

MEMÓRIA À SECA NO CERRADO: ACLIMATAÇÃO  
DIFERENCIAL DO BARU (*Dipteryx alata Vogel*).

Autor: Rauander Douglas Ferreira Barros Alves

Orientadora: Dra. Fernanda dos Santos Farnese

RIO VERDE - GO  
Fevereiro - 2018

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO

MEMÓRIA À SECA NO CERRADO: ACLIMATAÇÃO  
DIFERENCIAL DO BARU (*Dipteryx alata Vogel*).

Autor: Rauander Douglas Ferreira Barros Alves

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda dos Santos Farnese

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

Rio Verde, Goiás  
Fevereiro de 2018

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

AAL474  
m Alves, Rauander Douglas Ferreira Barros  
MEMÓRIA À SECA NO CERRADO: ACLIMATAÇÃO DIFERENCIAL  
DO BARU (*Dipteryx alata* Vogel). / Rauander Douglas  
Ferreira Barros Alves; orientadora Fernanda dos  
Santos Farnese; co-orientador Paulo Eduardo de  
Menezes Silva. -- Rio Verde, 2018.  
48 p.

Dissertação (Graduação em Mestrado em  
Biodiversidade e Conservação) -- Instituto Federal  
Goiano, Câmpus Rio Verde, 2018.

1. Estresse Hídrico. 2. Nativa. 3. Morfologia. 4.  
Trocas Gasosas. 5. Enzimas. I. Farnese, Fernanda dos  
Santos, orient. II. Silva, Paulo Eduardo de Menezes,  
co-orient. III. Título.


**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO**


**MEMÓRIA A SECA NO CERRADO: ACLIMATAÇÃO  
DIFERENCIAL DO BARU (*DIPTERYX ALATA VOGEL*)**

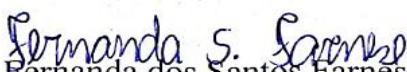
Autor: Rauander Douglas Ferreira Barros Alves  
Orientadora: Fernanda dos Santos Farnese

*TITULAÇÃO:* Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de  
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 01 de março de 2018.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Andrea Nascimento  
dos Reys Magalhães  
*Avaliadora externa*  
UniRV/Campus Rio Verde

  
Prof. Dr. Lucas Anjos de Souza  
*Avaliador interno*  
IF Goiano/Campus Rio Verde

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda dos Santos Farnese  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/Campus Rio Verde

**DEDICO ESTE TRABALHO:**

Dedico este trabalho a minha mãe, que do seu jeito me deu suporte emocional e fraterno nesta longa caminhada. Dedico a minha namorada, aos amigos e a todos aqueles que sonharam este sonho junto comigo. Dedico aos mestres que me ensinaram, incentivaram e acreditaram que eu era capaz de alcançar os objetivos traçados.

## **AGRADECIMENTOS**

As páginas que disponho e o vocabulário que conheço são insuficientes para nomear e traduzir o sentimento de gratidão que tenho a todos que ajudaram nesta caminhada, tenho realmente uma gratidão genuína, agradeço do fundo do coração o atendimento e ajuda incondicional recebida, espero na minha atividade profissional poder dar àqueles que precisarem o mesmo amor que recebi durante meus estudos.

Agradeço a Deus, por ter me dado a vida e ter me permitido conhecer as pessoas que conheci e chegar aonde estou.

Agradeço minha família, minha mãe, irmãos e minha namorada Bárbara Lima, por terem sido meu alicerce me ajudado, incentivado e aturado durante todos os momentos.

Faço um agradecimento especial a minha Orientadora Fernanda dos Santos Farnese, e aos meus coorientadores Paulo Eduardo Menezes, Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho e Alan Carlos Costa, que sem me conhecer acolheram, ensinaram e deram todo o suporte necessário a confecção do trabalho aqui apresentado.

Agradeço aos professores Adriano Perin, Hipólito Tadeu, Bruno Saleh e ao amigo Renystton Ribeiro, por terem me incentivado a entrar no mestrado e por apostarem que eu seria capaz de concluir esta jornada.

Agradeço o companheirismo de todos do laboratório de fisiologia do estresse vegetal (Vicejar), e em especial ao amigo Lucas Loram e as colegas de iniciação científica Maria Lucia, Leticia e Sabrina, por terem contribuído enormemente para consecução deste objetivo, tendo comigo dividido o trabalho braçal, intelectual e a responsabilidade de condução do experimento.

Por fim, e na certeza de não ter conseguido mencionar a todos aos quais sou grato, agradeço do DPPG – Biodiversidade e Conservação, pela oportunidade profissional e pela estrutura oferecida.

**MUITO OBRIGADO!**

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Rauander Douglas Ferreira Barros Alves, natural de Rio Verde – GO, filho de Marluce Ferreira Barros e Sebastião Alves Pereira. Coursou ensino fundamental e médio em escolas públicas. Sua formação profissional está assentada sobre a verticalização do ensino oferecida pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, tendo sido iniciada no ano de 2007 com o curso técnico em administração. No ano de 2009, iniciou os estudos nos cursos Tecnólogo em Saneamento Ambiental e Bacharel em Gestão Ambiental, tendo concluído o curso tecnológico no primeiro semestre de 2013 e o bacharelado no segundo semestre de 2014.

Possui atuação profissional como auxiliar administrativo na prefeitura de Rio Verde de 2010 até o momento presente, e atuação como professor da UniRV – Universidade de Rio Verde de 2015, também até o presente momento.

Em 2016, iniciou seu *Stricto sensu* - Mestrado em Biodiversidade e Conservação, também no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, concluindo-o em março de 2018.

## ÍNDICE

	Página
INDICE DE FIGURAS E TABELAS .....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS .....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Gerais .....	16
2.2. Específicos .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Análises morfológicas e índice de tolerância à seca .....	17
3.2. Anatomia foliar.....	18
3.3. Trocas Gasosas e pigmentos fotossintéticos .....	19
3.4. Relações Hídricas.....	20
3.4.1. Potencial hídrico .....	20
3.4.2. Transpiração.....	20
3.4.3. Teor de água nas folhas .....	20
3.4.4. Condutividade hidráulica foliar.....	21
3.5. Análises Bioquímicas .....	21
3.5.1. Danos celulares .....	21
3.5.2. Enzimas do metabolismo antioxidante.....	22
3.5.3. Metabólitos.....	23
3.6. Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS .....	24
4.1. Relações hídricas.....	24
4.2. Análises morfológicas e índice de tolerância a seca .....	25
4.3. Anatomia foliar.....	26
4.4. Trocas Gasosas e pigmentos fotossintéticos .....	28
4.5. Danos celulares .....	30
4.6. Enzimas do metabolismo antioxidante.....	31
4.7. Metabólitos .....	32
5. DISCUSSÃO .....	33
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40



## INDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Teor de Agua (TA) (A), Potencial Hídrico antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) (B), Transpiração diurna (Ed) (C). .....	25
Figura 2 - Área foliar específica (AFE) (A), Índice de tolerância a seca (ITS) (B), Matéria seca parte aérea (MSPA) (C), Matéria seca raízes (MSR) (D). .....	26
Figura 3 - Densidade estomática (DE) (A), Índice estomático (IE) (B), Condutância estomática máxima ( $g_{wmax}$ ) (C), Densidade de venação (D), Condutividade Hidráulica Foliar (Kleaf) (E). .....	27
Figura 4 – Folha clarificada utilizada na aferição da densidade de venação (A), Folha vetorizada no ImageJ para cálculo do comprimento das nervuras e área foliar (B); Imagem microscópica utilizada nos parâmetros de anatomia foliar (C).....	28
Figura 5 - Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), Concentração interna de CO <sub>2</sub> (Ci) (B), Taxa transpiratória (E) (C), Condutância estomática (gs) (D), Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ( $V_{cmax}$ ) (E), Eficiência do uso da água (A/E) (F), Respiração Noturna (Rn) (G), Respiração mitocondrial diurna (Rd) (H). . .....	29
Figura 6 -. Clorofila A (A), Clorofila B (B), Rendimento quântico potencial do fotossistema II (FV/FM) (C). .....	30
Figura 7 - Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (A), Extravasamento de eletrólitos (EL) (B), Aldeído Malônico (MDA) (C). .....	31
Figura 8 - Peroxidase (POX) (A), Glutaciona redutase (GR) (B), Superóxido Dismutase (SOD) (C) Catalase (CAT) (D), Ascorbato peroxidase (APX) (E). .....	32
Figura 9 -. Açúcares solúveis totais (A), Prolina (B). .....	33

## LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Taxa fotossintética líquida  
 A/E – Eficiência do uso da água  
 AFE – Área foliar específica  
 ANOVA – Análise de Variância  
 APX – Ascorbato peroxidase  
 AsA – Ácido Ascórbico  
 $A_{\text{sat}}$  - taxa fotossintética à irradiação saturante e concentração atmosférica de CO<sub>2</sub>  
 CAT - Catalase  
 $C_i$  – Concentração interna de CO<sub>2</sub>  
 Cm - Centímetro  
 CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono  
 DE – Densidade estomática  
 DEX – Departamento de ciências exatas  
 DIC – Delineamento inteiramente ao acaso  
 dm<sup>2</sup> – Decímetro quadrado  
 DNA – Ácido desoxirribonucleico  
 DTT – Ditioneitol  
 E – Taxa transpiratória foliar  
 EC – Sistema de nomenclatura de enzimas  
 Ed – Transpiração diária  
 EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético  
 EL – Extravasamento de eletrólitos  
 FAA - Formaldeído  
 $F_v/F_m$  – Rendimento quântico potencial do fotossistema II  
 GR – Glutathione redutase  
 $g_s$  – Condutância estomática  
 GSH - Glutathione  
 GSSG – Glutathione dissulfeto/oxidada  
 $g_{w\text{max}}$  – Condutância estomática máxima  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio  
 IE – Índice estomático  
 INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais  
 ITS – Índice de Tolerância a Seca  
 Kg - Quilograma  
 M - Metro  
 m<sup>2</sup> – Metro quadrado  
 m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup> – Metro quadrado por quilograma  
 MDA - Malondialdeído  
 MF – Massa fresca  
 mL - Mililitro  
 mm - Milímetro  
 mM - milímol  
 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> – Milímol por centímetro  
 mm<sup>2</sup> – Milímetro quadrado  
 MSPA – Matéria seca parte aérea  
 MSR – Matéria seca raízes  
 NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido  
 NBT - Azul de p-nitro tetrazólio

nm - Nanômetro  
nmol - Nanomol  
O<sub>2</sub> – Oxigênio  
p/v – peso por volume  
Pa - Pressão atmosférica  
PBS – Tampão fosfato salino  
PCA – Análise de componentes principais  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfônico  
POX – Peroxidase  
PVPP - Polivinilpirrolidona  
RD – Respiração diária  
RN – Respiração noturna  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
rpm – Rotações por minuto  
SISVAR - Sistema de Análises Estatísticas e Planejamento de Experimentos  
SNK – Student Newman Keuls  
SOD – Superóxido dismutase  
TA – Teor de água  
TBA - ácido 2-tiobarbitúrico  
TCA – Ácido tricloroacético  
UFLA – Universidade Federal de Lavras  
V<sub>cmax</sub> – Velocidade de carboxilação máxima da Rubisco  
 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  – Micromol por metro quadrado por segundo  
 $\mu\text{L}$  - Microlitro  
 $\mu\text{L L}^{-1}$ - Microlitro por litro  
 $\mu\text{M}$  – Micromol  
 $\Psi_{\text{am}}$  – Potencial Hídrico antemanhã

## RESUMO

ALVES, RAUANDER DOUGLAS FERREIRA BARROS; Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2018. **Memória a seca no cerrado: aclimação diferencial do baru (*Dipteryx alata Vogel*)**. Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Fernanda dos Santos Farnese; Coorientadores: Dr. Alan Carlos Costa, Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva e Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho.

O processo de industrialização e as alterações antrópicas sobre a natureza, tem produzido importantes alterações no clima global, e espera-se que nos próximos anos aumentem as ocorrências de eventos climáticos extremos, como ondas de calor, frio, chuvas e secas. Os estudos normalmente realizados testam a seca como um evento isolado, e as plantas do cerrado, em função do clima local são recorrentemente expostas a eventos de restrição hídrica e tendem a estar naturalmente aclimatadas a ciclos de seca. Não se sabe, portanto, como a concretização das previsões para o clima pode alterar a sobrevivência ou o desenvolvimento dessas espécies. Algumas espécies vegetais possuem um mecanismo de aclimação diferencial, também conhecido como “memória à seca”, caracterizado pela produção de respostas diferenciais positivas frente a eventos de restrição hídrica; por outro lado, também existem espécies que apresentam sensibilidade e decréscimo na sua capacidade de produção de respostas quando submetidas de ciclos repetidos de estresse, e influi diretamente em sua capacidade de sobrevivência. Neste contexto, o presente trabalho submeteu plântulas de Baru (*Dipteryx alata Vogel*) a ciclos repetidos de seca, buscando avaliar através de parâmetros morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos as respostas produzidas e assim caracterizar a existência de sensibilidade ou a produção de respostas diferenciais frente aos eventos de seca. Praticamente não foram observadas alterações nos parâmetros morfoanatômicos em nenhum dos tratamentos, sendo que as maiores modificações foram observadas nos parâmetros bioquímicos e fisiológicos. De fato, foi possível observar que quando as plantas foram submetidas a apenas um ciclo de seca, ocorreu queda nas trocas gasosas, aumento na respiração, aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e danos às membranas celulares, alterações que, em conjunto, culminaram com menor índice de tolerância à seca nesse tratamento. As plantas expostas a três ciclos de seca, por sua vez, apresentaram maior índice de tolerância à seca do que as plantas submetidas a seca apenas uma vez, sendo capazes de manter a homeostase celular, como evidenciado pela manutenção da taxa fotossintética, da respiração e da geração de espécies reativas de oxigênio em níveis similares ao controle. A manutenção dos parâmetros fisiológicos aparentemente envolveu ajustes em diversos níveis, como o aumento da atividade do sistema antioxidante e a manutenção da condutividade hidráulica foliar. Dessa forma, os resultados mostraram que as plantas de Baru não são sensíveis a ciclos repetidos de seca. Ao contrário, essas plantas apresentaram um conjunto de respostas diferenciais que permitiram às plantas expostas a três ciclos de seca terem desempenho semelhante ao tratamento controle, indicando a existência de um mecanismo de memória à seca em uma espécie nativa do cerrado.

