

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO**



Dissertação

**Respostas fisiológicas, bioquímicas e transcricionais em porta-enxertos
Prunus persica submetidos ao alagamento do solo**

Flávia Lourenço da Silva

Pelotas, 2021

Flávia Lourenço da Silva

**Respostas fisiológicas, bioquímicas e transcricionais em porta-enxertos de
Prunus persica submetidos ao alagamento do solo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Coorientadora: Dra. Elsa Kuhn Klumb

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586r Silva, Flávia Lourenço da

Respostas fisiológicas, bioquímicas e transcricionais em porta-enxertos de *Prunus persica* submetidas ao alagamento do solo / Flávia Lourenço da Silva ; Valmor João Bianchi, orientador ; Elsa Kuhn Klumb, coorientadora. — Pelotas, 2021.

117 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Pessegueiro. 2. Hipóxia. 3. Carboidratos. 4. Curto-médio prazo. 5. Enxertia. I. Bianchi, Valmor João, orient. II. Klumb, Elsa Kuhn, coorient. III. Título.

CDD : 634.25

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

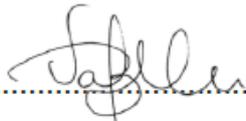
Flávia Lourenço da Silva

Respostas fisiológicas, bioquímicas e transcricionais em porta-enxertos de *Prunus persica* submetidos ao alagamento do solo

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau em Mestre em Ciências, Programa de Pós Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 03/05/2021

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Valmor João Bianchi (Orientador)

Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas



Dr. Simone Ribeiro Lucho

Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas



Prof. Dr. Luciano do Amarante

Doutor em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Rubén Almada

Doutor em Ciências, Engenharia Genética Vegetal pela Universidade de Talca, Chile

Dedico aos meus pais Carlos Rogério dos Santos da Silva e Ilga Alves Lourenço,
pelo apoio sempre prestado, por acreditarem na minha capacidade e estarem
sempre com os braços abertos diante as dificuldades e, claro, pelo amor
incondicional que sempre me foi concedido.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus, por me conceder a vida, e sempre atender as minhas orações, me guiando pelos caminhos corretos, trazendo paz e sabedoria em momentos difíceis e nas tomadas de decisões. Obrigado por permitir que eu chegue até aqui, que esteja com saúde, assim como meus entes queridos e por me dar esperanças e resiliência na busca de novos desafios. Agradeço também por colocar em meu caminho, nesta trajetória, pessoas competentes que se tornaram amigos.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PPGA), com concentração em Fruticultura de Clima Temperado, por me permitir cursar e concluir o Mestrado.

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV), por permitir que eu utilizasse as instalações para a realização do trabalho, e ao conhecimento adquirido.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos professores dos Programas de Pós Graduação (PPGA e PPGFV), pelos conhecimentos transmitidos e adquiridos no meio acadêmico.

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Valmor João Bianchi, por permitir que eu fosse sua orientada, confiar em mim e na minha capacidade. Pelos exemplos de dedicação e profissionalismo, por estar sempre presente, auxiliando e transmitindo conhecimento. Pela paciência, e agradável convivência, assim como por me incentivar, mesmo diante aos obstáculos.

À minha coorientadora Elsa Kuhn Klumb, por me ensinar o que hoje eu sei na molecular, transmitindo seu conhecimento de forma exemplar. Obrigado por estar presente na realização dos experimentos, pela paciência com esta agrônoma bruta, por estar sempre me auxiliar, principalmente diante as dificuldades, me dando apoio não somente teórico, mas emocional, e por se tornar uma amiga nesta trajetória que eu vou levar para a vida.

À Dra. Simone Ribeiro Lucho, amiga que ganhei nesta trajetória. Obrigado pela disposição em sempre ajudar, por contribuir com o trabalho, trazendo não apenas

conhecimento acadêmico, mas apoio emocional, por estar sempre receptiva em tudo, e ter essa paciência e coração de mãe, a qual a gente se sente acolhido, tornando os dias mais difíceis leves.

Às amigas que adquiri nesta caminhada, Gabrielle, Camila, Andressa, Tâmara, Mariana, Juliana e Angélica por sempre me apoiarem e me auxiliarem, assim como me incentivarem diante as dificuldades, agradeço muito ter encontrado vocês, foram um apoio incondicional nesta trajetória.

Aos demais colegas dos Programas de Pós Graduação (PPGA; PPGFV), pela convivência e troca de conhecimentos diários (quando não tínhamos pandemia).

Aos meus pais Carlos Rogério dos Santos da Silva e Ilga Alves Lourenço, por acreditarem em mim, e estarem orgulhosos de mais uma conquista, por me darem sempre apoio e me ensinarem valores da vida e nunca desistir da busca pelos sonhos e conquistas, agradeço por estarem sempre comigo.

Às minhas irmãs, Alexandra e Adriana por estarem sempre dispostas a me auxiliar, e que com certeza estão muito felizes por mais esta etapa vencida. Obrigado por sempre me tratarem com carinho e como a irmã caçula que eu sou (hehehe).

Às minhas amigas adquiridas durante a Graduação, a quais vou levar comigo sempre, Angélica Voigt e Janaina Goveia, por estarem sempre dispostas mesmo que longe para me auxiliar na tomada de decisões, por aturarem meus surtos e pelo apoio incondicional e as longas conversas. Estarei sempre torcendo pelo sucesso de vocês, como sei que torcem pelo meu, obrigado.

E por fim, a todos aqueles que embora não tiveram os seus nomes citados, contribuíram de alguma maneira para que este dia se tornasse realidade.

AGRADEÇO!

Resumo

DA SILVA, Flávia Lourenço. **Respostas fisiológicas, bioquímicas e transcricionais em porta-enxertos de *Prunus persica* submetidas ao alagamento do solo.** 2021. 117f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia com concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O estado do Rio Grande do Sul é o detentor da maior produção de pêssegos do Brasil, entretanto, nos dias atuais os produtores da região vêm enfrentando problemas em seus pomares, os quais afetam a produtividade e qualidade dos frutos. Tal situação fica evidenciada quando comparamos o Rio Grande do Sul com outros estados, pois mesmo sendo o maior produtor, possui a menor produtividade. A obtenção dos porta-enxertos pode estar relacionada aos problemas enfrentados, onde estes são provenientes de caroços residuais da indústria de conservas e com isso não há controle genético, proporcionando grande variabilidade genética, devido a mistura varietal das cultivares copa. Outro problema encontrado nesta região é a característica do solo, que de maneira geral apresenta drenagem insuficiente, principalmente na região produtora de Pelotas, associado a períodos de precipitação frequente e intensa em alguns períodos levando ao encharcamento e/ou alagamento do solo e causando prejuízos a cultura. Nestas situações ocorre uma redução drástica de oxigênio na solução do solo e para as raízes, prejudicando o processo de respiração aeróbica podendo levar as células a um déficit energético. Desta forma, no presente estudo foram realizados dois experimentos que objetivaram identificar e avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares (através da expressão de genes alvo por RT-qPCR) em dois porta-enxertos de *P. persica*, de pé franco e enxertados com a cultivar copa 'Rubimel', submetidos ao alagamento do solo. No primeiro estudo, foram avaliados parâmetros fisiológicos e a expressão de doze genes envolvidos nos metabolismos glicolítico e fermentativo, afim de elucidar a resposta inicial ao estresse e buscando identificar a ativação inicial da rota fermentativa em porta-enxertos de *Prunus persica* (cv. Tsukuba 1) submetidos ao alagamento do solo a curto prazo por controle (plantas em condição normal de irrigação); 1; 2; 4; 8; 16; e 32h de alagamento do solo. Na primeira hora de imposição ao estresse a *sacarose sintase* (*SUS*) já teve expressão positiva. A rota fermentativa do lactato foi ativada com duas horas de imposição do alagamento e com quatro horas verificou-se expressão positiva dos genes da via fermentação etanólica. A glicólise foi intensificada diante ao estresse por hipóxia no decorrer das oito e 16 horas de experimento. No segundo experimento, objetivou-se identificar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares adaptativas ao estresse e a influência de dois porta-enxertos de *Prunus* spp. ('Capdeboscq' e 'Tsukuba 1') quando enxertados com a cultivar copa 'Rubimel', e o comportamento dos mesmos quando não enxertados e submetidos ao alagamento do solo. Para isso, foram realizadas avaliações da condutância estomática, nos tempos: controle, 8, 24, 28, 48 e 72h; quantificação de carboidratos em folhas e raízes em dois tempos: controle e 72h; e expressão diferencial de genes envolvidos nas rotas glicolítica e fermentativa (*CINV1*; *GAPDH*; *LDH1*; *PDC* e *ADH1*), síntese de sacarose (*G6PI*; *PGM*; *UDPase* e *SPS*), sorbitol (*S6PDH*; *SDH* e *SOT1*), na regulação osmótica (*P5CS* e *GTL*) e etileno (*ACO1*) nos tempos: controle, 8 e 72h de imposição ao

estresse. De modo geral, plantas enxertadas diferiram das não enxertadas, apresentando redução na condutância estomática quando expostas ao estresse por alagamento. Plantas de 'Rubimel' enxertadas sobre 'Capdeboscq' e 'Tsukuba1' respondem diferencialmente para vários parâmetros bioquímicos, fisiológicos e moleculares sob estresse por hipóxia. A combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' demonstrou um controle mais eficiente das suas reservas, diante ao estresse, devido manter as concentrações de carboidratos estáveis. A expressão dos genes *SPS* e *S6PDH* foi bem pronunciada na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' indicando a síntese de sacarose e sorbitol nestas plantas. A via fermentativa foi ativa com 8h e persistiu até as 72h nas plantas da combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' demonstrando um estresse energético. Plantas da combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' parecem ser mais tolerantes que as da combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' quando em estresse por alagamento. Portanto, este estudo demonstrou através de análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares as peculiaridades das respostas adaptativas ao estresse por alagamento do solo (curto-médio prazo) em plantas não enxertadas e enxertadas com a cultivar copa Rubimel, deixando em evidência a importância do processo de enxertia. Sobretudo, este estudo corrobora com resultados que vão de encontro com a necessidade de seleção de porta-enxertos de *Prunus* spp. com características adaptáveis as condições edafoclimáticas limitantes da principal área produtora de *Prunus* do Rio Grande do Sul, que propiciem uma produção de qualidade, aumento de produtividade e lucratividades aos produtores.

Palavras- Chaves- pessegueiro; hipóxia; carboidratos; curto-médio prazo; enxertia.

Abstract

DA SILVA, Flávia Lourenço. **Physiological, biochemical, and transcriptional responses in *Prunus persica* rootstocks submitted to soil flooding**. 2021. 117 f. Dissertation (Master's in Agronomy) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia com concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

The state of Rio Grande do Sul is the largest peach producer in Brazil. Nowadays, the region's producers have been facing problems in their orchards, which affect the productivity and quality of the fruits. This situation is evident when we compare Rio Grande do Sul with other states, because even though it is the largest producer, it has the lowest productivity. The obtaining of rootstocks may be related to the problems faced, since these come from residual peach pits from the canning industry and therefore there is no genetic control, providing great genetic variability, due to the varietal mixture of the scion cultivars. Another problem found in this region is the soil characteristic, which in general presents insufficient drainage, mainly in the Pelotas producing region, associated with periods of frequent and intense precipitation in some periods leading to waterlogging and/or flooding of the soil and causing damage to culture. In these situations, there is a drastic reduction of oxygen in the soil solution and to the roots, impairing the aerobic respiration process and can lead the cells to an energy deficit. Thus, in the present study, two experiments were carried out that aimed to identify and evaluate physiological, biochemical and molecular responses (through the expression of target genes by RT-qPCR) in two rootstocks of *P. persica*, grafted and non-grafted with scion cultivar 'Rubimel', which root systems were imposed to flooding. In the first study, physiological parameters and the expression of twelve genes involved in glycolytic and fermentative metabolism were evaluated, in order to elucidate the initial stress response and identify the initial activation of the fermentative route in *Prunus persica* rootstocks (cv. Tsukuba 1) submitted to short-term flooding of soil during control (plants under normal irrigation conditions); 1; 2; 4; 8; 16; and 32h of soil flooding. In the first hour of stress imposition, *sucrose synthase (SUS)* already had a positive expression. The lactate fermentation pathway was activated after two hours of flooding and four hours later, positive expression of the genes of the ethanolic fermentation pathway was verified. Glycolysis was intensified in the face of hypoxia stress during the 8 and 16 hours of experiment. In the second experiment, the objective was to identify the physiological, biochemical and molecular responses adaptive to stress and the influence of two rootstocks of *Prunus* spp. ('Capdeboscq' and 'Tsukuba 1') when grafted with the scion cultivar 'Rubimel', and their behavior when not grafted and submitted to soil flooding. For this, stomatal conductance evaluations were carried out at the following times: control, 8, 24, 28, 48 and 72h; quantification of carbohydrates in leaves and roots in two stages: control and 72 hours; and differential expression of genes involved in the glycolytic and fermentative routes (*CINV1*; *GAPDH*; *LDH1*; *PDC* and *ADH1*), sucrose synthesis (*G6Pi*; *PGM*; *UDPase* and *SPS*), sorbitol (*S6PDH*; *SDH* and *SOT1*), in osmotic regulation (*P5CS* and *GTL*) and ethylene (*ACO1*) at times: control, 8 and 72 hours of stress imposition. In general, grafted plants differed from non-grafted plants, presenting a reduction in stomatal conductance when exposed to flooding stress. 'Rubimel' plants grafted on 'Capdeboscq' and 'Tsukuba1' respond differentially to various biochemical, physiological, and molecular parameters under hypoxia stress. The 'Capdeboscq'/'Rubimel' combination demonstrated a more

efficient control of its reserves, in the face of stress, due to maintaining stable carbohydrate concentrations. The expression of the *SPS* and *S6PDH* genes was very pronounced in the 'Tsukuba1'/'Rubimel' combination indicating the synthesis of sucrose and sorbitol in these plants. The fermentative route was active after 8h and persisted until 72 h in the plants of the 'Tsukuba1'/'Rubimel' combination showing an energy stress. Plants in the 'Capdeboscq'/'Rubimel' combination appear to be more tolerant than those in the 'Tsukuba1'/'Rubimel' combination when under flood stress. Therefore, this study demonstrated the peculiarities of the adaptive responses to stress by flooding the soil (short-medium term) in non-grafted and grafted plants with the 'Rubimel' canopy cultivar through physiological, biochemical and molecular analyses, highlighting the importance of the process of grafting. Primarily, this study corroborates with results that go against the selection of rootstocks of *Prunus* spp. with characteristics that are adaptable to the edaphoclimatic conditions of the state of Rio Grande do Sul and that provide quality production, increased productivity and profitability to producers.

Keywords peach tree; hypoxia; carbohydrates; short-medium term; grafting.

