaldeído e o etanol, que se tornam tóxicos quando acumulados e podem levar a morte da planta (Kozlowski, 1997). Neste caso, as plantas devem dispor de mecanismos bioquímico, anatômico e morfológico (Kozlowski, 1997; Voesenek & Bailey-Serres, 2015)

A tolerância de plantas ao alagamento pode estar relacionada a diversos fatores de acordo com sua espécie e genótipo, sendo influenciada pela idade da planta, duração da inundação (Kozlowski, 1997). A resposta fisiológica da planta relacionada com alagamento é acompanhada de uma série de disfunções na planta, como a redução na fotossíntese, devido ao fechamento estomático, diminuição na absorção de água e nutrientes, relações hormonais e compostos fitotóxicos(Colmer & Atwell, 2013; Kozlowski, 1997).

Devido à forte pressão exercida pelo alagamento para as plantas, muitas espécies que colonizam os ecossistemas alagáveis podem apresentar elevados níveis de plasticidade, que é definida como a capacidade do organismo de modificar de acordo com ambiente, o que é de grande importância para a planta por ser fixa no solo(Jackson *et al.*, 2009). Essas mudanças, que ocorrem devido a adaptação da planta ao ambiente, possibilitam o desenvolvimento de estudos em níveis morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares. Neste caso, estudos utilizando ecótipos pertencentes à mesma espécie, mas que habitam ecossistemas contrastantes com eventos de alagamento do solo, podem esclarecer como as plantas toleram de forma

eficiente o estresse que estariam envolvidas para garantir sua sobrevivência nessas condições durante as etapas do seu ciclo de vida (Ferreira *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2018)

Guazuma ulmifolia é uma arbórea da família Malvaceae, em que as maiores representantes podem alcançar até 30 m de altura. A sua distribuição é ampla e no Brasil ocorre na parte norte do Amazonas, em florestas de várzea que são periodicamente alagáveis (Marcio & Ayres, 1986) e em áreas secas do bioma Cerrado (Ribeiro *et al.*, 2018)) até a região Sul do país (Jacques *et al.* 1985). As florestas de várzea da Amazônia estão expostas todos os anos a um longo período de alagamento que pode ter uma duração de até sete meses contínuos, quando a coluna de água pode ultrapassar 10 metros de altura (Junk, 1979). O período de chuvas ou forte atividade convectiva na região Amazônica é compreendido entre Novembro e Março, sendo que o período de seca (sem grande atividade convectiva) é entre os meses de Maio e Setembro. Os meses de Abril e Outubro são meses de transição entre um regime e outro (Fisch *et al.*, 1998). Nessas condições, de plantas jovens podem permanecer completamente submersas por longo período de tempo, sendo reexpostas ao ar (desubmergência) logo após a retração das águas, ao final do período de alagamento. Nesses locais, ao longo do ano, as plantas são expostas a uma fase aquática e uma fase terrestre (Ferreira *et al.*, 2009, 2010). Por outro lado, no Cerrado, o clima predominante é tropical quente subúmido, caracterizado por forte sazonalidade das chuvas e com uma estação seca bem definida no ano (maio a setembro) (B. A. da S. Pereira *et al.*, 2011)

O Cerrado possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo (>7.000 espécies), com alto nível de endemismo. O número de plantas vasculares é superior àquele encontrado na maioria das regiões do mundo: plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 7.000 espécies (Mendonça *et al.*, 1998). O clima dessa região, é estacional, onde um período é chuvoso, que dura de outubro a março, é seguido por um período chuvoso, que dura de outubro a março, é seguido por um período seco, de abril a setembro. A distribuição da vegetação e as

adaptações de plantas são determinadas por condições climáticas (temperatura e sazonalidade de chuvas), por condições edáficas (relevo e tipo de solo) e pelos efeitos do fogo (Scariot *et al.*, 2005). Para tolerarem a seca com baixo potencial hídrico, as plantas desenvolveram mecanismos como o ajustamento osmótico, acúmulo de moléculas não-estruturais, transporte de solutos a longa distância com baixo custo energético, permitindo principalmente a manutenção da abertura estomática e fotossíntese sob condições de baixo potencial hídrico no solo (Furquim *et al.*, 2018).

O objetivo principal desse estudo é avaliar as estratégias que permitem uma planta tolerar o alagamento prolongado, por meio de um estudo comparativo entre populações de plantas de uma mesma espécie, *Guazuma ulmifolia*, que coloniza as florestas de várzea na Amazônia ou as áreas secas no Cerrado do Brasil Central. A ocorrência de uma mesma espécie colonizando ecossistemas tão contrastantes com relação à disponibilidade hídrica nos dá a oportunidade de estudar aspectos fisiológicos, bioquímico e morfológicos das plantas à submersão, contribuindo para agregar conhecimento sobre a tolerância de plantas aos estresses do ambiente.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. FLORESTA DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA

A floresta amazônica se caracteriza pela diversidade florística e por possuir fitofisionomias que conferem a sua heterogeneidade de habitats. A classificação dos tipos de vegetação está estritamente ligada com a proximidade e as características dos cursos de água da região (Junk, 1979). Entre os principais tipos de florestas que compõe o bioma, destaca-se a floresta de várzea. Com mais de 222 espécies de árvores ocorrendo ao longo de todo o

gradiente do nível de inundação, é uma das florestas alagáveis mais diversas do planeta (Montero *et al.*, 2006).

São cerca de 200000 km² de áreas, é o segundo maior ambiente florestado da região, considerando estrutura, diversidade e representatividade espacial. A temperatura média anual da região é de 27 °C, apresenta alta umidade relativa (acima 80%), elevado índice pluviométrico (média anual variado entre 2000 e 2500 mm), com um período de seca (estiagem) que dura de três a quatro e outro chuvoso (novembro/junho) (Junk, 1993).

As várzeas da Amazônia são áreas férteis porque os rios a elas associados transportam grande quantidade de sedimentos em suspensão, trazidos pelas correntezas a partir de suas áreas de captação localizadas nos Andes ou encostas pré-andinas. Todos os anos, durante a época de chuvas, o nível desses rios sobe em média 10 m de altura, transbordam e invadem extensas fitofisionomias de florestas próximas às suas margens (Junk, 2013; Junk, 1979). Ao adentrar nas florestas a velocidade do fluxo de água diminui, chegando a parar devido ao atrito com os troncos das árvores. Como consequência, os sedimentos se depositam no fundo dos rios e lagos formados, promovendo a renovação cíclica do solo e resultando na alta fertilidade das florestas de várzeas (Sioli, 1984; Piedade *et al.*, 2010).

A inundação acontece em direção às planícies mais elevadas no interior da floresta e uma zonação de comunidades vegetais se forma ao longo do gradiente de nível de inundação, com uma clara substituição das espécies, que depende das condições de inundação em cada posição topográfica (Montero *et al.*, 2006). As espécies que se estabelecem próximas às margens são as primeiras a serem alagadas e as últimas a saírem do alagamento. Essas áreas, onde o alagamento é mais extremo, são classificadas como várzea-baixa, locais onde as plantas podem permanecer, em média, durante cinco meses do ano continuamente alagada

sob uma coluna de água de cerca de cinco metros de altura (Gama *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2006). A penetração de luz através da água de alagamento é menor que 50 cm de profundidade e, por esse motivo, muitas plantas, especialmente durante a fase de plântula, podem permanecer completamente submersa por longos períodos no escuro (Ferreira *et al.*, 2010; Parolin, 2009).

2.2. CERRADO

O cerrado é segundo maior bioma em extensão territorial da América do Sul, aproximadamente, 2000000 km² de área, ocupa proximamente 24% do território brasileiro (MMA, 2015). Nele é comportado uma grande diversidade, em termos de espécies. Em função da sua extensão territorial e por apresentar um clima sazonal, relacionado a pluviosidade não homogênea sobre a sua extensão. Apresenta alta heterogeneidade ambiental faz com que a vegetação desse bioma apresente uma maior diversificação comparada com os outros tipos de biomas (Pereira *et al.*, 2011)

Fisionomicamente, o cerrado é caracterizado por vegetação tipicamente savânica, porém, segundo o sistema de classificação de Ribeiro & Walter (2008) existem 11 tipos principais e vegetação para o bioma Cerrado. Apresentam formações florestais (mata ciliar, mata de galeria, mata seca e cerradão), as savânicas (cerrado sentido restrito, parque cerrado, palmeiral e vereda) e as campestres (campo sujo, campo limpo e rupestre).

Essa alta diversidade de ambientes se reflete em uma elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 12.356 espécies que ocorrem espontaneamente somada a uma flora vascular nativa (pteridofita e fanerógama) somando 11627 espécies, 44 % aproximadamente em uma flora endêmica (Mendoza, 2008).

O cerrado apresenta um tipo de clima tropical sazonal, pode ser dividido em duas estações bem definidas: uma seca, que tem início no mês de maio, terminando no mês de setembro, e outra chuvosa, que começa em outubro e se estende até abril. Na estação da seca. A umidade relativa é muito baixa e a evaporação alta, sendo que a precipitação pode ser zero em alguns meses. A temperatura média anual do bioma fica em torno de 22-23 °C. O clima na estação propicia um ambiente para o aumento da ocorrência de incêndios florestais, que podem ocorrer de forma proposital ou de origem natural (Maracahipes *et al.*, 2011).

A região do Cerrado consiste em um mosaico de vegetação, como fisionomias determinadas não apenas pelo clima, mas também por solos provenientes de diferentes matérias de origem (Haridasan, 2008). O solo do Cerrado tem suas características bem conhecidas, o Latossolo apresenta, uma drenagem bem definida, ácidos e pobreza de nutrientes como cálcio, magnésio, potássio e alguns micronutrientes. Além dessas características esses tipos de solo representam cerca de 48% da área do bioma, apresentando coloração variando o vermelho ao amarelo, em função da presença de ferro (Haridasan, 2008; Pereira et al., 2011). Outros solos também são presentes no bioma do Cerrado, em 7,5% da região os solos pedregosos e rasos (Neosolos Litólicos), geralmente de encostas, os arenosos (Neosolos Quartzaresmicos), que representam cerca de 15% da área total, os orgânicos (Organossolos) e outros em menor quantidade (B. A. da S. Pereira et al., 2011; Reatto, 2008)

2.3. *GUAZUMA ULMIFOLIA*: UMA ESPÉCIE FLORESTAL NATIVA, COMO MODELO PARA ESTUDOS DE TOLERÂNCIA AO ALAGAMENTO PROLONGADO

Guazuma ulmifolia ou mutamba como é popularmente conhecida, é uma espécie arbórea amplamente distribuída, se encontra no México, América Central e América do Sul. Anteriormente classificada como Sterculiaceae, até que estudos filogenéticos de Souza & Lorenzi (2008) mudaram a espécie para as Malvaceae. É uma espécie pioneira, heliófita, semidecídua que se caracteriza por ser uma árvore ou arvoreta perenifólia, com copa arredondada e densa, galhos horizontais, folhas alternas, simples e pilosa e ovóides lanceoladas, inflorescências amarelas e frutos globosos, secos e verrucosos (Cronquist *et al.*, 2007).