**Palavras-chave:** Estresse Hídrico, Nativa, Cerrado, morfologia, trocas gasosas, enzimas, danos celulares.

## ABSTRACT

ALVES, RAUANDER DOUGLAS FERREIRA BARROS; Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2018. **Memória a seca no cerrado: aclimação diferencial do baru (*Dipteryx alata Vogel*)**. Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Fernanda dos Santos Farnese; Coorientadores: Dr. Alan Carlos Costa, Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva e Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

The industrialization and the anthropogenic actions in natural environments have produced important changes in the global climate, and it is expected that in the coming years extreme weather events such as heat waves, cold, rain and drought will increase. The studies usually test the drought as an isolated event, but the Cerrado plants are frequently exposed to cyclical events of water restriction and tend to be naturally acclimatized to drought cycles. It is not known, therefore, how the climate changes will alter the survival or development of these species. Some plant species have a differential acclimatization mechanism, also known as "drought memory", characterized by the production of positive differential responses to water restriction events; on the other hand, there are also species that show sensitivity and decrease in their ability to produce responses when subjected to repeated cycles of stress, which directly affects their survival capacity. In this context, the present work exposed Baru seedlings (*Dipteryx alata Vogel*) to repeated cycles of drought, aiming to evaluate the morphological, anatomical, physiological and biochemical responses and thus characterize the existence of sensitivity or differential responses to drought events. There were practically no changes in morphoanatomical parameters in any of the treatments, and the greatest changes were observed in the biochemical and physiological parameters. Indeed it was possible to observe that when the plants were submitted to only one cycle of drought, there was a drop in gas exchange, an increase in respiration, an increase in the generation of reactive oxygen species and damage to cell membranes, changes that, together, culminated with a lower drought tolerance index. The plants exposed to three cycles of drought, on the other hand, presented a higher drought tolerance index than plants submitted to drought only once time, being able to maintain cellular homeostasis, as evidenced by the maintenance of the photosynthetic rate, respiration and of the generation of reactive oxygen species at levels similar to the control. The maintenance of the physiological parameters apparently involved adjustments at several levels, such as increases in antioxidant system activity and the maintenance of leaf hydraulic conductivity. Thus, the results showed that Baru plants are not sensitive to repeated cycles of drought. On the contrary, these plants presented a set of differential responses that allowed the plants exposed to three drought cycles to perform similarly to the control treatment, indicating the existence of a mechanism of memory to drought in a native brazilian savanna (cerrado) species.

**Key words:** Drought Stress, Native, brazilian savanna, morphology, gas exchange, enzymes, cellular damage.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a revolução industrial, há aproximadamente 200 anos, a concentração atmosférica de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) aumentou de 280 para 408 µL L<sup>-1</sup> (NASA, 2018) refletindo em incrementos na temperatura global e alterações no regime hídrico (STOCKER et al., 2013). Com efeito, nos últimos 150 anos, a temperatura do planeta aumentou 0,75°C e pesquisas sugerem que, até o fim deste século, a temperatura ainda suba mais 2 ou 3°C (NOBRE et al., 2012). O aumento da temperatura global altera o regime de chuvas e aumenta a ocorrência de eventos climáticos extremos, como secas severas, inundações e ondas de calor e frio (LACERDA e NOBRE, 2010). Dentre as várias alterações previstas em decorrência das mudanças climáticas, a escassez hídrica será o principal fator ambiental a limitar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, uma vez que os danos desencadeados pelo déficit hídrico podem ser superiores aos oriundos de todos os outros fatores bióticos e abióticos em conjunto (FLEXAS et al., 2009).

A concretização das previsões de alterações no regime hídrico para os próximos anos, irá comprometer a conservação e a manutenção da biodiversidade. De fato, somando-se o aquecimento global às mudanças no uso do solo, é quase certa a ocorrência de rearranjos importantes nos ecossistemas e até mesmo a alteração na distribuição dos biomas brasileiros em um futuro próximo (CORDEIRO et al., 2008). Segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2007), diferentes regiões do Brasil sofrerão os efeitos das alterações climáticas de formas distintas. Em relação ao cerrado, por exemplo, estima-se que a precipitação sofra reduções entre 10 a 20% até 2040 e entre 20 a 35% até 2070, gerando uma escassez hídrica sem precedentes, que pode resultar no desaparecimento de até 25% das árvores nativas deste ecossistema (OLIVEIRA e RUTKOWSKI, 2008; SOUZA e MANZI, 2014).

Considerado um hotspot de biodiversidade mundial (MYERS et al., 2000), o cerrado conta com uma das maiores diversidades florísticas do planeta, estimando-se cerca de 11.627 plantas vasculares, com elevado grau de endemismo (RESENDE e GUIMARÃES, 2007); formado por um mosaico de formações vegetais que ocupam a cerca de 21% do território nacional, ele é considerado a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002; WALTER, 2006).

Considerando a teoria dos redutos florestais proposta por Jurgen Haffer (1969), que previu a existência de especiação em redutos florestais formados em função de eventos de expansão e retração florestal advindos de períodos frios e quentes ocorridos durante o quaternário, e também o trabalho do geólogo brasileiro Aziz Ab'saber (2000), que com base nesta teoria e através de estudos dos condicionantes do mosaico fitogeográfico brasileiro, estipulou que a região em que hoje se encontra o cerrado pode ter sido um reduto florestal caracterizado como uma zona de transição, e as espécies sempre estiveram em constante adaptação aos eventos climáticos; pode-se depreender que as plantas endêmicas deste ambiente já estão há milhares de anos sendo expostas a condições ambientais oscilantes (SILVA, 2011), podendo assim apresentar características peculiares de tolerância as flutuações climáticas.

Além das características históricas tem-se também que o clima atual do cerrado brasileiro é predominantemente tropical, sendo classificado por Köppen-Geiger como Aw, tropical chuvoso (MACENA et al., 2008), com duas estações bem definidas e divididas em uma estação seca, com três a sete meses de duração, e outra de chuvas constantes, com pluviosidade média anual na faixa de 800 - 1.800 mm (PEREIRA et al., 2011).

Assim, por todo o exposto, as plantas que ocorrem neste bioma tendem a estar naturalmente aclimatadas à ocorrência de eventos periódicos de restrição hídrica (PALHARES et al., 2010), sendo bons exemplares para o estudo da aclimação diferencial à seca. É importante ressaltar, no entanto, que o aumento da intensidade e da frequência dos eventos de seca pode comprometer até mesmo o crescimento, desenvolvimento e a sobrevivência de espécies aclimatadas a ciclos de déficit hídrico, o que implicaria em redução da produtividade primária do cerrado (AMEDIE, 2013).

Os danos desencadeados pelos eventos de restrição hídrica são diversos, e frequentemente resultam na redução da disponibilidade de CO<sub>2</sub> para o processo fotossintético vegetal, podendo este decréscimo estar vinculado ao fechamento estomático ou a diminuição da condutância hidráulica (CAI et al., 2015). Além disso, o estresse hídrico geralmente está associado a alta intensidade luminosa e elevada temperatura, o que, juntamente com o comprometimento do processo fotossintético, gera espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs apresentam alta reatividade bioquímica e podem interagir com diversas macromoléculas celulares, causando danos a membrana lipídica, proteínas, enzimas e provocando a inativação do fotossistema II (CHOUDHARY et al., 2012). Como consequência, há aumento na demanda respiratória para suprir a

necessidade de reparação da maquinaria fotossintética e produção de esqueletos de carbono (NISHIYAMA et al., 2001).

É importante salientar que, apesar dos efeitos deletérios da seca sobre o metabolismo vegetal, diversas espécies apresentam mecanismos capazes de atenuar os danos decorrentes do estresse hídrico. Dentre esses mecanismos pode-se citar alterações morfológicas e anatômicas, como a redução da área foliar, aprofundamento de raízes, redução do número e tamanho dos estômatos e aumento da densidade de venação (SANTOS e CARLESSO, 1998; XU et al., 2010), alterações que vão influenciar diretamente a capacidade de absorção, transporte e regulação do uso da água, alterando portanto o potencial hídrico e a capacidade transpiratória da planta (MARTINS et al., 2014; MITCHELL et al., 2013). De forma integrada, a perfeita ação destes mecanismos de defesa irá culminar com a manutenção da capacidade de crescimento vegetal, que pode ser definida como o índice de tolerância à seca (ITS) (PASSIOURA, 2002).

Além dos mecanismos citados acima, as alterações bioquímicas e fisiológicas também merecem destaque (SILVA, 2015), sendo que plantas expostas à restrição hídrica usualmente apresentam controle rigoroso do fechamento estomático e da expressão de enzimas do metabolismo antioxidante, como é o caso das enzimas Dismutase do Superóxido (SOD), Peroxidase (POX), Peroxidase do ascorbato (APX), Catalase (CAT) e Redutase da Glutathione (GR); e dos solutos osmocompatíveis, como prolina e glicina betaína, componentes do mecanismo antioxidante e responsáveis pela manutenção do estado redox celular (LIU et al., 2011). A eficiência da resposta frente ao evento estressante pode ser medida através dos parâmetros acima, assim como pela ausência de moléculas que indicam a presença de danos celulares causados pelas EROs, como o aldeído malônico (MDA), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o extravasamento de eletrólitos (FAROOQ et al., 2009; OSAKABE et al., 2014).

O tempo de exposição, a intensidade do estresse e a ocorrência de mais de um evento estressante são fatores que podem interferir na resposta das plantas à seca (XU et al., 2010). No entanto, embora o déficit hídrico seja um evento recorrente na vida das plantas, a grande maioria dos trabalhos abordam a seca como um evento isolado (FRANÇA et al., 2017; LI et al., 2017; MARTINS et al., 2017; SOBREIRO, 2017; VIÇOSI et al., 2017). Isso é particularmente preocupante quando se deseja estudar espécies nativas de ambientes como o cerrado, no qual a mesma planta atravessa vários ciclos de restrição hídrica durante seu crescimento e desenvolvimento (BACKHAUS et al., 2014). Vários trabalhos recentes têm mostrado que a pré-exposição ao agente



estressor pode alterar as respostas subsequentes da planta, resultando, muitas vezes, em aumento da tolerância vegetal (CRISP et al., 2016), e, em outros casos, em maior sensibilidade aos eventos estressantes subsequentes (ARRUDA e GRANDE, 2003; SCHEFFER et al., 2001). Com efeito, os estudos existentes com plantas submetidas a repetidos eventos estressantes demonstram a existência de um mecanismo de aclimação diferencial das plantas, também chamado de “memória ao estresse” (CONRATH et al., 2006). Evidências dessa teoria podem ser observadas em estudos com gramíneas (WALTER et al., 2011) e com culturas anuais (MENEZES-SILVA et al., 2017), nos quais plantas submetidas a repetidos eventos de déficit hídrico apresentaram respostas de proteção marcantes frente aos recorrentes eventos estressantes.

A memória ao estresse pode ser definida como sendo o conjunto de modificações estruturais, genéticas e bioquímicas que ocorrem como consequência da exposição recorrente a agentes estressantes (FLETA-SORIANO e MUNNÉ-BOSCH, 2016). Essa memória pode ser considerada de curto prazo (menor que uma semana), a qual dificilmente é repassada às gerações futuras (RAMÍREZ et al., 2015), ou de longo prazo, sua marca deve exceder o evento que lhe deu causa (AVRAMOVA, 2015) ativar uma resposta mais rápida e ou mais forte, frente ao novo evento estressante (WALTER et al., 2013). A memória de curto prazo está ligada ao período no qual a resposta diferencial se dá em função do acúmulo de substâncias responsivas ao estresse anterior, e não em função da repetição do evento estressante (VIRLOUVET e FROMM, 2015). A memória de longo prazo, por sua vez, é resultado da exposição sequencial ao estresse, produzindo modificações na cromatina, no posicionamento dos nucleosomas e na metilação do DNA, sendo estas alterações frequentemente repassadas à progênie (RAMÍREZ et al., 2015).

Além das modificações citadas acima, alguns pesquisadores propõem que a memória ao estresse esteja vinculada à persistência de moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição nas células vegetais após a retirada do agente estressor (KINOSHITA e SEKI, 2014; LÄMKE e BÄURLE, 2017). Já foi observado, por exemplo, que a exposição de *Arabidopsis* a ciclos repetidos de estresse osmótico altera os padrões de sinalização mediados pelo cálcio, sendo essas alterações acompanhadas por mudanças no padrão de expressão gênica que culminam com a aquisição da tolerância ao estresse (KNIGHT et al., 1998).

A existência de um processo adaptativo planta-meio ambiente através de eventos de memória de longo prazo é de grande importância ecológica e pode refletir maior capacidade de resposta das plantas frente às alterações climáticas (OGLE e BARBER,

2016; WEINHOLD, 2018). Por outro lado, a inexistência dessa capacidade adaptativa, ou mesmo a perda da resiliência após eventos estressantes recorrentes, pode indicar a possibilidade de graves problemas ambientais num cenário de mudanças climáticas (SCHEFFER et al., 2001). Assim, é importante que os trabalhos que visam caracterizar a memória das plantas frente ao déficit hídrico, com vistas ao benefício ecológico, trabalhem com ciclos repetidos de seca e que o tempo de recuperação destes ciclos sejam maiores que a memória de curto prazo.

Embora já tenha sido caracterizada a existência da aclimatação diferencial em algumas espécies quando submetidas a ciclos de déficit hídrico, os poucos estudos existentes foram realizados apenas com cultivares comerciais (MENEZES-SILVA et al., 2017; RAMÍREZ et al., 2015; WALTER et al., 2011), sendo importante a caracterização desse processo em plantas nativas do cerrado, principalmente no cenário atual de mudanças climáticas. Neste estudo, foram utilizadas plântulas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), planta perene nativa do cerrado, pertencente à Família Fabaceae, que sofre risco de desaparecimento pelo seu elevado potencial econômico; a espécie possui diversos usos e é promissora para cultivo, podendo ser utilizada como planta medicinal, aromática e madeireira com potencial para silvicultura (ARAKAKI, 2010) e ainda na recuperação de áreas degradadas (ALVES et al., 2010; MOSQUETTA et al., 2011).

