



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO - CÂMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Rodovia Sul Goiana, km 01, Zona Rural – Rio Verde - GO
CEP: 75.901-970. Fones: (64) 3620-5641. Fax: (64) 3620-5640

LETICIA FERREIRA DE SOUSA

CONTRIBUIÇÃO DE COMPONENTES MORFOANATÔMICOS, HIDRÁULICOS,
BIOQUÍMICOS E HORMONAIIS NA ACLIMATAÇÃO A MÚLTIPLOS FATORES DE
ESTRESSES EM PLANTAS DE *Dipteryx alata*

RIO VERDE-GO
AGOSTO/2019

LETICIA FERREIRA DE SOUSA

CONTRIBUIÇÃO DE COMPONENTES MORFOANATÔMICOS, HIDRÁULICOS,
BIOQUÍMICOS E HORMONAIS NA ACLIMATAÇÃO A MÚLTIPLOS FATORES DE
ESTRESSES EM PLANTAS DE *Dipteryx alata*

Autora: Leticia Ferreira de Sousa
Orientadora: Dra. Fernanda S Farnese
Coorientador: Dr. Paulo E Menezes Silva
Coorientador: Dr. Adinan Alves da Silva
Coorientador: Dr. Juraci Alves de Oliveira

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-GO

AGOSTO/2019

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

Sousa, Leticia Ferreira de

S725c Contribuição de componentes morfoanatômicos,
hidráulicos, bioquímicos e hormonais na aclimação a
múltiplos fatores de estresses em plantas de
Dipteryx alata. / Leticia Ferreira de
Sousa; orientadora Fernanda dos Santos Farnese; co-
orientador Paulo Eduardo de Menezes Silva. -- Rio
Verde, 2019.
88 p.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e
Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2019.

1. Sinalização celular. 2. Etileno. 3. Fisiologia
vegetal. 4. Amido. 5. Falha hidráulica. I. Farnese,
Fernanda dos Santos, orient. II. Silva, Paulo
Eduardo de Menezes, co-orient. III. Título.



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia - Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Leticia Ferreira de Sousa

Matrícula: 2017202310840128

Título do Trabalho: Contribuição de componentes morfoanatômicos, hidráulicos, bioquímicos e hormonais na aclimação a múltiplos fatores de estresses em plantas de *Dipteryx alata*.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 30/10/2019

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde - GO, 30/10/2019.
O seguir

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura da orientadora

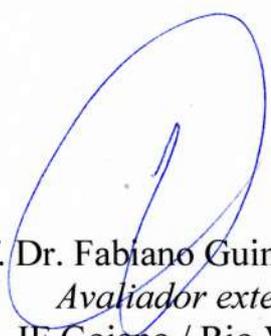
**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**CONTRIBUIÇÃO DE COMPONENTES
MORFOANATÔMICOS, HIDRÁULICOS, BIOQUÍMICOS E
HORMONAIIS NA ACLIMATAÇÃO A MÚLTIPLOS FATORES
DE ESTRESSE EM PLANTAS DE *DIPTERYX ALATA***

Autora: Leticia Ferreira de Sousa
Orientadora: Fernanda dos Santos Farnese

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

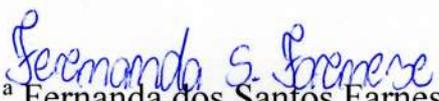
APROVADA em 30 de agosto de 2019.



Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
Avaliador externo
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Alan Carlos da Costa
Avaliador externo
IF Goiano / Rio Verde



Prof.ª Dr.ª Fernanda dos Santos Farnese
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde

AGRADECIMENTOS

A Deus,

“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.”

(Romanos 11:36)

Família,

Aos meus pais Nelson Camilo e Selma Regina, aos meus irmãos Priscila, Robison e Nelma e ao meu namorado Rafael pelos conselhos, incentivo e carinho. E aos meus sobrinhos, karolyne, Julia e Diogo, que, ainda tão pequenos, iluminaram de forma especial meus pensamentos em procurar evoluir sempre. Vocês são minha razão!

Instituições,

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde. À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Laboratórios,

Ao Laboratório de Fisiologia do Estresse Vegetal (Vicejar) / IFGoiano, pelos materiais, reagentes e equipamentos para condução do trabalho. Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal (LECO) / IFGoiano, coordenado pelo prof. Alan Carlos Costa que disponibilizou os equipamentos e a casa de vegetação.

Orientação e orientação,

Agradecimento especial a minha orientadora Fernanda dos Santos Farnese pela oportunidade, confiança, apoio e ensinamentos que foram essenciais para minha formação desde meu ingresso na iniciação científica e no mestrado. Aos meus orientadores, Adinan Alves da Silva, Paulo Eduardo de Menezes Silva e Juraci Alves de Oliveira, pelos ensinamentos, paciência e contribuições ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Equipe e amizades,

A equipe Vicejar, em especial aos colegas de laboratório Ana Paula, Maria Clara, Sabrina, Rauander e Lucas, pelos momentos de descontração, apoio, troca de conhecimentos e ajuda para a conclusão deste trabalho. E agradecimentos a Samylla e Esteffani, pelas amizades e incentivos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Leticia Ferreira de Sousa, natural de Diamantino -MT, filha de Nelson Camilo de Sousa e Selma Regina Ferreira de Sousa, nasceu em 27 de julho de 1992. Coursou ensino fundamental e médio em escolas públicas.

No primeiro semestre de 2012, ingressou no curso de graduação de Licenciatura em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

Pela mesma instituição, no segundo semestre de 2017 iniciou seu *Stricto sensu* - Mestrado em Biodiversidade e Conservação, concluindo-o em agosto de 2019.

ÍNDICE

Índice de figuras e tabelas	vi
Lista de símbolos, siglas e abreviaturas	ix
Resumo geral	1
General Abstract	3
1.Introdução geral	4
2. Referências bibliográficas	6
Capítulo 1	8
Resumo	9
Abstract	10
1. Introdução	11
2. Objetivos	14
2.1. Geral	14
2.2. Específicos	14
3. Material e métodos	15
3.1 Relações hídricas	16
3.2 Parâmetros morfológicos	17
3.3 Análises fisiológicas	17
3.4 Análises bioquímicas	18
3.5 Análises estatísticas	20
4. Resultados	20
5. Discussão	28
6. Conclusão	32
5. Referências bibliográficas	33
Capítulo 2	38
Resumo	39
Abstract	40
1. Introdução	41
2. Objetivos	44
2.1. Geral	44
2.2. Específicos	44
3. Material e métodos	45
3.1. Condições de cultivo e exposição aos tratamentos	45
3.2 Relações hídricas	45
3.3 Parâmetros fisiológicas	46
3.4 Análises bioquímicas	47
3.5 Análises estatísticas	49
4. Resultados	49
5. Discussão	58
6. Conclusão	61
7. Referências bibliográficas	62
Capítulo 3	67
Resumo	68
Abstract	69
2. Introdução	70
2. Objetivos	73
2.1. Geral	73
2.2. Específicos	73
3. Material e métodos	73
3.1. Condições experimentais e imposição dos tratamentos	73

3.2. Metabolismo do carbono	74
3.3. Caracterização da percentagem da abscisão foliar	75
3.4. Determinação da condutância cuticular mínima (<i>g_{min}</i>)	75
3.5. Relações hídricas	76
3.6. Densidade de venação	76
3.7 Análises estatísticas	76
4. Resultados	77
5. Discussão	81
6. Conclusão	84
5. Referências bibliográficas	85

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Potencial hídrico da antemanhã (Ψ_{am}) (A), potencial hídrico da meio-dia (Ψ_{md}) (B), potencial osmótico (Ψ_s) (C), teor de prolina (D), taxa transpiratória (E) (E), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 14

Figura 2 – Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (A), rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{PSII}) (B), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (C), quenching fotoquímico (qP) (D), fluorescência mínima (F_0) (E), quenching não fotoquímico (NPQ) (F), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 16

Figura 3 – Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) (C), eficiência de carboxilação (A/C_i) (D) e eficiência no uso da água (A/E) (E), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 17

Figura 4 – Clorofila a (A), Clorofila b (B), clorofila total ($Chla+Chlb$) (C), razão entre a clorofila a e b ($Chla/Chlb$) (D) e carotenoides (E), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 19

Figura 5 – Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (A), malondealdeído (MDA) (B), superóxido dismutase (C), peroxidase (D), ascorbato peroxidase (E) glutationa redutase (F), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 20

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Potencial hídrico da antemanhã (Ψ_{am}) (A), potencial hídrico da meio-dia (Ψ_{md}) (B), potencial osmótico (Ψ_s) (C), teor de prolina (D) e taxa transpiratória (E) (E), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca

de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 43

Figura 2 – Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) (C), razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) (D) e respiração noturna (R_n) (E), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 45

Figura 3 - Fotorrespiração (R_p) (A), taxa de carboxilação da Rubisco (ETR_c) (B) e taxa de oxigenação da Rubisco (ETR_o) (C), razão entre a taxa de carboxilação sobre a taxa de oxigenação da Rubisco (ETR_c/ETR_o) (D), razão entre a taxa fotorrespiratória sobre a fotossintética (R_p/A) (E) e taxa de respiração diurna sobre a fotossíntese (R_d/A) (F), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 47

Figura 4 – Área foliar específica (AFE) (A), clorofila a (B), clorofila b (C), clorofila total (Chl a+ Chl b) (D), razão entre a clorofila a e b (Chl_a/Chl_b) (E), carotenoides (F), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 49

Figura 5 – peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (A), malondealdeído (MDA) (B), superóxido dismutase (SOD) (C), ascorbato peroxidase (APX) (D), peroxidase (POX) (E), glutathione redutase (F), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade..... 50

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Condutância estomática (g_s) (A), condutância cuticular (g_{min}) (B), transpiração diária (C) e abscisão foliar (D). Médias seguidas pelo asterisco (*) ou por letras diferentes diferem entre si pelo teste T ou SNK, a 0,05% de probabilidade, respectivamente..... 71

Figura 2 –Potencial hídrico (Ψ_w) (A), condutividade hidráulica da planta (K_{plant}) (B), potencial hídrico no qual ocorreu perda de 50% condutividade (P_{50}) (C-D) e densidade de venação (E).

Gráfico de linhas: DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS).
Gráficos de barra: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH e DH+STS. Médias seguidas pelo asterisco (*) ou por letras diferentes diferem entre si pelo teste T ou SNK, a 0,05% de probabilidade, respectivamente..... 72

Figura 3 – Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), teor de amido no caule (B) e na raiz (C). Gráfico de linhas: DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Gráficos de barra: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH e DH+STS. Médias seguidas pelo asterisco (*) ou por letras diferentes diferem entre si pelo teste T ou SNK, a 0,05% de probabilidade, respectivamente..... 74

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Taxa fotossintética líquida
ABA – Ácido abscísico
A/Ci - Eficiência de carboxilação
A/E – Eficiência do uso da água
AF - Área foliar
AFE – Área foliar específica
ANOVA – Análise de variância
APX – Peroxidase do ascorbato
CC – Capacidade de campo
Chla+Chlb - Clorofila total
Chla/Chlb - Razão da a clorofila a/b
Ci – Concentração interna de CO₂
C_i/C_a - Concentração interna e externa de CO₂
Cl⁻ - Cloreto
CT – Controle
CT+STS - Plantas irrigadas e tratadas com 0,1 mM de tiosulfato de prata
DH – Déficit hídrico
DH+STS - Plantas submetidas à seca e tratadas com STS
DIC – Delineamento inteiramente casualizado
DTT – Ditiotreitól
E – Taxa transpiratória foliar
Ed – Transpiração diária
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
ETH – Etileno
ETR – Taxa de transporte de elétrons
ETRC - Taxa de elétrons para a carboxilação
ETRo - Taxa de transporte de elétrons para oxigenação
ETRC/ETRo - razão entre a taxa de carboxilação sobre a taxa de oxigenação da Rubisco
F₀ - Fluorescência mínima
F₀' - Fluorescência mínima após aclimação à luz actínica
F_m – Fluorescência máxima
F_m' – Fluorescência máxima à luz
F_v – Fluorescência variável
F_s – Fluorescência transiente
F_v/F_m – Rendimento quântico potencial do fotossistema II
F_v'/F_m' - Eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos
g_{min} – Condutância cuticular
GR – Glutathione redutase
g_s – Condutância estomática
GSSG – Glutathione dissulfeto/oxidada
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HP - Hipóxia
IPCC - Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
IV – Índice de vulnerabilidade
Jc - Fluxo de elétrons usado para carboxilação
Jo - Fluxo de elétrons usado para oxigenação
K_{plant} - Condutividade hidráulica da planta
MDA - Malondialdeído

Na⁺ - Sódio
NaCl - Cloreto de sódio
NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NaOH - Hidróxido de sódio
NBT - Azul de p-nitro tetrazólio
NFD - Número de folhas na data de avaliação
NFI - Número de folhas inicial
NPQ - Quenching não fotoquímico
OH⁻ - Radical hidroxila
O₂⁻ - Ânion superóxido
O₂ - Oxigênio
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfônico
POX - Peroxidase
PVPP - Polivinilpirrolidona
P₅₀ - Potencial hídrico no qual as plantas perderam 50% da sua condutividade
P₈₈ - Potencial hídrico no qual as plantas perderam 88% da sua condutividade
qP - Extinção fotoquímica
R_D - Respiração diária
R_N - Respiração noturna
ROS - Espécies reativas de oxigênio
R_p - Taxa fotorrespiratória
R_{d/A} - Taxa de respiração diurna sobre a fotossíntese
R_{p/A} - Taxa fotorrespiratória sobre a fotossintética
SAL - Salinidade
SISVAR - Sistema de Análises Estatísticas e Planejamento de Experimentos
SNK - Student Newman Keuls
SOD - Superóxido dismutase
STS - Tiosulfato de prata
TBA - Ácido 2-tiobarbitúrico
TCA - Ácido tricloroacético
Ψ_{am} - Potencial hídrico antemanhã
Ψ_{md} - Potencial hídrico meio-dia
Ψ_s - Potencial osmótico
ΔPV - Diferença do peso dos vasos
Δt - Intervalo de tempo
φ_{PSII} - Eficiência fotoquímica do transporte de elétrons associado ao fotossistema II

RESUMO GERAL

SOUSA, Leticia Ferreira de, M.Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano – Campus Rio Verde, agosto de 2019. **Contribuição de componentes morfoanatômicos, hidráulicos, bioquímicos e hormonais na aclimatação a múltiplos fatores de estresses em plantas de *Dipteryx alata*.** Orientadora: Dra. Fernanda dos Santos Farnese. Coorientadores: Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dr. Adinan Alves da Silva e Dr. Juraci Alves de Oliveira

O Cerrado é um dos principais biomas do Brasil, tanto em extensão territorial quanto em diversidade de espécies. De acordo com os modelos climáticos, as condições abióticas de diversas regiões do Brasil irão se alterar drasticamente em um futuro próximo, sobretudo em relação ao aporte de chuva em regiões onde o bioma Cerrado ocorre. Visando avaliar o impacto dessas alterações em uma planta nativa do Cerrado, plantas de baru (*Dipteryx alata*) foram submetidas a diversos fatores abióticos estressantes: déficit hídrico, salinidade e hipóxia. As plantas foram mais vulneráveis à salinidade e à hipóxia do que à seca, indicando tolerância da planta ao déficit hídrico, o que provavelmente está relacionado com sua história evolutiva. A fim de aprofundar o conhecimento sobre a tolerância de *D. alata* à seca, o papel do fitormônio etileno (ETH) foi avaliado. Para isso, um segundo experimento foi montado, no qual as plantas foram submetidas apenas ao déficit hídrico, sendo que metade das plantas foram aspergidas com um inibidor da ação do ETH. As plantas aspergidas com o inibidor ETH apresentaram maior condutância estomática, o que permitiu a manutenção de maior taxa fotossintética, mas, ao mesmo tempo, resultou em quedas no potencial hídrico. Plantas submetidas ao déficit hídrico isoladamente, por sua vez, mantiveram o potencial hídrico, mas apresentaram quedas na fotossíntese, na fotorrespiração e aumento na concentração de peróxido de hidrogênio. Cabe ressaltar que, embora plantas expostas à seca em combinação com o inibidor do ETH tenham apresentado maior fotossíntese, é provável que isso não se mantenha em secas mais prolongadas, uma vez que a manutenção dos estômatos abertos provavelmente resultaria em dessecação excessiva dos tecidos. Para testar essa hipótese, um terceiro experimento foi montado. Para isso, mudas de *D. alata* foram irrigadas até a capacidade de campo, sendo que metade delas recebeu solução contendo inibidor da ação do etileno. Em seguida, a fisiologia dessas plantas foi avaliada continuamente à medida que o solo secava ao longo dos dias, até a morte vegetal. Conforme esperado, plantas submetidas à seca em associação com o inibidor do ETH mantiveram seus estômatos abertos por mais tempo, o que resultou em danos celulares e morte precoce devido à falha hidráulica e à privação de carbono.

Palavras-chave: Sinalização celular, Etileno, Fisiologia vegetal, Seca, Mortalidade, Condutância estomática, Amido, Falha hidráulica.

GENERAL ABSTRACT

SOUSA, Leticia Ferreira de, M.Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano – Campus Rio Verde, August 2019. **Contribution of morphoanatomic, hydraulic, biochemical and hormonal components in acclimatization to multiple stress factors in *Dipteryx alata* plants.** Advisor: Dsc^a. Fernanda dos Santos Farnese. Coadvisor: Dsc. Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dsc. Adinan Alves da Silva and Dsc. Juraci Alves de Oliveira

The Cerrado is one of the main biomes in Brazil, both in territorial extension and species diversity. According to climate models, abiotic conditions in several regions of Brazil will change dramatically in the near future, especially in relation to rainfall in regions where the Cerrado biome occurs. In order to evaluate the impact of these changes on a native Cerrado plant, baru plants (*Dipteryx alata*) were subjected to several stressful abiotic factors: water deficit, salinity, and hypoxia. Plants were more vulnerable to salinity and hypoxia than to drought, indicating plant tolerance to water deficit, which is probably related to their evolutionary history. In order to deepen the knowledge of *D. alata* drought tolerance, the role of ethylene (ETH) was evaluated. For this, a second experiment was set up, in which the plants were subjected only to water deficit, and half of the plants were sprayed with an ETH action inhibitor. Plants sprayed with the ETH inhibitor showed higher stomatal conductance, which allowed the maintenance of a higher photosynthetic rate, but at the same time resulted in decreases in water potential. Plants subjected to water deficit alone, in turn, maintained water potential but showed decreases in photosynthesis, photorespiration and increased hydrogen peroxide concentration. It is noteworthy that although drought-exposed plants in combination with the ETH inhibitor showed higher photosynthesis, it is likely that this will not be sustained in longer droughts since keeping the stomata open would probably result in excessive tissue desiccation. To test this hypothesis, a third experiment was set up. For this, *D. alata* seedlings were irrigated to field capacity, and half of them received ethylene action inhibitor solution. Then the physiology of these plants was continuously evaluated as the soil dried over the days until plant death. As expected, plants subjected to drought in combination with the ETH inhibitor kept their stomata open for a longer period of time, resulting in cell damage and early death due to hydraulic failure and carbon deprivation.

Keywords: Cell signaling, Ethylene, Plant physiology, Drought, Mortality, Stomach conductance, Starch, Hydraulic failure.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As ações antrópicas na natureza ao longo das últimas décadas causaram uma série de desbalanços ambientais capazes de alterar significativamente a complexa dinâmica pluvial e térmica em todo o globo. Com efeito, diversos modelos climáticos preveem, já para as próximas décadas, um aumento significativo na frequência de eventos climáticos extremos, tais como ondas cada vez mais intensas de calor e seca, além de inundações mais frequentes e salinização do solo em determinadas regiões (IPCC, 2014). Dessa forma, caso as previsões de alterações climáticas se concretizem, espera-se que plantas de diferentes biomas passem a ser submetidas a diferentes tipos de estresses abióticos, como seca, alagamento e solos cada vez mais salinos, o que pode comprometer o crescimento e a conservação de espécies (Sano et al., 2019).

Dentre todos os fatores previstos para terem seus efeitos intensificados, o mais preocupante é a seca, uma vez que esse fator, juntamente com a temperatura, é o principal determinante da sobrevivência, distribuição e produtividade de espécies florestais em todo o mundo (Choat et al., 2018). Estudos de plantas submetidas à seca severa tem recebido muita atenção nos últimos anos (Wani et al. 2017; Xie et al., 2017; Zargar et al., 2017; Sousa et al., 2019). Regiões, particularmente nos trópicos, onde a taxa de evapotranspiração é superior a precipitação, os episódios de seca são notavelmente agravados pela alta radiação e altas temperaturas (DaMatta, 2003; DaMatta e Ramalho, 2006), que caracteriza a seca como um estresse multidimensional (DaMatta, 2003). Este estresse abiótico supera os danos desencadeados de todos os estresses bióticos e abióticos em conjunto (Flexas et al. 2009). A restrição hídrica altera o status hídrico da planta, como a redução do potencial hídrico e turgescência celular (Lisar et al., 2012). Em resposta a esses fatores, ao longo do período evolutivo por seleção natural, as plantas desenvolveram uma série de ajustes estruturais e funcionais para se adaptar ao meio (Brodrribb et al., 2014; Trueba et al. 2017). Com efeito, distintos órgãos estão intimamente relacionados aos aspectos centrais do metabolismo vegetal, bem como o balanço de carbono e o transporte hídrico (Martins et al., 2016; Tabassum et al. 2016). Dentre essas estruturas destacam-se os estômatos e vasos xilemáticos.

Existe um trade-off de estômatos com cavitação de vasos condutores do xilema. Conforme o solo vai secando, os estômatos regulam a perda de água e evitam o aumento ao máximo da pressão no xilema, dentro de um intervalo de tolerância do sistema hidráulico para a proteção do xilema à embolia (Meir e Woodward, 2010; Choat et al. 2012). Caso o reabastecimento da água transpirada não seja resposta, aumenta-se a tensão nos vasos xilemáticos que ocasiona a quebra da coluna d'água e formação de bolhas de ar por cavitação (Choat et al. 2012; Charrier et al., 2016; Trueba et al., 2017), porém este mecanismo não

representa uma estratégia efetiva de escape aos efeitos de seca severa, ao ponto que, a falha hidráulica desencadeará dano e dessecação tecidual que pode evoluir na morte vegetal (Choat et al. 2012; Grossiord et al., 2017). A resistência a embolia é caracterizada pela relação entre pressão do xilema e a perda da condutividade hidráulica (Choat et al. 2012), sendo assim, o P_{50} é um indicador de resistência à embolia mais comumente utilizado, que determina o valor do potencial hídrico (Ψ_w) no qual ocorre perda de 50% da condutividade hidráulica e o Ψ_w letal ocorre com a perda em cerca de 80-100% da condutividade (P_{88}) (Choat et al., 2018; Kursar et al., 2009; Urli et al., 2013). Assim, uma margem de segurança no fechamento estomático é necessária para evitar a falha do sistema hidráulico de plantas em condições de seca (Martin-StPaul et al., 2017). Um outro parâmetro determinante a vulnerabilidade à cavitação é a densidade de venação e condutividade hidráulica do xilema, intimamente relacionada abertura estomática e taxas fotossintéticas (Sack et al., 2008; Tabassum et al., 2016). A alta densidade de venação atribui numerosos vasos xilemáticos por unidade de área, favorecendo vias mais curtas da passagem de água até os estômatos (Alves, 2018). Mantém certa segurança hidráulica e contribui na manutenção do sistema hidráulico, propiciando menor ocorrência de cavitação (Scoffoni et al., 2011; Alves, 2018). Neste caso, o decréscimo no diâmetro dos vasos xilemáticos é levado em consideração em plantas submetidas à seca, acredita-se que o menor diâmetro contribui na menor ocorrência de falha hidráulica (Tabassum et al., 2016).

Os hormônios vegetais desempenham importantes funções na regulação de respostas a vários estímulos dentro da célula vegetal (Sarwat e Tuteja, 2017). Sendo que, o status hormonal muda enormemente nas plantas em exposição à seca (Osakabe et al., 2014). E sabe-se que uma das primeiras respostas das plantas submetidas à restrição hídrica consiste no fechamento estomático para reduzir as taxas transpiratórias (Martins et al., 2016; Sousa et al, 2019). E essa regulação da abertura estomática leva a participação dos fitormônios ácido abscísico (ABA) e o etileno (ETH) por sinalização celular (Sarwat e Tuteja, 2017; Santner e Estelle, 2009). O conhecimento tradicional documenta que o ABA atua como regulador positivo no fechamento estomático e o papel do ETH ainda é incerto, depende do tecido e de sua condição (revisão de Sarwat e Tuteja, 2017).

Diante do exposto, é fácil perceber que, nos anos vindouros, espera-se a ocorrência de alterações em diferentes aspectos do clima, o que pode expor espécies não adaptadas a diferentes estresses abióticos, como seca, salinidade e hipóxia, sendo que os maiores danos provavelmente ocorrerão após exposição à seca. Apesar disso, não se sabe ainda como espécies nativas do Cerrado brasileiro responderão à essas alterações, nem como os hormônios vegetais estarão envolvidos nesse processo.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, RDFB (2018) Memória a seca no cerrado: aclimação diferencial do baru (*Dipteryx alata* Vogel). Master Thesis, IF Goiano, GO. 48p.
- Brodrribb TJ, et al (2014) Conifer species adapt to low-rainfall climates by following one of two divergent pathways. **Proc Nat Acad Sci**, 111, 14489-14493.
- Charrier G, et al (2016) evidence for hydraulic vulnerability segmentation and lack of xylem refilling under tension. **Plant Phys**, 172: 1657–166.
- Choat B, et al (2018) Triggers of tree mortality under drought. **Nature**, 558(7711): 531–539.
- Choat B, et al (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. **Nature**, 4–8.
- DaMatta FM (2003) Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan A (ed), **Adv Plant Phys**, 5:227-265.
- DaMatta FM, Ramalho JDC (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Braz J Plant Phys**, 18(1):55-81.
- Flexas J, et al (2009) Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). **J Exp Bot**, 60: 2361–2377.
- Grossiord C, et al (2017) Precipitation, not air temperature, drives functional responses of trees in semi-arid ecosystems. **J Eco**, 105:163–175.
- IPCC (2014) Climate Change 2013 **The Physical Science Basis Report**, 107: 1535
- Kursar TA, et al (2009) Tolerance to low leaf water status of tropical tree seedlings is related to drought performance and distribution. **Funct. Ecol**. 23, 93–102.
- Lisar SYS, et al (2012) Water stress in plants: causes, effects and responses, in water stress; Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman Ed., InTech: New York, USA, 2012.
- Martins SCV, et al (2016) Stomatal dynamics are limited by leaf hydraulics in ferns and conifers: results from simultaneous measurements of liquid and vapour fluxes in leaves. **Plant Cell Environ**, 39:694–705.
- Martin-StPaul N, et al (2017) Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. **Ecol. Lett**, 20: 1437–1447.
- Meir P, Woodward FI (2010) Amazonian rain forests and drought: response and vulnerability. **New Phytol**. 187:553–557.
- Osakabe Y, et al (2014) Response of plants to water stress. **Front Plant Sci**, 1338 (5):1–8.
- Sack L, et al. (2008) Leaf palmate venation and vascular redundancy confer tolerance of hydraulic disruption. **Proc Nat Aca Sci**, 105(5):1567–1572.
- Santner A, Estelle M (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, 459: 1071–1078.
- Sarwat M, Tuteja N. (2017) Hormonal signaling to control stomatal movement during drought stress. **Plant Gene**, 11:143–153.
- Scoffoni C et al (2011) Decline of Leaf Hydraulic Conductance with Dehydration: Relationship to Leaf Size and Venation Architecture. **Plant Phys**, 156(2):832–843.
- Sousa LF, et al (2019) Improving water use efficiency by changing hydraulic and stomatal characteristics in soybean exposed to drought: the involvement of nitric oxide. **Physiol Plant**, 3:1-15.
- Tabassum MA, et al (2016) Influence of leaf vein density and thickness on hydraulic conductance and photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) during water stress. **Sci Rep**, 6: 1–9.
- Trueba S, et al (2017) Vulnerability to xylem embolism as a major correlate of the environmental distribution of rain forest species on a tropical island. **Plant Cell Env** 40: 277–289.
- Urli M, et al. (2013) Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. **Tree Physiol**. 33:672–683.
- Wani SH, et al (2017) Transgenic approaches to enhance salt and drought tolerance in plants. **Plant Gene**, 11: 219–231

Xie T, et al (2017) Exogenous DCPTA ameliorates simulated drought conditions by improving the growth and photosynthetic capacity of maize seedlings. **Sci Rep**, 7: 12684.

Zargar SM, et al (2017) Aquaporins as potential drought tolerance inducing proteins: towards instigating stress tolerance. **J Proteome**, 169: 233–238.