Seus frutos são do tipo cápsula loculicida, globosa, seca, de cor preta. Os frutos maduros apresentam maior concentração nos meses de agosto e novembro (Roberta *et al.*, 2005) e têm a coloração cinza-escuro, sendo do tipo cápsula, lenhoso, seco, indeiscente, muricado e pentacarpelar, com média de 64 sementes por fruto (Roberta *et al.*, 2005). As sementes são pequenas, medindo aproximadamente 3 X 2 mm, de consistência lenhosa e cor marrom acinzentada (Roberta *et al.*, 2005). É uma espécie importante para o reflorestamento destinado a algumas áreas de recomposição degradadas (Carvalho *et al.*, 2007).

Comparar a mesma planta de ecossistemas diferentes a ambientes totalmente distintos, como por exemplo inundados e não inundados, ajuda a esclarecer e entender melhor alguns mecanismos, como o processo de especiação da planta, a seleção natural, a plasticidade fenotípica e a adaptação ao estresse. Em trabalhos de Ribeiro *et al.* (2018) as plantas de *G. ulmifolia* obtidas de ecótipos da Amazônia ou do Cerrado submetidas ao alagamento parcial sobreviveram ao estresse, foram observadas respostas relacionadas ao alagamento, como o

surgimento e clorose e abscisão foliar tanto nas plantas provenientes de matrizes da Amazônia quanto nas do Cerrado.

O alagamento promoveu o desenvolvimento de algumas estruturas como lenticelas, a hipertrofia do caule e o aumento de raízes adventícias (Pires *et al.* 2018). Apesar de apresentarem um desempenho inferior ao das plantas da Amazônia, as plantas do Cerrado tiveram características de tolerância a inundações que estavam presentes em populações de ambos os ecossistemas.

2.4 FISIOLOGIA DO ESTRESSE DE PLANTAS

O estresse na planta foi definido por Litchentaler (1996) como algumas condições desfavoráveis a substâncias que afetam ou bloqueiam metabolismo da planta. Entre os fatores de estresse abióticos mais comuns para as plantas está o excesso de água no solo ou alagamento resultante de fatores climáticos ou ambientais, mudanças no uso da terra e/ou solos mal drenados (Yeung *et al.*, 2018).

O alagamento do solo tem impacto negativo na agricultura por levar a um baixo rendimento que pode atrasar o plantio, reduzindo o vigor, alterando o desenvolvimento e aumento da susceptibilidade a doenças (Voeselek & Bailey-Serres, 2015). De acordo com Bailey-Serres (2012) é impossível calcular os impactos dos prejuízos que o alagamento causa, porém, nos Estados Unidos de 2001 a 2011, foram pagos U\$ 24 bilhões de dólares em seguros para agricultores. Além de restringir ao ambiente somente as espécies que são tolerantes ao alagamento, diminuindo o número e a diversidade de plantas.

Muitas plantas são capazes de desenvolver características que lhes permitem ajustar às mudanças ao ambiente, e conferir tolerância ou resistência. Tais características, quando envolvem alterações no genoma da planta são referidas comumente como adaptações. As adaptações são caracterizadas principalmente por serem transmitidas às gerações seguintes

(Ben Rejeb *et al.*, 2014). Ajustes de curto prazo nas características que permitem a tolerância ao estresse, podem ser denominados como mecanismo de aclimatação, que é quando as plantas expostas a um estresse subletal (exposição a um período de frio ou a déficits hídricos), de maneira subsequente ou severa, adquirem alguma resistência e/ou tolerância às condições que poderiam matar as plantas mais sensíveis (Shabala, 2013).

No ambiente natural, ao longo da vida a planta é constantemente confrontada por ambos os estresses, bióticos e os abióticos, fazendo com que a produtividade caia de forma significativa. A planta então se organiza de maneira complexa para tentar combater esses fatores, o que envolve várias respostas fisiológicas e adaptações em nível celular e molecular (Loreti *et al.*, 2016).

Devido ao alagamento, as plantas produzem sinais metabólicos de vários tipos, em resposta à diminuição dos níveis endógenos de oxigênio. Nesse período ocorre adaptações onde as plantas alagadas alteram sua arquitetura, anatomia, metabolismo e crescimento como estratégia de sobrevivência (Voesenek & Bailey-Serres, 2015). Uma das principais vias de sinalizações inicia pelo balanço de gases, com diminuição da concentração de oxigênio e por um aumento de etileno. Como consequência da queda nos níveis de oxigênio, há uma regulação negativa do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (o ciclo de Krebs) que são os principais mecanismos geradores de esqueletos de carbono para a síntese de compostos do metabolismo secundário das plantas, de onde vêm os hormônios vegetais (Grandis *et al.*, 2010). São os ajustes nas vias hormonais que podem levar à modificações na anatomia e na morfologia da planta, relacionadas aos níveis alterados de etileno e seu balanço com outros hormônios, como a indução do alongamento do caule, produção de raízes adventícias, lenticelas e aerênquima. Tais estruturas tem a finalidade de reduzir os danos causados pelo alagamento e facilitar a troca de gases e compostos voláteis tóxicos provenientes do

metabolismo anaeróbico, entre o ambiente externo e interno da planta (Jackson et al. 2009; Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

7

2.5 METABOLISMO ANAERÓBICO

O O₂ é uma molécula extremamente importante para organismos aeróbios, devido a sua eletronegatividade ele é um importante aceptor de elétrons em processos energéticos. O oxigênio serve como um aceptor de elétrons na fosforilação oxidativa que regenera o ATP, principal fonte de energia para o metabolismo celular, por meio da regeneração do NAD⁺, viabilizando o poder de sustentação das vias bioquímicas, como por exemplo, a glicólise (De Sousa & Sodek, 2002; Loreti *et al.*, 2016).

O trabalho anaeróbico da glicólise funciona para algumas necessidades, mas é ineficiente, tóxico e acumula produtos tóxicos. Esses dois problemas causarão a morte rapidamente das árvores que não estão adaptadas às condições de alagamento (Gama *et al.*, 2005; Loreti *et al.*, 2016). Os principais problemas durante a submersão ocorrem pela falta de oxigênio devido às taxas de difusão lentas de gases na água e o esgotamento de carboidratos, que é o substrato para respiração (Mommer & Visser, 2005). Esses dois fatores juntos levam à perda de biomassa e eventualmente morte de plantas submersas não adaptadas (Ferreira *et al.*, 2010).

Ao sofrer alagamento, são produzidos nas plantas diversos tipos de compostos, em resposta ao baixo nível endógeno de oxigênio. As células e tecidos são expostos à variação interna de O₂ e CO₂ e à elevação no nível de etileno, de espécies reativas de oxigênio (EROS)

e de nitrogênio. A produção de EROS é induzida pela deficiência de O₂, como consequência da inibição do transporte de elétrons na mitocôndria (Voeselek & Bailey-Serres, 2015).

Em tecidos com baixa ou nenhuma presença de oxigênio, o conteúdo de piruvato aumenta assim como o de enzimas glicolíticas. Na deficiência de oxigênio as enzimas fermentativas piruvato descarboxilase (PDC), álcool desidrogenase (ADH) e lactato desidrogenase (LDH) são produzidas em consequência da necessidade em aumentar a glicólise para compensar a baixa produção de ATP devido à inativação da fosforilação oxidativa (Saglio *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2002). O uso excessivo da via fermentativa e resulta na produção e acúmulo de produtos como acetaldeído, lactato e etanol, que permite regeneração de NAD⁺ a partir de NADH. A regeneração de NAD⁺ pelas enzimas fermentativas ADH e LDH é vital para a tolerância à hipoxia/anoxia porque, na ausência de NAD⁺, a glicólise cessa (Ismond *et al.*, 2003; Kürsteiner *et al.* 2003).

A 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; Voeselek & Bailey-Serres, 2015).

Estudos têm demonstrado que o pH do citosol acidifica durante o alagamento, o que leva a ativação da álcool desidrogenase (ADH), proporcionando alta produção de etanol, que é extremamente danoso para a membrana pela solubilização de lipídeos, alterando sua fluidez, permeabilidade e transporte. (Drew *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1992; Loreti *et al.*, 2016). A produção do NAD durante a fermentação alcoólica, para a formação de piruvato mostra que é um dos motivos importantes de assegurar que a glicólise aconteça (De Sousa & Sodek, 2002; Jackson *et al.*, 2009). Além do ADH, a glutamatopiruvato transaminoferase (GTP) e a malato desidrogenase (MDH) em condições de anaerobiose da planta, e o aumento da atividades dessas enzimas, são responsáveis por manter uma fonte de energia basal

quando apresentadas as condições de pouco ou ausência de oxigênio (De Sousa & Sodek, 2002; Ferreira *et al.*, 2009; Parolin, 2012).

Mesmo após o fim do alagamento a planta não se encontra em condições favoráveis, já que houve o um ajuste metabólico durante o período de alagamento. Neste caso, a recuperação após o alagamento pode ser um momento crucial para muitas espécies (Colmer *et al.* 2014). Para algumas plantas, no momento da reoxigenação ocorre um aumento na produção de superóxidos em dois complexos, o complexo III (citocromo bc_1) e complexo IV (citocromo c oxidase) da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, a fim de proteger esses sistemas do excesso de O_2 . Deficiência em antioxidantes nessa fase pode levar a danos na membrana celular, comprometendo a integridade da célula (Barreiros *et al.*, 2006; De Sousa & Sodek, 2002).

2.6. ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROS)

As plantas têm um modo de vida sésstil, e por isso são expostas a diversos fatores ambientais que podem levar ao estresse oxidativo vindos de meio abióticos (luz, seca, alagamento, metais pesados, desbalanço de nutrientes e outros) e bióticos (herbívoros, patógenos e alelopatia), na falta de oxigênio, as plantas conseguem obter energia em condições adversas produzindo espécies reativas ao oxigênio tóxicas para as plantas que em altos níveis podem danificar a planta ou até mesmo matar (Christine H. & Graham, 2000)

O O_2 quando se encontra no estado molecular é pouco reativo, mas o metabolismo aeróbico produz as EROs, como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), composto de baixa capacidade oxidativa, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode romper a membrana nuclear e causar danos ao DNA, o radical hidroxil ($\bullet OH$), com baixa capacidade de difusão, mas alta reatividade, provocando lesões em uma série de moléculas em meio celular e o oxigênio singlete (O_2) (Messchmidt *et al.*, 2015; Yeung *et al.*, 2018). As reações onde as EROs são

produzidas acontecem na mitocôndria, cloroplasto e peroxissomos (Kürsteiner *et al.*, 2003). As respostas de defesa aos produtos nocivos do metabolismo precisam acontecer de maneira imediata para que ocorram menos danos possíveis aos tecidos afetados. Por isso ocorre a produção dos antioxidantes, com a função de manter os níveis baixos de EROs nas plantas. O sistema antioxidante precisa agir em sincronia já que são divididos em dois sistemas o antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos que trabalham em conjunto para combater as EROs, para que os sistemas vegetais recuperem a sua homeostase celular (Foyer & Graham, 2000).

