

MARCO ANTONIO TORAL JUÁREZ

**TOLERÂNCIA AO ALAGAMENTO EM CLONES DE *Coffea canephora*: RESPOSTAS HÍDRICAS, FOTOSINTÉTICAS E METABÓLICAS**

Tese submetida à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

T676t Toral Juárez, Marco Antonio, 1985-  
2019 Tolerância ao alagamento em clones de *Coffea canephora* :  
respostas hídricas, fotossintéticas e metabólicas / Marco Antonio  
Toral Juárez. – Viçosa, MG, 2019.  
vii, 55 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fábio Murilo da Matta.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 26-34.

1. Plantas - Metabolismo. 2. Antioxidantes. 3. Oxidação.  
4. Etileno. 5. Stress (Fisiologia). 6. Fotossíntese. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa  
de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.


CDD 22. ed. 572.42

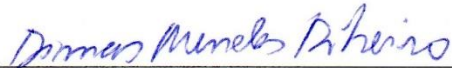
MARCO ANTONIO TORAL JUÁREZ

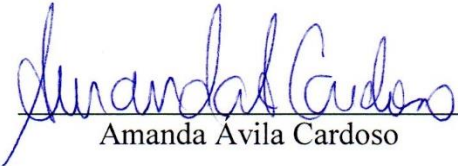
**TOLERÂNCIA AO ALAGAMENTO EM CLONES DE *Coffea canephora*: RESPOSTAS HÍDRICAS, FOTOSSINTÉTICAS E METABÓLICAS**

Tese submetida à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

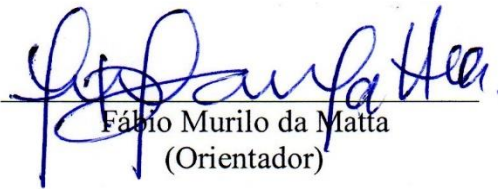
APROVADA: 31 de maio de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Samuel Cordeiro Vitor Martins

  
\_\_\_\_\_  
Dimas Mendes Ribeiro

  
\_\_\_\_\_  
Amanda Avila Cardoso

  
\_\_\_\_\_  
Leandro Elias Morais

  
\_\_\_\_\_  
Fábio Murilo da Matta  
(Orientador)

*“Cada adversidade, cada fracasso, cada angústia traz consigo a semente de  
um benefício igual ou maior”  
Napoleon Hill*

## AGRADECIMENTOS

Ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) e ao Consejo Veracruzano de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (COVEICYDET), pela bolsa outorgada para a manutenção de quatro anos de estudos de Doutorado.

Ao Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuárias, e ao pessoal diretivo do Centro de Investigación Regional Golfo Centro, pela licença e oportunidade concedida pela capacitação no exterior.

Ao Campo Experimental Cotaxtla, pela grande oportunidade de colaborar com excelentes profissionais que contribuem no dia-a-dia para o desenvolvimento tecnológico do campo agrícola mexicano.

À Universidade Federal de Viçosa, com reconhecimento internacional na área de ciências agrícolas. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela entrega, dedicação e contribuição ao conhecimento nas disciplinas e na pesquisa, bem como seus professores e funcionários.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Dr. Fábio Murilo da Matta, pela oportunidade, orientação e profissionalismo brindado durante estes quatros anos de amizade e convivência.

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Espírito Santo, Brasil, pela produção das mudas que foram utilizadas na pesquisa.

A todas as pessoas que formaram parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas. Muito agradecido com os que atualmente formam parte desse grupo distinto pela dedicação e paixão no laboratório, ajuda e união no desenvolvimento de experimentos.

Ao pessoal que constituiu a banca de qualificação e a banca de defesa de tese: Prof. Samuel C. V. Martins, Prof. Dimas M. Ribeiro, Dra. Amanda A. Cardoso, Dra. Rebeca P. O. Garcia e Prof. Leandro Elias Morais. Muito obrigado pelas contribuições e dedicação durante o meu processo de formação.

Por último, quero dedicar esta tese à minha família, pelo seu apoio, amor e compreensão durante os estudos de doutorado.

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>RESUMO .....</b>  | <b>vi</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>vii</b> |
| <b>Introdução.....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>Materiais e métodos .....</b>   | <b>4</b>   |
| <b>Material vegetal e condições de crescimento.....</b>                              | <b>4</b>   |
| <b>Delineamento experimental .....</b>   | <b>4</b>   |
| <b>Desenvolvimento dos experimentos .....</b>  | <b>4</b>   |
| Experimento 1 .....  | 4          |
| Experimento 2 .....  | 5          |
| Potencial hídrico foliar .....   | 6          |
| Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....                                   | 6          |
| Avaliações metabólicas .....   | 7          |
| Quantificação de metabólitos e de clorofilas.....                                    | 7          |
| Produção de etileno .....  | 8          |
| Atividade da ACC oxidase .....   | 8          |
| Perfil hormonal.....   | 9          |
| Atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo .....                             | 10         |
| Peroxidação lipídica .....   | 11         |
| Experimento 3 .....  | 11         |
| Condutância hidráulica da planta .....   | 11         |
| Taxa de crescimento relativo de área foliar.....                                     | 12         |
| Dano foliar e taxa de sobrevivência de plantas .....                                 | 12         |
| <b>Análises estatísticas .....</b>   | <b>13</b>  |
| <b>Resultados .....</b>  | <b>14</b>  |
| <b>Experimento 1 .....</b>   | <b>14</b>  |
| <b>Experimento 2 .....</b>   | <b>14</b>  |
| Potencial hídrico foliar .....   | 14         |
| Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....                                   | 14         |
| Análises de correlação.....  | 16         |
| Quantificação de metabólitos e pigmentos cloroplastídicos .....                      | 16         |
| Produção de etileno, concentração de ACC e quantificação de alguns fitormônios... 16 |            |
| Atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica .....                     | 17         |
| <b>Experimento 3 .....</b>   | <b>17</b>  |
| Potencial hídrico foliar e condutância hidráulica da planta.....                     | 17         |
| Danos e sobrevivência em plantas alagadas.....                                       | 18         |

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>Discussão .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>Conclusão .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>Referências.....</b> | <b>26</b> |
| <b>Tabelas .....</b>    | <b>35</b> |
| <b>Figuras.....</b>     | <b>39</b> |

## RESUMO

JUÁREZ, Marco Antonio Toral, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2019. **Tolerância ao alagamento em clones de *Coffea canephora*: respostas hídricas, fotossintéticas e metabólicas.** Orientador: Fábio Murilo da Matta.

O alagamento do solo impacta negativamente o desempenho da planta devido à redução da disponibilidade de oxigênio na raiz e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO). Nesta pesquisa, avaliou-se a relação entre a tolerância ao alagamento e a expressão do sistema antioxidante em dois clones (120 e 109A) de *Coffea canephora* caracterizados, respectivamente, como tolerante (com sistema antioxidante mais robusto) e sensível (com sistema antioxidante menos robusto) à seca. A hipótese basou-se no fato de que clones mais tolerantes à seca, que apresentam um sistema antioxidante mais eficiente, também mostrariam maior tolerância ao alagamento. Os clones foram submetidos a dois tratamentos de irrigação (controle e alagado), por seis dias, seguidos de 40 dias de recuperação. Foram avaliados: potencial hídrico, condutância hidráulica, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, partição de carboidratos, concentração de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e alguns fitormônios, dano oxidativo e sobrevivência. Em resposta ao alagamento, a atividade antioxidante nas raízes dos clones envolveu incrementos na atividade da dismutase do superóxido e da peroxidase do ascorbato (APX). Entretanto, foi observado apenas aumento de APX foliar do clone 120. O alagamento ocasionou diminuição de absorção de água radicular com perda de 70% na condutância hidráulica em ambos os clones, reduções nas suas taxas de fotossíntese líquida (*A*) e condutância estomática, esgotamento de açúcares e altas concentrações de ACC e etileno em raízes. Entretanto, no clone 120, houve uma queda mais tênue de *A* ao longo da imposição do estresse, menor afetação por déficit hídrico, menor alteração no fluxo de elétrons, dissipação eficiente de excesso de energia por meio de processos não fotoquímicos e acúmulo tardio de ACC em raízes. As diferenças entre clones foram maiores na fase de recuperação, sendo as plantas do clone 109A as mais afetadas em danos à maquinaria fotossintética, menor taxa de transporte de elétrons, maior dano oxidativo acompanhado de redução de área foliar, e menor taxa de sobrevivência. Contudo, houve pouca diferença na capacidade antioxidante entre os dois clones, sugerindo que o melhor desempenho do clone 120, durante o alagamento, possivelmente não esteja associado com o metabolismo antioxidante; outras estratégias, portanto, devem estar envolvidas na diminuição do dano oxidativo e no retardo na queda de *A*, bem como maior dissipação de excesso de energia, na fase de alagamento.



## ABSTRACT

JUÁREZ, Marco Antonio Toral, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2019. **Tolerance to flooding in *Coffea canephora* clones: water relations, photosynthetic and metabolic responses.** Adviser: Fábio Murilo da Matta.

Soil flooding negatively impacts plant performance due to reduced oxygen availability in the root and accumulation of reactive oxygen species (ROS). In this research, the relationship between flood tolerance and antioxidant system expression was evaluated in two *Coffea canephora* clones (120 and 109A) characterized, respectively, as tolerant (antioxidant system more robust) and sensitive to drought (antioxidant system less robust). The hypothesis was based on the fact that more drought-tolerant clones, which present a more efficient antioxidant system, would also show greater tolerance to flooding. Furthermore, The clones were submitted to two irrigation treatments (control and flooding) for six days, followed by 40 days of recovery. The hydric potential, hydraulic conductance, gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, carbohydrate partition, concentration of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and some phytohormones, oxidative damage and survival were evaluated. In response to flooding, the antioxidant activity at the roots of the clones involved increases in the activity of ascorbate superoxide dismutase and peroxidase (APX), only APX showed increase of activity on 120 clone leaves. The flooding caused a decrease in root water absorption with a loss of 70% in hydraulic conductance in both clones, reductions in their rates of liquid photosynthesis (*A*) and stomatal conductance, depletion of sugars and high concentrations of ACC and ethylene in roots. Nevertheless, in clone 120, there was a faint drop in *A* along the stress imposition, less response due to water deficit, lower change in the electron flow, efficient dissipation of excess energy through non-photochemical processes and late accumulation of ACC in roots. The differences between clones were higher in the recovery phase, with clone 109A plants being the most affected in photosynthetic machinery damage, lower electron transport rate, greater oxidative damage accompanied by reduction leaf area, and lower survival rate. However, there was little difference in antioxidant capacity between the two clones, suggesting that the best performance of clone 120 during flooding is possibly not associated with antioxidant metabolism. Other strategies, therefore, should be involved in the reduction of oxidative damage and the delay in the decrease of *A*, as well as greater dissipation of excess energy in the flooding phase.

## Introdução

O aumento da frequência de eventos de alagamento em todo o mundo impacta negativamente o desempenho das plantas e o seu rendimento de colheita (Bailey-Serres et al., 2012; Sasidharan et al., 2017; Fukao et al., 2019). A inundação do solo provoca uma difusão mais lenta do oxigênio dissolvido em água, que, por sua vez, acarreta uma rápida redução da disponibilidade do oxigênio na rizosfera (Sauter, 2013; Voesenek e Bailey-Serres, 2013; Olmo-Vega et al., 2017). O oxigênio é importante por atuar como o aceptor final da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial da raiz, de modo a suportar uma produção eficiente de ATP pela fosforilação oxidativa (Bailey-Serres e Chang, 2005). Portanto, uma redução de oxigênio limita a produção de ATP, e gera um acúmulo de elétrons no complexo III (ubiquinona: citocromo-redutase) da cadeia de elétrons mitocondrial da raiz, provocando uma formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), responsáveis pelo dano oxidativo (Gibbs e Greenway, 2003; Bailey-Serres e Mittler, 2006; Bailey-Serres e Colmer, 2014). Ademais, o oxigênio é requerido para a conversão de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) em etileno, via atividade de ACC-oxidase. Portanto, uma diminuição do oxigênio no solo aumenta a concentração de ACC nas raízes; posteriormente o ACC acumulado é transportado à parte aérea e oxidado a etileno, o que pode resultar em epinastia, senescência e abscisão foliar (Bradford e Yang, 1980; Van de Poel e Van Der Straeten, 2014; Vanderstraeten e Van Der Straeten, 2017).

Além das alterações acima descritas, ocorrem outras alterações fisiológicas na parte aérea, como reduções significativas na taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ) e na condutância estomática, conforme observado em plantas de trigo (Malik et al., 2001), soja (Mutava et al., 2015) e em café arábica (Silveira et al., 2015). A diminuição de  $A$  pode ser devido ao acúmulo de carboidratos nas folhas (Plaut, 1987; Ferner et al. 2012; Mutava et al., 2015) ou a limitações estomáticas (Kreuzwieser e Rennenberg, 2014), além de outros fatores, como redução do teor de clorofila, senescência foliar e redução da área foliar (Malik et al., 2001). Como consequência de uma redução do fluxo de elétrons na cadeia de transporte, somados às ERO da cadeia de transporte mitocondrial, ocorre uma exacerbação do estresse oxidativo (e.g. formação de  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Hossain et al., 2009). Ademais, é comum a ocorrência de déficit hídrico mediado pela redução da condutividade hidráulica da raiz e pela diminuição da permeabilidade de membrana mediada por aquaporinas, conforme observado em *Arabidopsis thaliana* sob alagamento (Holbrook e Zwieniecki, 2003; Tournaire-Roux et al., 2003). Nessa condição, tem-se

também observado que o decréscimo da condutividade hidráulica da raiz reduz o potencial hídrico foliar, como verificado em plantas de *Solanum lycopersicum* e *Ricinus communis* (Else et al., 2001; 2009). Desde que a redução da condutância estomática ( $g_s$ ) está frequentemente associada com a diminuição da condutividade hidráulica da raiz, como demonstrado em algumas plantas lenhosas tolerantes e sensíveis ao alagamento (Islam et al., 2003; Nicolas et al., 2005; Rodriguez-Gamir et al., 2011), sugere-se que limitações hidráulicas exacerbem limitações ao processo fotossintético sob alagamento.

A maioria das plantas lenhosas de regiões úmidas possuem estratégias baseadas em características morfológicas e anatômicas (formação de aerênquimas, lenticelas e raízes adventícias) que evitam a falta de oxigênio na raiz (Herrera, 2013; Kreuzwieser e Rennenberg, 2014; Takahashi et al., 2014). No entanto, plantas lenhosas, que crescem em um habitat diferente e que carecem de adaptações morfo-anatômicas ao alagamento, utilizam mecanismos de tolerância relacionados com adaptações metabólicas que mantêm a produção de energia (Brandle e Crawford, 1987; Hossain e Uddin, 2011), armazenamento de carboidratos para respiração anaeróbica (glicólise e fermentação) (Atkinson et al., 2008; LeProvost et al., 2012), aumentos nos níveis de antioxidantes solúveis em água (e.g. ascorbato, glutathiona) e lipossolúveis (e.g.  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno), e incrementos na atividade de enzimas antioxidantes, como a dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutathiona (GR) e catalase (CAT) (Gibbs e Greenway, 2003; Arbona et al., 2008; Bailey-Serres e Voisenek, 2010).

Apenas duas espécies, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (café conilon), dentre mais de 100 espécies do gênero *Coffea*, são economicamente importantes, contribuindo aproximadamente com 99% da produção mundial de café. No caso de *C. canephora*, existe uma considerável variação intraespecífica quanto a tolerância à seca (Silva et al., 2013). Acredita-se que um sistema antioxidativo mais eficiente (maior atividade e maior concentração das moléculas antioxidantes) esteja fortemente associado com a tolerância à seca em *C. canephora* (Lima et al., 2002; Pinheiro et al., 2004; DaMatta e Ramalho, 2006). No entanto, nada se conhece sobre a tolerância dessa espécie ao estresse por alagamento. Registra-se que o alagamento é também um fator limitante à produção de *C. canephora*, especialmente em regiões com solos argilosos e de topografia plana (Gay et al., 2006; Bunn et al., 2015).

Em espécies lenhosas, como o citrus, por exemplo, a tolerância ao excesso de água no solo está associada a uma maior expressão do sistema antioxidante, que confere uma proteção satisfatória contra o dano oxidativo em folhas e raízes (Arbona et al., 2008). Pergunta-se, então, se a tolerância de *C. canephora* ao alagamento também estaria associada a uma maior expressão do sistema antioxidante? A hipótese deste trabalho basou-se no fato de que clones de *C. canephora* mais tolerantes à seca, que apresentam um sistema antioxidante mais eficiente (Lima et al., 2002; Pinheiro et al., 2004), também mostrariam maior tolerância ao alagamento. Esta pesquisa visou, pois, examinar as respostas do potencial hídrico foliar, de condutância hidráulica, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, partição de carboidratos, concentração de alguns fitormônios e ACC, dano oxidativo e sobrevivência de dois clones de *C. canephora* submetidos a períodos de estresse por alagamento e recuperação. Esses clones foram previamente identificados como tendo tolerâncias diferenciais ao déficit hídrico, além de diferenças na atividade de seus sistemas antioxidantes. Ao se esclarecer tal questionamento, espera-se aumentar a compreensão dos mecanismos de tolerância de *C. canephora* ao alagamento.

## **Materiais e métodos**

### ***Material vegetal e condições de crescimento***

O experimento foi realizado em Viçosa (20°45' S, 42°54' W, 650 m de altitude), sudeste do Brasil, sob condições controladas, em casa de vegetação. Foram utilizados dois clones de *C. canephora*: 120 (tolerante à seca) e 109A (sensível à seca) (Lima et al., 2002; Pinheiro et al., 2004). Os clones foram produzidos a partir de estacas de raízes no Instituto de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Espírito Santo, Brasil. Trinta dias antes do plantio, as plantas foram aclimatadas às condições ambientais da casa de vegetação. Quando as plantas atingiram o quarto par de folhas completamente expandido, os clones foram transplantados para vasos de 12 L, contendo uma mistura de solo, areia e esterco bovino (3:2:1, v/v/v). As plantas foram cultivadas por oito meses, sob irrigação periódica, de modo que a umidade do solo permanecesse próxima à da capacidade de campo. Foram feitas adubações foliares quando necessário.

### ***Delineamento experimental***

Plantas dos dois clones com um ano de idade foram submetidas a dois tratamentos de irrigação (controle e alagado), em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 2x2. Plantas do tratamento-controle tiveram um regime de irrigação de solo em capacidade de campo, enquanto as plantas do tratamento alagamento tiveram uma lâmina de água de 5 cm acima da superfície do substrato. Uma planta por vaso constituiu-se numa repetição.

### ***Desenvolvimento dos experimentos***

#### ***Experimento 1***

Foi feito um experimento preliminar em delineamento inteiramente casualizado, constituído pelos quatro tratamentos já mencionados, com cinco repetições. Foram utilizadas 10 plantas por clone, das quais cinco foram submetidas ao tratamento por alagamento e as outras cinco, utilizadas como tratamento-controle. Durante o experimento, os vasos com as plantas (alagamento) foram colocados dentro de vasos maiores (21.5 L), de modo que uma lâmina de água de 5 cm fosse aplicada acima da superfície do substrato. A água foi repostada diariamente de modo a manter a lâmina de água constante. Nas plantas do tratamento-controle, a umidade do solo foi mantida próxima à capacidade de campo até o final do experimento.

Os objetivos deste experimento foram: a) avaliar a relação entre a atividade fotossintética e a habilidade de *C. canephora* em tolerar a inundação do solo, e b) identificar o tempo necessário para que a  $g_s$  e  $A$  se reduzissem em 50% e 90% nas plantas

sob alagamento, em relação às plantas-controle. Em síntese, medições periódicas de trocas gasosas (1, 3, 6, 9, 12 e 15 dias) foram feitas ao longo do período de alagamento. As medições de trocas gasosas foram realizadas utilizando um analisador de trocas de gases (ver abaixo) em dois períodos: 08:00 - 10:00 h e 11:00 - 13:00 h; porém, os resultados obtidos ao meio-dia permitiram mais bem discriminar as respostas das plantas aos tratamentos aplicados, de modo que apenas os dados obtidos às 11:00 – 13:00 h são apresentados.