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Esquema representativo da respiração diante a condições de hipóxia/anóxia. Inicialmente com o funcionamento da glicólise até a formação de piruvato, posterior bloqueio do ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons, e a ativação da via fermentativa afim de manter o suprimento de NAD⁺ e o funcionamento da glicólise.39
- Figura 2.** Representação esquemática dos materiais e métodos empregados no experimento com o porta-enxerto 'Tsukuba 1' submetido ao alagamento do solo... 42
- Figura 3.** Concentração de oxigênio na solução do solo e temperatura do ambiente medidas nos sete períodos de coleta e dois períodos compreendidos entre as coletas das 16h/32h do experimento de submissão de 'Tsukuba1' ao estresse por alagamento de curto prazo. As barras indicam erro padrão (n=4).47
- Figura 4.** Condutância estomática (gs) de porta-enxertos 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo à curto-prazo. As barras indicam o erro padrão da média das três repetições. Médias comparadas dentro de cada medição para a cultivar e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).48
- Figura 5.** Quantificação Relativa (QR) de *SUS(A)* e de *CINV1 (B)* em raízes de porta-enxertos de 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo à curto prazo. A linha tracejada representa o controle (QR=1) das amostras no tempo zero. As barras indicam o erro padrão (n=4).49
- Figura 6.** Quantificação Relativa (QR) de *UDPase* e *Hexoquinase (A)* e *Fosfoglicomutase (B)* em raízes do porta-enxerto 'Tsukuba 1' submetido ao estresse por alagamento do solo à curto prazo. A linha tracejada representa o controle QR=1 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=4).50

Figura 7. Quantificação Relativa (QR) de *GAPDH* (A) e de *LDH1* e *L-LDH* (B) em raízes de porta-enxertos de 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo à curto prazo. A linha tracejada representa o controle (QR=1) das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=4).....51

Figura 8. Quantificação Relativa (QR) de *PDC* (A) e *ADH 1*, *ADH 2* e *ADH 4* (B) em raízes de porta-enxertos de 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo à curto prazo. A linha tracejada representa o controle (QR=1) das amostras no tempo zero. As barras indicam o erro padrão (n=4).....52

CAPÍTULO 2

Figura 1. Modelo representativo mostrando a via de biossíntese da sacarose e sorbitol, assim como a fase inicial da glicólise e a via fermentativa. Na síntese de sacarose as enzimas *G6PI*, *PGM*, *UDPase*, *SPS* e *SPP* estão envolvidas e na síntese de sorbitol, a *S6PDH* e *SDH*. Além disso, as enzimas *CINV1*, *SUS* e *HXK* que fazem parte da fase inicial da glicólise também estão representadas, e adicionalmente, as enzimas *LDH*, *PDC* e *ADH* da via fermentativa. A sigla em negrito representa a enzima catalisando o passo de reação correspondente. Abreviações: *G6PI* - glicose-6-fosfato isomerase; *PGM* - fosfoglicomutase; *UDPase* - UDP glicose pirofosforilase; *SPS* - Sacarose fosfato sintase; *SPP* - Sacarose fosfatase; *S6PDH* - sorbitol-6-fosfato desidrogenase; *SDH* - Sorbitol desidrogenase; *CINV* – Invertases; *SUS* - sacarose sintase; *HXK* – hexoquinase; *LDH* - Lactato desidrogenase; *PDC* - piruvato descarboxilase e *ADH* - Alcool desidrogenase69

Figura 2. Concentração de oxigênio na solução de alagamento do solo e temperaturas médias do ambiente em seis medições ao longo do experimento. As barras indicam erro padrão n=3.80

Figura 3. Quantificação relativa (QR) de genes envolvidos na síntese, catabolismo e transporte de sorbitol, respectivamente *S6PDH*, (A;B); *SDH* (C;D) e *SOT1* (E;F) em

folhas da cultivar copa Rubimel enxertada e raízes dos porta-enxertos 'Tsukuba1' e 'Capdeboscq' submetidos ao alagamento do solo.86

Figura 4. Quantificação relativa (QR) de genes envolvidos na síntese de sacarose *G6PI* (A; B); *PGM* (C; D); *UDPase* (E; F) e *SPS* (G; H) em folhas da cultivar copa Rubimel e raízes dos porta-enxertos 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq' submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=3).88

Figura 5. Quantificação relativa (QR) do gene envolvido na síntese de prolina *P5CS* em folhas da cultivar copa Rubimel enxertada (A) e raízes dos porta- enxertos 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq' (B) submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=3).89

Figura 6. Quantificação relativa (QR) dos genes *ACO1* (A) e *GTL* (B) em folhas da cultivar copa Rubimel enxertada nos porta-enxertos 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq' submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=3).90

Figura 7. Quantificação relativa (QR) do gene *GAPDH* em folhas da cultivar copa Rubimel enxertada (A) nos porta-enxertos 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq' (B) submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão n=3.91

Figura 8. Quantificação relativa (QR) dos genes *Cinv1*(A); *LDH1* (B), *PDC* (C) e *ADH1* (D) em raízes das combinações da cultivar copa Rubimel enxertada nos porta-enxertos 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq' submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam o erro padrão n=3.93

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Descrição dos doze genes e normalizador utilizados nas reações de RT-qPCR em raízes de porta-enxertos 'Tsukuba 1' sob condições de alagamento do solo.....44

Tabela 2. Eficiência de PCR (E) e especificidade (T^a_m) de treze genes (normalizador e alvos) em raízes de porta-enxertos de 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo. 46

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Descrição dos quinze genes e normalizadores utilizados nas reações de RT-qPCR em folhas e raízes das combinações 'Capdeboscq'/'Rubimel' e 'Tsukuba1'/'Rubimel' sob condições de alagamento do solo.76

Tabela 2. Condutância Estomática (gs) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em dois genótipos porta-enxerto de Prunus 'Capdeboscq' e 'Tsukuba 1' pé franco e enxertados com 'Rubimel' submetidos ao alagamento do solo.....81

Tabela 3. Condutância estomática (gs) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em diferentes períodos após a submissão do alagamento em porta enxertos de Prunus pé-franco e enxertados com 'Rubimel'.81

Tabela 4. Teores de amido, açúcares solúveis (AST) e sacarose em (mg g^{-1} MF), quantificados em folhas da cultivar copa Rubimel enxertada sob dois porta-enxertos, 'Capdeboscq' e 'Tsukuba1' submetidos ao alagamento por 72 horas.83

Tabela 5. Teores de amido, açúcares solúveis (AST) e sacarose (mg/g^{-1} MF), quantificados em raízes da cultivar copa Rubimel enxertada sob dois porta-enxertos, 'Capdeboscq' e 'Tsukuba1' submetidos ao alagamento por 72 horas.**84**

Sumário

1 Introdução Geral.....	18
2 Revisão da Literatura	21
2.1 A cultura do Pessegueiro	21
2.2 Porta- enxertos.....	23
2.3 A problemática da cultura do pessegueiro no Rio Grande do Sul	24
2.4 Morte Precoce do Pessegueiro (<i>Peach Tree Short Life</i>)	25
2.5 Alterações no solo diante ao estresse por hipoxia/anoxia.....	26
2.6 Metabolismo Energético e Fermentativo sob condições de hipoxia	27
2.7 Alterações no aparato fotossintético e no metabolismo de carboidratos.....	28
Referências	32
CAPÍTULO 1	37
Alagamento do solo a curto prazo altera o nível de expressão de genes chaves do metabolismo energético em raízes de porta-enxerto Tsukuba 1 (<i>Prunus sp.</i>)	37
1 Introdução	37
2 Material e Métodos.....	41
2.1 Material Vegetal e Condições Experimentais	41
2.2 Análises Fisiológicas	42
2.3. Análises da Expressão Gênica.....	43
2.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	43
2.3.2. Escolha dos genes alvo e síntese de primers	43
2.3.3. Reações de RT-qPCR e Quantificação Relativa	45
2.3.4. Especificidade e Eficiência dos primers	45
3 Resultados	46
4 Discussão.....	52

5 Conclusões.....	60
Referências	61
CAPÍTULO 2.....	66
Alterações no teor de carboidratos e respostas da expressão diferencial de genes envolvidos nos metabolismos de carboidratos e fermentativo em plantas enxertadas de <i>Prunus persica</i> submetidas ao alagamento do solo	66
1 Introdução	66
2 Material e Métodos.....	73
2.1 Material Vegetal	73
2.2 Análises Fisiológicas	74
2.3 Análises da Expressão Gênica.....	74
2.3.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA	74
2.3.2 Escolha dos Genes Alvo e Síntese de Primers	75
2.3.3 Reações de RT-qPCR e Quantificação Relativa	77
2.4 Quantificação de Carboidratos de folhas e raízes.....	77
2.4.1 Preparo das amostras para quantificar Açúcar Solúvel Total (AST) e Sacarose	77
2.4.2 Preparo das amostras para quantificação de amido	78
2.4.3 Determinação do Teor Total de Açúcar Solúveis (AST) e Amido.....	78
2.4.4 Determinação do Teor de Sacarose.....	78
2.4.5 Análises estatísticas	79
3 Resultados	79
4 Discussão.....	93
5 Conclusões.....	105
Referências	106
Anexos	116

1 Introdução Geral

A produção mundial de frutas é caracterizada pela vasta diversidade de espécies cultivadas, que permitem a oferta de frutas ao longo do ano, por serem produzidas tanto no hemisfério Norte quanto Sul, complementado assim as produções (ANDRADE, 2020). Os três maiores produtores mundiais de frutas são China, Índia e Brasil, respectivamente. A China responde por em torno de 27,98% da produção mundial com uma colheita de aproximadamente 244 milhões de toneladas, seguida por Índia cujas colheitas chegam a 98,72 milhões de toneladas, representando 11,34% da produção mundial e em terceiro lugar no *ranking* está o Brasil sendo responsável por 4,6% da produção mundial com volumes de colheitas de 40,04 milhões de toneladas de frutas (FAOSTAT, 2018).

No Brasil a fruticultura é amplamente cultivada em todo o território nacional com viabilidade para o crescimento e desenvolvimento do país, devido sua capacidade de geração de empregos diretos, indiretos, renda e também pelas condições edafoclimáticas favoráveis (PICOLOTTO, 2009). Mesmo assim, o consumo interno de frutas no Brasil ainda é baixo, pois o brasileiro consome em média 58 quilos de frutas/ano, quando o recomendado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) é de 140 quilos/ano. Segundo o diretor da Abrafrutas (Associação brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados) Eduardo Brandão (2020), esse baixo consumo é agravado com a crise econômica que afeta o poder de compra das classes menos favorecidas, que priorizam a compra de cereais e proteína ao invés de frutas e hortaliças (GAZETA, 2020).

Contudo, a fruticultura brasileira vem ganhando destaque no mercado externo de frutas *in natura*, com a oferta de frutas tropicais e de clima temperado durante boa parte do ano. No entanto, ainda é o 23º exportador mundial de frutas, e estava em ascensão, segundo dados da ABRAFRUTAS, em 2020 o Brasil exportou mais de 1 milhão de toneladas de frutas, representando um aumento do volume (kg) em 6% na exportação em relação ao ano de 2019, mesmo diante a pandemia do novo coronavírus. Mas, ao avaliarmos o ano de 2021 em relação ao 2020, ocorreu uma redução de 5% no volume de exportações (kg) de frutas do Brasil, devido a pandemia que tem prejudicado, por exemplo, a logística de exportação através do espaço aéreo por causa das restrições sanitárias impostas (ABRAFRUTAS, 2021).

Dentre as frutíferas que apresentam importância econômica o pêssego e a nectarina são muito apreciados pelo seu sabor e aparência no mundo (OLIVEIRA, 2018), sendo consumidos principalmente *in natura*, mas também processado na forma de diversos produtos. A produção mundial destes frutos gira em torno de 24 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 1 milhão de hectares. Os três principais produtores destas culturas, em 2018, foram a China, responsável por mais de 15 milhões de toneladas, seguida pela Itália com 1,09 milhão de toneladas e a Grécia com 968,7 mil toneladas, em áreas cultivadas de 826.325 ha, 61.897 ha e 42.650 ha, respectivamente (FAOSTAT, 2018).

O Brasil ocupa a 13ª posição dentre os maiores produtores de pêssegos e nectarinas mundiais, sendo que o pessegueiro (*Prunus persica* L. Bastch) ocupa uma posição de destaque no mercado brasileiro. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), em 2019 o Brasil produziu cerca de 183.132 toneladas de pêssegos, provenientes de 16.101 mil hectares cultivados.

O Rio Grande do Sul (RS) é o principal estado produtor de pêssegos no Brasil com 110.205 toneladas em uma área próxima de 11.895 ha, representando 60% da produção e 73% da área cultivada nacional. Os cinco municípios com as maiores áreas plantadas com a cultura estão no RS- Pelotas (3.000ha); Canguçu (1.200ha); Pinto Bandeira (1.100ha); Farroupilha (810ha) e Morro Redondo (600ha) (IBGE, 2019). Com relação a produção de pêssegos, no intervalo que compreende os anos entre 2007-2018, Pelotas- RS foi o principal produtor da cultura, porém, em 2019 o município de Pinto Bandeira- RS passou a ocupar esta posição com uma produção de aproximadamente 18.700 toneladas, seguido por Pelotas (18.107 t).

O estado está dividido em dois segmentos na produção de pêssegos, a Serra Gaúcha especializada em pêssegos para o consumo *in natura* e a região Sul, com o predomínio do cultivo para abastecer as indústrias (PEGORARO et al., 2016; BELARMINO, 2019). Na região Sul, destaca-se a região de Pelotas (GONÇALVES et al., 2014; NEDEL, 2016), responsável pela maior área cultivada com 3.000 hectares (IBGE, 2019), e o maior número de famílias envolvidas com 605 persicultores (SCHNEID, 2020), onde mais de 90% da produção é destinada ao processamento industrial, sendo responsável por cerca de 96% de toda produção nacional de compotas e uma parcela é destinada ao consumo *in natura* (BETEMPS, 2015; SCHNEID, 2020).

Tradicionalmente no RS as mudas de pessegueiro são obtidas por enxertia, onde o porta-enxerto desempenha importantes funções. No entanto, estes porta-enxertos são provenientes de caroços residuais das indústrias conserveiras e, portanto, não tem controle genético, proporcionando grande variabilidade genética, devido a mistura varietal das cultivares copa e, conseqüente, baixa qualidade do porta-enxerto e da muda final, isto pode refletir negativamente nos pomares quando já estabelecidos (MAYER et al., 2014; NEDEL et al., 2016)

Outro problema encontrado nas regiões produtoras de pêssegos no RS é a característica do solo, que de maneira geral é considerado raso e apresenta drenagem insuficiente (NASCIMENTO et al., 2003). Por conta disso, em período de chuvas, que podem ocorrer de maneira frequente e intensa, acaba acumulando água no solo, sendo esta situação prejudicial às plantas cultivadas, em especial ao pessegueiro por ser uma espécie altamente sensível ao encharcamento e/ou alagamento do solo (MESSCHIMDT et al., 2015; ZHOU et al., 2017), principalmente em épocas consideradas críticas para a cultura, como o florescimento e brotação (MARTINAZZO et al., 2013).