Os antioxidantes enzimáticos são a primeira linha de defesa contra os danos das EROs a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx). A SOD é uma enzima que atua dismutando o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Alscher, Ruth Grene; Erturk, Neval & Heanth, 2007). A catalase tem a função de decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. A ascorbato peroxidase é quem catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons. A glutathiona redutase (GR) é uma enzima responsável por catalisar a redução da GSSG (glutathiona oxidada) para GSH (glutathiona reduzida), a glutathiona têm importância na proteção celular (contra a formação de radicais livres), na manutenção do balanço redox da célula, no transporte de aminoácidos e participa da regulação alostérica enzimática, sendo utilizada pela GR (Cakmak *et al.*, 1993; Yeung *et al.*, 2018). O ascorbato é responsável pela degradação do H_2O_2 utilizando o ascorbato como substrato, a enzima é importante na defesa de tecidos fotossintético contra o estresse fotooxidativo (Barbosa *et al.*, 2014).

Entre os antioxidantes não enzimáticos se destacam os polifenóis, flavonoides, o β -caroteno e o tocoferol. Os polifenóis constituem um amplo grupo de fitoquímicos que possui

mais de 8000 estruturas conhecidas. A capacidade antioxidante dos polifenóis é conferida a seu poder redutor e, por ter essa multiplicidade de estruturas, pode apresentar variadas respostas que dependem da posição da hidroxila na molécula (Barreiros *et al.*, 2006). Os flavonóides e os carotenóides são capazes de absorver os radicais livres e inibir a cadeia de iniciação ou interromper a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (Ben Rejeb *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

O alagamento é um dos mais importantes estresses abióticos para as plantas, responsável por reduzir a diversidade da flora em ambientes naturais e por grandes perdas entre as espécies agricultáveis. Mesmo um período relativamente curto de alagamento, menor que 24 horas, é suficiente para gerar fortes prejuízos econômicos, uma vez que a maioria das espécies cultivadas para fins comerciais não é tolerante ao excesso de água no solo (Bailey-Serres & Voesenek 2012). Por esse motivo, estudos com espécies adaptadas a ecossistemas alagáveis despertam bastante interesse. Plantas que colonizam áreas sujeitas a alagamentos podem exibir diferentes níveis de tolerância, dependendo da duração do estresse, e que pode estar combinado a fatores da própria planta como a idade e a genética (Ferreira *et al.* 2010). Muitas espécies tendem a alterar sua bioquímica, fisiologia e/ou a morfologia para se ajustar às condições expostas e garantir sua perpetuação no ambiente (Kozlowski 1997, Larcher 2006, Jackson *et al.* 2009, Piedade *et al.* 2010, Colmer *et al.* 2014, Bailey-Serres & Voesenek 2015). *Guazuma ulmifolia* é uma espécie que possui representantes que colonizam ecossistemas distintos, áreas secas no Cerrado e florestas alagáveis na Amazônia, sujeitos a condições de climas contrastantes em relação à disponibilidade hídrica. Neste caso, é possível que tais diferenças

sejam evidenciadas na tolerância desta espécie ao alagamento, e que possam estar relacionadas com o ambiente de origem das plantas (Cerrado ou Amazônia). Por se tratar de uma arbórea nativa, encontrada naturalmente em ambientes alagáveis ou não alagáveis, os estudos que avaliem os mecanismos bioquímicos e fisiológicos da planta em condições de alagamento experimental, oferecem a oportunidade de ampliar o conhecimento sobre a tolerância de plantas a esse estresse.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas de plantas jovens de *Guazuma ulmifolia*, pertencentes a ecotipos nativos de regiões secas do Cerrado e das áreas alagáveis da Amazônia, quando submetidas a condições de submersão por longo período. Verificar a ocorrência de alterações na morfologia das plantas e de ajustes na sua fisiologia, por meio da análise de atividade de enzimas da via do metabolismo anaeróbico ou do sistema antioxidante, ambas relacionadas com a tolerância ao alagamento.

5. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Obter os dados de sobrevivência, de crescimento, do acúmulo de biomassa e identificar as alterações que ocorrem na morfologia das plantas de *G. ulmifolia*, pertencentes aos distintos ecotipos (Cerrado ou Amazônia) em condições de submersão.
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas plantas, por meio da análise na atividade de enzimas do sistema antioxidantes durante período de submersão.

- Analisar a atividade da enzima do metabolismo anaeróbico, álcool desidrogenase (ADH), induzida pelo alagamento, durante os 30 dias de submersão das plantas.

6. HIPÓTESE

A hipótese principal do estudo é de que as plantas de *Guazuma ulmifolia* provenientes de populações de plantas nativas do Cerrado não toleram ou não respondem à submersão prolongada, com alterações em sua morfologia e/ou fisiologia, como aquelas de mesma espécie provenientes de populações de plantas nativas das várzeas da Amazônia, uma vez que essas condições extremas de alagamento do solo não ocorrem naturalmente nesse ecossistema. Com base nisso, foram elaboradas as hipóteses complementares descritas abaixo:

- As plantas de *G. ulmifolia* do Cerrado e da Amazônia, irão mostrar diferentes níveis de tolerância devido a condição de alagamento total, em função do ambiente de origem (Cerrado ou Amazonia), com os ecotipos da Amazônia apresentando melhores adaptações na morfologia (ex. raiz adventícias), fisiologia (ex. metabolismo) e bioquímica (ex. antioxidantes) no período do Alagamento.
- As plantas de *G. ulmifolia* irão apresentar diferentes respostas a sobrevivência e aos danos causados pelo alagamento, tendo em vista o seu ecotipo de origem, as plantas da Amazônia tendo uma maior vantagem sobre as plantas do Cerrado.

7. MATERIAIS E METODOS

7.1 COLETA DE SEMENTES PARA A PRODUÇÃO DAS PLÂNTULAS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS

As sementes foram obtidas de plantas de *G. ulmifolia* nativas das florestas alagáveis pelos rios de águas brancas na Amazônia (*sensu* várzea, Sioli 1984) ou de áreas secas, nos

cerrados no Brasil Central. Na Amazônia, foram coletados frutos de, no mínimo, cinco plantas de *G. ulmifolia* na região das ilhas Xiborena (3°11'36,73" S; 59°56'33,34" W) e Marchantaria (3°1'28" S; 60°8'48" W), às margens do rio Solimões próximas da cidade de Manaus, AM. No Cerrado, os frutos foram coletados em uma área de cerradão localizada na região de Formoso, Minas Gerais (15° 02'28,0"S; 46°33'00,9" W). Os frutos foram transportados para o Laboratório de Fisiologia Vegetal da UnB, em Brasília, e processados para a retirada das sementes. Para garantir a aleatoriedade das amostras obtidas em cada local, as sementes foram misturadas em lotes únicos, devidamente identificados por Amazônia ou Cerrado, de acordo com a procedência.

Para obtenção das plântulas, foi feito um pré-tratamento mergulhando as sementes em água quente por 60 segundos, para quebrar a dormência das sementes e induzir a germinação (Paiva-Sobrinho *et al.* 2012). Depois desse processo, as sementes foram distribuídas em uma bandeja de plástico (18,91 cm x 44,1 cm x 29,7 cm) com uma mistura (1:3) de vermiculita e solo comercial Bioplant®, mantidas em câmara de germinação (25 °C, fotoperíodo de 12 horas, regadas diariamente até capacidade de campo – solo úmido). Após 20 dias, as plântulas (do Cerrado e da Amazônia) foram colocadas em vasos plásticos de 800 mL contendo solo comercial Bioplant® e transferidas para a sala de crescimento do Departamento de Botânica (IB-UnB), onde foram mantidas por 30 dias com regas diárias e luz artificial (70,75 $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$). Passado esse período, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação na Estação Experimental (IB-UnB), onde permaneceram por 60 dias para aclimação até o início dos experimentos de submersão.

7.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para execução da pesquisa foram montados três experimentos (Tab. 1), um experimento principal de longa duração (60 dias) avaliou o crescimento, as alterações na morfologia e o incremento em biomassa das plantas (tópico 6.4), e dois experimentos de menor duração (30 dias) foram conduzidos de forma paralela ao principal para aferir as alterações e ajustes no metabolismo que acontecem ainda nos primeiros dias e semanas de submersão. Os experimentos de menor duração avaliaram a atividade da enzima chave do metabolismo anaeróbico, desidrogenase alcoólica (ADH), e a atividade de sistemas antioxidantes das plantas (tópico 6.4 e 6.5, respectivamente).

Todos os experimentos seguiram o mesmo desenho experimental, que foi inteiramente casualizado. Para os tratamentos foram utilizados baldes plásticos de 50 L e dentro de cada balde foram colocadas as plantas com origem no Cerrado ou na Amazônia. Antes do início dos experimentos, as plantas foram mantidas nos baldes com regas diárias durante sete dias para aclimatar. Depois desse período, foram submetidas aos tratamentos: (1) = Controle (rega até a capacidade de campo), (2) = Submersão (coluna de água ~ 10cm acima da planta). Em cada experimento, o tempo de avaliação e o número de amostras coletadas variou de acordo com a análise a ser realizada e estão descritos na metodologia correspondente. Para as análises enzimáticas, foram realizados pré-ensaios para otimização da metodologia. Um total de 170 plantas com idade de 60 dias foram utilizadas, sendo que 124 plantas foram amostradas durante os experimentos (Tab. 1).

Tabela 1. Número de plantas de *Guazuma umifolia*, provenientes do Cerrado ou da Amazônia, utilizadas nos três experimentos realizados neste estudo.

Experimentos	Controle		Submersas		Total
	Cerrado	Amazônia	Cerrado	Amazônia	

I. Crescimento, morfologia e biomassa (60 dias)	10	10	10	10	40
II. Metabolismo anaeróbico: atividade da ADH (30 dias)	3	3	15	15	36
III. Atividades de enzimas do estresse oxidativo (30 dias)	4	4	20	20	48
Total de plantas utilizadas					124

Durante a execução dos experimentos a temperatura média foi de 29,5 °C na casa de vegetação e de 22,9°C na água de inundação, contida nos baldes. A concentração de oxigênio dissolvido na água foi de 3,48 mg/L aferida com auxílio de um oxímetro (Lutron, DO – 5519, Taipei, Taiwan). A luminosidade média na casa de vegetação foi de 113,75 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, medida com luxímetro (Tecnal, MQ-200).

7.3 EXPERIMENTO I: CRESCIMENTO, MORFOLOGIA, BIOMASSA DAS PLANTAS

O experimento I teve a duração de 60 dias. Para as plantas de cada ecossistema, Cerrado e Amazônia, foram utilizados 10 baldes, sendo cinco para os tratamentos controle e cinco para os tratamentos de submersão. Os baldes foram distribuídos no interior da casa de vegetação de forma aleatória, por meio de sorteio da localização (Fig. 1). Dentro de cada balde foram acondicionadas duas plantas do Cerrado ou duas plantas da Amazônia, sendo uma para a coleta de biomassa aos 30 dias e outra aos 60 dias.