CAPÍTULO 1

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTRESSES ABIÓTICOS NOS PROCESSOS CENTRAIS DO METABOLISMO DE *Dipteryx alata*

RESUMO

SOUSA, Leticia Ferreira de, M.Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano – Campus Rio Verde, agosto de 2019. **Influência de estresses abióticos nos processos centrais no metabolismo de *Dipteryx alata***. Orientadora: Dra. Fernanda dos Santos Farnese. Coorientadores: Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dr. Adinan Alves da Silva e Dr. Juraci Alves de Oliveira

Cerrado, um dos hotspots da biodiversidade, abriga uma das maiores diversidades florísticas do planeta. Essa grande biodiversidade, no entanto, encontra-se ameaçada, uma vez que as ações antrópicas na natureza ao longo das últimas décadas têm causado uma série de desbalanços ambientais. De acordo com os modelos climáticos, as condições abióticas de diversas regiões do Brasil irão se alterar drasticamente em um futuro próximo, bem como, secas ainda mais intensas e aporte considerável na pluviosidade para algumas regiões, e aumento na concentração de sal no solo para outras. Caso as previsões se confirmem profundas alterações podem ocorrer nas comunidades vegetais. Diante disso, o presente estudo avaliou respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas da espécie *Dipteryx alata* submetidas à seca, alagamento e salinidade. Os estresses abióticos afetaram negativamente o metabolismo de *D. alata*, principalmente nos tratamentos de salinidade e hipóxia. É provável que estes resultados reflitam a história evolutiva desta espécie que ao longo dos anos por pressão seletiva conseguiram se adaptar em locais onde a seca é um evento frequente, como em biomas cerrado e caatinga. Tais resultados aprofundou o conhecimento de como essa espécie responde a diversos fatores de estresses abióticos que não só contribuirá para a preservação da espécie, mas também para projetos de programas de reflorestamento.

Palavras-chave: Estresse hídrico, Seca, Hipóxia, Salinidade, Relações hídricas, Fisiologia vegetal, Bioquímica, Danos celulares.

ABSTRACT

SOUSA, Leticia Ferreira de, M.Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano – Campus Rio Verde, august 2019. **Influence of abiotic stresses on central processes in *Dipteryx alata* metabolism.** Advisor: Dsc^a. Fernanda dos Santos Farnese. Coadvisor: Dsc. Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dsc. Adinan Alves da Silva and Dsc. Juraci Alves de Oliveira

Cerrado, one of the biodiversity hotspots, encompasses one of the largest floristic diversities on the planet. This great biodiversity, however, is under threat, as anthropic actions in nature over the last decades have caused a number of environmental imbalances. According to climate models, abiotic conditions in various regions of Brazil will change dramatically in the near future, as will even more intense droughts and considerable rainfall for some regions, and increase in soil salt concentration for others. If predictions are confirmed, profound changes can occur in plant communities. Therefore, the present study evaluated physiological and biochemical responses of *Dipteryx alata* plants submitted to drought, flooding and salinity. Abiotic stresses negatively affected *D. alata* metabolism, especially in salinity and hypoxia treatments. It is likely that these results reflect the evolutionary history of this species that over the years under selective pressure have been able to adapt in places where drought is a frequent event, such as in cerrado and caatinga biomes. These results deepened the knowledge of how this species responds to various abiotic stress factors that will not only contribute to the preservation of the species, but also to reforestation program projects.

Key words: Water Stress, Drought, Hypoxia, Salinity, Water Relations, Plant Physiology, Biochemistry, Cell Damage.

Influência de diferentes estresses abióticos nos processos centrais do metabolismo de *Dipteryx alata*

1. INTRODUÇÃO

O cerrado é um dos principais biomas do Brasil, tanto em extensão territorial quanto em diversidade de espécies. É considerado um hotspot de biodiversidade mundial e abrange uma das maiores diversidades florísticas do planeta, com mais de 12.000 espécies vegetais catalogadas, das quais estima-se que cerca de 11.627 sejam plantas vasculares, com elevado grau de endemismo (Resende e Guimarães, 2007; Brasil, 2015). Formado por um mosaico de formações vegetais que abrange cerca de 21% do território nacional, o cerrado ocupa 97% da superfície do estado de Goiás e é considerado a última fronteira agrícola do planeta (Walter, 2006; Lopes, 2016). Essa grande biodiversidade, no entanto, encontra-se ameaçada, uma vez que as ações antrópicas na natureza ao longo das últimas décadas têm causado uma série de desbalanços ambientais que, em curto prazo, podem alterar significativamente a complexa dinâmica pluvial e térmica em todo o globo. Com efeito, diversos modelos climáticos preveem, já para as próximas décadas, um significativo aumento na frequência de eventos climáticos extremos, tais como aumento de precipitação para algumas regiões e ondas cada vez mais intensas de calor e de seca para outras (IPCC, 2013).

De acordo com os modelos climáticos existentes, as condições abióticas de diversas regiões do Brasil irão se alterar drasticamente em um futuro próximo. Enquanto a maior parte do cerrado irá enfrentar secas ainda mais intensas, com redução de até 45% na precipitação até o fim deste século, alguns modelos climáticos apontam que pontos isolados deste bioma, como a região do triângulo mineiro, podem apresentar um aporte considerável na pluviosidade (Nobre et al., 2012). Caso essas previsões se confirmem, profundas alterações em diversas comunidades vegetais podem ser esperadas para as próximas décadas, já que o estresse hídrico, tanto por seca quanto por alagamento, interfere negativamente no crescimento e desenvolvimento das plantas. Em adição, as mudanças climáticas poderão afetar também a salinização do solo, o que pode ocorrer devido ao aumento no nível do mar (Teh e Koh, 2016; Daliakopoulos et al., 2016) ou como consequência do incremento da evapotranspiração em regiões áridas e semi-áridas, o que, associado com a diminuição da precipitação, irá aumentar a concentração de solutos presentes na solução do solo (Teh e Koh, 2016; Vaishnav, et al., 2019). Cabe ressaltar, ainda, que maior evapotranspiração acarreta maior demanda por água de irrigação, e técnicas inadequadas de irrigação (restrição da lixiviação e/ou aumento do lençol freático) e adubação (uso extensivo)

representam uma das formas mais comuns de salinização do solo (Moreira Barradas et al., 2014; Borrajo et al., 2018; Vaishnav, et al., 2019; Litalien e Zeeb, 2020).

É fácil perceber, portanto, que as alterações advindas das mudanças climáticas irão desencadear uma série de pressões ambientais que podem comprometer o crescimento, desenvolvimento, produtividade e sobrevivência de ecossistemas naturais e agrícolas.

Embora cada estresse abiótico altere a fisiologia vegetal de forma específica, os efeitos desencadeados por diferentes agentes estressores apresentam alguns pontos de convergência na célula vegetal, sendo o mais comum deles o incremento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS é um termo genérico usado para descrever espécies químicas formadas a partir da redução incompleta do oxigênio molecular, como é o caso do ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-) (Farnese et al., 2016). Devido a sua curta meia-vida e alta reatividade química, o acúmulo de ROS na célula vegetal frequentemente resulta em danos celulares, como a oxidação de proteínas e lipídeos de membranas, inibição de atividades enzimáticas e danos nos ácidos nucleicos (Miller et al. 2010; Choudhary et al., 2012). A manutenção dos níveis de ROS envolve a participação de enzimas antioxidantes, como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POX) e redutase da glutatona (GR) (Huang et al., 2013).

Em adição a geração de ROS, cada estresse abiótico desencadeia também alterações inerentes à natureza do estresse. Em relação ao déficit hídrico, por exemplo, é comum observar a redução na abertura estomática e na condutividade hidráulica (Choudhary et al., 2012; Cai et al., 2015), além de afetar aspectos relacionados à expansão da área foliar, abscisão foliar, absorção e transporte de água e nutrientes, dentre outros (Ferrari, et al., 2015; Bi et al., 2017; Demmig-Adams et al., 2018). Assim que estresse hídrico é detectado pelas plantas, diversos reguladores vegetais são metabolizados (Müller e Munné-Bosch, 2015), promovendo a modulação dos processos fisiológicos e de estruturas morfológicas e anatômicas a fim de manter a homeostase celular (Voesenek e Bailey-Serres, 2015; Li et al., 2017), tais como a regulação da abertura estomática, ajustamento osmótico e alterações na anatomia foliar relacionadas ao espessamento da cutícula, alteração no padrão de distribuição dos estômatos e aumento no número de tricomas epidérmicos, a fim de evitar a perda de água (Tang et al. 2002; Rossatto et al 2009; Fang e Xiong., 2014; Bi et al., 2017).

Não apenas o déficit hídrico, mas também o excesso de água é prejudicial ao desenvolvimento vegetal. Com efeito, o estresse por alagamento faz com que o sistema radicular experiencie um ambiente hipóxico, ou seja, um ambiente no qual ocorre a redução gradual nos níveis de O_2 livre na rizosfera (Bailey-Serres, 2005; Irfan et al. 2010; Sasidharan et al., 2018). A

redução na disponibilidade de O₂ compromete o metabolismo energético da célula (Carvalho, 2015) e desencadeia a mudança do metabolismo aeróbico para o fermentativo (Jackson e Ismail, 2015). Os efeitos causados pela hipóxia no tecido vegetal são diversos e geralmente afetam aspectos morfofisiológicos das plantas, como a alteração da permeabilidade radicular devido ao fechamento das aquaporinas, redução da abertura estomática, acidose citosólica, comprometimento da parede celular, dentre outras alterações que irão impactar diretamente a sobrevivência das plantas (Aldan et al. 2014; Paz et al., 2017). Apesar desses efeitos danosos, diversas plantas apresentam adaptações específicas que permitem a sobrevivência em ambientes alagados (van Dongen e Licausi, 2015; Pugh e Ratcliffe, 2017; Yamauchi et al, 2018), o que envolve a modulação de caracteres funcionais como a formação de aerênquimas, lenticelas, epinastia foliar, raízes adventícias e pneumatóforos (Sandalio et al., 2016; Melo et al., 2017; Taiz et al, 2017; Striker et al., 2017;), além da eliminação de compostos tóxicos produzidos durante o processo fermentativo (Pangala et al., 2014; Voesenek e Bailey-Serres, 2015).

A salinização do solo, por sua vez, expõe as plantas a um excesso de íons na região radicular, particularmente sódio (Na⁺) e cloreto (Cl⁻), o que desencadeia dois tipos de estresses: i) estresse osmótico, uma vez que a alta concentração de sais limita a absorção de água, o que faz com que a planta se comporte como se estivesse em estresse hídrico; ii) e a toxicidade iônica, a qual é desencadeada pelo acúmulo de Na⁺ e Cl⁻ nos tecidos vegetais, gerando um ambiente tóxico no qual a planta não consegue manter a homeostase celular (Vaishnav et al., 2019). O estresse osmótico e a toxicidade iônica podem ser considerados como estresses primários, os quais, por sua vez, desencadeiam uma série de outras alterações, como inativação enzimática e aumento na fotorrespiração (Liang et al., 2018). Como resultado, processos fisiológicos centrais são comprometidos, como ocorre com a fotossíntese, que pode ser afetada tanto pelo fechamento estomático em resposta ao estresse osmótico (Hniličková et al., 2017), quanto por fatores não estomáticos, incluindo danos ao fotossistema II (PSII) e degradação da clorofila (Mittal et al., 2012; Parihar et al., 2015). Respostas adaptativas ao estresse salino são controladas por cascatas de sinalização celular e incluem a exclusão e compartimentalização de íons, fechamento estomático e acúmulo de osmólitos compatíveis (Zhang et al., 2016; Vaishnav, et al., 2019).

O Baru (*Dipteryx alata*), pertencente à família Fabaceae e subfamília Faboideae, é uma espécie nativa arbórea amplamente distribuída no cerrado, apresentando grande importância econômica. Essa espécie pode alcançar mais de 25 metros de altura, apresentando folhas alternadas, compostas, pinadas, pecioladas com ráquis alada e com aproximadamente 7 a 12 folíolos alternos ou subopostos (Sano et al., 2016). Contém uma semente com endocarpo lenhoso e uma amêndoa comestível, na qual predominam proteínas com considerável teor de

aminoácidos essenciais (Collevatti et al., 2010; Souza e Silva, 2015). A amêndoa contém, ainda, vários compostos fenólicos e alta atividade antioxidante, sendo muito utilizada na proteção de tecidos contra o estresse oxidativo (Siqueira et al., 2012; Fetzer et al., 2018). Assim, a importância comercial de *D. alata* inclui produtos alimentícios, medicinais, madeireiro e forrageiro (Pineli et al., 2015; Rocha, 2016), além de ser considerada uma espécie com grande potencial para o reflorestamento de áreas degradadas (Silva 2017; Ferreira et al., 2018). Apesar disso, no entanto, existem poucos estudos avaliando o impacto de estresses abióticos sobre a fisiologia de *D. alata*, o que pode comprometer não apenas a conservação da espécie, mas também projetos de reflorestamento que utilizem a *D. alata*, principalmente quando consideramos as mudanças do clima esperadas para os próximos anos.

Diante do exposto, fica claro que, embora apresentem mecanismos de ação diversos, os diferentes tipos de estresses abióticos resultam no comprometimento do crescimento e da sobrevivência das espécies vegetais. Dessa forma, eventos de seca, alagamento ou salinização de solos em decorrência das mudanças climáticas ou de atividades antrópicas podem provocar a morte e até a substituição de espécies dentro dos biomas. Por conseguinte, estudar e conhecer as respostas das plantas aos estresses abióticos, utilizando como modelo uma planta nativa do Brasil, a *D. alata*, é importante e representa o primeiro passo para buscar e propor estratégias de conservação. Com efeito, a elaboração e implantação de programas de manejo e reflorestamento de comunidades vegetais, dentro do contexto atual e futuro de mudanças climáticas, requer amplo conhecimento dos diferentes mecanismos e estratégias utilizadas pelas plantas frente às mais diversas situações de estresse. Assim sendo, neste estudo avaliou-se as respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas da espécie *D. alata* submetidas à seca, alagamento e salinidade, testando a hipótese de que diferentes estresses abióticos irão afetar a espécie com diferentes intensidades.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas de *Dipteryx alata* exposta à seca, alagamento e salinidade.

2.2. Específicos

- Avaliar o efeito da seca, hipóxia e salinidade sobre as relações hídricas vegetais.
- Analisar a vulnerabilidade de *D. alata* exposta à seca, hipóxia e salinidade.

- Verificar o efeito dos estresses abióticos em processos fisiológicos e bioquímicos em *D. alata*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com proteção de sombrite 50% nas laterais e em cobertura de lona plástica transparente a 2,50 metros de altura, do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde – GO, Brasil (17°48'18.33" de latitude sul e 50°54'0.04" de longitude oeste e 748 m de altitude), durante os meses de novembro/2018 a janeiro de 2019. As mudas de Baru (*Dipteryx alata*) foram adquiridas em viveiro florestal na cidade de Rio Verde e foram selecionadas de acordo com o tamanho e a idade (4 meses), contendo no substrato fertilizante de lenta liberação Osmocote® (19-06-10) com tempo de liberação de 3 a 4 meses, cobertura via foliar de fosfato monoamônico (MAP) purificado (750 g por 100 L de água) a cada 15 dias. Sendo, posteriormente, transplantadas em citrovassos de 4 litros, com solo na proporção de 2:1 (solo de área não cultivada e areia), adubadas de acordo com a análise de solo e laudo de recomendação (solo adubado com 1,5 g de superfosfato simples (00-90-00), 0,2g de cloreto de potássio (00-00-40) e 0,2 de ureia (30-00-00) por vaso. A temperatura média e umidade relativa média durante o período de avaliação foi de 25°C e 60°C, respectivamente. Após 30 dias para aclimação às condições de cultivo, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: Controle (plantas irrigadas diariamente a fim de manter a capacidade de campo (CC)); Seca (suspensão gradual da irrigação, até que o solo atingir 30% da CC); Alagamento (plantas submetidas ao alagamento (água mantida 3cm acima do solo)); e Salinidade (plantas submetidas a 100mM de NaCl). Cada tratamento teve seis repetições. Para imposição da seca, permitiu-se que o solo secasse de forma natural e gradativa até atingir 30% da CC, sendo os vasos pesados diariamente. As plantas expostas à salinidade foram irrigadas diariamente com solução salina (100mM de NaCl), sendo o solo lavado com água corrente (destilada) periodicamente a cada 3 dias para lixiviar os sais, a fim de evitar o acúmulo de NaCl na solução do solo em uma concentração superior a 100 mM (Akas et al., 2006; Al-Khaliel, 2010). As plantas permaneceram nessas condições por 16 dias, sendo então utilizadas nas análises descritas a seguir.

3.1 Relações hídricas

3.1.1 Potencial hídrico

Avaliou-se o potencial hídrico, no período da antemanhã (05:00 h) (Ψ_{am}) e ao meio-dia (12:00) (Ψ_{md}), em folhas individuais de cada tratamento, com o auxílio de bomba de pressão tipo Scholander.

3.1.2 Potencial osmótico (Ψ_s)

O potencial osmótico foliar (Ψ_s) foi mensurado de acordo com Pask et al. (2012). As amostras foliares congeladas foram acondicionadas em seringas esterilizadas com trava de êmbolo e o suco celular foi extraído com a utilização de uma pipeta automática, sendo acondicionado em microtubos devidamente identificados. Uma alíquota de 10 μ L do suco celular foi utilizada para determinação da osmolaridade utilizando um osmômetro de pressão de vapor (modelo 5600; VAPRO). A determinação do Ψ_s foi realizada utilizando-se a equação de Van't Hoff:

$$\Psi_s = -R \times T \times C_s$$

Onde R é a constante universal dos gases (0.08205 L atm mol⁻¹K⁻¹), T é a temperatura em K (T K = T °C + 273) e C_s a concentração do soluto (M), usualmente expressa em atmosferas e convertida em MPa.

3.1.2 Transpiração

A transpiração diária (E_d) foi determinada na antemanhã (05:00) e ao meio dia (12:00), por método gravimétrico, através da diferença do peso dos vasos (Δ PV), sendo os vasos tampados com sacos plásticos para desconsiderar a transpiração do solo (Lima et al., 2006; Silva et al., 2013). O valor da pesagem 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 (Δ t), de acordo com a fórmula a seguir:

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

A transpiração também foi avaliada por um analisador de gases infravermelho portátil (IRGA, modelo LI-6800, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA).

3.2 Parâmetros morfológicos

3.2.1 Área foliar específica e Índice de vulnerabilidade

A determinação da área foliar específica (AFE) foi realizada de acordo com (Crawley, 2009), na qual as folhas foram coletadas, tiveram sua área determinada e foram mantidas em estufa convencional à 80°C até a obtenção do peso seco constante. A AFE foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

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

Para determinar a vulnerabilidade aos diferentes estresses, calculou-se o índice de vulnerabilidade (IV), o qual baseou-se em análises de diferentes parâmetros fisiológicos que refletem o metabolismo vegetal (F_v/F_m , ϕ_{PSII} , assimilação líquida de carbono, concentração de clorofilas totais e de malondialdeído), segundo proposto por Hairat e Khurana (2016).

3.3 Análises Fisiológicas

3.3.1 Avaliação dos parâmetros fotossintéticos

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram mensurados em todas as plantas, sendo a fluorescência mínima (F_0) obtida na antemanhã via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade (0,03 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A fluorescência máxima (F_m) foi obtida pela aplicação de um pulso de 0,8 s de luz act\u00ednica saturante (8000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel (F_v) foi determinada pela diferen\u00e7a entre F_0 e F_m e a partir desses valores, foi calculado o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II. As folhas foram aclimatadas \u00e0 luz act\u00ednica (1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante 60 s, a fim de se obter a fluoresc\u00eancia transiente (F_s), seguido por um pulso de luz saturante para estimar-se a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima \u00e0 luz ($F_{m'}$) e, por \u00faltimo, foi aplicado um pulso de luz vermelho-distante, para obten\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia m\u00ednima ap\u00f3s aclima\u00e7\u00e3o \u00e0 luz act\u00ednica ($F_{0'}$). Com esses par\u00e2metros, foram calculados os coeficientes de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica (qP), a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do transporte de el\u00e9trons associado ao fotossistema II (ϕ_{FSII}) e a efici\u00eancia de captura de energia de excita\u00e7\u00e3o pelos centros de rea\u00e7\u00e3o abertos ($F_v/F_{m'}$), conforme (Maxwell e Johnson, 2000).

A taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida do carbono (A), a condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s), a concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 (C_i) e a taxa transpirat\u00f3ria (E) foram determinadas em sistema aberto, sob luz saturante (1.000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e press\u00e3o parcial de CO_2 de 40 Pa. Para tanto,

utilizou-se um analisador de gases a infravermelho (LI-6800, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6800, LI-COR).

3.3.2. Teor de pigmentos cloroplastídicos

Para análise da concentração de clorofilas e carotenoides, aproximadamente 0,3g de amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido com acetona 80%. Após a maceração realizou-se a filtragem em papel filtro e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA) nos comprimentos de onda 663, 645, 652 e 470 nm. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ de massa de matéria seca (MS) (Arnon, 1949).

3.4 Análises Bioquímicas

3.4.1 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas células foi realizado por meio da metodologia proposta por Kuo e Kao (2003). Para determinação da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), a concentração de H₂O₂ foi quantificada macerando-se aproximadamente 0,25g de tecidos foliares em nitrogênio líquido. O tecido foliar foi homogeneizado em meio de extração composto por tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4°C (Kuo e Kao, 2003). O volume de 100 µL do sobrenadante foi adicionado a 250 µM de meio de reação contendo FeNH₄SO₄, 25 mM de ácido sulfúrico, 250 µM de laranja de xilenol e 100 mM de sorbitol (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram incubadas no escuro durante 30 minutos e a leitura da absorbância determinada em espectrofotômetro UV-VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA) a 560 nm. Estimou-se as concentrações do H₂O₂ com base em curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂ e normalizadas em função do peso das amostras.

3.4.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica

O dano oxidativo nas membranas celulares foi estimado pela quantificação de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso na forma de malonaldeído (MDA) (Cakmak e Horst, 1991). Para isso, macerou-se aproximadamente 0,25g de tecidos foliares com o auxílio de nitrogênio líquido, sendo o tecido homogeneizado em 2ml de solução contendo 0,1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) em conjunto com 20% de polivinilpirrolidona (PVPP). O

homogenato foi então centrifugado a 15.000 x g por 15 min a 4°C. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada 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. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 15000 x g por 15 min a 4 °C. A leitura da absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA) a 532 nm e 660 nm. 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 nmol de MDA g^{-1} MS.

3.4.3 Ensaios de enzimas antioxidantes

Foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Peroxidase (POX), Peroxidase do Ascorbato (APX) e Glutathione Redutase (GR). Para isso, aproximadamente 0,30g de amostras foliares foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 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 (GR, EC 1.6.4.2) (Peixoto et al., 1999; Carlberg e Mannervik, 1985). A seguir, os homogenatos foram submetidos a centrifugação a 12.000 g por 15 min, a 4°C, sendo os sobrenadantes utilizados como extrato enzimático bruto. Os seguintes meios de reação foram utilizados: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM , para SOD (Giannopolitis e Ries, 1977); tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_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_2O_2 1 mM, para APX (Peixoto et al., 1999) e 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 SOD as amostras foram iluminadas por 5 min e absorvância foi lida 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 e APX foram estimadas pela leitura da absorvância durante o primeiro minuto de reação, nos comprimentos de onda de 420 e 290 nm, respectivamente (Peixoto et al., 1999).

3.5 Análises estatísticas

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado (DIC), composto com quatro tratamentos e seis repetições cada, sendo os dados submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste SNK, a 0,05% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico R Studio.

4. RESULTADOS

4.1. Relações hídricas

A exposição das plantas de *Dipteryx alata* aos estresses abióticos afetou diferentes aspectos relacionados às relações hídricas das plantas (Fig. 1). Em relação ao potencial hídrico da antemanhã (Ψ_{am}), alterações foram observadas apenas nas plantas submetidas ao solo salino, enquanto nos demais tratamentos esse parâmetro manteve-se constante (Fig. 1A). O potencial hídrico do meio-dia (Ψ_{md}), por sua vez, apresentou queda tanto nas plantas expostas ao déficit hídrico (DH) quanto nas plantas expostas ao sal (Fig. 1B). Alterações significativas entre os tratamentos em comparação ao CT foram observadas também no potencial osmótico (Ψ_s) (Fig. 1C), o qual foi menor nas plantas submetidas aos três estresses testados. A concentração de prolina, no entanto, manteve níveis similares em todos os tratamentos (Fig. 1D). Por último, a transpiração diária (E) diminuiu apenas nas plantas submetidas ao tratamento DH, mantendo-se estatisticamente igual ao controle nos demais estresses (Fig. 1E).

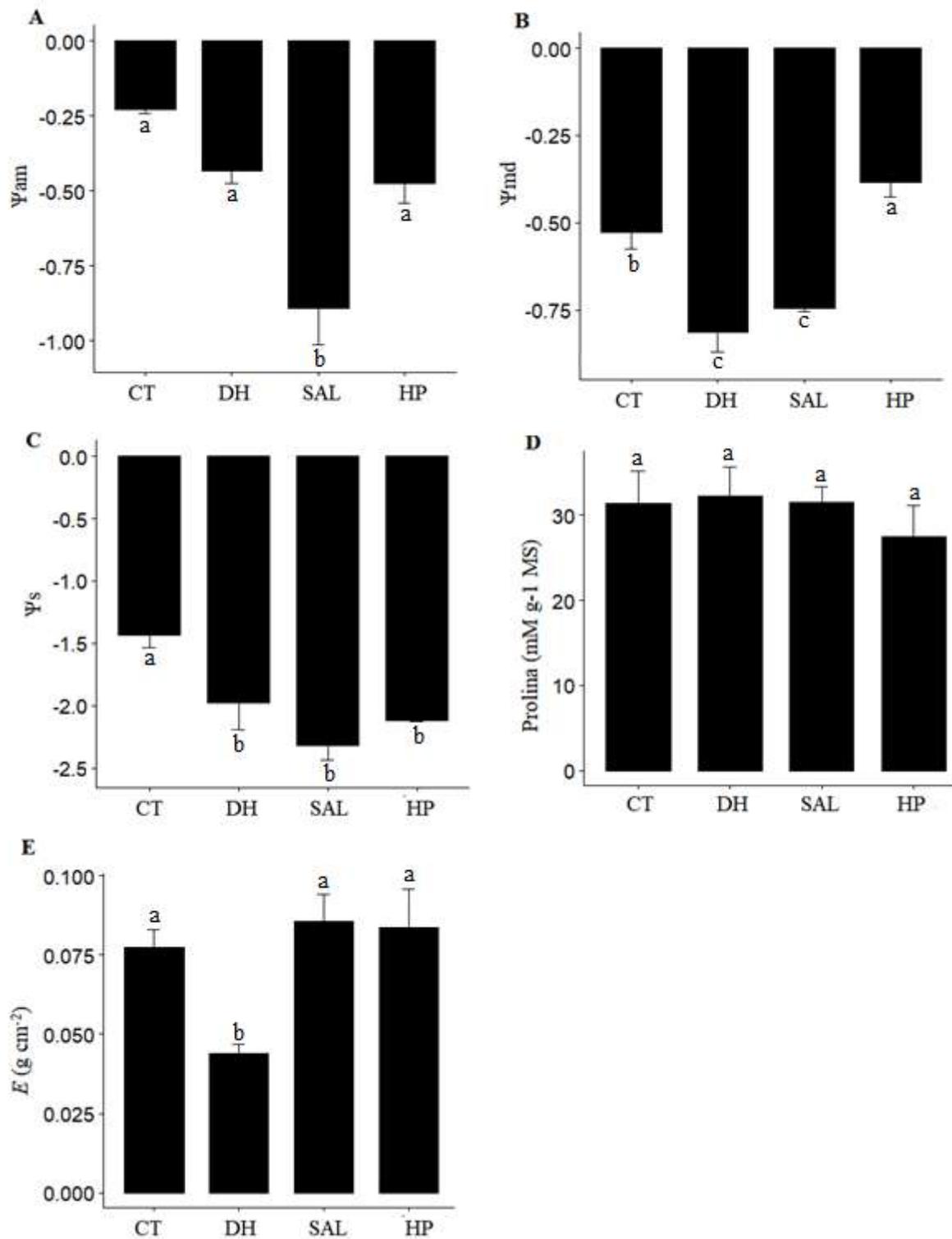


Figura 1 – Potencial hídrico da antemanhã (Ψ_{am}) (A), potencial hídrico da meio-dia (Ψ_{md}) (B), potencial osmótico (Ψ_s) (C), teor de prolina (D), taxa transpiratória (E) (E), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.2. Aspectos relacionados aos processos fisiológicos

4.2.1 Fluorescência da clorofila *a*

O rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) não se alterou em nenhum dos tratamentos analisados (Fig. 2A). O rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), por outro lado, diminuiu significativamente nos tratamentos de SAL e hipóxia (HP) (Fig. 2B), sendo o mesmo padrão observado na taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), conforme o esperado (Fig. 2C). O quenching fotoquímico apresentou queda apenas na HP, se mantendo constante nos outros tratamentos avaliados (Fig. 2D). Os demais parâmetros avaliados, fluorescência mínima (F_0) e quenching não fotoquímico (NPQ) (Fig. 2E-F), não se alteraram após a exposição aos tratamentos.

4.2.2 Trocas gasosas

A exposição aos estresses abióticos afetou todos os parâmetros das trocas gasosas analisados (Fig. 3). A taxa de assimilação líquida do carbono (A) diminuiu em todos os tratamentos, sobretudo nas plantas expostas à HP (Fig. 3A). De forma similar, queda acentuada foi observada na condutância estomática (g_s) após a exposição aos estresses, não havendo, nesse caso, diferença estatística entre DH, SAL e HP (Fig. 3B). Em relação à razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), observou-se queda significativa apenas nas plantas que foram expostas ao DH (Fig. 3C). Diante disso, a eficiência de carboxilação (A/C_i) foi incrementada no tratamento DH, sendo similar as plantas CT, enquanto em SAL e HP esse parâmetro diminuiu (Fig. 3D). Por último, entre os estresses, a maior eficiência no uso da água, representada pela razão entre A/E , foi apresentada pelas plantas submetidas à seca (Fig. 3E).