Estes fatores associados, podem estar contribuindo com a síndrome Morte Precoce do pessegueiro, que tem causados grandes danos aos pomares da região Sul do RS (ALBA et al., 2019). Esta síndrome é causada por fatores bióticos e abióticos, e podem causar grandes prejuízos as plantas, levando em maioria a morte destas (PARKER et al., 2018).

Visto que os pomares são constituídos por plantas enxertadas e a atual obtenção dos porta-enxertos é um dos problemas associados a sensibilidade da cultura ao estresse por alagamento, é de suma importância que sejam realizados estudos que visem entender a relação entre estes dois fatores. Portanto, no presente trabalho foram realizados dois estudos, com dois diferentes porta-enxertos 'Capdeboscq' e 'Tsukuba1', com plantas não enxertadas e enxertadas com a cultivar copa 'Rubimel' submetidas ao estresse por alagamento do solo.

O trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo que o capítulo 1 teve como objetivos determinar a partir de quantas horas de alagamento a planta percebe o estresse e começa a resposta a nível transcricional, através da ativação da via fermentativa e caracterizar a expressão dos genes codificadores das enzimas PDC, ADH e LDH durante a ativação do processo fermentativo, sob estresse por

alagamento, afim de corroborar estes com a hipótese de encontrar possíveis marcadores da tolerância e/ou suscetibilidade para auxiliar seleção de novos genótipos. No capítulo 2, foram testadas as hipóteses de que plantas enxertadas irão responder de forma diferencial às plantas pé franco, ao alagamento do solo; e as concentrações de carboidratos serão menores em raízes de plantas alagadas em comparação com plantas controle, com o objetivo de caracterizar a influência do porta-enxerto ('Tsukuba 1 e Capdeboscq') sob a cultivar copa Rubimel, quando em estresse por alagamento.

2 Revisão da Literatura

2.1 A cultura do Pessegueiro

O pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch) é uma árvore caducifólia pertencente ao gênero *Prunus*, família Rosaceae, subfamília Prunoideae, (BYRNE et al., 2012). Existem três variedades botânicas para a espécie: *Prunus persica* var. *vulgaris* (pêssego comum, com epiderme pilosa), *Prunus persica* var. *nucipersica* (nectarina, com epiderme glabra) e *Prunus persica* var. *platicarpa* (pêssego chato, com formato achatado) (CASTRO; BARBIERI, 2014). Inicialmente acreditou-se que o pessegueiro fosse originário da Pérsia, atual Irã, daí a denominação *Prunus persica*, no entanto, seu centro de origem é a China de onde foi levado, espalhando-se pela Europa (FRANZON; RASEIRA, 2014).

No Brasil, o pessegueiro foi introduzido em 1.532 através da colonização portuguesa, por Martin Afonso de Souza, que trouxe mudas da Ilha da Madeira, as quais foram plantadas na Capitania de São Vicente, que corresponde hoje ao estado de São Paulo (SP) (BARBOSA et al., 2010). Atualmente o estado de SP é o segundo maior produtor da cultura no país, precedido apenas pelo Rio Grande do Sul (RS) que concentra a maior produção. No RS, o cultivo do pessegueiro cresceu e teve amplo desenvolvimento, devido as condições climáticas favoráveis, a proximidade com o programa de melhoramento da Embrapa e o polo industrial da fruta (FRANZON; RASEIRA, 2014).

Para o sucesso da persicultura é necessário levar em consideração alguns fatores, dentre eles, a escolha do local de instalação do pomar é um dos mais importantes, onde se deve examinar cuidadosamente as condições ambientais, como clima, solo e topografia (HERTER et al., 2014).

A temperatura é um dos fatores climáticos mais importantes na expansão da cultura. O pessegueiro é uma espécie frutífera de clima temperado, e para sua completa formação, as gemas floríferas e vegetativas devem passar por um período de repouso, definido como dormência (SAURE, 1985; FAUST et al., 1997). Inicialmente as baixas temperaturas auxiliam a entrada na dormência, e em seguida, atuam no processo de superação desta fase (NACHTIGAL et al., 2009; SINGH, 2017; FADÓN et al., 2020). Para a superação da dormência é preciso um acúmulo de horas de frio abaixo 7,2°C ou até 11°C, o que é mais importante são as baixas temperaturas contínuas durante o período de repouso (NACHTIGAL et al., 2009).

As geadas são prejudiciais na floração e na primeira fase de desenvolvimento dos frutos, e são consideradas um dos sérios problemas ao cultivo do pessegueiro. O frio intenso durante a floração pode prejudicar a polinização, o desenvolvimento do tubo polínico e à fusão dos gametas (HERTER et al., 2014). Ainda, temperaturas altas próximas a floração (acima de 28°C) podem diminuir a viabilidade dos grãos de pólen, trazendo prejuízos a fertilização e formação de frutas (RASEIRA, 2015).

Para o correto manejo de um pomar de pessegueiro, é de suma importância conhecer a demanda hídrica da cultura, uma vez que, a cultura possui uma elevada necessidade de água, porém não tolera o encharcamento (CAMPOS et al., 2014). De modo geral, é recomendável o cultivo em solos profundos, permeáveis e bem drenados (HERTER, et al., 2014), além de locais com bom suprimento de água, principalmente durante o final da primavera e o início do verão, para evitar prejuízos por déficit hídrico (RICKES et al., 2019).

A utilização de mudas que obtenham alta qualidade e garantam um padrão genético e fitossanitário seguros, é outro fator importante quando no estabelecimento de um novo pomar de pêssegos (BIANCHI et al., 2014). Atualmente as mudas de pessegueiro são obtidas através da enxertia com a combinação de dois genótipos distintos, porta-enxerto e cultivar copa.

Os programas de melhoramento genético vêm obtendo sucesso no desenvolvimento de cultivares copa que sejam mais adaptadas ao clima ameno e condições subtropicais, assim como, que sejam mais produtivas e com frutas de maior qualidade (VIÑOLY, 2016). No entanto, são relativamente poucas as pesquisas com porta-enxertos no Brasil. Atualmente os porta-enxertos utilizados na produção de

mudas no RS, em grande parte são de origem genética desconhecida (MAYER et al., 2014).

Portanto, nos pomares de pessegueiro, pode-se garantir apenas a qualidade das cultivares copa, uma vez que estas apresentam fidelidade genética, diferentemente dos porta-enxertos. Em virtude disso, são notáveis as diferenças entre plantas dentro de um mesmo pomar, como no diâmetro do tronco, crescimento do dossel, no número de frutos e, principalmente, na tolerância as condições climáticas adversas, como o estresse hídrico (seca/alagamento) e também a pragas e doenças do solo (MAYER et al, 2012; MAYER et al., 2014).

Sendo assim, é preciso investir em pesquisas que busquem identificar porta-enxertos que sejam adaptados às condições edafoclimáticas das regiões produtoras, assim como, entender as suas respostas diante ao estresse por alagamento do solo, além de ampliar o conhecimento sobre as características que são induzidas pelos porta-enxertos nas cultivares copa (SCHMITZ et al., 2012; CASTRO et al., 2014).

2.2 Porta- enxertos

Atualmente em pomares comerciais de pessegueiro na região Sul do Brasil as mudas são obtidas por meio da enxertia da cultivar copa sobre porta-enxerto, onde busca se agregar características de interesse de ambos genótipos, visando, em geral, o incremento da produtividade e frutas de qualidade e um sistema radicular com adaptação às condições bióticas e abióticas do solo (BIANCHI et al., 2014; MAYER et al., 2019).

Os porta-enxertos que constituem o sistema radicular das mudas, devem possuir características que se adaptem as condições edafoclimáticas das regiões produtoras da cultura, tais como, boa ancoragem ao solo, boa absorção de água e nutrientes, armazenamento de reservas adequados, resistência a pragas e doenças do solo e apresentar tolerância a seca ou alagamento (GAINZA et al., 2015; FORCADA et al., 2012).

De forma complementar, os porta-enxertos apresentam influência direta na cultivar copa enxertada, caracterizando a relação porta enxerto/cultivar copa, podendo apresentar efeito no vigor das plantas, influenciando a produtividade e qualidade dos frutos (PICOLOTTO et al., 2009; SCHMITZ, 2012), além de prolongar o período de maturação dos frutos. Os porta-enxertos podem interferir nos hormônios que circulam

dentro da planta, a nível de proporção, promoção ou inibição destes, e também no transporte de assimilados, como açúcares, aminoácidos ou elementos minerais e na quantidade de água absorvida e/ou transportada (GAINZA et al., 2015; WEBSTER, 1995). Além disso, os porta-enxertos podem influenciar nas respostas aos estresses, como por exemplo, alterando a forma e o funcionamento dos estômatos, a transpiração e o potencial de água e crescimento das folhas (JIMENEZ et al., 2013).

Contudo, a identidade genética dos porta-enxertos no atual sistema de produção de mudas no Sul do Brasil na maioria das vezes é desconhecida, devido os porta-enxertos serem obtidos a partir da mistura varietal de caroços oriundos das indústrias conserveiras, ocasionando assim uma grande variabilidade deste material não conferindo qualidade genética e fitossanitária da muda final (NEDEL, 2016).

Diante a importância da cultura do pessegueiro no RS, o fato de não se utilizar porta-enxertos selecionados e que sejam adaptados às diferentes condições edafoclimáticas de cultivo, pode estar atrelado aos diversos problemas que a cultura vem enfrentando, como a morte precoce do pessegueiro e a baixa produtividade quando comparada aos demais estados produtores (HUSSAIN et al., 2013).

2.3 A problemática da cultura do pessegueiro no Rio Grande do Sul

O RS mesmo apresentando a maior produção nacional de pêssegos, detém uma produtividade média considerada baixa ($\sim 9,24 \text{ ton ha}^{-1}$) em comparação com os demais estados produtores, como São Paulo, que apresenta uma produtividade em torno de $22,16 \text{ ton ha}^{-1}$ (IBGE, 2019).

Esta baixa produtividade pode estar atrelada a ineficiência de alguns fatores relacionados a produção de pêssegos no RS, como a obtenção das mudas, onde é recomendado a utilização de mudas com qualidade garantida e materiais bem adaptados a região (MARTINAZZO et al., 2013). No entanto, no atual sistema de produção de mudas no sul do RS, estas apresentam baixa qualidade genética e fitossanitária, devido o material vegetal utilizado como porta-enxertos não ter identidade genética conhecida, por serem obtidos de caroços oriundos das indústrias conserveiras, ocasionando mistura varietal deste material (NEDEL, 2016).

Outro fator que pode estar relacionado a tal condição são as características dos solos do RS, que apresenta uma vasta extensão de solos hidromórficos que se caracterizam por horizontes impermeáveis, pouco profundos e com grande

capacidade de saturação por água e, portanto, baixa drenagem (SILVA NETO, 2010), sendo que, é recomendável o cultivo da cultura do pessegueiro em solos profundos, permeáveis e bem drenados, onde as raízes tenham boa aeração e possam realizar suas funções adequadamente para o correto desenvolvimento das plantas (HERTER et al., 2014).

Adicionalmente, as condições pluviométricas nas regiões produtoras do RS podem ser limitantes para a produção de pêssegos ao longo do ano, onde o regime de chuvas atua de forma que em períodos ocorra a falta e outros excesso de chuvas. É observado que geralmente no final do inverno e início da primavera, onde ocorrem o florescimento e início de brotação, que são períodos considerados críticos para a cultura do pessegueiro, há tendência de aumento das chuvas e, conseqüente, alagamentos e/ou encharcamento do solo que serão prejudiciais as plantas a curto e a longo prazo (MARTINAZZO et al., 2013; GODOY et al., 2017).

Como descrito para o RS, nas últimas décadas, devido à atividade antropogênica, tem se intensificado a ocorrência e a gravidade dos eventos de inundações que é um fator de estresse ambiental abiótico, causando prejuízos as plantas terrestres, também a nível mundial (COLMER e VOESENECK, 2009; BAYLEY-SERRES e COLMER, 2014; SASIDRAHAN et al., 2018). O crescente aumento de dióxido de carbono e outros gases na atmosfera, estão modificando o clima, principalmente a temperatura, que tem aumentando consideravelmente nos últimos anos, e com isso, tem afetado fortemente o ciclo hidrológico global, causando situações de alagamento e inundações, ou de déficit hídrico (RENNENBERG e KREUZWIESER, 2014; JIMENEZ et al., 2017).

2.4 Morte Precoce do Pessegueiro (*Peach Tree Short Life*)

A heterogeneidade encontrada entre as plantas de um mesmo pomar, devido à falta de identidade genética dos porta-enxertos dificulta a identificação de genótipos que sejam mais tolerantes ao estresse por alagamento do solo, e também a outras moléstias, como a síndrome conhecida por Morte Precoce do pessegueiro.

Esta síndrome é um problema enfrentado pelos produtores da região Sul do Brasil, principalmente na região produtora de Pelotas e vem causando prejuízos a persicultura no estado desde o final da década de 1970 (MAYER et al., 2018).

A morte precoce do pessegueiro tem sido considerada como o resultado de uma complexa interação de fatores bióticos e abióticos, dentre eles o alagamento do solo (PARKER et al., 2018). Tais fatores em combinação podem causar sintomas de forma branda, severa ou o colapso repentino na copa dos pessegueiros no final do inverno ou início da primavera, durante ou no final do período de dormência (ALBA et al., 2019), ocasionando alta taxa de mortalidade de plantas nos pomares de pessegueiro e, conseqüentemente, prejuízos a cadeia produtiva da cultura nas regiões afetadas.

Para Mayer et al. (2014), os porta-enxertos podem influenciar na manifestação dos sintomas da síndrome além da associação do nematóide-anelado (*Mesocriconema xenoplax*) com a morte precoce, a influência dos porta-enxertos nos mecanismos de dormência e de tolerância da planta ao frio são importantes fatores consideráveis, assim como ao alagamento do solo.

2.5 Alterações no solo diante ao estresse por hipoxia/anoxia

Quando em condições de alagamento do solo, ocorre privação de oxigênio para as raízes das plantas, devido a água ocupar os poros do solo anteriormente ricos em oxigênio. Além disso, o oxigênio restante é então rapidamente consumido pelos micro-organismos presentes no solo e pelas raízes das plantas reduzindo assim o oxigênio a níveis que levam a condições de hipóxia e/ou anóxia (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008).