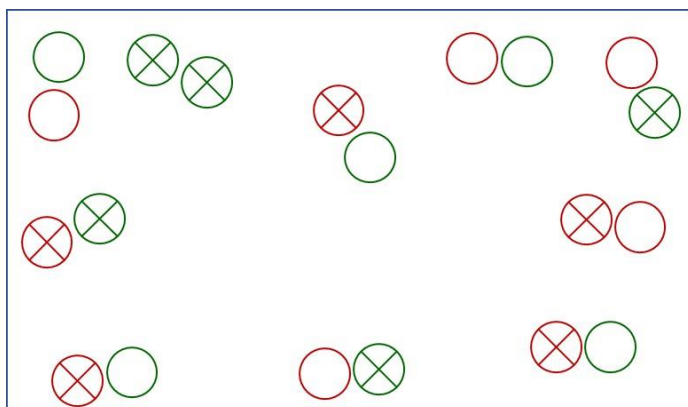


Figura 1. Distribuição dos baldes com as plantas dentro da casa de vegetação. Localização definida por sorteio. Cerrado: ⊗ tratamento controle, ○ tratamento de submersão; Amazônia: ⊗ tratamento controle, ○ tratamento de submersão.

a) Avaliação de biomassa: para cada origem, Cerrado ou Amazônia, cinco plantas ($n = 5$) foram coletadas nos tratamentos controle ou de submersão. As coletas foram realizadas nos tempos 30 e 60 dias do experimento. As plantas foram separadas em raiz, caule e folhas e em seguida colocadas para secar em estufa a 60 °C constante por uma semana. Depois desse período foram pesadas em balança de precisão (0,0001g) para obtenção da massa seca.

b) Avaliação do crescimento e alterações na morfologia das plantas: para cada origem, Cerrado ou Amazônia, cinco plantas ($n = 5$) tiveram o crescimento e as alterações na morfologia acompanhados durante 60 dias nos tratamentos controle ou de submersão. As plantas avaliadas foram as mesmas utilizadas para a análise de biomassa ocorrida aos 60 dias (descrito acima), pois foram mantidas até o final do período experimental. A primeira avaliação ocorreu no tempo 0 (zero), imediatamente antes de submeter as plantas aos tratamentos (controle ou submersão), outras duas foram realizadas aos 30 dias e 60 dias de alagamento. Com auxílio de uma trena, foi tomado o crescimento em altura das plantas de cada ecossistema, nos dois tratamentos. Por meio de observações visuais foram avaliadas as alterações na morfologia das plantas, como a queda ou produção de folhas novas, o aparecimento de clorose, produção de raízes adventícias

e de lenticelas. O estado geral das raízes (p.ex. presença de tecido necrosado) foi verificado ao final do experimento.

7.4. EXPERIMENTO II: METABOLISMO ANAERÓBICO

O metabolismo anaeróbico de *G. ulmifolia* foi aferido por meio da análise da atividade da desidrogenase alcoólica (ADH), enzima chave na via de fermentação alcoólica, que ocorre na ausência de oxigênio. Raízes de três plantas (n=3) de cada ecossistema, Cerrado e Amazônia, foram coletadas em nitrogênio líquido imediatamente antes de submeter aos tratamentos de submersão (tempo zero ou controle), após 24h e 48h de submersão e depois de 7, 15 e 30 dias submersas. O material coletado foi armazenado em freezer a – 80 °C até as análises.

7.4.1 ENSAIO DA ATIVIDADE DA ADH (EC 1.1.1.1):

O protocolo para extração e quantificação de ADH seguiu uma adaptação proposto por (Dixon *et al.*, 2006) e (Jaeger *et al.*, 2009). Amostras de, no mínimo, 0,1 g de material vegetal fresco foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido e armazenados em tubos Eppendorf a - 80°C. O ADH foi extraído usando um tampão contendo 100 mM de Tris (pH 7,5), 10 mM de EDTA, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de ditioneitol, 0,5 mM de pirofosfato de tiamina, 0,1% (p/v) de PVP-40, 1 mM de NAD⁺, 15% (v/v) glicerol, triton 0,02% (v/v), PMSF 1 mM e ascorbato de sódio 10 mM.. Após centrifugação das amostras a 10.000 g, 4 °C por 10 minutos, foram coletadas alíquotas de 100 µL do sobrenadante e adicionado 2,9 mL da mistura de incubação da enzima, que consistiu de tampão Tris-HCl (pH 8,9) 50 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM e βNAD 0,25 mM com mais 100 µL de etanol a 96%. A atividade de ADH foi medida na direção da conversão de etanol em acetaldeído em um volume final de 1,5 mL contendo 48 mM Tris (pH 8,9), 1,26 mM NAD⁺, 20 µL de extrato e 8,75 µL de etanol usando um

espectrofotômetro Thermo Scientific UV/Vis Evolution 201 ajustado para 340nm. A atividade foi expressa em uma base de massa fresca usando o coeficiente de extinção molar para NADH.

7.5 EXPERIMENTO III: ATIVIDADES DE ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO

7.5.1. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROS)

A produção de EROs nos tecidos das raízes e/ou folhas em resposta à submersão das plantas foi avaliada por meio da análise de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, que são a superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) e Peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11). As medidas ocorreram nos mesmos intervalos de tempo utilizados para aferir o metabolismo anaeróbico (descrito no tópico acima 7.4.1): 0h (controle), 24h, 48h e aos 7, 14 e 30 dias após a submersão.

Para as análises, foram separadas as raízes e folhas de três plantas (n=4 de cada ecossistema, coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C para posterior análise. A atividade da CAT e da APX foram analisadas nas raízes e folhas, enquanto da SOD ocorreu apenas nas raízes das plantas.

7.5.1 ENSAIO E QUANTIFICAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

As raízes e folhas congeladas (0,1 g) foram pulverizadas em nitrogênio líquido e as proteínas foram extraídas com 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) contendo EDTA 100 M, PVPP a 10% (p / v) e protease cocktail inibidor. Os extratos de folhas foram centrifugados

a $10.000 \times g$ por 15 min a $4^\circ C$ e o sobrenadante coletado para análise posterior de atividades da SOD, CAT e Peroxidase.

A atividade SOD foi medida de acordo com (Giannopolitis & Ries, 1977), com modificações descritas por (Horta *et al.*, 2014). Os homogenatos foram incubados na presença de tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), L-metionina 13 mM, EDTA 100 μ M, riboflavina 2 μ M e azul de nitro-tetrazólio (NBT) 75 μ M por 10 min a temperatura ambiente numa câmara equipada com lâmpada fluorescente. Os controles consistiram em 9 reações mantidas na ausência de luz. Medidas espectrofotométricas foram realizadas a 575 nm para determinação do conteúdo de O_2 remanescente no meio. Uma unidade de atividade SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de NBT em 50%.

A atividade CAT foi mensurada de acordo com (Cakmak & Horst, 1991). Os homogenatos foram incubados com tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) e H_2O_2 12,5 mM. A atividade da enzima foi estimada a partir de medidas espectrofotométricas a 240 nm e equação de Lambert-Beer, usando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade de APX foi medida de acordo com Nakano & Asada (1981). Os homogenatos foram incubados com tampão fosfato 50 mM (pH 6,0), ácido ascórbico 1 mM e H_2O_2 2 mM. A taxa de oxidação do ácido ascórbico foi monitorada a 290 nm. A atividade da enzima foi estimada utilizando $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O teor total de proteína nas amostras de folhas foi determinado de acordo com Bradford (1976).

8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nas análises de crescimento e biomassa foi aplicada uma ANOVA modelo misto, tendo o alagamento como fator fixo e tempo como fator aleatório. Para as análises de atividade enzimática (ADH e Antioxidantes), a ANOVA unifatorial (One-Way ANOVA) foi utilizada para comparar as medias, seguido do teste Tukey para identificar as diferenças entre os grupos.

9. RESULTADOS

9.1 CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO TOTAL

Todas as plantas (100%), procedentes do Cerrado e da Amazônia, sobreviveram aos 60 dias de submersão. No experimento de submersão ocorreu a paralisação do crescimento das plantas tanto do Cerrado quanto da Amazônia (Fig. 2). Os Controle tiveram um crescimento continuado, sem diferença em relação à origem da planta ($P \geq 005$). Essa resposta foi observada ainda na primeira semana após o início dos tratamentos (Fig. 2).

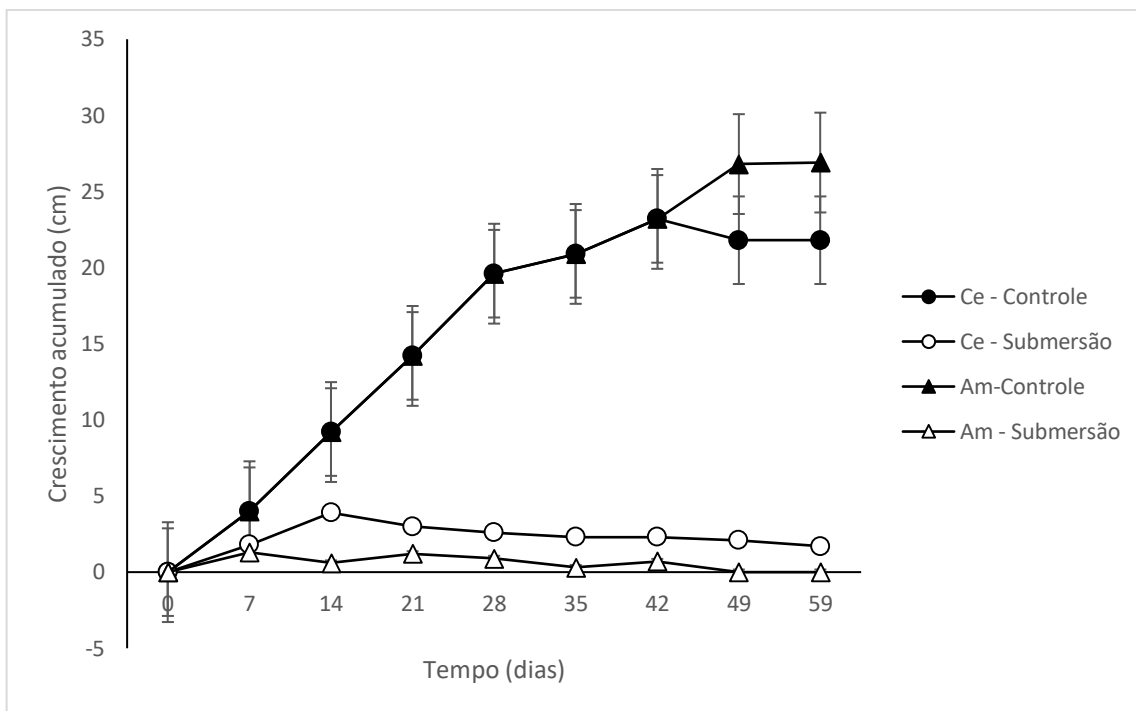


Figura 2. Crescimento médio das plantas jovens de *Guazuma ulmifolia* da Amazônia e do Cerrado, ao longo de 59 dias de submersão.

Em condição de submersão, nenhuma das plantas desenvolveu lenticelas ou raízes adventícias, porém foram verificadas algumas características morfológicas distintas entre as plantas procedentes dos dois biomas (Tabela 2).

Tabela 2. Características morfológicas das plantas de *Guazuma ulmifolia* apresentadas ao longo de 60 dias de tratamento. (+) presença, (-) ausência.

Características	Amazônia		Cerrado	
	Controle	Submersão	Controle	Submersão
Lenticelas	-	-	-	-

Raiz Adventícia	-	-	-	-
Queda de folhas	-	+	-	+
Clorose	-	+	-	+
Tecido necrosado (caule)	-	-	-	+

As plantas do Cerrado mostraram descolamento da epiderme do caule, seguida por necrose dos tecidos e exposição do xilema caulinar (Fig. 3), o que não foi observado nas plantas da Amazônia, que mantiveram o tecido do caule intacto e sem sinais de danos na epiderme (Fig. 4).