Nesse trabalho, as plântulas de Baru foram submetidas a repetidos ciclos de déficit hídrico, a fim de se avaliar a ocorrência de “memória à seca”, sugerindo ou não a existência deste processo em plantas nativas do cerrado, e possibilitando a elaboração de alternativas de ação para enfrentamento das adversidades advindas das mudanças climáticas. Por fim, este estudo se mostrou relevante pela abrangência e importância do tema abordado, contribuindo para o avanço do conhecimento científico no que concerne à resposta de uma planta nativa do cerrado a eventos de seca e fornecendo subsídios para políticas públicas e alternativas que possibilitem o enfrentamento das alterações do clima; os dados obtidos a partir do projeto forneceram, ainda, subsídios para o desenvolvimento de estudos que contribuam para compreender a dinâmica do ambiente e sua interferência na conservação de ecossistemas naturais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Gerais

Caracterizar o impacto dos ciclos de déficit hídrico sobre os processos centrais do metabolismo vegetal, bem como a existência de um mecanismo de memória em uma espécie nativa do cerrado; e delinear os instrumentos de defesa vegetal expressados no evento de memória.

### 2.2. Específicos

Verificar o efeito da seca sobre variáveis morfológicas, anatômicas, fisiológicas e bioquímicas em uma planta do cerrado.

Caracterizar a existência de uma memória a seca do *Dipteryx alata* Vog. quando submetido a diferentes ciclos de seca.

Avaliar quais mecanismos estão envolvidos nas respostas de *D. alata* Vog. frente ao estresse hídrico.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de sombreamento do Laboratório de Ecofisiologia e Produção Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, com localização geográfica 17°48'18.33" de latitude sul e 50°54'0.04" de longitude oeste e 748 m de altitude, com duração de 180 dias. Foram utilizadas mudas de Baru com aproximadamente 120 dias de cultivo, adquiridas em um viveiro florestal da cidade de Iporá-GO; e transplantadas para citrovasos com 4 litros de capacidade, contendo solo de área não cultivada e areia na proporção de 2:1. Os vasos foram dispostos em bancada com espaçamento de 5 cm entre os vasos, e irrigados diariamente por 45 dias para adaptação e pleno estabelecimento. Após este período de adaptação, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle (plantas irrigadas continuamente, de forma que a umidade do solo permanecesse próxima à capacidade de campo); 1 ciclo de seca (plantas submetidas a um ciclo de seca) sendo mantidas irrigadas enquanto as plantas de 3 ciclos passavam por seu tratamento; 3 ciclos de seca (plantas submetidas a três ciclos de seca). Cada ciclo de déficit hídrico consistiu de duas fases, uma de desidratação e outra de reidratação. A desidratação foi realizada mediante suspensão da irrigação, até que a umidade do solo atingisse 25% da água disponível, em relação à capacidade de campo. As plantas permaneceram nessa condição

de seca por seis dias, sendo então avaliados os parâmetros fisiológicos, anatômicos e coletadas amostras para análises bioquímicas. Após as avaliações, as plantas foram reidratadas, via elevação da umidade do solo à capacidade de campo, sendo a recuperação determinada quando as trocas gasosas se equipararam as plantas controle. As plantas permaneceram hidratadas por 15 dias, antes do início de um novo ciclo de seca. A determinação da capacidade de campo foi realizada através de uma curva de retenção de água no solo, para confecção desta curva os vasos foram encharcados às 18h de um dia e pesados novamente às 06h do dia seguinte, sendo determinada assim a máxima capacidade de armazenamento de água, e passaram a ser pesado todos os dias às 18h até atingirem peso constante, sendo assim determinado o menor volume de água disponível.

### 3.1. Análises morfológicas e índice de tolerância à seca

As plantas foram coletadas e seccionadas em parte aérea e raízes, sendo determinado o número de lâminas foliares. Posteriormente, foi realizada a análise da área foliar ( $\text{dm}^2$ ) através da obtenção de imagens em escala e medição da área através do software de processamento de imagens ImageJ (National Institutes of Health) (DAVIDSON e PROMETHEUS, 2011).

As partes aéreas e raízes foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa a  $65^\circ\text{C}$ , até massa constante, para a avaliação da Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca de Raízes (MSR).

A determinação da área foliar específica (AFE) foi realizada através da metodologia proposta por (CRAWLEY, 2009), na qual as folhas coletadas, após terem sua área determinada, foram secas em estufa convencional até a obtenção do peso seco constante. A AFE foi então calculada empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{AFE (m}^2 \text{ Kg}^{-1}\text{)} = \text{área foliar planta (m}^2\text{)} / \text{massa seca da folha (kg)}$$

Em virtude de as plantas possuírem uma variação natural de biomassa, o índice de tolerância à seca (ITS), foi calculado utilizando os dados da taxa fotossintética ( $A$ ), sendo este o melhor parâmetro encontrado para estimar a atividade fisiológica normal da planta. Para os cálculos foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{ITS} = \frac{A_{\text{seca}}/A_{\text{controle}}}{A_{\text{controle}}^2}$$

### 3.2. Anatomia foliar

A técnica de impressão da epiderme foi empregada para determinação da densidade estomática, do índice estomático e da condutância estomática máxima (MCDONALD, 1977). Para isso, uma pequena quantidade de cola instantânea foi colocada sobre lâmina histológica, sendo o material vegetal pressionado contra a lâmina por alguns minutos. As lâminas foram, então, observadas em uma magnificação de 20x com o auxílio de microscópio de luz equipado com sistema para captura de fotos.

Para análise da lâmina, 25 campos de 0,171 mm<sup>2</sup> foram escolhidos aleatoriamente, sendo a determinação da densidade estomática (DE), do índice estomático (IE) e do comprimento da célula-guarda (L) realizados por meio de software de imagem (MARTINS et al., 2014). A condutância estomática máxima teórica ( $g_{wmax}$ ) foi calculada com base nesses dados, segundo proposto por FRANKS et al. (2009):

$$g_{wmax} = \frac{DE \, d_w \, a}{v(l + \pi) \sqrt{\frac{a}{\pi}}}$$

Em que  $d_w$  representa a difusão do vapor d'água em ar;  $a$  é área máxima do poro de estômatos totalmente abertos;  $v$  é o volume molar do ar; e  $l$  representa a profundidade do poro de estômatos totalmente abertos. Para normalização dos valores, as constantes  $d_w$  e  $v$  foram aquelas em 25°C ( $24,9 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $24,4 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$ , respectivamente). O valor de  $a$  foi calculado como  $\pi(\rho/2)^2$ , em que  $\rho$  representa o comprimento do poro estomático, aproximado como  $L/2$ , de acordo com o proposto por FRANKS e FARQUHAR (2001). O valor de  $l$  para estômatos totalmente abertos foi calculado como  $L/4$  (FRANKS e FARQUHAR, 2001; MARTINS et al., 2014; MENEZES-SILVA et al., 2015).

Para analisar a densidade de venação, fragmentos da parte central da lâmina foliar foram preservados em FAA e utilizados no processo de clarificação, que consistiu em mergulhar as amostras foliares em hidróxido de sódio (NaOH) a 5% para clareamento químico durante dois dias até ficarem transparentes e macias. Após esse processo as folhas foram lavadas várias vezes em água e passadas por uma série de diluição etanólica (30%, 50%, 70% e 100%). Após a passagem pelo etanol 100%, as folhas foram cobertas com safranina 1% (preparada em etanol 100%), deixadas por 15 minutos e lavadas gentilmente com etanol 100%; posteriormente foram cobertas com 1% de fast Green (preparada de etanol 100%) por alguns segundos, lavadas novamente com etanol 100% e submetidas a uma série de diluição reversa para tirar o excesso de corante (100%, 90%,

70%, 50%, 30% e água). Após estes passos os fragmentos foliares foram montados em lâmina histológicas e fotografadas (JENSEN, 1977). A área do fragmento foliar e a densidade de venação foram determinadas com auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health).

### 3.3. Trocas Gasosas e pigmentos fotossintéticos

Para determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos clorofila a e clorofila b, aproximadamente 0,3 g de material fresco foi macerado em nitrogênio líquido e submetido à extração etanólica, a quente, segundo proposto por PÁPISTA et al., 2002. A leitura da absorvância dos extratos foi realizada em leitor de microplacas nos comprimentos de onda de 665 e 645 nm, para determinação da clorofila a e clorofila b, respectivamente.

A taxa de assimilação líquida do carbono ( $A$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e a taxa transpiratória ( $E$ ) foram determinadas em sistema aberto, sob luz saturante ( $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e pressão parcial de  $\text{CO}_2$  de 40 Pa. Para tanto, foi utilizado um analisador de gases a infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6400-02B, LI-COR).

Com o mesmo analisador a respiração noturna ( $R_N$ ), ou taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  noturna, foi avaliada antes do amanhecer. A respiração mitocondrial durante o dia ( $R_D$ ), por sua vez, foi estimada a partir de  $R_N$ , de acordo com BAI et al. (2008).  $R_D$  foi estimada em diferentes temperaturas usando o Q10 (LARCHER, 1983), como a seguir:

$$R_D = R_N * Q_{10}^{(T_d - T_n)/10} \quad (Q_{10} = 2,2)$$

Em que  $T_n$  é a temperatura foliar no qual a  $R_n$  foi medida e  $T_d$  é a temperatura foliar na qual  $R_D$  foi calculada.

Na antemanhã, foi obtida a fluorescência mínima ( $F_0$ ) via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade ( $0,03 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi obtida pela aplicação de um pulso de 0,8 s de luz actínica saturante ( $8000 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A fluorescência variável ( $F_v$ ) foi determinada pela diferença entre  $F_0$  e  $F_m$  e a partir desses valores, foi calculado o rendimento quântico potencial do fotossistema II (KOOTEN e SNEL, 1990), conforme a equação:

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

A eficiência do uso da água (A/E) foi estimada com base na razão entre a taxa de assimilação líquida de carbono e a taxa de transpiração foliar. A velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ( $V_{cmax}$ ) foi calculada conforme proposto por (DE KAUWE et al., 2016) através da seguinte fórmula:

$$V_{cmax} = A_{sat} \left( \frac{C_i - K_m}{C_i + \Gamma^*} - 0,015 \right)$$

Em que,  $A_{sat}$  é a taxa fotossintética à irradiação saturante e concentração atmosférica de  $CO_2$ ,  $C_i$  a concentração interna de  $CO_2$ ,  $K_m$  é a constante de Michaelis-Menten para o  $CO_2$  e  $\Gamma^*$  é o ponto de compensação de  $CO_2$  na ausência de respiração mitocondrial.

### 3.4. Relações Hídricas

#### 3.4.1. Potencial hídrico

O potencial hídrico foliar foi determinado em folhas individuais de cada um dos tratamentos com o auxílio de bomba de pressão tipo Scholander, na antemanhã (04h30 – 05h30) ( $\Psi_{am}$ ) e ao meio-dia ( $\Psi_{md}$ ).

#### 3.4.2. Transpiração

A transpiração diária ( $Ed$ ) foi estimada por gravimetria, mediante a diferença do peso dos vasos ( $\Delta PV$ ), determinada na antemanhã e ao final do dia. Este valor foi dividido pela área foliar total de cada planta ( $AF$ ), pelo peso molecular da água ( $PM$ ) e pelo intervalo de tempo entre as pesagens dos vasos ( $\Delta t$ ), de acordo com a fórmula a seguir (SILVA et al., 2013):

$$Ed = [(\Delta PV) / (AF * PM * (\Delta t))] * 1000$$

#### 3.4.3. Teor de água nas folhas

A determinação do teor de água nos tecidos vegetais foi realizada através da diferença de peso entre o material fresco e seco. Para isso, após a retirada da planta as folhas foram imediatamente pesadas tendo assim o seu peso fresco determinado, após

esta determinação as folhas foram colocadas em sacos de papel devidamente numerados e secas em estufa a 65°C até peso constante.

#### 3.4.4. Condutividade hidráulica foliar

A condutividade hidráulica da folha foi medida utilizando o método do fluxo evaporativo e os dados foram normalizadas pela área foliar (BRODRIBB e M. HOLBROOK, 2003; SIMONIN et al., 2015).

### 3.5. Análises Bioquímicas

#### 3.5.1. Danos celulares

A fim de evidenciar a geração de espécies reativas de oxigênio, a concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi quantificada utilizando amostras de aproximadamente 200 mg de folhas homogeneizadas em meio de extração (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM) e centrifugadas a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C (KUO e KAO, 2003). Alíquotas de 100  $\mu$ L do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo  $FeNH_4SO_4$  250  $\mu$ M preparado ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250  $\mu$ M e sorbitol 100 mM (GAY e GEBICKI, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorbância determinada a 560 nm. As concentrações de  $H_2O_2$  foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de  $H_2O_2$  e normalizadas em função do peso das amostras.

A concentração de aldeído malônico (MDA) foi determinada estimando as substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso em equivalentes de aldeído malônico (CAKMAK e HORST, 1991). O tecido foliar (0,25 g) foi macerado na presença de nitrogênio líquido e homogeneizado com 0,1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e 20% de insolúvel polivinilpirrolidona. O homogenato foi centrifugado a 15.000 x g por 15 min a 4°C e adicionada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante a 1,5 mL de 0,5% de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (preparado em 20% de TCA). As amostras foram homogeneizadas e a reação colorimétrica conduzida a 90 °C por 20 min após incubação em banho-maria. A seguir, as amostras foram imersas em banho de gelo e clarificadas através de centrifugação a 15000 x g por 15 min a 4 °C. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 532 nm e a absorbância inespecífica (660 nm) descontada. A peroxidação de lipídios foi estimada como conteúdo total de substâncias reativas ao TBA



e expressa como equivalentes de MDA. O coeficiente de extinção molar do MDA ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi utilizado para os cálculos e os resultados expressos como  $\text{nmol de MDA g}^{-1} \text{ MF}$ .

O extravasamento de eletrólitos foi determinado a partir de dez discos foliares de 1 cm de diâmetro acondicionados em tubo de ensaio contendo 10 mL de água deionizada, mantidos em banho-maria a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. A seguir, foi realizada a leitura da condutividade elétrica da solução (L1). Posteriormente, os tubos de ensaio foram incubados a  $90^\circ\text{C}$  por 1 hora e após entrar em equilíbrio térmico com o ambiente, foi procedida nova leitura (L2) da condutividade elétrica da solução. O extravasamento de eletrólitos foi calculado conforme a fórmula  $\text{EL} (\%) = (\text{L1}/\text{L2}) * 100$  (LUTTS et al., 1996).