Nestas mesmas condições, as trocas gasosas entre o solo e a atmosfera são prejudicadas, devido a água conferir uma importante barreira para a difusão de gases, uma vez que, o oxigênio tem uma taxa de difusão cerca de 10.000 vezes mais lenta na água do que no ar (PIMENTEL et al., 2014; RENNENBERG e KREUZWIESER, 2014).

Nas folhas as trocas gasosas com o ambiente são importantes, devido o influxo de CO₂ para os cloroplastos ser necessário para a fotossíntese e a rápida difusão de O₂ para as mitocôndrias para manter a respiração aeróbica, entretanto condições de hipóxia podem comprometer as trocas gasosas no dossel, devido induzir alterações no movimento estomático. Por sua vez, no que tange ao sistema radicular, a diminuição da velocidade de difusão dos gases entre o solo e a atmosfera causa um

acúmulo de compostos gasosos no solo alagado, como o hormônio vegetal etileno ou outros produtos metabólicos como o CO₂ e metano (COLMER e VOESENEK, 2009).

A privação de oxigênio na solução do solo também limita a absorção de água e nutrientes, produção regular de ATP e processamento de carboidratos, levando a um baixo potencial redox do solo e ao acúmulo de substâncias reduzidas, incluindo NO²⁻, Mn²⁺, Fe²⁺ e H₂S, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008; DREW, 1997).

A intensidade e a velocidade das mudanças que ocorrem nas propriedades físico-químicas do solo diante ao alagamento, são dependentes de alguns fatores, como o tipo de solo, a duração do estresse e as condições ambientais (como a temperatura) (DREW, 1997). Um fator importante que contribui na disponibilidade de oxigênio no solo, é o tipo de alagamento, onde em condições de encharcamento e estagnação ocorre uma maior redução deste oxigênio, diferentemente em águas em movimento onde as turbulências facilitam a solubilização do oxigênio (RENNENBERG e KREUZWIESER, 2014).

2.6 Metabolismo Energético e Fermentativo sob condições de hipoxia

O oxigênio atua como substrato em diferentes vias metabólicas, dentre elas o metabolismo respiratório mitocondrial é um dos mais importantes, onde o trifosfato de adenosina (ATP) que é utilizado para manutenção e crescimento celular e liberação de energia, é gerado a partir da fosforilação oxidativa na respiração, onde o oxigênio atua como acceptor final da cadeia de elétrons (GIBBS e GREENWAY, 2003).

Contudo, com a privação de oxigênio, a fosforilação oxidativa é reduzida drasticamente ou cessada, limitando a produção de ATP para atender as demandas por energia, ficando apenas a glicólise como a principal via responsável pela produção de ATP. No entanto, o rendimento energético se torna inferior nesta condição, onde é produzido apenas 4 unidades de ATP por unidade de sacarose, valor este muito menor quando comparado com ao da fosforilação oxidativa, que é de aproximadamente 60 unidades de ATP por unidade de sacarose, levando a um déficit energético (GEIGENBERGER, 2003; FERNER et al., 2012). Diante a tal situação, em busca de compensar este déficit, a glicólise tem sua atividade acelerada para que a produção de ATP a nível de substrato possa aumentar (GIBBS e GREENWAY, 2003).

Portanto, é preciso que a glicólise mantenha uma atividade ajustada para continuar com a produção de ATP suficiente para a sobrevivência celular quando em hipóxia. Para isto, é necessário um suporte adequado de NAD^+ , que diante ao estresse se torna limitado, prejudicando o funcionamento da glicólise. Então, para que a produção de energia não cesse a planta faz uma reprogramação molecular, com a ativação da expressão de genes envolvidos no metabolismo energético, ativando uma via denominada respiração anaeróbica (fermentação), que vai regenerar NAD^+ para que a glicólise continue a produção de ATP, a partir da oxidação e reciclagem de NADH e catabolismo do piruvato (ZHANG, et al., 2017).

A fermentação ocorre através de três principais enzimas: Lactato desidrogenase (LDH), Piruvato descarboxilase (PDC) e Álcool desidrogenase (ADH), que tem como subprodutos o lactato, acetaldeído e etanol, respectivamente (ZHOU et al., 2017). Como uma rápida resposta ao estresse por hipóxia a via fermentativa é rapidamente ativada inicialmente pela LDH. No entanto, o acúmulo de lactato que é considerado prejudicial as células, influência na queda do pH citoplasmático, reduzindo a atividade da LDH e, conseqüente, a produção de lactato. Esse evento favorece a fermentação etanólica que é considerada menos prejudicial, pois através das enzimas PDC e ADH subsequentemente, o piruvato é descarboxilado a etanol, o qual possui difusão facilitada para fora da célula evitando toxidez, embora represente uma perda significativa de carbono pela célula (TAIZ e ZEIGER, 2017; MATELUNA et al., 2018).

O entendimento de como estas vias são controladas por diferentes genótipos em situações de hipóxia, é de grande importância na tomada de decisões quando se busca identificar genótipos, principalmente de porta-enxertos que sejam mais tolerantes a tais condições (PIMENTEL et al., 2014; BAILEY-SERRES e COLMER, 2014).

2.7 Alterações no aparato fotossintético e no metabolismo de carboidratos

A fotossíntese é um processo químico que utiliza a energia luminosa para a síntese de carboidratos e a liberação de oxigênio a partir de CO_2 e água (TAIZ e ZEIGER, 2017). O processo da fotossíntese é dividido em duas etapas, conhecidas como reação fotoquímica (fase clara), onde a energia da luz associada a foto-oxidação de água para oxigênio gera ATP e NADPH (fosfato de nucleotídeo de nicotinamida e

adenina), estes subprodutos são então utilizados na segunda etapa, denominada reação de carboxilação (fase escura) (SHARKEY, 1985; TAIZ e ZEIGER, 2017).

Na fase escura, ocorre uma série de reações denominadas Ciclo de Calvin-Benson. Nesse ciclo, o CO₂ reage com um açúcar de cinco carbonos, conhecido como RuBP (ribulose difosfato), e essa reação é catabolizada pela enzima RuBisCo (ribulose-1,5-bifostato carboxilase/oxigenase). Os primeiros produtos estáveis desta reação são duas moléculas de três carbonos, 3- fosfoglicerato (PGA). As moléculas de PGA são então reduzidas à seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (PGAL), na presença de ATP e NADPH, e destas moléculas cinco regeneram RuBP e uma serve para a produção de carboidratos (JACKSON, 2003).

Na grande maioria das espécies vegetais, as trioses-fosfato podem então ser translocadas para o citosol por um translocador de triose-fosfato e atuar na síntese de sacarose, usadas pela respiração, ou para a síntese de outros açúcares que serão transportados entre os tecidos fonte e dreno, a exemplo da sacarose e do sorbitol. Alternativamente, as trioses-fosfato podem continuar nos cloroplastos e serem utilizadas para a síntese de amido. No entanto, a maior parte destas trioses-fosfato formadas voltam para regenerar ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) (regeneração), enquanto um 1/6 delas podem ser desviadas para a síntese de amido no cloroplasto e/ou sacarose no citosol (TAIZ e ZIEGER, 2017).

Estes carboidratos produzidos na fotossíntese consistem principalmente de açúcares solúveis prontamente utilizados (sacarose, glicose e frutose) e também amido imóvel armazenado (LIN et al., 2018), sendo a sacarose e o amido considerados os principais carboidratos obtidos pela fotossíntese (ARENQUE, 2010). A sacarose apresenta importante função como açúcar de transporte, devido sua característica não redutora. É preciso complementar, no caso das rosáceas a exemplo do pessegueiro, que o principal açúcar de transporte é o sorbitol (TAIZ e ZIEGER, 2017).

Diante da baixa produção de energia a partir da respiração anaeróbica, apoiada pela fermentação, o aumento da demanda e a degradação de carboidratos no sistema radicular sob estresse, para manter a produção de ATP, é maior, devido a glicólise ficar acelerada afim de atender a demanda, a despeito da baixa eficiência da produção de ATP comparada com a respiração aeróbica (BELO, 2011).

Contudo, diante as condições de hipóxia/anóxia, ocorre uma crise energética no sistema radicular, reduzindo drasticamente a funcionalidade das aquaporinas e a absorção de íons (TAN et al., 2018; SALVATIERRA et al., 2020), prejudicando a captação de água, assim como o transporte via xilema. Estas limitações levam ao fechamento estomático, de forma a manter o status hídrico da planta, ocasionando prejuízos às trocas gasosas nas folhas, interferindo na fotossíntese que pode ser reduzida e/ou cessada por completo, e isto reflete no ciclo de Calvin e, conseqüente, na produção de carboidratos (GARCIA-SANCHES et al., 2007; PERATA et al., 2011).

A hipóxia ainda pode comprometer o transporte via floema dos carboidratos das folhas para as raízes, devido ao processo de descarregamento do floema ter consumo de ATP, e diante a redução da disponibilidade de energia pode haver prejuízo deste transporte, vindo a reduzir a translocação dos carboidratos e haver o acúmulo de açúcares e amido nas folhas afetando negativamente o fornecimento destes às raízes (KREUZWIESER et al., 2004; HARGUINDEGUY, 2013). Assim, as raízes têm seu crescimento e produção de biomassa reduzidos, assim como, sua atividade metabólica e, conseqüente, queda na produção de energia (DIAS- FILHO, 2006; BELO, 2011).

Tão importante quanto a capacidade de manter um suprimento adequado de carboidratos das folhas às raízes, em condições de hipóxia, o armazenamento de reservas também é um fator importante na tolerância ao estresse, onde plantas que mantêm um maior acúmulo de reservas e conseguem ativar as vias de metabolização destas, podem manter a produção de energia por períodos mais longos sob estresse, do que plantas com menor acúmulo de reservas nas raízes (PARENT et al., 2008). Portanto, o nível de armazenamento, transporte e de catabolismo destes carboidratos pode ser um importante fator na tolerância ao estresse por alagamento (VOESENEK e SASIDRAHAN, 2013; IACONA et al., 2019; YANG et al., 2019).

Diante ao exposto, considerando a importância da cultura do pessegueiro no Brasil e no Estado do RS, é preciso desenvolver estudos relacionados a estresses como o alagamento do solo, visando a identificação das respostas adaptativas dos porta-enxertos a tal estresse, podendo auxiliar os programas de melhoramento para identificação e seleção de genótipos mais tolerantes, bem como, fornecer tais informações aos pesquisadores e produtores envolvidos no setor produtivo de frutas de caroço no Brasil. Portanto, no presente trabalho foram conduzidos dois

experimentos, nos quais objetivou-se identificar e avaliar respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares em dois porta-enxertos de *P. persica* ('Capdeboscq' e 'Tsukuba 1'), de pé franco e enxertados com a cultivar copa Rubimel, submetidos ao estresse por alagamento do solo em curto e médio prazo.

Referências

- ABRAFRUTAS. **Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados**. Dados estatísticos. Disponível em: <https://abrafrutas.org/dados-estatisticos/>, 2021. <acessado em março de 2021>.
- ALBA, J. M. F.; MAYER, N. A.; UENO, B.; da COSTA, F. A. Fatores Ambientais Envolvidos na Morte Precoce do Pessegueiro na Região de Pelotas. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, comunicado técnico- 368, p. 10, 2019.
- AMADOR, M. L.; SANCHO, S.; BIELSA, B.; GOMES-APARISI, J.; RUBIO-CABETAS, M. J. Physiological and biochemical parameters controlling waterlogging stress tolerance in Prunus before and after grainage. **Physiologia Plantarum**, v.144, p. 357-368, 2012.
- ANDRADE, P. F de S., Fruticultura- Análise da Conjuntura (Prognóstico- 2020). PR: **Secretaria da Agricultura e Abastecimento- Departamento de Economia Rural (DERAL)**, 2020. Versão eletrônica disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-01/fruticultura_2020.pdf <acessado em dezembro de 2020>.
- ARENQUE, B. C. Metabolismo de carboidratos da espécie amazônica Senna reticulata sob cultivo em alto CO₂. **Dissertação** (Mestrado em Botânica) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 313– 339, 2008.
- BAILEY-SERRES, J.; COLMER, T. D. Plant tolerance of flooding stress—recent advances. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 10, p. 2211-2215, 2014.
- BELARMINO, L. C. Mercado e comercialização. In. Pêssego, nectarina e ameixa: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Newton Alex Mayer, Rodrigo Cezar Franzon, Maria do Carmo Bassols Raseira (editores) Brasília, DF: **Embrapa**, p.259-271, 2019.
- BELO, E. S. Efeito do Estresse Hídrico no Metabolismo de Gabirobeira. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia- Goiás, p. 131, 2012.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reports**, v.11, p.113-116, 1993.
- COLMER, T. D.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 8, p. 665-681, 2009.
- DIAS-FILHO, M. B. Respostas morfofisiológicas de *Brachiaria* spp. ao alagamento do solo e a síndrome da morte do capim-marandu. Em: BARBOSA, R.A. (Ed.) Morte

de pastos de braquiárias. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, p.83-101, 2006.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 1997.

EDITORIA GAZETA. Notícias. Produção das principais frutas estabiliza em 43 milhões de toneladas, 2020. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/producao-das-principais-frutas-estabiliza-em-43-milhoes-de-toneladas_432666.html, <acessado em dezembro de 2020>.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Agricultural statistics. **Banco de dados**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>, <acessado em 15 de setembro de 2020>.

FERNER, E.; RENNENBERG, H.; KREUZWIESER, J. Effect of flooding on C metabolism of flood-tolerant (*Quercus robur*) and non-tolerant (*Fagus sylvatica*) tree species. **Tree physiology**, v. 32, n. 2, p. 135-145, 2012.

FORCADA, C.; GOGORCENA, Y.; MORENO, M. A. Agronomical and fruit quality traits of two peach cultivars on peach-almond hybrid rootstocks growing on Mediterranean conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 140, p. 157-163, 2012.

GAINZA, F.; OPAZO, I.; GUAJARDO, V.; MEZA, P.; ORTIZ, M.; PINOCHET, J.; MUÑOZ, C. Rootstock breeding in *Prunus* species: Ongoing efforts and new challenges. **O chileno Journal Agriculture Research**, v. 75, 2015.

GARCIA-SÁNCHEZ, F.; SYVERTSEN, J. P.; GIMENO, V.; BOTÍA, P.; PEREZ-PEREZ, J. G. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. **Physiology Plant**, v. 130, p. 532–542, 2007.

GEIGENBERGER, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 247-256, 2003.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Function Plant Biology**, v. 30, p. 1–47, 2003.

GODOY, J. V. Z.; BAUMBACH, M. F.; MELO, C. M.; KOBAYAMA, M. Análise estatística da distribuição de chuvas na região da Bacia Hidrográfica do Rio Maquiné, RS. **Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**. Porto Alegre: ABRH, 2017.