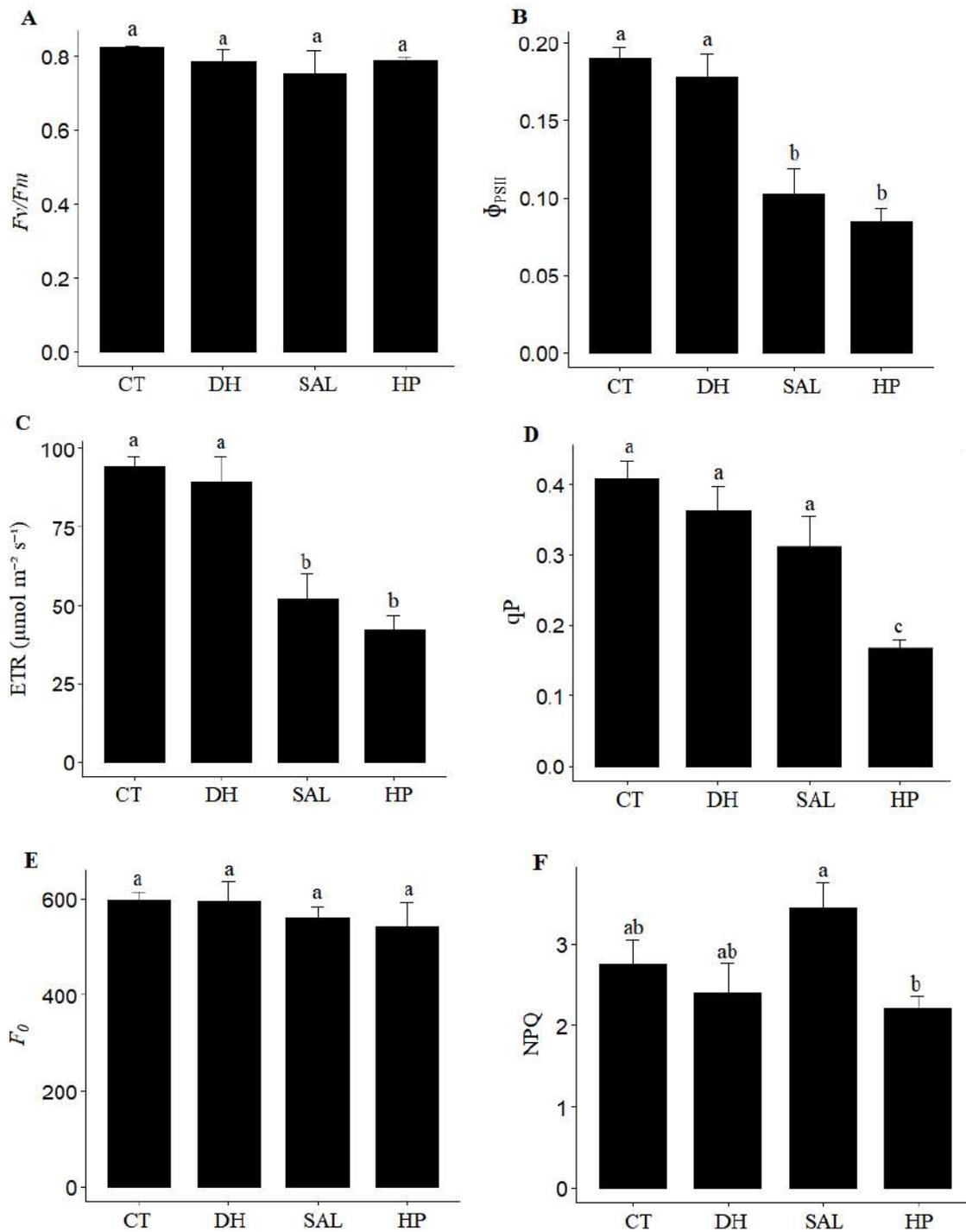


Figura 2 – Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (A), rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{PSII}) (B), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (C), quenching fotoquímico (qP) (D), fluorescência mínima (F_0) (E), quenching não fotoquímico (NPQ) (F), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

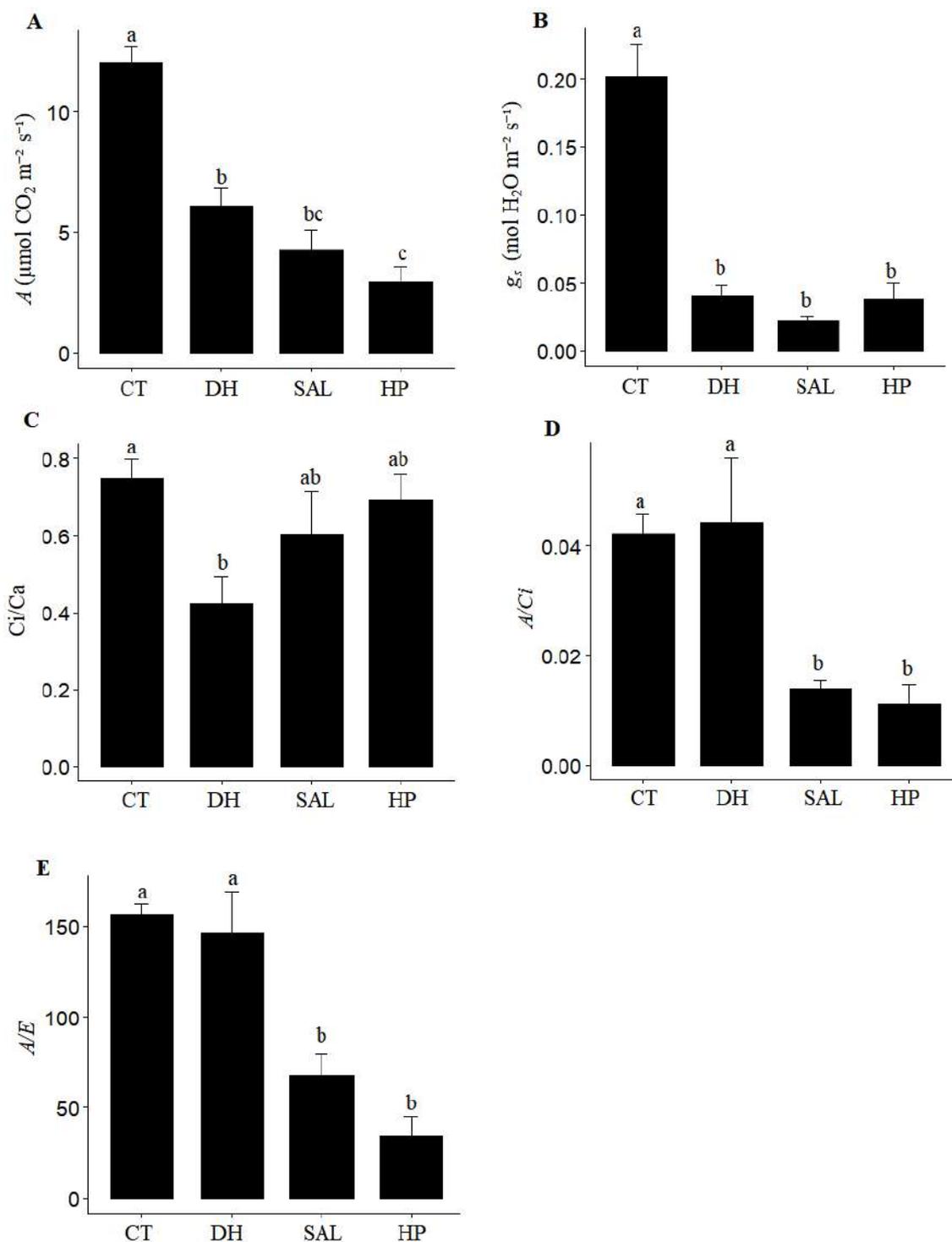


Figura 3 – Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) (C), eficiência de carboxilação (A/C_i) (D) e eficiência no uso da água (A/E) (E), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.3 Influência dos estresses abióticos nos processos bioquímicos

4.3.1 Pigmentos cloroplastídicos

Os pigmentos cloroplastídicos clorofilas *a* e *b* tiveram seus níveis reduzidos nos tratamentos SAL e HP, enquanto o DH se manteve estatisticamente igual ao CT (Fig. 4A-B). Como consequência, a concentração de clorofilas totais diminuiu em todos os estresses, sendo essa queda mais acentuada no SAL e HP do que no DH (Fig. 4C). Não foram observadas alterações na razão da a clorofila *a/b* (*Chla/Chlb*) e no conteúdo de carotenoides (Fig. 4D-E).

4.3.1 Danos celulares e defesas antioxidantes

Plantas submetidas ao déficit hídrico e salinidade por 16 dias apresentaram aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), aqui evidenciado pelo incremento na concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. 5A). Aumentos na concentração de malonaldeído (MDA), por sua vez, só foram observados no tratamento SAL, enquanto nas plantas submetidas ao DH e HP o conteúdo de MDA manteve-se estatisticamente igual ao controle (Fig. 5B). Diante disso, o sistema antioxidante foi ativado, sendo que as principais alterações foram representadas pelo aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) nos tratamentos DH e SAL; da enzima ascorbato peroxidase (APX) no SAL e HP; e Peroxidase (POX) no DH e HP (Fig. 5C-E). Não foram observados incrementos na atividade da glutatona redutase (GR) em nenhum dos tratamentos, ocorrendo, ao contrário, a diminuição na atividade dessa enzima nas plantas submetidas à seca (Fig. 5 F).

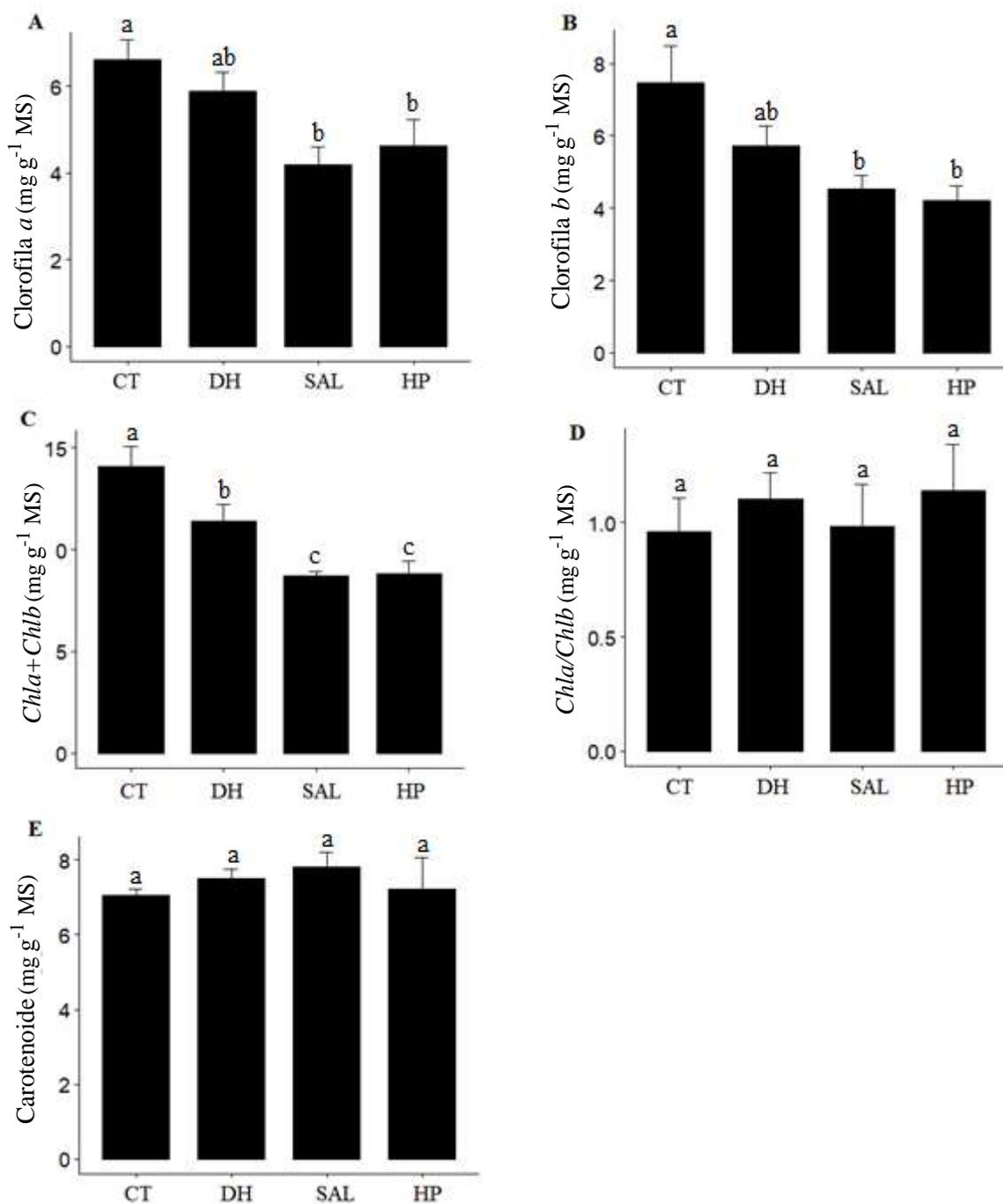


Figura 4 – Clorofila a (A), Clorofila b (B), clorofila total (*Chla*+*Chlb*) (C), razão entre a clorofila a e b (*Chla*/*Chlb*) (D) e carotenoides (E), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

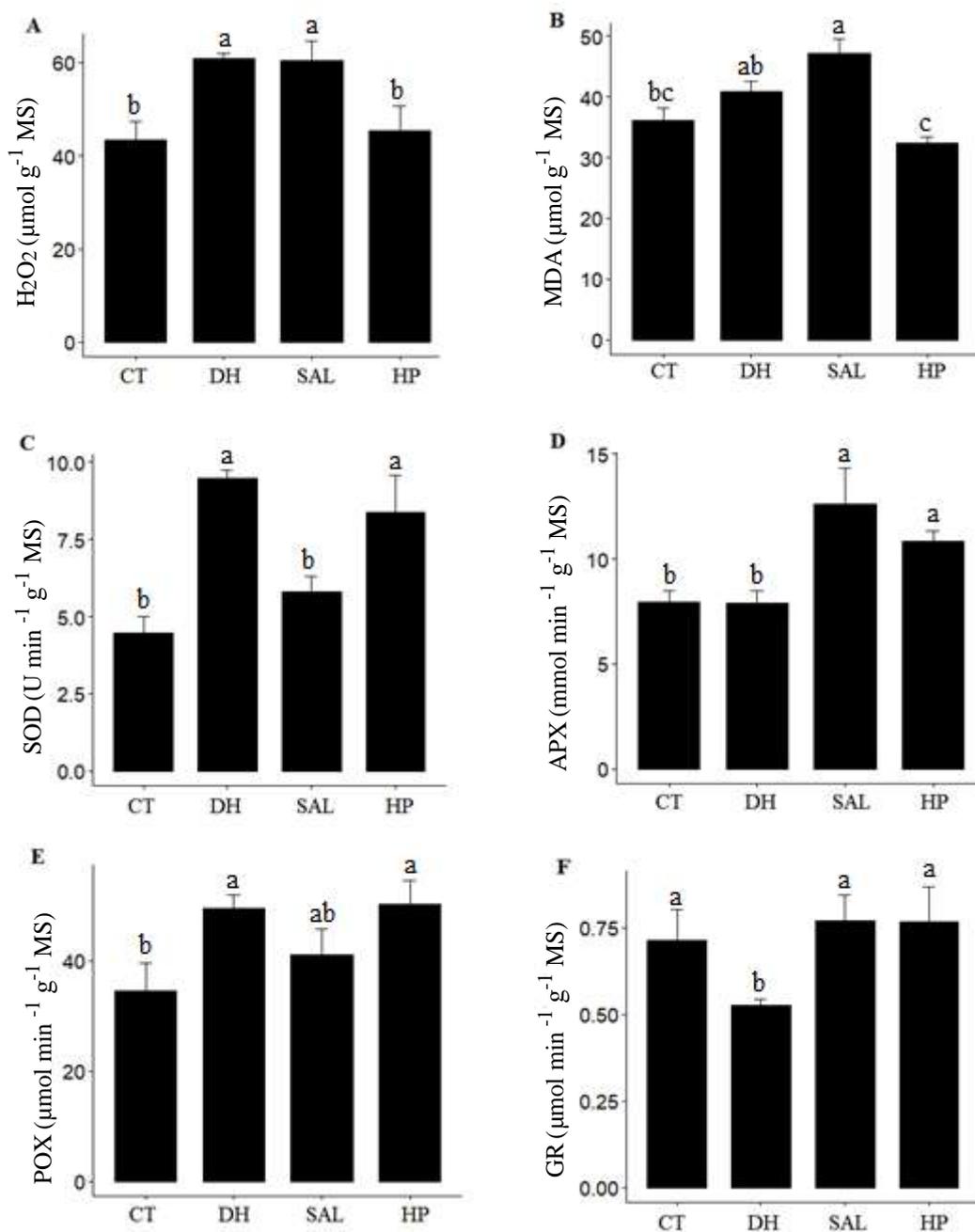


Figura 5 – Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (A), malondealdeído (MDA) (B), superóxido dismutase (C), peroxidase (D), ascorbato peroxidase (E) glutationa redutase (F), nos tratamentos: CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.4 Área foliar específica (AFE) e índice de vulnerabilidade (IV)

A aplicação dos estresses não alterou a área foliar específica (AFE) das plantas em nos tratamentos DH e HP, no entanto aumento nas plantas tratadas com SAL (Tabela 1). O índice de

vulnerabilidade, por sua vez, foi bastante similar nas plantas submetidas aos tratamentos SAL e HP, sendo consideravelmente menor nas plantas expostas ao DH (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros Área foliar específica (AFE) e índice de vulnerabilidade (IV) em plantas *Dipteryx alata* expostas aos tratamentos CT (controle), DH (30% CC), SAL (100 mM NaCl), HP (água mantida 3cm acima do solo).

Tratamentos	AFE (%)	IV (%)
CT	695.20 b	-
DH	693.33 b	22.46 b
SAL	803.26 a	45.45 a
HP	694.62 b	47.48 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade

5. DISCUSSÃO

Todos os estresses avaliados desencadearam alterações significativas nos processos fisiológicos e bioquímicos de *Dipteryx alata*, embora com diferentes intensidades, o que resultou em índices de vulnerabilidade distintos. Tais resultados refletem estratégias adaptativas da espécie, e provavelmente estão relacionados com o seu habitat. Dentre os parâmetros aqui avaliados ressalta-se o Ψ_w , o qual reflete o status hídrico da planta e é bastante sensível às variações ambientais, sendo que decréscimos nessa variável são comumente observados em plantas submetidas à seca, salinidade e alagamento (Herrera, 2013; Silva, 2017; Vaishnav et al., 2019). No caso de *D. alata*, maiores alterações no Ψ_w foram observadas quando as plantas foram submetidas à salinidade, uma vez que, nesse estresse, tanto o Ψ_{am} quanto o Ψ_{md} foram afetados. Queda no Ψ_w é uma resposta comumente observada em plantas crescendo em solos com altas concentrações de NaCl e reflete o declínio no potencial hídrico do solo em decorrência do acúmulo de sal, o que compromete a absorção de água pela planta (Távora et al., 2001; Lacerda, 2016). Diminuição no Ψ_{md} também foi observada nas plantas submetidas à seca, o que também é reflexo do menor potencial hídrico do solo, embora nesse caso isso se deva a menor disponibilidade de água, e não ao excesso de sais. Apesar disso, o Ψ_{am} se manteve constante, o que provavelmente foi resultado da capacidade dessas plantas em se reidratar quando a transpiração cessa, indicando bom funcionamento dos vasos condutores (Silva, 2017).

Em relação as plantas submetidas à HP, o excesso de água na superfície do solo não resultou em alterações no Ψ_w . De forma geral, espécies expostas ao alagamento tendem a apresentar queda no status hídrico vegetal, o que frequentemente envolve a inibição da atividade das aquaporinas na membrana das células radiculares (Herrera, 2013). Diversos estudos, no entanto, obtiveram resultados semelhantes aos observados aqui, não encontrando relação entre o alagamento e quedas no Ψ_w , mesmo quando plantas sensíveis ao alagamento foram utilizadas no estudo, indicando que o comprometimento dos processos de absorção de água podem não ser um dano tão difundido entre as plantas expostas ao alagamento como se imaginou a princípio (Blanke e Cooke, 2004; Herrera, 2013; Oliveira et al., 2015).

O estresse desencadeado pela exposição ao déficit hídrico, salinidade e hipóxia reduziram o potencial osmótico das plantas de *D. alata*. Esse declínio indica que essas plantas foram capazes de promover o ajustamento osmótico, estratégia importante para manutenção do potencial hídrico e, conseqüentemente, da turgescência foliar (Babita et al., 2010; Askari e Ehsanzadeh, 2015). Essa hipótese é particularmente verdadeira no caso das plantas submetidas à hipóxia, uma vez que nessas plantas a queda no potencial osmótico não foi acompanhada por alterações no Ψ_w , não podendo, portanto, ser considerada como simples consequência do menor conteúdo de água nas células. Ao contrário, é possível que a alteração no potencial osmótico nesse tratamento tenha contribuído para a manutenção do Ψ_w (Behr et al., 2017). No entanto, no presente estudo não foi observado o aumento na concentração de prolina nos tratamentos analisados. Comportamento similar foi observado em plantas de *D. alata* em exposição à seca severa (Alves, 2018). Isso pode ser um indicativo de que este aminoácido nesta espécie não atua diretamente no ajustamento osmótico e que outros solutos osmocompatíveis podem ter participado de forma efetiva neste processo, por exemplo carboidratos, demais aminoácidos e compostos nitrogenados (Servillo et al., 2011; Alves, 2018). No caso das plantas expostas ao estresse salino, é provável que o acúmulo de íons Na^+ e Cl^- no tecido foliar também tenham contribuído para o menor potencial de soluto (Silva et al., 2009).

A fotossíntese é um processo chave que integra o status fisiológico da planta (Alves, 2018). Esse processo foi afetado em diferentes níveis pelos agentes estressores aos quais a *D. alata* foi submetido, sendo que, de forma geral, as plantas expostas ao DH apresentaram menores danos do que os demais estresses. O Sal e HP diminuíram a concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais, enquanto o DH foi capaz de manter esses parâmetros mais próximos ao controle. A manutenção na concentração dos pigmentos é considerada uma característica robusta na tolerância de plantas à estresse (Carvalho et al., 2015; Silva, 2017). Alterações nas membranas

cloroplastídicas sob estresse abiótico pode ocasionar danos oxidativos devido à foto-oxidação e à degradação da clorofila (Gomes et al., 2011; Khan et al., 2019).

Alterações também foram observadas em relação aos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Em todos os tratamentos os valores de F_v/F_m tenham se mantido constantes, próximos aos valores considerados ótimos para a maioria das espécies, em torno de 0,75 à 0,85, indicando a ausência de danos às proteínas e componentes do fotossistema II (Baker, 2008; Murchie e Lawson, 2013). Baixos valores Φ_{PSII} e ETR, por outro lado, ocorreram apenas nos tratamentos SAL e HP. No caso do SAL, a alteração em Φ_{PSII} não foi acompanhada por mudanças em q_p , indicando que o menor fluxo de elétrons através do PSII foi resultado da eficiência com a qual a luz foi absorvida e transferida do complexo antena para o centro de reação (Cousins et al., 2002), o que pode ter sido consequência na diminuição na concentração de pigmentos observada nesse tratamento. Na HP, por outro lado, tanto Φ_{PSII} quanto q_p apresentaram quedas consideráveis, indicando que nesse caso, além da menor eficiência na absorção e transferência de luz, provavelmente também houve comprometimento na disponibilidade de aceptores de elétrons no PSII (Cousins et al., 2002).

Foi observado menor na taxa de assimilação líquida do carbono nas plantas em exposição aos tratamentos, sendo essa diminuição ainda mais acentuada na HP. Nas plantas submetidas apenas à seca, essa queda na taxa fotossintética foi um reflexo na diminuição na condutância estomática, não havendo danos bioquímicos no ciclo de Calvin, conforme evidenciado pela redução da razão C_i/C_a (Bai et al., 2008; Osakabe et al., 2014). Com efeito, o fechamento estomático é uma das primeiras respostas das plantas à seca e é essencial para diminuir a perda de água para a atmosfera por transpiração, embora também reduza a entrada de CO_2 para a reação de carboxilação da Rubisco (Alves, 2018). Nas plantas submetidas ao SAL e HP também observou-se redução na condutância estomática. Em condição de hipóxia a redução de g_s é uma resposta comum em plantas terrestres vasculares submetidas ao alagamento (Pociecha et al., 2008; Gimeno et al., 2012; Bai et al., 2013). Essa resposta associada com os hormônios vegetais, principalmente o ácido abscísico (ABA), que está relacionado a mudanças morfológicas e fisiológicas nas plantas sob estresse hídrico ou por hipóxia. Acredita-se que ele estimule o fechamento estomático e diminua a relação raiz/parte aérea, devido a estimular o crescimento da raiz por reduzir a síntese do etileno e diminuir crescimento do caule (Sharp, 2002). No caso do SAL, essa diminuição geralmente está relacionada com o estresse osmótico desencadeado no solo. Convém ressaltar, no entanto, que embora também tenha ocorrido o fechamento estomático nos tratamentos SAL e HP, a razão C_i/C_a se manteve similar ao controle, indicando que houve

limitações bioquímicas e difusivas neste processo (Bai et al., 2008; Osakabe et al., 2014). Essa hipótese é reforçada pela queda na razão A/C_i nos tratamentos SAL e HP (Osakabe et al., 2014)

As plantas do tratamento DH apresentaram transpiração significativamente menor do que a apresentada pelas plantas no controle ou nos outros estresses, tanto em relação à transpiração diária quanto à transpiração avaliada com o Irga, com consequente aumento na eficiência no uso de água (A/E). Aumento na razão A/E é uma característica comumente observada em plantas sob restrição hídrica que reflete na sua tolerância à seca (Martins et al., 2016), ainda que isso implique em certo decréscimo nas taxas fotossintéticas. Nas plantas submetidas ao SAL e HP, por outro lado, não foram constatadas alterações nas taxas transpiratórias ou na relação A/E , embora essas plantas também tenham apresentado diminuição na condutância estomática. É provável, portanto, que outros fatores além de g_s tenham impactado a perda de água pelas plantas, como a condutância cuticular (g_{min}) (Duursma et al., 2019) ou a ocorrência de senescência foliar (Morales et al., 2013).

Em adição às alterações nos processos fisiológicos, a imposição de déficit hídrico, salinidade e hipóxia também alterou processos bioquímicos, como a atividade de enzimas antioxidantes. A manutenção dos níveis de ROS envolve a participação de enzimas antioxidantes, como o superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX) e glutathione redutase (GR), atuantes na desintoxicação desses compostos (Farnese et al., 2016). Sendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a ROS mais comum na célula vegetal (Khan et al., 2019). Neste estudo, a SOD aumentou sua atividade nos tratamentos das plantas sob DH e HP. Sendo essa a primeira linha de defesa frente ao estresse oxidativo, responsável em converter o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 , que por sua vez pode ser eliminado da célula pela ação de enzimas específicas, transformando este ROS por exemplo em H_2O (Farnese et al., 2016). Aumento na atividade da SOD foram observados nas plantas do DH e HP, o que, juntamente com a ação da atividade da APX e POX foram eficientes na eliminação do H_2O_2 em HP, no entanto, apenas observou alteração da POX no processo de desintoxicação deste ROS em DH, que não foi suficiente para eliminar de vez esta espécie reativa. Também foi observado alteração de uma única enzima antioxidante nas plantas em SAL, o APX. A manutenção da atividade da maioria das enzimas antioxidantes em níveis similares ao controle nos tratamentos DH e SAL explica os maiores níveis de H_2O_2 . O H_2O_2 pode se difundir nas membranas e quando produzidas de maneira controlada atuam como moléculas sinalizadoras, no entanto a produção em excesso promove oxidação descontrolada e causar dano as células (Fukao e Bailey-Serres, 2004; Van Breusegem e Dat, 2006). Nesse caso, observou-se danos as membranas celulares das plantas em exposição ao SAL, evidenciado pelo incremento na concentração de MDA (Li et al., 2019). Esse

aumento de H_2O_2 das plantas em salinidade pode ter sido ocasionado pelo comprometimento da cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos, desencadeando a transferência de elétrons para o O_2 e formando ROS (Møller, 2007). No caso da seca, por outro lado o aumento nas concentrações de H_2O_2 não se refletiu em nenhum dano nas membranas celulares.

Ao fazermos uma análise dos dados obtidos, observa-se que a atuação conjunta de diferentes mecanismos envolvidos na tolerância de plantas de *D. alata* permitiu que essas plantas fossem menos vulneráveis ao déficit hídrico. Por exemplo, plantas no tratamento DH apresentaram menores quedas nos parâmetros de ETR e Φ_{PSII} , menor taxa transpiratória e maior A/E , o que favoreceu a manutenção de água na planta. As plantas de *D. alata* apresentaram características sensíveis quando expostas à salinidade e hipóxia representadas pelas quedas nos parâmetros de ETR, Φ_{PSII} , redução na concentração de clorofilas total e na taxa fotossintética, apontam para efeito mais rigoroso de ambos estresses no aparato fotossintético. Menor eficiência no uso da água, por meio da redução de A/E e maiores taxas transpiratórias para os dois tratamentos, além da maior área foliar (AFE) nas plantas em salinidade resultaram em maior vulnerabilidade nessas plantas. É provável que esses resultados reflitam a história evolutiva da planta, uma vez que, embora possua ampla distribuição geográfica, a *D. alata* ocorre predominantemente em regiões onde a seca é um evento frequente, como cerrado e caatinga. Mesmo quando presente em outros biomas, como o Pantanal, essa espécie está restrita a regiões não alagáveis, de forma que os outros estresses aqui avaliados não são tão frequentes para essa planta quanto a restrição hídrica.

5. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados desse experimento, podemos notar que, embora todos os estresses tenham afetado negativamente o metabolismo de *D. alata*, os tratamentos de salinidade e hipóxia foram mais agressivos. De fato, quando expostas à seca, as plantas foram capazes de manter o Ψ_{am} , ao contrário das plantas expostas à salinidade, além de apresentar menores danos na fotossíntese e maior eficiência no uso da água quando comparada aos dois outros fatores estressantes, o que resultou, em última instância, em menor índice de vulnerabilidade ao estresse. Tais resultados devem ser levados em consideração não apenas para a preservação de *D. alata*, mas também em programas de reflorestamento, sendo necessário analisar as características da área de plantio antes de se optar por essa espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aktas H, Abak K, Cakmak I (2006) Genotypic variation in the response of pepper to salinity. **Sci Hortic-Amsterdam**. 110:260–6.
- Al-Khaliel AS (2010) Effect of salinity stress on mycorrhizal association and growth response of peanut infected by *Glomus mosseae*. **Plant Soil Environ**, 56(7):318–324
- Aldan, F, et al (2014) Effect of waterlogging stress on the growth, development and symptomatology of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plants. **Rev Acad Colomb Ci Exact**, 38(149): 393–400
- Alves RDFB (2018) **Memória a seca no cerrado: aclimação diferencial do baru (*Dipteryx alata* Vogel)**. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO. 48f.
- Arnon, DI (1949) Copper enzymes in isolates choroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol**, 24(1):1-15.
- Askari, et al (2015) Osmoregulation-mediated differential responses of field-grown fennel genotypes to drought. **Ind. Crops Prod**. 76, 494-508.
- Babita, et al (2010) Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. **Environ. Exp. Bot**. 69, 243-249.
- Bai J, et al, (2008) Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. **Photosynthetica**, 46(2):232-237.
- Bailey-Serres J, Chang R (2005) Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. **Annals of Botany**, Oxford, 96(4):507–518.
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Anais Annual Rev Plant Biol**, 59:89–113.
- Blanke MM, Cooke DT (2004). Effects of flooding and drought on stomatal activity, transpiration, photosynthesis, water potential and water channel activity in strawberry stolons and leaves. **Plant Growth Regul**. 42(2), 153–160.
- Behr JH et al (2017). Metabolic and physiological adjustment of *Suaeda maritima* combined salinity and hypoxia. **Ann Bot**. 119: 965–976.
- Bi H, et al (2017). The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. **BMC Plant Biol**, 85(1).
- Borrajo CI, et al (2018) Morpho-physiological responses of tall wheatgrass populations to different levels of water stress. **Plos One**, 13(12):1-17.
- Brasil (2015) Ministério do Meio Ambiente. **Mapeamento do uso e cobertura da terra do Cerrado: Projeto TerraClass Cerrado 2013/ MMA/ SBF**. Brasília: MMA, 67p.
- Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, 113(1):484-490.
- Cai Y. et al (2015) Photosynthetic Response of an Alpine Plant , *Rhododendron delavayi* Franch, to Water Stress and Recovery : The Role of Mesophyll Conductance. **Front Plant Sci**, 6(1):10, 2015.
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol Plant**, 83(3):463–468.
- Carvalho JFC, et al (2015) Phenotyping soybeans for drought responses using remote sensing techniques and non-destructive physiological analysis. **GI Sci Technol**, 08: 1-1.
- Choudhary R, et al (2012) Effect of abscisic acid and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes in *Syzygium cumini* plant. **J Food Sci Technol**, 49(5): 649–652.
- Cousins AB et al (2002). Photosystem II energy use, non-photochemical quenching and the xanthophyll cycle in *Sorghumbicolor* grown under drought and free-air CO₂ enrichment (FACE) conditions. **Plant Cel Environ**, 25(11):1551–1559.

- Collevatti RG, et al (2001). Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Mol Ecol** 10: 349–356.
- Crawley MJ (2009) Life History and Environment. In: Crawley MJ (Ed.). **Plant Ecol**. 2. ed. Oxford - UK: Blackwell Publishing Ltd., p. 73–131.
- Demmig-Adams B, Stewart JJ, Baker CR, Adams WW (2018) Optimization of photosynthetic productivity in contrasting environments by regulons controlling plant form and function. **Int J Mol Sci**, 19(3):872.
- Duursma RA et al (2019). On the minimum leaf conductance: its role in models of plant water use, and ecological and environmental controls. **New Phytol**. 221: 693–705.
- Fang Y, Xiong L (2014) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cell. Mol. Life Sci.**, 72 (4): 673-89.
- Farnese FS, et al (2016) When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. **Front Plant Sci**, 7.
- Ferreira EM, et al (2018). Área de preservação permanente em processo de revegetação com espécies arbóreas e adubos verdes. **Eng Sanit Ambient**, 23(2):243-252.
- Ferrari E, et al (2015) Déficit hídrico no metabolismo da soja em sementeiras antecipadas no Mato Grosso. **Nativa**, 3(1):67-77.
- Fetzer DL, et al (2018). Extraction of baru (*Dipteryx alata* vogel) seed oil using compressed solvents technology. **The Journal of Supercritical Fluids** 137:23-33.
- Fukao T, Bailey-Serres J (2004). Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, 9(9), 449–456.
- Gay C, Gebicki, JMA (2000) Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric–Xylenol Orange Hydroperoxide Assay. **Anal Biochem**, 284(2): 217–220.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases, Occurrence in higher plants. **Plant Physiol**, 59(1):6.
- Gimeno V et al (2012) Physiological and morphological responses to flooding with fresh or saline water in *Jatropha curcas*. **Environ Expl Bot**, 78:47–55.
- Gomes FP, et al (2008) Photosynthetic limitations in leaves of young Brazilian Green Dwarf coconut (*Cocos nucifera* L. ‘nana’) palm under well-watered conditions or recovering from drought stress. **Environ Exp Bot**, 62:195–204.
- Hniličková H (2017) Effects of salt stress on water status, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of rocket. **Plant Soil Environ**. 63(8):362–367.
- Herrera A (2013). Responses to flooding of plant water relations and leaf gas exchange in tropical tolerant trees of a black-water wetland. **Front Plant Sci**, 4:1-12.
- Huang CJ, et al (2013) Iteration in chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in hybrid ramie (*Boehmeria nivea* L.) under drought stress. **Aust. J Crop Sci**, 7:594–599.
- IPCC (2013) Climate Change 2013: The Physical Science Basis. **Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)].
- Irfan M, et al (2010) et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, 241:3-17.
- Jackson MB, Ismail AM (2015). Introduction to the Special Issue: Electrons, water and rice fields: plant response and adaptation to flooding and submergence stress. **AoB Plants**, 7:110
- Kuo MC, Kao CH (2003) Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Rice Leaves. **Biol Plant**, 46(1):149–152.
- Lacerda JJ (2016) **Estresse salino e seus efeitos no crescimento inicial de clones de *Eucalyptus*** (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia), spp. Vitória da Conquista – BA: UESB. 122p.

- Li J, et al. (2017) Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. **J Saudi Soc Agric Sci**, 16:82–88.
- Lima JRS, et al. (2006) Comparação da sonda de nêutrons e de sensores tipo TDR para a determinação dos componentes do balanço hídrico no solo e evapotranspiração do feijão Caupi. **AGROTEC**, 27(1):21–29.
- Lopes MV (2016) **Índice de Possibilidade de Conversão à Agricultura (IPCA): Uma ferramenta na elucidação do fenômeno da expansão da fronteira agrícola em Goiás**. Doctorate Thesis, UFG. 223p.
- Martins CAS, et al. (2017) Crescimento e produção do feijoeiro comum cultivado sob déficit hídrico. *Water Resources and Irrigation Management*, 6(1): 95–106.
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **J Exp Bot**, 51:659–668.
- Melo LA, et al. (2017) Estaquia e efeito da deficiência hídrica ou inundação sobre características morfoanatômicas de *Cestrum axillare* Vell. **Ciência Florest**, 27(1): 325-337.
- Miller G, et al (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant Cell Environ**, 33:453–467.
- Mittal S et al (2012) Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. **Plant Physiol Biochem**. 54:17–26
- Møller IM, et al (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481.
- Morales, M et al (2013). Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*, an extraordinarily long-lived herb. **Journal Eco**, 101(3):555–565.
- Moreira Barradas JM, et al (2014) Efeito da fertirrigação na salinização do solo e estabilidade agregada. **J Irrig Drenar Eng**, 141: 1-10.
- Müller M, Munné-Bosch S (2015) Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. **Plant Physiol**, 169(1):32-41.
- Murchie EH, Lawson T (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **J Exp Bot**, 64:3983-3998.
- Nobre CA, et al (2012) Fundamentos científicos das mudanças climáticas. **INPE**, 2012.
- Osakabe Y. et al. (2014) Response of plants to water stress. **Front Plant Sci**, 1338(5):1-8.
- Oliveira AS, et al (2015) Anatomical and morphological modifications in response to flooding by six Cerrado tree species. **Act Bot Brasil**, 29(4):478–488.
- Pangala SR, et al (2014). Controls on methane emissions from *Alnus glutinosa* saplings. **New Phyto**, 201: 887–896.
- Parihar P et al (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environ Sci Pollut Res**, 22(6), 4056–4075.
- Pask AJD (2012) Physiological Breeding II: A Field Guide to Wheat Phenotyping, in: Pierre CS, Arce, VT (Eds.), *Osmotic adjustment*. D.F.: CIMMYT, México, p. 21-24.
- Paz AA, et al. (2017) Induced flooding as environmental filter for riparian tree species. **Environ Exp Bot**, 139: 31–38.
- Peixoto PHP et al. (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev Bras Fisiol Veg**, 11(3):137–143.
- Pineli LDL, et al (2015) Use of baru (Brazilian almond) waste from physical extraction of oil to produce flour and cookies. **LWT - Food Sci Technol** 60:50–55.
- Pociecha E, et al (2008) Effects of root flooding and stage of development on the growth and photosynthesis of field bean (*Vicia faba* L. minor). **Acta Physiol Plant**, 30(4):529–535.
- Pugh CW, et al (2017) New horizons in hypoxia signaling pathways. **Exp Cell Res**, 356:116–121.

- Resende MLF, Guimarães LL (2007) **Inventários da biodiversidade do bioma cerrado: biogeografia de plantas**. 1. ed. Rio de Janeiro: IBGE.
- Rocha F (2016) **Caracterização química, física e termofísica da amêndoa do baru (*Dipteryx alata* Vog.)** 40 f. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.
- Rossatto DR, et al (2009) Características estomáticas de pares congêneros de cerrado e mata de galeria crescendo numa região transicional no Brasil central. **Acta Bot Bras**, 23(2):499-508.
- Sano SM, et al (2016) Baru (*Dipteryx alata*). **Plantas Para o Futuro - região Centro-oeste**. Brasília: MMA, 203-215.
- Sandalio LM, et al (2016) Leaf epinasty and auxin: a biochemical and molecular overview. **Plant Sci**, 253:187–93.
- Sasidharan R, et al (2018) Signal dynamics and interactions during flooding stress. **Plant Physiol**, 176:1106–1117.
- Servillo L, et al (2011) Proline Derivatives in Fruits of Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poit): Presence of N-Methyl-l-proline and 4-Hydroxy-l-Prolinebetaine. **J Agri Food Chem**, 59(1):274–281.
- Sharp, et al, (2002) **Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress**. *Plant Cell Environ Columbia*, 25(2): 211-222.
- Silva AA (2017b) **Estudo da resistência à seca em soja: avaliações fisiológicas, metabólicas e moleculares**. - Viçosa, MG, 2017. 102f
- Silva EN et al (2009) Contribuição de solutos orgânicos e inorgânicos no ajustamento osmótico de pinhão-mansão submetido à salinidade. *Pesqui Agropecu Bras*, 44(5):437-445.
- Silva AF (2016) **eficiência fotossintética e proteção oxidativa em mudas de cajueiro anão submetidas ao estresse salino**. UFPB, 93p
- Silva GP (2017a) **Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Dipteryx alata* Vog. no processo de germinação e armazenamento**. Doctorate Thesis, IF Goiano, GO. 63p.
- Silva PEM, et al. (2013) The functional divergence of biomass partitioning carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply. **Environ Exp Bot**, 87:49-57.
- Siqueira EMA, et al (2012) Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats *Food Research International*, 45: 427-433.
- Striker GG et al (2017) No escape? Costs and benefits of leaf de-submergence in the pasture grass *Chloris gayana* under different flooding regimes. **Funct Plant Biol**, 44: 899–906.
- Souza PL, Silva MR (2015) Quality of granola prepared with dried caju-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) and baru almonds (*Dipteryx alata* Vog). **J Food Sci Technol**, 52(3), 1712–1717.
- Taiz L et al (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 888 p.
- Tang M et al (2002) Developmental mechanism and distribution pattern of stomatal clusters in *Begonia peltatifolia*. **Acta Bot**. 44:384–389.
- Távora FJAF et al (2001), Crescimento e relações hídricas em plantas de goiabeira. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, - SP, 23(2):441-446.
- Teh SY Koh HL (2016) Climate change and soil salinization: impact on agriculture, water and food security. **Int J Agric For Plantation** 2:1–9.
- Vaishnav A et al (2019) Endophytic Bacteria in Plant Salt Stress Tolerance: Current and Future Prospects. **J Plant Growth Regul**. 38: 650.
- Van Breusegem et al (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, v. 141, p. 384 – 390.
- van Dongen JT Licausi F (2015) Oxygen Sensing and Signaling. **Ann Rev Plant Biol**, 66(1): 345–367.

- Voesenek LACJ Bailey-Serres J (2015) Flood adaptative traits and process: and overview. **New Phyto**, 206:57–73.
- Yamauchi T et al (2018) Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. **Plant Physiol**, 176:1118– 1130.
- Walter BMT (2006) Fitofisionomias do bioma Cerrado : síntese terminológica e relações florísticas. [s.l.] **Universidade de Brasília**, 2006.

CAPÍTULO 2

SINALIZAÇÃO CELULAR: O PAPEL DO FITORMÔNIO ETILENO NA RESPOSTA DE *Dipteryx alata* SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

SOUSA, Leticia Ferreira de, M.Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano – Campus Rio Verde, agosto de 2019. **Sinalização celular: o papel do fitormônio etileno na resposta de *Dipteryx alata* submetida ao déficit hídrico.** Orientadora: Dra. Fernanda dos Santos Farnese. Coorientadores: Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dr. Adinan Alves da Silva e Dr. Juraci Alves de Oliveira

O cerrado é um dos principais biomas do Brasil, tanto em extensão territorial quanto em diversidade de espécies. Nos últimos anos, atividades antrópicas diversas têm alterado os regimes hídricos naturais, intensificando a ocorrência e a duração dos eventos de seca, os quais podem afetar diversos processos fisiológicos vegetais e comprometer a sobrevivência da comunidade vegetal. Diante disso, o presente estudo avaliou o envolvimento do fitormônio etileno nas respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de *Dipteryx alata* submetidas à restrição hídrica. As plantas foram submetidas à seca isoladamente ou em combinação com o inibidor de etileno (STS). Plantas expostas ao déficit hídrico sem o STS apresentaram menor taxa de assimilação de carbono, condutância estomática e maior abscisão foliar, que contribuiu para a manutenção do potencial hídrico. As plantas expostas ao déficit hídrico com STS, por outro lado, apresentaram maior condutância estomática e menor abscisão foliar, o que se refletiu em maiores taxas transpiratórias e menor eficiência no uso da água. Assim, o presente estudo demonstrou o importante papel do fitormônio etileno (ETH) em manter o status hídrico vegetal por meio de diversas alterações fisiológicas.

Palavras-chave: Sinalização celular, Etileno, Tiosulfato de prata, Fisiologia vegetal, relações hídricas, bioquímicas, Seca, Restrição hídrica.

ABSTRACT

SOUSA, Leticia Ferreira de, M.Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano – Campus Rio Verde, august 2019. **Cell signaling: the role of ethylene phythormonium in the response of *Dipteryx alata* submitted to water deficit.**

Advisor: Dsc^a. Fernanda dos Santos Farnese. Coadvisor: Dsc. Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dsc. Adinan Alves da Silva and Dsc. Juraci Alves de Oliveira

The Cerrado is one of the main biomes in Brazil, both in territorial extension and species diversity. In recent years, various anthropic activities have altered natural water regimes, intensifying the occurrence and duration of drought events, and threshold that can affect various plant physiological processes and compromise the survival of the plant community. Therefore, the present study evaluated the involvement of ethylene (ETH) phythormonium in the physiological and biochemical responses of *Dipteryx alata* plants subjected to water restriction. Plants were treated alone or in combination with ethylene inhibitor (STS). Plants exposed to water deficit without STS showed lower carbon assimilation rate, stomatal conductance and higher leaf abscission, which contributed to the maintenance of water potential. the opposite was observed in plants treated for water deficit with STS, even though they had higher stomatal conductance, these plants had lower leaf abscission and consequently reflected in higher transpiratory rates and lower water use efficiency. However, the present study demonstrated the important role of ETH phythormonium in maintaining plant water status through various physiological changes.

Key words: Cellular signaling, Ethylene, Silver thiosulfate, Plant physiology, Water relations, Biochemical, Drought, Water restriction.

Sinalização celular: o papel do fitohormônio etileno na resposta de *Dipteryx alata* submetida ao déficit hídrico

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado, segundo maior bioma brasileiro em extensão (Brasil, 2015a), possui mais de 12.000 espécies vegetais descritas (Brasil, 2015b) e ocupa 97% da superfície do estado de Goiás, destacando-se pelo expressivo potencial de espécies nativas frutíferas (Lopes, 2016; Oliveira et al., 2017). É considerado o bioma com a maior vegetação savânica da América do Sul, sendo também um hotspot de biodiversidade mundial (Myers et al., 2000). Sua vegetação compreende diferentes fitofisionomias (Malheiros, 2016), as quais são fortemente influenciadas pela presença de períodos sazonais contrastantes: uma estação chuvosa, com índice pluviométrico entre 150 e 500 mm; e uma estação seca, durante a qual ocorre queda brusca na precipitação, tornando-se inferior a 50 mm (Almeida et al., 2017; Silva et al., 2008).

Nos últimos anos, atividades antrópicas diversas têm alterado os regimes hídricos naturais, intensificando a ocorrência e a duração dos eventos de seca, o que pode comprometer a sobrevivência até mesmo de espécies adaptadas às secas sazonais (Fernandes et al, 2016). A redução da precipitação abaixo de determinado limiar pode afetar diversos processos fisiológicos vegetais, comprometendo o desenvolvimento e a sobrevivência das plantas (Demmig-Adams et al., 2018; Fahad et al., 2017). Uma das primeiras alterações desencadeadas pelo déficit hídrico é a redução da abertura estomática, com consequente diminuição da condutância estomática (Sales et al., 2015), o que afeta negativamente a atividade fotossintética (Nguyen et al., 2018), além de aumentar a taxa de fotorrespiração (Yi et al., 2016), promovendo balanço negativo de carbono (Ping et al., 2015). Além disso, pode ocorrer incrementos na transferência de elétrons para o O₂ nos cloroplastos, o que aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Silveira et al, 2017), as quais podem causar uma série de danos nos tecidos vegetais (Nicco e Batteux, 2017; Sasidharan et al., 2018). Em adição, a restrição hídrica pode, ainda, afetar aspectos morfofisiológicos relacionados à expansão foliar, absorção e transporte de nutrientes e desencadear a cavitação em células condutoras, ocasionando a morte vegetal (Ferrari, et al., 2015; Demmig-Adams et al., 2018).

Diversas plantas, particularmente aquelas adaptadas às condições de seca, como é o caso das plantas do cerrado, apresentam mecanismos de defesa capazes de minimizar os danos desencadeados pelo déficit hídrico. Esses mecanismos incluem diferentes estratégias, como aumento na atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, POX, APX e GR, dentre outras)

(Carvalho et al., 2019), aumento na concentração de antioxidantes não enzimáticos, ajustamento osmótico, regulação estomática, redução da área foliar, aprofundamento das raízes e senescência foliar (Li et al., 2017; Carvalho et al., 2019). Esses mecanismos de defesa são induzidos nas células vegetais por meio de cascatas de transdução de sinais em resposta à moléculas produzidas após a exposição ao agente estressor (Petrov et al., 2015; Müller e Munné-Bosch, 2015), como é o caso dos fitormônios (Wani et al., 2016). Os fitormônios são moléculas produzidas pelas plantas que, em pequenas quantidades, medeiam importantes respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares no tecido vegetal (Wani et al., 2016; Per et al., 2018). Existem várias classes de hormônios vegetais, como auxina (AIA), giberelina (GA), ácido abscísico (ABA), etileno (ETH) e citocinina (CK), sendo que, dentre eles, o ABA e o ETH parecem ser particularmente importantes nas respostas das plantas à seca (Han et al., 2018; Saleem et al., 2018). No entanto, embora o papel do ABA em plantas expostas ao déficit hídrico já esteja bem estabelecido, o envolvimento do ETH nesse processo ainda desperta muitas perguntas (Merritt et al., 2001; Habben et al., 2014; Valluru et al., 2016).

Conhecido por ser o menor e único fitormônio gasoso, o ETH é considerado o fitormônio do estresse vegetal por atuar na resposta à diferentes fatores estressantes, tais como alta luminosidade, temperaturas elevadas e seca (Guan et al., 2017; Dubois et al., 2018). Além disso, o ETH também participa de processos normais do crescimento e desenvolvimento das plantas, como abscisão foliar, senescência e amadurecimento de frutos (Arraes et al., 2015). Em relação ao estresse hídrico, já foi demonstrado que a exposição das plantas à seca induz a transcrição do gene da ACC Sintase (ACS), enzima envolvida na síntese de ETH, o que, conseqüentemente, leva ao acúmulo do fitormônio no tecido vegetal (Dubois et al., 2018; Dubois, 2017). O efeito desse acúmulo, no entanto, ainda não está claro, sendo que os estudos realizados até o momento apresentam resultados conflitantes em relação ao papel do ETH em plantas sob restrição hídrica. Com efeito, enquanto alguns trabalhos constataram que o ETH desencadeia respostas que promovem a tolerância ao déficit hídrico, como o ajustamento osmótico e a atenuação do estresse oxidativo (Desikan et al., 2006; Cui et al., 2015), outros evidenciaram que plantas nas quais transcrição do ETH foi reprimida são menos sensíveis à seca (Yu et al., 2017; Gaion et al., 2017). Convém ressaltar, no entanto, que a maior parte dos trabalhos que demonstram que o ETH aumenta a vulnerabilidade à seca foi realizado em culturas, como milho, tomate e arroz, e utilizou parâmetros como manutenção da fotossíntese, manutenção do crescimento e menor taxa de senescência foliar como indicativos de tolerância à seca (Shi et al., 2015; Yu et al., 2017; Gaion et al., 2017). No entanto, embora o retardo da senescência e manutenção do crescimento seja interpretado como algo positivo em culturas, nas quais se deseja manter a produtividade durante

um curto ciclo de vida, esse mesmo raciocínio pode não se aplicar às plantas do cerrado, uma vez que nessas espécies a redução temporária do crescimento e a queda das folhas aparentemente são mecanismos de defesa contra os ciclos anuais de seca.

Outro aspecto relacionado à ação do ETH que gera muitas dúvidas diz respeito ao seu envolvimento na regulação dos movimentos estomáticos. Mais uma vez é possível encontrar resultados contrastantes na literatura, sendo que, enquanto alguns autores alegam que o ETH inibe o fechamento estomático em plantas submetidas à seca (She et al., 2012; Chen et al., 2013; Watkins et al., 2014), outros apontam que essa molécula, agindo em conjunto com outros reguladores como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico e o próprio ABA, é essencial para que o processo de fechamento estomático ocorra de forma eficaz (Liu et al., 2012; Hou et al., 2013; Daszkowska-Golec e Iwona Szarejko, 2013). Diante desse cenário, estudos que busquem esclarecer o envolvimento do ETH na resposta de plantas à seca se tornam essenciais para maior compreensão dos mecanismos de sinalização em condições de déficit hídrico, sobretudo em espécies nativas do cerrado, uma vez que, de forma geral, informações a respeito de mecanismos de sinalização celular em plantas nativas expostas a estresses abióticos são praticamente inexistentes. De fato, até onde foi possível constatar, até o momento nenhum estudo abordou o papel do ETH em espécies nativas de importância econômica, como é o caso do Baru (*Dipteryx alata* Vogel).

A *D. alata* é uma espécie pertencente à família Fabaceae e pode atingir até 25 metros de altura, apresentando folhas alternas pecioladas com 7 a 12 folíolos. É considerada uma espécie chave para o bioma cerrado, pois apresenta alta taxa de germinação e estabelecimento de mudas, além de ser uma das poucas espécies que produz fruto com polpa carnosa durante a época seca, alimentando assim várias espécies da fauna e até mesmo o gado da região (Sano et al., 2004). Essa árvore é também promissora para a recuperação de áreas degradadas, além de ter grande potencial econômico devido a seus usos múltiplos: alimentício, madeireiro, medicinal, industrial e paisagístico (Silva, 2017; Rocha, 2016). Com efeito, a *D. alata* figura entre as dez plantas nativas mais promissoras do cerrado brasileiro para cultivo comercial como floresta plantada (Soares et al., 2008). É ainda uma espécie relativamente tolerante à seca (Alves, 2018), apresentando alta sensibilidade estomática ao conteúdo de água no solo (Matos et al., 2018), fatores que tornam essa espécie propícia para avaliar o efeito do ETH em condições de déficit hídrico.

Diante do exposto, ficam as seguintes perguntas: qual o envolvimento do ETH em plantas nativas do cerrado expostas à seca? Qual o custo do retardo da senescência e da manutenção da fotossíntese e do crescimento para uma planta submetida a ciclo anuais de seca? Qual a

participação do ETH na regulação dos movimentos estomáticos? A fim de responder essas questões e esclarecer o papel do ETH em uma planta nativa do cerrado, o presente trabalho avaliou as respostas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas de plantas de *D. alata* expostas ao déficit hídrico, na presença e na ausência de um inibidor de ação do ETH, testando as seguintes hipóteses: (i) Plantas de *Dipteryx alata* são relativamente tolerantes à seca, o que se deve, ao menos em parte, à ação do ETH nos tecidos vegetais, de forma que plantas tratadas com inibidor de ETH serão mais sensíveis ao estresse; (ii) Plantas tratadas com o inibidor do ETH serão capazes de manter as folhas por mais tempo, o que vai resultar em alterações das relações hídricas, impactando negativamente os processos fisiológicos e bioquímicos dos espécimes.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o envolvimento do fitormônio etileno (ETH) nas respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de *Dipteryx alata* submetidas ao déficit hídrico.

2.2. Específicos

- Avaliar o efeito da seca e do inibidor de ETH, tiosulfato de prata (STS), sobre as relações hídricas vegetais;
- Verificar o efeito da concentração do inibidor de ação do ETH sobre a fisiologia da planta, analisando a fotossíntese, respiração e fotorrespiração;
- Caracterizar a ocorrência de abscisão foliar em resposta a restrição hídrica, isoladamente ou em conjunto com o STS;
- Quantificar e comparar as atividades das enzimas antioxidantes após os tratamentos com STS e Seca;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições de cultivo e exposição aos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com proteção de sombrite 50% de sombreamento nas laterais e em cobertura de lona plástica transparente a 2,50 metros de altura, do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - GO, Brasil (17°48'18.33" de latitude sul e 50°54'0.04" de longitude oeste e 748 m de altitude), durante os meses de novembro/2018 a janeiro de 2019. As mudas de Baru (*Dipteryx*

alata) foram adquiridas em viveiro florestal na cidade de Rio Verde e foram selecionadas de acordo com o tamanho e a idade (4 meses), contendo no substrato fertilizante de lenta liberação Osmocote® (19-06-10) com tempo de liberação de 3 a 4 meses, cobertura via foliar de fosfato monoamônico (MAP) purificado (750 g por 100 L de água) a cada 15 dias. Sendo, posteriormente, transplantadas em citrovasos de 4 litros, com solo na proporção de 2:1 (solo de área não cultivada e areia), adubadas de acordo com a análise de solo e laudo de recomendação (solo adubado com 1,5 g de superfosfato simples (00-90-00), 0,2g de cloreto de potássio (00-00-40) e 0,2 de ureia (30-00-00) por vaso. A temperatura média e umidade relativa média durante o período de avaliação foram 25°C e 60°C, respectivamente. Após 30 dias para aclimação às condições de cultivo, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: Controle (plantas irrigadas diariamente); Controle + STS (plantas irrigadas e tratadas com 0,1 mM de tiosulfato de prata (STS)); Seca (suspensão gradual da irrigação, até que o solo atinja 30% da capacidade de campo); Seca + STS (plantas submetidas à seca e tratadas com STS). O STS foi utilizado aqui como um inibidor da ação do ETH (Spricigo et al., 2010), sendo a concentração determinada experimentalmente por meio de testes de dose. O STS foi preparado a partir de uma solução estoque de tiosulfato de sódio 0,1 M e outra solução estoque de nitrato de prata 0,1 M, com uma razão molar entre o nitrato de prata e o tiosulfato de sódio de 1:4 (Heins et al., 1984), aplicando 25 mL do volume de calda por planta. As aplicações do STS foram feitas por aspersão foliar, com um dia de intervalo entre cada aplicação, utilizando-se um pulverizador manual. Todas as aplicações foram realizadas do lado de fora da casa de vegetação, a fim de evitar a contaminação dos tratamentos por deriva. As plantas permaneceram expostas aos tratamentos por 16 dias, sendo então utilizadas nas análises descritas a seguir.

