



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

ALINY CLAWDY MOTA RIBEIRO

**Efeito do alagamento e da luminosidade em plantas de *Vitex cymosa*:
respostas fisiológicas, bioquímicas e morfoanatômicas**

**BRASÍLIA
2014**

ALINY CLAWDY MOTA RIBEIRO

**Efeito do alagamento e da luminosidade em plantas de *Vitex cymosa*:
respostas fisiológicas, bioquímicas e morfoanatômicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane da Silva Ferreira

BRASÍLIA
2014

Efeito do alagamento e da luminosidade em plantas de *Vitex cymosa*:
respostas fisiológicas, bioquímicas e morfoanatômicas

Aliny Clawdy Mota Ribeiro

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Marília Gaspar – Instituto de Botânica de São Paulo
(Membro externo)

Prof. Dr. Augusto César Franco - Universidade de Brasília – UnB
(Membro titular)

Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams - Universidade de Brasília – UnB
(Membro suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES, que por meio do Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (CAPES/PNADB), proporcionou minha estada e as coletas na Amazônia, e ao CNPq (Edital Universal) que financiou parte do projeto e também a minha bolsa REUNI.

Agradeço a minha orientadora Cristiane por ter me recebido no laboratório, por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos e pelo apoio durante esses dois anos.

Ao Professor Augusto pelo auxílio, principalmente, com o delineamento experimental. Ao Professor Thomas pelas análises cromatográficas.

Aos técnicos Marinho, Fábio Nakamura, Rodolfo e Juliana. Ao técnico Zé do Carmo que me acompanhou durante meses na estação experimental da UnB. Agradeço ao Sr. Fábio e a sua equipe que também me ajudaram durante a fase experimental.

Ao Will, meu veterano e amigo, que me ajudou muito e tornou esse processo menos difícil. A Izabelly pela amizade, pela ajuda e por ter me ensinado a usar o IRGA, claro! A Natacha e a Hérica pela companhia e pelos risos. A Estela pela ajuda e companhia no laboratório. A Jéssica pela ajuda na anatomia. A Reneida, ao Maicon, a Ana Fabrícia, ao Chesterton, a Isa, a todos que conviveram comigo e tornaram os meus dias melhores. Fico muito feliz por ter feito tantos amigos.

A todos os meus amigos que até hoje não sabem direito o que eu fiz durante esses dois anos, mas que sempre me apoiaram.

A minha mãe por ter sempre zelado pela minha educação apesar das muitas dificuldades. Ao meu namorado, Giovanni, que durante o mestrado se tornou meu marido e sempre me deu força.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESES.....	5
3. OBJETIVO GERAL	5
3.1 Objetivos específicos	5
4. MATERIAIS E MÉTODOS	6
4.1. Espécie estudada	6
4.2. Área de coleta e obtenção das plantas	7
4.3. Desenho Experimental	9
4.4. Avaliação do crescimento, morfologia e área foliar específica das plantas	10
4.5. Biomassa das plantas	11
4.6. Assimilação de CO ₂ e análise de clorofila das folhas.....	11
4.7. Anatomia.....	12
4.8. Análise de carboidratos e perfil metabólico das plantas.....	13
4.10. Recuperação das plantas	14
4.11. Análise estatística	15
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSSÃO.....	24
8. BIBLIOGRAFIA.....	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** a) *Vitex cymosa* em floração em floresta de várzea durante a cheia, b) detalhe das flores e frutos, c) frutos maduros e d) frutos na água..... 7
- Figura 2.** Localização da área de coleta. * Ilha de Marchantaria. 8
- Figura 3.** Distribuição das plantas por tratamento..... 9
- Figura 4.** Experimento montado na estação experimental da Universidade de Brasília. Os baldes com as plantas (alagadas e não-alagadas) foram cobertos com sombrite que simularam as condições de luz (5% e 50%) 10
- Figura 5.** Taxa de assimilação de CO₂ em diferentes densidades de fótons de fluxo fotossintético (PPFD) em plantas de *Vitex cymosa* antes de serem submetidas aos tratamentos. As médias representam 6 repetições biológicas ± o desvio padrão..... 12
- Figura 6.** Raízes adventícias em *V. cymosa* submetida ao alagamento. 15
- Figura 7.** Corte anatômico mostrando o aerênquima formado na raiz secundária de *V. cymosa* (a) e detalhe (b). 16
- Figura 8.** Incremento em altura (a) e em diâmetro (b) nas plantas de *V. cymosa* ao longo dos 90 dias de experimento. BI/NA= baixa irradiância /não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância/alagadas; AI/NA= alta irradiância / não alagadas. As médias representam 10 repetições biológicas ± o desvio padrão. 17
- Figura 9.** Produção de folhas de *V. cymosa* ao longo de doze semanas. BI/NA= baixa irradiância /não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância / alagadas; AI/NA= alta irradiância / alagadas. As médias representam 10 repetições biológicas ± o desvio padrão..... 17
- Figura 10.** Medidas de assimilação máxima (a), transpiração (b) e condutância estomática (c) nas primeiras 96 horas em que as plantas de *V. cymosa* foram submetidas ao alagamento. BI/NA= baixa irradiância /não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância / alagadas; AI/NA= alta irradiância / alagadas. As médias representam 5 repetições biológicas ± o desvio padrão..... 19
- Figura 11.** Medidas de assimilação máxima (a), transpiração (b) e condutância estomática (c) ao longo de doze semanas. BI/NA= baixa irradiância /não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância/alagadas; AI/NA= alta irra irradiância/alagadas; AI/NA= alta irradiância / alagadas. As médias representam 10 repetições biológicas ± o desvio padrão..... 20
- Figura 12.** Ácido succínico identificado nas raízes (a), caule (b) e folhas (c) de *V. cymosa* em unidades arbitrárias. BI/NA= baixa irradiância /não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância/alagadas; AI/NA= alta irradiância / alagadas. As médias representam 5 repetições ± o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos..... 22

Figura 13. Medidas de assimilação máxima (a), transpiração (b) e condutância estomática (c) nas 96 primeiras horas, ao oitavo dia e ao vigésimo quinto dia após o alagamento. BI/NA= baixa irradiância / não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância / alagadas. As médias representam 5 repetições biológicas \pm o desvio padrão..... 23

Tabela 1. Efeitos e interações dos parâmetros foliares de plantas jovens de *V. cymosa*. As médias representam 3 repetições biológicas \pm o desvio padrão. Interações entre os tratamentos de luz (L) e alagamento (A) foram analisados por ANOVA fatorial onde: $p > 0,05$ ($> 0,05$ (ns), $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,001$ (**). 18

Tabela 2. Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de plantas jovens de *Vitex cymosa*. As médias representam 5 repetições biológicas \pm o desvio padrão. Interações entre os tratamentos de luz (L) e alagamento (A) foram analisados por ANOVA fatorial onde: $p > 0,05$ (ns), $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,001$ (**). 21

Tabela 3. Conteúdo de amido ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de plantas jovens de *Vitex cymosa*. As médias representam 5 repetições biológicas \pm o desvio padrão. Interações entre os tratamentos de luz (L) e alagamento (A) foram analisados por ANOVA fatorial onde: $p > 0,05$ (ns), $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,001$ (**). 21

RESUMO

Alagamento e sombreamento são dois importantes estresses que podem limitar o crescimento e o desenvolvimento de plantas. Nas florestas de várzea da Amazônia, muitas plantas estão sujeitas a períodos de alagamento do solo que ocorrem simultaneamente à exposição destas ao sombreamento, especialmente no interior da floresta. Este trabalho objetivou avaliar o efeito desses dois estresses (alagamento e sombreamento) na fisiologia, bioquímica e morfoanatomia de *Vitex cymosa* (Lamiaceae), uma arbórea comum nas várzeas amazônicas, e determinar se a interação entre eles tem efeito amplificado ou se um estresse pode predominar sobre o outro (estresse hierárquico). Plantas com um ano de idade foram submetidas experimentalmente a condições alagadas (coluna de água ~5 cm acima do solo) e não-alagadas (solo na capacidade de campo), sob dois níveis de luminosidade, baixa e alta irradiância (5% e 50% da luz solar plena, respectivamente). O experimento durou 90 dias. Semanalmente, foram avaliadas alterações na morfologia, incremento em altura da planta, diâmetro do caule, produção de folhas, assimilação máxima de CO₂ (A_{max}) e de transpiração (E). Aos 30 dias de experimento foram coletadas plantas para as análises anatômicas e, ao final do experimento de 90 dias foram feitas análises bioquímicas (açúcares solúveis totais, amido e perfil metabólico) em raízes, caules e folhas das plantas. Foi avaliada a recuperação das plantas após a retirada do alagamento. Todas as plantas nos tratamentos de alagamento (baixa e alta luz) apresentaram raízes adventícias e aerênquima. Plantas alagadas apresentaram um menor incremento em comprimento e em diâmetro e menor produção de folhas, quando comparadas àquelas não-alagadas ($p < 0,05$), independente do nível de luminosidade. Com relação à A_{max}, foi verificado não apenas um significativo efeito do alagamento, com uma menor assimilação de CO₂ pelas plântulas submetidas ao alagamento ($p < 0,001$), mas também o efeito da interação entre os tratamentos de luz e de alagamento ($p \leq 0,001$). Nas plantas alagadas, houve um acúmulo de amido na parte aérea e a depleção de AST nas raízes. O perfil metabólico mostrou que houve acúmulo de ácido succínico nas raízes das plantas alagadas indicando metabolismo anaeróbico nesse órgão. Deste modo, as respostas das plantas aos tratamentos de luz e de alagamento apontam para a existência de uma hierarquia entre os fatores ambientais limitantes para a planta.

ABSTRACT

Waterlogging and shading are two important stresses that can limit the growth and development of plants. In floodplain forests of the Amazon, many plants are subject to periods of flooding that occur simultaneously with exposure to shading, especially in the forest. This study aimed to evaluate the effect of these two stresses (waterlogging and shading) in physiology, biochemistry and morphoanatomy of *Vitex cymosa* (Lamiaceae), a common tree in the Amazonian floodplains, and determine if the interaction between them has amplified effect or a stress may predominate over the other (hierarchical stress). One year old plants were subjected to experimentally waterlogged conditions (~ 5 cm above the ground) and non-waterlogged (field capacity) under two light levels, low and high irradiance (5% and 50% of full sunlight , respectively). The experiment lasted 90 days. Weekly changes were evaluated in morphology, anatomy of roots, increase in plant height, stem diameter, leaf production, measures of maximum CO₂ assimilation (A_{max}) and transpiration (E). At the end of 90 days, analysis of total soluble sugar (AST), starch and succinic acid were made. The recovery of the plants was evaluated after removal of the waterlogging. All plants in the waterlogging treatments (low and high irradiance) showed aerenchyma and adventitious roots. Waterlogged plants showed a lower increase in length and diameter and lower leaf production when compared to those non-waterlogged plants ($p < 0.05$), regardless of light level. With respect to A_{max}, not only a significant effects of waterlogging were observed, with a lower CO₂ assimilation by plants of waterlogging treatment ($p < 0.001$), but also one effect of the interaction between light treatments and waterlogging ($p \leq 0.001$) was detected. In waterlogged plants, there was an accumulation of starch in the shoot and the depletion of AST in the roots. Succinic acid was accumulated only in the roots of waterlogged plants indicating anaerobic metabolism in this organ. Thus, the responses of plants to light and waterlogging treatments indicate the existence of a hierarchy between the limiting environmental factors for the plant.