Figura 3. Detalhe do sistema radicular e parte do caule das plantas de *Guazuma ulmifolia* do Cerrado depois de 30 dias nos tratamentos: (A) Controle, sem aparência de danos ou necrose dos tecidos; (B) Submersão, mostrando o descolamento da epiderme do caule e a necrose dos tecidos, expondo o xilema caulinar (círculo).

Nas plantas dos dois biomas, Amazônia e Cerrado, foi observada acentuada perda de folhas ($\geq 90\%$) no tratamento de submersão ainda no final do período de 30 dias (Fig. 5) e aos 60 dias, a maior parte das plantas havia perdido totalmente as folhas.

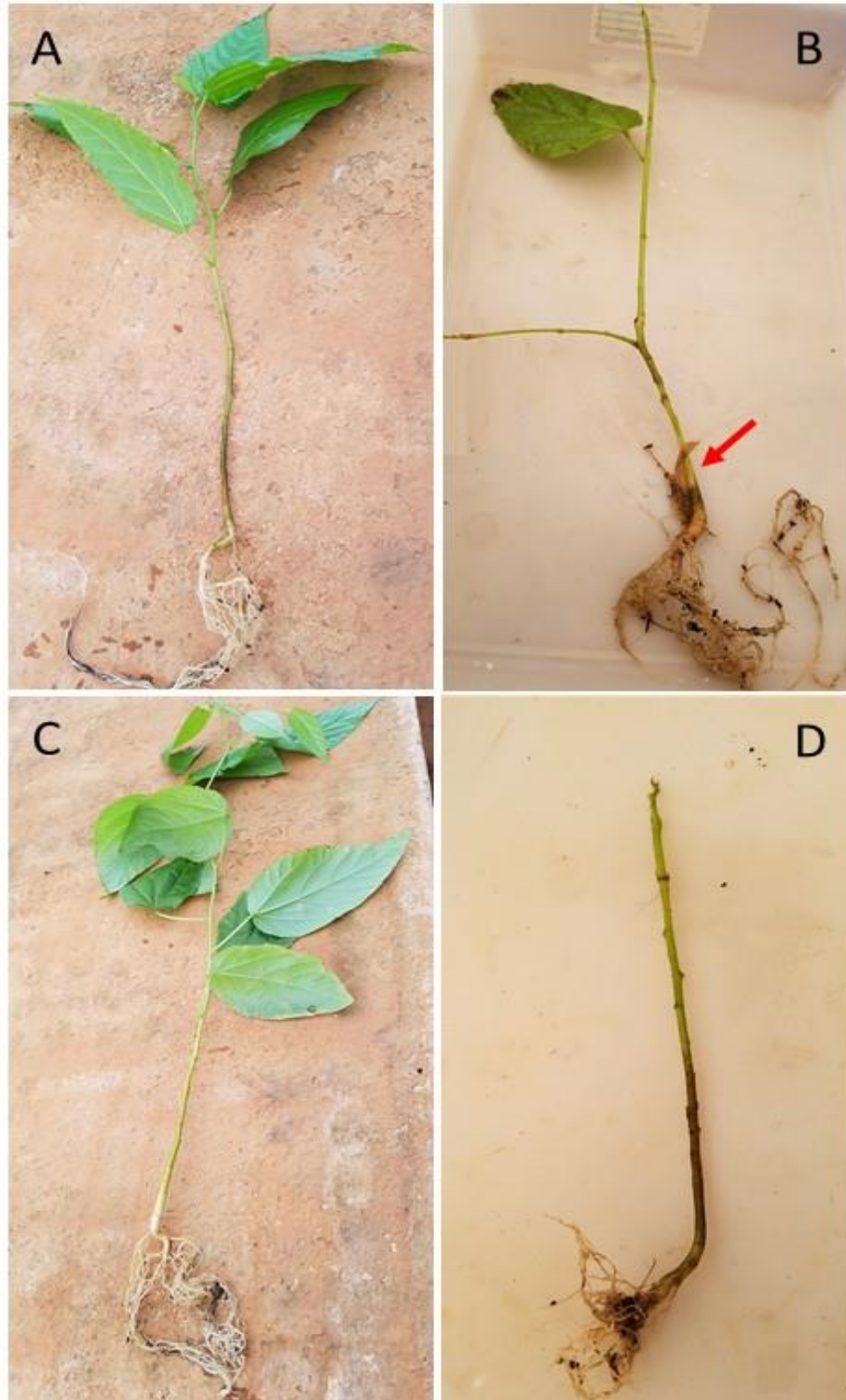


Figura 4. Aparência das plantas de *Guazuma ulmifolia* do Cerrado (A-B) e da Amazônia (C-D), nos tratamentos controle (A, C) e após 30 dias de submersão (B, D). As plantas submersas do Cerrado (B) e da Amazônia (C) perderam as folhas. A seta (B) indica a epiderme necrosada na base do caule em plantas do Cerrado.

9.2 BIOMASSA

A submersão reduziu a biomassa das plantas ($P \leq 0,05$), tanto do Cerrado quanto da Amazônia quando comparadas ao controle (Tabela 5). Aos 30 dias, os valores de biomassa total das plantas submersas correspondiam a cerca de 15% daqueles obtidos nas plantas dos tratamentos controle. Aos 60 dias esse percentual de biomassa correspondia a 5% dos valores de biomassa das plantas controle.

Nos dois tratamentos, controle e submersão, não houve diferença entre as análises realizadas aos 30 e 60 dias ($P \geq 0,05$), para as plantas do Cerrado ou da Amazônia. A exceção foram os valores de biomassa das folhas que aos 60 dias se mostraram significativamente menores ($P \leq 0,05$) nas plantas submersas do Cerrado e naquelas do controle da Amazônia, quando relacionadas aos valores obtidos aos 30 dias.

Tabela 3. Médias dos valores, seguida do erro padrão, da distribuição de biomassa nas plantas de *Guazuma ulmifolia* da Amazônia e do Cerrado, quando submetidas à submersão por 30 ou 60 dias. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa entre os tempos de 30 e 60 dias, para cada órgão. Letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa entre os tratamentos e a origem das plantas. $P < 0.05$, $n = 5$.

	Cerrado		Amazônia	
	Controle (g/kg)	Submersão (g/kg)	Controle (g/kg)	Submersão (g/kg)
Raiz				
30 dias	0,52 ± 0,17 Aa	0,09 ± 0,04 Ba	0,67 ± 0,16 Aa	0,14 ± 0,03 Ba
60 dias	0,71 ± 0,02 Aa	0,04 ± 0,01 Ba	0,79 ± 0,19 Aa	0,09 ± 0,27 Ba
Caule				
30 dias	0,99 ± 0,29 Aa	0,20 ± 0,06 Ba	1,15 ± 0,31 Aa	0,22 ± 0,05 Ba
60 dias	1,25 ± 0,4 Aa	0,12 ± 0,04 Ba	1,81 ± 0,50 Aa	0,10 ± 0,01 Ba
Folhas				
30 dias	2,13 ± 0,3 Aa	0,12 ± 0,05 Ba	1,20 ± 0,1 Aa	0,13 ± 0,06 Ba
60 dias	1,96 ± 0,02 Aa	0 ± 0,00 Cb	1,06 ± 0,19 Ab	0,02 ± 0,02 Ba
Total				
30 dias	3,65 ± 0,47 Aa	0,42 ± 0,03 Ba	3,02 ± 0,06 Aa	0,50 ± 0,02 Ba
60 dias	3,92 ± 0,36 Aa	0,16 ± 0,03 Ba	3,66 ± 0,30 Aa	0,20 ± 0,02 Ba

9.3 METABOLISMO ANAERÓBICO: ANÁLISE DA ENZIMA ADH

A ADH se mostrou uma enzima constitutiva nas raízes das plantas de *G. ulmifolia*, independente da origem, Cerrado ou Amazônia (Fig. 5). A atividade da enzima foi induzida com a submersão, mas essa indução só foi observada ($P \leq 0,05$) depois de 48h do início dos experimentos, sendo menor nas plantas do cerrado ($P \leq 0,05$), neste ponto da avaliação. Na avaliação seguinte, tempo de 7 dias, a atividade da ADH nas plantas da Amazônia não diferiu das plantas do Cerrado ($P \geq 0,05$). No entanto, ambas, Cerrado e Amazônia, se mantiveram elevadas até o final do período de avaliação de 30 dias (Fig. 5).

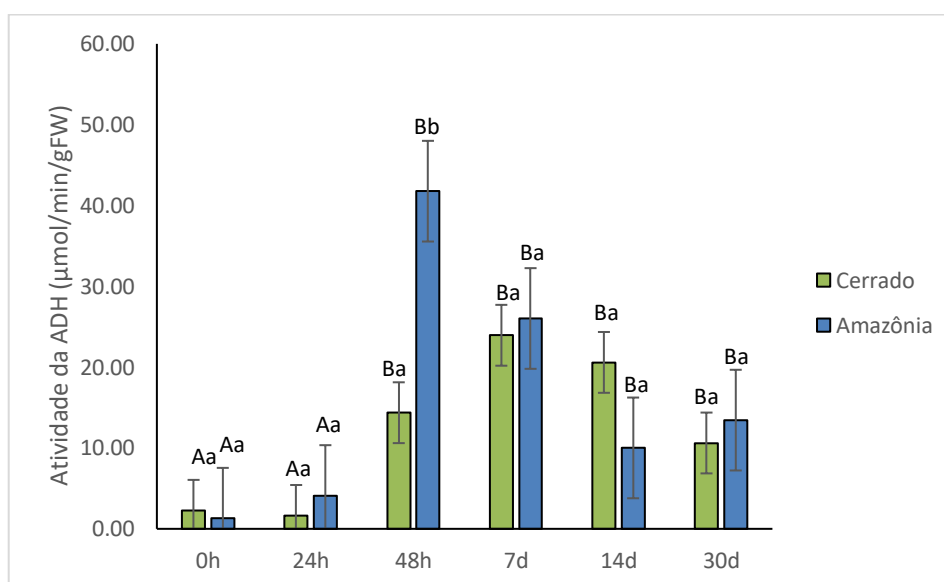


Figura 5. Atividade da enzima ADH nas plantas nos tempos 0 (início ou controle), 24 horas, 48 horas e 7 dias, 14 dias e 30 dias de submersão. Letras maiúsculas comparam as plantas de mesma origem, ao longo do tempo, quando submersas. Letras minúsculas comparam plantas de origens diferentes (Cerrado ou Amazônia), no mesmo intervalo de tempo. Letras diferentes representam diferença significativa ($P \leq 0.05$). I = erro padrão da média.