Observou-se que quatro e seis dias sob alagamento foi o tempo necessário para que  $g_s$  e  $A$  se reduzissem em 50% e 90%, em relação aos valores das plantas-controle. Além disso, esta informação serviu de base para se determinar o período de coleta de material vegetal em todos os tratamentos, para análises posteriores.

Em resposta ao estresse por alagamento do solo, as plantas apresentaram folhas com sintomas de murcha e nervuras amarelas (clorose). O dano visível desses dois sintomas foi expresso em termos de porcentagem de folhas afetadas pelo alagamento.

### *Experimento 2*

Com base nos resultados do experimento preliminar, foi desenvolvido um experimento com três blocos de plantas, cada bloco foi inteiramente casualizado conforme o esquema experimental mencionado, com seis repetições. Neste experimento, foram realizadas avaliações de potenciais hídricos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila  $a$  aos 2, 4 e 6 dias de aplicação dos tratamentos, e aos 15 e 40 dias de recuperação das plantas previamente estressadas.

Para as avaliações bioquímicas, em todos os tratamentos foram realizadas duas coletas de folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos (além de raízes laterais) aos quatro e seis dias de aplicação dos tratamentos. As folhas foram coletadas durante as avaliações de trocas gasosas e do potencial hídrico de meio-dia (11:00 – 13:00 h); encerradas essas atividades, foram coletadas as raízes dos dois clones a partir das 13:00 h. Em cada coleta de material vegetal foi desmontado um bloco experimental. Após seis dias de alagamento contínuo, foi drenado o excesso de água em plantas do terceiro bloco, o qual foi utilizado para monitorar a recuperação das plantas estressadas mediante avaliações hídricas e fotossintéticas. A metodologia para simular o alagamento do solo foi a mesma utilizada no experimento preliminar.

### *Potencial hídrico foliar*

As medições de potencial hídrico foliar foram realizadas na antemanhã (04:30 – 05:30 h) ( $\Psi_{am}$ ) e ao meio-dia (12:00 – 13:00 h) ( $\Psi_{md}$ ). As folhas usadas para a estimativa de  $\Psi_{md}$  foram encerradas em um saco plástico transparente de fecho hermético contendo papel toalha umedecido em seu interior. Usou-se uma câmara de pressão tipo Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, Albany, NY, USA), conforme a metodologia descrita em Silva et al. (2013).

### *Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a*

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas [taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ), condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), taxa transpiratória ( $E$ ) e a taxa de respiração mitocondrial no escuro ( $R_E$ )] foram obtidas usando-se dois sistemas abertos portáteis de troca de gases previamente calibrados entre si (LI-6400XT; LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA), equipados com uma câmara de fluorescência integrada (LI-6400-40; LI-COR Inc). A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada a partir da razão  $A/E$ . As medições de trocas gasosas foram realizadas às 08:00 - 10:00 h e 11:00 - 13:00 h; mesmo modo do experimento 1, apenas os dados obtidos entorno do meio-dia são apresentados. As medições foram feitas em folhas totalmente expandidas, sob radiação fotossinteticamente ativa (RFA) artificial, isto é, 1000  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em nível das folhas, e 400  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ . Todas as medições foram realizadas em condições ambientes a uma temperatura foliar de 25 °C e um déficit de pressão de vapor entre 1.2 e 2.0 kPa, enquanto a quantidade de luz azul foi ajustada em 10% de RFA para otimizar a abertura estomática.

Na antemanhã, a fluorescência mínima ( $F_0$ ) foi obtida via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade (0.03  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi obtida pela aplicação de um pulso de luz actínica saturante (8000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 0.8 s). Usando esses parâmetros, foi calculada a relação de fluorescência variável/máxima,  $F_v/F_m = [(F_m - F_0)/F_m]$ . Em folhas adaptadas à luz, o rendimento da fluorescência no estado estacionário ( $F_s$ ) foi medido após o registro dos parâmetros de trocas de gasosas. Um pulso de luz branca saturante (8000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 0.8 s) foi aplicado para atingir a fluorescência máxima do tecido foliar adaptado à luz ( $F_m'$ ). A luz actínica foi desligada e uma iluminação vermelho-distante de baixa intensidade (2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foi aplicada para medir a fluorescência inicial do tecido foliar adaptado à luz ( $F_0'$ ). Usando-se os valores desses parâmetros, o coeficiente de extinção fotoquímico ( $q_p$ ) foi calculado como  $q_p = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ , e o coeficiente de

extinção não-fotoquímico (NPQ) foi calculado como  $NPQ = (F_m/F_m') - 1$ . O rendimento quântico fotoquímico máximo do fotossistema II ( $\Phi_{FSII}$ ) foi obtido como  $\Phi_{FSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ , a partir do qual a taxa de transporte de elétrons (TTE) foi calculada como  $TTE = \Phi_{FSII} * PPF * f * \alpha$ , em que  $f$  é um fator associado à partição de energia entre FSII e FSI e é assumido como 0.5, o que indica que a energia de excitação é distribuída igualmente entre os dois fotossistemas,  $\alpha$  é a absorvância foliar pelos tecidos fotossintéticos, assumida como sendo 0.84 (Maxwell e Johnson, 2000).

A taxa de respiração mitocondrial no escuro ( $R_E$ ) foi medida à meia-noite e se utilizou para estimar a taxa de respiração à luz ( $R_L$ ), de acordo com Niinemets et al. (2006, 2009), como  $R_L = R_E/2$ . A taxa fotorrespiratória da Rubisco ( $R_P$ ) foi estimada como  $R_P = 1/12 [TTE - 4(A + R_L)]$ , de acordo com Valentini et al. (1995). A taxa de fotossíntese bruta ( $A_{bruta}$ ) foi calculada como  $A_{bruta} = R_P + R_L + A$ . Os valores de  $R_P$  e  $A_{bruta}$  foram utilizados para calcular a razão  $R_P/A_{bruta}$ . Além disso, a velocidade máxima de carboxilação ( $V_{cmax}$ ) da Rubisco foi calculada utilizando-se pontos únicos de  $A$  e TTE em uma base de concentração de  $CO_2$  no cloroplasto, de acordo com a metodologia descrita por Wilson et al. (2000) e De Kauwe et al. (2016); para tal, utilizaram-se as propriedades cinéticas da Rubisco para *Coffea* relatadas em Martins et al. (2013).

#### *Avaliações metabólicas*

As avaliações metabólicas em folhas e raízes consistiram da quantificação de metabólitos e clorofilas ( $a + b$ ) (apenas em folha), produção de etileno, atividade da ACC oxidase, concentração de ACC e de alguns fitormônios, atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica. Todo o material vegetal coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a  $-80^\circ C$ , até análise. As amostras foram liofilizadas a  $-48^\circ C$  e maceradas em um disruptor celular com auxílio de esferas de metal de 3.2 mm (mini-Bead beaer-96, Bio Spec Products, Bartlesville, OK, EUA).

#### *Quantificação de metabólitos e de clorofilas*

A quantificação de metabólitos foi realizada usando-se 10 mg de massa seca (MS) de amostras de folhas ou raízes liofilizadas, ao qual se adicionou 1 mL de metanol 100%; a mistura foi incubada ( $70^\circ C$ , 30 min) e posteriormente centrifugada (13000 g, 5 min). Após a centrifugação, as concentrações de hexoses (glicose e frutose) e sacarose foram quantificadas no sobrenadante; amido e proteínas (método Bradford) foram quantificadas na fração insolúvel (pellet) em metanol, conforme detalhado em Praxedes et al. (2006) e Ronchi et al. (2006). A quantificação de prolina foi obtida na análise de perfil hormonal,



descrita abaixo. As clorofilas (*a + b*) foram extraídas utilizando-se acetona aquosa 80% (v/v) e suas concentrações quantificadas espectrofotometricamente, de acordo com Lichtenthaler (1987).

#### *Produção de etileno*

A quantificação de produção de etileno foi feita utilizando-se uma folha completamente expandida, descartando-se a nervura central. Após, a folha foi armazenada em um frasco do tipo erlenmeyer de 50 mL com tampa selante, adicionando-se 1 mL de água desionizada para evitar-se a desidratação dos tecidos. Sequencialmente, os erlenmeyers selados foram incubados em câmara germinadora do tipo BOD, por 24 h, a 30°C. Foi coletada 1 mL da atmosfera do frasco com auxílio de seringa (Focus GC, Thermo Fisher Scientific, Waltham EUA) para se inserir o volume em um cromatógrafo a gás (modelo 5890, Series II, Hewlett-Packard, Palo Alto, EUA), equipado com coluna “stainless-steel” (1.0 m x 6.0 mm), empacotada com malha Porapak-N 80-100. O etileno produzido foi quantificado pelo detector de ionização por chama e comparado a um padrão externo. O resultado foi expresso com base na massa seca da folha ( $\text{pmol g}^{-1} \text{MS}$ ) de cada tratamento, utilizando-se de seis repetições biológicas. Para quantificação de produção de etileno em raiz, aproximadamente 6 g de raízes laterais foram coletados de um torrão aleatoriamente amostrado do substrato. Por planta (repetição), as raízes foram lavadas, separadas e secadas com papel toalha. Depois disso, as raízes foram alocadas em erlenmeyer de 50 mL, após selado e incubado por 24 horas em BOD a 30 °C. Posteriormente, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima para quantificar a produção de etileno em raiz.

#### *Atividade da ACC oxidase*

A avaliação da atividade da enzima ACC oxidase foi feita em raízes (3 g de MF) e em folhas (1 g de MF). O material vegetal foi transferido para frascos do tipo erlenmeyer de 25 mL, com uma camada de papel filtro. A reação enzimática foi iniciada pela adição de uma alíquota de 2 mL de uma solução tampão em ausência ou presença de ACC (0.1 M), constituído de bicarbonato de sódio 0.2 M; ascorbato de sódio 0.3 M;  $\text{FeSO}_4$  1 mM; tricina 1 M e manitol 0.6 M. Sequencialmente, os erlenmeyers selados foram incubados em câmara germinadora do tipo BOD, por 5 h, a 30°C. Decorrido o tempo de reação, foi coletada 1 mL da atmosfera do frasco para se inserir o volume em cromatógrafo a gás para quantificar-se o etileno, conforme detalhado acima. Cada repetição foi analisada em duplicata e o resultado foi expresso com base na massa seca de folha ou raiz ( $\text{pmol g}^{-1} \text{MS}$ ) de cada tratamento, utilizando-se de seis repetições biológicas.

### *Perfil hormonal*

Para esta análise, foram utilizados 20 mg de MS (folha ou raiz) liofilizados para subsequente extração, de acordo com a metodologia descrita por Müller et al. (2011), com modificações, para quantificar-se as concentrações de ACC, ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (JA), metil jasmonato (MeJA), putrescina e prolina. Em aquela massa foi adicionado 400 µL de solução de extração (metanol: isopropanol: ácido acético, 20: 79: 1). Após centrifugação (13000 g, 10 min, 4 °C), 350 µL de sobrenadante foram recolhidos para um novo tubo. Para o pellet resultante, repetiu-se o processo de extração e depois foram combinados os sobrenadantes obtidos. Adicionalmente, uma centrifugação final (20000 g, 5 min, 4 °C) foi realizada para remover os detritos de tecido em suspensão. As amostras foram passadas em filtros (Filtro seringa PVDF 13 mm, 0.2 µm, marca Hexis, AG5190-5261ESTou HX0097-02623) para remover qualquer partícula em suspensão. Subsequentemente, o extrato foi injetado (5 µL) no sistema LC – MS/MS usando um Agilent 1200 Infinity Series (Santa Clara, CA, USA) acoplado a espectrômetro de massa do tipo quadruplo triplo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada por uma coluna de modelo Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 µm, 2.1 x 50 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), em série, com uma coluna de modelo Zorbax SB-C18 de 1.8 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Os solventes utilizados foram (A) 0.02% de ácido acético em água e (B) ácido acético a 0.02% em acetonitrila em um gradiente A/B: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. A razão de fluxo do solvente foi de 0.3 mL min<sup>-1</sup> em uma coluna a 23 °C. Uma vez no espectrômetro de massa, foi utilizada a fonte de ionização ESI (Ionização por Electrospray) com as seguintes condições: temperatura do gás de 300 °C, taxa de fluxo de nitrogênio de 10 L min<sup>-1</sup>, pressão do nebulizador capilar de 35 psi e voltagem de 4000 V. O equipamento foi operado no modo MRM (“Multiple reaction monitorin”). O precursor de passagem íon/fragmento estabelecido foi monitorado por testes de fragmentação de cada molécula: ACC (102.1/56.2); ABA (263.1/153); JA (209/59); MeJA (225.2/151.2); putrescina (89/72.1) e prolina (116/70). ACC, MeJA, putrescina e prolina foram escaneados no modo positivo, e os demais fitormônios, no modo negativo. Uma curva de calibração, utilizando padrões autênticos para cada composto, foi gerada para permitir a quantificação absoluta dos hormônios citados. Finalmente, os dados gerados foram analisados no programa "Skyline 4.1" para obter a área de pico de cada hormônio nas amostras e os resultados foram expressos em ng g<sup>-1</sup> MS.

### *Atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo*

As atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutatona (GR) e catalase (CAT) foram determinadas a partir de amostras de 90 mg de raízes ou folhas, maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1 mL de meio de extração. Extração e determinações de atividades enzimáticas seguiram a metodologia de Pinheiro et al. (2004), com modificações. O meio de extração utilizado para as enzimas foi composto de tampão fosfato de potássio 0.1 M, pH 7.0, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0.1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, ácido ascórbico 20 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 100% (p/p). O extrato foi colocado no vórtex por 20 s e centrifugado a 12000 g por 15 min, a 4 °C.

Uma alíquota de 20 µL do extrato bruto foi adicionada a 180 µL de um meio de reação para quantificar a atividade das enzimas antioxidantes: SOD, EC 1.15.1.1 [50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7.5), 13 mM de metionina (pH 7.8), 2 µL de riboflavina, 0.1 mM de EDTA, 75 µL de azul de p-nitro tetrazólio (NBT)]; APX, EC 1.11.1.11 [50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7.0), 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM de ácido ascórbico]; GR, EC 1.6.4.2 [100 mM de tampão fosfato (pH 7.0), 1 mM de EDTA, 3 mM de cloreto de magnésio, 1 mM de glutatona oxidada, 0.1 mM de NADPH]; CAT, EC 1.11.1.6 [50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7.0), 20 mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)].

A atividade das enzimas SOD, APX, GR e CAT foi determinada pela medida de absorvância em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA). A reação de SOD foi realizada em câmara com luz fluorescente de 15 W, a 25 °C, por 10 min. Em seguida, a iluminação foi interrompida e a absorvância da formazana azul resultante da fotoredução do NBT foi determinada a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). O resultado foi expresso em U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. A atividade de APX foi calculada utilizando-se a absorvância (290 nm, a 25 °C) e o coeficiente de extinção molar de 2.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e expressa em µmol de ácido ascórbico min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. A atividade de GR foi testada medindo-se a taxa de oxidação de NADPH e NADH, respectivamente, ambas em 340 nm. A atividade de CAT foi determinada pela variação de absorvância (240 nm, durante 1 min) e coeficiente de absorvância de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, expressando-se o resultado em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### *Peroxidação lipídica*

A peroxidação lipídica foi determinada a partir de amostras de 90 mg de raízes ou folhas, maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1 mL de solução 0.1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) com 1% (v/v) de Triton X-100, seguida de centrifugação a 10000 g, por 15 min, a 4 °C (Gomes-Junior et al., 2006). Uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi adicionada a 750 µL de TCA 20% com ácido tiobarbitúrico (TBA, 0.5% p/v), incubadas por 20 min a 90 °C, com agitação. A reação foi paralisada em banho de gelo por 15 min; os tubos foram então centrifugados a 3000 g, por 10 min, a 4 °C. Para a absorvância de 200 µL em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA), foram utilizados os seguintes comprimentos de onda: 532 e 600 nm. A concentração de malondialdeído (MDA) foi estimada utilizando-se as absorvâncias e coeficiente de absortividade de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e expressa em nmol g<sup>-1</sup> MF (Heath e Packer, 1968).

### *Experimento 3*

No terceiro experimento, foram utilizadas 12 plantas por clone, das quais seis foram submetidas ao tratamento de alagamento e as outras seis, ao tratamento-controle. Depois de seis dias de alagamento contínuo, o excesso de água foi drenado e o solo permaneceu com umidade próxima à da capacidade de campo. Acompanhou-se a recuperação das plantas afetadas pelo alagamento ao longo de 40 dias, tempo em que ocorreu a recuperação de *A* no clone 120. Durante os períodos de alagamento e recuperação, foram realizadas em todos os tratamentos as avaliações de potencial hídrico, condutância hidráulica da planta, transpiração de plantas inteiras, área foliar total, taxa de crescimento relativo de área foliar, extravazamento de eletrólitos, abscisão foliar e, ao final dos 40 dias, foi avaliada a taxa de sobrevivência das plantas.

### *Condutância hidráulica da planta*

A condutância hidráulica da planta foi estimada por meio da razão entre a taxa de transpiração de plantas inteiras ( $E_p$ ) e a diferença de potencial hídrico foliar obtida durante o intervalo da medição de  $\Psi_{am}$  e  $\Psi_{md}$  (Pinheiro et al., 2005; Silva et al., 2013):

$$K_{planta} = E_p / (\Psi_{md} - \Psi_{am})$$

A taxa de transpiração de plantas inteiras foi estimada gravimetricamente (Dias et al., 2007), e calculada usando-se os dados da duração da transpiração ( $h$ ), área foliar total (AFT) e variações de peso dos vasos, entre a antemanhã ( $P_1$ ) e o meio-dia ( $P_2$ ):

$$E_p = [((P_1 - P_2) / 18 * 1000) / AFT] / (T_2 - T_1)$$

A área foliar total (AFT) foi obtida a partir do somatório das áreas foliares unitárias. Para calcular a área foliar unitária (AF) foi utilizando um modelo matemático em que se usam medidas não destrutivas do comprimento (C) e largura das folhas (L).  $AF = 0.6626 (C * L)^{1.0116}$ , conforme Antunes et al. (2008).

A porcentagem de perda da condutância hidráulica de plantas dos tratamentos sob alagamento foi calculada em relação aos valores de condutividade hidráulica das plantas do tratamento-controle. Para evitar a perda de água por evaporação (e, portanto, evitar subestimativas de  $E_p$ ) foi utilizado um filme plástico de cor preta sobre a superfície do substrato.