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas que afetam a produtividade de plantas, tanto nativas quanto agronomicas, são os estresses abióticos. Por serem sésseis, as plantas são expostas ao longo do seu ciclo de vida a constantes mudanças das condições ambientais, que muitas vezes podem ser desfavoráveis ao seu crescimento e estabelecimento no ambiente (Larcher, 2006; Reddy *et al.*, 2011). A colonização bem sucedida de uma espécie depende da capacidade de expressar mecanismos que garantam a sobrevivência aos diversos tipos de estresses a que são expostas, e que na maioria das vezes envolve respostas em todos os níveis funcionais do organismo (Bohnert *et al.*, 1995; Larcher, 2006; Reddy *et al.*, 2011). Vários são os tipos de estresses abióticos, contudo nos ecossistemas naturais os mais comuns são decorrentes do excesso ou déficit de água e da disponibilidade luz no ambiente para a planta (Bohnert *et al.*, 1995; Chaves *et al.*, 2002; Hadiarto & Tran, 2011; Larcher, 2006).

Na natureza, raramente um fator de estresse atua sozinho. Um exemplo extremo é o que ocorre nas florestas de várzea da Amazônia, situadas no maior bioma brasileiro. As várzeas são planícies banhadas por rios oriundos de áreas geologicamente recentes dos Andes e encostas pré-andinas, suas águas são brancas, pois carregam grandes quantidades de sedimentos em suspensão e o pH é próximo a neutro (Prance, 1979). Todos os anos, a vegetação que coloniza essas áreas é submetida a um prolongado período de alagamento, que pode variar de alguns dias até 270 dias seguidos (Junk *et al.*, 1989). Ao mesmo tempo, muitas espécies, principalmente durante a fase de plântula, podem sofrer com o baixo nível de luminosidade decorrente do sombreamento proporcionado pelas árvores mais altas do dossel (Junk *et al.*, 2011; de Oliveira Wittmann *et al.*, 2011, Wittmann *et al.*, 2010). De fato, a exuberância da vegetação dificulta a penetração e disponibilidade de luz para o subbosque. Nas florestas secundárias tardias da várzea, valores de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) medidos abaixo da copa das árvores podem variar entre 3 e 17% da luz solar plena, tendo efeito direto no estabelecimento e crescimento de muitas espécies não tolerantes ou pouco tolerantes ao sombreamento (Wittmann *et al.*, 2011). Entretanto, apesar dos condicionantes para a vegetação, mais de 1000 espécies de árvores ocorrem nas florestas de várzea ao longo da bacia amazônica, que é considerada uma das áreas

alagáveis mais diversas do mundo (Wittmann *et al.*, 2010), e por isso, um dos ecossistemas alagáveis mais estudados da região.

A composição das espécies e a estrutura da várzea variam ao longo do gradiente de inundação. A várzea possui três habitats característicos, várzea alta, baixa e chavascal, significativamente diferentes quanto à estrutura florestal e a composição de espécies, refletindo a topografia do ambiente. As florestas da várzea alta se estabelecem onde a média anual da coluna d'água durante o pulso de inundação é menor que 3 m e os períodos de inundação são menores que cinquenta dias ao ano. Estas são florestas sucessionais tardias que ocupam a zona de transição entre ambientes alagados e não alagados. As florestas da várzea baixa se estabelecem onde a coluna de água tem uma média anual maior que 3 m e por um período maior que cinquenta dias ao ano. Dentro das florestas de várzea baixa há uma vegetação especial, o chavascal. Essa vegetação ocorre em depressões topográficas que não drenam e, portanto, permanece alagada o ano todo (Wittmann *et al.*, 2002). Dessa forma, a composição florística nessas áreas depende do regime de inundação, teor de sedimentos e intensidade da inundação (Junk *et al.*, 1989).

As condições encontradas nas florestas de várzea são um exemplo de ambiente extremo, pois o alagamento promove uma série de alterações nos processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem no solo e influenciam no crescimento das plantas (Piedade *et al.*, 2011; Ponnampertuma, 1984). Uma das primeiras alterações que ocorrem no solo inundado é a diminuição na concentração de oxigênio. A escassez de oxigênio em solos saturados de água se deve a um desequilíbrio entre uma difusão lenta do gás na água e o consumo de O₂ por micro-organismos e pelas raízes das plantas (Visser *et al.*, 2003). A exposição das plantas à inundação durante a estação de crescimento leva a inibição da germinação de sementes e do crescimento vegetativo e reprodutivo, alterações na anatomia vegetal, promoção da senescência precoce e mortalidade (Kozłowski, 1997). Plantas tolerantes ao alagamento desenvolveram várias respostas fisiológicas, morfológicas e anatômicas que parecem minimizar o impacto do estresse (Kozłowski, 1984; De Simone *et al.*, 2003; Colmer & Voisenek, 2009; Jackson, 2005; Parolin & Wittmann, 2010).

O alagamento do solo diminui a expansão foliar, o crescimento cambial e o crescimento da raiz afetando o desenvolvimento na maioria das plantas (Herrera, 2013;

Jackson, 2005; Kozłowski, 1984). Importantes adaptações morfológicas ao alagamento incluem a formação de aerênquima (tecido caracterizado por grandes espaços intercelulares), hipertrofia de lenticelas, raízes adventícias, bem como a produção de novas raízes. Estas estruturas tem a função de facilitar as trocas gasosas entre os tecidos da planta ou entre a planta e o meio externo (Ferreira *et al.*, 2009; Kozłowski, 1984; Simone *et al.*, 2002).

Redução na taxa de fotossíntese imediatamente após o alagamento é comum para várias espécies que colonizam áreas úmidas devido ao fechamento dos estômatos como uma resposta ao alagamento e, em muitas espécies intolerantes, eles permanecem fechados por um longo período (Kozłowski, 1984; Tang & Kozłowski, 1982; Pezeshki, 2001). Supõe-se que os mecanismos que levam à redução da condutância estomática estão ligados a condutividade hidráulica reduzida da raiz e subsequentemente a restrição da absorção de água pelas raízes (Kreuzwieser & Rennenberg, 2014; Parent *et al.*, 2008).

O metabolismo anaeróbico ocorre em função da baixa disponibilidade de oxigênio no solo e são as primeiras respostas da planta ao alagamento. Isso acontece porque a planta precisa de alternativas para manter o metabolismo em condições de hipoxia ou mesmo anoxia dos tecidos. (Joly, 2011; Colmer & Voesenek, 2009; Ferreira *et al.* 2009). As mudanças metabólicas que são induzidas logo após o alagamento podem ser explicadas pela ativação do metabolismo da alanina em combinação com a bifurcação da rota do ácido tricarbóxico, levando a uma acumulação de alanina e succinato e produção extra de ATP sob condições de hipoxia (Rocha *et al.*, 2010).

A redução da produção de energia e fornecimento de intermediários necessários para os processos de sobrevivência ou crescimento devido ao alagamento (Crawford, 2003; Dennis *et al.*, 2000) combinado com a baixa irradiância, leva à diminuição da taxa de assimilação de carbono pela fotossíntese. Assim, as plantas não conseguem manter a oferta de carboidratos necessários para a respiração ou metabolismo anaeróbico durante a submersão, o que acentua ainda mais o impacto negativo do alagamento (Agarwal & Grover, 2006).

Nas florestas de várzea da Amazônia, tanto o alagamento quanto a disponibilidade de luz para as plantas ao longo do relevo, interferem na composição do dossel e na dinâmica de populações das espécies (Bianchini *et al.*, 2001). Em ambientes

de florestas, devido a interceptação de grande parte da luminosidade pelas árvores dominantes do dossel (Larcher, 2006; Taiz & Zeiger, 2006), as plantas jovens do sub-bosque estão continuamente submetidas ao estresse de sombreamento. Uma repentina exposição a um estresse severo (e.g. alagamento) pode predominar sobre os outros fatores que anteriormente regulavam o crescimento (e.g. luminosidade) (Kozlowski, 1991).

Segundo Lenssen *et al.* (2003) há outras possibilidades além da hierarquia entre os estresses (onde um predomina fortemente sobre o outro) sendo elas a sinergia e a inibição. Na sinergia o efeito dos dois estresses é maior do que a simples soma dos efeitos dos estresses individuais onde a tolerância para um dado estresse é tipicamente reduzida por outros estresses concorrentes ou por fatores bióticos, como herbivoria, pragas e competição (Niinemets & Valladares, 2006). Já na inibição um estresse reduz o efeito do outro. O conhecimento da tolerância aos estresses abióticos primários ainda é escasso para muitas plantas nativas e a tolerância a estresses simultâneos é mal compreendida, apesar da coexistência de múltiplos estresses na natureza (Niinemets & Valladares, 2006).

Na natureza são muitas as variáveis coexistentes que influenciam o sucesso ou fracasso no estabelecimento de plantas. Estresses como a privação de luz por sombreamento ou de alagamento afetam diretamente a fotossíntese e a respiração, ou seja, as rotas do metabolismo primário do carbono. É importante saber quais adaptações anatômicas, morfológicas e fisiológicas e bioquímicas permitem que as plantas se estabeleçam em condições tão adversas. Espécies que ocorrem naturalmente nesses ecossistemas extremos, como é o caso de *Vitex cymosa*, uma arbórea que coloniza florestas de várzea baixa na região amazônica, e que é bem tolerante ao alagamento (Parolin, 2001; Piedade *et al.*, 2001), devem apresentar, de forma mais evidente, as adaptações que lhes permitem sobreviver por longos períodos de inundação, muitas vezes sob total ausência de luz.

2. HIPÓTESES

1) Plantas de *V. cymosa* mantidas em condições de baixa irradiância em solo não alagado (na capacidade de campo) apresentarão o crescimento reduzido e um menor percentual de sobrevivência, quando comparadas com aquelas mantidas em alta irradiância com solo nas mesmas condições. Isso ocorrerá porque a luz é um recurso essencial para a realização da fotossíntese, que implica na produção de reservas para uso no metabolismo e no crescimento, sendo assim o principal fator limitante para o desenvolvimento das plantas.

2) O alagamento parcial não restringirá o desenvolvimento das plantas de *V. cymosa*, pois, tendo em vista que a espécie ocorre naturalmente nas florestas de várzea da Amazônia, apresenta mecanismos morfológicos (ex. formação de raízes adventícias e lenticelas) e anatômicos (ex. formação de aerênquimas) capazes de minimizar os danos causados pelo alagamento e possibilitar o crescimento da planta.

3) O alagamento deverá ser mais danoso para as plantas que o sombreamento, assim, é esperado que haja uma hierarquia entre os estresses.

3. OBJETIVO GERAL

- Avaliar as alterações que ocorrem no crescimento, na morfoanatomia, na fisiologia e na bioquímica de plantas de *Vitex cymosa* em resposta ao alagamento parcial, em condições contrastantes de luminosidade (alta e baixa irradiância).