3.2 Relações hídricas

3.2.1 Potencial hídrico

O potencial hídrico foi avaliado no período da antemãhã (05:00 h) (Ψ_{am}) e ao meio-dia (12:00) (Ψ_{md}), em folhas individuais de cada tratamento, com o auxílio de bomba de pressão tipo Scholander.

3.2.2 Potencial osmótico (Ψ_s)

O potencial osmótico foliar (Ψ_s) foi mensurado de acordo com Pask et al. (2012). As amostras foliares congeladas foram acondicionadas em seringas esterilizadas com trava de êmbolo e o suco celular foi extraído com a utilização de uma pipeta automática, sendo

acondicionado em microtubos devidamente identificados. Uma alíquota de 10 µL do suco celular foi utilizada para determinação da osmolaridade utilizando um osmômetro de pressão de vapor (modelo 5600; VAPRO). A determinação do Ψ_s foi realizada utilizando-se a equação de Van't Hoff:

$$\Psi_s = -R \times T \times C_s$$

Onde R é a constante universal dos gases (0.08205 L atm mol⁻¹K⁻¹), T é a temperatura em K (T K = T °C + 273) e C_s a concentração do soluto (M), usualmente expressa em atmosferas e convertida em MPa.

3.2.3 Transpiração

A transpiração foi avaliada por um analisador de gases infravermelho portátil (IRGA, modelo LI- 6800, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA).

3.2.4 Área foliar específica

A determinação da área foliar específica (AFE) foi realizada de acordo com (Crawley, 2009), na qual as folhas foram coletadas, tiveram sua área determinada e foram secas em estufa convencional até a obtenção do peso seco constante. A AFE foi calculada pela seguinte fórmula:

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

3.2.6. Caracterização da percentagem de abscisão foliar

O percentual de abscisão foliar, último estágio da senescência, foi determinada pela contagem do número total das folhas no primeiro e no último dia de aplicação dos tratamentos. O percentual foi calculado de acordo com o número de folhas remanescentes em cada ramo em relação ao número inicial de folhas (Segatto et al., 2013):

$$AF (\%) = 100 - (NFD / NFI * 100),$$

onde: NFD = número de folhas na data de avaliação e NFI = número de folhas inicial.

3.3 Análises Fisiológicas

3.3.1 Fotossíntese, respiração e fotorrespiração

A taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s), a concentração interna de CO₂ (C_i) e a taxa transpiratória (E) foram determinadas em sistema aberto, sob luz saturante (1.000 µmol m⁻² s⁻¹) e pressão parcial de CO₂ de 40 Pa. Para tanto,

utilizou-se um analisador de gases a infravermelho (LI-6800, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6800, LI-COR). Com o mesmo analisador a respiração noturna (R_N), ou taxa de assimilação líquida de 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).

Na antemanhã, foi obtida a fluorescência mínima (F_0) via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade ($0,03 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluorescência m\u00e1xima (F_m) foi obtida pela aplica\u00e7\u00e3o de um pulso de 0,8 s de luz act\u00ednica saturante ($8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel (F_v) foi determinada pela diferen\u00e7a entre F_0 e F_m e a partir desses valores, foi calculado o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II. As folhas foram aclimatadas \u00e0 luz act\u00ednica ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 60 s, a fim de se obter a fluoresc\u00eancia transiente (F_s), seguido por um pulso de luz saturante para estimar-se a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima \u00e0 luz ($F_{m'}$) e, por \u00faltimo, foi aplicado um pulso de luz vermelho-distante, para obten\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia m\u00ednima ap\u00f3s aclima\u00e7\u00e3o \u00e0 luz act\u00ednica (F_0'). Com esses par\u00e2metros, foram calculados os coeficientes de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica (qP), a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do transporte de el\u00e9trons associado ao fotossistema II (ϕFSII) e a efici\u00eancia de captura de energia de excita\u00e7\u00e3o pelos centros de rea\u00e7\u00e3o abertos ($F_v'/F_{m'}$), conforme (Maxwell e Johnson, 2000).

O fluxo de el\u00e9trons usado para carboxila\u00e7\u00e3o (J_c) e oxigena\u00e7\u00e3o (J_o) da RuBP, bem como a taxa de fotorrespira\u00e7\u00e3o da Rubisco (PR) foram obtidas usando-se as f\u00f3rmulas propostas por Valentine et al., (1995).

3.4 An\u00e1lises Bioqu\u00edmicas

Para determina\u00e7\u00e3o da forma\u00e7\u00e3o de esp\u00e9cies reativas de oxig\u00eanio (ROS), a concentra\u00e7\u00e3o de H_2O_2 foi quantificada macerando-se aproximadamente 0,25g de tecidos foliares com o aux\u00edlio de nitrog\u00eanio l\u00edquido. O tecido foliar foi homogeneizado em meio de extra\u00e7\u00e3o composto por tamp\u00e3o fosfato de pot\u00e1ssio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. As amostras foram ent\u00e3o centrifugadas a $10.000 \times g$, por 15 minutos, a 4°C (Kuo e Kao, 2003). Adicionou-se 100 μL do sobrenadante em 250 μM de meio de rea\u00e7\u00e3o contendo FeNH_4SO_4 , 25 mM de \u00e1cido sulf\u00farico, 250 μM de laranja de xilenol e 100 mM de sorbitol (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram incubadas no escuro durante 30 minutos e a leitura da absorv\u00eancia determinada em espectrofot\u00f4metro UV-VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA) a 560 nm. As concentra\u00e7\u00f5es do H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibra\u00e7\u00e3o preparada com padr\u00f5es de H_2O_2 e normalizadas em fun\u00e7\u00e3o do peso das amostras.

3.4.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica

O dano oxidativo nas membranas celulares foi estimado pela quantificação de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso na forma de malonaldeído (MDA) (Cakmak e Horst, 1991). Para isso, macerou-se aproximadamente 0,25g de tecidos foliares com o auxílio de nitrogênio líquido, sendo o tecido homogeneizado em 2ml de solução contendo 0,1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) em conjunto com 20% de polivinilpirrolidona (PVPP). O homogenato foi então centrifugado a 15.000 x g por 15 min a 4°C. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada 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. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 15000 x g por 15 min a 4 °C. A leitura da absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA) a 532 nm e 660 nm. 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 nmol de MDA g^{-1} MS.

3.4.3 Ensaio de enzimas antioxidantes

3.4.3 Ensaio de enzimas antioxidantes

Foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes Dismutase do Superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), Peroxidase (POX, EC 1.11.1.7), Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e Redutase da Glutaciona (GR, EC 1.6.4.2). Para isso, aproximadamente 0,30g de amostras foliares foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, contendo EDTA 0,1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (Peixoto et al., 1999; Carlberg e Mannervik, 1985). A seguir, os homogenatos foram submetidos a centrifugação a 12.000 g por 15 min, a 4°C, sendo os sobrenadantes utilizados como extrato enzimático bruto. Os seguintes meios de reação foram utilizados: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM , para SOD (Giannopolitis e Ries, 1977); tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogallol 20 mM e H_2O_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_2O_2 1 mM, para APX (Peixoto et al., 1999) e 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 SOD as amostras foram iluminadas por 5 min e absorbância foi lida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotoredução do NBT (Giannopolitis e Ries, 1977). As atividades das enzimas POX e APX foram estimadas pela leitura da absorbância durante o primeiro minuto de reação, nos comprimentos de onda de 420 e 290 nm, respectivamente (Peixoto et al., 1999).

3.5 Análises estatísticas

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado (DIC), composto com quatro tratamentos e seis repetições cada, sendo os dados submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste SNK, a 0,05% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico RStudio.

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos relacionados as relações hídricas

4.1.1 Potencial hídrico e osmótico, teor de prolina e taxa transpiratória

Como o intuito de analisar os efeitos do déficit hídrico em conjunto com o inibidor da ação do fitohormônio ETH, avaliamos diversos parâmetros para obtenção de resultados capazes de esclarecer o papel do ETH nas relações hídricas das plantas. Alterações nos parâmetros do potencial hídrico (Ψ_w), osmótico (Ψ_s) e taxa transpiratória (E) foram observadas após os tratamentos (Fig. 1 A-E). Em relação ao Ψ_{am} , alterações foram observadas apenas quando a seca foi imposta em associação com o inibidor da ação do etileno (Fig. 1A), enquanto o Ψ_{md} foi diferente dos tratamentos controle em ambas as condições de déficit hídrico, sendo mais negativo no tratamento DH+STS (Fig. 1B). O Ψ_s , por outro lado, foi diferente dos controles apenas nas plantas expostas apenas à seca (Fig. 1C). O conteúdo de prolina não se alterou em nenhum dos tratamentos analisados (Fig. 1D), enquanto a transpiração foi consideravelmente menor nas plantas expostas à ambas as condições de déficit hídrico, embora essa diminuição tenha sido mais acentuada no tratamento DH (Fig. 1E).

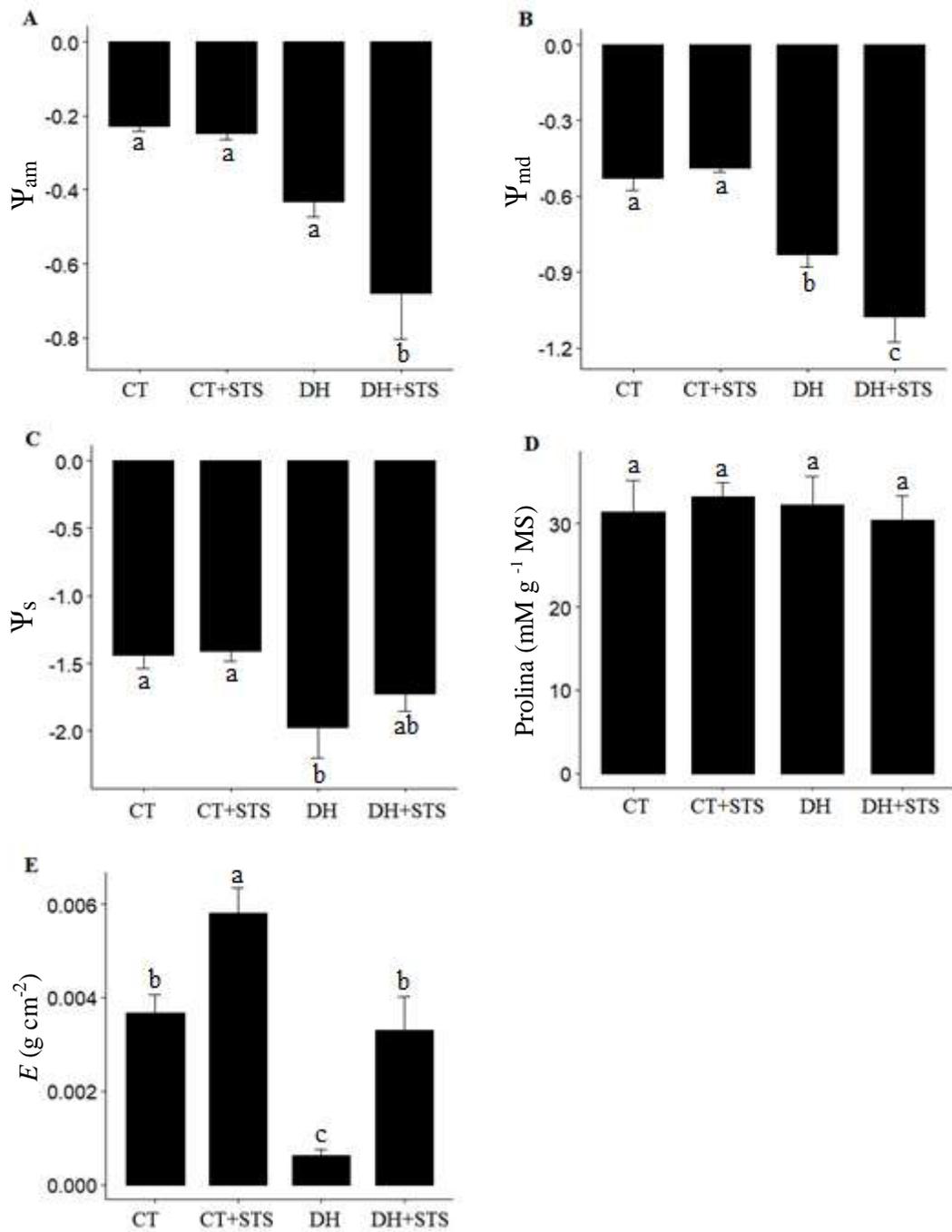


Figura 1 – Potencial hídrico da antemã (Ψ_{am}) (A), potencial hídrico da meio-dia (Ψ_{md}), (B), potencial osmótico (Ψ_s) (C), teor de prolina (D) e taxa transpiratória (E) (E), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.1 Efeito dos estresses abióticos nos processos fisiológicos

4.1.1 Fluorescência da clorofila *a*

A exposição de *Dipteryx alata* aos tratamentos não desencadeou alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (Tabela 1). Desse modo, todos os tratamentos se mantiveram semelhantes ao controle em todos os parâmetros avaliados: fluorescência mínima (F_0), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{PSII}) e quenching não fotoquímico (NPQ).

Tabela 1 - Parâmetros da fluorescência da clorofila: fluorescência mínima (F_0), quenching não fotoquímico (NPQ), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{PSII}), em plantas de *Dipteryx alata* com tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS).

Fluorescência da clorofila					
Tratamentos	F_0	NPQ	ETR	F_v/F_m	ϕ_{PSII}
CT	603.65 a	2.705 a	91.785 a	0.824 a	0.185 a
CT+STS	587.08 a	1.874 ab	96.026 a	0.814 a	0.192 a
DH	593.56 a	2.408 a	89.412 a	0.784 a	0.178 a
DH+STS	605.68 a	2.468 a	87.240 a	0.814 a	0.172 a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.1.2 Trocas gasosas

A exposição das plantas à seca teve forte impacto sobre as trocas gasosas das plantas, o que foi atenuado, ainda que parcialmente, pela adição do inibidor de ETH. Os parâmetros taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s), eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s), a razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) e a respiração noturna (Rn) foram alterados após os tratamentos (Fig. 2 A-E). A taxa de assimilação líquida do carbono (A) foi negativamente afetada em ambas as condições de seca, sendo esse efeito mais pronunciado quando o déficit hídrico foi imposto isoladamente para as plantas (Fig. 2A). A condutância estomática (g_s), por sua vez, apresentou quedas apenas no DH, enquanto no tratamento DH+STS g_s permaneceu similar ao controle (Fig. 2B). É interessante observar, ainda, que a aspersão de STS nas plantas irrigadas (CT+STS) aumentou g_s . Como reflexo dessas alterações, a eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) foi muito superior no DH do que nos demais tratamentos (Fig. 2C). Em relação à razão entre a concentração interna e externa de CO_2

(C_a/C_i), observou-se queda nas duas condições de restrição hídrica (Fig. 2D). Não foi observado diferença significativa no parâmetro de respiração noturna (R_n) entre os tratamentos em relação ao CT (Fig. 2E).

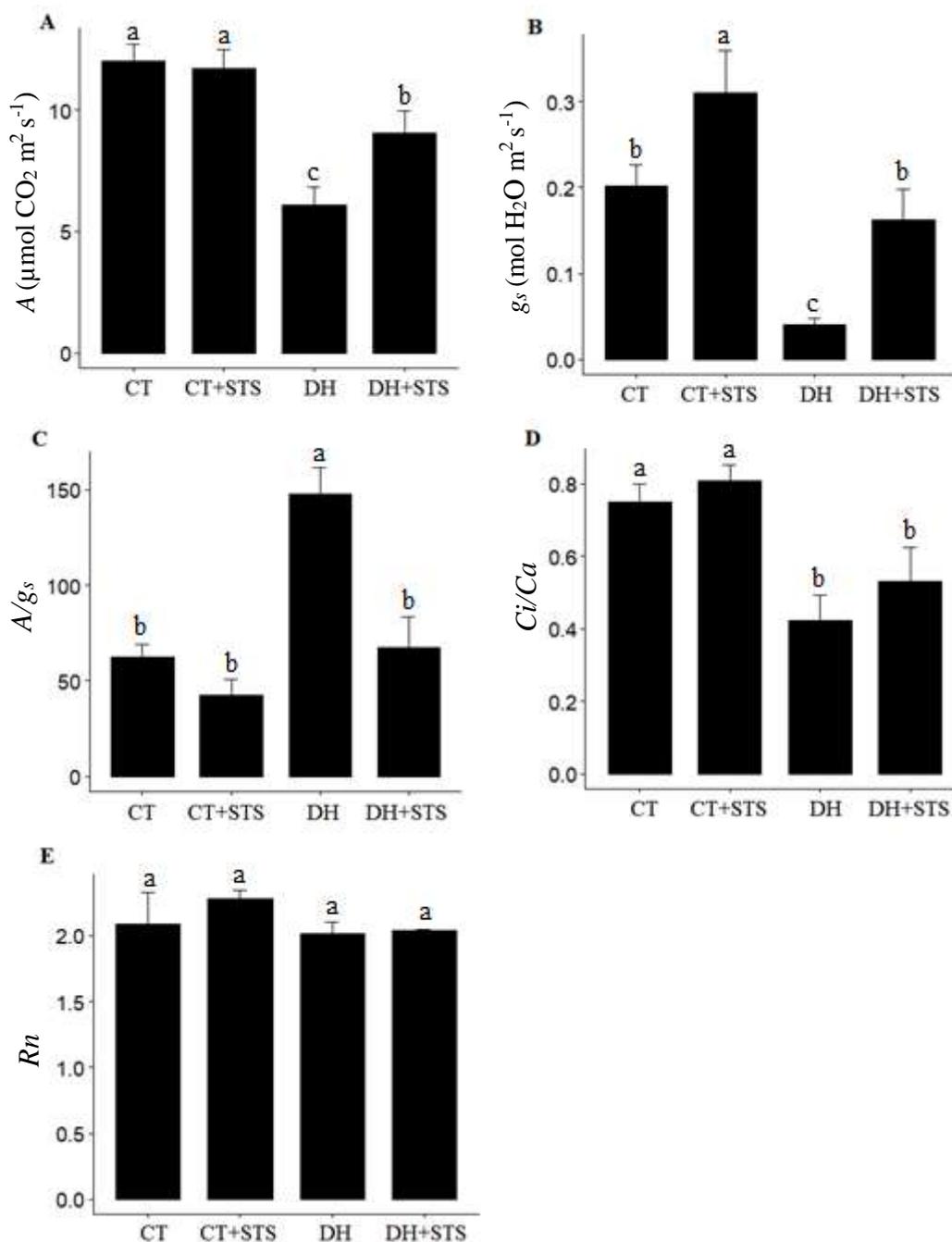


Figura 2 – Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) (C), razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) (D) e respiração noturna (R_n) (E), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com

0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.1.3 Fotorrespiração

Plantas submetidas ao DH apresentaram incremento na taxa fotorrespiratória (R_p), enquanto nos tratamentos CT+STS e DH+STS esse parâmetro se manteve próximo ao CT (Fig. 4A). Consequentemente, a taxa de elétrons para a carboxilação (ETR_c) diminuiu no tratamento DH (Fig. 4B), enquanto a taxa de transporte de elétrons para oxigenação (ETR_o) aumentou (Fig. 4C), resultando em queda na razão ETR_c/ETR_o (Fig. 4D). As razões R_p/A e R_d/A , por sua vez, aumentaram consideravelmente quando as plantas foram submetidas apenas à restrição hídrica (Fig. 4 E-F).

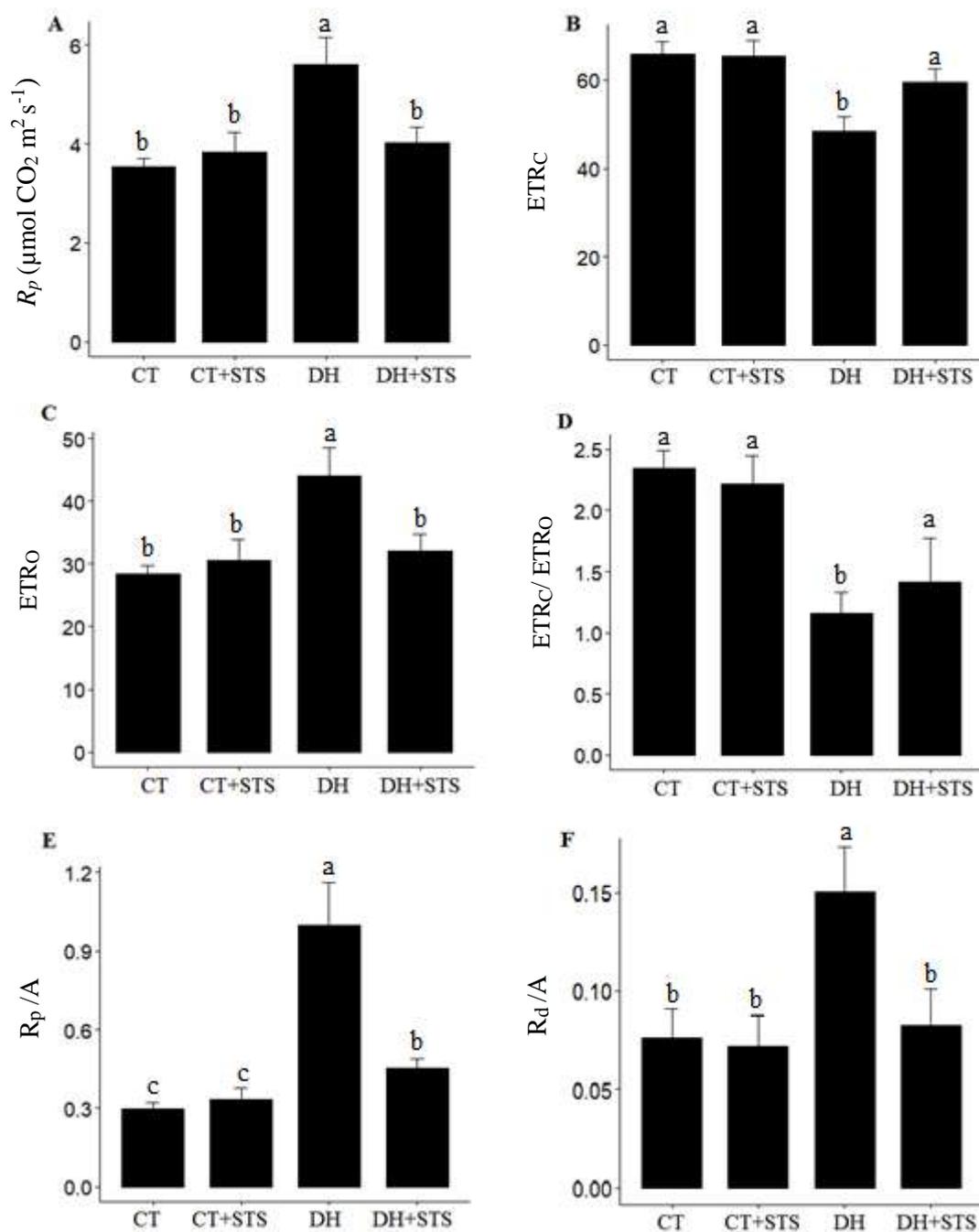


Figura 3 - Fotorrespiração (R_p) (A), taxa de carboxilação da Rubisco (ETRc) (B) e taxa de oxigenação da Rubisco (ETRo) (C), razão entre a taxa de carboxilação sobre a taxa de oxigenação da Rubisco (ETRc/ ETRo) (D), razão entre a taxa fotorrespiratória sobre a fotossintética (R_p/A) (E) e taxa de respiração diurna sobre a fotossíntese (R_d/A) (F), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.2 Influência dos estresses abióticos na morfologia e em processos bioquímicos

4.2.1 Área foliar específica e pigmentos cloroplastídicos

A área foliar específica (AFE) se manteve constante em todos os tratamentos aqui analisados (Fig. 3A). Em relação ao teor de clorofilas, o tratamento DH+STS apresentou diminuição no conteúdo de clorofila *a* em comparação ao CT, enquanto clorofila *b* foi diminuído em todos os tratamentos, CT+STS, DH e DH+STS (Fig. 3B-C). Em relação a clorofila total (Chl_{total}), plantas em DH+STS apresentaram queda significativa neste parâmetro em comparação ao DH, que este por sua vez, não diferiu estatisticamente ao CT+STS (Fig. 3D). No entanto, em relação entre a razão da clorofila *a* e *b* (Chl_a/Chl_b) e conteúdo de carotenoides não houve diferença significativa entre tratamentos (Fig. 3E-F).

4.2.2 Estresse oxidativo, danos às membranas e mecanismos de defesa antioxidante

A imposição do estresse hídrico de forma isolada aumentou a concentração de H_2O_2 nas células vegetais, o que não foi observado nos demais tratamentos (Fig. 5A). Esse incremento na concentração de H_2O_2 , no entanto, não se refletiu em danos nas membranas celulares de *D. alata*, sendo que a concentração de MDA foi estatisticamente próximo ao CT em todos os tratamentos (Fig. 5B).

Dentre as enzimas do metabolismo antioxidante analisadas, observou-se alterações significativas nas atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR) em pelo menos um dos tratamentos analisados (Fig. 5 C-F). Em relação à SOD, incrementos na atividade enzimática foram observados apenas nas plantas expostas ao DH (Fig. 5C), enquanto as enzimas APX e GR aumentaram sua atividade no tratamento DH+STS, não tendo sido observadas alterações na atividade da POX em nenhum dos tratamentos (Fig. 5 D-F).