### 3.5.2. Enzimas do metabolismo antioxidante

Foram determinadas as atividades das seguintes enzimas do metabolismo antioxidante: Superóxido Dismutase (SOD), Peroxidase (POX), do Ascorbato Peroxidase (APX), Catalase (CAT) e Glutathione Redutase (GR). Para isso, amostras foliares de aproximadamente 0,3 g foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas nos seguintes meios de reação:

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% para (SOD, EC 1.15.1.1), (POX, EC 1.11.1.7), (APX, EC 1.11.1.11) e (CAT, EC 1.11.1.6) (PEIXOTO et al., 1999);

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% para a enzima redutase da glutathione (GR, EC 1.6.4.2) (CARLBERG e MANNERVIK, 1985);

Os homogenatos foram então centrifugados a  $12.000 \times g$  por 15 min, a  $4^\circ\text{C}$  e os sobrenadantes utilizados como extrato enzimático bruto. As atividades enzimáticas foram determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação:

- Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT)  $75 \mu\text{M}$ , EDTA 0,1 mM e riboflavina  $2 \mu\text{M}$ , para SOD (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977) ;

- Tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM, para POX (PEIXOTO et al., 1999);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, para APX (PEIXOTO et al., 1999);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM, para CAT (PEIXOTO et al., 1999);

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, GSSG 1 mM e NADPH 0,1 mM, para GR (CARLBERG e MANNERVIK, 1985);

Para determinação da atividade da SOD, as amostras foram iluminadas por 5 min e a absorbância medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotorredução do NBT (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). As atividades das enzimas POX, APX, CAT, GR foram estimadas pela leitura da absorbância a cada 10 segundos durante os dois primeiros minutos de reação. Os seguintes coeficientes de extinção molar foram utilizados: POX (420 nm,  $\epsilon$ : 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), APX (290 nm,  $\epsilon$ : 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), CAT (240 nm,  $\epsilon$ : 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (PEIXOTO et al., 1999), GR (340 nm,  $\epsilon$ : 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (CARLBERG e MANNERVIK, 1985).

### 3.5.3. Metabólitos

Os teores de açúcares e prolina foram determinados através de extração a quente (CARILLO e GIBON, 2011) adaptada. Resumidamente, 100 mg de tecido vegetal foram maceradas com nitrogênio líquido, e adicionadas 2 ml de etanol 98%, este material foi transferido para tubos de rosca e submetidos a banho-maria 80°C por 20 minutos, após foram resfriados a temperatura ambiente e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos sendo o sobrenadante reservado, e o pellet submetido duas outras extrações semelhantes a primeira com etanol 80 e 50% respectivamente, sendo os sobrenadantes das três extrações acondicionados em um único recipiente, e estocados a - 20°C.

O açúcar solúvel total foi determinado com base no método dado por DUBOIS et al., (1951). Em que 1 ml do extrato etanólico acima foi misturado com 1 ml de 18% de fenol e água destilada e depois deixado em repouso à temperatura ambiente durante uma hora. Finalmente, foram adicionados 5 ml de ácido sulfúrico e toda a mistura foi submetida a vortex. A absorvância foi lida a 490 nm no espectrofotômetro. O etanol 80% foi usado como amostra em branco.

O meio de reação da prolina foi preparado de acordo com (BATES, L. S., WALDREN, R & TEARE, 1973), sendo constituído de 2,5 g de ninidrina, 60 ml de ácido acético glacial e 40 ml de ácido fosfórico 6 M. A reação foi conduzida através da adição

100 µl do meio de reação e 50 µl do extrato etanólico em tubos de rosca que foram vedados e posteriormente colocados em banho-maria a 95°C por 20 min; após o resfriamento a temperatura ambiente eles foram centrifugados rapidamente (2500 rpm, durante 1 min); e transferido 100 µl da mistura para a microplaca com leitura a 520 nm.

O conteúdo de prolina foi determinado através de curva padrão com concentrações de prolina variando de 0,04 a 1 mmol, e calculado conforme a equação a seguir:

$$\text{Proline } (\mu\text{mol. g}^{-1}\text{FW}) \\ = (\text{Abs}_{\text{extrato}} - \text{Branco})/\varepsilon * \text{Vol}_{\text{extrato}}/\text{Vol}_{\text{aliquota}}*(1/\text{FW})$$

Em que, Abs. extrato é a absorbância determinada com o extrato, o branco (expresso como absorbância) e  $\varepsilon$  (expresso como absorbância·nmol<sup>-1</sup>) são determinados por regressão linear, Vol. extrato é o volume total do extrato e Vol. Alíquota é o volume utilizado no ensaio, FW (expresso em mg) é o valor de material vegetal utilizado.

### 3.6. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC); as plântulas de Baru foram submetidas a regimes hídricos diferenciais e cada tratamento teve oito repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias calculadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR 5.6 (DEX/UFLA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Relações hídricas

O evento de restrição de hídrica alterou o teor de água (TA) dos tratamentos; conforme esperado os maiores valores foram apresentados pelo tratamento controle e os menores apresentados pelos tratamentos em déficit hídrico, sendo que estes não diferiram estatisticamente entre si (Fig. 1 A). Os resultados de potencial hídrico na antemanhã ( $\Psi_{\text{am}}$ ) corroboram com os resultados de TA, apresentando padrão inverso de comportamento entre os tratamentos, os menores valores foram apresentados pelos tratamentos em déficit hídrico e o menor potencial apresentado pelo controle (Fig. 1 B).

A transpiração diária (Ed) apresentou maiores valores para o tratamento controle e o menor valor para o tratamento com 1 ciclo de seca, por sua vez o tratamento com três

ciclos de seca apresentou comportamento intermediário com valores comparáveis aos outros dois tratamentos (Fig. 1 C).

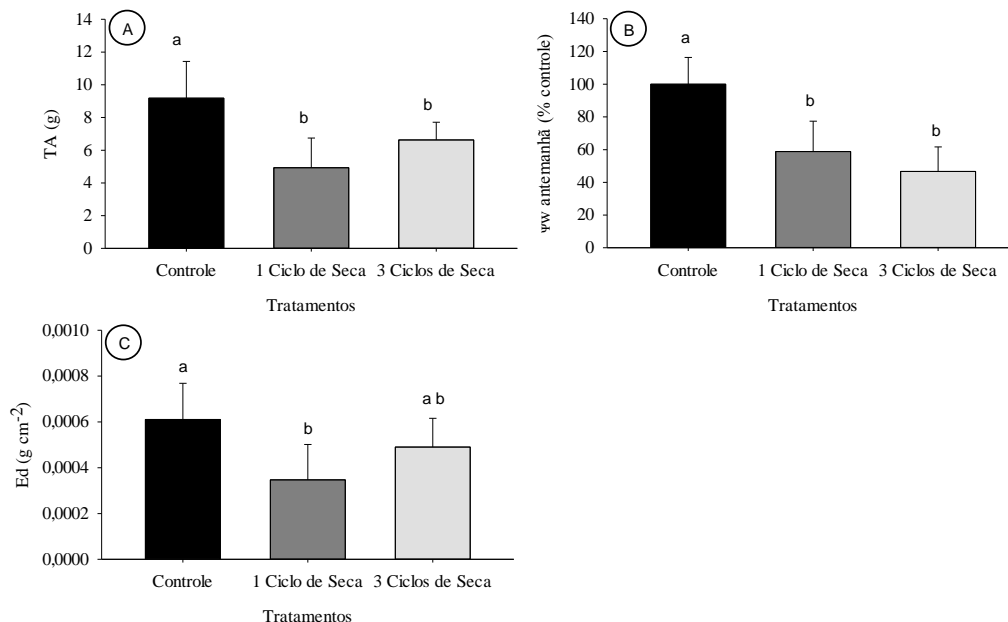


Figura 1 - Teor de Água (TA) (A), Potencial Hídrico antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) (B), Transpiração diurna (Ed) (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2. Análises morfológicas e índice de tolerância a seca

A exposição das plantas de Baru aos ciclos repetidos de seca não alterou a sua produção de biomassa, sendo observados valores semelhantes para Área Foliar Específica (AFE), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca de Raízes (MSR) entre os três tratamentos (Fig. 2 A-C). Estes resultados podem ter ocorrido em função da ausência de lapso temporal de avaliação compatível com o necessário para o aparecimento destas alterações.

De modo diferente o ITS apresentou melhores resultados para os tratamentos controle e três ciclos de seca, destoando do resultado apresentado pelo tratamento com somente um ciclo de seca (Fig. 2 D). Observa-se que estes valores são consoantes com os apresentados pela taxa de assimilação líquida de carbono (A), parâmetro utilizado para sua determinação.

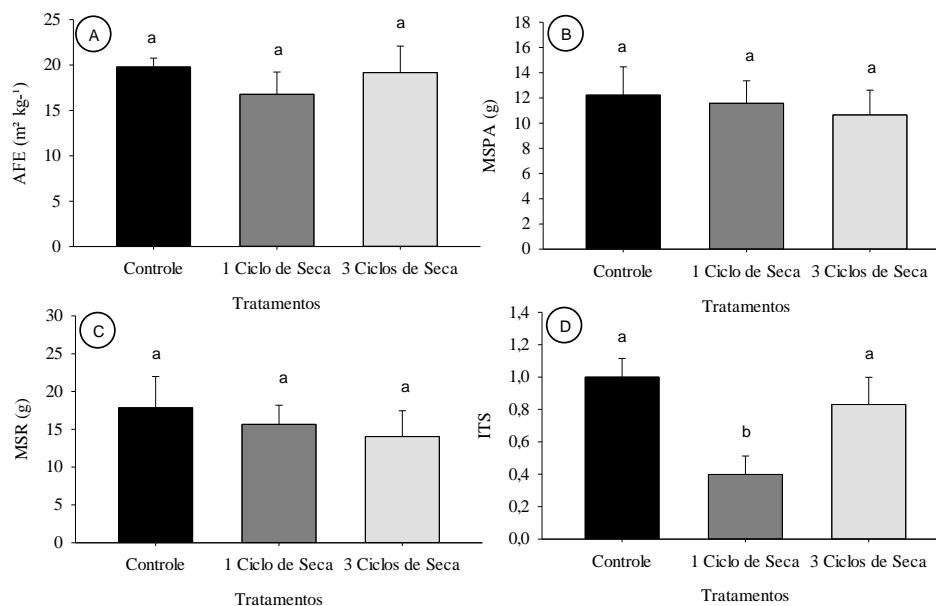


Figura 2 - Área foliar específica (AFE) (A), Índice de tolerância a seca (ITS) (B), Matéria seca parte aérea (MSPA) (C), Matéria seca raízes (MSR) (D). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.3. Anatomia foliar

Em relação a anatomia foliar, não foram observadas alterações significativas em praticamente nenhum dos elementos analisados, sendo que os parâmetros Densidade Estomática (DE), Índice estomático (IE) e Condutância Estomática Máxima ( $g_{wmax}$ ) permaneceram semelhantes ao controle em todos os tratamentos analisados (Fig. 3 A-C). Em relação à densidade de venação (Fig. 3 D), observou-se incremento tanto nas plantas submetidas a um ciclo quanto naquelas submetidas a três ciclos de seca, embora entre os ciclos de seca a densidade de venação não tenha se alterado. Neste ponto, vale informar que houve a perda de folhas após cada ciclo de seca, semelhante ao indicado por BASSINE (2008), e os dados em análise foram mensurados conforme se observa na figura 4, após a troca de folhas.

Para condutividade hidráulica foliar ( $K_{leaf}$ ), os tratamentos controle e três ciclos de seca apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si, e diferentes do tratamento com um ciclo de seca, no qual foi observado valor notavelmente menor (Fig. 3 E).

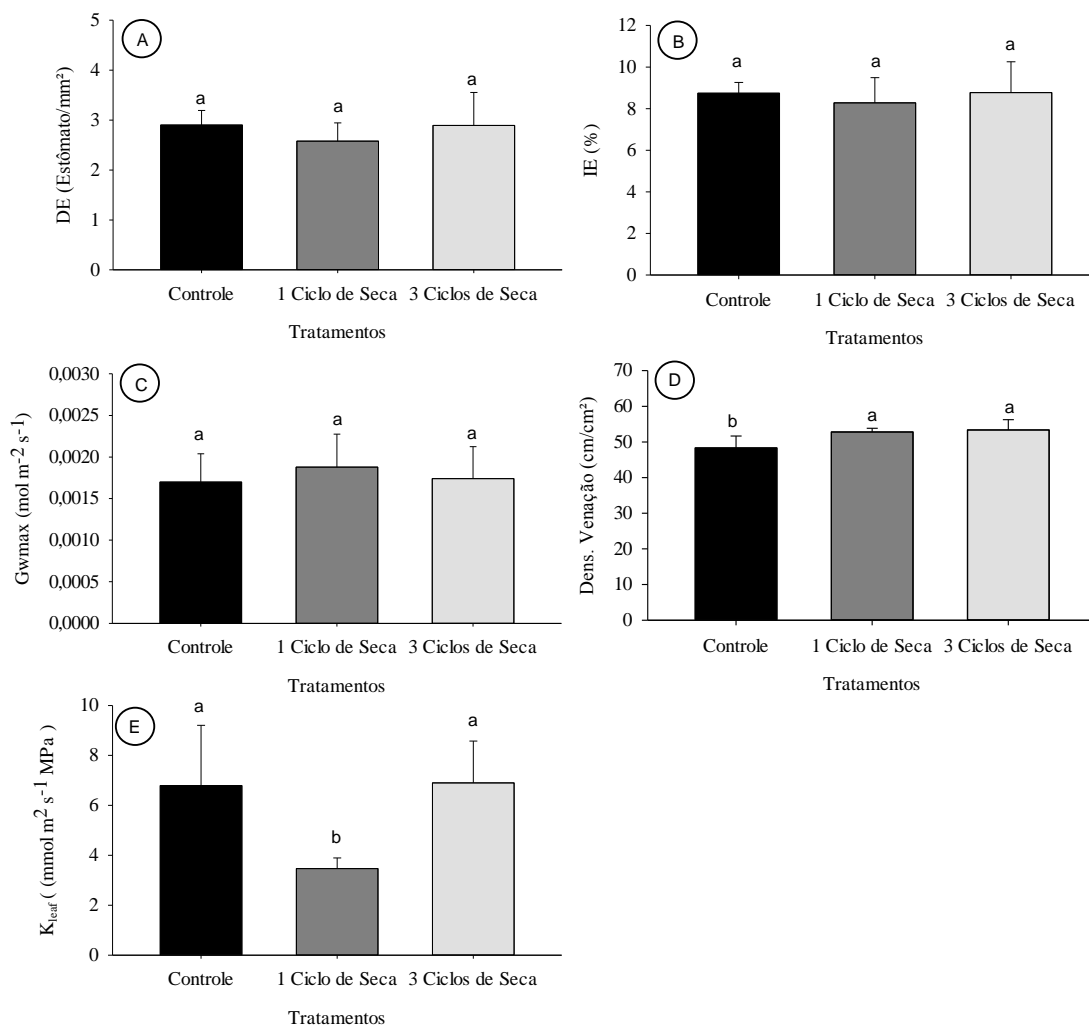


Figura 3 - Densidade estomática (DE) (A), Índice estomático (IE) (B), Condutância estomática máxima ( $g_{wmax}$ ) (C), Densidade de venação (D), Condutividade Hidráulica Foliar ( $K_{leaf}$ ) (E). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