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento em altura e diâmetro, área foliar e a produção de folhas das plantas quando submetidas aos tratamentos de alagamento e de luminosidade.

- Registrar a ocorrência ou não de características morfológicas que possam ser consideradas como respostas das plantas aos tratamentos de alagamento e de luminosidade.
- Avaliar a área foliar das plantas submetidas aos tratamentos de alagamento e luminosidade.
- Determinar os teores de açúcares solúveis totais e de amido nos órgãos das plantas da espécie, nos tratamentos de alagamento e de luminosidade.
- Analisar o perfil metabólico das plantas quando submetidas aos tratamentos de alagamento e de luminosidade.
- Avaliar a taxa de assimilação fotossintética das plantas nos tratamentos de alagamento e de luminosidade.
- Avaliar a taxa de sobrevivência da espécie após submetê-la aos tratamentos de alagamento e de luminosidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Espécie estudada

A espécie escolhida para estudo foi *Vitex cymosa* (Bertero ex Spreng), Lamiaceae. A família apresenta distribuição cosmopolita, sendo que no Brasil ocorrem 28 gêneros com cerca de 350 espécies. É representada por ervas e arbustos, menos frequentemente por árvores. O gênero *Vitex* possui 56 espécies que ocorrem na América do Sul (Souza & Lorenzi, 2008). *V. cymosa* é uma arbórea que ocorre em florestas úmidas, ao longo das margens dos rios e, com frequência, em locais de baixa altitude (Worbes *et al.*, 1992). Nas florestas de várzea da Amazônia, a ocorrência da espécie é restrita às porções mais baixas do relevo inundável, o que a caracteriza como uma espécie de várzea baixa, podendo permanecer inundada por mais de três meses ao ano (Wittmann *et al.*, 2004; Junk *et al.*, 2012; Parolin *et al.*, 2010). Possui a base do tronco levemente digitada e o ritidoma cinza claro, fibroso, papuloso. O floema apresenta cor creme e albúrnio de cor alaranjada. Folhas opostas, palmadas, com cinco folíolos. A floração da espécie nas várzeas amazônicas coincide com o pico da cheia (Fig.1a) e a dispersão ocorre pela água (hidrocória) (Fig. 1d) e por peixes (Parolin *et al.*, 2011; Wittmann *et al.*, 2010). As flores são azuis a roxas, zigomórficas (Figura 1b). Os frutos são drupas globosas, roxas a pretas, quando maduras (Wittmann *et al.*, 2010).



Figura 1. a) *Vitex cymosa* em floração em floresta de várzea durante a cheia, b) detalhe das flores e frutos, c) frutos maduros e d) frutos na água.

4.2. Área de coleta e obtenção das plantas

Frutos maduros foram coletados de pelo menos cinco plantas no campo, distantes uma das outras, em áreas de várzea baixa na região da Ilha de Marchantaria e adjacências, nas proximidades da cidade de Manaus, Amazonas (03° 15' S, 60° 00' W). A Ilha de Marchantaria é banhada pelo Rio Solimões/Amazonas (Fig.2). Essas áreas podem permanecer inundadas em média seis meses ao ano, com uma coluna de água de até oito metros (Serviço Geológico do Brasil, 2011).



Figura 2. Localização da área de coleta. * Ilha de Marchantaria.

Após a coleta no campo, os frutos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados (via aérea) para o laboratório de Fisiologia do Estresse, na Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal. No laboratório, os frutos foram despulpados para a obtenção das sementes. Procedeu-se a separação de cinco lotes compostos de 100 sementes cada, que foram colocadas para germinar em bandejas de 20 cm x 30 cm, contendo substrato vermiculita. As bandejas foram mantidas em câmaras de germinação tipo B.O.D., a 28 °C e fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram até o desenvolvimento da plântula. As plântulas formadas foram transplantadas para sacos plásticos de 1,5 L com a mistura de solo: para cada 60 L de terra previamente autoclavada, 25 L de esterco de galinha, 1 Kg de cal (CaO) e 1,5 Kg de fertilizante NPK 4-14-8. Depois do plantio, estas foram mantidas em casa de vegetação, para aclimações às novas condições e, as plantas com um ano foram utilizadas nos experimentos de alagamento e luminosidade. As plantas foram submetidas por 30 dias aos tratamentos de irradiância antes de serem submetidas aos tratamentos de alagamento.

4.3. Desenho Experimental

O experimento foi montado na Estação Biológica da UnB, em ambiente aberto com luz solar plena. Para o alagamento foram utilizados baldes de polietileno (50 L), sendo colocada 1plântula/1balde (Fig. 4). Cada balde foi considerado uma unidade amostral. Os níveis de luminosidade foram obtidos com uso de sombrite, e o percentual em cada tratamento foi aferido por um sensor quântico calibrado na faixa fotossinteticamente ativa, tendo como referência a luz solar do ambiente ao 12h, horário de maior incidência de luz solar. A média da irradiância ao meio dia foi de $2030 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em área externa, nas parcelas para obtenção do tratamento de baixa irradiância a média foi de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e nas parcelas para obtenção do tratamento de alta irradiância foi de $1037 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As plantas foram submetidas a quatro tratamentos, com treze plantas cada. Os tratamentos foram uma combinação de (1) níveis de alagamento: não alagado (regas diárias e solo na capacidade de campo) e submersão parcial (coluna de água de 5 cm acima do solo); e (2) níveis de luminosidade: alta irradiância (50% da luz solar ambiente) e baixa irradiância (5% da luz solar ambiente), de acordo com a figura abaixo:

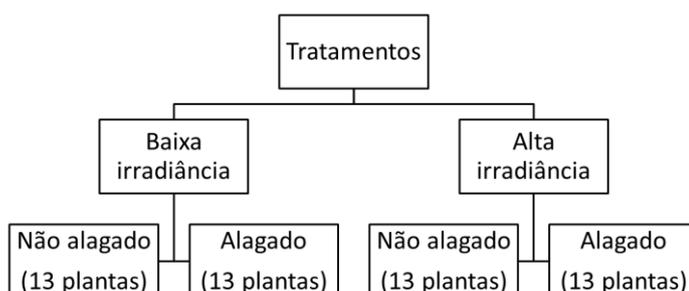


Figura 3. Distribuição das plantas por tratamento.

O experimento teve a duração de 90 dias, durante o qual foram avaliados semanalmente os seguintes parâmetros abióticos: temperatura do ambiente (máxima e

mínima) e concentração de oxigênio dissolvido na água (Oxímetro digital Lutron, modelo DO - 5519).



Figura 4. Experimento montado na estação experimental da Universidade de Brasília. Os baldes com as plantas (alagadas e não-alagadas) foram cobertos com sombrite que simularam as condições de luz (5% e 50%).

4.4. Avaliação do crescimento, morfologia e área foliar específica das plantas

Dez plantas foram marcadas, no início do experimento, para avaliação do crescimento em altura e diâmetro, com uso de trena milimetrada e paquímetro, durante o período de 90 dias em que ficaram submetidas aos tratamentos. Semanalmente, foram observadas alterações na morfologia relacionadas às respostas aos diferentes tratamentos, como: clorose, epinastia das folhas, raízes adventícias, hipertrofia de lenticelas no caule, perda ou produção de folhas. Para análise da área foliar específica (AFE), efetuou-se a retirada de discos de área conhecida de folhas totalmente expandidas, no final do tratamento de alagamento, que foram secas em estufas a 70° C por 72 horas, seguindo o protocolo de Cornelissen *et al.*(2003).

4.5. Biomassa das plantas

Ao final dos 90 dias de experimentação, cinco plantas de cada tratamento foram coletadas, seccionadas em raiz e parte aérea, e secas em liofilizador e em seguida pesadas para obtenção da massa seca. As pesagens foram realizadas em balança de precisão 0,0001 g (Marte AY220).

4.6. Assimilação de CO₂ e análise de clorofila das folhas

Por meio de um analisador de gás por infravermelho (IRGA Lc pro, ADC BioScientific), foram tomadas as medidas de assimilação máxima de CO₂ (A_{max}), condutância estomática (gs) e transpiração (E) em cinco plantas por tratamento nas primeiras 96 horas em foram submetidas aos tratamentos. Ao longo dos 90 dias essas medidas foram tomadas em dez plantas semanalmente.

As medidas foram realizadas sempre na parte da manhã, entre 8:00h e 11:00h, em folhas totalmente expandidas evitando incluir a nervura principal da folha, sendo realizadas três medidas em cada folha. A temperatura e luminosidade foram controladas pelo aparelho em 30°C e 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. O valor da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) foi fixado em 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por ser o PPFD onde a assimilação de CO₂ atingiu a saturação, tal dado foi obtido a partir de uma curva de resposta a luz realizada anteriormente á montagem do experimento (Fig. 5).

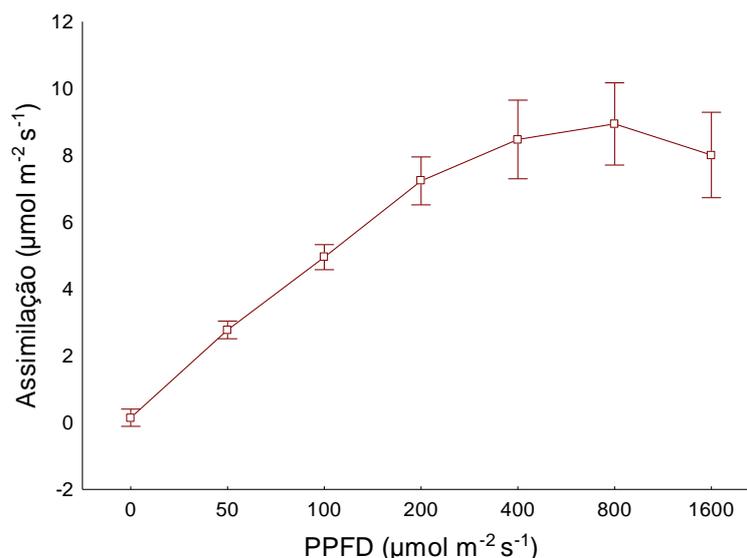


Figura 5. Taxa de assimilação de CO_2 em diferentes densidades de fótons de fluxo fotossintético (PPFD) em plantas de *Vitex cymosa* antes de serem submetidas aos tratamentos. As médias representam 6 repetições biológicas \pm o desvio padrão.

Ao final dos 90 dias, foram analisadas as concentrações de clorofilas *a* e *b* por meio do método de extração com N,N-dimetilformamida (Wellburn, 1994), onde foi retirado um disco de 4 mm de diâmetro, que foi colocado em um tubo de microcentrífuga âmbar contendo 2 mL de DMF (N, N-dimetilformamida- $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$). Os tubos com as amostras foram mantidos em refrigerador a 4°C por 48 h. Após esse período foi feita a leitura em espectrofotômetro (Evolution 201 da Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 663.8, 646.8 e 480nm.