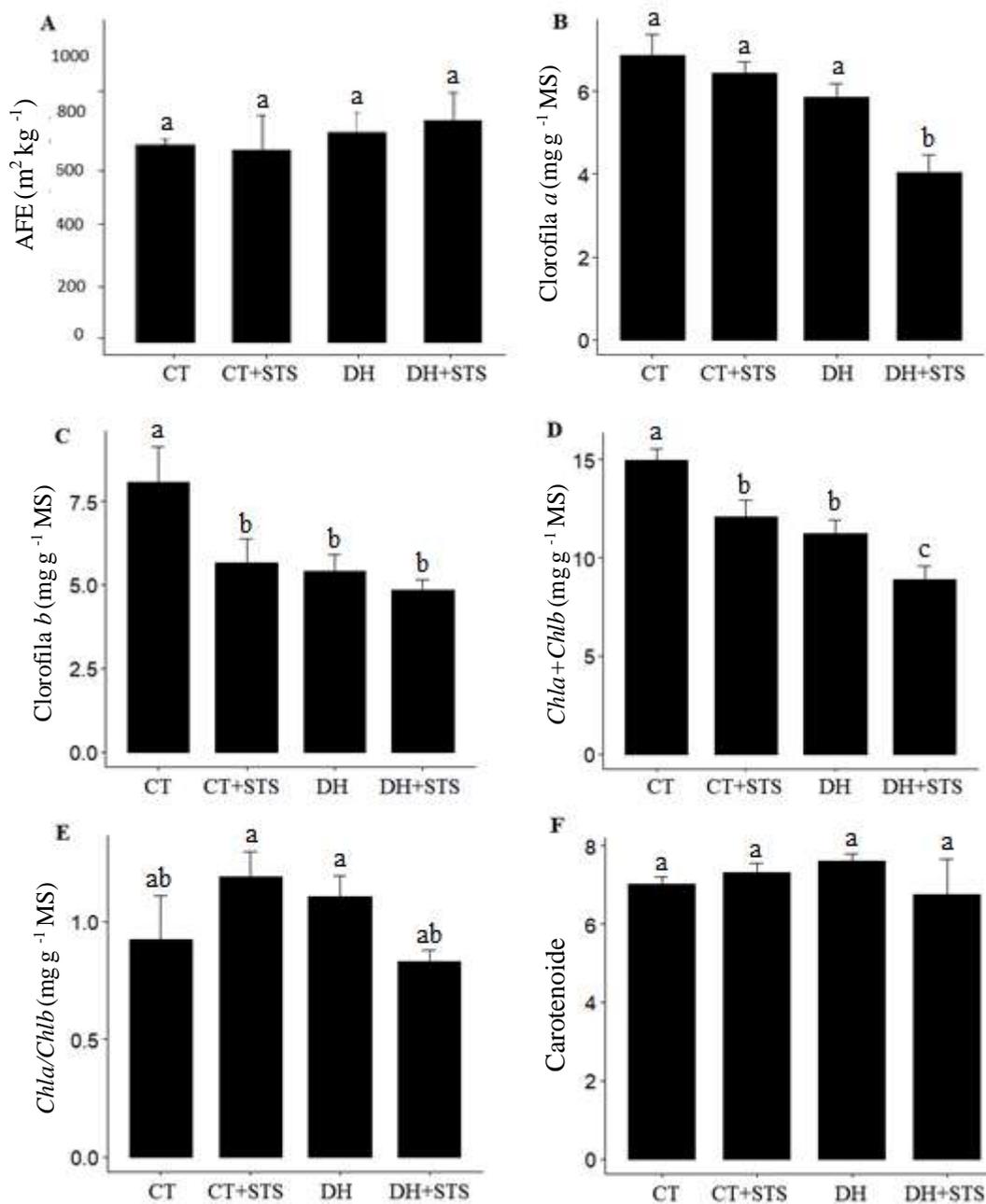


Figura 4 – Área foliar específica (AFE) (A), clorofila a (B), clorofila b (C), clorofila total (Chl a+ Chl b) (D), razão entre a clorofila a e b (*Chla/Chlb*) (E), carotenoides (F), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

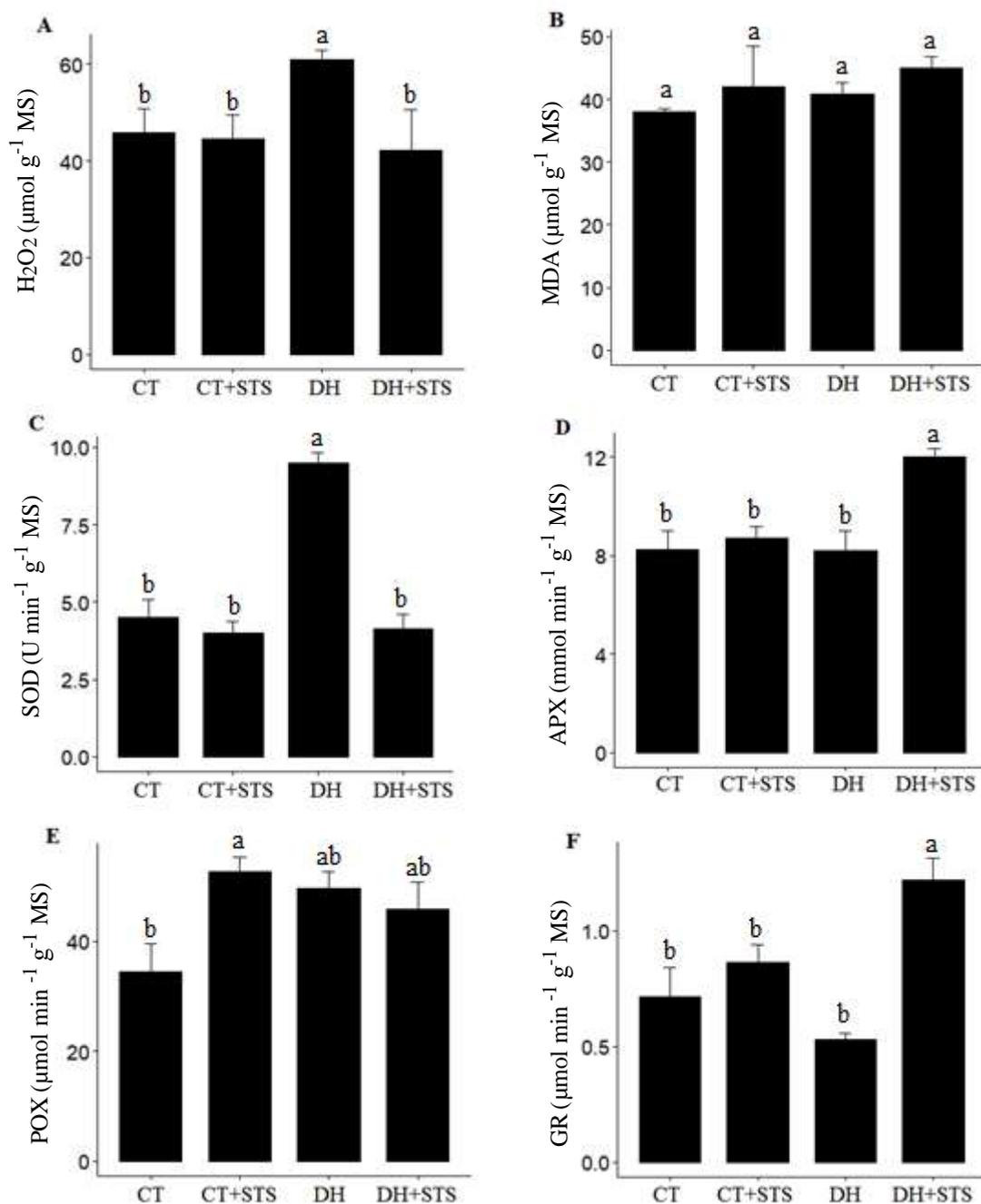


Figura 5 – peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (A), malonaldeído (MDA) (B), superóxido dismutase (SOD) (C), ascorbato peroxidase (APX) (D), peroxidase (POX) (E), glutathiona redutase (F), nos tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.4. Abscisão foliar

A maior porcentagem de abscisão foliar, processo que ocorre após a senescência foliar, foi observada nas plantas expostas ao DH, enquanto DH+STS foi semelhante ao controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros da senescência foliar (AF) em plantas de *Dipteryx alata* com tratamentos: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS).

Senescência foliar (AF)	
Tratamentos	AF (%)
CT	0.00 b
CT+STS	0.00 b
DH	6.45 a
DH+STS	0.82 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

Plantas adaptadas ao clima do cerrado apresentam diversas estratégias para gerenciar sua resposta frente a eventos estressantes, principalmente de seca, estresse recorrente que se estende por até seis meses nesse bioma (Macena et al., 2008; Palhares et al., 2010). Neste trabalho, analisamos o efeito do fitohormônio ETH na reposta de plantas de Baru (*Dipteryx alata*) expostas ao déficit hídrico moderado (30% da capacidade de campo), utilizando um inibidor da ação de ETH (tiosulfato de prata - STS). Foi possível constatar que o ETH está envolvido em diversas alterações fisiológicas nas plantas submetidas à restrição hídrica, ocasionando o fechamento estomático e reprogramando o metabolismo celular, o que, em conjunto, permitiu a manutenção de um Ψ_w menos negativo.

Uma das principais consequências da diminuição da disponibilidade de água no solo consiste na desidratação dos tecidos vegetais e queda no Ψ_w (Silva, 2017). Plantas capazes de manter um bom status hídrico geralmente apresentam menos danos celulares, o que se reflete em maior tolerância e maior sobrevivência na condição estressante (Hossain et al., 2014; Sousa et al., 2019). Embora ambos os tratamentos de restrição hídrica tenham promovido quedas no Ψ_{md} , a queda mais acentuada desse parâmetro nas plantas expostas ao tratamento DH+STS é um indicativo de falha na regulação do mecanismo de abertura e fechamento estomático exercido pelo ETH no tecido foliar (Müller & Munné-Bosch, 2015). A manutenção do Ψ_{am} , por outro lado, denota maior habilidade das plantas expostas apenas à seca para retirar água do solo e

transportar até as folhas (Menezes-Silva et al., 2017), o que não ocorreu na ausência do ETH, indicando que a inibição da ação do fitohormônio pode ter comprometido a condutividade hidráulica da planta, impedindo assim a reidratação dos tecidos foliares (Yan et al., 2017).

Quando o Ψ_w da planta é reduzido pela restrição hídrica, geralmente ocorre o acúmulo de solutos na célula vegetal, o que pode ocorrer tanto passivamente, como consequência do menor conteúdo de água, ou ativamente, devido ao ajustamento osmótico, o que contribui para a manutenção do turgor celular (Singh et al., 2015; Basu et al., 2016). De fato, há existência de uma gama de solutos compatíveis que tendem a se acumular no tecido vegetal, o que reduz o Ψ_s (Marijuan e Bosch, 2013, Alves, 2017). Porém não foi observado acúmulo de prolina em nenhum dos tratamentos, sendo estatisticamente igual para todos. Comportamento semelhante foi observado em trabalho com *Dipteryx alata* submetidas à seca (Alves, 2018). Isso pode ser um indicativo de que este aminoácido nesta espécie não atua diretamente no ajuste osmótico e que outros solutos osmocompatíveis podem participar de forma efetiva neste processo, como carboidratos, demais aminoácidos e compostos nitrogenados (Servillo et al., 2011; Alves, 2017).

Além de alterar o Ψ_w celular, a exposição das plantas às condições estressantes também afetou a concentração de pigmentos fotossintéticos, resposta comumente observada em plantas expostas à seca (Farooq et al., 2009; Din et al., 2011). Esse tipo de alteração pode ser devido tanto ao comprometimento da síntese de pigmentos quando devido ao aumento na degradação dessas moléculas (Din et al., 2011; Asharaf e Harris, 2013). A manutenção na concentração desses pigmentos é, portanto, considerada uma característica robusta na tolerância de plantas ao estresse (Carvalho et al., 2015; Silva, 2017), já tendo sido documentada em estudos com as espécies *Eriotheca pubescens*, *Vellozia squamata* e *Sclerolobium paniculatum* (Carvalho, 2005) e *Jatropha curcas* submetidas ao déficit hídrico (Moura et al., 2016).

Embora o déficit hídrico não tenha afetado nenhum dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, a exposição das plantas à seca teve forte impacto sobre a taxa fotossintética, principalmente no tratamento DH. Essa queda mais intensa na fixação de carbono das plantas expostas apenas ao déficit hídrico não envolveu danos bioquímicos e foi decorrência do maior fechamento estomático, conforme evidenciado pela redução das taxas C_i/C_a . É plausível assumir, portanto, que a inibição da ação do etileno comprometeu a cascata de sinalização para o fechamento estomático, a qual envolve a interação (cross-talk) com outros sinalizadores, como o ácido abscísico (ABA) (Beguerisse-Diaz, 2012; Muller e Munné-Bosch, 2015). Como consequência, as plantas do tratamento DH+STS mantiveram maior g_s , maior fotossíntese, mas menor eficiência intrínseca do uso da água, sendo que este foi, provavelmente, um dos principais fatores responsáveis pelos menores valores de Ψ_w neste tratamento, uma vez que o fechamento

estomático representa o primeiro mecanismo de defesa em resposta à seca, sendo essencial para manutenção do status hídrico celular (Alves, 2018). De fato, as plantas no tratamento DH+STS também apresentaram maior taxa transpiratória em comparação com as plantas submetidas à seca isoladamente. Assim, embora a ausência do ETH mantenha temporariamente a fotossíntese das plantas, a longo prazo ela pode resultar na dessecação excessiva da planta e até mesmo na morte vegetal.

O processo fotorrespiratório (R_p) é essencial para as plantas sob estresse abiótico, sendo cuidadosamente regulado em condições adversas (Millar et al., 2011; Osakabe et al., 2014). Com efeito, vias alternativas de dissipação do excesso de energia de excitação são especialmente importantes em plantas expostas à seca. De acordo com Martins et al. (2014) a fotorrespiração pode ser benéfica na dissipação do excesso de energia de excitação da cadeia de transporte de elétrons cloroplastídica. Esse mecanismo aparentemente foi importante para as plantas submetidas apenas à seca, as quais apresentaram, além dos incrementos na R_p , maior direcionamento de elétrons para esse processo, conforme evidenciado pelos valores de ETR_c , ETR_o e pela razão R_p/A e ETR_c/ETR_o . O mesmo não ocorreu no tratamento DH+STS, o que provavelmente está relacionado com a manutenção de maior g_s pelas plantas nesta condição. De fato, o fechamento estomático estimula a fotorrespiração como consequência da diminuição na concentração de CO_2 no estroma, diminuindo assim a razão C:O (Kangasjärvi et al., 2012).

Em adição às alterações nos processos fisiológicos, a imposição da seca também alterou processos bioquímicos, como a atividade de enzimas antioxidantes. A manutenção de níveis constantes de ROS nas células vegetais envolve a participação de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, atuantes na eliminação desses compostos (Farnese et al., 2016). Entre os antioxidantes enzimáticos, a superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima na rota de desintoxicação celular de ROS, convertendo o O_2^- (ânion superóxido) em H_2O_2 , o qual pode, por sua vez, ser eliminado da célula pela ação de enzimas específicas, como ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX) e glutatona redutase (GR) (Farnese et al., 2016). Incrementos na atividade da SOD foram observados apenas nas plantas do DH, o que, juntamente com a manutenção da atividade da APX, POX e GR, explica os maiores níveis de H_2O_2 observados nesse tratamento. Convém salientar, no entanto, que a concentração de H_2O_2 aparentemente não foi suficientemente alta a ponto de desencadear danos celulares, como evidenciado pela manutenção dos níveis de MDA. Uma vez que esses resultados não foram observados nas plantas submetidas ao DH+STS, nas quais observou-se incremento na atividade de enzimas envolvidas na eliminação do H_2O_2 , é possível que o aumento dessa ROS seja resultado de vias de sinalização envolvendo o ETH. Sabe-se que, embora sejam potencialmente danosas em altas concentrações,

as ROS são importantes agentes sinalizadores em condições de estresse (Van Breusegem e Dat, 2006). De fato, muitos mecanismos de defesa são ativados pela célula em resposta ao aumento na concentração de ROS, o que muitas vezes demanda a inibição temporária da atividade de enzimas antioxidantes (del Río, 2015). Em contrapartida, diversos estudos em diferentes espécies já evidenciaram que o fechamento estomático mediado pelo etileno requer o aumento na concentração de H₂O₂ (Desikan et al., 2006; He et al., 2011; Shi et al., 2015). É plausível assumir, portanto, que o maior fechamento estomático observado nas plantas expostas apenas à seca foi resultado de uma via de sinalização desencadeada pelo ETH, a qual envolveu aumento da atividade da SOD e inibição das enzimas APX e GR, promovendo assim o incremento na concentração de H₂O₂. Até onde foi possível constatar, esse é o primeiro estudo a propor uma via de sinalização para fechamento estomático envolvendo H₂O₂ e ETH em plantas nativas do cerrado brasileiro, embora investigações mais profundas sejam necessárias para confirmar ou refutar essa hipótese, além de identificar os outros possíveis agentes envolvidos nessa rota, bem como outras possíveis fontes de H₂O₂.

Diante das alterações mencionadas acima é válido colocar em ressalva que em estudos de plantas submetidas à restrição hídrica já é muito bem documentada a participação do ETH nos fenômenos de senescência e abscisão foliar, sendo um comportamento comum em plantas na seca, uma vez que limita a perda de água foliar e gasto energético para sua manutenção (Estornell et al., 2013). No presente estudo, houve diferença significativa na abscisão foliar decorrente da senescência foliar apenas nas plantas do tratamento DH, indicando que o STS bloqueou efetivamente a via de sinalização do ETH, interrompendo o processo de senescência e abscisão foliar. Os dados aqui encontrados reforçam mais uma vez a atuação do ETH nesse processo em plantas expostas à restrição hídrica, conforme documentado em diversos outros estudos (Desikan et al., 2006; Cui et al., 2015; Nascimento et al., 2018). É possível observar, portanto, que o ETH agiu em diferentes vias para minimizar a perda de água em *D. alata* e manter assim o status hídrico da célula, sendo uma molécula essencial para a resposta das plantas expostas à seca.

5. CONCLUSÃO

A exposição de *Dipteryx alata* ao estresse hídrico, isoladamente ou em combinação com o inibidor de etileno (STS), teve profundos efeitos sobre a fisiologia vegetal. Em relação à fotossíntese, plantas submetidas à seca em associação com o STS foram capazes de manter maiores taxas desse processo, como consequência da maior condutância estomática observada nesse tratamento. A manutenção da atividade fotossintética é um dos principais objetivos em estudos com culturas, uma vez que maior fotossíntese se reflete em maior estabilidade de

produção, sendo que inibidores do hormônio etileno (ETH) são comumente utilizados na agricultura para aumentar a “tolerância” das plantas à seca. Esses resultados, no entanto, devem ser interpretados cuidadosamente quando se trata de uma planta nativa do cerrado, a qual apresenta ciclo de vida longo e enfrenta períodos de seca que podem se alongar por até seis meses e que ocorrem de forma cíclica. Nesse caso, qual seria o custo da manutenção do processo fotossintético? De fato, embora plantas no DH tenham apresentado menor taxa de assimilação de carbono em decorrência da menor condutância estomática, isso se refletiu em menor transpiração, diminuindo assim a perda de água para a atmosfera. É provável que o fechamento estomático tenha sido resultado de uma cascata de sinalização desencadeada pelo ETH, a qual envolveu o aumento na concentração de H₂O₂. Além disso, nas plantas nas quais o ETH estava ativo, observou-se maior abscisão foliar, o que, juntamente com a redução na transpiração, contribuiu para a manutenção do potencial hídrico celular, tanto na antemanhã quanto ao meio dia. É plausível assumir, portanto, que em secas mais prolongadas e/ou intensas as plantas no tratamento DH+STS apresentariam um quadro grave de dessecação dos tecidos vegetais, o que aceleraria a morte vegetal, a despeito da manutenção do processo fotossintético. Por outro lado, é possível que, em secas mais prolongadas, a queda na fotossíntese nas plantas expostas apenas à seca levasse à depleção das reservas de carbono, o que também poderia resultar na morte da planta. Assim sendo, embora este trabalho tenha evidenciado que o ETH é importante para manter o status hídrico vegetal por meio de diversas alterações fisiológicas, levanta-se também a questão de qual fator seria preponderante para a sobrevivência das plantas em condições de seca: a manutenção do status hídrico ou a manutenção da fotossíntese e das reservas de carbono.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida LV et al (2017) Seasonal changes of fructans in dimorphic roots of *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) Blake (Asteraceae) growing in Cerrado. **Sci Total Environ**, 598:404–412.
- Alves RDFB (2018) **Memória a seca no cerrado: aclimação diferencial do baru** (*Dipteryx alata* Vogel). Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO. 48f.
- Arraes FB et al. (2015) Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. **BMC Plant Biol**, 15:213.
- Asharaf M et al (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, 51: 163-190
- Bai J et al (2008) Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. **Photosynthetica**, 46(2):232-237.
- Basu S (2016). Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**, 5, 1554.
- Beguerisse-Diaz M et al. Compound stress response in stomatal closure: a mathematical model of ABA and ethylene interaction in guard cells. **BMC systems biology**, 6(1):146, 2012.

- Brasil (2015a) Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. **Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite: Cerrado 2010-2011**. Brasília, 2015a. 16p.
- Brasil (2015b) Ministério do Meio Ambiente. **Mapeamento do uso e cobertura da terra do Cerrado: Projeto TerraClass Cerrado 2013/MMA/ SBF**. Brasília: MMA, 67p.
- Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, 113(1):484-490.
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol Plant**, 83(3):463–468.
- Crawley MJ (2009) Life History and Environment. In: Crawley MJ (Ed.). **Plant Ecol**. 2. ed. Oxford - UK: Blackwell Publishing Ltd., p. 73–131.
- Carvalho PA (2015) **Metabolismo do nitrogênio e carbono em plantas de seringueira submetidas à hipoxia e diferentes fontes de nitrogênio**. Doctorate Thesis, UFLA, 2015. 168p.
- Carvalho APF (2005) **Estudo de características foliares de espécies de lenhosas de Cerrado e sua relação com os espectros de reflectância**. Universidade de Brasília, Brasília, 126f.
- Carvalho M et al (2019). Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. **J Plant Phys**. 1-47.
- Chen L et al (2013). Ethylene limits abscisic acid- or soil drying-induced stomatal closure in aged wheat leaves. **Plant, Cell Environ**, 36(10):1850–1859.
- Cui M et al. (2015) Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis*. **J Plant Biol**, 58:193-201.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I (2013). Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. **Front Plant Sci**, 4:138.
- del Río LA (2015) ROS and RNS in plant physiology: an overview. **J Exp Bot**, 66(10), 2827–2837.
- Demmig-Adams B et al (2018) Optimization of photosynthetic productivity in contrasting environments by regulons controlling plant form and function. **Int J Mol Sci**, 19(3):872.
- Desikan R et al (2006) Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. **Plant J**, 47: 907–916.
- Din J et al (2011) Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. *The J. Anim.* **Plant Sci**, 21:78-82.
- Dubois M (2017) Time of day determines *Arabidopsis* transcriptome and growth dynamics under mild drought. **Plant Cell Environ**, 40:180–189.
- Dubois M et al (2018) The pivotal role of ethylene in plant growth. **Trends Plant Sci**. 23(4):311–323.
- Estornell LH et al. (2013). Elucidating mechanisms underlying organ abscission. **Plant Sci**. 199–200:48–60.
- Fahad S et al (2017). Crop Production under drought and heat stress: plant responses and management options. **Front Plant Sci**, 8:1147.
- Farnese FS et al (2016). When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. **Front Plant Sci**, 7.
- Farooq M et al (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agron Sustain Dev**. 29: 185–212
- Fernandes GW et al (2016) Bioma em transformação. In: Fernandes GW et al. **Cerrado: em busca de soluções sustentáveis**. Rio de Janeiro: Vertente produções artísticas, p. 80-102.
- Ferrari E (2015) Déficit hídrico no metabolismo da soja em sementeiras antecipadas no Mato Grosso. **Nativa**, 3(1):67-77, 2015.

- Gay C, Gebicki, JMA (2000) Critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric–xylenol orange hydroperoxide assay. **Anal Biochem**, 284(2): 217–220.
- Gaion LA et al (2017) Ethylene modulates tomato growth during drought stress. **HOLOS Environ**, v. Suplem, p. 8195.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases, Occurrence in higher plants. **Plant Physiol**, 55:6.
- Guan X (2017) **Optimizing silver thiosulfate applications on cassava to block ethylene effects and improve flower retention for breeding purposes**. Master Thesis, Universidade Cornell, New York, 84p.
- Habben JE et al (2014) Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions. **Plant Biotech J**, 12:685–693.
- Han X et al (2018) Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: A review. **Fermentation**, 4(25):1-15.
- He J et al (2011) Ethylene mediates UV-B-induced stomatal closure via peroxidase-dependent hydrogen peroxide synthesis in *Vicia faba* L. **J Exp Bot**, 62(8):2657–2666.
- Heins RD et al (1984) Mixing and storage of silver thiosulphate. *Bedding Plants (BP) News*, 15:1-2.
- Hou Z et al (2013) Regulatory function of polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide in ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. **J Integr Agric**, 12(2), 251–262.
- Hossain MM et al (2014) Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. **Crop J** 6:366-380.
- Kangasjärvi S et al (2012). Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. **J Exp Bot**, 63(4), 1619–1636.
- Kuo MC, Kao CH (2003) Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Rice Leaves. **Biol Plant**, 46(1):149–152.
- Li J et al (2017) Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. **J Saudi Soc Agric Sci**, 16:82–88.
- Liu C et al (2014). Responses of antioxidant defense system to drought stress in the leaves of *Fargesia denudata* seedlings, the staple food on the Giant Panda. **Russ. J. Plant Physiol**. 3:374–383.
- Lopes MV (2016) **Índice de Possibilidade de Conversão à Agricultura (IPCA): Uma ferramenta na elucidação do fenômeno da expansão da fronteira agrícola em Goiás**. Doctorate Thesis, UFG. 223p.
- Macena F et al (2008) Clima do bioma cerrado. In: Albuquerque ACS, Silva AG (Eds.). *Agricultura Tropical*. 1. ed. Brasília - DF: Agricultura Tropical, p. 56
- Malheiros R (2016) A influência da sazonalidade na dinâmica da vida no bioma cerrado. **RBCLima**, 19:113-128.
- Matos FS et al (2018) Initial growth of *Dipteryx alata* plants under water deficit. **Rev Arv**, 42(1), e420103.
- Marijuan MP, Bosch SM (2013) Ecophysiology of invasive plants: Osmotic adjustment and antioxidants. *Trends in Plant Science*, 18(12): 660–666.
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **J Exp Bot**, 51:659– 668.
- Menezes-Silva PE (2014) **Aclimação fisiológica e bioquímica a ciclos de deficiência hídrica em clones de *Coffea canephora*** Viçosa, MG, 2014. 67f.
- Menezes-Silva PE et al (2017). Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. **J Exp Bot**, 68(15), 4309–4322.
- Merritt F, et al (2001) Inhibitors of ethylene biosynthesis inhibit auxin-induced stomatal opening in epidermis detached from leaves of *Vicia faba* L. **Plant Cell Physiol**, 42: 223–230.

- Millar AH et al (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annu Rev Plant Biol** 62:79-104.
- Moura AR et al (2016) Sob diferentes regimes hídricos water relations and organic solutes in young plants of *Jatropha curcas* L. under different water regimes. **Ciência Florestal**, 26(2):345-354.
- Müller M, Munné-Bosch S (2015) Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. **Plant Physiol**, 169(1):32-41.
- Myers N et al (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403:853-858.
- Nicco C, Batteux F (2017) ROS modulator molecules with therapeutic potential in cancers treatments. **Molecules**, 23(1):1-16.
- Nguyen HC et al (2018) Biochemical and physiological characteristics of photosynthesis in plants of two calathea species. **Int J Mol Sci**, 19 (3):704.
- Oliveira SSC et al (2017) Perfil do mercado varejista e consumidor de frutas nativas do Cerrado no município de Iporá-GO. **Cerr Agroc**, (8):61-74.
- Osakabe Y et al (2014) Response of plants to water stress. **Front Plant Sci**, 1338(5):1–8.
- Palhares D et al (2010) Respostas fotossintéticas de plantas do cerrado nas estações seca e chuvosa. **Rev Bras Bioc**, 8(2):213–220.
- Pask AJD (2012) Physiological Breeding II: A Field Guide to Wheat Phenotyping, in: Pierre CS, Arce, VT (Eds.), Osmotic adjustment. D.F.: CIMMYT, México, p. 21-24.
- Per TS et al (2018) Jasmonates in plants under abiotic stresses: Crosstalk with other phytohormones matters. **Environ Exp Bot**, 145:104–120.
- Petrov V et al (2015) ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Front Plant Sci**, 6:69, 1-16.
- Ping MA et al (2015) Effects of progressive drought on photosynthesis and partitioning of absorbed light in apple trees. **J Integr Agric**, 14(4):681-690.
- Rocha F (2016) **Caracterização química, física e termofísica da amêndoa do baru (*Dipteryx alata* Vog.)** 40 f. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.
- Saleem AR et al (2018) Drought response of *Mucuna pruriens* (L.) DC. inoculated with ACC deaminase and IAA producing rhizobacteria. **PLoS ONE**, 13(2): 1-18.
- Sales CRG et al (2015) Photosynthetic and antioxidant responses to drought during the sugarcane ripening. **Photosynthetica**, 53:547–554.
- Sano SM et al (2004) **Baru: biologia e uso**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 52 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 116).
- Sasidharan R et al (2018) Signal dynamics and interactions during flooding stress. **Plant Physiol**, 176(2): 1106–1117.
- Segatto FB et al (2013) Effects of ethylene on the post-production of potted ornamental peppers (*Capsicum annuum* L.). **Acta Hort**, 1000:217-222.
- Servillo L et al (2011) Proline derivatives in fruits of bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poit): Presence of N-methyl-l-proline and 4-hydroxy-l-prolinebetaine. **J Agri Food Chem**, 59(1):274–281.
- Shi J et al (2015). Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both *Arabidopsis* and Maize. **Plant Physiol**, 169(1):266–282.
- Silva FAM et al (2008) **Caracterização climática do bioma Cerrado**. In: Sano, S.M., Almeida SP, Ribeiro JF (Eds.) **Cerrado Ecologia e Flora**. Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 69–88.
- Silva GP (2017) **Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Dipteryx alata* Vog. no processo de germinação e armazenamento**. Doctorate Thesis, IF Goiano, GO. 63p.
- Singh M et al (2015) Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Rev Environ Sci Biotechnol**. 14: 407–426.

- Silveira NM et al (2017) S-nitrosoglutathione spraying improves stomatal conductance, Rubisco activity and antioxidant defense in both leaves and roots of sugarcane plants under water deficit. **Physiol Plant**, 160:383–395.
- Soares TN et al (2008) Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, 132 (1), pp. 9–19.
- Sousa LF et al (2019) Improving water use efficiency by changing hydraulic and stomatal characteristics in soybean exposed to drought: the involvement of nitric oxide. **Physiol Plant**, 3:1-15.
- Spricigo PC et al (2010) Inibidor da ação do etileno na conservação pós-colheita de *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Dragon. **Cienc Agro**, 34(5): 1184-1190.
- Peixoto PHP et al (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev Bras Fis Veg**, 11(3):137–143.
- Valentini RE et al (1995) In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. **Plant Cell Environ**, 18(6):631–640.
- Valluru R et al (2016) Foliar abscisic acid-to-ethylene accumulation and response regulate shoot growth sensitivity to mild drought in wheat. **Front Plant Sci**, 7:461.
- Van Breusegem et al (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, v. 141, p. 384 – 390.
- Wani SH et al (2017) Transgenic approaches to enhance salt and drought tolerance in plants. **Plant Gene**, 11: 219–231.
- Watkins JM et al (2014). Ethylene-induced flavonol accumulation in guard cells suppresses reactive oxygen species and moderates stomatal aperture. **Plant Physiol**, 164(4):1707–1717.
- Yan W et al (2017) Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. **Sci Rep**, 17: 4470.
- Yi XP et al (2016) Different strategies of acclimation of photosynthesis, electron transport and antioxidative activity in leaves of two cotton species to water deficit. **Funct Plant Biol**, 4: 448–460.
- Yu Y et al (2017) The ethylene response factor OsERF109 negatively affects ethylene biosynthesis and drought tolerance in rice. **Protoplasma**, 254:401–408.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO ETILENO NA ESCALA TEMPORAL DA MORTALIDADE INDUZIDA PELA SECA EM *Dipteryx alata*: INTERAÇÃO ENTRE FALHA HIDRÁULICA E PRIVAÇÃO DE CARBOIDRATOS

RESUMO

SOUSA, Leticia Ferreira de, M.Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano – Campus Rio Verde, agosto de 2019. **Efeito do etileno na escala temporal da mortalidade induzida pela seca em *Dipteryx alata*: interação entre falha hidráulica e privação de carboidratos.** Orientadora: Dra. Fernanda dos Santos Farnese. Coorientadores: Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dr. Adinan Alves da Silva e Dr. Juraci Alves de Oliveira

Eventos extremos de seca tornaram-se cada vez mais frequentes nos últimos anos, ocasionando a morte de florestas em diversas regiões do mundo. A fim de compreender os impactos causados por secas prolongadas, que ocasionam perda de biodiversidade e de serviços ecossistêmicos, bem como o papel do fitormônio etileno (ETH) nesse processo, o estudo analisou a mortalidade de mudas de *Dipteryx alata* após a imposição da restrição hídrica, avaliando os aspectos fisiológicos e hidráulicos das plantas. Para isso, mudas de *Dipteryx alata* foram irrigadas até a capacidade de campo, sendo que metade delas recebeu solução contendo inibidor da ação do etileno. Em seguida, a fisiologia dessas plantas foi avaliada continuamente à medida que o solo secava ao longo dos dias, até a morte vegetal. A ausência da ação do ETH desencadeou impactos negativos nos processos fisiológicos e hidráulicos no tecido vegetal, principalmente devido à alteração no comportamento estomático e na abscisão foliar, reforçando a hipótese de que a tolerância à seca está mais intimamente relacionada ao fechamento dos estômatos do que a características morfoanatômicas. A inibição do ETH promoveu maior abertura estomática, o que se refletiu em maior taxa fotossintética até determinado ponto. Conforme a intensidade e o tempo de exposição à seca aumentou, essas plantas sofreram impacto negativo em sua fisiologia, apresentando danos celulares, falha hidráulica e comprometimento das reservas de carbono no tecido radicular, o que resultou na morte precoce das plantas que receberam a solução com o inibidor do ETH. É possível concluir, portanto, que o ETH é essencial para a sobrevivência de *Dipteryx alata* submetida à seca e que a ausência desse hormônio provoca a morte por falha hidráulica e por privação de carbono.