9.4 ATIVIDADE DE ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO: APX, CAT E SOD

Em função da queda de folhas nas plantas submersas, a análise das enzimas nesse órgão ocorreu até o tempo de 7 dias. Nas folhas, os valores de atividade da APX e CAT não diferiram entre as plantas do Cerrado ou da Amazônia ($P \geq 0.05$). Foi observado um aumento significativo ($P \leq 0.05$) na atividade da APX a partir de 48h apenas nas plantas do Cerrado, que se manteve elevada na análise realizada aos 7 dias. Nas plantas da Amazônia, houve uma redução na atividade da APX ($P \leq 0.05$) após 24h e 48h de submersão. Contudo, aos 7 dias, a atividade da enzima voltou a aumentar para valores que não foram estatisticamente diferentes ($P \geq 0.05$) dos obtidos antes da submersão, no tempo zero (Fig. 6).

A enzima CAT permaneceu com valores elevados nas plantas submersas, tanto do Cerrado quanto da Amazônia, durante todo o período avaliado, sem diferença ($P \geq 0.05$) em relação ao tempo zero (Fig. 6).

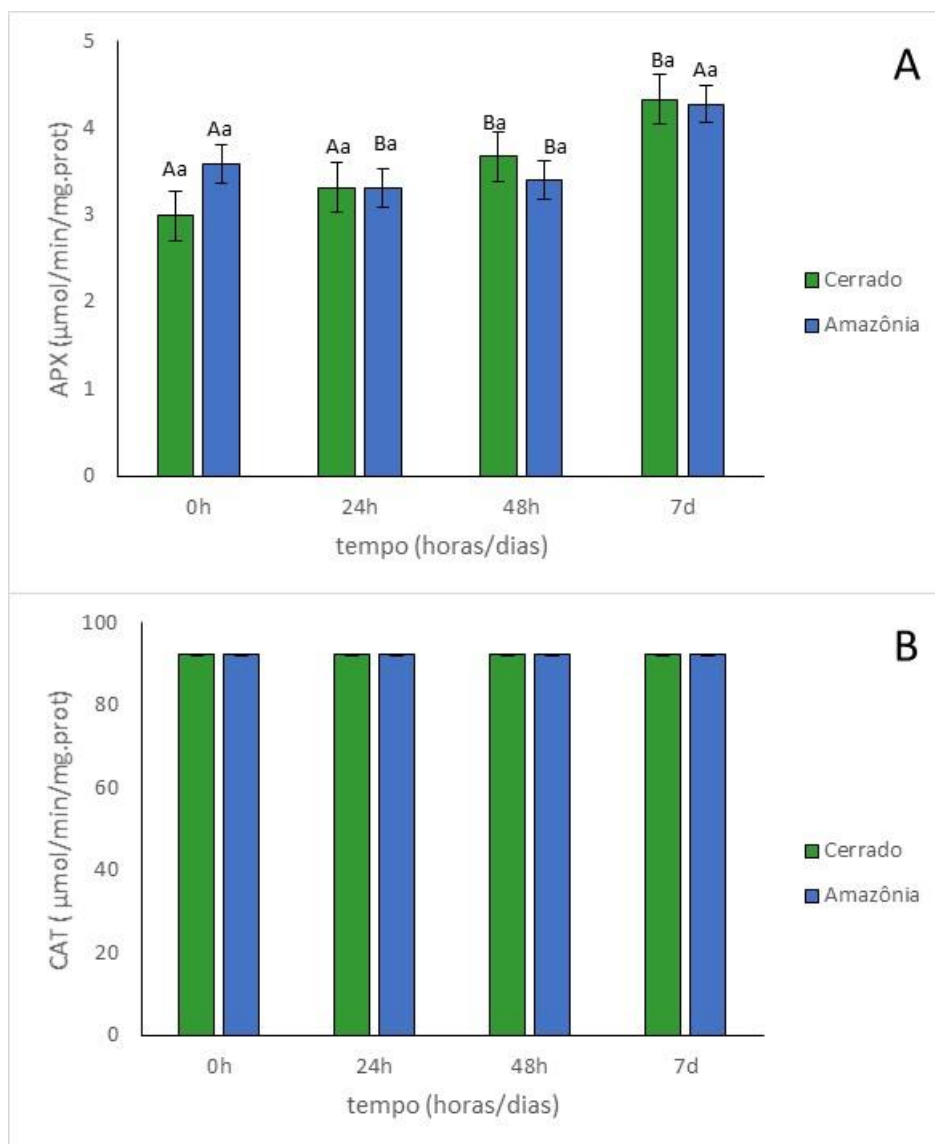


Figura 6. Efeito da inundação na atividade das enzimas antioxidantes APX (A) e CAT (B) nas folhas. Letras maiúsculas comparam as plantas de mesma origem, ao longo do tempo, quando submersas. Letras minúsculas comparam plantas de origens diferentes (Cerrado ou Amazônia), no mesmo intervalo de tempo. Letras diferentes representam diferença significativa ($P \leq 0.05$).

I = erro padrão da média.

A atividade da APX nas raízes se mostrou variável tanto ao longo do tempo quanto entre as plantas de diferentes procedências. Para as plantas do Cerrado, ao contrário do observado nas folhas, ocorreu uma redução ($P \leq 0.05$) na atividade da APX no tempo de 48h. A atividade da enzima voltou a subir ($P \leq 0.05$) nas análises obtidas aos 7 e 14 dias, mas não foi diferente ($P \geq 0.05$) do tempo zero na análise de 30 dias. Nas plantas procedentes da Amazônia, o aumento ($P \leq 0.05$) na atividade da APX foi observado apenas no tempo de 7 dias, sendo reduzida na avaliação que ocorreu aos 14 dias ($P \leq 0.05$). Contudo, assim como entre as plantas do Cerrado, a atividade da APX aos 30 dias não foi diferente ($P \geq 0.05$) da observada no tempo zero (Fig. 7).

A atividade da SOD nas raízes aumentou nas primeiras 48h após a submersão, mas esse aumento só foi significativo ($P \leq 0.05$) nas plantas do Cerrado, cujos valores foram mais elevados ($P \leq 0.05$) que nas plantas do Amazônia. Aos 7 dias os valores de atividade da SOD permaneciam elevados, mas sem diferença entre as plantas dos dois ecossistemas ($P \geq 0.05$). A partir da análise realizada aos 14 dias, foi observado um decréscimo ($P \leq 0.05$) na atividade da enzima e aos 30 dias não foi detectada atividade da SOD nas raízes das plantas do Cerrado ou da Amazônia (Fig. 7).

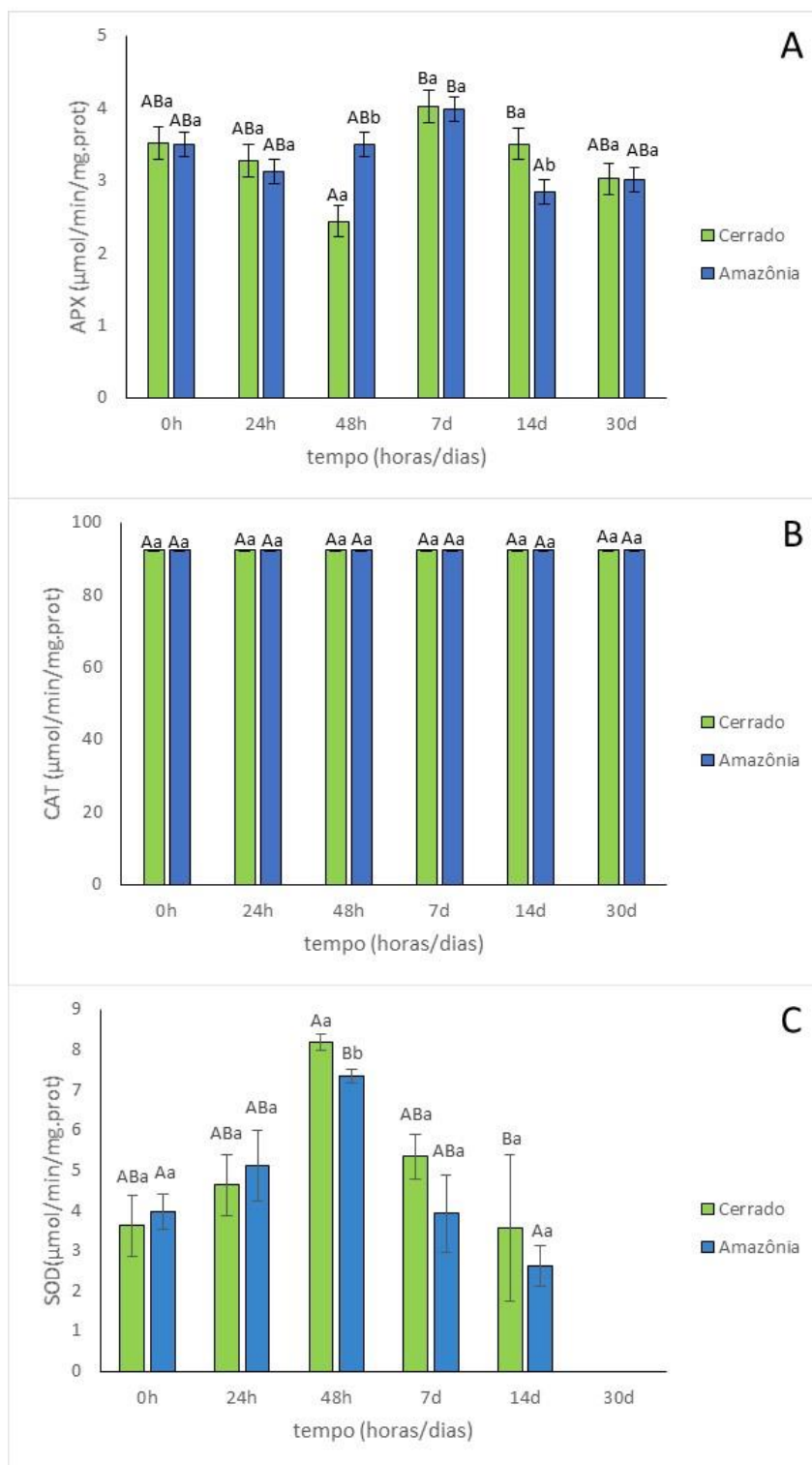


Figura 7. Efeito da inundação na atividade das enzimas antioxidantes APX (A), CAT (B) e SOD (C), nas raízes. As letras maiúsculas comparam as médias nos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Letras diferentes representam diferença significativa ($P \leq 0.05$). I = erro padrão da média.

10. DISCUSSÃO

Crescimento, biomassa, morfologia e sobrevivência das plantas à submersão

Guazuma ulmifolia é altamente tolerante ao alagamento, uma vez que mesmo as plantas provenientes dos representantes da espécie estabelecidos no Cerrado sobreviveram a longo período de submersão. De maneira geral, os dois ecotipos de *G. ulmifolia* tiveram uma limitação no crescimento e produção de folhas e, conseqüentemente, menor incorporação de biomassa. A perda de folhas compromete a capacidade fotossintética, o que pode levar a um menor crescimento da planta inteira (Batista *et al.*, 2008).

A inibição do crescimento, evidenciada nas plantas quando submersas, é uma característica observada para muitas espécies de ambientes alagáveis (Parolin, 2009; Pires *et al.*, 2018). A resposta de redução ou até a paralisação do ritmo de crescimento das plantas em condições de alagamento está diretamente ligada ao uso moderado das reservas, com o objetivo de manter, mesmo que de forma extremamente baixa, o metabolismo celular, bastante comprometido devido à baixa disponibilidade de oxigênio no meio (Colmer *et al.* 2013; Ferreira *et al.*, 2009). Estudos mostram que ao mesmo tempo que economiza energia, há seu direcionamento para outras áreas críticas de consumo, como para a manutenção das raízes que tem importante papel na garantia da sobrevivência da planta nestas condições (Ferreira *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2018). De fato, o sistema radicular das plantas de *G. ulmifolia*, do Cerrado e da Amazônia, mostraram pouco ou nenhum tecido necrosado, evidenciando a ausência de danos.