#### *Taxa de crescimento relativo de área foliar*

A taxa de crescimento relativo de área foliar ( $TCR_{AF}$ ) expressa o incremento de área foliar, por unidade de área inicial ( $m^2$ ), num determinado intervalo de tempo (dias). Para isso, usou-se o dado de AFT calculado em plantas dos clones sob recuperação:

$$TCR_{AF} = (\ln AFT_2 - \ln AFT_1) / (t_2 - t_1)$$

Em que: ln = logaritmo neperiano

#### *Dano foliar e taxa de sobrevivência de plantas*

O teste de extravazamento de eletrólitos (EE) foi realizado conforme a metodologia descrita em Lima et al. (2002), utilizando-se um medidor de condutividade elétrica. Por repetição, foram usados 10 discos foliares, que foram lavados e depois depositados em 20 mL de água desionizada em frascos selados durante 6 h, à temperatura ambiente. Após esse período foi feita a primeira leitura de condutividade elétrica (CE1) e, imediatamente, os frascos foram colocados em uma estufa de secagem, a 90 °C, por 2 h, e subsequentemente se procedeu à segunda leitura de condutividade elétrica (CE2). O valor de extravazamento de eletrólitos foi obtido pela porcentagem de eletrólitos extravasados em relação aos eletrólitos totais, conforme a seguinte fórmula:

$$EE (\%) = (CE1/CE2) * 100$$

A contagem de perda de folhas por abscisão foi feita a cada cinco dias, os dados foram apresentados de forma acumulativa (0 - 15 dias, período de recuperação intermediária; e 16 - 40 dias, fase final da recuperação). A contagem de folhas cloróticas somente foi realizada aos 15 e 40 dias de recuperação. Folhas com nervuras amarelas (clorose) foram consideradas como afetadas pelo alagamento. A sobrevivência das plantas ao alagamento foi expressa em porcentagem e foi avaliada ao final do período de

recuperação. As plantas que foram consideradas mortas exibiram cerca de 90% de área foliar com folhas totalmente secas. Essas plantas “mortas” foram mantidas na capacidade de campo por dois meses, período em que se verificou secagem completa de todo o caule.

### ***Análises estatísticas***

Os dados obtidos foram analisados usando-se o desenho inteiramente casualizado, em um fatorial de 2x2. Os dados foram expressos como médias±erro padrão. As diferenças entre as médias foram examinadas usando-se o teste *t* ou Mann-Whitney. Análises de correlação de Pearson foram realizadas entre os parâmetros de relevância fisiológica. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa computacional Statistica versão 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) e os gráficos foram realizados no programa SigmaPlot versão 11.0.

## Resultados

### *Experimento 1*

No Experimento 1, foi avaliada a tolerância de dois clones (120 e 109A) de *C. canephora* ao longo de 12 dias de contínuo alagamento do solo, mediante medições de trocas gasosas e porcentagem de folhas afetadas pelo estresse. Em ambos os clones, o alagamento diminuiu o valor de  $A$  progressivamente, desde o início da imposição do estresse. Após seis dias de alagamento, o valor de  $A$  ficou próximo a zero no clone 109A, enquanto no clone 120  $A$  foi cerca de 1/3 em relação aos valores encontrados nas plantas-controle (Figura 1A). Em paralelo,  $g_s$  foi diminuída pelo alagamento, evidenciando um fechamento estomático quase completo no clone 109A após seis dias de estresse, enquanto no clone 120 houve uma redução de  $g_s$ , porém não significativa em comparação à das plantas-controle (Figura 1B). Com 12 dias de alagamento do solo, os parâmetros de  $A$  e  $g_s$  foram reduzidos a valores próximos de zero em ambos os clones.

O dano visível às folhas foi evidente após seis dias de alagamento contínuo nos dois clones. Depois de 12 dias de estresse, a porcentagem de danos nas folhas aumentou significativamente em ambos os clones, embora com diferentes graus de afetação entre eles (Figuras 2 e 3). Ao fim do experimento, duas das cinco plantas do clone 120 sobreviveram, e apenas uma planta do clone 109A manteve-se viva após o alagamento.

### *Experimento 2*

#### *Potencial hídrico foliar*

Folhas de plantas dos dois clones submetidos ao alagamento não sofreram alterações em  $\Psi_{am}$  em relação ao das folhas de plantas não alagadas. No entanto, folhas de plantas alagadas de ambos os clones tiveram diminuições significativas em  $\Psi_{md}$  a partir do sexto dia de experimento. Na fase de recuperação, avaliada aos 15 e 40 dias após a suspensão do alagamento,  $\Psi_{am}$  não diferiu entre plantas-controle e plantas previamente estressadas do clone 120, apesar de se detectar menor  $\Psi_{md}$  (-1.30 MPa) aos 15 dias, mas não aos 40 dias nesse clone. No clone 109A, tanto  $\Psi_{am}$  (-2.13 MPa) como  $\Psi_{md}$  (-2.77 MPa) foram marcadamente menores nas plantas previamente estressadas que nas plantas-controle aos 15 dias de recuperação, com total recuperação tanto de  $\Psi_{am}$  como de  $\Psi_{md}$  aos 40 dias (Figura 4).

#### *Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a*

Durante a aplicação do alagamento, ocorreram reduções significativas de  $A$  e  $g_s$  em ambos os clones, mais marcadamente no clone 109A. Com seis dias de alagamento, ambos os clones atingiram um quase completo fechamento estomático. Com apenas 15

dias de recuperação, o clone 120 foi o único que mostrou uma reversão de 50% em  $A$  em relação às das plantas-controle. Após 40 dias de recuperação, o clone 120 teve valores de  $A$  semelhantes aos das plantas-controle, apesar dos menores valores de  $g_s$ . Por outro lado, o clone 109A apresentou uma recuperação de  $A$  bem menor ao fim do experimento, com menores valores (75%) em relação às das plantas-controle (Figuras 5A e 5B).

Os clones sob alagamento exibiram  $C_i$  similares ao das plantas do tratamento-controle, porém  $C_i$  diminuiu significativamente nos clones durante o processo de recuperação (Figura 5C). Com seis dias de alagamento, o clone 109A exibiu uma redução de 40% na EUA, enquanto o clone 120 mostrou um incremento de 45% na EUA em relação às das plantas não alagadas. Incremento de EUA também foi observado nas plantas dos tratamentos alagados durante o período de recuperação (60% para o clone 120 e 15% para o clone 109A; Figura 5D).

Folhas de ambos os clones sob alagamento apresentaram reduções discretas na razão  $F_v/F_m$  em relação às plantas-controle. Estas reduções foram completamente revertidas durante a recuperação, porém apenas no clone 120 (Figura 5E). Por sua vez, a TTE foi menor ao longo dos seis dias de alagamento, com reduções proporcionalmente menores nas plantas estressadas do clone 120 em relação às das plantas do clone 109A (Figura 5F). Aos 15 dias de recuperação, TTE foi menor nas plantas previamente estressadas, comparadas com as plantas-controle, especialmente no clone 109A. Mesmo aos 40 dias de recuperação do alagamento, TTE foi significativamente menor nas plantas estressadas do clone 109A, mas recuperou-se completamente no clone 120.

Em condições sob alagamento, plantas do clone 120 mostraram valores de  $q_p$  similares aos das plantas-controle, mesmo padrão observado na fase de recuperação. Porém, plantas do clone 109A mostraram uma redução significativa com respeito ao tratamento-controle. Aos 40 dias após alagamento, plantas do clone 109A mostraram uma diminuição de 50% dos valores de  $q_p$  em relação às das plantas-controle (Figura 6A). Por sua vez, houve aumentos de NPQ em resposta ao alagamento, a partir do quarto dia de alagamento no clone 120, e aos seis dias no clone 109A. Esses aumentos persistiram nos dois clones aos 15 dias de recuperação do estresse, porém nenhuma diferença significativa foi encontrada comparando-se plantas previamente estressadas com seus respectivos controles ao final do experimento.



De modo geral, os tratamentos aplicados não afetaram a  $R_E$  (Figura 6C). Por outro lado,  $R_P$  foi incrementada no clone 120, aos quatro e seis dias de alagamento; aos 15 dias de recuperação, não se observaram alterações de  $R_P$  no clone 109A (Figura 6D). Entretanto, a razão  $R_P/A_{bruta}$  aumentou nos dois clones em resposta ao alagamento, aos quatro e seis dias, e aos 15 dias de recuperação. No final do experimento, aquela razão recuperou-se aos níveis dos controles no clone 120, mas manteve-se significativamente maior no clone 109A (Figura 6E). Destaque-se que  $V_{cmax}$  não foi afetada pelos tratamentos aplicados no clone 120. No clone 109A,  $V_{cmax}$  reduziu-se significativamente ao longo de todo o período de recuperação nas plantas previamente estressadas (Figura 6F).

#### *Análises de correlação*

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para conhecer o grau de associação entre  $A$  e alguns parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila  $a$  durante o alagamento e posterior recuperação das plantas. Houve, na fase de alagamento, correlação positiva entre  $A$  com  $g_s$ ,  $F_v/F_m$ , TTE e  $q_P$  nos dois clones, observando-se uma correlação negativa entre  $A$  e NPQ (apenas no clone 120). Na fase de recuperação,  $A$  correlacionou-se positivamente com  $g_s$ ,  $C_i$ ,  $F_v/F_m$ , TTE e  $q_P$  em ambos os clones, e negativamente com NPQ, mas somente no clone 120 (Tabela 1).

#### *Quantificação de metabólitos e pigmentos cloroplastídicos*

As concentrações de glicose, frutose e sacarose não foram alteradas em folhas dos clones durante o alagamento. Porém, as concentrações de frutose e sacarose, em raízes de ambos os clones, foram diminuídas durante a aplicação do estresse; somente no clone 109A houve reduções dos níveis de glicose durante o último dia de alagamento (Figura 7). Por outro lado, as concentrações de amido e proteínas em folhas e raízes de ambos os clones não foram afetadas pelos tratamentos. De modo geral, não houve diferenças significativas nas concentrações de aminoácidos e clorofilas ( $a + b$ ) em folhas de ambos os clones sob alagamento (Figura 8; Tabela 2), bem como na concentração de aminoácidos em raízes dos dois clones em resposta ao alagamento. Quanto à prolina, suas concentrações foliares aumentaram significativamente em ambos os clones aos seis de alagamento. Em raízes, as concentrações de prolina aumentaram significativamente nos dois clones, aos quatro e seis dias de alagamento (Figura 9).

#### *Produção de etileno, concentração de ACC e quantificação de alguns fitormônios*

Foram quantificados alguns fitormônios aos quatro e seis dias de alagamento. Não se observaram diferenças significativas nos níveis foliares de ACC, de etileno, bem como de atividade da ACC oxidase nos dois clones, com exceção dos níveis de ACC, que

aumentaram nas plantas do clone 120 aos seis dias (Figura 10). Nas raízes, em contraste, os níveis de ACC (exceto aos quatro dias no clone 120) e etileno foram marcadamente maiores nas plantas sob alagamento. Aumentos na atividade da ACC oxidase, nas raízes, foram observados apenas aos seis dias de alagamento, e somente no clone 109A (Figura 10).

Quanto aos outros fitormônios avaliados (ABA, MeJA e putrescina) em folhas, não houve alterações significativas em ambos clones sob condições de alagamento (Figura 12). Verificou-se alterações nos níveis de JA nas raízes das plantas sob alagamento, independentemente do clone e tempo de avaliação; redução foi observada também na concentração de MeJA nas raízes do clone 120, apenas aos quatro dias de alagamento (Figura 13).

#### *Atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica*

Na folha, observou-se um aumento significativo na atividade da SOD, mas apenas no clone 109A aos seis dias de alagamento (Figura 14). A atividade da APX aumentou em resposta ao alagamento no clone 120, enquanto a atividade da GR não foi afetada pelos tratamentos. Em contraste, o alagamento promoveu redução significativa (exceto no clone 120 aos quatro dias após o estresse) na atividade da CAT. Nas raízes, por sua vez, o alagamento resultou em maior atividade da SOD e de APX em ambos os clones e reduções da atividade da GR (apenas no clone 109A), enquanto a atividade de CAT foi reduzida indistintamente do clone e da época de avaliação (Figura 15). A respeito da variação da atividade do sistema antioxidante, não se observou variação de MDA em folhas e raízes (exceto no clone 109A com seis dias de alagamento) dos clones submetidos aos tratamentos (Figura 16).

### ***Experimento 3***

#### *Potencial hídrico foliar e condutância hidráulica da planta*

O  $\Psi_{am}$  não foi afetado pelos tratamentos, exceto nos 15 primeiros dias de recuperação (-0.36 MPa no clone 120 e -1.31 MPa no clone 109A). Por outro lado,  $\Psi_{md}$  foi significativamente mais negativo aos quatro e seis dias de alagamento, e aos 15 dias de recuperação do estresse, nos dois clones (Figura 17). Registrou-se que, apesar de completa recuperação de  $\Psi_{am}$  e  $\Psi_{md}$  ao final do experimento, não houve recuperação de condutância hidráulica em ambos os clones, que foi a metade da observada nas plantas-controladas (Tabela 3). Registre-se que a porcentagem da perda de condutância hidráulica aumentou com aumento do tempo de alagamento (Figura 18).

### *Danos e sobrevivência em plantas alagadas*

Nos dois clones não foram registrados danos foliares por EE, clorose e abscisão durante a exposição ao alagamento; mas o ambiente anaeróbico alterou a coloração das raízes, porém em menor extensão no clone 120 (Figura 19). A sobrevivência das plantas e danos foliares causados por seis dias de alagamento foram acentuados na fase de recuperação, sendo as plantas do clone 109A as mais afetadas em termos de diminuição da taxa de crescimento relativo de área foliar (Tabela 5), acompanhado de aumentos de porcentagem de EE (Tabela 6), número de folhas cloróticas (Tabela 7) e número de folhas caídas (Tabela 8). Registre-se que, combinando-se os experimentos II e III, a porcentagem de sobrevivência de plantas do clone 120 (92%) foi superior à do clone 109A (58%). Por último, 40 dias de recuperação não foram suficientes para reverter a coloração escura em raízes do clone 109A (Figura 19).

## Discussão

Em conformidade com a hipótese deste trabalho, o clone 120, tolerante à seca, exibiu uma melhor performance fotossintética que o clone 109A, sensível à seca, tanto na fase de alagamento como na fase de recuperação. Registre-se que, ao longo de seis dias de alagamento, não se observaram diferenças marcantes entre os dois clones, no que respeita às relações hídricas, atividade antioxidante e danos oxidativos; por outro lado, diferenças clonais mais proeminentes foram observadas na fase de recuperação, com completa reversão das taxas fotossintéticas a níveis das plantas-controle no clone 120 (mas não no clone 109A). Destaque-se que essa fase de recuperação (40 dias) foi muito longa. Tomados em conjunto, os presentes dados indicam um baixo grau de tolerância ao alagamento em *C. canephora*, com potencial comprometimento do aparelho fotossintético e das relações hídricas, fatos mais evidentes na fase de recuperação que durante o alagamento *per se*.

### *Fase de alagamento*

Os resultados aqui descritos indicam que os  $\Psi_{am}$  dos clones avaliados não foram alterados pelo alagamento, fato possivelmente relacionado à capacidade das raízes em absorver água durante a noite, associado com a expressiva redução da transpiração. Em contraste,  $\Psi_{md}$  foi reduzido pelo estresse, fato possivelmente associado a um transporte limitado de água pelo caminho apoplástico (principal rota de transporte de água em plantas lenhosas); menor  $\Psi_{md}$  deve estar relacionado com diminuições da condutância hidráulica dos clones que, por sua vez, está sendo afetado pela redução da condutância hidráulica da raiz e pela diminuição da permeabilidade de membrana mediada por aquaporinas, a exemplo do que se observa em outras espécies sob alagamento (Yetisir et al., 2006; Atkinson et al., 2008; Aroca 2012).

O alagamento reduziu  $A$  e  $g_s$  em paralelo ( $r= 0.83$ ,  $p= 0.00$ ), mais marcadamente no clone 109A. Esses dados indicam, *a priori*, uma limitação estomática à fotossíntese. Entretanto,  $C_i$  não se alterou significativamente, de sorte que é pouco provável que tais limitações tenham sido expressivas. Houve também comprometimento de eventos fotoquímicos, a julgar-se, por exemplo, pelas correlações positiva de  $A$  com  $F_v/F_m$ , TTE e  $q_p$ . Em todo o caso, como  $V_{cmax}$  em base de concentração de  $CO_2$  no cloroplasto não foi afetada pelo alagamento, sugere-se que potenciais limitações fotoquímicas tenham afetado o desempenho fotoquímico. A manutenção de  $C_i$  e  $V_{cmax}$  pode sugerir que a difusão do  $CO_2$ , desde os espaços intracelulares até o estroma cloroplástico, tenha sido gradualmente limitada pela condutância mesofilica ( $\downarrow g_m$ ). A condutância de  $CO_2$  pelo

mesofilo é finita e altamente variável, podendo reduzir a concentração cloroplástica de  $\text{CO}_2$  e, portanto, a fotossíntese (Flexas et al., 2008; Ouyang et al., 2017), fato reportado numa espécie de conífera (*Picea sitchensis*) sob alagamento (Black et al., 2005). A redução de  $g_s$  não foi associada a variações em ABA, cujas concentrações não variaram significativamente em resposta aos tratamentos. Resultados semelhantes foram observados em citrus (Rodríguez-Gamir et al., 2011) e soja (Mutava et al., 2015). Portanto, o fechamento estomático foi possivelmente associado a decréscimos de condutância hidráulica da planta, fato realçado pela correlação positiva destas duas variáveis ( $r= 0.61$ ,  $p= 0.00$ ). Resultados similares foram encontrados em outras plantas lenhosas (Davanso et al., 2002; Mielke et al., 2003; Nicolas et al., 2005; Rodriguez-Gamir et al., 2011; Ferner et al., 2012).

Uma vez que a fixação de carbono (o principal processo de utilização da energia luminosa nos cloroplastos) foi reduzida, ajustes na captura de luz, uso e dissipação são necessários para sustentar fotoproteção à maquinaria fotossintética (Martins et al., 2014). Neste estudo, demonstraram-se quedas em  $q_p$  e aumento em NPQ, sugerindo menor captura de luz e aumentos na dissipação de energia na forma de calor (Arbona et al., 2009), fatos especialmente observados aos 6 dias de alagamento. Alterações em  $q_p$  foram, no entanto, independentes dos níveis de clorofilas, que se mantiveram constantes. Ademais, visto que houve aumento em  $R_p/A_{\text{bruta}}$ , sugere-se que a fotorrespiração tenha contribuído largamente para a dissipação do excesso de energia sob condições de alagamento. Outras rotas alternativas, como o fluxo cíclico de elétrons no FSII ou o ciclo água-água (Logan et al., 2006), também poderiam estar envolvidas na dissipação de energia excedente.

Em condições de alagamento, diminuição de  $A$  está diretamente relacionada com o decréscimo da atividade metabólica das reações de carboxilação, levando a uma redução de carboidratos (Silveira et al., 2015). Porém, o acúmulo de açúcares em folhas dos clones não esteve relacionado com a baixa atividade fotossintética, mais bem poderia ser atribuída à redução de particionamento de carboidratos para a raiz ou a uma menor utilização na parte aérea, em resposta a prováveis reduções no crescimento (Kreuzwieser et al., 2004). Por outro lado, concentrações de açúcares nas raízes indicaram um consumo crescente de carboidratos, fato possivelmente associado a menores importações de fotoassimilados. Geralmente, espécies ou genótipos que apresentam menor concentração de carboidratos (açúcares) nas raízes e, redução na atividade enzimática do metabolismo de carboidratos (menor atividade de sintase da sacarose) mostraram menor tolerância para

suportar a deficiência de oxigênio no solo (Sairam et al., 2009; Zanandrea et al., 2010; Araki et al., 2012). Uma redução de carboidratos pode limitar a respiração anaeróbica da raiz, reduzindo a tolerância a longos períodos de alagamento (Hossain e Uddin, 2011). Portanto, reduções de açúcares nas raízes pode ter resultado em um colapso energético. Isso, em conjunto com severas afetações na maquinaria fotossintética do clone 109A, poderia ter comprometido a sobrevivência das plantas desse clone muito mais que a do clone 120 (Ayi et al., 2016).

A sacarose, principal produto da fotossíntese, pode ser utilizada para a manutenção do metabolismo celular ou é convertida em amido para armazenamento (Kuai et al., 2016). As concentrações de amido em folhas e raízes não diminuíram nos clones sob estresse, coincidindo em parte com os relatos de outros experimentos em genótipos de *Arabidopsis thaliana* e arroz tolerantes ao alagamento, que reduzem o consumo de amido durante o estresse e aumentam a demanda desse carboidrato durante a oxigenação da raiz (Perata e Voesenek, 2007; Loreti et al., 2018). Porém, nesta pesquisa, não se pôde confirmar se essas reservas de amido foram consumidas durante a reparação da maquinaria bioquímica foliar. Por outro lado, acúmulo de proteínas e aminoácidos poderia ser atribuído à inibição do crescimento da planta.