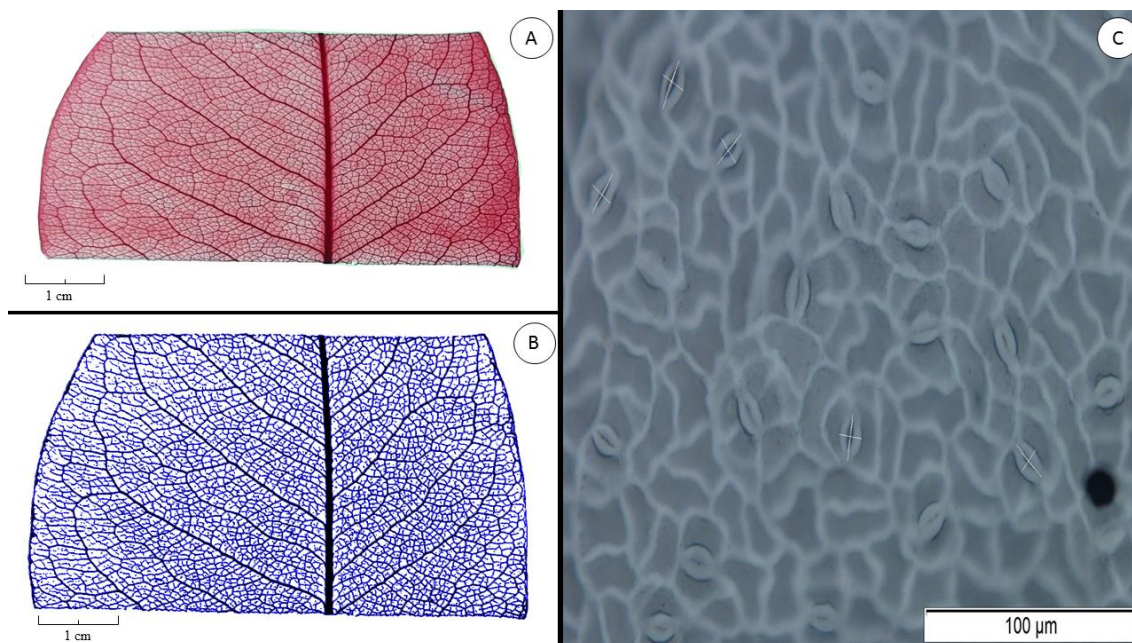


Figura 4 – Folha clarificada utilizada na aferição da densidade de venação (A), Folha vetorizada no ImageJ para cálculo do comprimento das nervuras e área foliar (B); Imagem microscópica utilizada nos parâmetros de anatomia foliar (C).

#### 4.4. Trocas Gasosas e pigmentos fotossintéticos

A exposição ao déficit hídrico afetou praticamente todos os parâmetros de trocas gasosas analisados. A assimilação líquida de carbono ( $A$ ), que representa um processo central no metabolismo da planta, por exemplo, foi similar no controle e nas plantas expostas a três ciclos de seca, enquanto no tratamento com um ciclo de seca, observou-se queda acentuada em função do evento estressante (Fig. 5 A). A concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), por sua vez, foi maior nos tratamentos controle e 1 ciclo de seca, sendo menor no tratamento com três ciclos de seca. Comportamento oposto foi observado em relação à taxa transpiratória foliar ( $E$ ), variando significativamente entre os três tratamentos, sendo que, conforme esperado, o maior valor foi encontrado no controle, que dispunha de ampla disponibilidade hídrica, sendo seguido pelo tratamento com três ciclos de seca e os menores valores apresentados pelo tratamento com um ciclo de seca (Fig. 5 B-C). O mesmo padrão de resposta foi observado em relação à condutância estomática ( $g_s$ ), sendo os maiores valores apresentados pelo controle, seguido pelo tratamento com três ciclos e pelo tratamento com apenas um ciclo de seca (Fig. 5D).

A velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ( $V_{cmax}$ ) variou estatisticamente entre os tratamentos, e o tratamento com um ciclo de seca apresentou forte queda na velocidade de carboxilação e o tratamento com três ciclos de seca manteve sua capacidade carboxilativa semelhante ao tratamento controle (Fig. 5 E).

A relação entre a atividade fotossintética e a taxa transpiratória, parâmetro que determina a eficiência do uso da água (A/E) (Fig. 5 F), não apresentou variação entre os tratamentos.

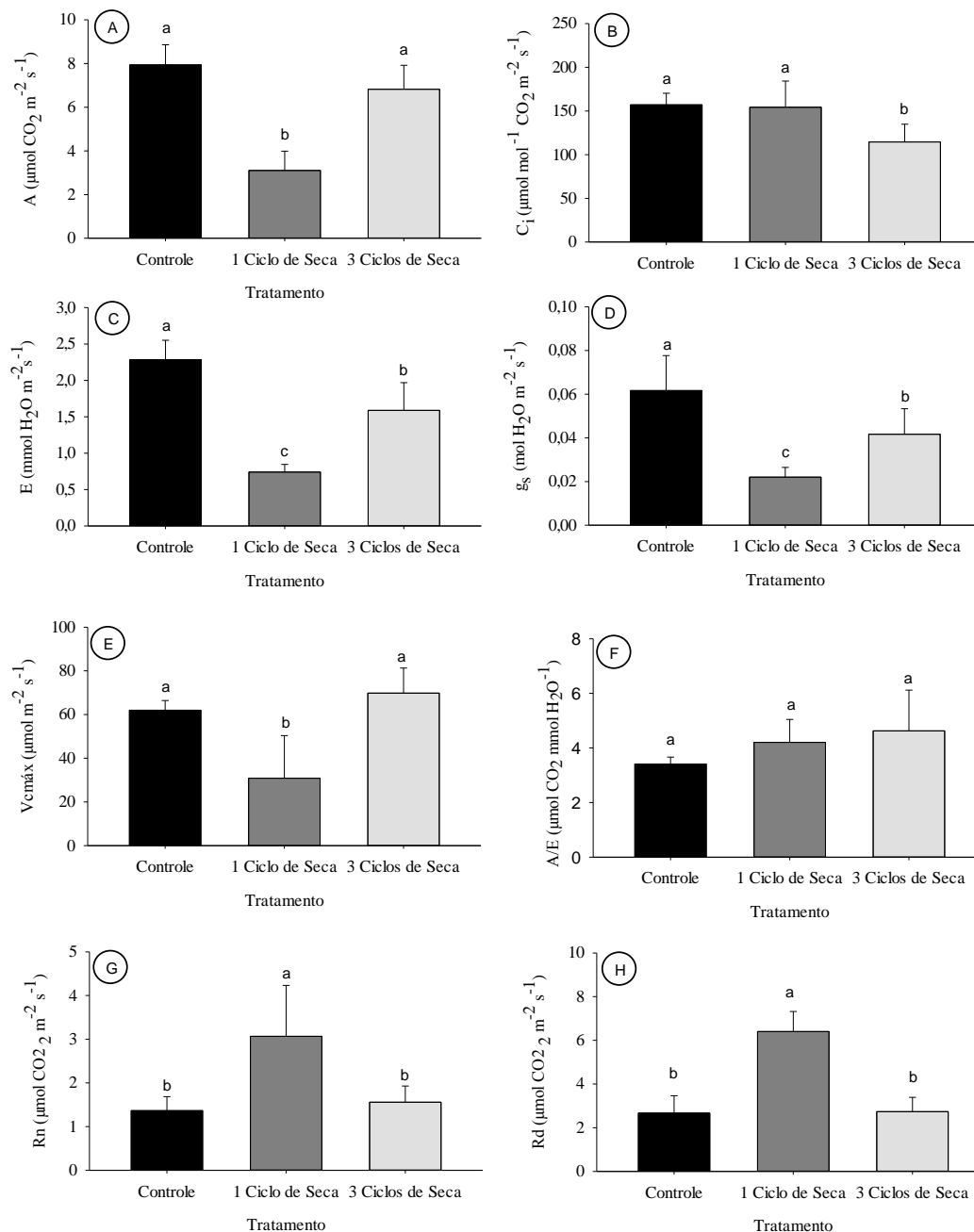


Figura 5 - Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), Concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) (B), Taxa transpiratória (E) (C), Condutância estomática ( $g_s$ ) (D), Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ( $V_{c\text{max}}$ ) (E), Eficiência do uso da água (A/E) (F), Respiração Noturna (Rn) (G), Respiração mitocondrial diurna (Rd) (H). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).



Em relação à respiração noturna e mitocondrial, os maiores valores foram observados nas plantas submetidas a apenas um ciclo de seca (Fig. 5 G-H). De fato, nesse tratamento os valores obtidos foram superiores ao dobro dos apresentados para os tratamentos controle e três ciclos de seca. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as plantas do controle e as plantas submetidas a três ciclos de restrição hídrica.

Destoando dos parâmetros ligados as trocas gasosas, a concentração de clorofilas *a* e *b* não diferiu estatisticamente entre os tratamentos analisados (Fig. 6 A-B). De forma similar, o rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $Fv/Fm$ ) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, conforme se observa na figura 6 C.

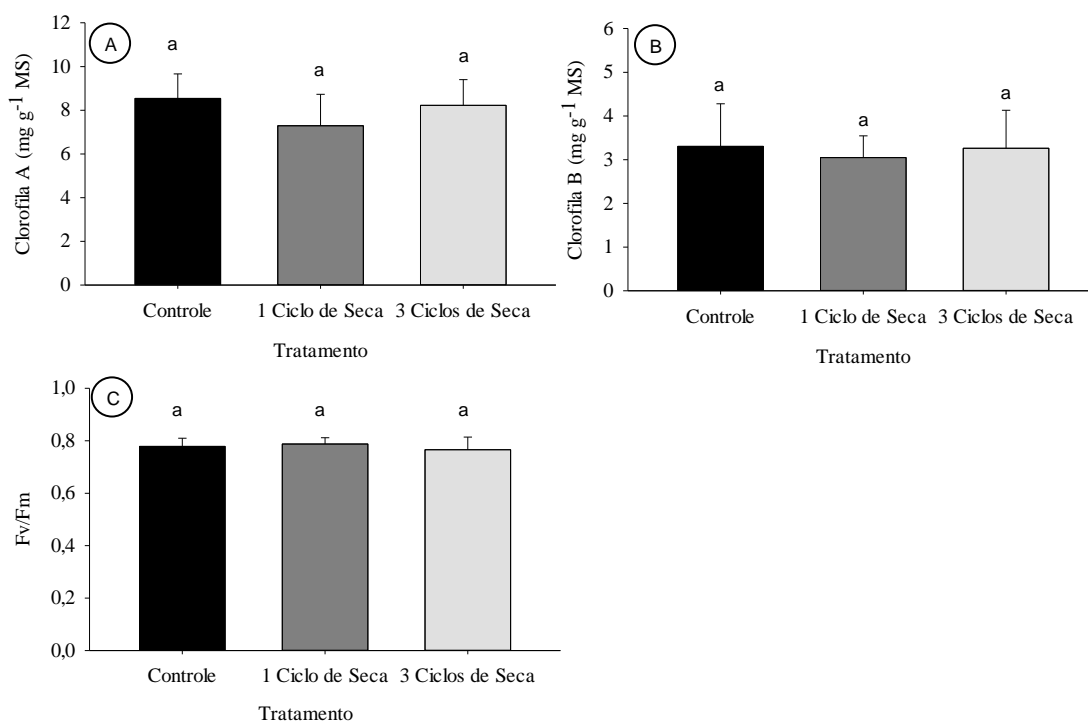


Figura 6 -. Clorofila A (A), Clorofila B (B), Rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $FV/FM$ ) (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.5. Danos celulares

A exposição das plantas a apenas um ciclo de seca aumentou a geração de espécies reativas de oxigênio nas células, como pode ser evidenciado pelo incremento na concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. 7A). Esse acúmulo de EROs teve efeito danoso sobre as membranas de *D. alata* (Fig. 7 B), embora não tenham sido observadas alterações na concentração do indicador de peroxidação de lipídios aldeído malônico (MDA) (Fig. 7 C). É interessante observar, no entanto, que quando as plantas foram

submetidas a três ciclos de seca esses danos foram atenuados, sendo que os valores encontrados para a concentração de peróxido de hidrogênio, extravasamento de eletrólitos e a concentração de MDA foram significativamente iguais ao controle (Fig. 7A-C).