Palavras-chave: Mortalidade, Falha hidráulica, Carboidrato, Etileno, Morte florestal.

ABSTRACT

SOUSA, Leticia Ferreira de, M.Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano – Campus Rio Verde, august 2019. **Effect of ethylene on the temporal scale of drought-induced mortality in *Dipteryx alata*: interaction between hydraulic failure and carbohydrate deprivation.** Advisor: Dsc^a. Fernanda dos Santos Farnese. Coadvisor: Dsc. Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dsc. Adinan Alves da Silva and Dsc. Juraci Alves de Oliveira

Extreme drought events have become increasingly frequent over the years, causing a major impact on forest death in various regions of the world. As a result of being able to understand the major impacts caused by frequent prolonged droughts that cause loss of biodiversity and ecosystem services, the aim of the present study was to analyze the mortality of *Dipteryx alata* seedlings after the imposition of water restriction, evaluating the physiological and hydraulic aspects and identifying the influence of ethylene (ETH) plant hormone on these processes. Thus, we documented that the absence of ETH plant hormone action promotes negative impacts on physiological and hydraulic processes in plant tissue, mainly due to changes in stomatal behavior and leaf abscission. Reinforcing the hypothesis that drought tolerance is closely related to the closure of stomata of morphoanatomics characteristics. Inhibition of ETH promoted greater stomatal opening reflecting the highest photosynthetic rate up to a certain point. As the intensity and time of drought exposure increased these plants negatively impacted their physiology with cell damage and the hydraulic failure that compromised their carbon reserves in the root tissue. In addition, the present study was important to answer non-exclusive questions: What would first cause plant death, carbon depletion or water failure? The results indicated that the joining of the two would result in this process and that ETH is of great importance in this process.

Key words: Mortality, Hydraulic failure, Carbohydrate, Ethylene, Forest death.

Efeito do etileno na escala temporal da mortalidade induzida pela seca em *Dipteryx alata*: interação entre falha hidráulica e privação de carboidratos

1. INTRODUÇÃO

Eventos extremos de seca tornaram-se cada vez mais frequentes nos últimos anos, desencadeando ondas de morte florestal em diversas regiões do mundo e impactando a dinâmica de comunidades inteiras (McDowell et al., 2008; Blackman et al., 2016; Martin-St Paul et al., 2017). Com efeito, a morte de ecossistemas florestais em decorrência de secas prolongadas foi frequente em múltiplos biomas nas últimas décadas, ocasionando a perda de biodiversidade e de serviços ecossistêmicos (Allen et al., 2010; Young et al., 2017; Kono et al., 2019). Duas hipóteses principais tem sido propostas para explicar a mortalidade causada pela seca: *i*) hipótese de falha hidráulica, que postula que a morte das árvores é consequência do suplemento inadequado de água para o corpo da planta; e *ii*) hipótese do déficit de carbono, a qual sugere que a seca levaria à depleção das reservas de carbono abaixo de um nível crítico, com consequente morte dos tecidos.

A hipótese do déficit de carbono baseia-se no fato de que a escassez hídrica tem profundos efeitos na taxa fotossintética, podendo resultar em um suprimento de carbono insuficiente para manter as atividades metabólicas da planta (Hartmann, 2018). Uma das primeiras respostas de plantas submetidas à deficiência hídrica consiste na redução nas taxas transpiratórias. Esse processo envolve o fechamento estomático, com consequente redução da condutância estomática (g_s), que contribui sobretudo para o aumento ou para a manutenção do potencial hídrico dentro de limites que sustentem o metabolismo celular (Tardieu, 2005). No entanto, a redução de g_s leva a um menor influxo de CO_2 para o interior dos cloroplastos, causando reduções nas taxas fotossintéticas devido a limitações difusivas (Flexas et al., 2004; Attia et al., 2015; Kissel et al., 2015; Shen et al., 2015). Sob condições mais severas de déficit hídrico, reduções nas taxas fotossintéticas também podem ocorrer devido à inibição de processos metabólicos específicos, como a redução na atividade de enzimas do ciclo de Calvin (limitações bioquímicas) (Dias e Bruggemann, 2010; Nagy et al., 2013). Dessa forma, em condições de deficiência hídrica, existe um conjunto de limitações ao processo fotossintético, as quais se refletem negativamente sobre o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas. Os níveis mínimos de carboidratos necessários para a sobrevivência, no entanto, são desconhecidos até o momento e provavelmente variam entre tipos de plantas e até mesmo entre tecidos de uma mesma planta (Hartmann, 2018).

A hipótese da falha hidráulica, por sua vez, tem sido apontada em diferentes estudos como sendo um dos principais aspectos relacionados com a morte de espécies florestais submetidas à seca, já que compromete o transporte de água através dos vasos xilemáticos (Anderegg et al., 2016; Zhu et al., 2018; Islam et al., 2019; Klein et al., 2019). Isso ocorre porque a redução na disponibilidade hídrica aumenta consideravelmente a tensão nos vasos do xilema, o que pode resultar na nucleação de bolhas de ar com consequente quebra da coluna d'água (cavitação), induzindo falha hidráulica no corpo vegetal e limitando a capacidade de repor a água perdida por transpiração (Islam et al., 2019). A cavitação gera, portanto, um quadro de extrema dessecação nos tecidos vegetais, podendo rapidamente evoluir para a morte da planta (Zhu et al., 2018). Dessa forma, espécies menos vulneráveis à cavitação tendem a ser mais tolerantes à seca (Anderegg et al., 2016; Klein et al., 2019).

Um dos parâmetros mais utilizados para determinar a vulnerabilidade à cavitação é o P_{50} . O P_{50} consiste no valor de potencial hídrico no qual 50% da condutividade hidráulica é perdida (Choat et al., 2012; Trueba et al., 2017) e tem sido apontado como um dos principais índices de mortalidade em comunidades vegetais submetidas à seca (Choat et al., 2012). Outro parâmetro importante é o P_{88} , o qual representa o potencial hídrico no qual 88% dos vasos do xilema estão cavitados. Para angiospermas, o P_{88} é o ponto no qual a falha hidráulica se torna irreversível e as plantas não conseguem mais se recuperar (Urli et al., 2013). Os valores de P_{50} e P_{88} e, consequentemente, a tolerância à cavitação, tem sido tradicionalmente associado às características morfoanatômicas das plantas, como menor condutância cuticular (g_{min}), maior densidade de venação e características dos vasos do xilema, como diâmetro e comprimento das células (Sack et al., 2008; Tabassum et al., 2016). Recentemente, no entanto, Martin-StPaul et al. (2017) hipotetizaram que características morfoanatômicas tem apenas um efeito marginal na tolerância à cavitação, sendo que o fechamento estomático precoce aparentemente é mais determinante do que as características do xilema para evitar a ocorrência de falha hidráulica nas plantas. Essa hipótese, no entanto, ainda não foi validada experimentalmente, de forma que os mecanismos envolvidos na tolerância à cavitação ainda não estão totalmente esclarecidos. Caso ela se comprove, não apenas os estômatos, mas também as moléculas sinalizadoras envolvidas na regulação do movimento estomático, assumem papel central na manutenção da segurança hidráulica das plantas.

Os estômatos são estruturas epidérmicas especializadas que consistem em duas células-guardas em torno de um poro e atuam como uma válvula que regula as trocas gasosas entre a folha e a atmosfera (Daszkowska-Golec e Szarejko, 2013), desempenhando um balanço entre o fluxo de CO_2 para atividade fotossintética e a saída de vapor d'água durante a transpiração

(Daszkowska-Golec e Szarejko, 2013; Hérault et al., 2013). Em resposta à diminuição da disponibilidade de água no solo, as plantas rapidamente reduzem a abertura estomática a fim de limitar a perda de água por transpiração, auxiliando assim na manutenção do potencial hídrico e evitando a ocorrência de cavitação (Yan et al., 2017; Marcos et al., 2018; Sousa et al., 2019). Apesar disso, conforme discutido anteriormente, a diminuição na condutância estomática também limita a entrada de CO₂ para a carboxilação, de forma que a planta enfrenta um dilema entre manter a taxa de fixação de carbono ou evitar a perda de água (Kono et al., 2019). Em espécies aclimatadas à seca, o fechamento estomático ocorre nos primeiros sinais de diminuição do conteúdo de água do solo, antes mesmo que qualquer alteração no potencial hídrico das folhas seja detectada (Salleo et al., 2000). Estes resultados indicam que a resposta dos estômatos ao déficit hídrico não é resultado da limitação hidráulica *per se*, mas baseia-se em um processo de sinalização entre as raízes e as folhas. Frequentemente o ABA é apontado como a principal molécula envolvida nesse processo (Sarwat e Tuteja, 2017; Santner e Estelle, 2009). Diversas evidências indicam, no entanto, que outro hormônio, o etileno (ETH), também seja essencial para o fechamento estomático e provavelmente age em conjunto com o ABA (Sarwat e Tuteja, 2017), embora o seu papel na resposta das plantas à seca e, sobretudo, na regulação estomática e na consequente manutenção da condutividade hidráulica das plantas ainda seja desconhecido.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e abriga mais de 12.400 espécies vegetais, muitas delas endêmicas, o que faz com que este bioma seja considerado um dos grandes hotspots mundiais de biodiversidade (Strassburg et al., 2017). Apesar disso, o Cerrado é a savana tropical mais ameaçada no mundo e fatores como a expansão do agronegócio e a baixa proteção legal ameaçam a sobrevivência das espécies (Strassburg et al., 2017; Sano et al., 2019). Essas ameaças à biodiversidade tornam-se ainda mais preocupantes quando consideramos as previsões de mudanças climáticas, as quais apontam para reduções de até 45% na pluviosidade do Cerrado até o fim deste século (IPCC, 2014). Caso se confirmem, esses eventos de seca podem provocar uma grande onda de morte florestal, culminando com a perda em massa de biodiversidade e substituição de espécies (Breshears et al., 2009; Mencuccini et al., 2015). Nesse contexto, conhecer os principais processos envolvidos na morte de espécies florestais é essencial para a conservação da biodiversidade, uma vez que a compreensão desses processos pode auxiliar no desenvolvimento de políticas públicas voltadas para proteção e conservação de ambientes florestais em um cenário de mudanças climáticas globais. Tendo em vista esses fatos e visando preencher as lacunas existentes sobre os processos que desencadeiam a morte de plantas em resposta à seca, no presente estudo nós acompanhamos as alterações fisiológicas em plantas desde o momento de imposição do estresse até a morte vegetal, utilizando como modelo uma

espécie chave para o Cerrado brasileiro, o Baru (*Dipteryx alata*). Além de caracterizar os processos fisiológicos vegetais, nós também avaliamos o envolvimento ETH na resposta das plantas à seca, empregando um inibidor da ação do fitohormônio, testando as seguintes hipóteses: *i*) plantas tratadas com o inibidor do etileno mantém seus estômatos abertos por mais tempo, o que possibilita a manutenção do processo fotossintético e maior acúmulo de carbono; e *ii*) apesar do maior acúmulo de carbono, a manutenção da condutância estomática promove a desidratação dos tecidos e maior ocorrência de cavitação, promovendo a morte precoce da planta.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar a influência fitohormônio etileno (ETH) na mortalidade de mudas de *Dipteryx alata* após a imposição do déficit hídrico, enfocando os aspectos fisiológicos e hidráulicos envolvidos nesse processo.

2.2. Específicos

- Avaliar o efeito da seca sobre as relações hídricas das plantas na ausência e presença de um inibidor de ação do etileno;
- Determinar a ocorrência de cavitação nas plantas expostas à seca, na presença e na ausência de um inibidor de ação do etileno;
- Caracterizar o comportamento estomático ao longo do tempo em plantas submetidas à seca, na presença e na ausência de um inibidor de ação do etileno;
- Verificar a influência do STS sobre o processo fotossintético ao longo do tempo e o acúmulo de amido;
- Analisar a influência de caracteres anatômicos, como densidade de venação e condutância cutilar, sobre a tolerância de plantas ao estresse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições experimentais e imposição dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com proteção de sombrite 50% nas laterais e em cobertura de lona plástica transparente a 2,50 metros de altura, do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - GO, Brasil (17°48'18.33" de latitude sul e 50°54'0.04" de longitude oeste e 748 m de altitude), durante os meses de abril de 2019 a maio de 2019. As mudas de Baru (*Dipteryx alata*) foram adquiridas

em viveiro florestal na cidade de Rio Verde e foram selecionadas de acordo com o tamanho e a idade (4 meses), contendo no substrato fertilizante de lenta liberação Osmocote® (19-06-10) com tempo de liberação de 3 a 4 meses, cobertura via foliar de fosfato monoamônico (MAP) purificado (750 g por 100 L de água) a cada 15 dias. Sendo, posteriormente, transplantadas em citrovasos de 4 litros, com solo na proporção de 2:1 (solo de área não cultivada e areia), adubadas de acordo com a análise de solo e laudo de recomendação (solo adubado com 1,5 g de superfosfato simples (00-90-00), 0,2g de cloreto de potássio (00-00-40) e 0,2 de ureia (30-00-00) por vaso. A temperatura média e umidade relativa média durante o período de avaliação foram 25°C e 60°C, respectivamente. Após 30 dias para aclimação às condições de cultivo, a irrigação foi interrompida em metade das plantas, sendo aplicados quatro tratamentos: Controle (plantas irrigadas diariamente até atingir a capacidade de campo (CC)); Controle + STS (plantas irrigadas e tratadas com 0,1 mM de tiosulfato de prata (STS), um inibidor da ação do etileno); Seca (plantas nas quais a irrigação foi suspensa); Seca + STS (plantas nas quais a irrigação foi suspensa e que foram tratadas com STS). As aplicações do STS foram feitas por aspersão foliar, com um dia de intervalo entre cada aplicação, utilizando-se um pulverizador manual, sendo 25 mL do volume de calda por planta. Todas as aplicações foram realizadas do lado de fora da casa de vegetação, a fim de evitar a contaminação dos tratamentos por deriva. A suspensão da seca e a aplicação do STS foram mantidas até a morte de todas as plantas submetidas à restrição hídrica, aqui considerada como o momento em que as plantas ultrapassaram o P_{88} . As avaliações de taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração diária, potencial hídrico e condutividade hidráulica da planta foram estimadas em intervalos de tempo definidos, quando o conteúdo de água no solo das plantas submetidas à seca foi igual a 100, 50, 30, 10, 5 e 0% da quantidade de água em capacidade de campo. Análises pontuais (quantificação de amido no caule e na raiz, determinação da condutância cuticular, determinação da senescência e densidade de venação) foram realizadas apenas ao fim dos experimentos.

3.2. Metabolismo do carbono

3.2.1. Taxa fotossintética

A taxa de assimilação líquida do carbono (A) e a condutância estomática (g_s) foram determinadas em sistema aberto, sob luz saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e pressão parcial de CO_2 de 40 Pa. Para tanto, foi utilizado um analisador de gases a infravermelho (LI-6800, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6800, LI-COR).

3.2.2. Quantificação de amido

A quantificação do conteúdo de amido no caule e raiz foi realizada de acordo com McDready et al (1950), com algumas pequenas modificações. Para isso, aproximadamente 0,100 mg de tecidos de caule e raiz foram coletados, aquecidos em micro-ondas a 600 W por 90 s, moídas e encaminhadas para análise. O material vegetal seco macerado foi acondicionado em microtubos de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de etanol 80% em microtubos de 2 mL, agitando para suspender o sólido. Posteriormente, os microtubos foram levados em banho-maria a 90°C durante 10 min e esfriado em temperatura ambiente. Após isso, os microtubos foram agitados para suspender o sólido e centrifugados a 13.000g por 1 min. Foi retirado o sobrenadante e o pellet foi lavado com etanol 80%. Após isso, foi pego uma alíquota de 1.500 µL do pellet dissolvido no álcool 80% e transferiu-se a microtubos de 2 mL vazios, logo em seguida adicionado 50 µL de solução de Lugol (1%) e misturou a suspensão. Em seguida, os microtubos foram levados em banho-maria a 50 °C durante 10 min, esfriado em temperatura ambiente. A leitura da absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA) a 660 nm e a concentração foi determinada com base em curva de calibração.

3.3. Caracterização da percentagem da abscisão foliar

O percentual de abscisão foliar foi mensurado pela contagem do número total das folhas antes e após o início da seca e a aplicação do inibidor de etileno (STS). Sendo a contagem foliar realizada diariamente. O percentual foi calculado de acordo com o número de folhas remanescentes em cada ramo em relação ao número inicial de folhas (Segatto et al., 2013): $\text{desfolha (\%)} = 100 - (\text{NFD} / \text{NFI} * 100)$, onde: NFD = número de folhas na data de avaliação e NFI = número de folhas inicial.

3.4. Determinação da condutância cuticular mínima (*gmin*)

A condutância cuticular (*gmin*) foi determinada pela perda de massa foliar por transpiração no escuro em baixa umidade (Burghardt e Riederer, 2003; Schuster et al. 2016). As folhas foram coletadas, o pecíolo selado com parafina derretida e espessura foliar foi mensurada. Em seguida, as folhas foram colocadas em sacos plásticos do tipo zip-lock e mantidas no escuro por aproximadamente 2 horas para o fechamento estomático total. Após isso, as folhas foram tiradas dos sacos plásticos e acondicionadas em bandejas de alumínio e levadas em estufa incubadora B.O.D. com temperatura (28° C) e umidade relativa (45%). A temperatura do ar na incubadora foi verificada com um termômetro digital. No intervalo de 2h as folhas foram pesadas

em uma balança analítica. A pesagem foi repetida até que fossem obtidos 4 pontos lineares. Ao final das medições, as folhas foram adicionadas em sacos de papel e secas em estufa por 48 horas a 72 °C para obtenção do peso seco.

3.5. Relações hídricas

3.5.1 Potencial hídrico, condutividade hidráulica foliar e determinação do P_{50}

O potencial hídrico foi avaliado em folhas individuais de cada tratamento, no período da antemã (05:00 h) (Ψ_{am}) e ao meio-dia (12:00) (Ψ_{md}), com o auxílio de bomba de pressão tipo Scholander.

A condutividade hidráulica da planta (K_{plant}) foi obtida pelo método do fluxo evaporativo, conforme proposto por Brodribb e Holbrook (2003) e Simonin et al. (2015), sendo os dados normalizados pela área foliar total das plantas. O potencial hídrico no qual as plantas perderam 50% da sua condutividade (P_{50}) foi calculado utilizando-se a porcentagem de perda de condutividade hidráulica, obtida após a determinação de K_{plant} , e os dados de potencial hídrico. O ajuste da curva seguiu o modelo sigmoidal, sendo o slope derivado das equações propostas por Duursma e Choat (2017).

3.5.2 Transpiração diária

A transpiração diária (E_d), foi determinada na antemã (05:00) e ao meio-dia (12:00), por método gravimétrico, pela diferença do peso dos vasos (ΔPV), sendo os vasos tampados para desconsiderar a transpiração do solo (Lima et al., 2006; Silva et al., 2013). Os dados foram normalizados pela área foliar total da planta (Lopes et al., 2005).

3.6. Densidade de venação

Para determinação da densidade de venação, utilizou-se fragmentos da parte central da lâmina foliar, posteriormente foram lavadas e posteriormente passadas pelo processo de clarificação emergindo os fragmentos em hidróxido de sódio (NaOH) a 10% no período de 2h seguida da imersão do material em hipoclorito de sódio 20% até a obtenção do clareamento, totalmente translúcido. Seguidamente, foi removido o alvejante das amostras foliares com água destilada e após isso, coradas com safranina e fast green. Após isso, montou-se lâminas histológicas com as amostras, levadas a microscópio ótico de luz e fotografadas. As imagens foram analisadas em um software específico (imagens J). Este método foi mensurado pela razão entre comprimento total das nervuras e superfície da área foliar (Uhl e Mosbrugger, 1999).

3.7. Análises estatísticas

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições cada. Para as análises pontuais, os dados foram submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste SNK, a 0,05% de probabilidade. Os dados quantificados ao longo do tempo foram expressos em porcentagem do controle (no caso do tratamento Seca) ou porcentagem do controle + STS (no caso do tratamento Seca + STS) e a diferença entre as médias em cada ponto de amostragem foi determinada pelo teste T, a 0,05% de probabilidade. O ajuste da curva para determinação do P_{50} e P_{88} foi realizado pela execução do pacote fitplc para curvas não lineares, utilizando-se o RStudio. As demais análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR.

4. RESULTADOS

4.1. Relações hídricas

4.1.1. Determinação da condutância estomática (g_s) e cuticular (g_{min}), transpiração (Ed) e caracterização da percentagem da abscisão foliar

Conforme esperado, os dados da condutância estomática (g_s) apresentaram a mesma tendência observada para os dados de fixação de carbono (Fig. 1A). Quando as plantas estavam hidratadas (100% CC), o g_s foi igual para ambos os tratamentos. No entanto, a medida que o solo começou a secar, observou-se declínio de g_s nos dois tratamentos de déficit hídrico, sendo esse declínio mais acentuado no tratamento DH. A condutância estomática permaneceu menor nas plantas expostas apenas à seca durante todo o experimento, sendo que, apenas quando a quantidade de água no solo correspondeu a 0% da CC, g_s se igualou entre os dois tratamentos. A condutância cuticular (g_{min}), por outro lado, foi avaliada ao fim do experimento e não se alterou em nenhuma das condições analisadas (Fig. 1B).

A intensificação da seca diminuiu a taxa transpiratória (Ed) em ambos os tratamentos, embora em níveis diferentes (FIG. 1C). De início, quando as plantas estavam hidratadas, a transpiração em ambos os tratamentos foi semelhante, o que não se manteve ao longo do tempo. Com efeito, quando o solo atingiu 50% CC já foi possível observar que plantas submetidas ao DH+STS apresentaram taxa transpiratória consideravelmente maior. Essa tendência se manteve até o fim do experimento. A taxa de abscisão foliar, por sua vez, foi muito maior nas plantas em DH, enquanto nas plantas DH+STS mantiveram o maior número de folhas (Fig. 1D).

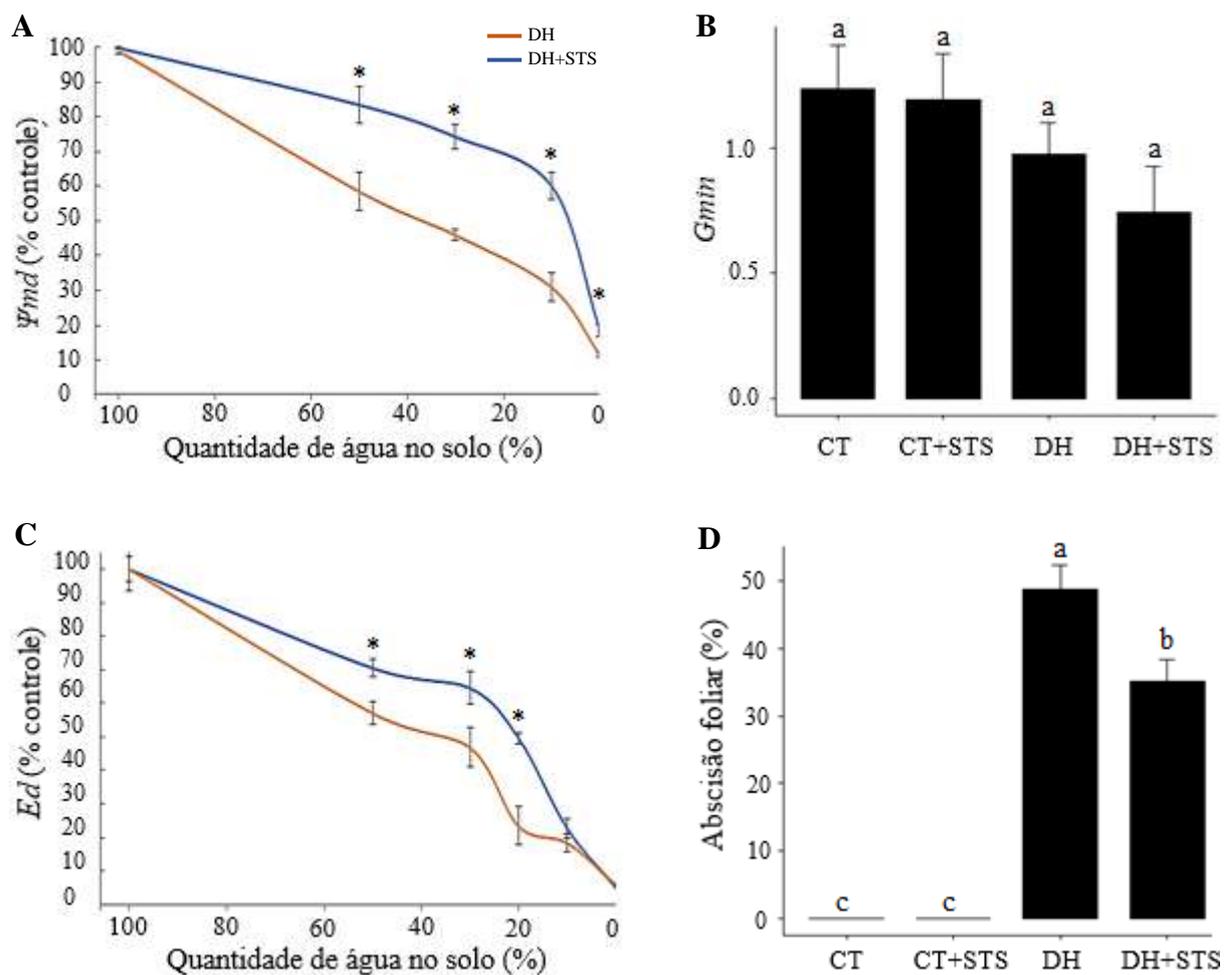


Figura 1 – Condutância estomática (g_s) (A), condutância cuticular (g_{min}) (B), transpiração diária (C) e abscisão foliar (D). Gráfico de linhas: DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Gráficos de barra: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH e DH+STS. Médias seguidas pelo asterisco (*) ou por letras diferentes diferem entre si pelo teste T ou SNK, a 0,05% de probabilidade, respectivamente.

4.1.2. Determinação do potencial hídrico e condutividade hidráulica

Embora as plantas submetidas ao DH+STS tenham sido capazes de manter maior taxa fotossintética durante período mais prolongado, o inverso ocorreu em relação ao potencial hídrico e à condutividade hidráulica da planta (K_{plant}) (Fig. 2 A-B). Com efeito, plantas submetidas à seca na presença do inibidor de etileno não foram capazes de impedir grandes variações nos valores de potencial hídrico ou de condutividade hidráulica, parâmetros que se mantiveram mais estáveis no tratamento DH. Apesar disso, não foram observadas alterações nos valores de P_{50} , o qual foi igual a -1,7 MPa em ambos os tratamentos, conquanto seja importante ressaltar que, enquanto plantas do tratamento DH+STS atingiram o P_{50} quando o conteúdo de

água no solo correspondia à 30% da CC, nas plantas submetidas apenas à seca isso só ocorreu quando o solo continha 10 % da quantidade de água na CC (Fig. 2 C-D). E, por fim, a densidade de venação não sofreu alteração ao final do experimento, sendo estatisticamente semelhante para todos os tratamentos em relação ao controle (Fig. 2E).