Em resposta a seis dias de alagamento, raízes e folhas de ambos os clones acumularam altas concentrações de prolina. Este resultado em raízes é explicado pelo fato de ser o primeiro órgão a perceber as condições adversas de alagamento e, maior capacidade de sintetizar prolina pode estar relacionada a um maior nível de tolerância (Argamasilla et al., 2013). Por outro lado, altas concentrações de prolina foliar em genótipos de citrus foram associadas a uma baixa tolerância ao alagamento do solo (Arbona et al., 2008). Sabe-se que o acúmulo de prolina é a primeira resposta de plantas submetidas a uma variedade de estresses ambientais (Jarzyniak e Jasinski, 2014). A prolina é um bom indicador na percepção do estresse por salinidade (Sannazzaro et al., 2007); em seca, a acumulação de prolina ajuda a reduzir o potencial osmótico, e por sua vez o potencial hídrico da folha, que faz que as plantas sustentem o aparelho fotossintético, mantendo melhor hidratação dos órgãos e manutenção da pressão de turgência (Kandowangko et al., 2009; Chun et al., 2018). Possivelmente, o rápido aumento de prolina em plantas dos clones de *C. canephora* seja uma resposta ao déficit hídrico ocasionado pelo alagamento e não como um indicador de sensibilidade, portanto, esse aumento de prolina pode estar envolvido em várias estratégias de tolerância similares às que ocorrem em estresse por déficit hídrico.

Durante o período de aplicação do estresse, folhas dos clones não mostraram relação direta entre a quantidade de ACC e a produção de etileno. Concentração de ACC foliar aumentou apenas em plantas do clone 120 no fim do alagamento, mas sem registro de efeitos foliares visíveis (epinastia, senescência e abscisão foliar). Nas raízes do clone 109A, observou-se marcante relação entre a quantidade de ACC e produção de etileno; apenas no clone 120 se registrou um aumento tardio de ACC radicular. Provavelmente, o acúmulo mais inicial de ACC em raízes está vinculado com maiores danos oxidativos em folhas do clone 109A após o final do período de alagamento. Por outro lado, manutenção nas concentrações de MeJA e putrescina em folhas e raízes, assim como concentrações inalteradas de ABA foliar, parece ser uma tendência comum nos dois clones, independentemente dos níveis de tolerância. No entanto, raízes de ambos os clones mostraram reduções de JA, fato que pode ser considerado uma resposta ao estresse oxidativo através da modulação da biossíntese de compostos antioxidantes (Guo et al., 2012). Em *Arabidopsis thaliana* os níveis de JA diminuíram durante o alagamento, mas com rápidos aumentos na reoxigenação das raízes, sendo associado com a diminuição do dano oxidativo (Yuan et al., 2017).

A SOD é usualmente considerada a primeira linha de defesa contra as ERO, catalisando a dismutação do superóxido em oxigênio e  $H_2O_2$ , enquanto CAT e APX são as mais importantes enzimas envolvidas na regulação intracelular de  $H_2O_2$  (Gill e Tuteja, 2010). Folhas dos dois clones sob estresse não mostraram aumentos na atividade das enzimas GR e CAT, apenas aumentos de APX no clone 120 parece atuar na remoção de  $H_2O_2$  formado durante o estresse. Provavelmente, a pouca resposta do metabolismo antioxidativo foliar esteja relacionada com a ausência de danos por estresse oxidativo aos quatro e seis dias após aplicação do alagamento, fato verificado nos valores inalterados de concentração de clorofilas ( $a + b$ ), EE e MDA. Apesar de não se ter evidenciado sintomas de dano oxidativo foliar durante a aplicação do alagamento, sugere-se que houve fotoinibição crônica da fotossíntese, a julgar-se pelos menores valores de  $F_v/F_m$  aos seis dias de estresse.

Por outro lado, raízes dos dois clones mostraram incremento na atividade de SOD, provavelmente aumentando a produção de  $H_2O_2$  (Hossain et al., 2009). O declínio da atividade de CAT nas raízes dos clones pode ser devido à redução da taxa de conversão de proteína (Sharma et al., 2012) ou pelo acúmulo de  $H_2O_2$  catalisado pela SOD. Registre-se que  $H_2O_2$  pode reagir com os íons de metais de transição ( $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ) da SOD, produzindo radical hidroxila, fato reportado num genótipo de citrus tolerante ao

alagamento (Arbona et al., 2008). Contudo, alta atividade de APX nas raízes dos clones pode ser responsável de converter o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  junto com a regeneração de  $NADP^+$ . Durante o alagamento, raízes dos clones não mostraram aumentos de MDA; não obstante, as raízes apresentaram uma coloração escura, sendo mais visível nas raízes do clone 109A, possivelmente essa cor seja um indicador de danos por acumulação de compostos fermentativos formados no processo respiratório.

#### *Recuperação das plantas estressadas pelo alagamento*

Os danos ocasionados pelo alagamento foram evidentes durante a fase de recuperação (após drenagem do excesso de água), com sinais de desidratação foliar nos 15 primeiros dias de recuperação; não obstante, plantas do clone 120 foram capazes de manter melhor hidratação (potenciais hídricos menos negativos). A redução da condutância hidráulica e absorção de água pelos canais de aquaporina podem ser afetadas pela acidificação citoplasmática, ocasionada por aumentos na concentração de  $CO_2$ , conforme observado em *Arabidopsis thaliana* (Holbrook e Zwieniecki, 2003; Tournaire-Roux et al., 2003; Aroca et al., 2011), ou por fatores como a falta de energia metabólica e acúmulo de compostos tóxicos, tais como etanol, acetaldeído ou ácido láctico (Else et al., 2001; Irfan et al., 2010). Ademais, nesta etapa os dois clones registraram alta EUA, porém com reduções significativas de  $A$ ,  $g_s$  e  $C_i$ , particularmente o clone 109A. Isso pode ter comprometido sua sobrevivência, tal como ocorreu num genótipo de citrus sensível ao alagamento (Arbona et al. 2009). Registre-se que ambos os clones tiveram a capacidade de recuperar os potenciais hídricos no fim da recuperação, mas recuperaram sua condutância hidráulica, fato que pode explicar a menor  $g_s$  (correlação positiva entre condutância hidráulica e  $g_s$   $r=0.60$ ,  $p=0.00$ ).

Na fase de recuperação, somente no clone 109A foram observadas reduções consistentes em  $A$ ,  $C_i$ ,  $F_v/F_m$ , TTE e  $V_{cmax}$ . Diante do exposto, sugere-se que a maquinaria fotossintética do clone 109A foi comprometida progressivamente durante o estresse, severamente afetada nos primeiros 15 dias de recuperação, mas apenas com pequenas melhoras no fim da recuperação. Por outro lado, verificou-se a recuperação da maquinaria fotossintética em plantas do clone 120 através da reversão dos parâmetros de  $A$ ,  $F_v/F_m$  e TTE aos níveis das plantas-controle, mas com limitações estomáticas que reduziram a concentração interna de  $CO_2$  no fim da recuperação. Aos 15 dias de recuperação, folhas do clone 120 mostraram aumento de NPQ, mas  $q_P$  permaneceu inalterado. Isso indica que a dissipação de energia pode ter ocorrido através da emissão de calor nas antenas e outros processos não fotoquímicos (Golan et al., 2004; López-Climent et al., 2007). Então, no



clone 120, um gradiente de prótons na cadeia de elétrons fotossintéticos pode ter contribuído na dissipação de excesso de energia luminosa não usada na fixação de CO<sub>2</sub>, para evitar o dano oxidativo. Nessa mesma fase, apenas no clone 109A registrou-se aumento significativo de NPQ correlacionado com a diminuição de  $A$ , mas com diminuições significativas de  $q_P$  e TTE; desse modo, mecanismos de dissipação foram induzidos principalmente nas antenas, devido à impossibilidade de manter um fluxo elétrons, tal como ocorreu em um genótipo de citrus sensível ao alagamento (Arbona et al., 2009).

Sintomas visíveis de dano oxidativo foliar acarretados pelo estresse ocorreram durante a fase de recuperação, registrando-se marcantes aumentos de EE, clorose e abscisão foliar em plantas do clone 109A, fato relativamente comum em plantas lenhosas sob alagamento (Bertolde et al., 2012). A principal causa do estresse oxidativo é a incapacidade do sistema em eliminar os tóxicos radicais de oxigênio devido ao aumento da formação de ERO ou à diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (Chugh et al., 2011). Aumentos de EE indicam danos às membranas celulares ligados aos processos de senescência foliar e estresse oxidativo (Prochazkova et al., 2001; Campos et al., 2003). A maior magnitude da clorose foliar pode ser promovida por aumentos na concentração de ERO, que podem oxidar os pigmentos fotossintéticos (Drew, 1997). Presumivelmente, parte de o incremento de abscisão foliar foi estimulada pela alta concentração de ACC nas raízes, acompanhada por um concomitante incremento de etileno nas folhas (Salazar et al., 2015; Ali e Kim, 2018). Observações semelhantes foram relatados em genótipos de citrus e abacate sensíveis a pequenos períodos de alagamento, os quais mostraram maiores concentrações de ACC em raízes, associada à oxidação de ACC em etileno foliar (Gómez-Cadena et al., 1996; Gil et al., 2009).

Adicionalmente, no clone 120 sob condições de alagamento, foi observado um acúmulo tardio de ACC nas raízes, sem detecção de etileno foliar nas plantas-controle e plantas previamente estressadas. Isso, em conjunto com aumentos na expressão da enzima APX em folhas e completa recuperação da fotossíntese aos 40 dias fim do alagamento, permitiram melhor proteção contra o dano oxidativo foliar. Como consequência, o clone 120 exibiu maior porcentagem de sobrevivência e maior taxa de crescimento relativo de área foliar em relação ao clone 109A. Saliente-se que maior taxa de crescimento de área foliar é um bom indicador de tolerância, reportado em plantas de araticum (*Annona glabra* L.) (Mielke et al., 2005).

## Conclusão

Os dois clones de *C. canephora* exibiram rápidas respostas ao alagamento do solo e as diferenças maiores entre os clones ocorreram na fase de recuperação; não obstante, sugere-se que os dois clones são sensíveis aos efeitos de alagamento, por três motivos: (i) a condutância hidráulica foi afetada drasticamente, mesmo que sob período de alagamento e a recuperação; (ii) seis dias de alagamento induziram rápidas quedas na taxa de fotossíntese líquida e condutância estomática, além de esgotamento de açúcares em raízes, parâmetros importantes na tolerância de plantas lenhosas ao alagamento; e (iii) o alagamento induziu uma rápida perda de desempenho da maquinaria fotossintética dos clones, começando com uma redução na eficiência dos complexos de captação de luz que pode levar a um sobrefluxo de elétrons no sistema fotossintético; ademais, a maquinaria bioquímica do clone 109A foi severamente afetada após fim do alagamento, comprometendo o fornecimento de produtos fotossintéticos durante a expressão do dano oxidativo.

Com efeito, o clone 120 foi mais tolerante a seis dias de alagamento ao mostrar (i) menor desidratação foliar, retardo na queda de fotossíntese líquida e maior eficiência do uso da água nos períodos críticos do estresse; (ii) outros mecanismos como o ajuste do fluxo de elétron fotossintético e dissipação de excesso de energia realizada por meio dos processos não fotoquímico (NPQ) permitiram reduzir o dano oxidativo após fim do alagamento; e (iii) possivelmente a menor redução de área foliar registrada durante a drenagem do solo seria efeito de um acúmulo tardio de ACC nas raízes. Ademais, houve pouca diferença do sistema antioxidante entre os dois clones, então, pode-se concluir que o melhor desempenho do clone 120, durante o alagamento, possivelmente não esteja associado com o metabolismo antioxidante, mas com outras estratégias acima mencionadas. Por outro lado, não se descarta que o clone 120 tenha tido um metabolismo antioxidante mais robusto na fase de recuperação, a julgar-se pela menor extensão de dano oxidativo (menor EE) e maior taxa de crescimento de área foliar.

## Referências

- Ali S, Kim WC** (2018) Plant growth promotion under water: decrease of waterlogging-induced ACC and ethylene levels by ACC deaminase-producing bacteria. *Front Microbiol* **9**: 1–12.
- Antunes WC, Pompelli MF, Carretero DM, DaMatta FM** (2008) Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*). *Ann Appl Biol* **153**: 33–40.
- Araki H, Hossain MA, Takahashi T** (2012) Waterlogging and hypoxia have permanent effects on wheat root growth and respiration. *J Agron Crop Sci* **198**: 264–275.
- Arbona V, Hossain Z, López-Climent MF, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A** (2008) Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol Plant* **132**: 452–466.
- Arbona V, López-Climent MF, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A** (2009) Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Environ Exp Bot* **66**: 135–142.
- Argamasilla R, Gómez-Cadenas A, Arbona V** (2014) Metabolic and regulatory responses in citrus rootstocks in response to adverse environmental conditions. *J Plant Growth Regul* **33**: 169–180.
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM** (2012) Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot* **63**: 43–57.
- Atkinson CJ, Harrison-Murray RS, Taylor JM** (2008) Rapid flood-induced stomatal closure accompanies xylem sap transportation of root-derived acetaldehyde and ethanol in *Forsythia*. *Environ Exp Bot* **64**: 196–205.
- Ayi Q, Zeng B, Liu J, Li S, Van Bodegom PM, Cornelissen JHC** (2016) Oxygen absorption by adventitious roots promotes the survival of completely submerged terrestrial plants. *Ann Bot* **118**: 675–683.
- Bailey-Serres J, Chang R** (2005) Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. *Ann Bot* **96**: 507–518.
- Bailey-Serres J, Colmer TD** (2014) Plant tolerance of flooding stress-recent advances. *Plant Cell Environ* **37**: 2211–2215.
- Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voisenek LACJ, van Dongen JT** (2012) Making sense of low oxygen sensing. *Trends Plant Sci* **17**: 129–138.

- Bailey-Serres J, Mittler R** (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* **141**: 311.
- Barrett-Lennard EG, Leighton PD, Buwalda F, Gibbs J, Armstrong W, Thomson CJ, Greenway H** (1988) Effects of growing wheat in hypoxic nutrient solutions and of subsequent transfer to aerated solutions. I. Growth and carbohydrate status of shoots and roots. *Aust J Plant Physiol* **15**: 585–598.
- Bertolde FZ, Almeida AF, Pirovani CP, Gomes FP, Ahnert D, Baligar VC, Valle RR** (2012) Physiological and biochemical responses of *Theobroma cacao* L. genotypes to flooding. *Photosynthetica* **50**: 447–457.
- Black K, Davis P, McGrath J, Doherty P, Osborne B** (2005) Interactive effects of irradiance and water availability on the photosynthetic performance of *Picea sitchensis* seedlings: implications for seedling establishment under different management practices. *Ann For Sci* **62**: 413–422.
- Bradford KJ, Yang SF** (1980) Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. *Plant Physiol.* **65**: 322–326.
- Brandle R, Crawford RMM** (1987) Rhizome anoxia tolerance and habitat specialization in wetland plants. In: Crawford RMM (Ed.), *Plant in of life aquatic and amphibious habitats*. Blackwell Scientific Publications: 397–410.
- Bunn C, Läderach P, Ovalle RO, Kirschke D** (2015) A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Clim Change* **129**: 89–101.
- Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA** (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J Plant Physiol* **160**: 283–292.
- Chugh V, Kaur N, Gupta AK** (2001) Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. *Indian J. Biochem. Bio* **48**: 47–53.
- Chun SC, Paramasivan M, Chandrasekaran M** (2018) Proline accumulation influenced osmotic stress in arbuscular mycorrhizal symbiotic plants. *Front Microbiol* **9**: 1– 13.
- Crawford RM** (1982) Physiological responses to flooding. In: Pirsonand M, Zimmermann H (Eds), *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag: 453–477.

- DaMatta FM, Cochicho Ramalho JD** (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Braz J Plant Physiol* **18**: 55–81.
- Davanso VM, Souza LA, Medri ME, Pimenta JA, Bianchini E** (2002) Photosynthesis, growth and development of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. (Bignoniaceae) in flooded soil. *Braz Arch Biol Tech* **45**: 375-384.
- De Kauwe MG, Lin YS, Wright IJ, Medlyn BE, Kristine Y et al.** (2016) A test of the ‘one-point method’ for estimating maximum carboxylation capacity from field-measured, light-saturated photosynthesis. *New Phytol* **210**: 1130-1144.
- Dias PC, Araújo WL, Moraes GA, Barros SR, DaMatta FM** (2007) Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. *J Plant Physiol* **164**: 1639–1647.
- Drew MC** (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 223–250.
- Else MA, Coupland D, Dutton L, Jackson MB** (2001) Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiol Plant* **111**: 46–54.
- Else MA, Janowiak F, Atkinson CJ, Jackson MB** (2009) Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. *Ann Bot* **103**: 313–323.
- Ferner E, Rennenberg H, Kreuzwieser J** (2012) Effect of flooding on C metabolism of flood-tolerant (*Quercus robur*) and non-tolerant (*Fagus sylvatica*) tree species. *Tree Physiol* **32**: 135–145.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H** (2008) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* **31**: 602–621.
- Fukao T, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM** (2019) Submergence and waterlogging stress in plants: A review highlighting research opportunities and understudied aspects. *Front Plant Sci* **10**: 1–24.
- Gay C, Estrada F, Conde C, Eakin H, Villers L** (2006) Potential impacts of climate change on agriculture: a case of study of coffee production in Veracruz, Mexico. *Clim Change* **79**: 259–288.
- Gibbs J, Greenway H** (2003) Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Funct Plant Biol* **30**: 1–47.

- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**: 909–930.
- Gil PM, Gurovich L, Schaffer B, Garcia N, Iturriaga R** (2009) Electrical signaling, stomatal conductance, ABA and ethylene content in avocado trees in response to root hypoxia. *Plant Signal Behav* **4**:100–108.
- Gómez-Cadenas A, Tadeo FR, Talón M, Primo M** (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol* **112**:401–408.
- Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratão PL, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo AR** (2006) Antioxidante metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* **65**: 1330-1337.
- Golan T, Li X, Müller-Moulé P, Niyogi KK** (2004) Using mutants to understand light stress acclimation in plants. In: Papageorgiou, GC, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer: 525–554.
- Guo J, Pang Q, Wang L, Yu P, Li N, Yan X** (2012) Proteomic identification of MYC2-dependent jasmonate-regulated proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proteome Sci* **10**: 1–13.
- Heath RL, Packer L** (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I- Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch of Biochem and Biophys* **125**: 189-198.
- 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.
- Holbrook NM, Zwieniecki MA** (2003) Plant biology: water gate. *Nature* **425**: 361.
- Hossain Z, López-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A** (2009) Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *J Plant Physiol* **166**: 1391–1404.
- Hossain A, Uddin SN** (2011) Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: Morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Aust J Crop Sci* **5**: 1094–1101.
- Irfan M, Hayat S, Hayat Q, Afroz S, Ahmad A** (2010) Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma* **241**: 3–17.
- Islam MA, MacDonald SE, Zwiazek JJ** (2003) Responses of black spruce (*Picea*

- mariana*) and tamarack (*Larix laricina*) to flooding and ethylene. *Tree Physiol* **23**: 545–552.
- Jackson MB, Colmer TD** (2005) Response and adaptation by plants to flooding stress. *Ann Bot* **96**: 501–505.
- Jarzyniak KM, Jasinski M** (2014) Membrane transporters and drought resistance – a complex issue. *Front Plant Sci* **5**: 1– 15.
- Kandowanko NY, Suryatmana G, Nurlaeny N, Simanungkalit R D M** (2009) Proline and abscisic acid content in droughted corn plant inoculated with *Azospirillum* sp. and arbuscular mycorrhizae fungi. *Hayati J Biosci.* **16**: 15–20.
- Kozlowski TT** (1984) Plant responses to flooding of soil. *BioScience* **34**: 162–167.
- Kreuzwieser J, Papadopoulou E, Rennenberg H** (2004) Interaction of flooding with carbon metabolism of trees. *Plant Biol* **6**: 299–306.
- Kreuzwieser J, Rennenberg H** (2014) Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. *Plant, Cell Environ* **37**: 2245–2259.
- Kuai J, Chen Y, Wang Y, Meng Y, Chen B, Zhao W, Zhou Z** (2016) Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism and the quality of fiber in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Front Plant Sci* **7**: 1–14.
- LeProvost G, Sulmon C, Frigerio JM, Bodénès C, Kremer A, Plomion C** (2012) Role of waterlogging-responsive genes in shaping interspecific differentiation between two sympatric oak species. *Tree Physiol* **32**: 119– 134.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME** (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* **47**: 239–247.
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* **148**: 350–382.
- Logan BA, Kornyejev D, Hardison J, Holaday AS** (2006) The role of antioxidant enzymes in photoprotection. *Photosynth Res* **88**:119–32.
- López-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A** (2007) Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environ Exp Bot* **62**: 176–184.
- Loreti E, Valeri MC, Novi G, Perata P** (2017) Gene regulation and survival under hypoxia requires starch availability and metabolism. *Plant Physiol* **176**: 1286–

1298.