A maioria das plantas de *G. ulmifolia* perdeu todas as folhas, o que pode estar relacionado com acúmulo de etileno (hormônio precursor da abscisão foliar) na planta, visto que sua difusão fica comprometida em condições de alagamento (Voesenek *et al.*, 1993). Adicionalmente, a submersão da planta impede que funções como a captação de luz e troca de

gases pela folha ocorram. Neste caso, a perda desse órgão quando a planta é alagada também pode resultar em economia de energia, pois reduz os custos com sua manutenção. Essa estratégia foi observada em outros estudos com plantas alagadas da Amazônia e outras plantas arbóreas em condições de alagamento (Medri et al., 2012; Voeselek & Bailey-Serres, 2015; Pires et al., 2018).

As alterações na morfologia também foram semelhantes entre os dois ecotipos quando submersos, não sendo observada a produção de raízes adventícias ou lenticelas. Uma vez que essas estruturas são responsáveis pela troca de gases com o ambiente aerado (Jackson *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2015), elas não teriam função na planta totalmente submersa. Contudo, ao final do experimento foi observada a necrose dos tecidos de revestimento do caule nas plantas do Cerrado, evidenciando dano nesta região, o que não ocorreu nas plantas da Amazônia, que mantiveram os tecidos intactos durante todo o período experimental. A necrose dos tecidos das plantas em condições de alagamento costuma ocorrer devido ao acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo anaeróbico (Kozłowski 1997, Colmer et al. 2013). Neste caso, as observações sugerem a presença de mecanismos de desintoxicação e proteção dos tecidos que poderiam estar atuando de forma mais eficiente nas plantas dos ecotipos da Amazônia, em relação às do Cerrado. Contudo, são necessários estudos para identificar a existência e ação desses mecanismos.

Devido às restrições impostas para aquisição de carbono durante o alagamento, em geral, nas plantas de ecossistemas sazonais é observado o acúmulo de reserva durante a fase favorável da vida da planta (período não alagado) que a utiliza durante o período em que permanece alagada, em condições de hipóxia ou mesmo anoxia (Ferreira *et al.*, 2009; Parolin, 2012; Ribeiro *et al.*, 2018). Essa estratégia foi constatada nas plantas de *G. ulmifolia*, do Cerrado ou da Amazônia, quando submetidas à submersão. Ocorreu uma redução no acúmulo

de biomassa foi evidenciada em todos os órgãos (raiz, caule e folha), mostrando que houve consumo de reserva para manter o metabolismo durante o período de alagamento para os dois ecotipos . Os primeiros 30 dias de submersão consideravelmente afetaram negativamente o acúmulo de biomassa nas plantas, provavelmente quando ajustes no metabolismo, com produção de enzimas e ativação de vias metabólicas, demandaram maior energia da planta. Entre 30 e 60 dias as alterações nos valores de biomassa não foram significativas ($P > 0,05$), revelando o estado de quiescência das plantas alagadas, que se mantiveram vivas até o final do período experimental.

Metabolismo das plantas submersas: atividade das enzimas ADH (via anaeróbica) e das enzimas APX, CAT e SOD (antioxidantes)

As plantas submersas desviaram o metabolismo aeróbico para anaeróbico, com a produção de etanol confirmado com o aumento observado na atividade da enzima ADH, tanto para plantas provenientes dos ecotipos da Amazônia quanto para as do Cerrado. Esse aumento na atividade foi observado a partir de 48h de submersão da planta, semelhante ao verificado por Gonçalves *et al.* (2010) em raízes de plântulas de açaí (*Euterpe oleracea*), espécie amazônica de ambientes úmidos, quando submetidas à submersão parcial.

Contudo, ao contrário dos resultados obtidos pelos autores para as plântulas de açaí, que reduziram drasticamente a atividade da ADH à níveis semelhantes ao controle, em plantas de *G. ulmifolia*, os valores da atividade da ADH se mantiveram elevados até o final do experimento, mostrando a importância dessa via metabólica para a espécie em condições de alagamento

Sua intensificação contribui com a manutenção da síntese de ATP que garante a sobrevivência das plantas em condições de hipoxia ou mesmo períodos curtos de anoxia (De Sousa & Sodek, 2002; Yamauchi *et al.*, 2018)..

Em *G. ulmifolia* as enzimas avaliadas tiveram níveis de atividade elevados nas plantas (raízes e folhas) sob submersão. Os valores de SOD, APX e CAT foram cerca de 10 a 100 vezes maiores que observados para outras espécies em situações de estresse, como nas raízes de plântulas alagadas de *Garcinia brasiliensis* (Souza *et al.*, 2013) ou raízes de *Zea mays* sob estresse por déficit hídrico (Pereira *et al.*, 2013).

A capacidade de manter altos níveis de atividades de SOD, CAT e APX sob condições de estresse é essencial para o equilíbrio entre formação e remoção de EROs nas células (Fukao *et al.*, 2019; Messchmidt *et al.*, 2015). As raízes de *G. ulmifolia* conseguiram se aclimatar ao alagamento e a manutenção do sistema radicular permitiu sustentar as funções essenciais contribuindo para a sobrevivência da planta (Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

Dentre as enzimas envolvidas na remoção das EROs, a SOD é a primeira na linha de mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (Neval & Heanthy, 2007), podendo ser considerada uma enzima chave nesse processo. Elas participam da modulação do nível de EROs em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos. Uma vez que dismutam o $O_2^{\cdot -}$, agem indiretamente na redução do risco de formação do OH^{\cdot} a partir do $O_2^{\cdot -}$ (Messchmidt *et al.*, 2015; Shabala, 2013). A SOD funciona para eliminar ânions superóxido, transformando-os em H_2O_2 e O_2 , enquanto a APX e a CAT são as duas enzimas importantes dentre os componentes de desintoxicação do H_2O_2 (Ben Rejeb *et al.*, 2014; Messchmidt *et al.*, 2015). Porém, a APX tem mais afinidade pelo H_2O_2 e pode eliminá-lo mesmo quando em baixas concentrações, ao contrário da CAT que tem atividade efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H_2O_2 . As duas enzimas, APX e CAT, agem sinergicamente com SOD na remoção de

oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio. As plantas da Amazônia e do Cerrado tiveram seu pico de atividade de SOD nas raízes, no tempo de 48 horas e que permaneceu elevado até o sétimo dia de análise, com o valor da SOD nas plantas do Cerrado maior ($P < 0.05$) do que nas plantas da Amazônia. A resposta da SOD pode estar ligada também a APX, visto que SOD e APX podem agir de maneira coordenada para eliminação de radicais livres. O aumento da atividade de SOD e APX nos dois ecótipos, mostra uma melhor capacidade para evitar danos oxidativos causados pelo alagamento e, portanto, de tolerar o estresse. Contudo, mesmo SOD e APX tendo apresentado os valores mais elevados nos primeiros 7 dias de submersão, o que pode indicar período de ajuste de seu metabolismo, nas plantas da Amazônia o pico na atividade da APX observado no período de 48h de submersão foi semelhante ao observado para SOD, o que não ocorreu para as plantas do Cerrado. Essa diferença nos picos de atividade das enzimas em um ponto específico, sugere a presença de ajustes finos no metabolismo que precisam ser mais bem explorados em estudos futuros.

Em experimentos de tolerância ao alagamento parcial com a arbórea *Garcinia brasiliensis* (Souza *et al.* 2013), os autores observaram que a atividade da APX e da CAT se mantiveram praticamente constantes durante os primeiros 30 dias de alagamento. Resultados semelhantes ao encontrados no presente estudo com *G. ulmifolia*. No caso de *G. brasiliensis*, aumentos significativos na atividade da APX e CAT foram observados apenas depois de 55 dias das plantas alagadas. Em ambos os casos, as plantas se mantiveram vivas e com metabolismo ativo e a preservação da integridade fisiológica das plântulas durante o período de alagamento pode ser atribuída à presença constante das enzimas nos tecidos da raiz.

A análise conjunta das atividades das enzimas do sistema antioxidante CAT, SOD e APX nas plantas de ambos os ecossistemas, Cerrado ou Amazônia, mostrou que *G. ulmifolia* dispõe

dos mesmos mecanismos constitutivos de remoção de EROs e que as vias de produção são bem conservadas na espécie. Os dados apresentados mostram que *G. ulmifolia* tem ampla plasticidade na sua tolerância ao alagamento, com representantes nativos de ecossistemas sujeitos a condições ambientais distintas, as savanas do Planalto Central ou as florestas alagáveis da Amazônia, respondendo de forma semelhante ao extremo do estresse, que é a submersão por longo período.

A submersão é um dos cenários mais estressantes que as plantas que colonizam ambientes sujeitos ao alagamento podem enfrentar ao longo do seu ciclo de vida. Além de reduzir a concentração de oxigênio do solo, a planta fica impedida de usar estruturas morfológicas, que são adaptações ao alagamento, para obter o gás e suprir parte de sua demanda do metabolismo aeróbico (para mais detalhes, ver Striker 2012). Quando submetidas à submersão, além de sobreviver ao déficit de recursos, as plantas precisam dispor de mecanismos de desintoxicação dos muitos dos produtos danosos às células que são gerados pelo metabolismo anaeróbico. Adicionalmente, precisam se preparar para a etapa após a submergência, quando são novamente expostas a uma atmosfera oxigenada. Muitas plantas sofrem danos que podem levar à morte dos tecidos e até da planta inteira (Ferreira *et al.* 2009, Colmer *et al.* 2013). Poucas espécies, especialmente arbóreas, conseguem tolerar longos períodos de alagamento. A maioria está restrita a determinados ecossistemas, como as várzeas da Amazônia Central (Parolin 2009). Neste sentido, *G. ulmifolia* pode representar um modelo para o estudo sobre os limites de tolerância de plantas a estresse, bem como auxiliar no entendimento sobre como os mecanismos de respostas são ativados e quais podem ser conservados na espécie.

11. CONCLUSÃO

Guazuma ulmifolia é uma espécie com elevado grau de tolerância ao alagamento, as plantas provenientes dos dois ecossistemas, Cerrado e Amazônia, se comportaram de maneira semelhante em relação à morfologia e alguns aspectos bioquímicos, como o metabolismo anaeróbico, por meio da ativação da enzima ADH. O alagamento por um longo período afetou negativamente o crescimento e a biomassa de ambas, no entanto, todas as plantas sobreviveram até o final dos experimentos. Estudos que enfoquem a tolerância aos condicionantes impostos para plantas no Cerrado, como a seca sazonal, se fazem necessários para esclarecer o grau de plasticidade da espécie para eventos extremos a que podem estar sujeitas no ambiente, como o estresse por alagamento ou seca.