4.7. Anatomia

As análises anatômicas foram feitas nas raízes de três plantas de cada tratamento coletadas após 30 dias, para avaliar a formação de tecido aerênquima. O material fresco coletado foi fixado em FAA 70% por 24 horas, e posteriormente armazenado em álcool 70% para sua conservação até a realização dos cortes. Foram confeccionados cortes transversais consecutivos ao longo das raízes secundárias no micrótomo manual. Esses cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio nas concentrações de 20 e 50% (Kraus & Arduin, 1997), com o tempo variando de acordo

com o material, e posteriormente corados com solução de safranina e azul de alcian na proporção de 4:1 (Luque *et al.*, 1996). E montados em resina sintética (Paiva *et al.*, 2006). As fotos foram obtidas em microscópio LEICA DM 2500.

4.8. Análise de carboidratos e perfil metabólico das plantas

Ao final de 90 dias dos experimentos cinco plantas, em cada tratamento, foram retiradas dos baldes e separadas em raiz, caule e folha. O material coletado foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e em seguida transferido para secar em liofilizador. Depois de secas, as amostras foram pulverizadas em moinho de bola (Tecnal Ltda) para posteriores análises dos açúcares solúveis totais (AST), amido e do perfil metabólico.

Para açúcares solúveis totais, 10 mg de cada amostra de pó foram submetidas a quatro extrações com 500 μL de etanol 80% (v/v), incubada em banho-maria a 80 °C por 20 minutos. Após cada extração, a mistura foi centrifugada. Em seguida, foi feita a coleta do sobrenadante para uso na quantificação de açúcares solúveis totais em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 490 nm (Dubois *et al.*, 1956) com curva padrão de glicose.

A análise de amido foi feita com base na metodologia descrita por Amaral *et al.*(2007), na qual o resíduo da extração etanólica foi seco em speedvac e após a secagem, adicionados 500 μL de α -amilase termoestável ($120\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). As amostras foram incubadas a 75 °C por 30 minutos (repetido 2x). Em seguida foram adicionados 400 μL de amiloglicosidase ($30\text{ U}/\text{mL}^{-1}$) e a mistura de incubação foi mantida por 30 minutos a 50 °C (repetido 2x). A amostra foi submetida à digestão com ácido perclórico para a quantificação colorimétrica em ELISA (Spectra Max[®] 900) a um comprimento de onda de 505nm com curva padrão de glicose.

As análises de perfil de metabólitos foram realizadas com uso do sistema GC/MS (Cromatógrafo a Gás com espectrometria de massa) adaptada de Lisec *et al.*(2006) para amostras liofilizadas. Foi adicionado 1,4 mL de metanol e 60 μL de ribitol a cada amostra de 10 mg. As amostras foram incubadas a 70 °C por 10 min em banho-maria, depois foram centrifugadas e 750 μL do sobrenadante foi transferido para

novos eppendorfs. Foram adicionados 375 µL de clorofórmio refrigerado e 750 µL de água miliQ aos novos tubos contendo o sobrenadante da extração com metanol. As amostras foram levadas ao vortex e centrifugadas. A fase superior foi transferida para um novo tubo. Foram transferidas alíquotas de 150 µL para novos tubos, foram secas em speedvac e armazenados em freezer. A extração restante foi mantida congelada como reserva.

As alíquotas foram secas em speedvac antes de iniciar a derivatização com a finalidade de remover água que possa ter acumulado durante o armazenamento. Foram adicionados 40 µL de hidrócloro de metoxiamina aos tubos e estes levados ao vortex e ao banho seco com agitador por 2h a 37 °C. Os tubos foram centrifugados para retirar o condensado das tampas e foi adicionado a estes 70 µL de MSTFA, foram levados ao vortex, ao banho seco com agitador por 30 min a 37 °C e a centrifuga. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para os frascos do GC para serem injetadas.

Os cromatogramas obtidos tiveram a linha de base corrigidas com o software metAlign (Lommen, 2009) e a altura dos picos de massa foram normalizados para o padrão interno (ribitol). Os gráficos foram confeccionados com o uso do programa VANTED (Junker *et al.*, 2006).

4.10. Recuperação das plantas

Ao final do experimento de 90 dias, cinco plantas de cada tratamento foram retiradas dos tratamentos de alagamento, mantidas nos tratamentos de luminosidade e irrigadas na capacidade de campo. As plantas foram acompanhadas por 25 dias para avaliar a sua recuperação e sobrevivência. Durante esse período foram tomadas, semanalmente, as medidas de crescimento e anotadas as alterações morfológicas apresentadas, como a queda e produção de folhas. Foram também analisadas a assimilação de CO₂ pelas plantas, conforme metodologia descrita nos tópicos 4.6 e 4.5.

4.11. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para testar o efeito dos tratamentos foi realizada uma Anova fatorial considerando os tratamentos seco (baixa e alta luz) e parcialmente alagado (baixa e alta luz). Estas análises foram seguidas por testes de comparação de médias de Tukey em nível de 5% de significância. Para os testes e gráficos foi utilizado o programa Statistic versão 7.0 da empresa Statsoft.

5. RESULTADOS

Todas as plantas, nos quatro tratamentos, sobreviveram aos 90 dias de duração dos experimentos. Durante esse período, o oxigênio dissolvido na água esteve na faixa de 4mg/mL. A presença de raízes adventícias foi observada ainda na primeira semana de alagamento e após seis semanas todas as plantas submetidas ao alagamento apresentavam essa característica (fig. 6), contudo, não foi observada a presença de lenticelas ou de necrose nos tecidos.



Figura 6. Raízes adventícias em *V. cymosa* submetida ao alagamento.

Nas plantas submetidas ao alagamento, independente da luminosidade, a análise anatômica das raízes secundárias mostrou que as células do córtex na região de crescimento primário apresentaram organização cúbica, com pequenos espaços intercelulares e início de formação de aerênquima de origem esquizógena (Fig. 7). Não

foi observada a formação dessas estruturas em região de crescimento secundário e nem nas raízes das plantas nos tratamentos não alagados.

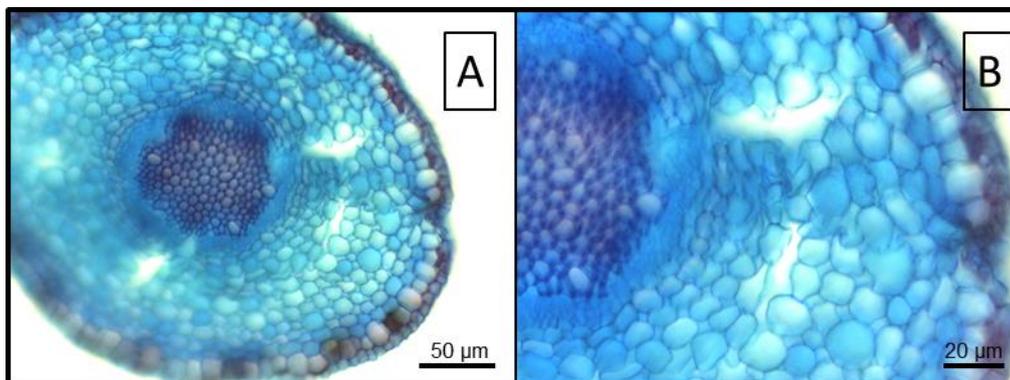


Figura 7. Corte anatômico mostrando o aerênquima formado na raiz secundária de *V. cymosa* (a) e detalhe (b).

Os níveis de luminosidade não afetaram o incremento em altura da planta (Fig. 8a). Por outro lado, em condições de alagamento este foi significativamente reduzido ($p < 0,001$), tanto no tratamento com baixa irradiância quanto alta irradiância. Verificou-se ainda que este parâmetro variou ao longo do tempo ($p < 0,001$) e, a partir da sexta semana ($p < 0,05$) os valores apresentados pelas plantas nos tratamentos de alagamentos se tornaram significativamente diferentes daqueles apresentados pelas não alagadas.

Em todos os tratamentos, as plantas mostraram um incremento em diâmetro ao longo do tempo ($p < 0,001$) e este foi significativamente menor apenas entre os tratamentos submetidos ao alagamento na décima segunda semana ($p < 0,05$). Os níveis de luminosidade também não mostraram efeitos significativos sobre o diâmetro (Fig. 8b). As plantas que não foram submetidas a alagamento obtiveram uma maior razão raiz/parte aérea ($p < 0,001$) e a luminosidade não influenciou de forma significativa esta variável.

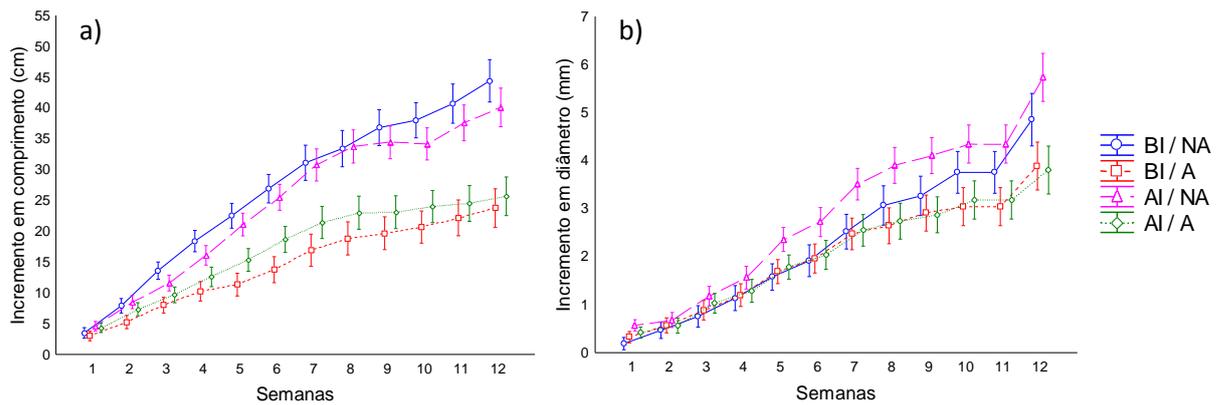


Figura 8. Incremento em altura (a) e em diâmetro (b) nas plantas de *V. cymosa* ao longo dos 90 dias de experimento. BI/NA= baixa irradiância / não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância/alagadas; AI/NA= alta irradiância / não alagadas. As médias representam 10 repetições biológicas \pm o desvio padrão.

Os resultados mostraram que a produção de folhas foi afetada pelo alagamento e pela luz, uma vez que as plantas alagadas produziram menor número de folhas ($p < 0,05$) do que aquelas não alagadas, e os tratamentos sob alta irradiância produziram mais folhas que os de baixa irradiância ($p < 0,05$). Não houve interação entre os efeitos de luz e alagamento (Fig. 9).

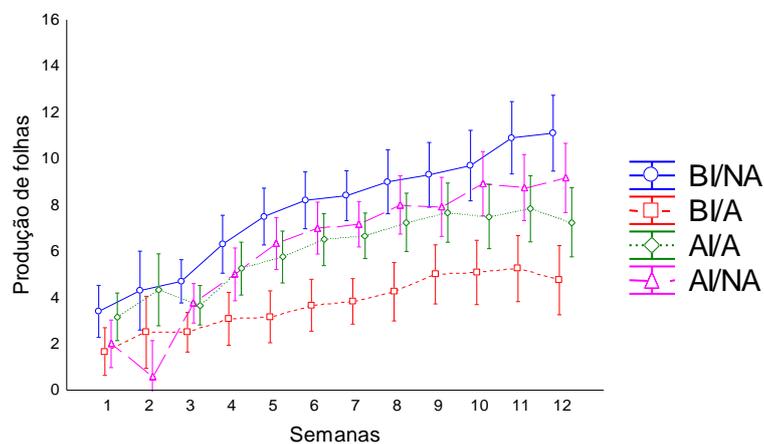


Figura 9. Produção de folhas de *V. cymosa* ao longo de doze semanas. BI/NA= baixa irradiância / não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância / alagadas; AI/NA= alta irradiância / não alagadas. As médias representam 10 repetições biológicas \pm o desvio padrão.