**Malik AI, Colmer TD, Lambers H, Schortemeyer M** (2001) Changes in physiological and morphological traits of roots and shoots of wheat in response to different depths of waterlogging. *Aust J Plant Physiol* **28**: 1121–1131.

**Martins SC, Araújo WL, Tohge T, Fernie AR, DaMatta FM** (2014) In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. *PLoS ONE* **9**, 1–11.

**Martins SC, Galmés J, Molins A, DaMatta FM** (2013) Improving the estimation of mesophyll conductance: on the role of electron transport rate correction and respiration. *J Exp Bot* **64**: 3285–3298.

**Maxwell K, Johnson GN**. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* **51**: 659–668.

**Mielke MS, De Almeida AAF, Gomes FP, Aguiar MAG, Mangabeira PAO** (2003) Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. *Environ Exp Bot* **50**: 221–231.

**Mielke MS, Matos EM, Couto VB, De Almeida A-AF, Gomes FP, Oliveira Mangabeira PA** (2005) Some photosynthetic and growth responses of *Annona glabra* L. seedlings to soil flooding. *Acta Bot Bras* **19**: 905–911.

**Mutava RN, Prince SJK, Syed NH, Song L, Valliyodan B, Chen W, Nguyen HT** (2015) Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: a comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. *Plant Physiol Biochem* **86**: 109–120.

**Müller M, Munné-Bosch S, Pan X, Welti R, Wang X, Dun E, Brewer P, Beveridge C, Davies P, Ross J, et al** (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Meth* **7**: 37.

**Nicolás E, Torrecillas A, Dell’Amico J, Alarcón JJ** (2005) The effect of short-term flooding on the sap flow, gas exchange and hydraulic conductivity of young apricot trees. *Trees* **19**: 51–57.

**Niinemets Ü, Cescatti A, Rodeghiero M, Tosens T** (2006) Complex adjustments of photosynthetic potentials and internal diffusion conductance to current and previous light availabilities and leaf age in Mediterranean evergreen species *Quercus ilex*. *Plant Cell Environ* **29**: 1159–1178.

**Olmo-Vega A, García-Sánchez F, Simón-Grao S, Simón I, Lidón V, Nieves M,**



- Martínez-Nicolás JJ** (2017) Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions. *Sci Hort* **224**: 171–179.
- Ouyang W, Struik PC, Yin X, Yang J** (2017) Stomatal conductance, mesophyll conductance, and transpiration efficiency in relation to leaf anatomy in rice and wheat genotypes under drought. *J Exp Bot* **68**: 5191–5205.
- Perata P, Voeselek LACJ** (2007) Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends Plant Sci* **12**: 43–46.
- Pezeshki SR** (2001) Wetland plant responses to soil flooding. *Environ Exp Bot* **46**: 299–312.
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME** (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci* **167**: 1307–1314.
- Plaut Z, Mayoral ML, Reinhold L** (1987) Effect of altered sink: source ratio on photosynthetic metabolism of source leaves. *Plant Physiol* **85**: 786–91.
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Maria MA, Cordeiro AT** (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environ Exp Bot* **56**: 263–273.
- Ronchi CP, DaMatta FM, Batista KD, Moraes GABK, Loureiro ME, Ducatti C** (2006) Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. *Funct Plant Biol* **33**: 1013–1023.
- Rodríguez-Gamir J, Ancillo G, González-Mas MC, Primo-Millo E, Iglesias DJ, Forner-Giner MA** (2011) Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. *Plant Physiol Biochem* **49**: 636–645.
- Ruiz-Sánchez MC, Domingo R, Morales D, Torrecillas A** (1996) Water relations of Fino lemon plants on two rootstocks under flooded conditions. *Plant Sci* **120**: 119–125.
- Sairam RK, Dharmar K, Chinnusamy V, Meena RC** (2009) Waterlogging-induced increase in sugar mobilization, fermentation, and related gene expression in the roots of mung bean (*Vigna radiata*). *J Plant Physiol* **166**: 602–616.
- Salazar C, Hernandez C, Pino MT** (2015) Plant water stress: Associations between ethylene and abscisic acid response. *Chil J Agric Res* **75**: 71–79.
- Sannazzaro A I, Echeverria M, Alberto E O, Ruiz OA, Menendez, AB** (2007).

Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol Biochem* **45**, 39–46.

**Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessaraki M** (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot* **ID**: 217037.

**Sasidharan R, Bailey-Serres J, Ashikari M, Atwell BJ, Colmer TD, Fagerstedt K, Fukao T, Geigenberger P, Hebelstrup KH, Hill RD, et al** (2017) Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. *New Phytol* **214**: 1403–1407.

**Sauter M** (2013) Root responses to flooding. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 282–286.

**Silva PEM, Cavatte PC, Morais LE, Medina EF, DaMatta FM** (2013) The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: implications for breeding aimed at improving drought tolerance. *Environ Exp Bot* **87**: 49–57.

**Silveira HRO, Souza KRD, Alves JD, Santos MO, Andrade CA, Bomfim SC** (2015) Gas exchange and carbohydrate partitioning in coffee seedlings under waterlogging. *Ciênc Agrotecnol* **39**: 138–146.

**Steudle E, Peterson CA** (1998) How does water get through roots? *J Exp Bot* **49**: 775–788.

**Takahashi H, Yamauchi T, Colmer TD, Nakazono M** (2014) Aerenchyma formation in plants. *Plant cell monogr* **21**: 247–265.

**Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C** (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**: 393–397.

**Van de Poel B, Van Der Straeten D** (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene!. *Front Plant Sci* **5**: 1–11.

**Vanderstraeten L, Van Der Straeten D** (2017) Accumulation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: current status, considerations for future research and agronomic applications. *Front Plant Sci* **5**: 1–18.

**Valentini R, Epron D, Angelis P, Matteucci G, Dreyer E** (1995) In situ estimation of net CO<sub>2</sub> 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**: 631–640.

- Voesenek LACJ, Bailey-Serres J** (2013) Flooding tolerance: O<sub>2</sub> sensing and survival strategies. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 647–653.
- Wilson KB, Baldocchi DD, Hanson PJ** (2000) Spatial and seasonal variability of photosynthetic parameters and their relationship to leaf nitrogen in a deciduous forest. *Tree Physiol* **20**: 565–578.
- Yetisir H, Çaliskan ME, Soylu S, Sakar M** (2006) Some physiological and growth responses of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai] grafted onto *Lagenaria siceraria* to flooding. *Environ Exp Bot* **58**: 1–8.
- Yuan LB, Dai YS, Xie LJ, Yu LJ, Zhou Y, Lai YX, Yang YC, Xu L, Chen QF, Xiao S** (2017) Jasmonate regulates plant responses to postsubmergence reoxygenation through transcriptional activation of antioxidant synthesis. *Plant Physiol* **173**: 1864–1880.
- Zanandrea I, Alves JD, Deuner S, Goulart PDFP, Henrique PDC, Silveira NM** (2009) Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. *Aust J Bot* **57**: 661–666.

## Tabelas

**Tabela 1.** Coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) entre a taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ) e vários parâmetros: condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), rendimento máximo de fluorescência em folhas adaptadas à escuridão ( $F_v/F_m$ ), taxa de transporte de elétrons (TTE), coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) e coeficiente de extinção fotoquímico ( $q_p$ ) obtidos em folhas de dois clones de *C. canephora* (Experimento 2). Os dados foram obtidos aos 2, 4 e 6 dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo. Os dados de recuperação foram obtidos aos 15 e 40 dias após fim do alagamento. Na recuperação, valor de  $n$  corresponde às plantas que sobreviveram à aplicação dos tratamentos de irrigação.

|                       | Alagamento |                   | Recuperação |                   |
|-----------------------|------------|-------------------|-------------|-------------------|
|                       | $r$        | $p$ -valor        | $r$         | $p$ -valor        |
| <i>A</i> vs $g_s$     |            |                   |             |                   |
| Clone 120             | 0.81       | 0.00 ( $n = 36$ ) | 0.75        | 0.00 ( $n = 23$ ) |
| Clone 109A            | 0.85       | 0.00 ( $n = 36$ ) | 0.88        | 0.00 ( $n = 21$ ) |
| <i>A</i> vs $C_i$     |            |                   |             |                   |
| Clone 120             | 0.10       | 0.56 ( $n = 36$ ) | 0.76        | 0.00 ( $n = 23$ ) |
| Clone 109A            | -0.13      | 0.49 ( $n = 36$ ) | 0.81        | 0.00 ( $n = 21$ ) |
| <i>A</i> vs $F_v/F_m$ |            |                   |             |                   |
| Clone 120             | 0.42       | 0.01 ( $n = 36$ ) | 0.44        | 0.03 ( $n = 23$ ) |
| Clone 109A            | 0.57       | 0.00 ( $n = 36$ ) | 0.49        | 0.02 ( $n = 21$ ) |
| <i>A</i> vs TTE       |            |                   |             |                   |
| Clone 120             | 0.72       | 0.00 ( $n = 36$ ) | 0.67        | 0.01 ( $n = 23$ ) |
| Clone 109A            | 0.92       | 0.00 ( $n = 36$ ) | 0.87        | 0.00 ( $n = 21$ ) |
| <i>A</i> vs NPQ       |            |                   |             |                   |
| Clone 120             | -0.63      | 0.00 ( $n = 36$ ) | -0.41       | 0.06 ( $n = 23$ ) |
| Clone 109A            | -0.29      | 0.17 ( $n = 36$ ) | -0.61       | 0.01 ( $n = 21$ ) |
| <i>A</i> vs $q_p$     |            |                   |             |                   |
| Clone 120             | 0.55       | 0.01 ( $n = 36$ ) | 0.38        | 0.07 ( $n = 23$ ) |
| Clone 109A            | 0.87       | 0.00 ( $n = 36$ ) | 0.78        | 0.00 ( $n = 21$ ) |

**Tabela 2.** Concentrações de clorofilas (*a + b*) em folhas de dois clones de *C. canephora* aos 4 e 6 dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2).

| Dias | Clorofilas         | Clone 120             |             | Clone 109A   |             |
|------|--------------------|-----------------------|-------------|--------------|-------------|
|      |                    | Controle              | Alagado     | Controle     | Alagado     |
|      |                    | mg.g <sup>-1</sup> MS |             |              |             |
| 4    | Clorofila <i>a</i> | 3.60±0.40 b           | 3.82±0.32 b | 5.77±0.54 a  | 5.57±0.64 a |
|      | Clorofila <i>b</i> | 1.49±0.08 b           | 1.57±0.05 b | 2.00±0.12 a  | 1.98±0.15 a |
|      | <i>a + b</i>       | 5.10±0.46 b           | 5.39±0.38 b | 7.78± 0.66 a | 7.56±0.79 a |
| 6    | Clorofila <i>a</i> | 4.80±0.40 a           | 5.14±0.54 a | 5.95±0.47 a  | 5.84±0.51 a |
|      | Clorofila <i>b</i> | 1.64±0.07 a           | 1.80±0.12 a | 1.92±0.12 a  | 1.97±0.08 a |
|      | <i>a + b</i>       | 6.44±0.46 a           | 6.94±0.66 a | 7.87±0.60 a  | 7.81±0.60 a |

Quando presente, asterisco indica diferença significativa (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre clones dentro de um mesmo tratamento de irrigação. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ .

**Tabela 3.** Condutância hidráulica da planta inteira de dois clones de *C. canephora*. Os dados foram obtidos aos 2, 4 e 6 dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 3). Subsequentemente, o excesso de água foi drenado e os dados foram, então, obtidos aos 15 e 40 dias de recuperação do estresse.

| Dias | Clone 120   |              | Clone 109A  |              |
|------|---|--------------|-------------|--------------|
|      | Controle  | Alagado      | Controle    | Alagado      |
|      | mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> MPa <sup>-1</sup> |              |             |              |
| 2    | 1.05±0.06 a   | 0.75±0.08 a* | 1.10±0.12 a | 0.73±0.07 a* |
| 4    | 1.27±0.18 a   | 0.63±0.07 a* | 1.56±0.16 a | 0.66±0.08 a* |
| 6    | 1.70±0.15 a   | 0.64±0.12 a* | 1.80±0.11 a | 0.60±0.09 a* |
| 15   | 1.44±0.08 b   | 0.38±0.08 a* | 1.78±0.11 a | 0.49±0.06 a* |
| 40   | 1.43±0.07 a   | 0.69±0.09 a* | 1.39±0.17 a | 0.66±0.07 a* |

Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre clones dentro de um mesmo tratamento de irrigação. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ . Aos 40 dias de recuperação, média±erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 6$ ; clone 109A,  $n = 4$ ).

**Tabela 4.** Transpiração da planta inteira de dois clones de *C. canephora*. Os dados foram obtidos aos 2, 4 e 6 dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 3). Subsequentemente, o excesso de água foi drenado e os dados foram, então, obtidos aos 15 e 40 dias de recuperação do estresse.

| Dias | Clone 120                                       |              | Clone 109A  |              |
|------|---|--------------|-------------|--------------|
|      | Controle  | Alagado      | Controle    | Alagado      |
|      | $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ |              |             |              |
| 2    | 0.55±0.06 a                                     | 0.49±0.07 a  | 0.62±0.04 a | 0.39±0.04 a* |
| 4    | 0.63±0.06 a                                     | 0.44±0.07 a* | 0.68±0.05 a | 0.44±0.06 a* |
| 6    | 0.68±0.04 a                                     | 0.47±0.06 a* | 0.68±0.06 a | 0.34±0.05 a* |
| 15   | 0.97±0.04 a                                     | 0.34±0.07 a* | 1.06±0.05 a | 0.39±0.06 a* |
| 40   | 0.96±0.04 a                                     | 0.39±0.05 a* | 0.99±0.07 a | 0.47±0.05 a* |

Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre clones dentro de um mesmo tratamento de irrigação. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ . Aos 40 dias de recuperação, média±erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 6$ ; clone 109A,  $n = 4$ ).

**Tabela 5.** Taxa de crescimento relativo de área foliar em plantas de dois clones de *C. canephora*. Os dados foram obtidos nos “dias após recuperação” (DAR) de plantas previamente estressadas durante seis dias de alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 3).

| DAR     | Clone 120                                    |                | Clone 109A    |                |
|---------|--|----------------|---------------|----------------|
|         | Controle                                     | Alagado        | Controle      | Alagado        |
|         | $\text{m}^2 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ |                |               |                |
| 0 - 15  | 0.0077±0.0005                                | 0.0053±0.0004* | 0.0096±0.0019 | 0.0022±0.0009* |
| 16 - 40 | 0.0176±0.0012                                | 0.0100±0.0009* | 0.0114±0.0011 | 0.0059±0.0013* |

Asteriscos indicam diferenças significativas (Mann-Whitney,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ . No período de 16 – 40 DAR, média±erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 6$ ; clone 109A,  $n = 4$ ).

**Tabela 6.** Extravasamento de eletrólitos em folhas de dois clones de *C. canephora*. Os dados foram obtidos aos 2, 4 e 6 dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 3). Subsequentemente, o excesso de água foi drenado e os dados foram, então, obtidos aos 15 e 40 dias de recuperação do estresse.

| Dias | Clone 120   |             | Clone 109A  |              |
|------|-------------|-------------|-------------|--------------|
|      | Controle    | Alagado     | Controle    | Alagado      |
|      | %           |             |             |              |
| 2    | 6.38±0.38 a | 7.47±0.53 a | 6.32±0.18 a | 6.40±0.24 a  |
| 4    | 7.79±0.23 a | 8.73±0.51 a | 7.91±0.40 a | 7.42±0.54 a  |
| 6    | 7.01±0.35 a | 7.90±0.74 a | 6.10±0.11 a | 6.58±0.37 a  |
| 15   | 6.98±0.32 a | 7.91±0.38 a | 6.38±0.36 a | 9.95±1.31 a* |
| 40   | 6.98±0.32 a | 6.57±0.63 a | 6.38±0.36 a | 6.47±0.79 a  |

Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre clones dentro de um mesmo tratamento de irrigação. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ . Aos 40 dias de recuperação, média±erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 6$ ; clone 109A,  $n = 4$ ).

**Tabela 7.** Número de folhas cloróticas em plantas de dois clones de *C. canephora*. Os dados foram obtidos nos “dias após recuperação” (DAR) de plantas previamente estressadas durante seis dias de alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 3).

| DAR     | Clone 120 |            | Clone 109A |             |
|---------|-----------|------------|------------|-------------|
|         | Controle  | Alagado    | Controle   | Alagado     |
| 0 - 15  | 1.83±0.40 | 2.16±0.47  | 1.33±0.21  | 16.83±2.61* |
| 16 - 40 | 3.50±0.80 | 0.67±0.42* | 1.00±0.21  | 1.83±2.61   |

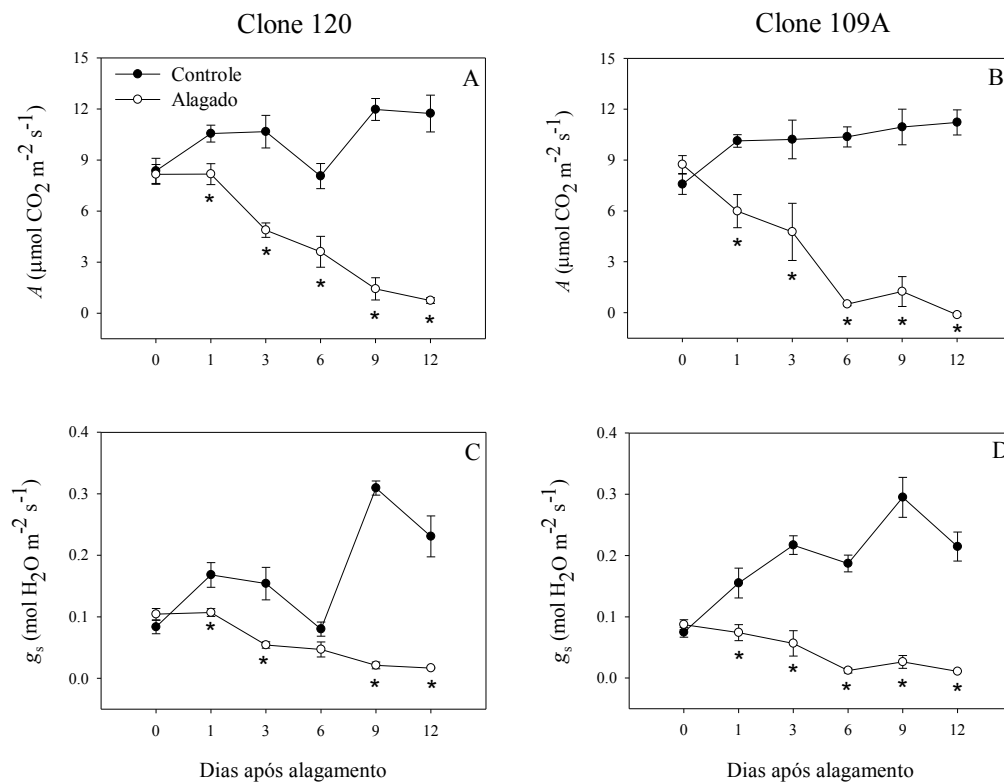
Asteriscos indicam diferenças significativas (Mann-Whitney,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ .

**Tabela 8.** Número de folhas caídas em plantas de dois clones de *C. canephora*. Os dados foram obtidos nos “dias após recuperação” (DAR) de plantas previamente estressadas durante seis dias de alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 3).

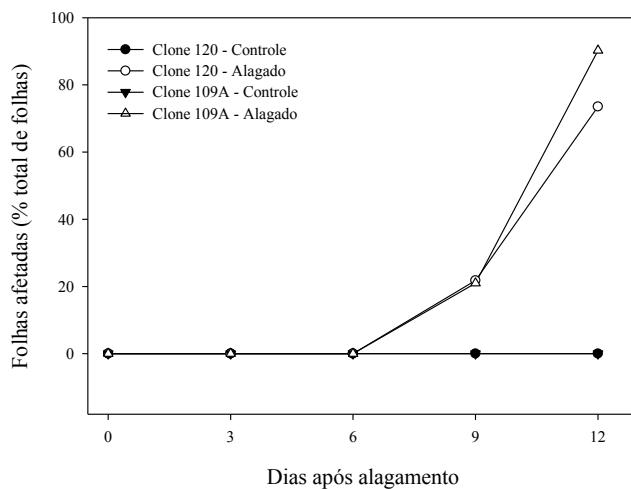
| DAR     | Clone 120 |            | Clone 109A |             |
|---------|-----------|------------|------------|-------------|
|         | Controle  | Alagado    | Controle   | Alagado     |
| 0 - 15  | 1.8±0.48  | 4.00±1.15* | 2.00±0.05  | 4.18±0.93*  |
| 16 - 40 | 0.70±0.28 | 6.00±0.81* | 2.20±0.58  | 19.20±3.10* |

Asteriscos indicam diferenças significativas (Mann-Whitney,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ .

## Figuras



**Figura 1.** Parâmetros de trocas gasosas: A-B) taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ) e C-D) condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ ) obtidos em folhas de dois clones de *C. canephora* submetidos por 12 dias de alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 1). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste  $t$ ,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 5$ .



**Figura 2.** Porcentagem de folhas de dois clones de *C. canephora* exibindo nítidos sinais de murcha e clorose em resposta aos tratamentos de irrigação (controle e alagado). As observações foram feitas aos 12 dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 1).  $n = 5$ .

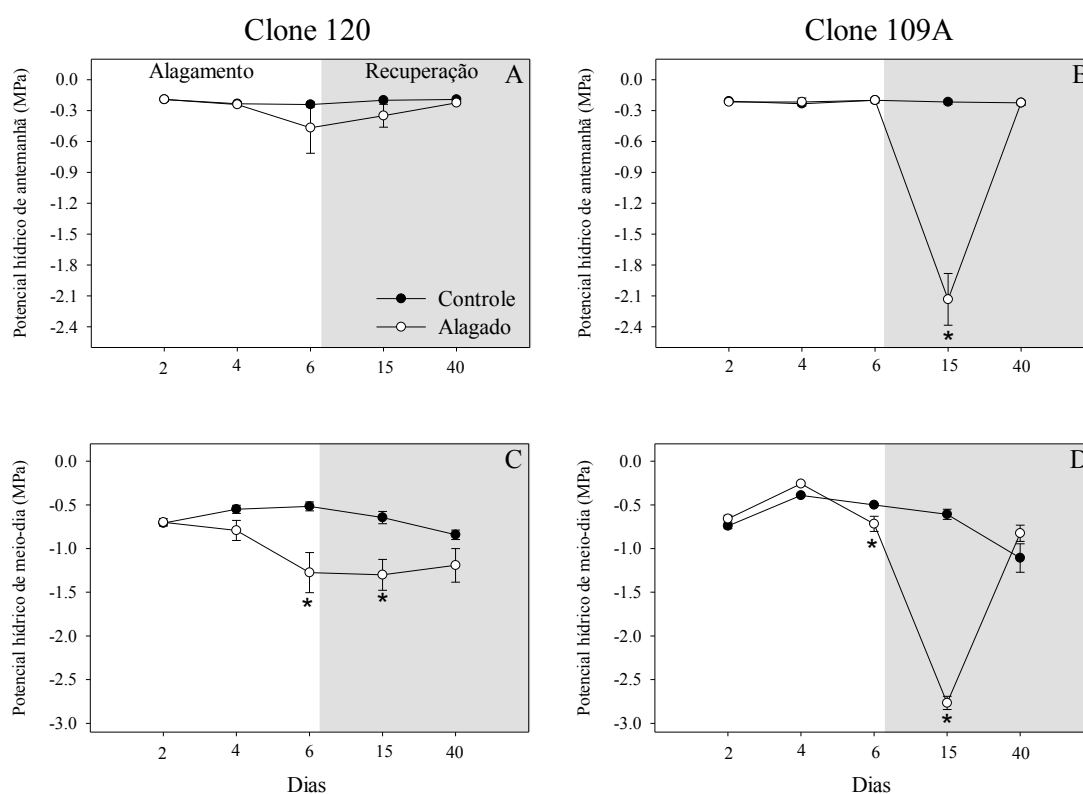




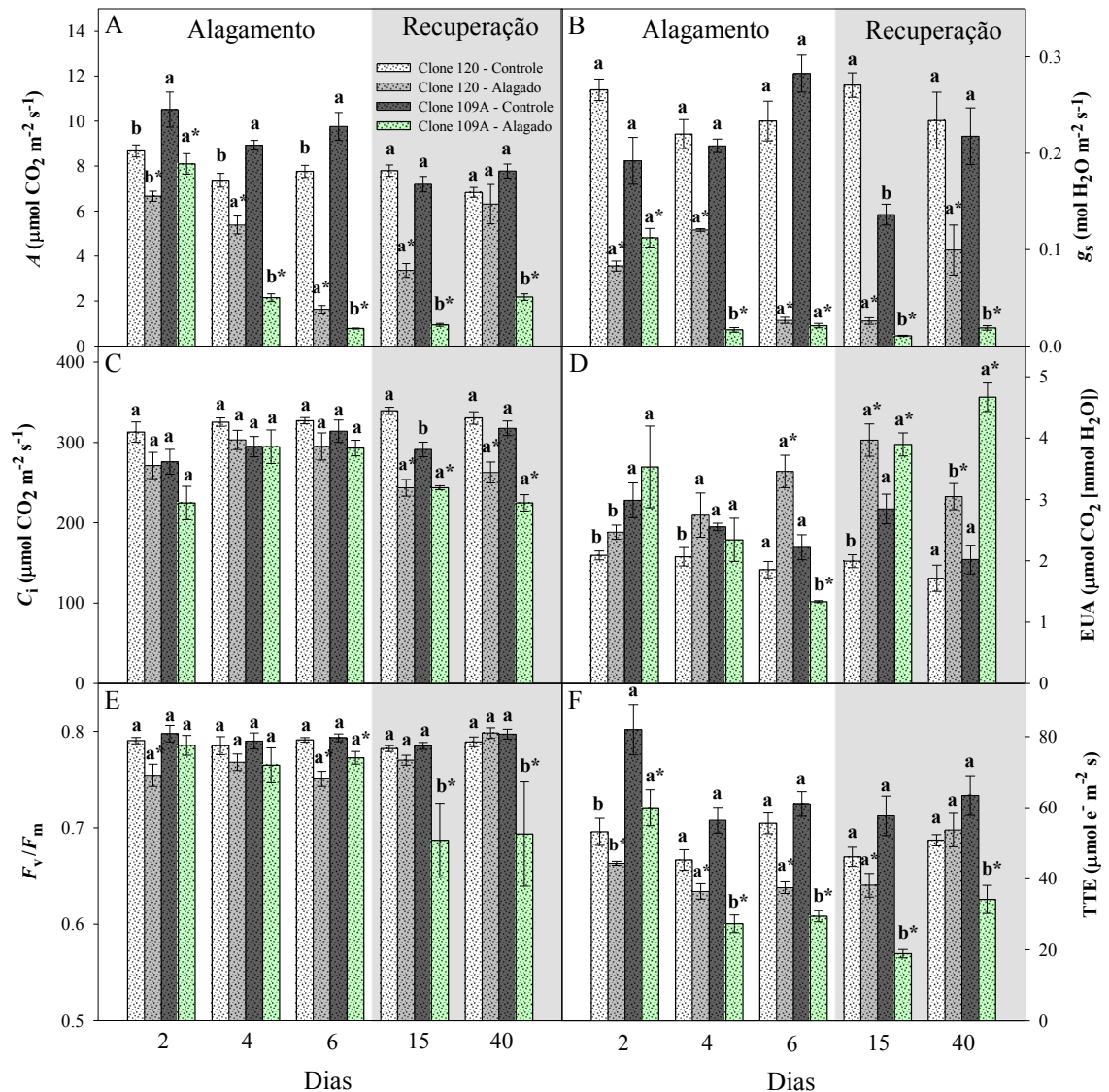
Clone 120 - Alagado

Clone 109A - Alagado

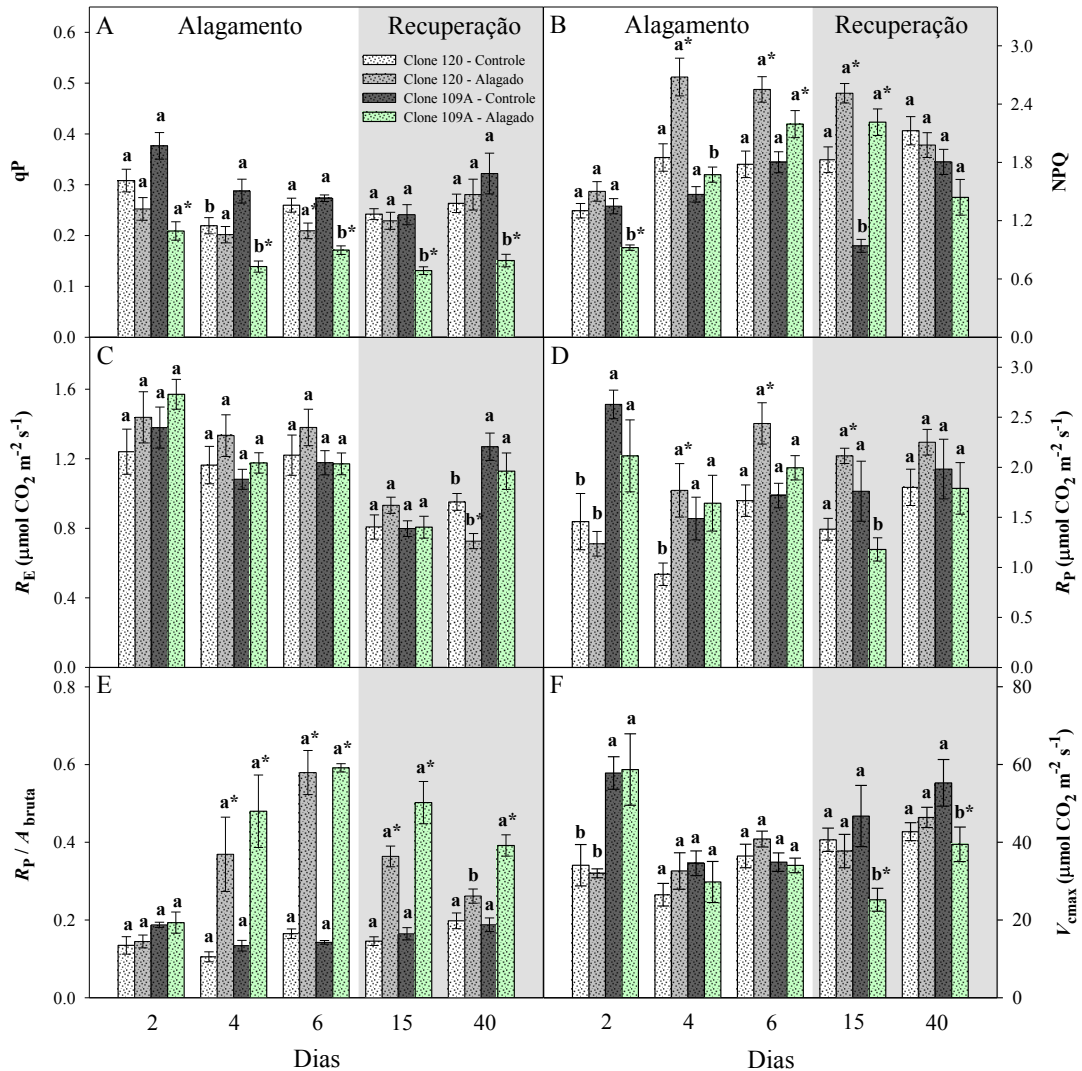
**Figura 3.** Aspecto geral das plantas de dois clones de *C. canephora* aos 12 dias após a imposição do alagamento.



**Figura 4.** Potencial hídrico foliar de antemanhã (A-B) e potencial hídrico foliar de meio-dia (C-D) de dois clones de *C. canephora* submetidos por seis dias de alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Subsequentemente, o excesso de água foi drenado e os dados foram, então, obtidos aos 15 e 40 dias de recuperação do estresse (cor cinza). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ . Aos 40 dias de recuperação, média±erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 5$ ; clone 109A,  $n = 3$ ).



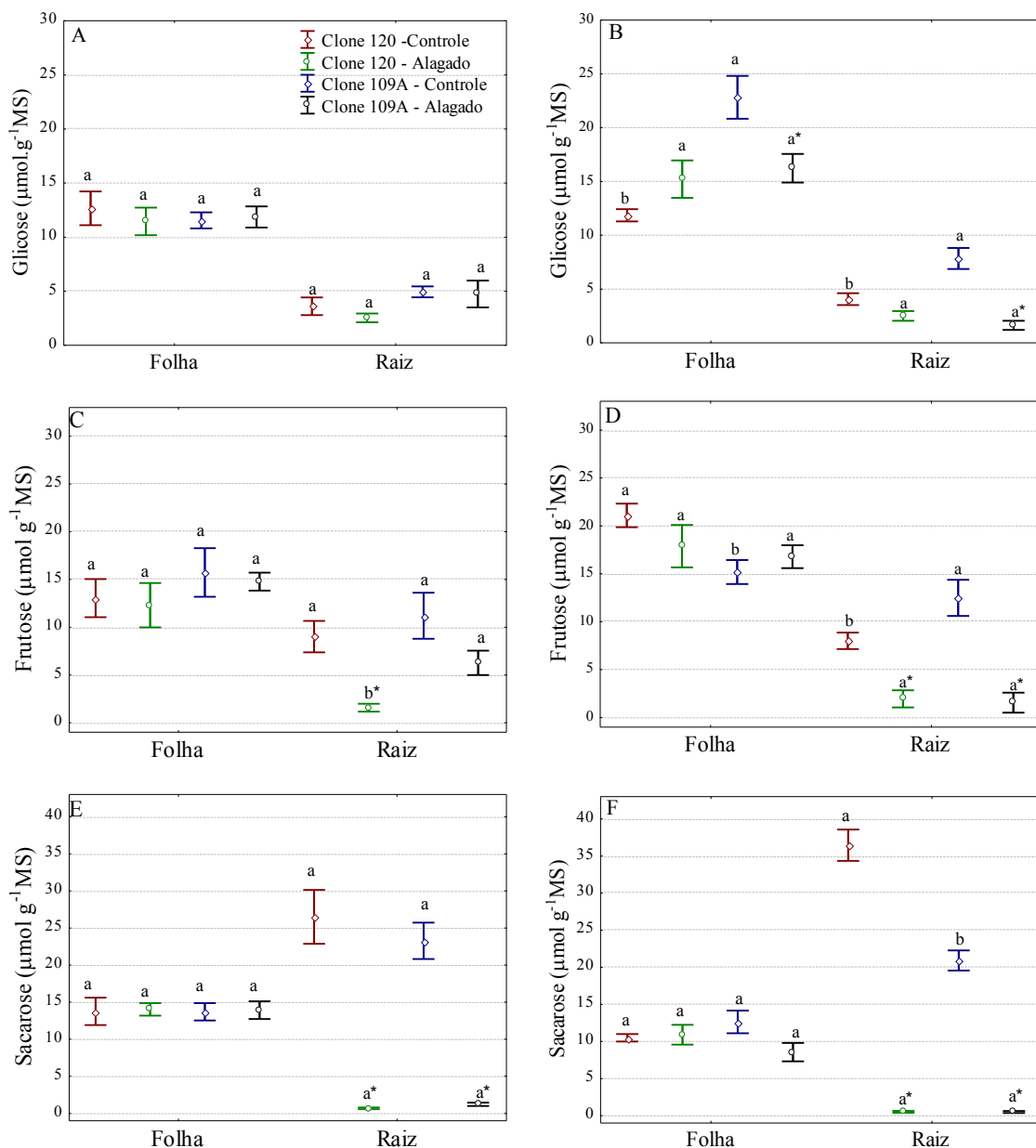
**Figura 5.** Avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*: A) taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ), B) condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ ), C) concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ), D) eficiência do uso da água (EUA), E) rendimento máximo de fluorescência em folhas adaptadas à escuridão ( $F_v/F_m$ ) e F) taxa de transporte de elétrons (TTE) obtidos em folhas de dois clones de *C. canephora* submetidos por seis dias de alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Subsequentemente, o excesso de água foi drenado e os dados foram, então, obtidos aos 15 e 40 dias de recuperação do estresse (cor cinza). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste  $t$ ,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone, em cada tempo de avaliação. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste  $t$ ,  $P \leq 0.05$ ) entre clones dentro de um mesmo tratamento de irrigação, em cada tempo de avaliação. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$ . Aos 40 dias de recuperação, média  $\pm$  erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 5$ ; clone 109A,  $n = 3$ ).



**Figura 6.** Avaliações de parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e respiração foliar: A) coeficiente de extinção fotoquímica ( $q_P$ ), B) coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ), C) taxa de respiração mitocondrial no escuro ( $R_E$ ), D) taxa fotorrespiratória da Rubisco ( $R_P$ ), E) razão fotorrespiração/ taxa de fotossíntese bruta ( $R_P/A_{bruta}$ ) e F) velocidade máxima de carboxilação ( $V_{cmax}$ ) da Rubisco numa base de concentração de  $CO_2$  no cloroplasto de folhas de dois clones de *C. canephora* submetidos por seis dias de alagamento; plantas-controlê permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Subsequentemente, o excesso de água foi drenado e os dados foram, então, obtidos aos 15 e 40 dias de recuperação do estresse (cor cinza). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone, em cada tempo de avaliação. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre clones dentro de um mesmo tratamento de irrigação, em cada tempo de avaliação. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$ . Aos 40 dias de recuperação, média  $\pm$  erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 5$ ; clone 109A,  $n = 3$ ).