- REFERÊNCIAS
Alscher, Ruth Grene; Erturk, Neval & Heath, L. S. (2007). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 372, *Antioxidants and Reactive Oxygen in Plants Special Issue Pp. 1331 - 1341*, May2002, 26(4), 292–302.
- Barbosa, M. R., Silva, M. M. de A., Willadino, L., Ulisses, C., & Camara, T. R. (2014). Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciencia Rural*, 44(3), 453–460. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova*, 29(1), 113–123. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000100021>
- Batista, C. U. N., Medri, M. E., Bianchini, E., Medri, C., & Pimenta, J. A. (2008). Tolerância à inundação de *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae): Aspectos ecofisiológicos e morfoanatômicos. *Acta Botanica Brasilica*, 22(1), 91–98. <https://doi.org/10.1590/S0102->

33062008000100012

- Ben Rejeb, I., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458–475.
<https://doi.org/10.3390/plants3040458>
- Cakmak, I., & Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3), 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>
- Cakmak, I., Strbac, D., & Marschner, H. (1993). Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany*, 44(1), 127–132.
<https://doi.org/10.1093/jxb/44.1.127>
- Christine H., F., & Graham, N. (2000). Tansley Review No . 112 Oxygen processing in photosynthesis : regulation and signalling. *New Phytologist*, 146(112), 359–388.
- Colmer, T. D., Armstrong, W., Greenway, H., Ismail, A. M., Kirk, G. J. D., & Atwell, B. J. (2013). Physiological Mechanisms of Flooding Tolerance in Rice: Transient Complete Submergence and Prolonged Standing Water. In *Phytochemistry* (Vol. 17, Issue 4).
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)94266-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)94266-3)
- Cronquist, D., Schum, K., & Rica, C. (2007). *Guazuma ulmifolia* 141.
- De Sousa, C. A. F., & Sodek, L. (2002). The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(2), 83–94.
<https://doi.org/10.1590/s1677-04202002000200002>
- De Souza, T. C., Souza, E. dos S., Dousseau, S., de Castro, E. M., & Magalhães, P. C. (2013). Seedlings of *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae) subjected to root flooding: Physiological, morphoanatomical, and antioxidant responses to the stress. *Aquatic Botany*, 111, 43–49.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.08.006>
- 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*. 47(1), 128–140.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pci229>
- Drew, M. C., Cobb, B. G., Johnson, J. R., Andrews, D., Morgan, P. W., Jordan, W., & He, C.

- J. (1994). Metabolic Acclimation of Root Tips to Oxygen Deficiency. In *Annals of Botany* (Vol. 74, Issue 3, pp. 281–286). <https://doi.org/10.1006/anbo.1994.1119>
- Ferreira, C., Piedade, M. T. F., Parolin, P., & Barbosa, K. M. (2005). Tolerância de *Himatanthus sucuuba* Wood. (Apocynaceae) ao alagamento na Amazônia Central. *Acta Botanica Brasilica*, 19(3), 425–429. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000300002>
- 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(3), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.10.006>
- Ferreira, C. S., Teresa, M., Piedade, F., Wittmann, A. D. O., & Ce, A. (2010). *Open access – Review Plant reproduction in the Central Amazonian floodplains : challenges and adaptations. 2010*, 1–14. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plq009>
- Fisch, G., Marengo, J. A., & Nobre, C. A. (1998). The climate of Amazonia - a review. *Acta Amazônica*, 28(2), 101–126. <https://www.scielo.br/pdf/aa/v28n2/1809-4392-aa-28-2-0101.pdf>
- Fukao, T., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., & Peña-Castro, J. M. (2019). Submergence and waterlogging stress in plants: A review highlighting research opportunities and understudied aspects. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00340>
- Furquim, L. C., Santos, M. P. dos, Andrade, C. A. O. de, Oliveira, L. A. de, & Evangelista, A. W. P. (2018). Relação entre plantas nativas do Cerrado e água. *Científic@ - Multidisciplinary Journal*, 5(2), 146–156. <https://doi.org/10.29247/2358-260x.2018v5i2.p146-156>
- Gama, J. R. V., Souza, A. L. de, Martins, S. V., & Souza, D. R. de. (2005). Comparação entre florestas de várzea e de terra firme do Estado do Pará. *Revista Árvore*, 29(4), 607–616. <https://doi.org/10.1590/s0100-67622005000400013>
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Grandis, A., Godoi, S., & Buckeridge, S. (2010). *Respostas fisiológicas de plantas amazônicas de regiões alagadas às mudanças climáticas globais*. 1–12.

- Haridasan, M. (2008). *Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils*. 20(3), 183–195.
- Horta, L. P., Braga, M. R., Lemos-Filho, J. P., & Modolo, L. V. (2014). Organ-coordinated response of early post-germination mahogany seedlings to drought. *Tree Physiology*, 34(4), 355–366. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu017>
- Hosokawa, R. T., & Crespo, I. (2007). Estrutura E Dinâmica De Floresta De Várzea No. *Structure*, 339–352.
- IPCC. (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribuição do Grupo de Trabalho I para o Quinto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Alterações Climáticas. In *Ippc*.
- Ismond, K. P., Dolferus, R., De Pauw, M., Dennis, E. S., & Good, A. G. (2003). Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiology*, 132(3), 1292–1302. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022244>
- Jackson, M. B., & Colmer, T. D. (2005). Response and adaptation by plants to flooding stress. *Annals of Botany*, 96(4), 501–505. <https://doi.org/10.1093/aob/mci205>
- Jackson, Michael B., Ishizawa, K., & Ito, O. (2009). Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Annals of Botany*, 103(2), 137–142. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn242>
- 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp268>
- Junk, Wolfgang J. (1993). *Wetlands of tropical South America*. 679–739.
- Junk, Wolfgang J. (2013). *Current state of knowledge regarding South America wetlands and their future under global climate change*. 113–131. <https://doi.org/10.1007/s00027-012-0253-8>
- Junk, Wolfgang Johannes. (1979). Recursos hídricos da região amazônica: utilização e preservação. *Acta Amazonica*, 9(4 suppl 1), 37–51. <https://doi.org/10.1590/1809-43921979094s037>
- Kennedy, R. A., Rumpho, M. E., & Fox, T. C. (1992). Anaerobic metabolism in plants. *Plant*

- Physiology*, 100(1), 1–6. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.1>
- Kozlowski, T. T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology*, 17(7), 490–490. <https://doi.org/10.1093/treephys/17.7.490>
- Kürsteiner, O., Dupuis, I., & Kuhlemeier, C. (2003). The Pyruvate decarboxylase1 gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiology*, 132(2), 968–978. <https://doi.org/10.1104/pp.102.016907>
- Loreti, E., van Veen, H., & Perata, P. (2016). Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.005>
- Maracahipes, L., Lenza, E., Marimon, B. S., de Oliveira, E. A., Pinto, J. R. R., & Marimon, B. H. (2011). Estrutura e composição florística da vegetação lenhosa em cerrado rupestre na transição cerrado-floresta amazônica, mato grosso, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(1), 133–141. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000100013>
- Marcio, J., & Ayres, C. (1986). 4-q.32. June.
- Medri, C., Pimenta, J. A., Ruas, E. A., Souza, L. A. de, 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*, 33(1), 123–134. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2012v33n1p123>
- Messchmidt, A., Bianchi, V., Zanandrea, I., Martinazzo, E., Radmann, E., & Bacarin, M. (2015). Trocas gasosas e atividade antioxidante de portaenxertos de *Prunus* spp. submetidos ao estresse seca e alagamento. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 114(1), 71–81.
- MMA. (2015). Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros Por Satélite: Cerrado 2010-2011. *Relatório Técnico*, 1–16. [http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80120/PPCerrado/Relatorio Tecnico_Bioma Cerrado_2011vfinal.pdf](http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80120/PPCerrado/Relatorio_Tecnico_Bioma_Cerrado_2011vfinal.pdf)
- Mommer, L., & Visser, E. J. W. (2005). Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: A matter of leaf plasticity. *Annals of Botany*, 96(4), 581–589. <https://doi.org/10.1093/aob/mci212>
- Montero, J. C., Wittmann, F., Scho, J., & Worbes, M. (2006). *Tree species composition and*

- diversity gradients in white-water forests across the Amazon Basin*. 1334–1347.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01495.x>
- Parolin, P. (2012). Diversity of adaptations to flooding in trees of amazonian floodplains. *Pesquisas Botanica*, 63, 7–28.
- Parolin, Pia. (2009). *Submerged in darkness : adaptations to prolonged submergence by woody species of the Amazonian floodplains*. 359–376.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcn216>
- Pereira, B. A. da S., Venturoli, F., & Carvalho, F. A. (2011). Florestas Estacionais No Cerrado: Uma Visão Geral. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41(3), 446–455.
<https://doi.org/10.5216/pat.v41i3.12666>
- Pereira, R. B. et. al. (2013). Boletim de Pesquisa. *Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa*, 1–16. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/4779/1/Bp-023.pdf>
- Reatto, A. (2008). *Validity of the Centrifuge Method for Determining the Water Retention*. 72(6). <https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0355N>
- Ribeiro, H., Pires, A., Franco, A. C., Teresa, M., Piedade, F., Scudeller, V. V., Kruijt, B., & Ferreira, C. S. (2018). *Flood tolerance in two tree species that inhabit both the Amazonian floodplain and the dry Cerrado savanna of Brazil*. 1–15.
<https://doi.org/10.1093/aobpla/ply065>
- Roberta, Y., Nunes, F., Santos, M. R., Braga, R. F., Priscilla, A., & Gonzaga, D. (n.d.). *Heteropterys byrsonimifolia A . Juss (Malpighiaceae) sob diferentes tratamentos de escarificação tegumentar Seed germination of Guazuma ulmifolia Lam . (Malvaceae) and Heteropterys byrsonimifolia A . Juss (Malpighiaceae) under different treatments o*. 43–52.
- Shabala, S. (2013). Plant stress physiology. *Choice Reviews Online*, 50(05), 50-2652-50–2652. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.50-2652>
- Sioli, H. (1984). 5. *The Amazon and its main affluents : Hydrography , morphology of the river courses , and river types*.
- Teresa, M., Piedade, F., Maria, V., & Almeida, F. De. (n.d.). *Organismos aquáticos e de áreas úmidas em uma Amazônia em transição*. 9, 34–40.
- Voesenek, L. A. C. J., & Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptive traits and processes: An

overview. *New Phytologist*, 206(1), 57–73. <https://doi.org/10.1111/nph.13209>

- Voesenek, L. A. C. J., Banga, M., Thier, R. H., Mudde, C. M., Harren, F. J. M., Barendse, G. W. M., & Blom, C. W. P. M. (1993). *Submergence-Induced Ethylene Synthesis , Entrapment , and Growth in Two Plant Species with Contrasting Flooding Resistances*. 783–791.
- Yamauchi, T., Colmer, T. D., Pedersen, O., & Nakazono, M. (2018). Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. *Plant Physiology*, 176(2), 1118–1130. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01157>
- Yeung, E., van Veen, H., Vashisht, D., Paiva, A. L. S., Hummel, M., Rankenberg, T., Steffens, B., Steffen-Heins, A., Sauter, M., de Vries, M., Schuurink, R. C., Bazin, J., Bailey-Serres, J., Voesenek, L. A. C. J., & Sasidharan, R. (2018). A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(26), E6085–E6094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803841115>