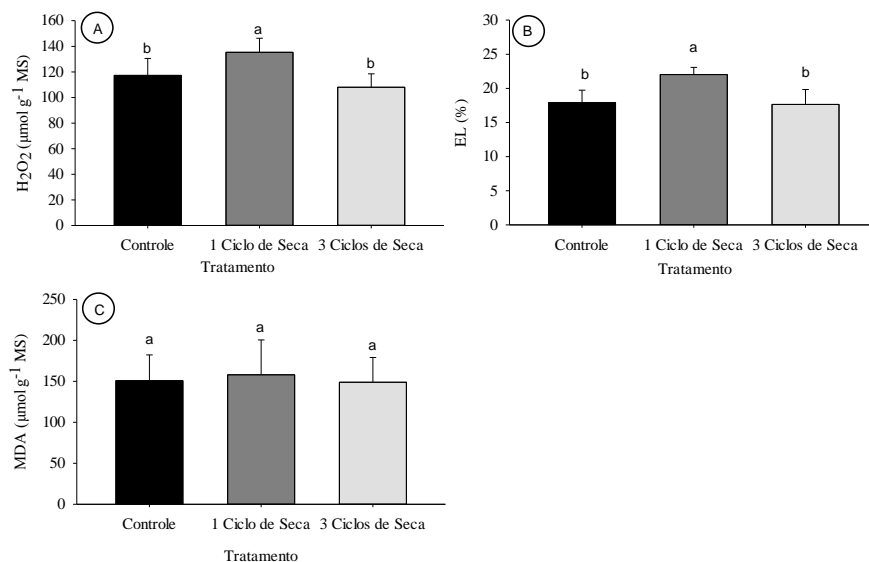


Figura 7 - Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (A), Extravasamento de eletrólitos (EL) (B), Aldeído Malônico (MDA) (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.6. Enzimas do metabolismo antioxidante

De modo geral, as enzimas do metabolismo antioxidante, com exceção da peroxidase (APX) e catalase (CAT), foram responsivas ao tratamento com restrição hídrica (Fig. 8 A-E). As principais alterações foram observadas nas plantas expostas a três ciclos de seca, as quais apresentaram maiores atividades para as enzimas peroxidase (POX), glutathiona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD), sendo que os tratamentos controle e um ciclo de seca apresentaram atividades estatisticamente iguais para todas as enzimas avaliadas.

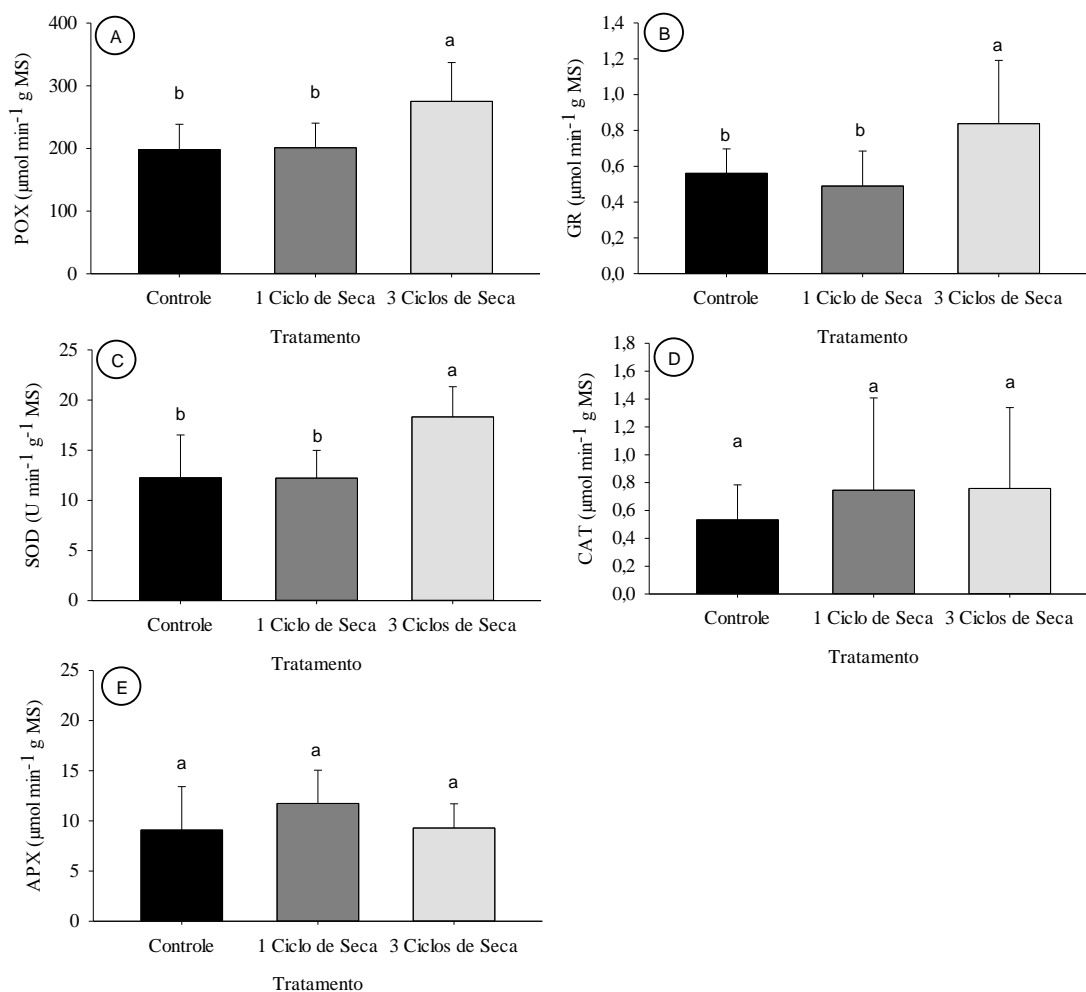


Figura 8 - Peroxidase (POX) (A), Glutaciona redutase (GR) (B), Superóxido Dismutase (SOD) (C) Catalase (CAT) (D), Ascorbato peroxidase (APX) (E). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.7. Metabólitos

A concentração de açúcares solúveis totais apresentou variação estatística entre os tratamentos com um e três ciclos de seca, os maiores valores foram apresentados pelo tratamento com um ciclo de seca e os menores foram apresentados pelo tratamento com três ciclos; por sua vez o tratamento controle apresentou valores intermediários sendo comparáveis com os dois tratamentos de déficit hídrico (Fig. 9 A). A concentração de prolina não apresentou variação estatística entre os tratamentos (Fig. 9 B).

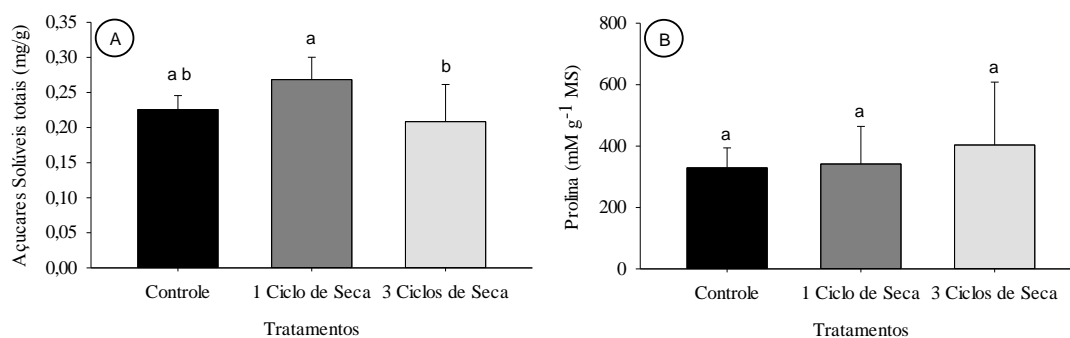


Figura 9 - Açúcares solúveis totais (A), Prolina (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Os ambientes naturais são ecossistemas dinâmicos, nos quais as plantas estão frequentemente sujeitas a estresses recorrentes. Nesse contexto, a aclimação diferencial das plantas, ou ainda, a memória ao estresse, representa um fator crucial a ser considerado em programas de conservação. Apesar disso, apenas recentemente esse aspecto começou a ser avaliado em estudos sobre seca e, até o momento, apenas culturas comerciais foram analisadas (SILVA et al., 2017; WALTER et al., 2011). No presente trabalho, caracterizou-se resposta diferencial de *Dipteryx alata* Vogel (Baru) exposta a diferentes ciclos de seca, sugerindo a existência de um mecanismo de memória em plantas nativas do cerrado. De fato, a exposição das mudas de Baru à seca produziu diversas alterações, principalmente nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, sendo que essas alterações foram marcadamente diferentes quando o déficit hídrico foi imposto como um evento isolado ou quando as plantas foram submetidas a ciclos de seca. De forma geral, os resultados obtidos indicam maior tolerância das plantas quando submetidas a três ciclos de seca, contrapondo a possibilidade de sensibilidade aos ciclos repetidos de déficit hídrico e sugerindo a existência de um mecanismo de aclimação diferencial responsável pela melhoria de desempenho frente ao evento estressante.

Com vistas às relações hídricas, os resultados obtidos são condizentes com os esperados (CHAVARRIA e DOS SANTOS, 2012; LI e LIU, 2016), em que o tratamento controle apresentou maior teor de água e maior potencial hídrico em relação aos tratamentos sob déficit hídrico. A queda no teor de água e no potencial hídrico é uma resposta típica de plantas expostas à restrição hídrica (FRANÇA et al., 2017; MARTINS et al., 2017; SILVA, 2017) e pode comprometer severamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal se não vier acompanhada de outras alterações capazes de manter

os principais processos do metabolismo vegetal. É interessante observar, no entanto, que embora o teor de água e o potencial hídrico não tenham variado entre os ciclos de déficit hídrico, o índice de tolerância à seca foi notavelmente superior nas plantas submetidas a três ciclos de estresse, quando comparadas com as expostas a somente um ciclo de seca. Estratégias de tolerância à seca incluem dois mecanismos contrastantes, o atraso na dessecação e a tolerância à dessecação (TYREE et al., 2003). O atraso na dessecação dos tecidos envolve características que aumentam o acesso à água e reduzem a perda de água, auxiliando a manter o potencial hídrico. A tolerância à dessecação, por outro lado, baseia-se na capacidade da planta em manter suas funções metabólicas apesar da perda de água (KURSAR et al., 2009). Dessa forma, os dados disponíveis permitem caracterizar o Baru como tolerante à dessecação, sendo que essa característica se torna mais marcante após a exposição a três ciclos de seca. De forma geral, diferentes estudos demonstraram que espécies tolerantes à dessecação, também chamadas de anisóidricas, apresentam maiores taxas de sobrevivência quando expostas a secas severas e prolongadas (BALTZER et al., 2008; KURSAR et al., 2009; MCDOWELL et al., 2008).

A ausência de alterações morfoanatômicas nas plantas submetidas a um ou a três ciclos de seca é um indicativo de que os períodos de seca enfrentados pelas plantas foram longos o suficiente para causar alterações fisiológicas e bioquímicas, porém curtos o bastante para possibilitar ajustes anatômicos. De fato, trabalhos realizados com Gabiroba (BELO, 2011), Mutambo (QUINTÃO SCALON et al., 2011), Cagaita (CAMPOS, 2016) e com o próprio Baru (PESSOA, 2010) conseguiram encontrar diferenças entre variáveis morfoanatômicas somente a partir dos doze primeiros dias de déficit hídrico. É importante considerar, ainda, que essa ausência de variação entre os tratamentos pode também ser pelo processo de adaptação morfoanatômica da planta ao bioma cerrado. Estudos realizados por BULHÃO e FIGUEIREDO (2008) indicaram que plantas do cerrado apresentam considerável plasticidade fenotípica e, apesar de serem consideradas sempre verdes (mantém suas folhas durante o período de seca), muitas vezes podem adotar estratégias decíduas frente aos eventos estressantes, como foi observado neste trabalho; e embora tenha havido a troca dos tecidos, a persistência das características morfoanatômicas pode estar relacionada a adaptação ecofisiológica das plantas ao cerrado (HÄMMERLE, 2006; RONQUIM e CONCEIÇÃO, 2011), as quais permitiriam uma rápida resposta quando da ocorrência de chuvas (DE MATTOS et al., 2002).

Alterações morfoanatômicas relacionadas ao aprofundamento de raízes, diminuição do número e tamanho dos estômatos e diminuição da área foliar específica

são respostas marcadamente conhecidas como estratégias de retardo ao dessecamento dos tecidos (BASU et al., 2016; SOUROUR et al., 2017). A ausência de variação nesses parâmetros no presente estudo, associada com a ocorrência de significativas alterações em parâmetros fisiológicos e bioquímicos, reforça a hipótese levantada por diversos autores de que a resposta mais eficaz observada em plantas após ciclos sucessivos de seca é oriunda de processos epigenéticos que retiveram a informação sobre a seca e permitiram a expressão de uma resposta mais rápida e/ou mais intensa, e não a ajustes na morfologia e na anatomia das plantas (AVRAMOVA, 2015; KINOSHITA e SEKI, 2014; LÄMKE e BÄURLE, 2017).

Dentre os vários parâmetros morfoanatômicos avaliados, o único que se alterou foi a densidade de venação, que foi maior nas plantas submetidas à seca do que no controle. Cabe ressaltar, no entanto, que entre os ciclos de seca não houve diferença nesse parâmetro, de forma que ele não está relacionado com o maior índice de tolerância observado após três ciclos sucessivos de restrição hídrica. A venação foliar corresponde ao sistema de irrigação da folha, altamente estruturado e eficiente, sendo determinado, principalmente, pelo comprimento das nervuras por unidade de área (TABASSUM et al., 2016). A densidade de venação pode, portanto, influenciar substancialmente a condutividade hidráulica foliar ( $K_{leaf}$ ), o que, por sua vez, está relacionado com o grau de abertura estomática e com a taxa fotossintética (SACK et al., 2008). Com efeito, uma alta densidade de venação representa vias xilemáticas mais numerosas por unidade de área e também vias mais curtas para o movimento de água do xilema até os estômatos. Além disso, já foi demonstrado que maior densidade de venação reduz a vulnerabilidade hidráulica e a ocorrência de cavitação (SCOFFONI et al., 2011), fatores que, em conjunto, contribuem para a manutenção de  $K_{leaf}$ , sobretudo em condições de baixa disponibilidade hídrica. Curiosamente, a manutenção de  $K_{leaf}$  ocorreu apenas nas plantas expostas a três ciclos de seca, e demonstra que a atividade de um terceiro elemento de controle hídrico, como por exemplo maior expressão das aquaporinas (WANG et al., 2017), pode ter sido determinante para manter a condutividade hidráulica nesse tratamento.