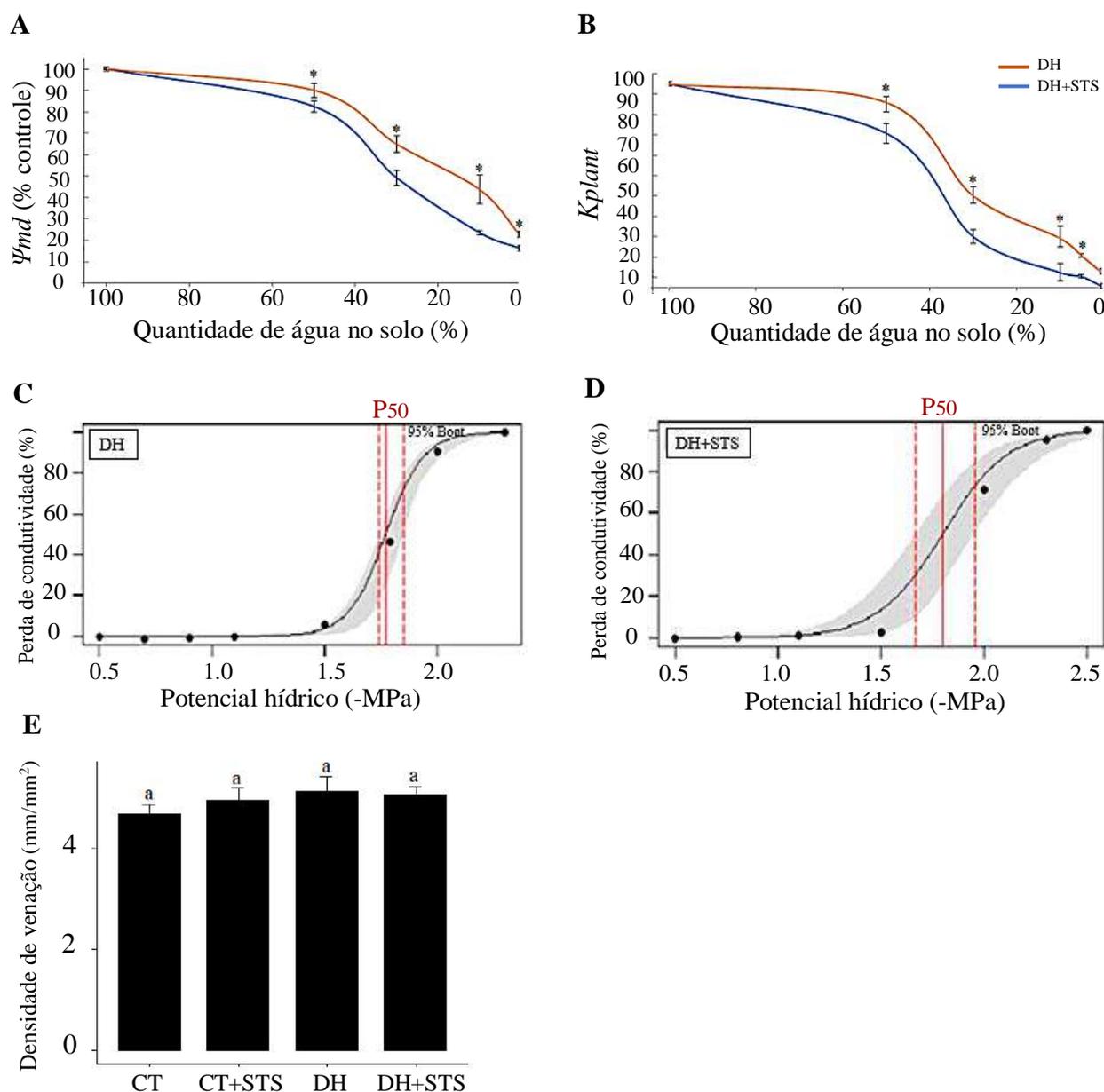


Figura 2 –Potencial hídrico (Ψ_w) (A), condutividade hidráulica da planta (K_{plant}) (B), potencial hídrico no qual ocorreu perda de 50% condutividade (P_{50}) (C-D) e densidade de venação (E). Gráfico de linhas: DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS). Gráficos de barra: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH e DH+STS. Médias seguidas pelo asterisco (*) ou por letras diferentes diferem entre si pelo teste T ou SNK, a 0,05% de probabilidade, respectivamente.

3.2. Fotossíntese e amido

A imposição da seca provocou quedas na taxa de assimilação líquida em ambos os tratamentos DH e DH+STS (Fig. 3A). Essa diminuição, no entanto, foi muito mais acentuada no tratamento DH, sendo que, quando a quantidade de água no solo foi igual a 0% em relação à capacidade de campo, essa relação se inverteu. Dessa forma, embora as plantas expostas apenas à restrição hídrica tenham apresentado menores taxas fotossintéticas no início do experimento, elas foram capazes de manter o processo fotossintético por mais tempo em relação às plantas tratadas com o inibidor da ação do ETH.

Os padrões na taxa de assimilação líquida de carbono foram refletidos no consumo de amido nos tecidos de reserva do caule e da raiz após os tratamentos (Fig. 3B-C). Houve uma diminuição no conteúdo de amido caulinar em ambos os tratamentos (Fig. 3B) e queda maior no teor de amido radicular apenas no tratamento DH+STS, enquanto nas plantas em DH não diferiu estatisticamente com o controle (Fig. 3C).

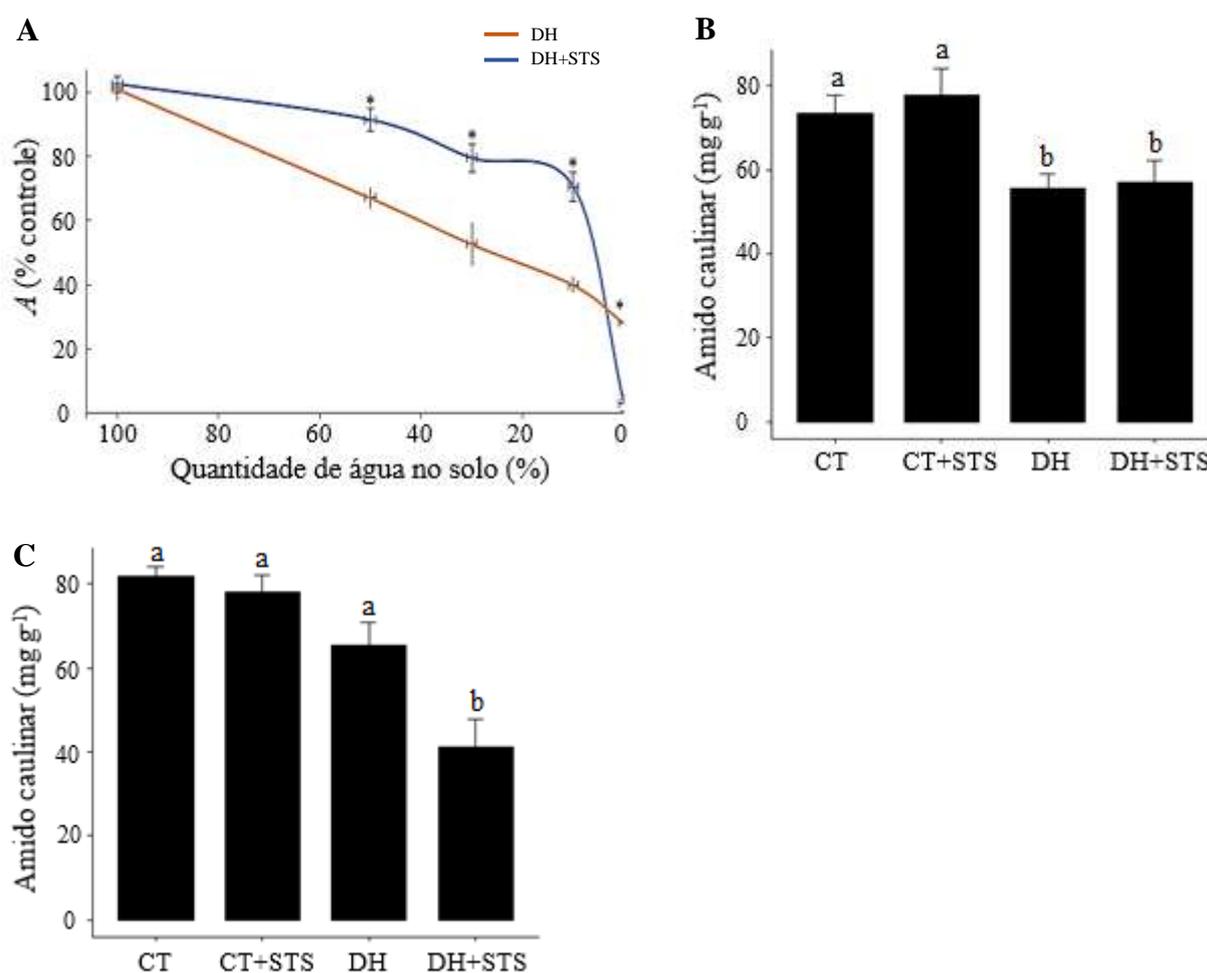


Figura 3 – Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), teor de amido no caule (B) e na raiz (C). Gráfico de linhas: DH (30% CC), DH+STS (seca de 30% CC tratadas com 0,1 mM de STS).

Gráficos de barra: CT (controle), CT+STS (controle tratadas com 0,1 mM de STS), DH e DH+STS. Médias seguidas pelo asterisco (*) ou por letras diferentes diferem entre si pelo teste T ou SNK, a 0,05% de probabilidade, respectivamente.

3.3. Mortalidade Vegetal

A mortalidade vegetal foi aqui considerada como o momento que as plantas submetidas à seca, na presença ou na ausência do inibidor de ação do etileno, atingiram ou ultrapassaram o P_{88} (Tabela 1). Embora o valor de P_{88} não tenha sido estatisticamente diferente entre os tratamentos, as plantas submetidas ao DH+STS atingiram esse valor mais rapidamente, quando a quantidade de água no solo correspondia à 10% da CC. Nas plantas expostas apenas à seca, o P_{88} só foi atingido quando a quantidade de água no solo foi igual a 0% da CC, indicando, portanto, que o STS acelerou a morte das plantas.

Tabela 1. P_{88} e os respectivos valores de água no solo para plantas expostas à seca, na presença ou na ausência de STS.

Tratamentos	Água no solo (% CC)	P_{88}
DH	0	2,13
DH+STS	10	1,98

4. DISCUSSÃO

De acordo com as alterações previstas para o clima nas próximas décadas, espera-se que a seca aumente a frequência e intensidade em muitos biomas, incluindo o cerrado (Kono et al., 2019). A seca fisiológica é determinada pela capacidade da planta de regular o uso da água em resposta ao declínio no potencial hídrico do solo e pelos limiares associados à mortalidade induzida por falha hidráulica ou déficit de carboidrato (Mitchell et al., 2012). Partindo deste princípio, neste estudo foi avaliado o grau de vulnerabilidade de plantas de baru (*Dipteryx alata*) em exposição à seca extrema, a fim de avaliar seu comportamento fisiológico e hidráulico e identificar a influência do fitohormônio ETH neste processo. Foi possível constatar que o ETH desencadeia várias respostas nas plantas após a imposição da seca, o que resultou, em última instância, no retardo da morte vegetal.

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram a hipótese de que o ETH é essencial para o fechamento estomático (Desikan et al., 2006), uma vez que a inibição da ação dessa molécula teve como resultado a manutenção de uma condutância estomática consideravelmente superior àquela observada nas plantas submetidas apenas à seca. O fechamento estomático representa uma das primeiras respostas das plantas ao déficit hídrico, ocorrendo antes mesmo que alterações no Ψ_w sejam detectadas no tecido foliar e é essencial para manter o grau de hidratação dos tecidos (Salleo et al., 2000). Em adição, o etileno também é uma molécula determinante para a ocorrência da abscisão foliar, principalmente em plantas submetidas à restrição hídrica (Gómez-Cadenas et al., 1996). A associação desses dois fatores, menor g_s e maior porcentagem de abscisão foliar, foi determinante para que as plantas do tratamento DH apresentassem queda precoce e acentuada na taxa de transpiração, o que, por sua vez, é essencial para diminuir a perda de água para a atmosfera e, assim, retardar a dessecação dos tecidos vegetais (Alves, 2018).

Outro fator que contribui para a manutenção do grau de hidratação dos tecidos em condição de déficit hídrico é a diminuição da condutância de cuticular (g_{min}). Mesmo que os estômatos estejam fechados, a perda de água continua a uma taxa mínima através da cutícula e, por isso, alterações nesse parâmetro usualmente estão relacionadas com maior tolerância à restrição hídrica (Duursma et al., 2019). Neste estudo, no entanto, nenhum dos tratamentos apresentou alterações em g_{min} , evidenciando que no caso de *D. alata* o controle estomático é mais importante do que mudanças nas características epidérmicas e/ou cuticulares. Indicando, então, de que as altas taxas evaporativas observadas quando as plantas estavam hidratadas são atribuídas ao comportamento estomático e não à g_{min} , conforme evidenciado nos estudos de Sack et al (2003) e Fanourakis et al (2013).

A manutenção de maior abertura estomática nas plantas do tratamento DH+STS teve profundas consequências para a hidratação dos tecidos, tendo sido observado que, como resultado da maior taxa transpiratória, essas plantas apresentaram quedas mais bruscas no Ψ_w . A manutenção do Ψ_w nas plantas submetidas apenas à seca, por sua vez, resultou em uma maior condutividade hidráulica, pois promoveu menor incidência de cavitação (Choat et al., 2012). Diminuições no Ψ_w e em K_{plant} comprometem a manutenção de estruturas e processos fisiológicos dentro das células vegetais (Avila-Lovera et al., 2017; Saiki et al., 2017), além de indicar a ocorrência de cavitação (Hochberg et al., 2017). Conforme esperado, por serem a mesma espécie nas mesmas condições de água no solo, não houve alteração no valor de P_{50} entre os tratamentos. Apesar disso, plantas no DH+STS atingiram o P_{50} mais rapidamente, quando o conteúdo de água no solo ainda correspondia a 30% da CC. O P_{50} é amplamente aceito como um

dos melhores índices para prever a vulnerabilidade das plantas à seca (Trueba et al., 2017), sendo possível afirmar, portanto, que a sinalização desencadeada pelo ETH nas células vegetais é essencial para maior tolerância de plantas expostas ao déficit hídrico.

A densidade de venação é comumente relatada como uma característica importante na manutenção da condutividade hidráulica das plantas. 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, já tendo sido demonstrado que maior densidade de venação reduz a vulnerabilidade hidráulica e a ocorrência de cavitação (Scoffoni et al., 2011). Este parâmetro, no entanto, não se alterou em nenhum dos tratamentos. O mesmo comportamento foi visto para *D. alata* submetida à repetidos ciclos de seca, sugerindo que mesmo com maior tempo de exposição à seca as variações no arranjo de nervuras foliares não se altera a ponto de apresentar diferença significativa entre os tratamentos nessa espécie (Alves, 2018). Assim, aparentemente o que realmente determina a ocorrência ou não de cavitação em *D. alata* é um preciso controle do movimento estomático, sendo que as análises anatômicas avaliadas, como densidade de venação e transpiração cuticular, que reflete características da cutícula, não se alteraram em nenhum dos tratamentos. Esses resultados reforçam a hipótese levantada pelo Martin-StPaul et al. (2017) de que as características anatômicas teriam apenas um efeito marginal sobre a tolerância a cavitação em plantas expostas ao déficit hídrico.

No início da imposição do estresse, plantas expostas ao DH+STS conseguiram manter a taxa fotossintética por mais tempo, devido ao fato de apresentarem maior g_s , provavelmente como resultado da inibição da via de sinalização do ETH responsável pelo fechamento dos estômatos (Desikan et al., 2006). A manutenção da taxa de fixação de carbono por meio da inibição da síntese e/ou ação do ETH tem sido interpretado por alguns autores como ganho de tolerância à seca (Huang et al., 2014; Nazar et al., 2015). Quando o conteúdo de água disponível no solo diminuiu além de um determinado limiar, no entanto, observou-se queda brusca na taxa fotossintética, maior inclusive do que a apresentada pelas plantas expostas apenas ao DH. Essa queda coincidiu com o momento no qual as plantas do tratamento DH+STS atingiram o P_{88} , indicando que a extensa falha hidráulica no corpo vegetal comprometeu o processo fotossintético. Diversos estudos já demonstraram que as taxas de fotossíntese estão diretamente relacionadas com a capacidade de uma planta em transportar água das raízes até os tecidos transpirantes. Nesse sentido, a condutividade hidráulica da planta é considerada fator preponderante para a manutenção do processo fotossintético (Sack e Scoffoni, 2012; Scoffoni et al., 2012). É possível que a ocorrência de falha hidráulica também tenha comprometido a etapa bioquímica da fotossíntese, acarretando danos às enzimas do ciclo de Calvin, o que contribuiria

para queda brusca no processo fotossintética nas plantas do tratamento DH+STS (Nagy et al., 2013).

As plantas expostas apenas à seca, embora tenham apresentado menores taxas fotossintéticas no início dos tratamentos, foram capazes de manter o processo por um período mais prolongado, o que se refletiu na concentração de amido em tecidos de reserva. Com efeito, as duas condições de déficit hídrico diminuíram as concentrações de amido tanto no caule quanto nas raízes, porém nos tecidos radiculares a concentração de amido foi ainda menor nas plantas tratadas com o inibidor da ação do ETH. Já foi observado que, em condições de seca, plantas estressadas consomem primeiro os carboidratos de reserva armazenados na raiz em detrimento daqueles armazenados em tecidos acima do solo, o que provoca a morte do tecido radicular e, conseqüentemente, da planta como um todo, por privação de carbono (Hartmann et al., 2013). Manter os estômatos abertos e a taxa fotossintética em baixa disponibilidade hídrica provavelmente resultou em uma série de danos celulares para as plantas do DH+STS em decorrência das alterações no status hídrico vegetal (Chiappero et al., 2019; Zhang et al., 2019). Logo, manter maior taxa fotossintética em condições de seca gera um alto custo para a planta, principalmente em relação à ativação de mecanismos de defesa, reestruturação de membranas e produção de novos vasos xilemáticos, o que pode ter contribuído para a depleção das reservas de carbono nas raízes das plantas no tratamento DH+ STS (Hartmann et al., 2013). Outra hipótese é que a desidratação celular possa ter ocasionado o colapso das células do floema no caule, o que impediu o transporte de carbono das folhas para as raízes (Saiki et al., 2017).

As plantas nas quais a restrição hídrica foi imposta juntamente com o STS atingiram o P_{88} antes das plantas no tratamento DH, quando a quantidade de água disponível no solo era 10% da CC. O P_{88} indica o potencial hídrico no qual a seca promove danos irreparáveis devido à cavitação massiva dos vasos do xilema e é considerado, portanto, um índice de mortalidade em angiospermas (Urli et al., 2013). Dessa forma, como consequência da maior desidratação e também do comprometimento das reservas de carbono, as plantas no tratamento DH+STS morreram mais rapidamente, evidenciando assim, mais uma vez, o papel essencial do ETH na resposta de *D. alata* à seca.

5. CONCLUSÃO

De acordo com todos os parâmetros analisados, apoia-se as hipóteses iniciais de que a ausência da ação do fitohormônio ETH promove impactos negativos nos processos fisiológicos e hidráulicos nas plantas, principalmente devido à alteração no comportamento estomático e na abscisão foliar. Os resultados aqui obtidos reforçam a hipótese de que um controle preciso do

mecanismo de abertura e fechamento estomático é mais determinante do que características morfoanatômicas para a tolerância à seca. De fato, o fechamento estomático precoce nas plantas expostas apenas ao déficit hídrico, associado com a maior porcentagem de abscisão foliar, mantiveram a hidratação dos tecidos e, por conseguinte, retardaram a ocorrência de falha hidráulica nos tecidos vegetais. Nas plantas tratadas com STS, por outro lado, a maior abertura estomática resultou em maior fotossíntese até determinado ponto, a partir do qual os danos celulares e a falha hidráulica foram tão extensa que o processo não pode mais ser mantido, a despeito dos valores de g_s , comprometendo as reservas de carbono nessas plantas. Então, este estudo além de responder as hipóteses iniciais, também ajudou na resposta de duas hipóteses não excludentes: o que mataria a planta primeiro, déficit de carbono ou falha hidráulica? (Hartmann et al., 2011; Zeppel et al., 2013; Yoshimura et al., 2016). Neste estudo foi documentado que a junção dos dois responde essa pergunta, embora a depleção de carbono seja uma consequência direta da falha hidráulica. Assim, quando a regulação estomática não ocorre de forma eficiente, a planta morre devido à falha hidráulica, o que compromete o suprimento de carbono, sendo o ETH essencial para retardar esse processo.

6. REFERÊNCIAS

- Allen CD et al (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. **For. Ecol. Manag.**, 259:660–684.
- Anderegg WRL et al (2016) Meta-analysis reveals that hydraulic traits explain cross-species patterns of drought-induced tree mortality across the globe. **PNAS**, 113:5024–5029.
- Attia Z et al (2015) Growth and physiological responses of isohydric and anisohydric poplars to drought. **J Exp Bot**, 66: 4373–4381.
- Alves RDFB (2018) Memória a seca no cerrado: aclimação diferencial do baru (*Dipteryx alata* Vogel). Master Thesis, IF Goiano, GO. 48p.
- Ávila-Lovera E et al (2017) Stem photosynthesis and hydraulics are coordinated in desert plant species. **New Phytologist**, 216(4), 1119–1129.
- Blackman CJ, et al (2016). Toward an index of desiccation time to tree mortality under drought. **Plant Cell Environ**, 39(10), 2342–2345.
- Breshears DD (2009) Tree die-off in response to global change-type drought: mortality insights from a decade of plant water potential measurements. **Front Eco Environ**, 7(4):185–189.
- Brodribb TJ, Holbrook NM (2003) Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol*, v. 132, n. 4, p. 2166–2173.
- Burghardt M, Riederer M (2003) Ecophysiological relevance of cuticular transpiration of deciduous and evergreen plants in relation to stomatal closure and leaf water potential. **J Exp Bot**, 54: 1941–1949.
- Chiappero J, et al (2019). Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. **Ind Crops Prod**, 139, 111553.
- Choat B et al (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. **Nature**, 4–8.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I (2013) Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. **Front Plant Sci**, 4:138.

- Desikan R et al (2006) Ethylene-induced stomatal closure in Arabidopsis occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. **Plant J**, 47: 907–916.
- Dias MC, Brüggemann W (2010) Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. **Photosynthetica**, 48(1):96–102.
- Duursma RA et al (2018) On the minimum leaf conductance: its role in models of plant water use, and ecological and environmental controls. **New Phytol**, 2018.
- Duursma R Choat B (2017) fitplc - an R package to fit hydraulic vulnerability curves. **J Plant Hydr**, 4, e002.
- Fanourakis D et al (2013) A comprehensive analysis of the physiological and anatomical components involved in higher water loss rates after leaf development at high humidity. **J Plant Physiol**, 170: 890– 898.
- Flexas J et al (2009) Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis hybrid* Richter-110 (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). **J Exp Bot**, 60: 2361–2377.
- Gómez-Cadenas, et al (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. **Plant Physiol**. 112 (1), 401–408.
- Hartmann H et al (2013) Lethal drought leads to reduction in nonstructural carbohydrates in Norway spruce tree roots but not in the canopy. **Funct. Ecol**. 27, 413–427.
- Hartmann H (2011) Will a 385 million year-struggle for light become a struggle for water and for carbon? - how trees may cope with more frequent climate change-type drought events. **Glob. Change Biol**. 17:642–655.
- Hartmann H et al (2018) Research frontiers for improving our understanding of drought-induced tree and forest mortality. **New Phytologist**, 218(1), 15–28.
- Hérault A et al (2013) Optimal stomatal conductance in relation to photosynthesis in climatically contrasting Eucalyptus species under drought. **Plant Cell Environ**, 36:262–274.
- Hochberg U et al (2017) Grapevine acclimation to water deficit: the adjustment of stomatal and hydraulic conductance differs from petiole embolism vulnerability. **Planta**, 245(6):1091–1104.
- Islam M et al (2019) Impact of extreme drought on tree-ring width and vessel anatomical features of *Chukrasia tabularis*, **Dendrochronologia**. 53:63–72.
- Kissel E et al (2015) Transpiration efficiency versus growth: Exploring the banana biodiversity for drought tolerance. **Sci Hortic**, 185:175–182.
- Klein T, et al (2018) Xylem embolism refilling and resilience against drought-induced mortality in woody plants: processes and trade-offs. **Ecol Res**. 33: 839.
- Kono Y et al (2019) Initial hydraulic failure followed by late-stage carbon starvation leads to drought-induced death in the tree *Trema orientalis* *Communications Biology*, 2: 8.
- Lima JRS et al (2006) Comparação da sonda de nêutrons e de sensores tipo TDR para a determinação dos componentes do balanço hídrico no solo e evapotranspiração do feijão Caupi. **AGROTEC**, 27(1):21–29.
- Lopes CM, Pinto PA (2005) Easy and accurate estimation of grapevine leaf area with simple mathematical models. *Vitis* 44(2):55-61.
- Marcos FCC et al (2018) Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. **J Plant Phys**. 223:9-18.
- Martin-StPaul N et al (2017) Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. **Ecol. Lett**, 20: 1437–1447.
- McDready RM (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. **Anal Chem**, 22:1156-1158.

- McDowell N, et al. (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? **New Phytol**, 178, 719–739.
- Mencuccini M et al (2015) Coordination of physiological traits involved in drought-induced mortality of woody plants. **New Phytol**, 208(2):396–409.
- Mitchell PJ et al (2013) Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. **New Phytol**, 197(3):862–872.
- Nagy Z et al (2013) Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. **Plant Physiol Biochem**, 67:48–54.
- Nazar R, et al (2015). Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. **South African J Bot**, 98, 84–94.
- Sack L et al (2003) The hydrology of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. **Plant, Cell & Environment** 26: 1343– 1356
- Sack L et al (2008) Leaf palmate venation and vascular redundancy confer tolerance of hydraulic disruption. **Proc Natl Acad Sci**, 105(5):1567–1572.
- Sack L, Scoffoni C (2012) Measurement of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance and their responses to irradiance and dehydration using the evaporative flux method (EFM). **J Vis Exp**, 70: 1-7.
- Saiki S-T et al (2017) Physiological mechanisms of drought-induced tree die-off in relation to carbon, hydraulic and respiratory stress in a drought-tolerant woody plant. **Sci Rep**, 7(1):2995.
- Salleo et al (2000) Xylem cavitation and hydraulic control of stomatal conductance in Laurel. **Plant Cell Environ**, 23:71-79.
- Sano EE et al (2019) Cerrado ecoregions: A spatial framework to assess and prioritize Brazilian savanna environmental diversity for conservation. **J Environ Manage**, 232, 818–828.
- Santner A, Estelle M (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, 459: 1071–1078.
- Sarwat M, Tuteja N (2017) Hormonal signaling to control stomatal movement during drought stress. **Plant Gene**, 11:143–153.
- Schuster A et al (2016) Effectiveness of cuticular transpiration barriers in a desert plant at controlling water loss at high temperatures, **AoB Plants**, 8(1): plw027.
- Scoffoni C et al (2011) Decline of Leaf Hydraulic Conductance with Dehydration: Relationship to Leaf Size and Venation Architecture. **Plant Phys**, 156(2):832–843.
- Scoffoni C et al (2012) Dynamics of leaf hydraulic conductance with water status: quantification and analysis of species differences under steady state. **J Exp Bot**, 63: 643-658.
- Segatto FB et al (2013) Effects of ethylene on the post-production of potted ornamental peppers (*Capsicum annuum* L.). **Acta Hort**, 1000:217-222.
- Shen Q et al (2015) Responses of shelterbelt stand transpiration to drought and groundwater variations in an arid inland river basin of Northwest China. **J Hyd**, 531: 738–748.
- Silva PEM et al (2013) The functional divergence of biomass partitioning carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply. **Environ Exp Bot**, 87:49-57.
- Simonin KA et al (2015) Increasing leaf hydraulic conductance with transpiration rate minimizes the water potential drawdown from stem to leaf. **J Exp Bot**, 66(5): 1303–1315.
- Sousa L, et al (2019) Improving water use efficiency by changing hydraulic and stomatal characteristics in soybean exposed to drought: the involvement of nitric oxide. **Physiol Plant**, 3:1-15.
- Strassburg BBN et al (2017) Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nat Ecol Evol**, 1(4), 0099.
- Tabassum et al (2016) Influence of leaf vein density and thickness on hydraulic conductance and photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) during water stress. **Sci Rep**, 6: 1–9.
- Tardieu F (2005) Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. **Compt Rendus Geosci** 337: 57–67.

- Trueba S et al (2017) Vulnerability to xylem embolism as a major correlate of the environmental distribution of rain forest species on a tropical island. **Plant Cell Env** 40: 277–289.
- Uhl D, Mosbrugger V (1999) Leaf venation density as a climate and environmental proxy: a critical review and new data. **Palaeogeography**, 149(1-4):15-26.
- Urli M et al. (2013) Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. **Tree Physiol.** 33:672–683.
- Yan W et al (2017) Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. **Sci Rep**, 17: 4470.
- Young DJN et al (2017) Long-term climate and competition explain forest mortality patterns under extreme drought. **Ecol. Lett.** 20, 78–86.
- Yoshimura K et al (2016) The dynamics of carbon stored in xylem sapwood to drought-induced hydraulic stress in mature trees. **Sci. Rep.** 6:24513.
- Zhang X et al (2019) Overexpression of NtabDOG1L promotes plant growth and enhances drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. **Plant Sci**, 287: 110186.
- Zhu S-D et al (2018) Leaf turgor loss point is correlated with drought tolerance and leaf carbon economics traits. **Tree Physiol**, 38(5), 658–663.
- Zeppel MJB et al (2013) Forest mortality due to drought: latest insights, evidence and unresolved questions on physiological pathways and consequences of tree death. **New Phytol.** 197:372–374.