HARGUINDEGUY, I. Respostas fisiológicas à hipóxia e a manganês em clones de eucalipto com tolerância diferencial à Seca de Ponteiros do Vale do Rio Doce. 2013. 39 f. **Dissertação** (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 4, 2013.

HERTER, F. G.; WREGE, M. S.; TONIETTO, J.; FLORES, C. A. Adaptação edafoclimática. In. Pessegueiro. Raseira, M.C.B; Pereira, J.F.M.;Carvalho, L. C. (edts). Brasília, DF: **Embrapa**, p. 45-57, 2014.

IACONA, C.; PISTELLI, L.; CIRILLI, M.; GATTI, L.; MANCINELLI, R.; RIPA, M. N. MULEO, R. Day-length is involved in flooding tolerance response in wild type and variant genotypes of rootstock *Prunus cerasifera* L. **Frontiers in Plant Science**, n. 10, p. 546, 2019.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Tabelas. 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>>. Acessado em: 22 de outubro de 2020.

JACKSON, J. E. The biology of apples and pears. **Cambridge university press**, 2003.

JIMENEZ, S.; DRIDI, J.; GUTIÉRREZ, D.; MORET, D.; ITIGOYEN, J.J.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Physiological biochemical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. **Tree Physiology**, v. 33, p. 1061-1075, 2013.

KREUZWIESER, J.; PAPADOPOULOU, E.; RENNENBERG, H. Interaction of flooding with carbon metabolism of forest trees. **Plant Biology**, v. 6, p.299-306, 2004.

KREUZWIESER, J.; RENNENBERG, H. Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. **Plant, Cell & Environment**, v.37, n.10, p. 2245-2259, 2014.

LIN, T.; ZHENG, H.; HUANG, Z.; WANG, J.; ZHU, J. Non-structural carbohydrate dynamics in leaves and branches of *Pinus massoniana* (Lamb) following 3-year rainfall exclusion. **Forests**, v. 9, n. 6, p. 315, 2018.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; OLIVEIRA, P. V.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência Rural**, v.43, n.1, p.35-41, 2013.

MATELUNA, P.; SALVATIERRA, A.; SOLIS, S.; NUÑEZ, G.; PIMENTEL, P. Involvement of aquaporin NIP1; 1 in the contrasting tolerance response to root hipóxia in *Prunus* rootstock. **Journal of Plant Physiology**, v. 228, p. 19-28, 2018.

MAYER, N. A.; UENO, B. A morte-precoce do pessegueiro e suas relações com porta-enxertos- Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, p. 9-18, 2012.

MAYER, N. A; BIANCHI, V. J.; CASTRO, L. A. S.; Porta enxertos. In. Pessegueiro. Raseira, M.C.B; Pereira, J.F.M.;Carvalho, L. C. (edts). Brasília, DF: **Embrapa**, p. 173-225, 2014.

MAYER, N. A.; UENO, B.; das NEVES, T. R. Vegetative propagation of rootstock selections potentially tolerant to Peach Tree Short Life. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 3, p. 300-308, 2018.

NAKASU, B. Introdução. In: **Pêssego Produção**. Raseira, M.C.B; Centellas-Quezada, A. (Edts). Brasília, DF: Embrapa. p.9, 2003.

NEDEL, M. V. C. A produção de compotas de pêssego em Pelotas-RS: uma análise estratégica da agroindústria Crochemore. Pelotas, 2016. 130 f. **Dissertação** (Mestrado em Agroindústria) – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento territorial e sistemas agroindustriais, Faculdade de Administração e Turismo, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

OLDONI, C. M. Alterações bioquímicas, crescimento e floração do pessegueiro “Barbosa” sobre porta-enxertos clonais. Passo Fundo, 2018, 81 f. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

PARKER, M. L.; RITCHIE, D. F.; REIGHARD, G. L.; CLARK, B.; WEST, R. M. Peach rootstock differences in tree survival from bacterial canker in the southeastern United States. **Acta Horticulturae**, p. 259-264, 2018.

PERATA, P.; ARMSTRONG, W.; VOESENEK, L. A. C. J. Plants and flooding stress. **New Phytologist**, v. 190, n. 2, p. 269-273, 2011.

PICOLOTTO, L.; MANICA-BERTO, R.; PAZIN, D.; PASA, M. D. S.; SCHMITZ, J. D.; PREZOTTO, M. E.; FACHINELLO, J. C. Vegetative, phenological and productive characteristics of peach trees cultivar Chimarrita grafted on different rootstocks. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 583-589, 2009.

PIMENTEL, P.; ALMADA, E.D.; SALVATIERRA, A.; TORO, G.; ARISMENDI, M.J.; PINO, M.T.; PINTO, M. Physiological and morphological responses of Prunus species with different degree of tolerance to long-term root hypoxia. **Scientia horticulturae**, v. 180, p. 14-23, 2014.

PISTELLI, L.; IACONA, C.; MIANO, D.; CIRILLI, M.; COLAO, M.C.; MENSUALI-SODI, A.; MULEO, R. Novel Prunus rootstock somaclonal variants with divergent ability to tolerate waterlogging. **Tree Physiology**, v. 32, p. 355-368, 2012.

RICKES, L. N., KLUMB, E. K., BENITEZ, L. C., BRAGA, E. J. B., & BIANCHI, V. J. Differential expression of the genes involved in responses to water-deficit stress in peach trees cv. Chimarrita grafted onto two different rootstocks. **Bragantia**, v. 78, n. 1, p. 60-70, 2019.

SASIDHARAN, R; HARTMAN, S.; LIU, Z.; MARTOPAWIRO, S.; SAJEEV, N.; VEEN, H. V.; YEUNG, E.; VOESENEK, A. C. J. Signal dynamics and interactions during flooding stress. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p. 1106-1117, 2018.

SCHMITZ, J. D.; BIANCHI, V. J.; PASA, M. D. S.; DE SOUZA, A. L. K.; FACHINELLO, J. C. Vigor e produtividade do pessegueiro ‘chimarrita’ sobre

diferentes porta-enxertos. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 181, 2012.

SILVA NETO, L. F. Pedogênese e matéria orgânica de solos hidromórficos da Região Metropolitana de Porto Alegre. RS: **UFRGS**, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6° edição, 918 p., 2017.

VOESENEK, L. A. C. J.; SASIDHARAN, R. Ethylene–and oxygen signalling–drive plant survival during flooding. **Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 426-435, 2013.

ZHANG, P.; LYU, D.; JIA, L.; HE, J.; QIN, S. Physiological and de novo transcriptome analysis of the fermentation mechanism of *Cerasus sachalinensis* roots in response to short-term waterlogging. **BMC genomics**, v. 18, p. 649, 2017.

ZHOU, C.; BAI, T.; WANG, Y.; WU, T.; ZHANG, X.; XU, X.; HAN, Z. Morphological and enzymatic responses to waterlogging in three *Prunus* species. **Scientia Horticulturae**, v. 221, p. 62-67, 2017.

YANG, B.; PENG, C.; ZHU, Q.; ZHOU, X.; LIU, W.; DUAN, M.; WANG, M. The effects of persistent drought and waterlogging on the dynamics of nonstructural carbohydrates of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings in Northwest China. **Forest Ecosystems**, v. 6, n.1, p. 23, 2019.

CAPÍTULO 1

Alagamento do solo a curto prazo altera o nível de expressão de genes chaves do metabolismo energético em raízes de porta-enxerto Tsukuba 1 (*Prunus sp.*)

1 Introdução

Um dos mais importantes estresses abióticos que causam danos à produção mundial, restringindo o crescimento e o rendimento das culturas, é o encharcamento e/ou alagamento do solo (TUO et al., 2015), o qual pode ser ocasionado por diferentes fatores, incluindo irrigação inadequada, chuvas fortes associadas à textura pesada do solo e drenagens deficientes (BANSAL e SIVRASTAVA, 2015; JIA et al., 2019). Adicionalmente, em diferentes partes do mundo nos últimos 50 anos, vem sendo observado o aumento e a gravidade das inundações (LAL et al., 2019).

Em situações de alagamento, a solução do solo apresenta condições de hipóxia (redução de até 80% da disponibilidade de oxigênio [O₂]), podendo rapidamente evoluir para condições de anóxia (ausência de O₂), devido a água ocupar os poros anteriormente ocupados pelo ar e o O₂ restante ser consumido rapidamente pelas raízes e microrganismos do solo (BAILEY-SERRES e COLMER, 2014). A água também confere uma barreira importante para a difusão de gases, bloqueando a transferência de O₂ livre e outros gases entre o solo e a atmosfera (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008; IACONA et. al., 2013), por consequência impacta nas trocas de gases das raízes.

Na ausência de O₂, que é o receptor final de elétrons na respiração aeróbica, a produção de ATP do sistema radicular das plantas pode ser reduzida drasticamente, devido ao NAD⁺ estar limitado na cadeia transportadora de elétrons, ocorrendo uma crise energética. Quando o NAD⁺ fica aprisionado no estado reduzido (NADH), a glicólise não pode continuar normalmente, portanto, para compensar o déficit energético, um dos mecanismos adotados pelas células vegetais é a ativação da respiração anaeróbica ou fermentativa, que oxida e recicla o NADH, suprindo o NAD⁺ e mantendo o catabolismo do piruvato (KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014). Sendo assim, sob condições de hipóxia/anóxia a manutenção e/ou aumento do metabolismo glicolítico se constitui como a principal rota para a produção de ATP.

Uma característica marcante da hipóxia/anóxia é a transcrição diferencial de genes e a produção de enzimas respiratórias que participam do metabolismo de açúcares, glicólise e fermentação, em respostas adaptativas ao estresse por alagamento (QI et al., 2012; ZHOU et al., 2017). Destas enzimas, três principais são altamente expressas no metabolismo anaeróbico - *lactato desidrogenase (LDH)*, *piruvato descarboxilase (PDC)* e *álcool desidrogenase (ADH)*. Os produtos finais do processamento do piruvato pelo metabolismo fermentativo incluem respectivamente o lactato, acetaldeído e etanol (ISMOND et al., 2003). O piruvato acumulado na glicólise inicialmente é convertido a lactato ou ácido láctico pela *LDH*, no entanto, tem sido sugerido que uma das principais causas de morte das células é o acúmulo de lactato, produto final da ação desta enzima, que influencia na acidificação citoplasmática, pela redução do pH, podendo levar a célula à morte (ZHOU et al., 2017). Em estudos com diferentes genótipos de milho (*Zea mays*), Chugh et al. (2011) sugeriram que a *ADH* é umas das principais enzimas anaeróbicas, pelo fato de continuar a reciclar NADH para manter a produção de ATP na glicólise, configurando maior benefício metabólico por produzir etanol como produto final, sendo que este, diferente do lactato, pode se difundir para fora da célula (Figura 1).

Além das enzimas do metabolismo fermentativo, alterações no aparato enzimático associado à via glicolítica também podem ser afetadas em condições de hipóxia/anóxia. A fase inicial da glicólise em que ocorre a quebra da sacarose pode ser catalisada por duas enzimas, a invertase e *sacarose sintase (SUS)* (TYMOWSKA-LALANNE et al., 1998) (Figura 1).

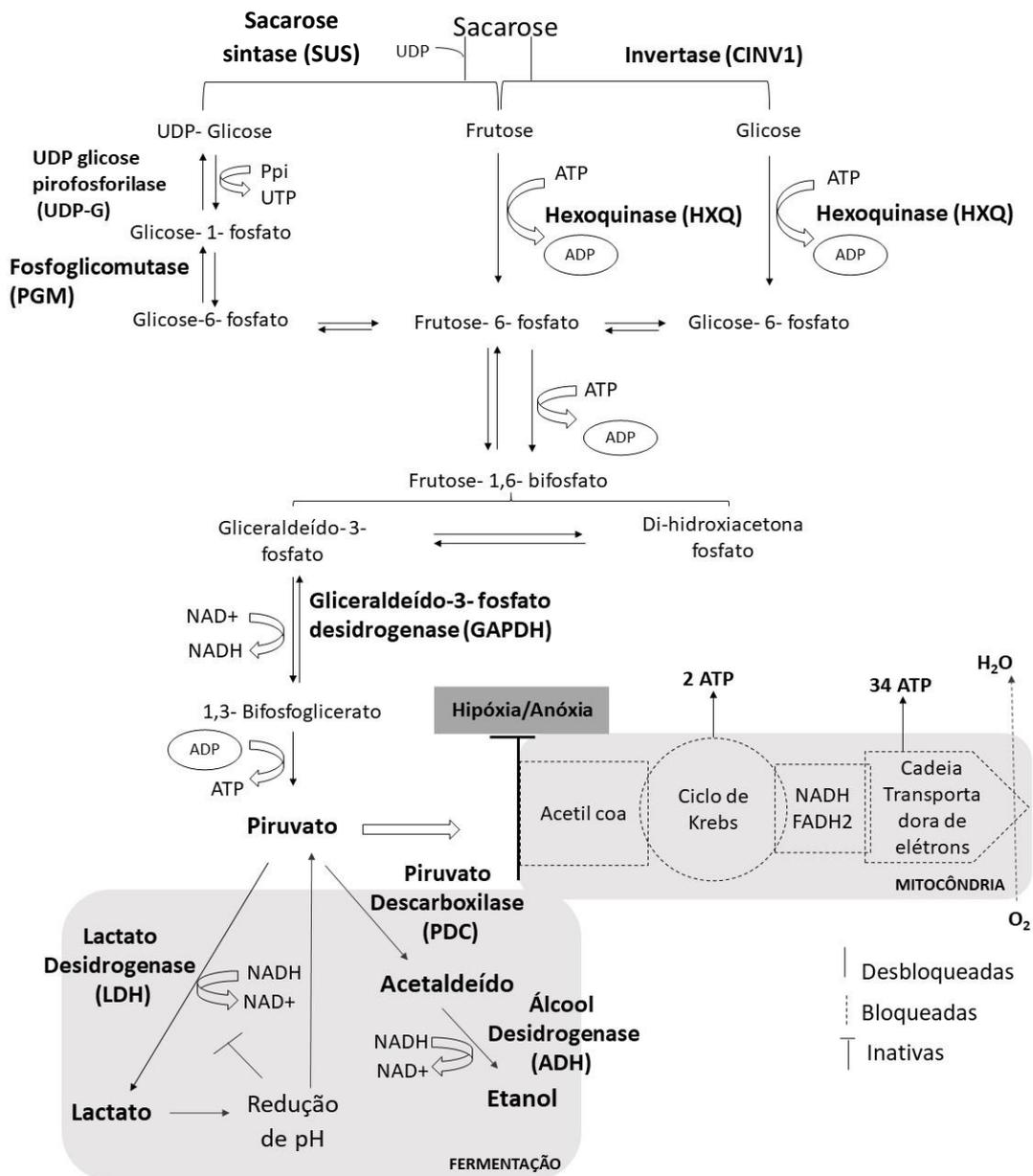


Figura 1. Esquema representativo da respiração diante a condições de hipóxia/anóxia. Inicialmente com o funcionamento da glicólise até a formação de piruvato, posterior bloqueio do ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons, e a ativação da via fermentativa afim de manter o suprimento de NAD⁺ e o funcionamento da glicólise.