A fotossíntese é um processo chave que integra o status fisiológico da planta. Embora o déficit hídrico não tenha comprometido o rendimento quântico do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) ou interferido na concentração de clorofilas, a taxa de assimilação líquida de carbono ( $A$ ) caiu consideravelmente quando as plantas foram submetidas a um único ciclo de seca, sendo restaurada nas plantas que passaram por três ciclos de seca. A queda observada nas plantas que passaram por apenas um ciclo de déficit hídrico pode ser

explicada pela associação de diferentes fatores que estão interligados entre si, como a condutividade hidráulica foliar, inibição das enzimas do ciclo de Calvin e a diminuição na condutividade estomática ( $g_s$ ), indicando a ocorrência tanto de limitações bioquímicas quanto limitações difusivas (BAI et al., 2008; OSAKABE et al., 2014). Com efeito, o fechamento estomático é uma das primeiras respostas das plantas sob estresse hídrico (BRODRIBB e HOLBROOK, 2003; LE et al., 2011), fator que diminui a taxa transpiratória e restringe a perda de água para o ambiente mas, ao mesmo tempo, limita a entrada do  $\text{CO}_2$ , diminuindo, portanto, a disponibilidade de substrato para a Rubisco. Contudo, apesar da marcante queda em  $g_s$ , as plantas submetidas a um ciclo de seca apresentaram valores para a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) estatisticamente iguais ao controle, indicando que o pouco  $\text{CO}_2$  que entrava na câmara subestomática não estava sendo fixado pelas enzimas do ciclo de Calvin, as quais são sensíveis ao evento de seca, em especial a Rubisco (FLEXAS et al., 2006). Esta observação é condizente e fundamentada nos resultados de  $V_{\text{cmax}}$ , parâmetro que indica a velocidade de carboxilação da Rubisco e é uma função do produto entre a concentração da Rubisco, o estado de ativação e a atividade catalítica ( $K_{\text{cat}}$ ), expondo, portanto, a ocorrência de comprometimento na atividade ótima dessa enzima (DE KAUWE et al., 2016).

Ao contrário do observado para as plantas expostas a apenas um ciclo de seca, após três ciclos recorrentes de déficit hídrico a fotossíntese do Baru foi restaurada, sendo estatisticamente igual a observada no controle. Um fator que pode ter contribuído sobremaneira para a recuperação da capacidade fotossintética das plantas do ciclo três foi a manutenção de  $K_{\text{leaf}}$ , o que, por sua vez, permitiu maior abertura estomática em comparação com as plantas de um ciclo. Diversos estudos já demonstraram que  $g_s$  e, conseqüentemente, as taxas de fotossíntese, estão diretamente relacionadas com a capacidade de uma planta em transportar água das raízes até os tecidos transpirantes (SANTIAGO et al., 2004). Nesse sentido, a condutividade hidráulica foliar ( $K_{\text{leaf}}$ ) é considerada fator preponderante para a manutenção do processo fotossintético (SACK E SCOFFONI, 2013), uma vez que, para algumas espécies, cerca de 70% da resistência total ao transporte de água ao longo da planta se encontra nas folhas. Em adição, os valores de  $C_i$  e  $V_{\text{cmax}}$  nas plantas de três ciclos evidenciam alta atividade das enzimas envolvidas na fixação do carbono.

O processo de respiração está intimamente vinculado à capacidade fotossintética das espécies vegetais. Essa relação intrínseca entre os dois processos é facilmente observada em plantas transgênicas, nas quais constatou-se que a alteração do

metabolismo respiratório afeta o comportamento fotossintético (NUNES-NESI et al., 2005). Embora em condições normais aproximadamente metade do carbono assimilado pela fotossíntese seja perdido na respiração, este balanço pode ser alterado em condições de restrição hídrica (FLEXAS et al., 2005). O presente estudo reforça essas afirmações, uma vez que a queda na taxa de fixação de carbono observada no Baru, submetido a um ciclo de seca, foi acompanhada por incrementos nas taxas respiratórias, similarmente ao que já foi encontrado para outras espécies vegetais em condições de seca, promovendo um balanço de carbono negativo (FLEXAS et al., 2005; GHASHGHAIE et al., 2001). O aumento da respiração das plantas em condição de seca tem sido associado com o maior direcionamento de esqueletos de carbono para mecanismos de defesa e/ou reparo de estruturas celulares danificadas em função do estresse, representando, portanto, uma estratégia de defesa das plantas em resposta à restrição hídrica (FLEXAS et al., 2005). Contudo, uma vez que não foram observadas alterações na concentração de açúcares solúveis totais, é possível que os substratos para a respiração estivessem sendo supridos pelo evento de senescência foliar observado nas plantas do ciclo 1, ou ainda, por reservas de amido nas folhas e nas raízes (SILVA et al., 2013). Cabe ressaltar, no entanto, que em longo prazo esse aumento na respiração pode exaurir as reservas da planta, já que ele não foi acompanhado por ganhos na fotossíntese. Nas plantas submetidas a três ciclos de seca, por sua vez, não foram observadas alterações nem na fotossíntese nem na respiração, de forma que essas plantas foram capazes de manter sua homeostase celular mesmo em condição de déficit hídrico, o que provavelmente envolveu ajustes em outros processos metabólicos, como o sistema antioxidante da célula, como será discutido a seguir.

O comprometimento dos processos metabólicos vegetais como consequência da exposição a estresses abióticos, comumente resulta no aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais apresentam alta reatividade bioquímica e causam danos as principais macromoléculas celulares, como ácidos nucleicos, enzimas e lipídeos de membrana (CHOUDHARY et al., 2012). Dentre as EROs mais comuns nas células vegetais cita-se aqui o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que pode atravessar membranas, ser convertido em formas mais reativas e inativar enzimas através da oxidação de seus grupos tiol (GADJEV et al., 2008). Apenas as plantas submetidas a um ciclo de seca apresentaram incrementos na concentração de  $H_2O_2$ , refletindo em danos nas membranas celulares, como foi constatado pelo aumento no extravasamento de eletrólitos. Surpreendentemente, não foram observadas alterações na concentração de MDA em nenhum dos tratamentos analisados, podendo ser consequência das limitações das



técnicas usualmente utilizadas na quantificação do MDA, as quais nem sempre possibilitam que essa molécula seja utilizada de forma confiável como um marcador de estresse oxidativo (YONNY et al., 2017).

Em contraste ao obtido para as plantas expostas uma única vez à seca, nas plantas submetidas a três ciclos de déficit hídrico observou-se ausência de danos às membranas celulares, bem como a manutenção da concentração de EROS, o que provavelmente foi resultado da maior atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e glutathione redutase (GR); este conjunto de respostas demonstra a capacidade superior de desintoxicação de EROs destas plantas, pois a SOD é considerada a primeira linha de defesa frente ao estresse oxidativo, sendo responsável por realizar a dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular (BARBOSA et al., 2014; NASCIMENTO e BARRIGOSI, 2014). Por sua vez, as POX catalizam a redução do  $H_2O_2$ , utilizando-o como oxidante e compostos de natureza fenólica como doadores de elétrons; e a GR atua intermediando o processo não enzimático de eliminação de EROs do ciclo ascorbato-glutathione, através da regeneração de glutathione reduzida (GSH), a qual será utilizada para regenerar o ácido ascórbico (AsA), substrato necessário a redução do  $H_2O_2$  (BARBOSA et al., 2014). Para este mesmo conjunto enzimático as plantas expostas ao primeiro ciclo de seca apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao tratamento controle, indicando que a atividade de suas enzimas ainda era insipiente.

Por fim, a concentração dos solutos osmocompatíveis como a prolina e os açúcares, são importantes ferramentas de ajustes do potencial osmótico celular com vistas a maior capacidade de obtenção de água pelo tecido vegetal (DIAZ et al., 1999), além de possuírem outras funções, como reserva energética e potencial antioxidante (CHAVARRIA e DOS SANTOS, 2012). Embora o ajustamento osmótico seja importante estratégia empregada por diferentes plantas em condições de seca, no presente trabalho o conteúdo de prolina não variou entre os tratamentos observados; este resultado pode ser pela adoção de outras estratégias de resposta à seca, ou aos elevados desvios padrões observados dentro dos tratamentos. É importante salientar, ainda, que diversos metabólitos diferentes podem estar envolvidos no ajustamento osmótico, de forma que a manutenção da concentração da prolina não necessariamente evidencia a ausência de ajustamento osmótico (SERVILLO et al., 2011).

Pelos requisitos indicados em diversos estudos (CRISP et al., 2016; FLETASORIANO e MUNNÉ-BOSCH, 2016; OGLE e BARBER, 2016; WALTER et al., 2011;

WEINHOLD, 2018), o conjunto de resultados relacionados a melhoria nas trocas gasosas, atividade de enzimas antioxidantes e condutividade hidráulica foliar, bem como os indicadores de danos celulares ( $H_2O_2$  e EL) expressados diferencialmente podem ser considerados um evento de memória a seca.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que o Baru (*Dipteryx alata Vogel*) não apresenta sensibilidade a eventos recorrentes de restrição hídrica, pois as plantas expostas a três ciclos de seca apresentaram, para a absoluta maioria dos parâmetros aqui avaliados, resultados semelhantes aos das plantas controle e superiores aos das plantas expostas ao primeiro evento de restrição hídrica. A existência em nível de planta de maior capacidade de resposta à seca ficou evidenciada na sincronia e na complementaridade das respostas obtidas nos diversos parâmetros analisados. Com efeito, a exposição das plantas ao déficit hídrico de forma recorrente foi capaz de aumentar o índice de tolerância à seca, o que envolveu a manutenção de processos essenciais para a sobrevivência das plantas, como a fotossíntese, a respiração e a condutividade hidráulica foliar. Adicionalmente, as plantas expostas a três ciclos também mantiveram a concentração de espécies reativas de oxigênio em níveis normais e não apresentaram indícios de danos às membranas, provavelmente como consequência da atuação mais efetiva das enzimas do metabolismo antioxidante. É importante ressaltar que, até onde foi possível averiguar, esse é o primeiro estudo que analisa o efeito dos ciclos de déficit hídrico em uma planta nativa do Brasil, evidenciando a existência da memória ao estresse em plantas do cerrado. É provável que esse mecanismo seja uma função do ambiente nos quais essas plantas evoluíram, o cerrado, um bioma no qual eventos intensos e recorrentes de seca são características intrínsecas. De fato, se a memória ao estresse também for observada nas demais espécies do cerrado, isso pode facilitar e beneficiar a manutenção da biodiversidade em um cenário de alterações climáticas. Contudo, espécies de outros biomas, que não evoluíram nas mesmas condições climáticas das plantas nativas do cerrado, podem apresentar um comportamento completamente contrastante, sendo necessário que estudos também sejam realizados em formações vegetais com características distintas a fim de averiguar o impacto das mudanças climáticas sobre essas espécies.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A. N. Spaces Occupied by the expansion of dry climates in south america during the quaternary ice ages. **Revista do Instituto Geológico de São Paulo**, v. 21, p. 71–78, 2000.
- ALVES, A. M. et al. Avaliação química e física de componentes do baru (*Dipteryx alata* Vog.) para estudo da vida de prateleira. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 40, n. 3, p. 266–273, 2010.
- AMEDIE, F. A. **Impacts of Climate Change on Plant Growth , Ecosystem Services , Biodiversity , and Potential Adaptation Measure**. [s.l.] University of Gothenburg, 2013.
- ARAKAKI, A. H. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa rica em cobre e zinco por fermentação submersa utilizando leveduras isoladas do Baru (*Dipteryx alata* Vog.) e testados em resíduos da agroindústria brasileira**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2010.
- ARRUDA, F. B.; GRANDE, M. A. Fator de resposta da produção do cafeeiro ao deficit hídrico em Campinas. **Bragantia**, v. 62, n. 1, p. 139–145, 2003.
- AVRAMOVA, Z. Transcriptional “memory” of a stress: Transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. **the Plant Journal**, v. 83, n. 1, p. 149–159, 2015.
- BACKHAUS, S. et al. Recurrent Mild Drought Events Increase Resistance Toward Extreme Drought Stress. **Ecosystems**, v. 17, n. 6, p. 1068–1081, 2014.
- BAI, J. et al. Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. **Photosynthetica**, v. 46, n. 2, p. 232–237, 2008.
- BALTZER, J. L. et al. The role of desiccation tolerance in determining tree species distributions along the Malay-Thai Peninsula. **Functional Ecology**, v. 22, n. 2, p. 221–231, 2008.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BASSINE, F. **Caracterização de populações de barueiros (*Dipteryx alata* Vog. - Fabaceae) em ambientes naturais e explorados**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2008.
- BASU, S. et al. Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 1554, 2016.
- BATES, L. S., WALDREN, R & TEARE, I. . D. **Rapid determination of free proline for water stress studies** **Plant and Soil**, 1973.
- BELO, E. DOS S. **Efeito do estresse hídrico no metabolismo de gabirobeira**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2011.
- BORLAUG, N. E. Feeding a World of 10 Billion People: The Miracle Ahead. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, v. 38, n. 2, p. 221–228, 2002.
- BRODRIBB, T. J.; HOLBROOK, N. M. Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. **Plant Physiol**, v. 132, n. 4, p. 2166–2173, 2003.
- BRODRIBB, T.; HOLBROOK, N. **Changes in leaf hydraulic conductance during leaf shedding in seasonally dry tropical forest**. [s.l.: s.n.]. v. 158
- BULHÃO, C. F.; FIGUEIREDO, P. S. Fenologia e estratégias reprodutivas das espécies arbóreas em uma área marginal de cerrado, na transição para o semi-árido no nordeste do Maranhão,. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 361–369, 2002.
- CAI, Y. et al. Photosynthetic Response of an Alpine Plant , *Rhododendron delavayi* Franch , to Water Stress and Recovery : The Role of Mesophyll Conductance. **Frontiers**

in **Plant Science**, v. 6, n. 1, p. 10, 2015.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, n. 3, p. 463–468, 1991.

CAMPOS, M. P. **Comportamento morfofisiológico de plantas jovens de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) submetidas ao déficit hídrico**. [s.l.] Universidade Federal de São João Del Rei, 2016.

CARILLO, P.; GIBON, Y. **PROTOCOL : Extraction and determination of proline**. Disponível em: <09/tiki-pagehistory.php?page=Extraction and determination of proline&preview=14>. Acesso em: 3 fev. 2018.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, v. 113, n. 1, p. 484–490, 1985.

CHAVARRIA, G.; DOS SANTOS, H. P. Plant Water Relations: Absorption, Transport and Control Mechanisms. In: MONTANARA, G. (Ed.). . **Advances in Selected Plant Physiology Aspects**. 1. ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 105–132.

CHOUDHARY, R.; SAROHA, A. E.; SWARNKAR, P. L. Effect of abscisic acid and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes in *Syzygium cumini* plant. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 649–652, 2012.

CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2006.