A área foliar foi maior entre as plantas submetidas aos tratamentos de alagamento ($p < 0,05$), entretanto aquelas submetidas aos tratamentos com alta irradiância ($p < 0,001$) tiveram maior área foliar específica (Tabela 1). Os conteúdos de

clorofila a e de clorofila b foram maiores nos tratamentos de baixa irradiância ($p < 0,05$; $p < 0,05$), entretanto a razão clorofila a:b não apresentou diferenças significativas, assim como o conteúdo de carotenoides (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos e interações dos parâmetros foliares de plantas jovens de *V. cymosa*. As médias representam 3 repetições biológicas \pm o desvio padrão. Interações entre os tratamentos de luz (L) e alagamento (A) foram analisados por ANOVA fatorial onde: $p > 0,05$ ($> 0,05$ (ns), $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,001$ (**).

	Baixa Irradiância		Alta Irradiância		ANOVA		
	Alagado	Não Alagado	Alagado	Não alagado	L	A	LxA
Área foliar (cm ²)	101,72 \pm 4,86	60,49 \pm 8,08	73,78 \pm 8,04	58,05 \pm 9,69	*	**	*
Área foliar específica (m ² kg ⁻¹)	33,04 \pm 6,05	31,76 \pm 6,8	19,8 \pm 10,02	18,25 \pm 3,07	**	ns	ns
Clorofila a (μ g/ml)	165,28 \pm 13,66	140,35 \pm 8,84	134,60 \pm 13,72	131,34 \pm 8,64	*	ns	ns
Clorofila b (μ g/ml)	54,12 \pm 4,84	47,28 \pm 1,61	43,41 \pm 4,78	43,18 \pm 6,13	*	ns	ns
Razão clorofila a:b	3,05 \pm 0,02	2,96 \pm 0,09	3,12 \pm 0,24	3,06 \pm 0,27	ns	ns	ns
Carotenóides (μ g/ml)	34,59 \pm 4,66	28,94 \pm 1,97	28,18 \pm 1,2	28,71 \pm 1,96	ns	ns	ns

A assimilação máxima de fotossíntese (A_{max}), condutância estomática (gs) e transpiração (E), nas primeiras 96 horas de alagamento, variaram ao longo do tempo ($p < 0,001$). O alagamento e a luz não influenciaram estes três parâmetros nas primeiras 96 horas (Fig. 10).

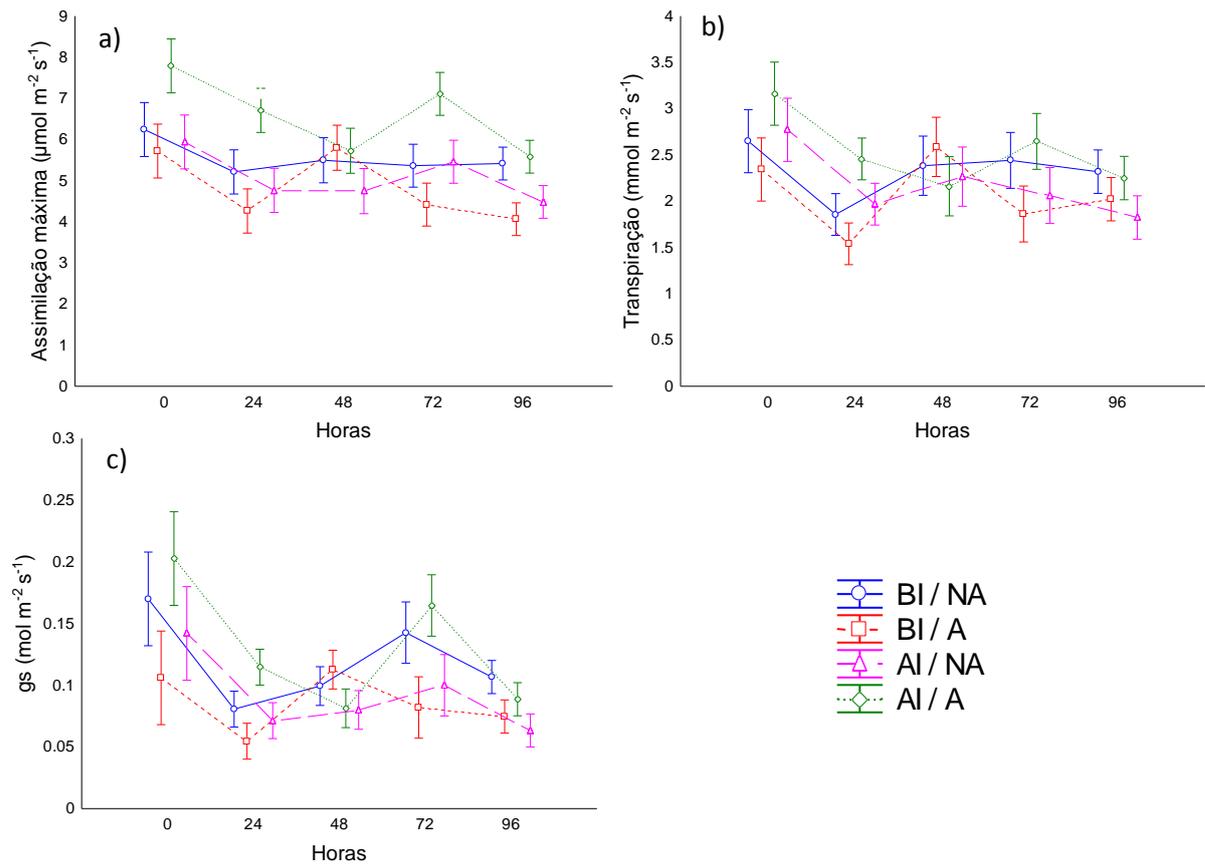


Figura 10. Medidas de assimilação máxima (a), transpiração (b) e condutância estomática (c) nas primeiras 96 horas em que as plantas de *V. cymosa* foram submetidas ao alagamento. BI/NA= baixa irradiância / não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância / alagadas; AI/NA= alta irradiância / não alagadas. As médias representam 5 repetições biológicas \pm o desvio padrão.

O alagamento teve efeito negativo na fotossíntese (A_{max}) das plantas ($p < 0,001$), verificados a partir da segunda semana do início dos tratamentos, independente do nível de luminosidade ($p < 0,05$) (Fig. 11a). As medidas de E foram maiores nos tratamentos não alagados ($p < 0,001$) e passaram a ser significativamente diferente a partir da segunda semana ($p < 0,001$), a exceção foi a medida tomada na sexta semana quando diferenças não foram significativas. As medidas de transpiração também tiveram efeito da luminosidade ($p < 0,05$), mas que só ocorreu a partir da décima semana ($p < 0,05$) (Fig. 11b) Do mesmo modo, os valores de condutância estomática foram influenciados pela luz ($p < 0,05$) e pelo alagamento ($p < 0,001$), que foram significativos apenas a partir da décima primeira semana ($p < 0,001$) (Fig. 11c).

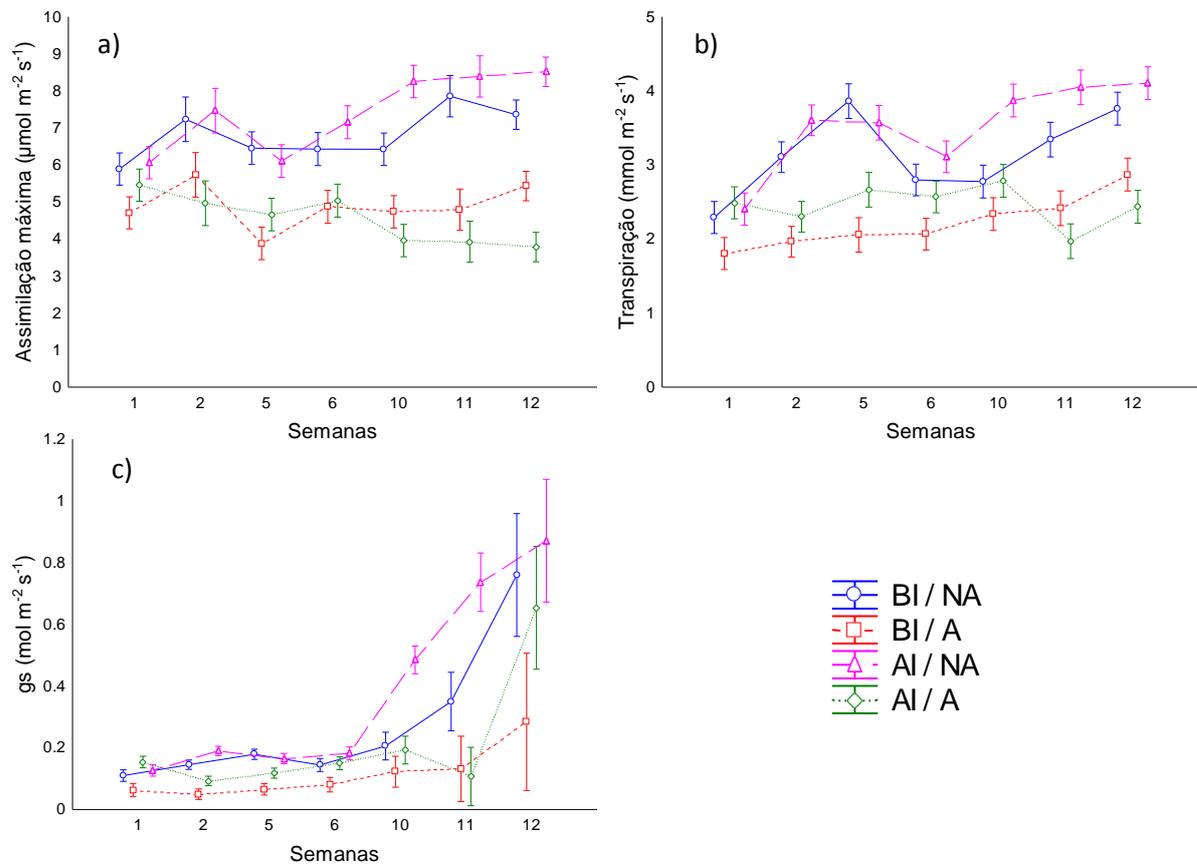


Figura 11. Medidas de assimilação máxima (a), transpiração (b) e condutância estomática (c) ao longo de doze semanas. BI/NA= baixa irradiância / não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância/alagadas; AI/NA= alta irradiância / alagadas. As médias representam 10 repetições biológicas \pm o desvio padrão.

O conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) nas raízes foi menor nos tratamentos submetidos ao alagamento ($p < 0,001$) e não foi influenciado pela intensidade luminosa. Já no caule, o conteúdo de AST foi maior nos tratamentos alagados sob alta irradiância e menor nos tratamentos submetidos ao alagamento sob baixa irradiância, portanto há um efeito tanto da luz quanto do alagamento ($p < 0,001$; $p < 0,001$). O conteúdo de AST nas folhas não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de plantas jovens de *Vitex cymosa*. As médias representam 5 repetições biológicas \pm o desvio padrão. Interações entre os tratamentos de luz (L) e alagamento (A) foram analisados por ANOVA fatorial onde: $p > 0,05$ (ns), $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,001$ (**).

AST	Baixa Irradiância		Alta Irradiância		ANOVA		
	Alagado	Não alagado	Alagado	Não alagado	L	A	LxA
Raiz	31,10 \pm 9,84	41,02 \pm 9,7	35,55 \pm 14,81	38,25 \pm 14,19	ns	**	ns
Caule	26,27 \pm 5,28	33,50 \pm 6,34	35,55 \pm 4,61	26,81 \pm 6,71	**	**	ns
Folha	33,66 \pm 7,48	35,12 \pm 22,87	35,55 \pm 4,11	34,27 \pm 4,85	ns	ns	ns

O conteúdo de amido nas raízes foi afetado pela luminosidade ($p < 0,001$) onde os tratamentos sob alta irradiância possuem mais amido que os de baixa irradiância. O alagamento não teve efeito no conteúdo de amido nas raízes, mas teve interação com a luz ($p < 0,001$) onde os tratamentos alagados sob alta luz possuíam maior concentração de amido que os não alagados sob a mesma intensidade luminosa. Entretanto, os alagados sob baixa irradiância possuíam menor concentração de amido que os não alagados sob a mesma intensidade luminosa.

O conteúdo de amido no caule foi afetado tanto da luz quanto pelo alagamento ($p < 0,001$; $p < 0,001$). A concentração de amido foi maior nos caules das plantas submetidas ao alagamento e sob alta irradiância. A concentração de amido nas folhas teve efeitos da interação entre luz e alagamento ($p < 0,001$). As plantas dos tratamentos alagados sob alta luz possuíam maior concentração de amido que aquelas dos tratamentos não alagados sob a mesma intensidade luminosa. Entretanto, em condições de alagamento sob baixa irradiância as plantas possuíam menor concentração de amido que aquelas dos tratamentos não alagados sob a mesma intensidade luminosa (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo de amido ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de plantas jovens de *Vitex cymosa*. As médias representam 5 repetições biológicas \pm o desvio padrão. Interações entre os tratamentos de luz (L) e alagamento (A) foram analisados por ANOVA fatorial onde: $p > 0,05$ (ns), $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,001$ (**).

Amido	Baixa Irradiância		Alta Irradiância		ANOVA		
	Alagado	Não alagado	Alagado	Não alagado	L	A	LxA
Raiz	3,01 \pm 2,27	6,63 \pm 2,92	10,48 \pm 6,93	8,03 \pm 4,49	**	ns	**
Caule	30,33 \pm 3,67	23,85 \pm 8,98	37,05 \pm 4,83	29,02 \pm 4,31	**	**	ns
Folha	11,53 \pm 10,66	19,97 \pm 7,16	21,81 \pm 15,2	18,47 \pm 8,19	ns	ns	**

A análise do perfil metabólico mostrou que não houve diferença significativa para a maioria dos compostos encontrados nas plantas submetidas aos tratamentos de alagamento e sombreamento. Sob tais condições, o único composto que variou foi o ácido succínico. Nas raízes das plantas alagadas, independente do nível de luminosidade, houve acúmulo desse composto ($p \leq 0,05$). Já no caule e nas folhas não foi observada a mesma tendência (Fig. 12).

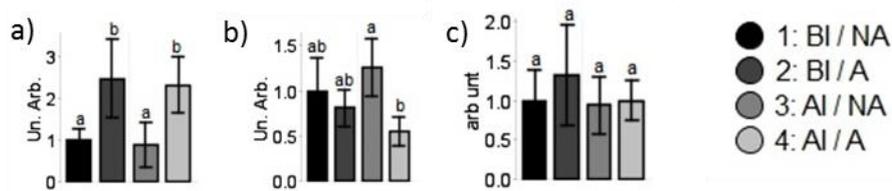


Figura 12. Ácido succínico identificado nas raízes (a), caule (b) e folhas (c) de *V. cymosa* em unidades arbitrárias. BI/NA= baixa irradiância / não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância/alagadas; AI/NA= alta irradiância / não alagadas. As médias representam 5 repetições \pm o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Após 25 dias em que foram retiradas do alagamento, as plantas mantidas para recuperação nos tratamentos de luminosidade, ainda apresentaram menor incremento em altura ($p < 0,05$) e menor incremento em diâmetro ($p < 0,05$) comparado àquelas que não foram alagadas. A assimilação máxima continuou menor nas plantas que foram alagadas mesmo após 25 dias que foram retiradas do alagamento ($p < 0,001$). Entretanto, as plantas que estavam alagadas sob alta irradiância apresentaram maior assimilação que as alagadas sob baixa irradiância contrastando com os resultados obtidos durante o alagamento.

A transpiração mostrou-se influenciada pela luz e alagamento mesmo após a retirada do alagamento ($p < 0,001$; $p < 0,001$), mas a partir do oitavo dia após o alagamento o efeito da luz passou a não ser mais significativo para os valores de transpiração e o efeito do alagamento não é mais significativo no vigésimo quinto dia (Fig. 15b). A luz e o alagamento também tiveram efeito sobre a condutância estomática ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Os valores de g_s se diferenciam entre os tratamentos no vigésimo quinto dia ($p < 0,05$) (Fig. 15c).

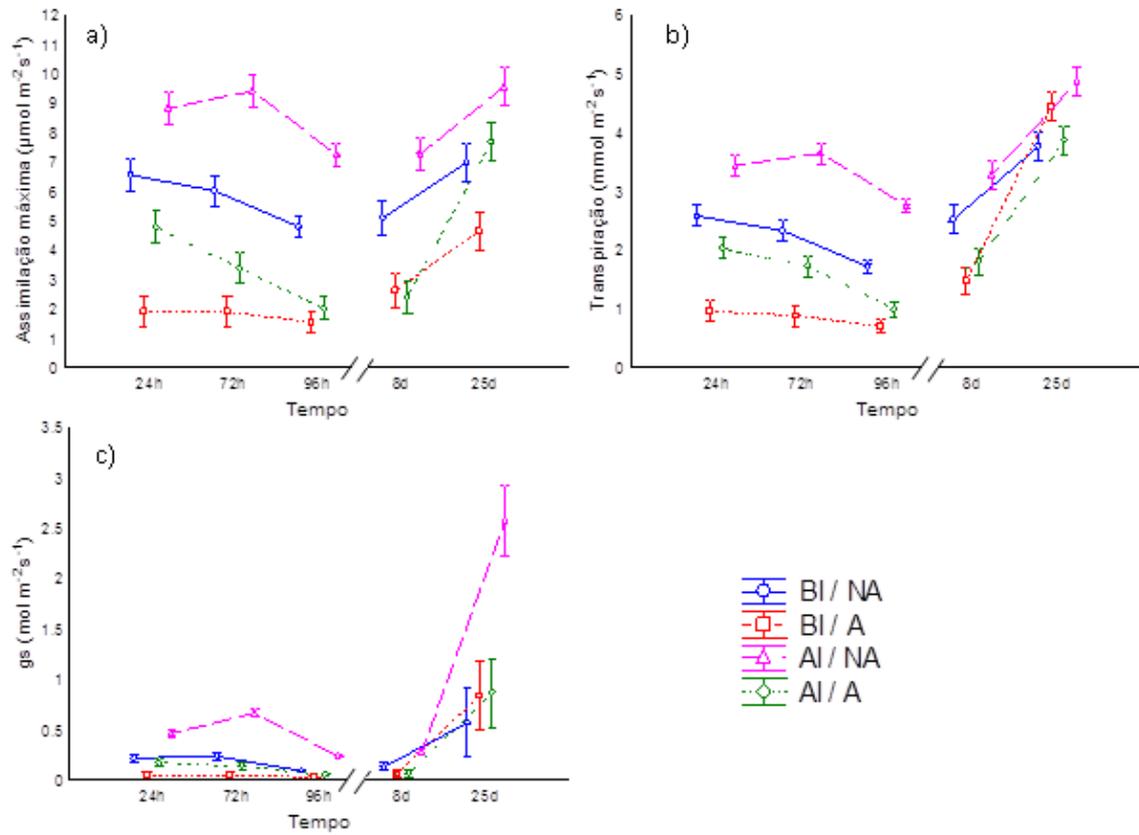


Figura 13. Medidas de assimilação máxima (a), transpiração (b) e condutância estomática (c) nas 96 primeiras horas, ao oitavo dia e ao vigésimo quinto dia após o alagamento. BI/NA= baixa irradiância / não alagadas; BI/A= baixa irradiância / alagadas; AI/A= alta irradiância / alagadas. As médias representam 5 repetições biológicas \pm o desvio padrão.

6. DISCUSSÃO

A ocorrência de estresses simultâneos, onde mais de um fator desfavorável atua prejudicando o desempenho da planta é comum em ecossistemas naturais. Nestas condições, as respostas apresentadas pela espécie para garantir a sobrevivência envolve a indução de diversos mecanismos bioquímicos, fisiológicos, morfoanatômicos e até genéticos (Ferreira *et al.*, 2010; Larcher, 2006; Reddy *et al.*, 2011). Adicionalmente, o tipo e a complexidade das respostas dependem ainda do tempo de exposição ao estresse, da idade e do genótipo da planta (Claeys *et al.*, 2014). Em ecossistemas sazonais, como das várzeas amazônicas, o período de crescimento e estabelecimento é considerado o mais crítico para a sobrevivência da planta. Nesta fase do ciclo de vida, as alterações ou alternâncias que ocorrem nas condições ambientais ao longo do ano são, na maioria das vezes, mais severas para a plântula e o indivíduo jovem do que para a planta adulta, que competem de forma desigual com indivíduos adultos da mesma espécie, ou de outras espécies na aquisição de recursos (de Oliveira Wittmann *et al.*, 2011; Kozłowski, 1997; Parolin, 2002; Wittmann & Junk, 2003).

No presente estudo, a sobrevivência de 100% das plantas de *V. cymosa* durante o período de exposição experimental aos diferentes tipos de estresses, revela que a espécie possui elevado nível de plasticidade que permite à planta sobreviver e colonizar com sucesso o ambiente sazonal das florestas de várzea, onde o alagamento e a baixa disponibilidade de luz são considerados fatores limitantes para o crescimento da vegetação por restringirem diversidade e a distribuição de espécies nesse ecossistema (Junk *et al.*, 2009; Wittmann *et al.*, 2006, 2010; Worbes, 2002). De acordo com Wittmann *et al.* (2010), os indivíduos que colonizam o sub-bosque dos estágios pioneiros estão expostos a pouco mais de 30% da PAR que passa através das copas das árvores adultas e tais valores podem chegar a menos de 10% nos estágios clímax dessas florestas. Estudos mostram que a capacidade que uma planta tem de se adaptar a ambientes diferentes está direta ou indiretamente relacionada com a plasticidade e a resiliência da fotossíntese, em combinação com outros processos que irão determinar o crescimento e o desenvolvimento destas, e que culminam na reprodução e na consequente perenização da espécie no ambiente (Chaves *et al.*, 2011; Lawlor, 2009).