Quando em condições normais, o catabolismo da sacarose ocorre principalmente pela invertase, no entanto, diversos estudos vêm demonstrando que a presença da *SUS* em condições de estresse por hipóxia/anóxia é notável, sendo essa via preferida em situações onde a síntese de ATP é limitada devido à baixa disponibilidade de O₂ (BIENIAWSKA et al., 2007). *SUS* catalisa a conversão de

sacarose e UDP em UDP-glicose e frutose em uma reação reversível, sendo adicionado fosfato às hexoses a partir do P_{Pi} e ATP, respectivamente pelas enzimas *UDP-glicose pirofosforilase* (UDPase), e *hexoquinases* (HXK) (Figura 1) (BIENIAWASKA et al., 2007; HIROSE et al., 2008).

Outra enzima que é mais expressa nas condições de anaerobiose e requisitada para a continuação da glicólise, tornando-se necessária para a reposição de ATP na rota glicolítica, é a *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* (GAPDH) (Figura 1), a qual foi avaliada em outros trabalhos com submissão de alagamento do solo, realizados com dendezeiro (NASCIMENTO et al., 2016), milho (PINTO et al., 2005) e espécies de *Prunus*, como pessegueiro e ameixeira (KLUMB et al., 2020). Os entendimentos sobre os padrões de expressão dos genes envolvidos nestas vias, sob condições de estresse pode auxiliar na seleção de porta-enxertos mais tolerante a esta condição de estresse (Figura 1).

Somado à alteração no padrão de expressão de genes e atividade de enzimas associadas ao metabolismo glicolítico e fermentativo, situações de baixa disponibilidade de O₂ alteram diversos outros processos vegetais que prejudicam a produção de energia, dentre estes podem ser citados os processos fisiológicos relacionados às trocas gasosas, como o fechamento estomático, reduções na taxa fotossintética e potencial hídrico foliar (ELSE et al., 2009; PIMENTEL et al., 2014), os quais estão relacionados não somente com a sinalização hormonal, mas principalmente com a crise energética que ocorre no sistema radicular sob estresse por hipóxia/anóxia, reduzindo drasticamente a funcionalidade das aquaporinas e a absorção de íons (TAN et al., 2018; SALVATIERRA et al., 2020).

Dentre as árvores frutíferas pertencentes ao gênero *Prunus* consideradas sensíveis à hipóxia radicular, o pessegueiro é uma das mais suscetíveis às condições de inundações do solo (INSAUSTI et al., 2013; IACONA et al., 2013; MATELUNA et al., 2018). Esta espécie é amplamente cultivada para a produção de frutos, mas também tem grande importância como porta-enxertos na produção de mudas, assim como outras espécies do gênero *Prunus*.

A região sul do Rio Grande do Sul é responsável por 67% da produção nacional de pêssegos (IBGE, 2018), no entanto, o Estado apresenta algumas características que limitam a produção, como o risco de encharcamento e/ou alagamento devido às chuvas excessivas e o solo deficiente em drenagem, principalmente em fases críticas

à cultura como a floração e brotação (MARTINAZZO et al., 2013), o que facilita o acometimento de situações de baixa disponibilidade de O₂ resultando, com isso, em todos os prejuízos à planta citados anteriormente. Outra característica da região que traz prejuízos à cultura é a utilização de porta-enxertos com identidade genética desconhecida, visto que, são obtidos a partir de caroços oriundos das indústrias conserveiras, portanto trata-se de material vegetal com baixa qualidade fitossanitária e sem origem genética conhecida (MAYER et al., 2014).

Embora já tenham sido realizados trabalhos para avaliar a tolerância de porta-enxertos de pessegueiro, ainda há muito a ser estudado quanto aos mecanismos usados pela espécie para tolerar situações de hipóxia/anóxia. Tais trabalhos executados avaliaram também a expressão diferencial de genes, porém a resposta à imposição do estresse foi estudada a longo prazo (RUBIO-CABETAS et al., 2018; KLUMB et al., 2020). Visto que algumas alterações metabólicas e transcricionais em plantas ocorrem em poucas horas após a submissão do estresse, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes envolvidos nos metabolismos glicolítico e fermentativo em raízes de porta-enxertos de *Prunus persica* (cv. Tsukuba 1) em condições de alagamento do solo a curto prazo, afim de elucidar a resposta inicial ao estresse e buscando identificar a ativação inicial da rota fermentativa.

2 Material e Métodos

2.1 Material Vegetal e Condições Experimentais

Plantas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica*), obtidas a partir de sementes, foram transplantadas para recipientes de 500mL contendo substrato comercial (Turfa Fértil-SC), mantidas em casa de vegetação com irrigação adequada e aplicação de solução nutritiva Maxsol (SOUZA et al., 2011) uma vez na semana. Quando as plantas apresentavam cinco meses de idade e uma altura média de 30 cm, foi iniciado o experimento, o qual foi conduzido em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas, no Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas, no mês de outubro de 2019.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, composto por dois tratamentos referentes a condição hídrica do solo: i) controle, sendo as plantas mantidas com irrigação diária, até a capacidade de campo, e ii)

estresse por alagamento do solo, onde os níveis de água foram mantidos 3 cm acima do solo. Cada tratamento foi composto de quatro repetições biológicas e cada repetição foi representada por uma planta. Para as análises, o material vegetal foi coletado em sete momentos de submissão do estresse: controle; 1; 2; 4; 8; 16; e 32 horas de alagamento, o qual teve início às 8 horas da manhã. Após a coleta, as amostras de raízes foram acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento da extração de RNA (Figura 2).

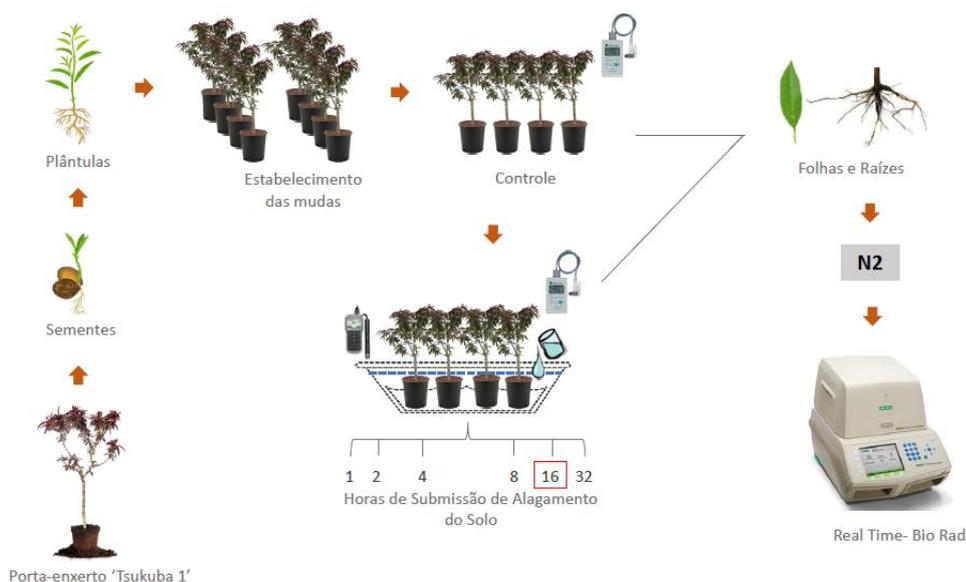


Figura 2. Representação esquemática dos materiais e métodos empregados no experimento com o porta-enxerto 'Tsukuba 1' submetido ao alagamento do solo.

2.2 Análises Fisiológicas

A condutância estomática foi medida com Porômetro (Leaf Porometer - modelo Decagon Devices, Inc 2365 NE Hopkins Ct. Pullman, WA 99163, USA), anteriormente a cada momento de coleta destrutiva, com exceção da coleta realizada às 16h de estresse, devido coincidir com o período noturno. As medições foram realizadas em duas folhas por planta, sendo estas completamente expandidas e saudáveis, localizadas no terço médio do caule, sendo o resultado expresso em $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

A concentração de oxigênio na solução do solo foi medida em todos os períodos de coleta utilizando um medidor de oxigênio dissolvido em água (Oxímetro: Schott-Dissolved Oxygen Meter- HANDYLAB OX1) (Figura 1), sendo o resultado expresso em mg L^{-1} de O_2 na solução.

Os resultados obtidos foram avaliados pelo sistema de análise estatística Sisvar (versão 5.6), onde a análise de variância foi realizada e quando significativas as médias de cada dia de avaliação foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.3. Análise de Expressão Gênica

2.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Os procedimentos que envolveram a extração e manipulação do RNA foram realizados em capela de exaustão, sempre com a utilização de vidrarias e materiais esterilizados.

O RNA total foi extraído a partir de 200 miligramas de material vegetal de acordo com o protocolo de cloreto de lítio (Chang et al., 1993). A concentração e pureza do RNA foram mensuradas em NanoDrop ND-1000, enquanto que a qualidade e integridade foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,0%. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 1,5 µg de RNA total utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), numa reação com volume final de 20 µL utilizando *primers* oligo-dT de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.2. Escolha dos genes alvo e síntese de primers

A escolha dos genes baseou-se em estudos já desenvolvidos por Klumb et al. (2020), além de uma vasta pesquisa na literatura. Após, a síntese de *primers* foi realizada com uso da ferramenta *Primer Designing tool*, do banco de dados do NCBI – *National Center for Biotechnology Information*, sendo suas sequências apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos doze genes e normalizador utilizados nas reações de RT-qPCR em raízes de porta-enxertos 'Tsukuba 1' sob condições de alagamento do solo.

GENE	DESCRIÇÃO	PRIMER FOWARD (5'-3')	PRIMER REVERSE (5'-3')	REFERÊNCIA
<i>CINV1</i>	<i>Invertase citosólica CINV1</i>	TGAATGGTGAGCCTGAGA	GGATAGGGTCGTGAAGAA	ZHANG et al., 2013
<i>SUS</i>	<i>Sacarose Sintase</i>	ATTGGAATGGCGTTGAGT	TTGCCCTTGTAGCAGTGAA	ZHANG et al., 2013
<i>PGM</i>	<i>Fosfoglicomutase</i>	CCCCATCGGATTCTGTAGCC	CTCCTGGCAACTCCCTTCAG	XM_00722235
<i>UDPase</i>	<i>UDP- glicose Pirofosforilase</i>	TGGAGAGCCTTGAAGGTGAT	ACCAAATTTTCATCTGACAGCCA	XM_007221966.2
<i>HXK</i>	<i>Hexokinase 1</i>	AGATGTGGTGGGAGAGCTGA	GTGCCCAATATCACAGCAGC	AF367451.1
<i>GAPDH</i>	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>	ATTTGGAATCGTTGAGGGTCTTATG	AATGATGTTGAAGGAAGCAGCAC	TONG et al. 2009
<i>PDC</i>	<i>Piruvato Descarboxilase</i>	GCTGTTCCCTGAGAAGCGAGTG	TTGTGGATGGCATCAACAAGTC	KLUMB et al., 2020
<i>LDH1</i>	<i>Lactato Desidrogenase 1</i>	GACTCGGCTAACACCATCTTGGA	AGCCAAAACCGCATTACAACGTG	KLUMB et al., 2020
<i>L-LDH</i>	<i>L- Lactato Desidrogenase</i>	CCTCTCCGCAATGTCATCCC	GATTGGTACCTGACCCGACA	Ppa007976m
<i>ADH1</i>	<i>Álcool Desidrogenase 1</i>	GGGATCTTCAGTTGCTGTCTTTGG	CACTGGTTTGCATGGTCCCTTTGG	PISTELLI et al., 2012
<i>ADH2</i>	<i>Álcool Desidrogenase 2</i>	GCTGCCTTTATTTCCAACCA	GTATGACCTGTCCAACAGCA	PRUPE_8G207300
<i>ADH4</i>	<i>Álcool Desidrogenase 4</i>	AGCTCAACGAGCCTTTCCTC	ATTGGAATCACACGGTCCCC	PRUPE_8G207100
<i>TEF2- Normalizador</i>	<i>Fator de alongamento da tradução 2</i>	GGTGTGACGATGAAGAGTGATG	TGAAGGAGAGGGAAGGTGAAAG	TONG et al., 2009

2.3.3. Reações de RT-qPCR e Quantificação Relativa

O volume total para cada reação de RT-qPCR foi de 12 µL, sendo 6,25 µL do fluoróforo SYBR Green (Invitrogen®), 0,25 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*, 10 µM cada), 1 µL de cDNA (diluição 1:5, previamente definida), 4,15 µL de água ultra pura e 0,1 µL de ROX. A amplificação foi padronizada em equipamento CFX-96 Real Time Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizando-se as seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência. Foram utilizadas quatro repetições biológicas para cada tempo de coleta.

A partir dos valores de CT (*Cycle Threshold*) obtidos, foram calculados os valores de Quantificação Relativa de Expressão (QR), através da seguinte equação: $QR = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Como normalizador interno da reação foi utilizado o gene *TEF2* para raiz, definido em análise prévia com um conjunto de oito potenciais genes normalizadores (dados não apresentados).

2.3.4. Especificidade e Eficiência dos primers

A especificidade dos *primers* foi avaliada através da curva de dissociação (*melting curve*), sendo mantidos neste estudo somente aqueles *primers* com *amplicons* específicos, ou seja, com um único pico de dissociação das fitas dos produtos da PCR, representados na Tabela 2 através de sua temperatura de *melting* (T^am). A eficiência da PCR (E) foi obtida a partir de quatro diluições seriadas de cDNA (1:1; 1:5; 1:25 e 1:125) para gerar a curva padrão de cada par de *primer* testado. O valor de E foi estimado pela equação $E = 10^{(-1/slope)}$ (RASMUSSEN, 2001), onde o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida da regressão entre os valores de Ct (*Cycle Threshold*) dos transcritos e os valores do logaritmo das diferentes diluições de cDNA (curva padrão de eficiência), sendo considerados aceitáveis valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110% (Tabela 2).

Tabela 2. Eficiência de PCR (E) e especificidade (T^{am}) de treze genes (normalizador e alvos) em raízes de porta-enxertos de 'T sukuba 1' submetidos ao alagamento do solo.