CORDEIRO, S. A.; SOUZA, C. C.; MENDONZA, Z. M. S. H. Florestas brasileiras e as mudanças climáticas. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 11, n. 11, p. 1–20, 2008.

CRAWLEY, M. J. Life History and Environment. In: CRAWLEY, M. J. (Ed.). . **Plant Ecology**. 2. ed. Oxford - UK: Blackwell Publishing Ltd., 2009. p. 73–131.

CRISP, P. A. et al. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science Advances**, v. 2, n. 2, p. 1–14, 2016.

DAVIDSON, A.; PROMETHEUS, W. CONTRIBUTORS. **Measuring leaf perimeter and leaf area**. Disponível em: </tiki-pagehistory.php?page=Measuring leaf perimeter and leaf area&preview=27>. Acesso em: 6 abr. 2018.

DE KAUWE, M. G. et al. A test of the “one-point method” for estimating maximum carboxylation capacity from field-measured, light-saturated photosynthesis. **New Phytologist**, v. 210, n. 3, p. 1130–1144, 2016.

DE MATTOS, E. A.; LOBO, P. C.; JOLY, C. A. Overnight rainfall inducing rapid changes in photosynthetic behaviour in a cerrado woody species during a dry spell amidst the rainy season. **Australian Journal of Botany**, v. 50, n. 2, p. 241–246, 2002.

DIAZ, P.; BORSANI, O.; MONZA, J. Acumulacion de prolina en plantas en respuesta al estres osmotico. **Agrociencia**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 1999.

DUBOIS, M. et al. A colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 4265, n. 1, p. 67, 1951.

FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: effects , mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag (Germany)**, v. 29, n. 1, p. 185–212, 2009.

FLETA-SORIANO, E.; MUNNÉ-BOSCH, S. Stress Memory and the Inevitable Effects of Drought: A Physiological Perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. February, p. 143, 2016.

FLEXAS, J. et al. The effects of drought in plant respiration. In: LAMBERS, H.; RIBAS-CARBO, M. (Eds.). . **Plant Respiration. Advances in Photosynthesis and Respiration**. 18. ed. .ETHERLANDS: Springer, 2005. p. 85–94.

FLEXAS, J. et al. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by

- decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. **New Phytologist**, v. 172, p. 73–82, 2006.
- FLEXAS, J. et al. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 8, p. 2361–2377, 2009.
- FRANÇA, P. H. T. DE et al. Análise fisiológica em mudas de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) submetidas ao déficit hídrico. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 13, n. 4, p. 264–269, 2017.
- FRANKS, P. J.; DRAKE, P. L.; BEERLING, D. J. Plasticity in maximum stomatal conductance constrained by negative correlation between stomatal size and density: An analysis using *Eucalyptus globulus*. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, n. 12, p. 1737–1748, 2009.
- FRANKS, P. J.; FARQUHAR, G. D. The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. **Plant physiology**, v. 125, n. February, p. 935–942, 2001.
- GADJEV, I.; STONE, J. M.; GECHEV, T. S. Programmed Cell Death in Plants. New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide. In: JEON, K. W. (Ed.). **International Review of Cell and Molecular Biology**. 1. ed. San Diego - USA: Elsevier Inc., 2008. v. 270p. 87–144.
- GAY, C.; GEBICKI, J. M. A Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric–Xylenol Orange Hydroperoxide Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 284, n. 2, p. 217–220, 2000.
- GHASHGHAIE, J. et al.  $\delta^{13}\text{C}$  of CO<sub>2</sub> respired in the dark in relation to  $\delta^{13}\text{C}$  of leaf metabolites: Comparison between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 5, p. 505–515, 2001.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases, Occurrence in higher plants. **Plant Physiol**, v. 59, n. 1, p. 6, 1977.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian Forest Birds. **Science**, v. 165, n. 3889, p. 131 LP-137, 11 jul. 1969.
- HÄMMERLE, I. N. C. **Ecofisiologia comparativa de espécies arbóreas de cerrado stricto sensu e mata de galeria**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2006.
- INPE, I. N. DE P. E. Mudanças Climáticas Globais e Efeitos sobre a Biodiversidade Sub projeto: Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do Século XXI Sumário Técnico. **Sumário Técnico CPTEC INPE**, v. 4, n. 1, p. 6, 2007.
- JENSEN, W. A. Botanical Microtechnique and Cytochemistry. John E. Sass, Graeme P. Berlyn, Jerome P. Miksche. **The Quarterly Review of Biology**, v. 52, n. 4, p. 431, 1 dez. 1977.
- KINOSHITA, T.; SEKI, M. Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 11, p. 1859–1863, 2014.
- KNIGHT, H.; BRANDT, S.; KNIGHT, M. R. A history of stress alters drought calcium signalling pathways in *Arabidopsis*. **the Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 681–687, 1998.
- KOOTEN, O. VAN; SNEL, J. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, n. 3, p. 147–150, 1990.
- KUO, M. C.; KAO, C. H. Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Rice Leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 1, p. 149–152, 2003.
- KURSAR, T. A. et al. Tolerance to low leaf water status of tropical tree seedlings is related to drought performance and distribution. **Functional Ecology**, v. 23, n. 1, p. 93–102, 2009.
- LACERDA, F.; NOBRE, P. Aquecimento global: conceituação e repercussões sobre o

- Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 3, n. 1, p. 14–17, 2010.
- LÄMKE, J.; BÄURLE, I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.
- LARCHER, W. **Physiological Plant Ecology**. 4. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1983.
- LE, A. et al. Stomatal Responses to Drought Stress and Air Humidity. In: SHANKER, A.; VENKATESWARLU, B. (Eds.). . **Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaption**. 1. ed. [s.l.] InTech, 2011. p. 265–280.
- LI, J. et al. Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 1, p. 82–88, 2017.
- LI, X.; LIU, F. Drought Stress Memory and Drought Stress Tolerance in Plants: Biochemical and Molecular Basis. In: HOSSAIN, M. A. (Ed.). . **Drought Stress Tolerance in Plants**. 1. ed. Switzerland: Springer International, 2016. v. 1p. 17–45.
- LIU, C. et al. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 2, p. 174–183, 2011.
- LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Plant Growth Regulation**, v. 19, n. 3, p. 207–218, 1996.
- MACENA, F. et al. Clima do Bioma Cerrado. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (Eds.). . **Agricultura Tropical**. 1. ed. Brasilia - DF: Agricultura Tropical, 2008. p. 56.
- MARTINS, C. A. DA S. et al. Crescimento e produção do feijoeiro comum cultivado sob déficit hídrico. **Water Resources and Irrigation Management**, v. 6, n. 1, p. 95–106, 2017.
- MARTINS, S. C. V. et al. Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: Bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2014.
- MCDONALD, M. . Preparation of stomatal impressions from leaf epidermis using a cellulose acetate “peel” technique. **Laboratory practice**, v. 26, n. 9, p. 691–697, 1977.
- MCDOWELL, N. et al. Mechanisms of Plant Survival and Mortality during Drought : Why Do Some Plants Survive while Others Succumb to Drought ? **New Phytologist**, v. 178, n. 4, p. 719–739, 2008.
- MENEZES-SILVA, P. E. et al. Wood density, but not leaf hydraulic architecture, is associated with drought tolerance in clones of *Coffea canephora*. **Trees**, v. 29, n. 6, p. 1687–1697, 2015.
- MENEZES-SILVA, P. E. et al. Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 15, p. 4309–4322, 2017.
- MITCHELL, P. J. et al. Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. **New Phytologist**, v. 197, n. 3, p. 862–872, 2013.
- MOSQUETTA, R. et al. Uso de amêndoas de Baru (*Dypterix alata*) para remoção de Ni (II) em etanol combustível. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 923–927, 2011.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–8, 2000.
- NASA. **Dioxide de Carbon Concentration**. Disponível em: <<https://climate.nasa.gov/>>. Acesso em: 28 fev. 2018.

- NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **AGRARIAN ACADEMY**, v. 1, n. 1, p. 234–250, 2014.
- NISHIYAMA, Y. et al. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 20, p. 5587–5594, 2001.
- NOBRE, C. A.; REID, J.; VEIGA, A. P. S. **Fundamentos Científicos das Mudanças Climáticas**. 1. ed. Brasília - DF: INPE, 2012.
- NUNES-NESE, A. et al. Enhanced Photosynthetic Performance and Growth as a Consequence of Decreasing Mitochondrial Malate Dehydrogenase Activity in Transgenic Tomato Plants. **Plant Physiology**, v. 137, n. 2, p. 611–622, 2005.
- OGLE, K.; BARBER, J. J. Plant and Ecosystem Memory. **Chance**, v. 29, n. 2, p. 16–22, 2016.
- OLIVEIRA, E. T. DE; RUTKOWSKI, E. W. **Mudanças Climáticas e Mudanças Socioambientais Globais : reflexões sobre alternativas de futuro**. 1. ed. Brasília - DF: [s.n.].
- OSAKABE, Y. et al. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. March, p. 1–8, 2014.
- PALHARES, D.; FRANCO, A. C.; ZAIDAN, L. P. Respostas fotossintéticas de plantas do cerrado nas estações seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 2, p. 213–220, 2010.
- PÁPISTA, É.; ACS, E.; BÖDDI, B. Chlorophyll-a determination with ethanol—a critical test. **Hydrobiologia**, v. 485, n. 1, p. 191–198, 2002.
- PASSIOURA, J. B. **Environmental biology and crop improvement**. [s.l.: s.n.]. v. 29
- PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.
- PEREIRA, B. A. DA S.; VENTUROLI, F.; CARVALHO, F. A. Florestas Estacionais No Cerrado: Uma Visão Geral. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 3, p. 446–455, 2011.
- PESSOA, Y. M. DE P. **Crescimento inicial de espécies arbóreas em substrato impactado por resíduo industrial alcalino rico em zinco**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- QUINTÃO SCALON, S. DE P.; MUSSURY, R. M.; DE MELLO EUZÉBIO, VERUSCA LUZIA KODAMA, FLAVIA MITSUKO KISSMANN, C. Estresse hídrico no metabolismo e crescimento inicial de mudas de mutambo (*Guazuma ulmifolia* Lam.). **Ciência Florestal**, v. 21, n. 4, p. 655–662, 2011.
- RAMÍREZ, D. A. et al. Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. **Plant Science**, v. 238, p. 26–32, 2015.
- RESENDE, M. DE L. F.; GUIMARÃES, L. DE L. **Inventários da biodiversidade do bioma cerrado: biogeografia de plantas**. 1. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2007.
- RONQUIM, C. C.; CONCEIÇÃO, A. F. Ecofisiologia de espécies arbóreas jovens de cerrado. **VIII Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas**, v. 1, n. 1, p. 21–23, 2011.
- SACK, L. et al. Leaf palmate venation and vascular redundancy confer tolerance of hydraulic disruption. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1567–1572, 2008.
- SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit Hídrico e o Processos Morfológicos e Fisiológicos das Plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287–294, 1998.
- SCHEFFER, M. et al. Catastrophic shifts in ecosystems. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 591–

596, 2001.

SCOFFONI, C. et al. Decline of Leaf Hydraulic Conductance with Dehydration: Relationship to Leaf Size and Venation Architecture. **Plant Physiology**, v. 156, n. 2, p. 832–843, 2011.

SERVILLO, L. et al. Proline Derivatives in Fruits of Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poit): Presence of N-Methyl-l-proline and 4-Hydroxy-l-Prolinebetaine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 274–281, 12 jan. 2011.

SILVA, P. E. M. et al. The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: Implications for breeding aimed at improving drought tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 87, n. October, p. 49–57, 2013.

SILVA, A. A. DA. **Estudo da resistência à seca em soja: avaliações fisiológicas, metabólicas e moleculares**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2017.

SILVA, A. C. DA. **Ácido Salicílico como atenuador de estresse hídrico nas fases de germinação e crescimento inicial em Gergelim**. [s.l.] Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa, 2015.

SILVA, M. L. DA. A Dinâmica de Expansão e Retração de Cerrados e Caatingas no Período Quaternário: Uma Análise Segundo a Perspectiva da Teoria dos Refúgios e Redutos Florestais. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p. 57–73, 2011.

SIMONIN, K. A. et al. Increasing leaf hydraulic conductance with transpiration rate minimizes the water potential drawdown from stem to leaf. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 5, p. 1303–1315, 2015.

SOBREIRO, M. B. **Expressão gênica diferencial de quatro espécies da Aliança Tabebuia em resposta ao deficit hídrico**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás - UFG Instituto, 2017.

SOUROUR, A. et al. A review: Morphological, physiological, biochemical and molecular plant responses to water deficit stress. **The International Journal Of Engineering And Science**, v. 6, n. 1, p. 1–4, 2017.

SOUZA, E. B. DE; MANZI, A. O. Mudanças Ambientais de Curto e Longo prazo: Projeções, Reversibilidade e Atribuição. In: AMBRIZZI, T.; ARAUJO, M. (Eds.). **Base científica das mudanças climáticas**. 1. ed. Brasília - DF: COPPE - UFRJ, 2014. p. 30.

STOCKER, T. F. et al. **IPCC - Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. 1. ed. Switzerland: Intergovernmental Panel on Climate Change, 2013.

TABASSUM, M. A. et al. Influence of leaf vein density and thickness on hydraulic conductance and photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) during water stress. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–9, 2016.

TYREE, M. T.; ENGELBRECHT, BETTINA, M.J. VARGAS, G.; KURSAR, T. A. Desiccation Tolerance of Five Tropical Seedlings in Panama. Relationship to a Field Assessment of Drought Performance. **Plant Physiology**, v. 132, n. 3, p. 1439–1447, 2003.

VIÇOSI, K. A. et al. Estresse hídrico simulado em genótipos de feijão, milho e soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 1, p. 36–42, 2017.

VIRLOUVET, L.; FROMM, M. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. **New Phytologist**, v. 205, n. 2, p. 596–607, 2015.

WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2006.

WALTER, J. et al. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 34–40, 2011.

WALTER, J. et al. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, n. 1, p. 3–8, 2013.



WEINHOLD, A. Transgenerational stress-adaption: an opportunity for ecological epigenetics. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 3, p. 3–9, 2018.

XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Plant responses to drought and rewatering. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 6, p. 649–654, 2010.

YONNY, M. E. et al. Development of a Novel, Sensitive, Selective, and Fast Methodology to Determine Malondialdehyde in Leaves of Melon Plants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, 2017.