As folhas são os órgãos mais plásticos das plantas e que tendem a se ajustar às condições vigentes do meio (Valladares & Niinemets, 2008). No presente estudo, a disponibilidade de luz afetou as características plásticas das folhas de *V. cymosa*, onde as plantas sob baixa irradiância apresentaram maior área foliar, provavelmente para aumentar a interceptação da luz solar, estratégia em geral observada para plantas em condições de sombreamento. Nesse tratamento também foi observado a maior área foliar específica (AFE) o que é comum em plantas aclimatadas a ambientes de baixa irradiância onde, em geral, há uma maior alocação do nitrogênio orgânico foliar em pigmentos (Evans & Poorter, 2001; Valladares & Niinemets, 2008). As plantas mantidas sob alta irradiância apresentaram menor área foliar específica independente se foram alagadas ou não. Menores valores para AFE tendem a corresponder com alto investimento em defesa por possuir um número maior de cloroplastos e de enzimas fotossintéticas por unidade de área foliar e como consequência uma maior capacidade fotossintética por unidade de área foliar (Cornelissen *et al.*, 2003; Evans & Poorter, 2001).

A pré-aclimação a diferentes irradiâncias pode afetar a performance fisiológica das plantas quando submetidas ao alagamento (Mielke & Schaffer, 2010; Mielke & Schaffer, 2011; Mommer *et al.*, 2007). A maior área foliar apresentada pelas plantas alagadas sob baixa irradiância em relação àquelas alagadas sob alta irradiância, pode ter colaborado com a maior assimilação de CO₂ observada neste tratamento, uma vez que uma maior área pode aumentar a capacidade de trocas gasosas entre as folhas (Mommer & Visser, 2005) , especialmente quando se verifica que estes resultados foram observados apenas ao fim das doze semanas, quando novas folhas, provavelmente ajustadas às novas condições haviam sido produzidas. Assim como em Lavinsky *et al.* (2007), plantas inundadas sob alta irradiância apresentaram menor assimilação o que indica a existência de efeitos sinérgicos entre a exposição de luz alta e encharcamento do solo, induzindo danos ao aparato fotossintético e mudanças significativas nas taxas de crescimento das plantas inundadas sob alta irradiância.

O desenvolvimento de raízes adventícias em *V. cymosa*, demonstrado ainda na primeira semana do início dos experimentos, é uma resposta comumente observada em plantas tolerantes ao alagamento (Lucas *et al.*, 2013; Parolin & Wittmann, 2010; Parolin, 2009; Simone *et al.*, 2002). Essas raízes desenvolvidas a partir do caule, flutuam na superfície da água onde a concentração de O₂ é maior e facilitam a difusão

do oxigênio para o interior das raízes subterrâneas (Lorbiecke & Sauter, 1999). Outra característica de plantas de áreas úmidas é a formação de aerênquima (Jackson, 2005). Em *V. cymosa*, o arranjo cúbico observado nas células de raízes das plantas submetidas ao alagamento pode ter a finalidade de conferir maior porosidade ao tecido e como consequência torna-lo mais ventilado. O arranjo cúbico também está relacionado a uma predisposição a formar aerênquima esquizógeno, comuns em plantas tolerantes ao excesso de água no solo (Drew *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2009). Neste caso, ocorre a separação da lamela média durante o desenvolvimento formando canais menos tortuosos e que facilitam a difusão de gases (Drew *et al.*, 2000; Justin & Armstrong, 1987). Isso permite que as partes melhor aeradas da planta sirvam como uma entrada de O₂ para beneficiar os órgãos inundados (Jackson & Armstrong, 1999). Em *V. cymosa* a formação de aerênquima do tipo esquizógeno foi observada nas raízes secundárias, mostrando que estes não são constitutivos e podem ter contribuído para a aeração adicional dos tecidos e a manutenção do sistema de raízes sob tais condições.

Análises bioquímicas mostraram que *V. cymosa* acumulou amido preferencialmente nas partes aéreas. Rengifo *et al.* (2005) descreveram que para algumas espécies amazônicas o acúmulo de amido nas folhas ocorre com subida das águas, quando a fotossíntese das plantas é reduzida. Alguns autores sugerem que o acúmulo de amido e açúcar nas folhas contrastando com a depleção destes nas raízes seja consequência da translocação reduzida no floema das partes aéreas para raiz, verificada para algumas espécies em condições de alagamento (Kreuzwieser *et al.*, 2004). No caso de *V. cymosa*, o acúmulo de amido parece ter ocorrido às custas do crescimento das plantas, pois os valores mais elevados foram verificados nos caules das plantas submetidas aos tratamentos de alagamento, que apresentaram o menor incremento em altura. Plantas mantidas sem alagamento tiveram crescimento elevado, possivelmente devido ao uso eficiente dos carboidratos provenientes da fotossíntese, que nesse tratamento manteve-se elevada até o final dos experimentos. As raízes dessas plantas também apresentaram uma diminuição da concentração de açúcar solúveis neste órgão, o que pode ser explicado pela ativação de vias metabólicas alternativas do metabolismo anaeróbico que apresenta elevada demanda por tais compostos. Os açúcares solúveis são carboidratos prontamente fermentáveis para uso no metabolismo, e a sua disponibilidade e consumo pode ser crucial para a manutenção das atividades metabólicas vitais no sistemas de raízes (Kreuzwieser *et al.*, 2004; Kreuzwieser *et al.*,

2002; Schull & Thomas, 2000; Vartapetian & Jackson, 1997), e essa estratégia pode ter sido utilizada pelas plantas no presente estudo, uma vez que suas raízes permaneceram com aspectos saudáveis, sem presença de necrose nos tecidos. Em condições de alagamento ocorreu uma redução na relação raiz/parte aérea nas plantas de *V. cymosa*. O alagamento do solo pode levar a uma restrição no alongamento da raiz, possivelmente devido à limitação de oxigênio que tem efeito no metabolismo e, como consequência a uma restrição na utilização dos nutrientes do solo (Pezeshki, 1991; Jackson *et al.*, 2009).

O perfil metabólico mostrou que as plantas de *V. cymosa* são altamente plásticas em relação a alterações nas condições do meio, tolerantes ao alagamento parcial e ao sombreamento, pois o metabolismo da parte aérea não foi alterado em nenhum dos tratamentos avaliados. Contudo, a espécie tende a ajustar o metabolismo quando alagada, tendo em vista que a parte radicular mostrou um aumento significativo apenas em um intermediário do ciclo do ácido cítrico, o ácido succínico. O acúmulo deste composto durante períodos de hipóxia (Joly & Crawford, 1982) é relatado para prevenir o acúmulo de piruvato, pois este ativa o consumo respiratório de oxigênio (Rocha *et al.*, 2010). Sugere-se que a síntese de succinato consome H⁺ evitando a acidificação do citoplasma (Drew, 1997). Apenas nas raízes das plantas alagadas o ácido succínico foi acumulado, o que pode ser um indicativo de que este foi o único órgão que ativou metabolismo anaeróbico.

A reaeração após a privação de oxigênio pode causar sérias injúrias para as plantas (Biemelt *et al.*, 1998), por esse motivo a performance apresentada por determinadas espécies durante o alagamento não pode ser apresentado como conclusivo e a sua recuperação após a retirada do alagamento precisa ser avaliada (Striker, 2012). Entretanto, *V. cymosa* não apresentou danos após a retirada do alagamento. Após 25 dias de recuperação, as plantas que haviam sido alagadas sob alta irradiância mostraram recuperação da fotossíntese e apresentaram uma maior assimilação máxima que aquelas sob baixa irradiância.

Com base no exposto, é possível sugerir que para a espécie *V. cymosa* o estresse por alagamento pode ser mais prejudicial ao seu crescimento e desenvolvimento do que o sombreamento, e que as alterações observadas na morfologia podem ser estratégias para amenizar ou mesmo evitar as possíveis injúrias causadas às plantas pelo

alagamento. As respostas da planta aos tratamentos de luz e de alagamento, bem como a interação entre os dois estresses aponta para a existência de uma hierarquia entre os fatores ambientais limitantes para a planta.

8. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, S., & Grover, A. (2006). Molecular Biology, Biotechnology and Genomics of Flooding-Associated Low O₂ Stress Response in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(1), 1–21.
- Amaral, L., Gaspar, M., Costa, P., Aidar, M., & Buckeridge, M. (2007). Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, 34(4), 425–431.
- Bianchini, E., Pimenta, J. A., & dos Santos, F. A. (2001). Spatial and Temporal Variation in the Canopy Cover in a Tropical Semi-Deciduous Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44(3), 269–276.
- Biemelt, S., Keetman, U., & Albrecht, G. (1998). Re-Aeration following Hypoxia or Anoxia Leads to Activation of the Antioxidative Defense System in Roots of Wheat Seedlings. *Plant Physiology*, 116, 651–8.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E., & Jensen, R. G. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, 7, 1099–1111.
- Chaves, M. M., Costa, M. J., & Saibo, N. J. M. (2011). Recent Advances in Photosynthesis Under Drought and Salinity. *Advances in Botanical Research*, 57.
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., ... & Pinheiro, C. (2002). How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany*, 89, 907–916.
- Claeys, H., Van Landeghem, S., Dubois, M., Maleux, K., & Inzé, D. (2014). What Is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used *in Vitro* Stress Assays. *Plant Physiology*, 165, 519–527.
- Colmer, T., & Voesenek, L. (2009). Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology*, 36, 665–681.
- Cornelissen, J. H. C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D. E., ... Poorter, H. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51(4), 335.
- Crawford, R. M. M. (2003). Seasonal differences in plant responses to flooding and anoxia. *Can. J. Bot.*, 81, 1224–1246.

- De Oliveira Wittmann, A., Lopes, A., Conserva, A. D. S., Wittmann, F., & Piedade, M. T. (2011). Seed germination and seedling establishment of Amazonian floodplain trees. In *Amazonian Floodplain Forests* (pp. 259–280). Springer Netherlands.
- Dennis, E. S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F. U., ... Peacock, W. J. (2000). Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*, *51*(342), 89–97.
- Drew, M. C. (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, *48*, 223–250.
- Drew, M., He, C. J., & Morgan, P. W. (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science*, *5*(3), 123–127.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356.
- Evans, J. R., & Poorter, H. (2001). Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance : the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell and Environment*, *24*, 755–767.
- Ferreira, C. S., Piedade, M. T. F., de Oliveira Wittmann, A., & Franco, A. C. (2010). Plant reproduction in the Central Amazonian floodplains: challenges and adaptations. *AoB Plants*, *2010*, plq009.
- Ferreira, C. S., Piedade, M. T. F., Franco, A. C., Gonçalves, J. F. C., & Junk, W. J. (2009). Adaptive strategies to tolerate prolonged flooding in seedlings of floodplain and upland populations of *Himatanthus sucuuba*, a Central Amazon tree. *Aquatic Botany*, *90*, 246–252.
- Hadiarto, T., & Tran, L.-S. P. (2011). Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports*, *30*, 297–310.
- Herrera, A. (2013). Responses to flooding of plant water relations and leaf gas exchange in tropical tolerant trees of a black-water wetland. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 106.
- Jackson, M. B. (2005). Response and Adaptation by Plants to Flooding Stress. *Annals of Botany*, *96*, 501–505.
- Jackson, M. B., & Armstrong, W. (1999). Formation of Aerenchyma and the Processes of Plant Ventilation in Relation to Soil Flooding and Submergence. *Plant Biology*, *1*(3), 274–287.
- Joly, C., & Crawford, R. (1982). Variation in tolerance and metabolic responses to flooding in some tropical trees. *Journal of Experimental Botany*, *33*(135), 799–809.