Gene	Tecido	E	T ^{am}
Normalizador <i>TEF2</i>	Raiz	2,04	82,96
<i>CINV1</i>	Raiz	1,0*	82,00
<i>SUS</i>	Raiz	2,41	82,00
<i>PGM</i>	Raiz	2,17	80,48
<i>UDPase</i>	Raiz	2,16	75,82
<i>HXK</i>	Raiz	2,18	79,86
<i>GAPDH</i>	Raiz	2,09	82,17
<i>PDC</i>	Raiz	1,93	81,91
<i>LDH1</i>	Raiz	1,86	80,41
<i>L-LDH</i>	Raiz	2,27	86,39
<i>ADH1</i>	Raiz	2,10	80,64
<i>ADH2</i>	Raiz	2,13	78,50
<i>ADH4</i>	Raiz	2,28	80,42

3 Resultados

A concentração de oxigênio foi medida na solução do solo a cada período de coleta, sendo realizadas duas medições extras entre as coletas das 16h e 32 horas, de forma a abranger mais tempos de avaliação e ampliar os resultados do experimento (Figura 3). A primeira medição (logo após submissão do estresse) apresentou o valor de 7,67 mg L⁻¹ de O₂ na solução, entretanto, a segunda medição (1h de exposição ao estresse) a concentração de O₂ na solução já obteve queda de 8,47%, apresentando valores de 7,02 mg L⁻¹. À medida que passava o tempo de imposição de estresse, os valores de concentração de O₂ seguiram em declínio, onde a medição das 27h e 32h de experimento revelou uma redução de 57,5% de O₂ na solução (3,26 mg L⁻¹). A temperatura apresentou resultados compatíveis com os horários, sendo inicialmente de 22,8°C começando a ter elevação no tempo de 2h após a submissão do estresse por alagamento, obtendo um aumento no tempo de 8h (30,7°C), vindo a declinar no

tempo de 16h (21,9°C) devido ao período noturno, voltando a subir, demonstrando o maior valor na última medição às 32h (31,4 °C).

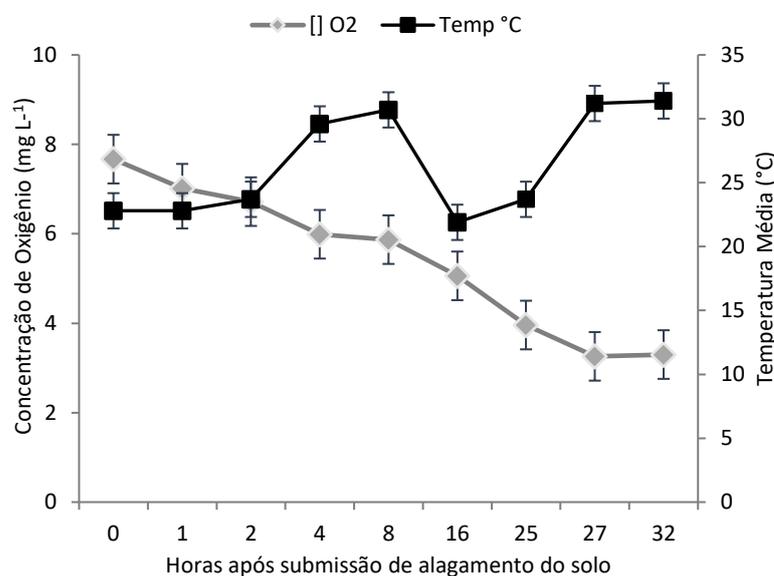


Figura 3. Concentração de oxigênio na solução do solo e temperatura do ambiente medidas nos sete períodos de coleta e dois períodos compreendidos entre as coletas das 16h/32h do experimento de submissão de 'Tsukuba1' ao estresse por alagamento de curto prazo. As barras indicam erro (n=4).

Na figura 4 são apresentados os dados de condutância estomática registrados com porômetro nas condições de controle e estresse por alagamento do porta-enxerto de 'Tsukuba 1'. Observa-se que ocorreu redução significativa dos valores de condutância após 8h de estresse, onde as plantas apresentaram valores de 205,612 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ e 110,125 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ para controle e alagamento, respectivamente. Seguindo o mesmo padrão, as avaliações de 25 e 27 horas de estresse, plantas estressadas também apresentaram redução significativa nos valores quando comparadas com o controle. De acordo com a Figura 3, a temperatura atinge os maiores valores nos tempos de 27 e 32 horas (31,2°C e 31,4°C, respectivamente), é possível que esta condição interfira no comportamento da condutância, juntamente ao período de estresse imposto as plantas.

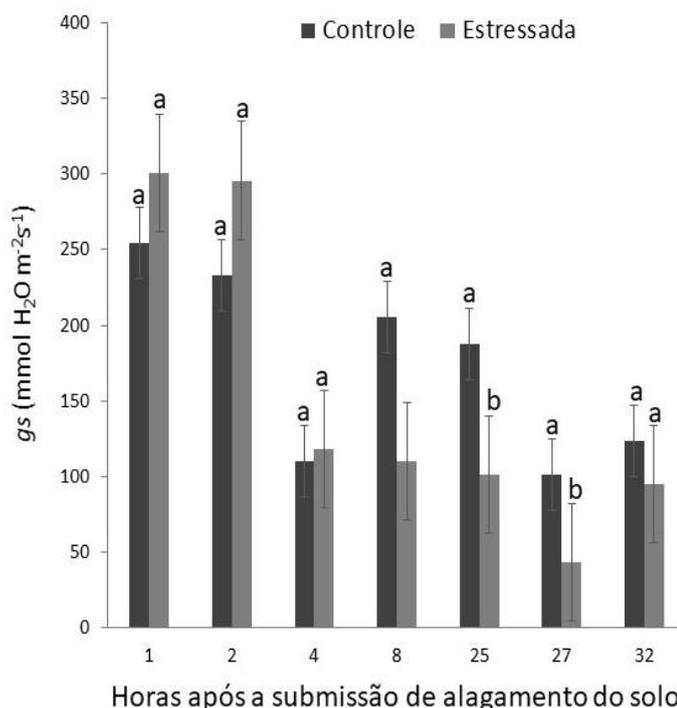


Figura 4. Condutância estomática (gs) de porta-enxertos 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo à curto-prazo. As barras indicam o erro padrão da média das três repetições. Médias comparadas dentro de cada medição para a cultivar e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).

Os dados de expressão gênica apresentam-se baseados nos valores de quantificação relativa (QR), onde QR=1,0 representa o controle; valores de QR abaixo de 1,0 representam regulação negativa (*down-regulated*); e valores acima de 1,0 correspondem a regulação positiva (*up-regulated*).

A QR de *sacarose sintase* (*SUS*) apresentou valores de expressão positiva durante todas as avaliações feitas no experimento, ocorrendo flutuação nos valores, sendo na primeira hora após a submissão ao alagamento QR= 31,50, mantendo a elevação até 2 horas de estresse (QR= 172,73), ocorrendo uma queda as 4 e 8 horas (41,99 e 35,56, respectivamente), voltando a elevar as 16h com o maior valor de QR (548,79) e posteriormente declinando (32h) (Figura 5A).

O gene da *Invertase citosólica* (*CINV1*) manteve os valores próximos ao controle, apresentando expressão *up-regulated* até as 4h do experimento, onde no tempo 8h da submissão ao alagamento ocorreu expressão *down-regulated* (0,90), voltando a aumentar a expressão após 16 horas, obtendo o maior valor (7,70) às 32h de submissão (Figura 5B).

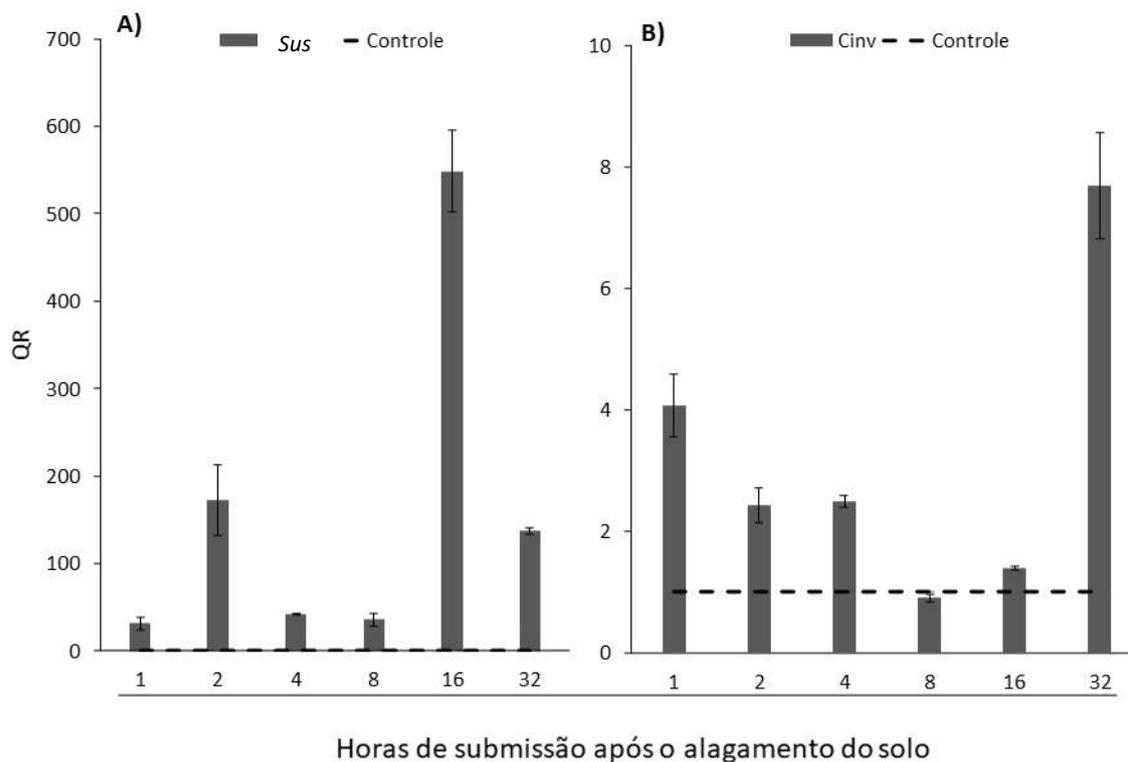


Figura 5. Quantificação Relativa (QR) de *SUS*(A) e de *CINV1* (B) em raízes de porta-enxertos de 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo à curto prazo. A linha tracejada representa o controle (QR=1) das amostras no tempo zero. As barras indicam o erro padrão (n=4).

A QR de *uridina difosfato glicose pirofosforilase (UDPase)* apresentou-se *up-regulated* já na primeira hora após a submissão do alagamento (QR=1,31), mantendo a ascendência às 2h de estresse (Figura 6A). Os valores de QR obtiveram uma leve queda às 4h, voltando a aumentar às 8h e mantendo a ascendência até as 32h de submissão de alagamento, onde foi observado o maior valor de expressão (QR=5,66).

A *hexoquinase (HXK)* obteve o mesmo padrão de comportamento que a *UDPase* em relação ao controle (valores sempre *up-regulated*), ocorrendo uma elevação já na primeira hora de submissão, mantendo com 2h de estresse com o maior valor de QR (18,34) (Figura 6A). Com 4h ocorreu uma queda, voltando a elevar-se fortemente com 16h e posteriormente decresceu as 32h de estresse (QR=7,64). Em termos comparativos, os valores de expressão dos genes codificadores das enzimas apresentadas na figura 6A apresentaram comportamento semelhante, no entanto, a *hexoquinase* obteve maiores valores de QR, nos tempos de 1; 2; 4; 16; 32 horas após a submissão do alagamento (QR=7,65; 18,34; 7,44; 17,64 e 7,64 respectivamente).

O gene codificador da *fosfoglicomutase* (*PGM*) apresentou regulação positiva em todo o experimento, sendo que no tempo de 4h após a submissão do alagamento a expressão foi menor (1,21). Os maiores valores de QR ocorreram as 2h e 16 horas após a submissão do alagamento (17,41 e 15,89 respectivamente) (Figura 6B).

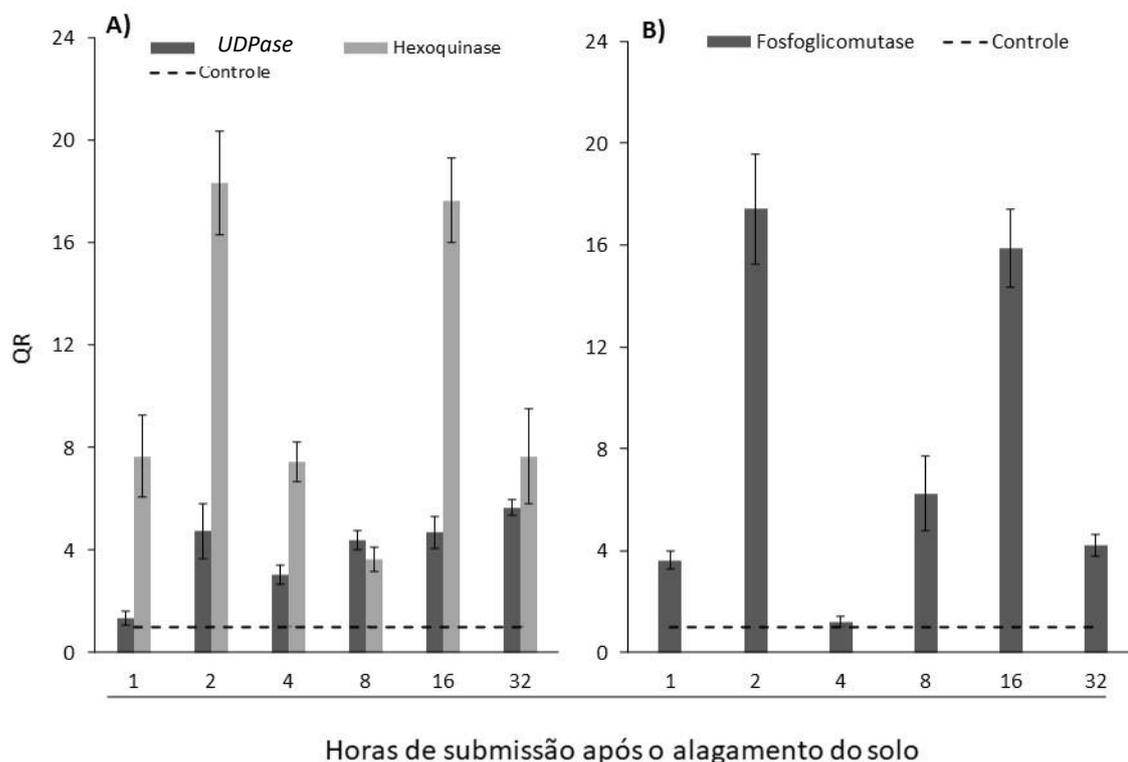


Figura 6. Quantificação Relativa (QR) de *UDPase* e *Hexoquinase* (*HXK*) (A) e *Fosfoglicomutase* (*PGM*) (B) em raízes do porta-enxerto 'Tsukuba 1' submetido ao estresse por alagamento do solo à curto prazo. A linha tracejada representa o controle QR=1 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=4).