Quatro dias após alagamento

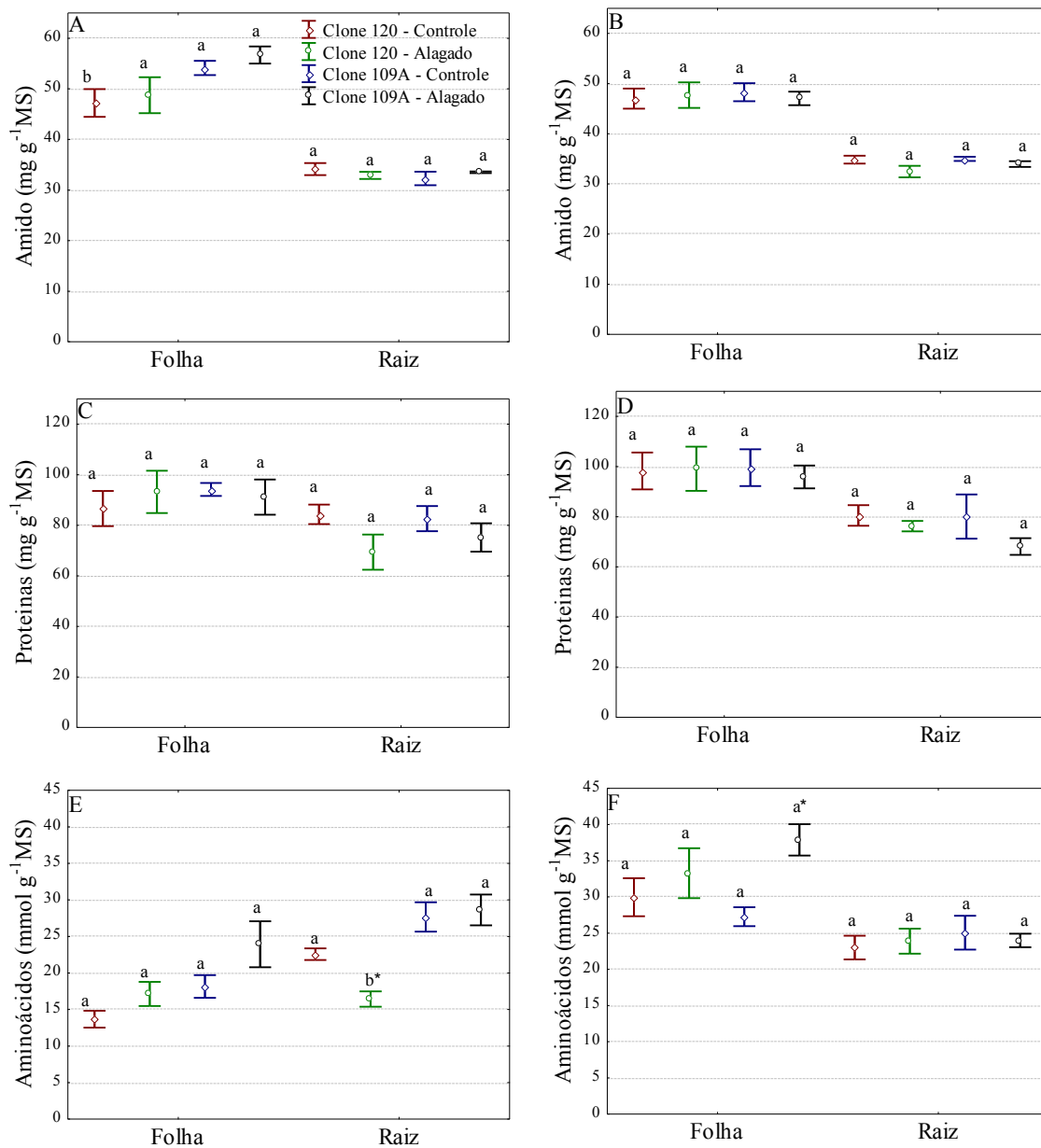
Seis dias após alagamento



**Figura 7.** Concentrações de glicose (A-B), frutose (C-D) e sacarose (E-F) em folhas e raízes de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controlé permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre clones dentro de um mesmo tratamento de irrigação. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$ .

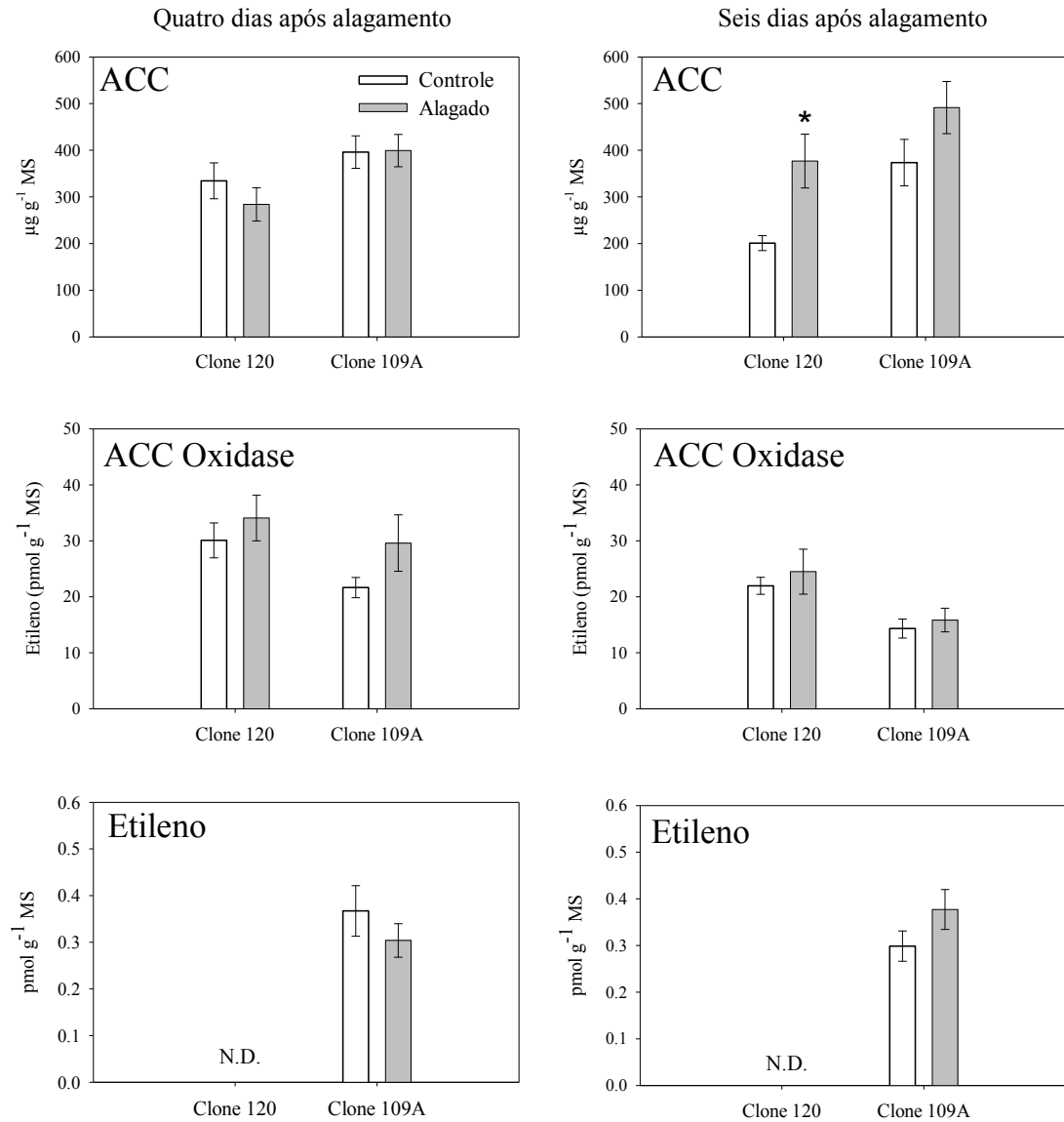
Quatro dias após alagamento

Seis dias após alagamento

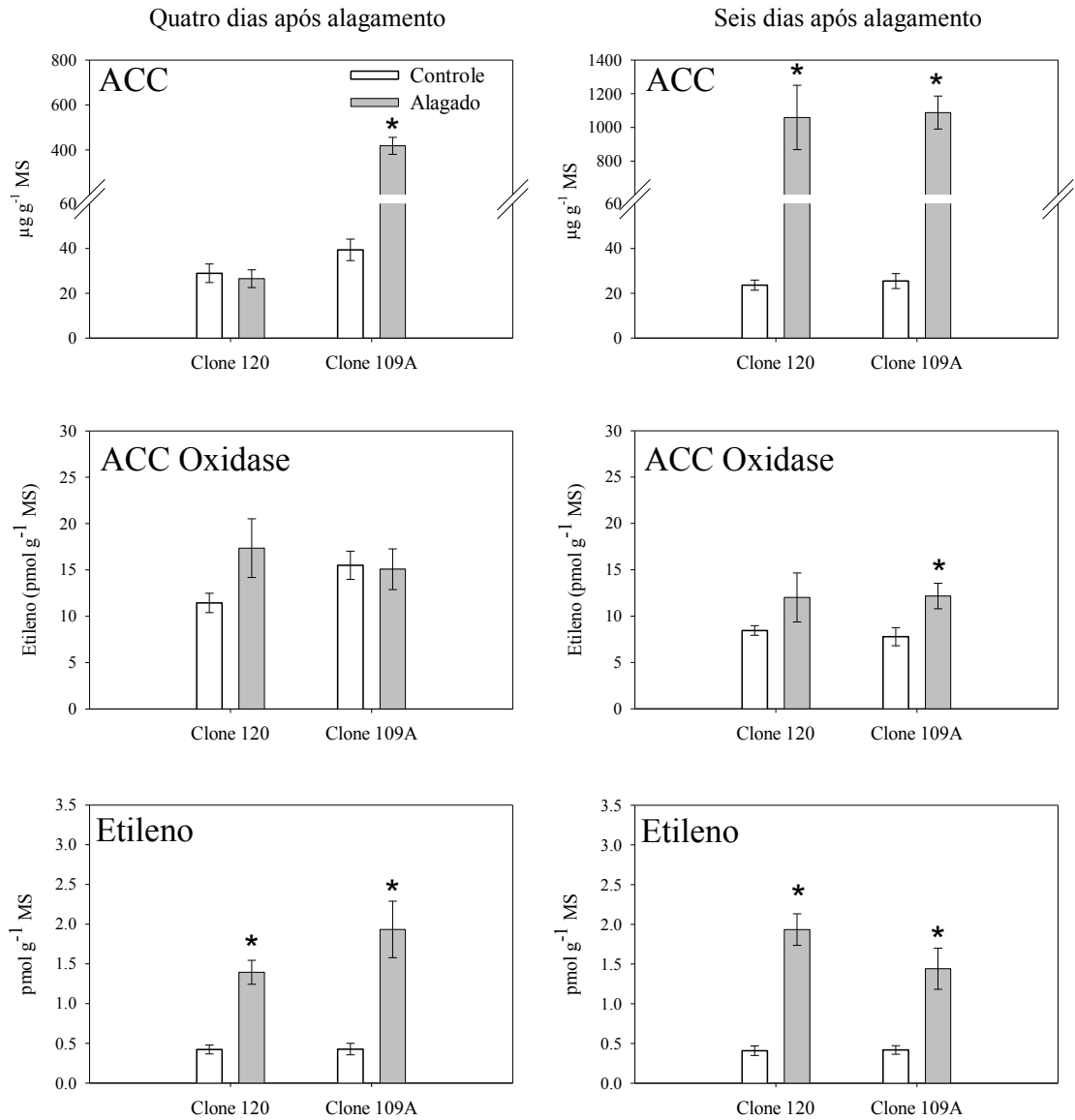


**Figura 8.** Concentrações de amido (A-B), proteínas (C-D) e aminoácidos (E-F) em folhas e raízes de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controlre permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre clones dentro de um mesmo tratamento de irrigação. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$ .



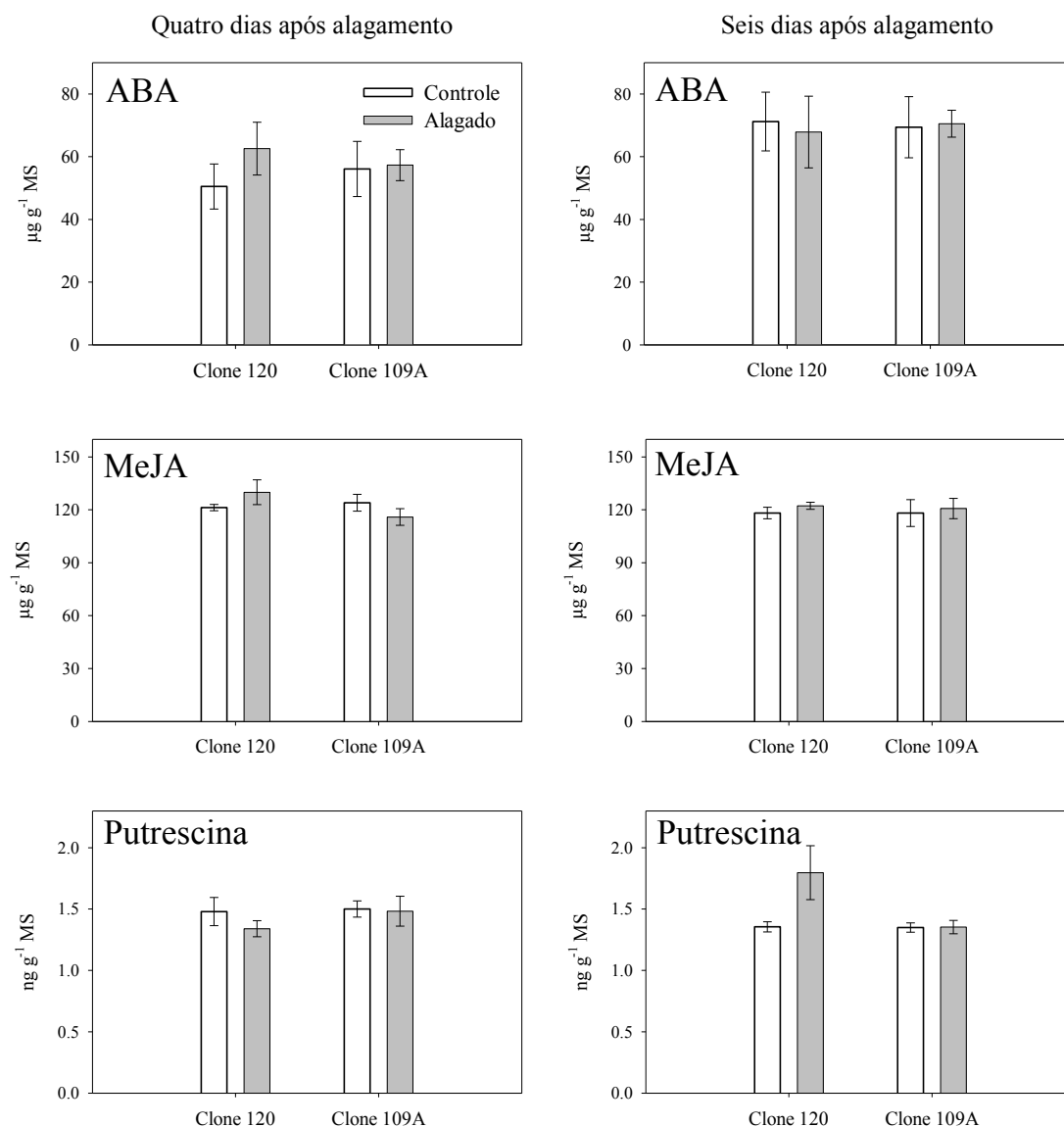


**Figura 10.** Concentração de ACC, atividade da enzima ACC oxidase e produção de etileno em folhas de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Folhas para a produção de etileno foram incubadas por 24 horas em câmara germinadora. Folhas para atividade da enzima ACC oxidase foram incubadas por 5 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas (teste  $t$ ,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 5$ . ACC = Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico. N.D. = não detectável.

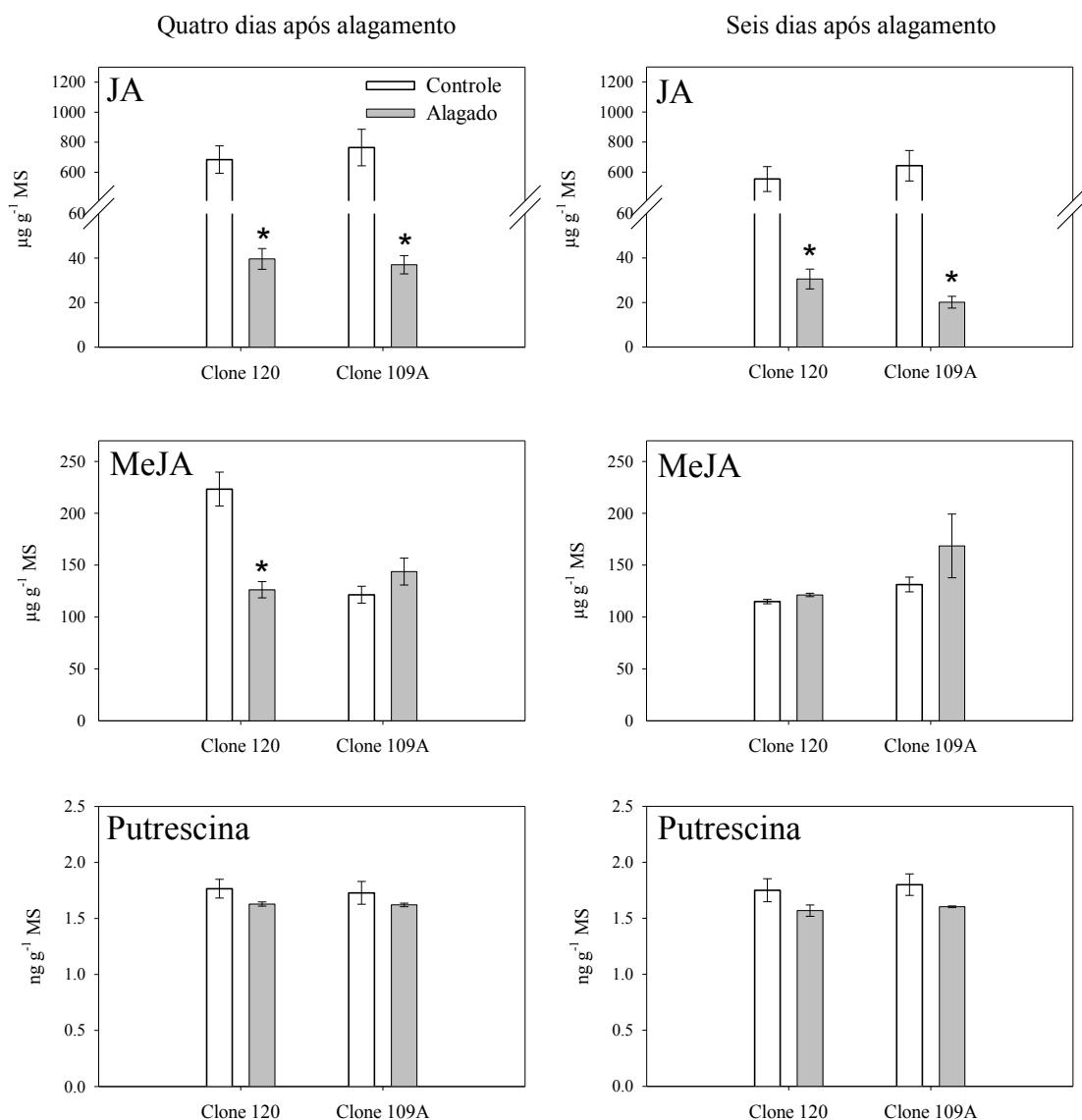


**Figura 11.** Concentração de ACC, atividade da enzima ACC oxidase e produção de etileno em raízes de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Raízes para a produção de etileno foram incubadas por 24 horas em câmara germinadora. Raízes para atividade da enzima ACC oxidase foram incubadas por 5 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 5$ . ACC = Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