- Junk, W., Bayley, P., & Sparks, R. (1989). The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 106(1), 110–127.
- Junk, W. J., Piedade, M. T. F., Schöngart, J., Cohn-Haft, M., Adeney, J. M., & Wittmann, F. (2011). A Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands. *Wetlands*, 31(4), 623–640.
- Junk, W. J., Piedade, M. T. F., Schöngart, J., & Wittmann, F. (2012). A classification of major natural habitats of Amazonian white-water river floodplains (várzeas). *Wetlands Ecology and Management*, 20(6), 461–475.
- Junk, W. J., Piedade, M. T. F., Parolin, P., Wittmann, F., & Schöngart, J. (2009). *Amazon floodplain forests: ecophysiology, biodiversity and sustainable management*. Heidelberg, Germany.: Springer.
- Junker, B. H., Klukas, C., & Schreiber, F. (2006). VANTED: a system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC Bioinformatics*, 7, 109.
- Justin, S. H. F. W., & Armstrong, W. (1987). the Anatomical Characteristics of Roots and Plant Response To Soil Flooding. *New Phytologist*, 106, 465–495.
- Kozłowski, T. T. (1984). Plant Responses to Flooding of Soil. *BioScience*, 34(3), 162–167.
- Kozłowski, T. T. (1991). Effects of enviromental stresses on deciduous trees. In *Response of Plants to Multiple Stresses* (p. 396). Academic Press.
- Kozłowski, T. T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology*, 17(7), 490–490.
- Kraus, J. E., & Arduin, M. (1997). *Manual Básico em Métodos em Morfologia Vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR.
- Kreuzwieser, J., Papadopoulou, E., & Rennenberg, H. (2004). Interaction of Flooding with Carbon Metabolism of Forest Trees. *Plant Biology*, 6(3), 299–306.
- Kreuzwieser, J., & Rennenberg, H. (2014). Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. *Plant, Cell & Environment*.
- Kreuzwieser, J., Graus, M., Wisthaler, A., Hansel, A., Rennenberg, H., & Schnitzler, J. P. (2002). Xylem-transported glucose as an additional carbon source for leaf isoprene formation in *Quercus robur*. *New Phytologist*, 156, 171–178.
- Larcher, W. (2006). *Ecofisiologia vegetal*. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária LTDA.
- Lavinsky, A. O., Souza Sant’Ana, C., Mielke, M. S., Almeida, A.-A. F., Gomes, F. P., França, S., & Costa Silva, D. (2007). Effects of light availability and soil flooding

- on growth and photosynthetic characteristics of *Genipa americana* L. seedlings. *New Forests*, 34(1), 41–50.
- Lawlor, D. W. (2009). Musings about the effects of environment on photosynthesis. *Annals of Botany*, 103, 543–549.
- Lenssen, J. P. M., Menting, F. B. J., & Van der Putten, W. H. (2003). Plant responses to simultaneous stress of waterlogging and shade: amplified or hierarchical effects? *New Phytologist*, 157, 281–290.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1(1), 387–396.
- Lommen, A. (2009). MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Analytical Chemistry*, 81(8), 3079–86.
- Lorbiecke, R., & Sauter, M. (1999). Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. *Plant Physiology*, 119, 21–30.
- Lucas, C., Bruna, E., & Nascimento, C. (2013). Seedling co-tolerance of multiple stressors in a disturbed tropical floodplain forest. *Ecosphere*, 4(1), 1–20.
- Luque, R., Sousa, H. C. De, & Kraus, J. E. (1996). Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado - e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra. *Acta Bot. Bras*, 10(2), 199–212.
- Mielke, M. S., & Schaffer, B. (2010). Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and pigment indexes of *Eugenia uniflora* L. in response to changes in light intensity and soil flooding. *Tree Physiology*, 30(1), 45–55.
- Mielke, M. S., & Schaffer, B. (2011). Effects of soil flooding and changes in light intensity on photosynthesis of *Eugenia uniflora* L. seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1661–1668.
- Mommer, L., Wolters-Arts, M., Andersen, C., Visser, E. J. W., & Pedersen, O. (2007). Submergence-induced leaf acclimation in terrestrial species varying in flooding tolerance. *The New Phytologist*, 176(2), 337–45.
- Niinemets, Ü., & Valladares, F. (2006). Tolerance to shade, drought, and waterlogging of temperate Northern Hemisphere trees and shrubs. *Ecological Monographs*, 76(4), 521–547.
- Paiva, J. De, Fank-de-Carvalho, S., Magalhães, M., & Graciano-Ribeiro, D. (2006). Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Bot. Bras*, 20(2), 257–264.
- Parent, C., Capelli, N., Berger, A., Crèvecoeur, M., & Dat, J. F. (2008). An Overview of Plant Responses to Soil Waterlogging. *Plant Stress*, 2(1), 20–27.

- Parolin, P. (2001). Morphological and physiological adjustments to waterlogging and drought in seedlings of Amazonian floodplain trees. *Oecologia*, *128*(3), 326–335.
- Parolin, P. (2002). Submergence tolerance vs. escape from submergence: two strategies of seedling establishment in Amazonian floodplains. *Environmental and Experimental Botany*, *48*, 177–186.
- Parolin, P. (2009). Submerged in darkness: adaptations to prolonged submergence by woody species of the Amazonian floodplains. *Annals of Botany*, *103*(2), 359–76.
- Parolin, P., & Wittmann, F. (2010). Struggle in the flood: tree responses to flooding stress in four tropical floodplain systems. *AoB Plants*, *2010*, plq003.
- Parolin, P., Wittmann, F., & Schöngart, J. (2010). Tree phenology in amazonian floodplain forests. In *Amazonian floodplain forests*. Springer.
- Parolin, P., Waldhoff, D., & Piedade, M. T. (2011). Fruit and seed chemistry, biomass and dispersal. In *Amazonian Floodplain Forests* (pp. 243–258). Springer Netherlands.
- Pezeshki, S. R. (1991). Root responses of flood-tolerant and flood-sensitive tree species to soil redox conditions. *Trees*, *5*(3), 180–186.
- Pezeshki, S. R. (2001). Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, *46*, 299–312.
- Piedade, M., Junk, W., & Parolin, P. (2001). The flood pulse and photosynthetic response of trees in a white water floodplain (várzea) of the Central Amazon, Brazil. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, *27*(December).
- Piedade, M. T., Ferreira, C. S., de Oliveira Wittmann, A., Buckeridge, M., & Parolin, P. (2011). Biochemistry of amazonian floodplain trees. In *Amazonian Floodplain Forests* (pp. 127–139). Springer Netherlands.
- Ponnamperuma, F. N. (1984). Effects of flooding on soils. In *Flooding and plant growth* (pp. 9–45).
- Reddy, A. S. N., Ali, G. S., Celesnik, H., & Day, I. S. (2011). Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *The Plant Cell*, *23*, 2010–32.
- Rengifo, E., Tezara, W., & Herrera, A. (2005). Water relations, chlorophyll fluorescence, and contents of saccharides in tree species of a tropical forest in response to flood. *Photosynthetica*, *43*(2), 203–210.
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R., & van Dongen, J. T. (2010). Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, *152*, 1501–13.

- Schmull, M., & Thomas, F. M. (2000). Morphological and physiological reactions of young deciduous trees (*Quercus robur* L., *Q. petraea* [Matt.] Liebl., *Fagus sylvatica* L.) to waterlogging. *Plant and Soil*, 225, 227–242.
- Serviço geológico do Brasil. (2011). Retrieved from <http://www.cprm.gov.br/>
- Simone, O. De, Müller, E., Junk, W. J., & Schmidt, W. (2002). Adaptations of Central Amazon Tree Species to Prolonged Flooding: Root Morphology and Leaf Longevity, 4, 515–522.
- Souza, V. C., & Lorenzi, H. (2008). *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- Striker, G. (2012). Flooding stress on plants: anatomical, morphological and physiological responses. In *Botany* (p. 226). InTech.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia Vegetal* (3ª edição., p. 719). Artmed.
- Tang, Z., & Kozłowski, T. (1982). Physiological, morphological, and growth responses of *Platanus occidentalis* seedlings to flooding. *Plant and Soil*, 66, 243–255.
- Valladares, F., & Niinemets, Ü. (2008). Shade Tolerance, a Key Plant Feature of Complex Nature and Consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39, 237–257.
- Vartapetian, B. B., & Jackson, M. B. (1997). Plant Adaptations to Anaerobic Stress. *Annals of Botany*, 79(A), 3–20.
- Visser, E. J. W., Voesenek, L. A. C. J., Vartapetian, B. B., & Jackson, M. B. (2003). Flooding and Plant Growth. *Annals of Botany*, 91, 107–109.
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307–313.
- Wittmann, F., Anhuf, D., & Junk, W. J. (2002). Tree species distribution and community structure of central Amazonian várzea forests by remote sensing techniques. *Journal of Tropical Ecology*, 18(06), 805–820.
- Wittmann, F., & Junk, W. J. (2003). Sapling communities in Amazonian white-water forests. *Journal of Biogeography*, 30, 1533–1544.
- Wittmann, F., Junk, W. J., & Piedade, M. T. F. (2004). The várzea forests in Amazonia: flooding and the highly dynamic geomorphology interact with natural forest succession. *Forest Ecology and Management*, 196, 199–212.
- Wittmann, F., Schöngart, J., Brito, J., Wittmann, A. de O., Piedade, M. T. F., Parolin, P., ... Guillaumet, J.-L. (2010). *Manual de árvores de várzea da Amazônia Central: taxonomia, ecologia e uso* (p. 298). Manaus: Editora INPA.

- Wittmann, F., Schongart, J., Montero, J. C., Motzer, T., Junk, W. J., Piedade, M. T. F., ... Worbes, M. (2006). Tree species composition and diversity gradients in white-water forests across the Amazon Basin. *Journal of Biogeography*, 33(8), 1334–1347.
- Wittmann, F., Schöngart, J., Junk, W. J. (2011). Phytogeography, species diversity, community structure and dynamics of central amazonian floodplain forests. In *Amazonian Floodplain Forests* (pp. 61–102). Springer Netherlands.
- Worbes, M. (2002). One hundred years of tree-ring research in the tropics - a brief history and an outlook to future challenges. *Dendrochronologia*, 217–231.
- Worbes, M., Klinge, H., Revilla, J. D., & Martius, C. (1992). On the dynamics, floristic subdivision and geographical distribution of várzea forests in Central Amazonia. *Journal of Vegetation Science*, 3(4), 553–564.