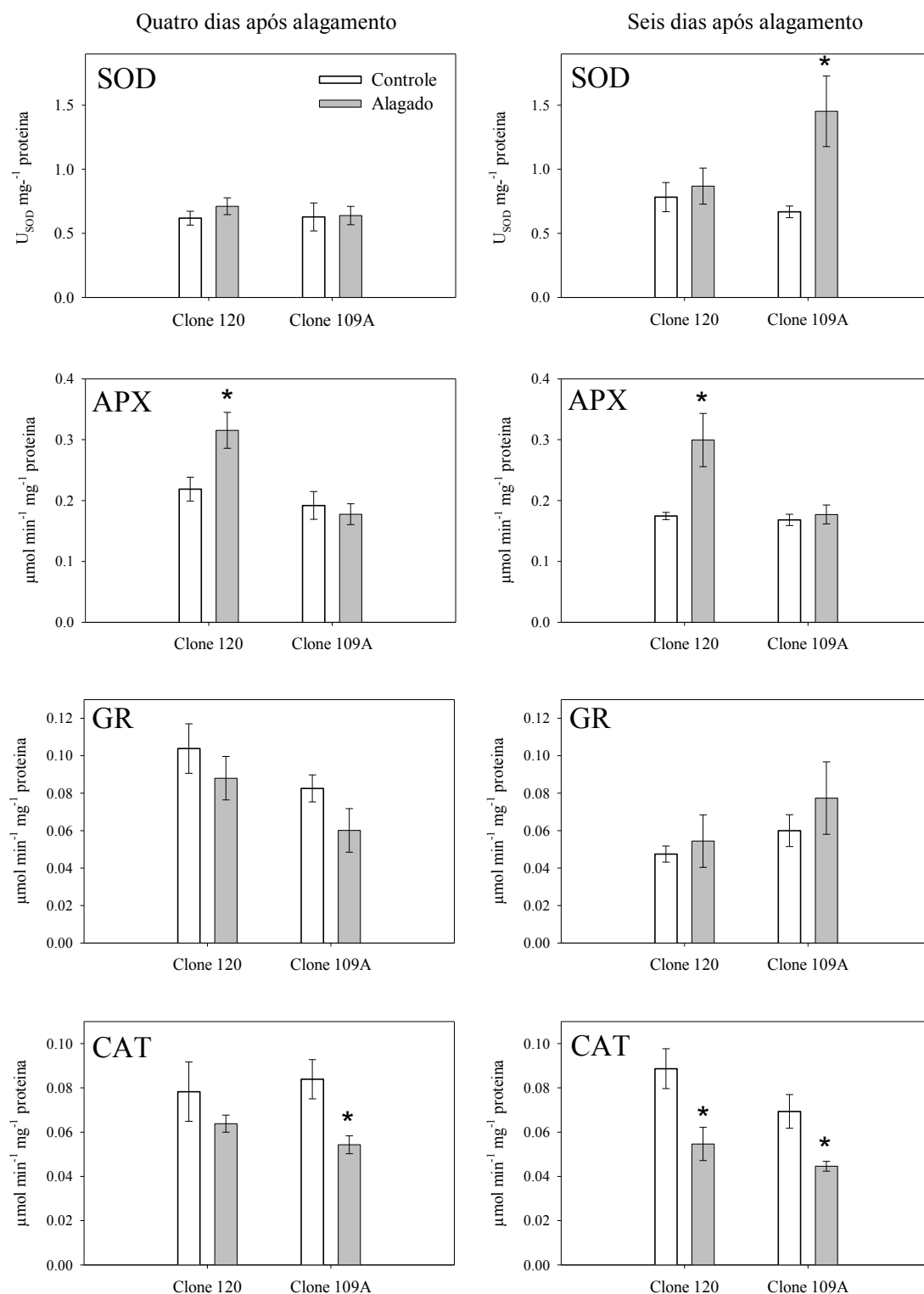




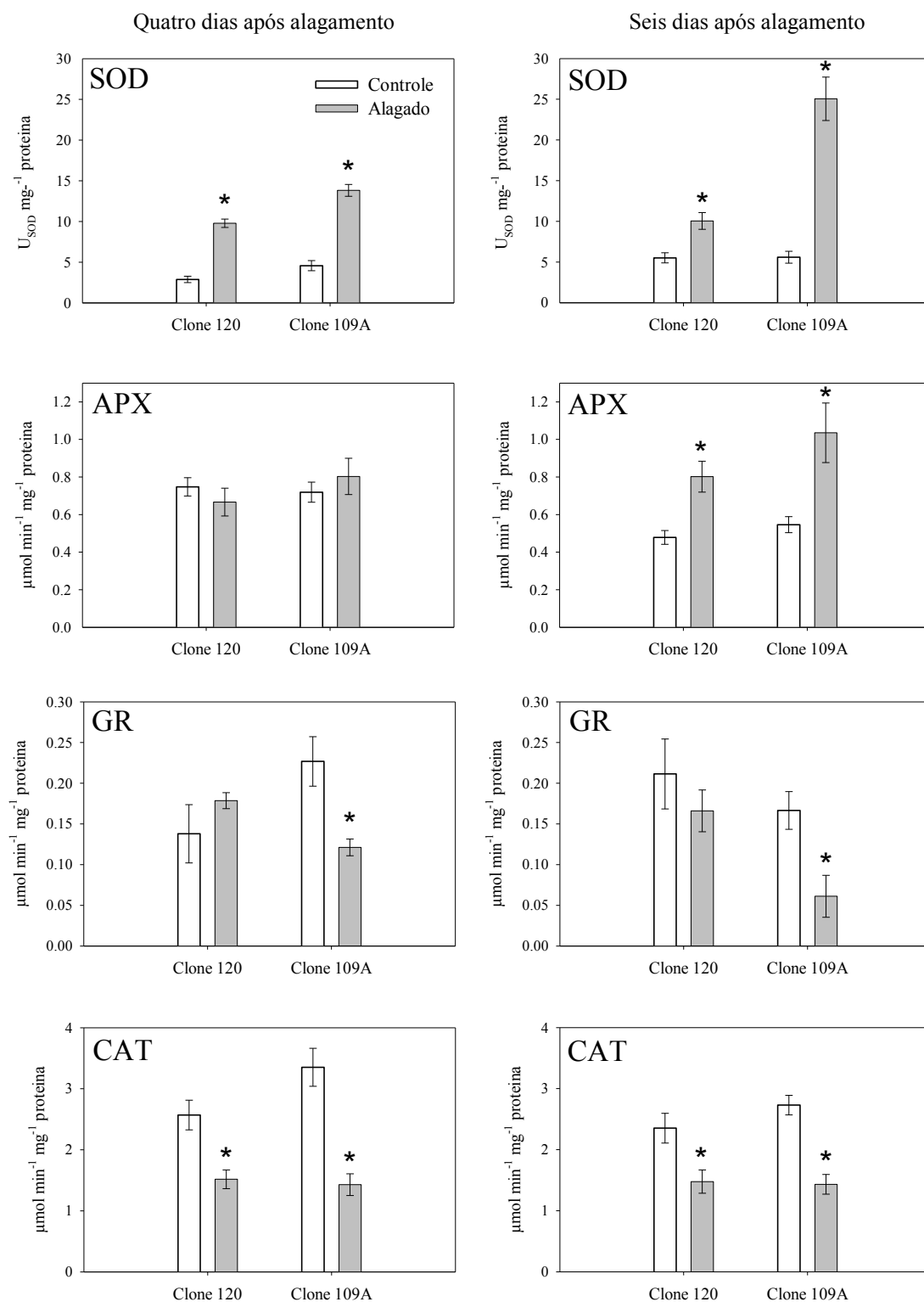
**Figura 12.** Concentrações de fitormônios em folhas de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 5$ . ABA: ácido abscísico; MeJA: metil jasmonato.



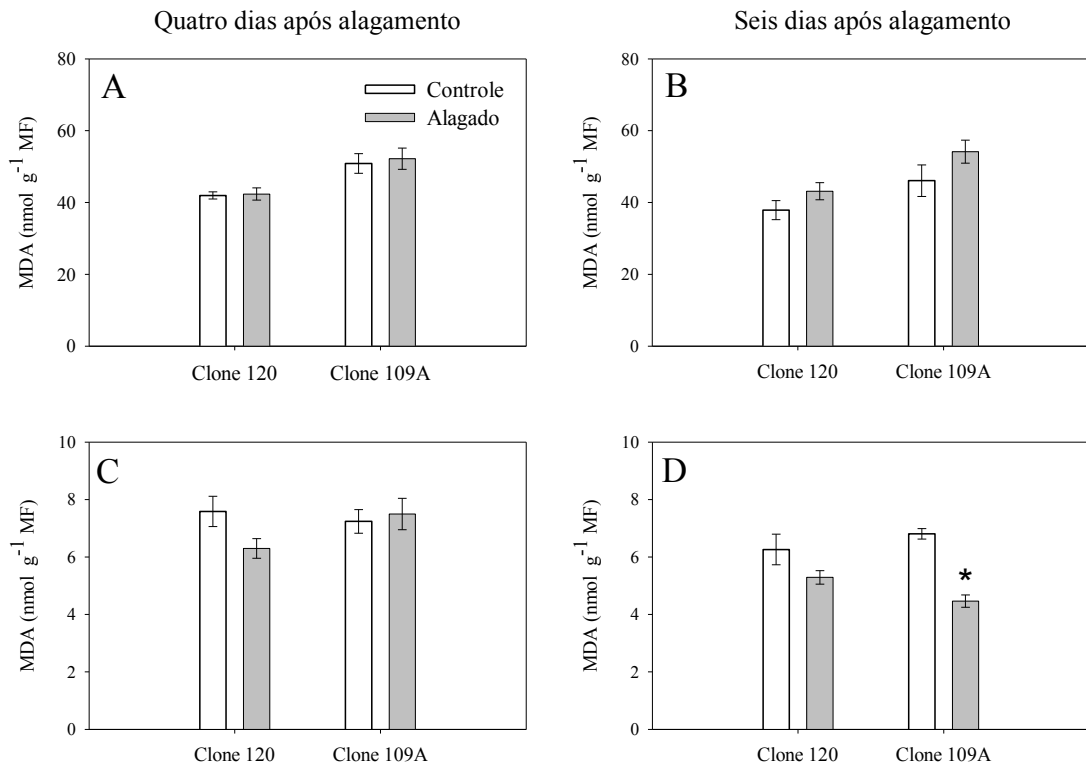
**Figura 13.** Concentrações de fitormônios em raízes de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 5$ . JA: ácido jasmônico; MeJA: metil jasmonato.



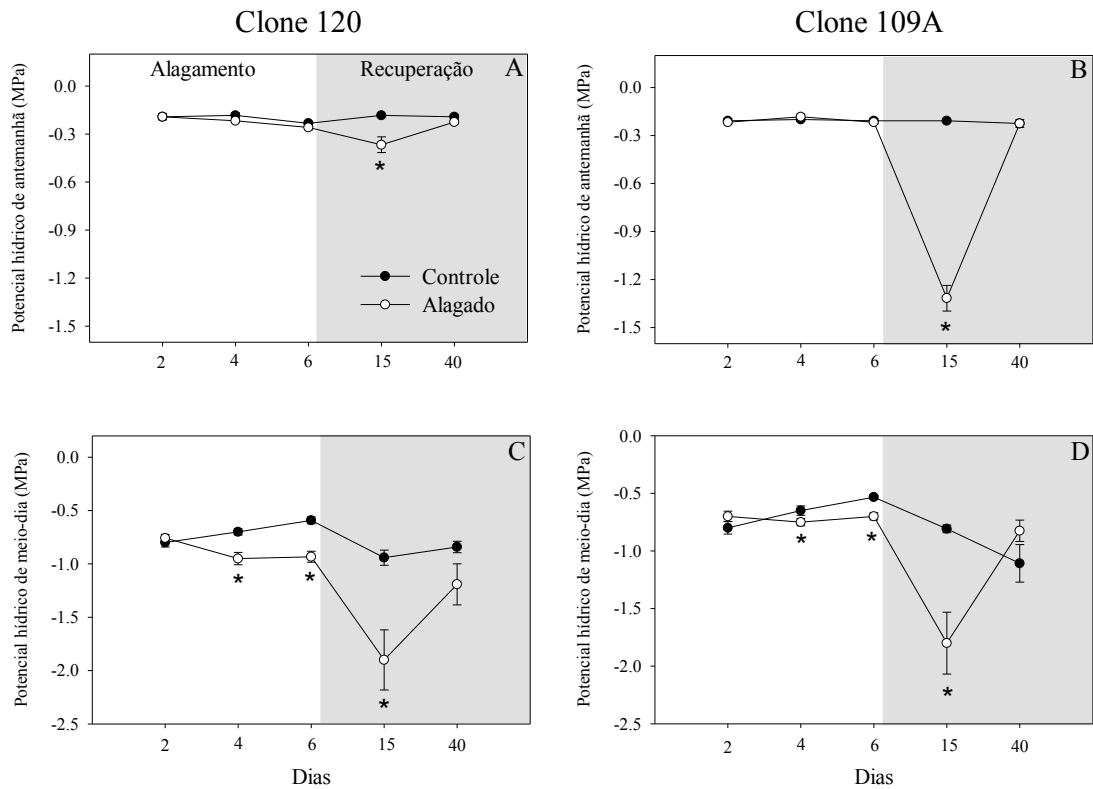
**Figura 14.** Atividade de enzimas antioxidantes em folhas de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$ . Dismutase do superóxido (SOD), Peroxidase do ascorbato (APX), Redutase da glutathione (GR) e Catalase (CAT).



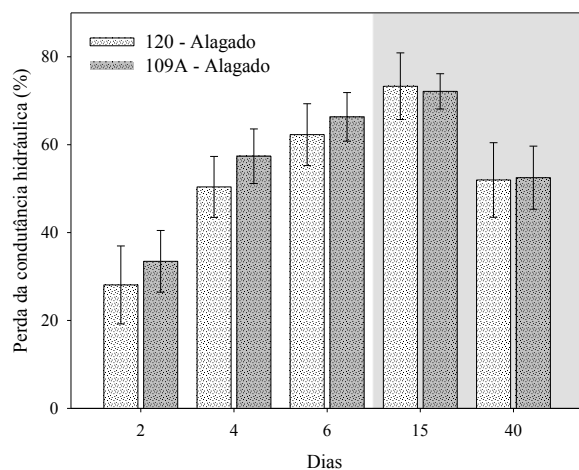
**Figura 15.** Atividade de enzimas antioxidantes em raízes de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$ . Dismutase do superóxido (SOD), Peroxidase do ascorbato (APX), Redutase da glutatona (RG) e Catalase (CAT).



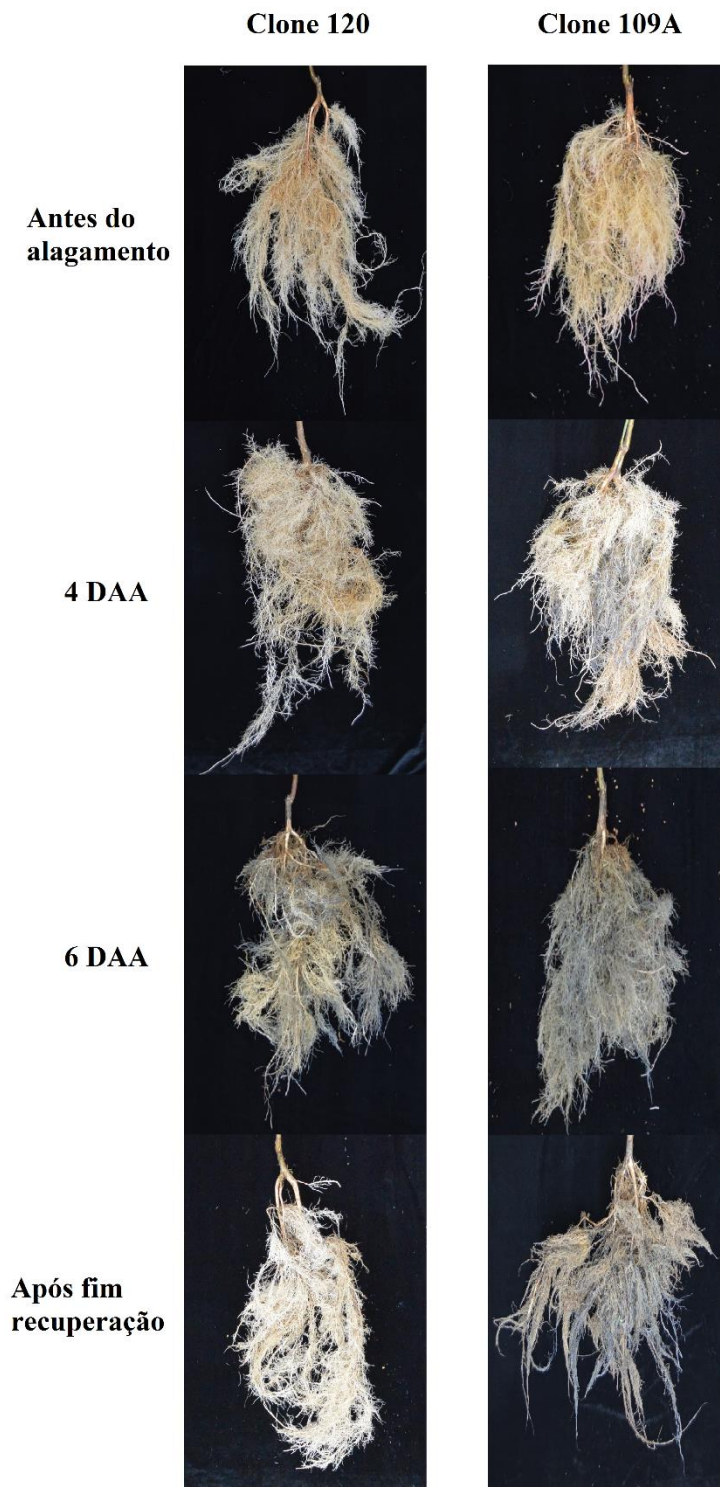
**Figura 16.** Concentração de MDA em folhas (A-B) e raízes (C-D) de dois clones de *C. canephora* aos quatro e seis dias após a imposição do alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 2). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$ . MDA = malondialdeído.



**Figura 17.** Potencial hídrico foliar de antemanhã (A-B) e potencial hídrico foliar de meio-dia (C-D) de dois clones de *C. canephora* submetidos por seis dias de alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 3). Subsequentemente, o excesso de água foi drenado e os dados foram, então, obtidos aos 15 e 40 dias de recuperação do estresse (cor cinza). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre tratamentos de irrigação para um mesmo clone. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$ . Aos 40 dias de recuperação, média  $\pm$  erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 6$ ; clone 109A,  $n = 4$ ).



**Figura 18.** Porcentagem de perda da condutância hidráulica da planta de dois *C. canephora* submetidos por seis dias de alagamento; plantas-controle permaneceram sob capacidade de campo (Experimento 3). Subsequentemente, o excesso de água foi drenado e os dados foram, então, obtidos aos 15 e 40 dias de recuperação do estresse (cor cinza). Quando presente asterisco, indica diferença significativa (teste *t*,  $P \leq 0.05$ ) entre clones sob alagamento. Cada valor representa a média±erro padrão,  $n = 6$ . Aos 40 dias de recuperação, média±erro padrão dos clones previamente alagados corresponde às plantas sobreviventes (clone 120,  $n = 6$ ; clone 109A,  $n = 4$ ).



**Figura 19.** Aspecto geral das raízes de dois *C. canephora*: antes do alagamento, aos 4 e 6 dias após aplicação do alagamento (DAA) e após fim recuperação das plantas (Experimento 2).