Com relação ao gene da *GAPDH* a quantificação relativa foi *up-regulated*, mantendo uma elevação da expressão de 1h até as 8h pós submissão ao alagamento, obtendo o maior valor de expressão relativa às 8h (QR=16,50) e ocorrendo uma queda acentuada às 16 e 32 h de experimento (15,68 e 9,40 respectivamente) (Figura 7A).

A expressão gênica de duas isoformas de *LDH* (*LDH1* e *L-LDH*) apresentaram comportamentos semelhantes durante o experimento (Figura 7B), sendo observado que o gene da *LDH1* teve oscilações nos valores de quantificação relativa, obtendo os maiores valores após 2 e 32 horas de submissão ao estresse por alagamento (QR de 6,32 e 9,85, respectivamente), sendo *down-regulated* com 1h do experimento. Por outro lado, *L-LDH* apresentou o mesmo comportamento no tempo de 1h de estresse

que a *LDH1*, apresentando um aumento crescente na expressão, alcançando o maior valor de QR= 11,83 às 32h após a submissão do alagamento. Para ambos genes a regulação foi negativa somente no tempo de 1h em todas as avaliações.

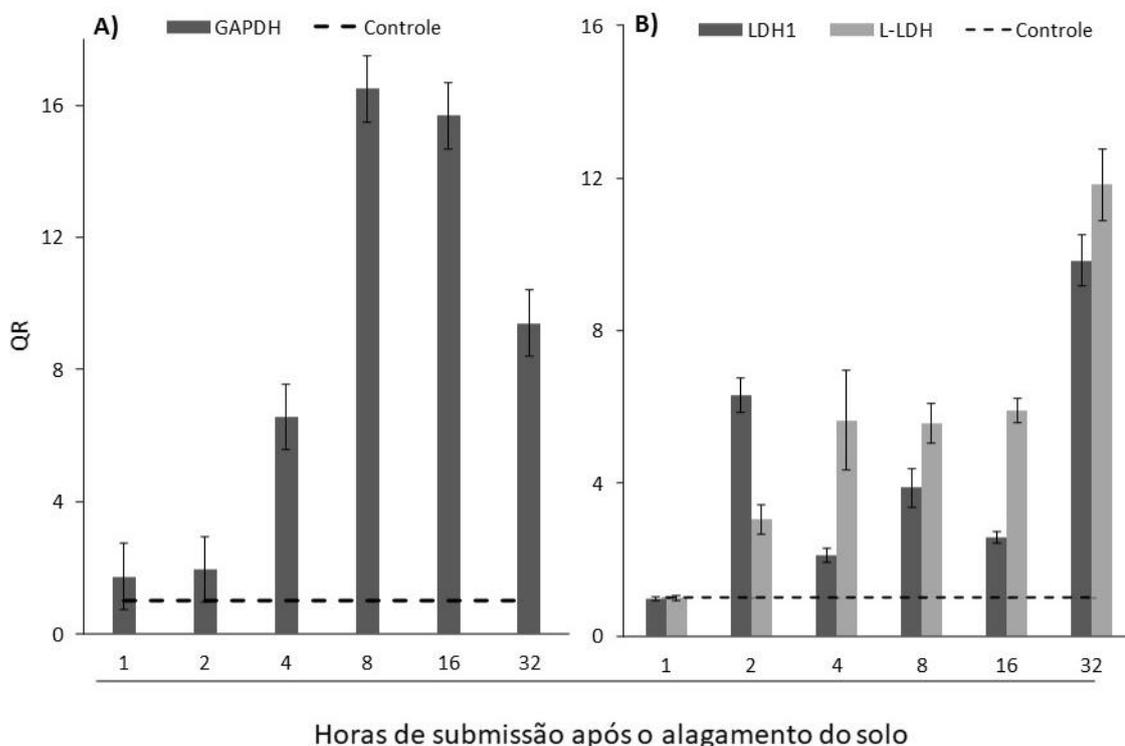


Figura 7. Quantificação Relativa (QR) de *GAPDH* (A) e de *LDH1* e *L-LDH* (B) em raízes de porta-enxertos de 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo à curto prazo. A linha tracejada representa o controle (QR=1) das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=4).

Para *PDC* a quantificação relativa foi positiva durante todo o experimento. Os valores apresentados nas horas iniciais (1 e 2 horas de submissão de estresse) não foram tão elevados quando comparados aos demais tempos, onde os valores apresentaram-se superiores a 100, obtendo o maior valor com 8h de estresse (QR=642,75) e exibindo uma queda as 16h (QR=565,88) e 32h (QR=365,2) (Figura 8A).

Foram avaliados três diferentes isoformas de *ADH* (*ADH 1*; *ADH 2* e *ADH 4*), que estão representadas na figura 8B. O gene *ADH1* apresentou regulação negativa na primeira hora de submissão ao estresse, vindo a ocorrer uma elevação da QR nos demais tempos de avaliação, obtendo o maior valor de expressão com 32h (QR=10,65). Para *ADH2* a quantificação foi sempre *up-regulated* durante o experimento e foi a isoforma com maiores valores de expressão, obtendo maior

expressão (8h e 32 h) em que os valores de QR foram 36,54 e 35,32 respectivamente. A expressão de *ADH4* foi inferior as demais isoformas, apresentando QR *down-regulated*, em três tempos (1, 8 e 16h), e nos demais tempos de avaliação a expressão foi *up-regulated*, porém com valores de QR inferiores em comparação com as demais isoformas avaliadas.

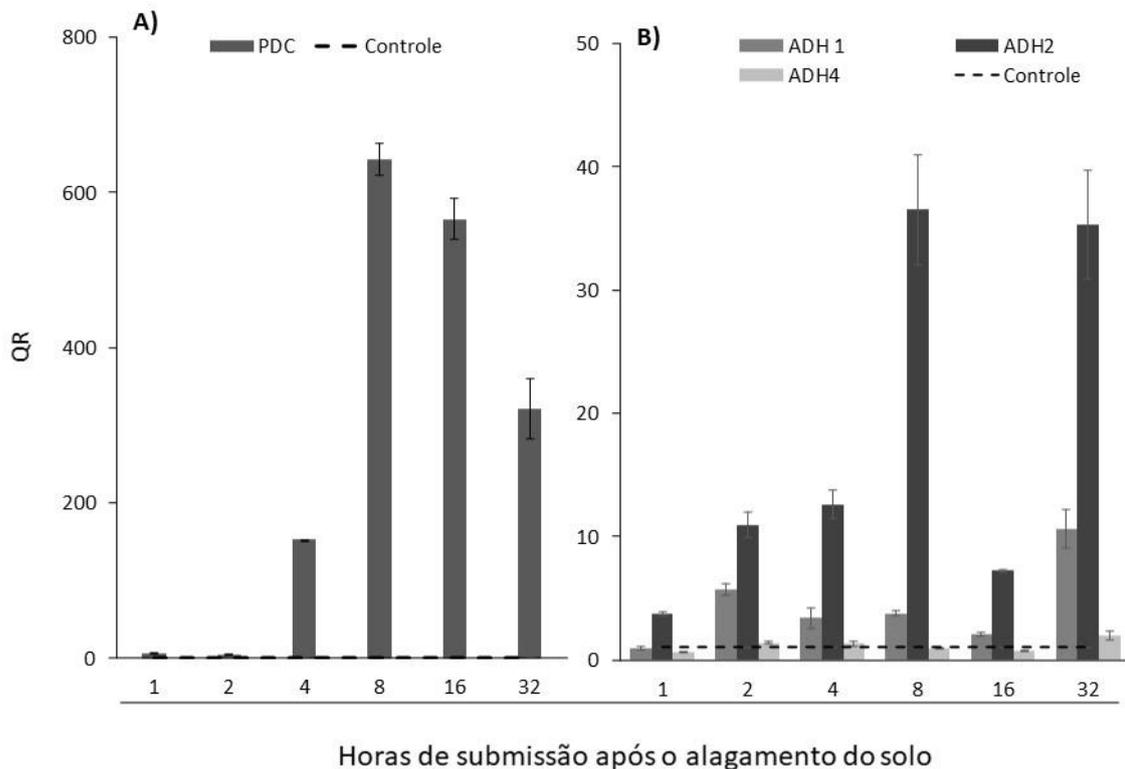


Figura 8. Quantificação Relativa (QR) de *PDC* (A) e *ADH 1*, *ADH 2* e *ADH 4* (B) em raízes de porta-enxertos de 'Tsukuba 1' submetidos ao alagamento do solo à curto prazo. A linha tracejada representa o controle (QR=1) das amostras no tempo zero. As barras indicam o erro padrão (n=4).

4 Discussão

Buscando caracterizar as respostas transcricionais iniciais ao estresse por alagamento do solo em plantas de *Prunus persica*, foi realizada a quantificação relativa da expressão de genes-alvo envolvidos nos metabolismos glicolítico e fermentativo em raízes do porta-enxerto 'Tsukuba1' em períodos de curto prazo de estresse.

Quando em situações de alagamento, pode ocorrer uma baixa disponibilidade de oxigênio na rizosfera, ocasionando situações de hipóxia/anóxia para os tecidos das raízes, devido os poros do solo estarem ocupados por água ao invés de ar. Nestas

condições ocorre limitação na difusão de gases entre o solo e a atmosfera, especialmente o O₂, cuja a difusão é 10.000 vezes menor na água do que no ar (COLMER e VOESENEK, 2009). Em adição a baixa difusão de gases, o oxigênio restante é rapidamente consumido pelos micro-organismos do solo, que tem sua atividade respiratória intensificada com o aumento da temperatura (PONNAMPERUMA, 1972). No estudo em questão esta condição é notória, onde a concentração de O₂ foi monitorada durante todo o experimento, sendo observada a redução desta, em torno de 57,5%, até as 27 e 32 horas após a submissão do alagamento (Figura 3).

Um dos prejuízos causados pela hipóxia nas plantas é a redução da condutividade hidráulica da raiz prejudicando a captação de água, e causando um déficit hídrico interno, levando a alterações de fatores hidráulicos das células estomáticas (conteúdo de água, potencial hídrico e pressão de turgor), e assim ocorrendo o fechamento estomático, que também é regulado por processos metabólicos (como aos relacionados a produção de ABA) (PARENT et al., 2008; LAWLOR e TEZARA, 2009).

O fechamento estomático é considerado como uma das respostas ao estresse, devido este mecanismo reduzir a perda de água através da transpiração, aumentando a resistência das folhas para que a planta mantenha seu status hídrico de forma a tolerar ao estresse imposto (LAWLOR e TEZARA, 2009).

No entanto, diante ao fechamento estomático ocorre a redução da fixação de CO₂ e a baixa transpiração, associada a alterações no conteúdo de clorofila, senescência e área foliar reduzida, ocorre um declínio das taxas fotossintéticas. Além de que, com a deficiência de ATP (adenosina trifosfato) e RuBP (1,5-bifosfato de ribulose), ocorre a inibição da RubisCo (ribulose-1-5-bifostato carboxilase/oxigenase), comprometendo o ciclo de Calvin e o acúmulo do primeiro aceptor de elétrons, NADPH, tornando ineficiente a utilização de toda a energia luminosa, aumentando a suscetibilidade à fotoinibição (MALIK et al., 2001; ELSE et al., 2009; SHAO et al., 2013). O fechamento estomático como resultado do alagamento do solo foi descrito por diferentes autores no gênero *Prunus* (AMADOR et al., 2012; INSAUSTI; GORJÓN, 2013; PIMENTEL et al., 2014; ZIEGLER et al., 2017).

Ziegler et al. (2017) concluíram que, dentre os genótipos avaliados do gênero *Prunus*, o porta-enxerto 'Nemared' (*Prunus persica*) foi o mais suscetível a condições

de alagamento do solo por apresentar redução na condutância estomática de 69% e 82% no primeiro (24h) e segundo (48h) dias, respectivamente.

Para o nosso estudo, a condutância estomática nas plantas alagadas apresentou diferenças estatísticas em relação às plantas controle às oito horas de submissão ao alagamento (Figura 4), mantendo este padrão até as 27 horas, onde observou-se a menor condutância estomática, diante a temperatura mais elevada do período de experimento. Há evidências de uma relação direta entre temperatura e condutância estomática, quanto mais alta a temperatura, menor a condutância (KLUMB et al., 2017).

Respostas moleculares são observadas diante ao estresse causado pelo alagamento do solo, com a alteração no padrão de expressão de genes e, especialmente daqueles envolvidos no metabolismo da glicólise e fermentação (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008; ALVES et al., 2013). Segundo Dennis et al. (2000), a indução destes genes é fundamental para estimular processos associados a produção de energia contínua em *Prunus*, ocorrendo no que eles determinam de segundo estágio, entre 4-24 horas após o estresse por alagamento. Portanto, buscar identificar genes e produtos gênicos que atuam nas respostas iniciais ao estresse, pode ser a chave para a tolerância em espécies de *Prunus*.

O O₂ é o aceptor final na cadeia de elétrons mitocondrial, porém quando em condições de alagamento suas concentrações dentro da planta decaem significativamente, bloqueando o transporte de elétrons e, conseqüentemente, reduzindo a produção de ATP pela fosforilação oxidativa mitocondrial (VAN DONGEN et al., 2011). Com isso, a glicólise torna-se a via essencial para a produção de ATP durante o estresse por alagamento, com o auxílio da ativação de enzimas presentes no metabolismo fermentativo. Embora, o rendimento energético seja reduzido na respiração anaeróbica (2 a 4 moléculas de ATP por glicose), em comparação com a respiração mitocondrial aeróbica (30 a 36 moléculas de ATP glicose) (ASHRAF, 2012), este mecanismo permite que a planta mantenha a sobrevivência celular, devido a fermentação reciclar NAD⁺ permitindo que a glicólise siga com a produção de ATP, mesmo as custas de um alto consumo de substratos respiratórios.

Em condições de privação de oxigênio, a *SUS* foi descrita como substituta da *Cinv 1* na clivagem da sacarose, ficando responsável pelo fornecimento de carboidratos para a glicólise (STEIN e GRANOT, 2019). Em plantas do gênero *Prunus*

spp. há evidências de que a SUS é ativada, diante do alto consumo de carboidratos durante o estresse e a redução de açúcares (SHENG et al., 2017).

Os valores de expressão relativa da *SUS* aumentaram rapidamente (Figura 5A) em comparação a *Cinv 1* (Figura 5B) neste estudo, demonstrando o papel da *SUS* sob estresse por hipóxia. Do ponto de vista energético esta substituição é aceitável e favorável para a célula, visto que a clivagem da sacarose pela via da *SUS* consome somente uma molécula de ATP para fosforilar as duas hexoses produzidas, sendo a fosforilação realizada com PPi, enquanto que pela via da *invertase* são utilizadas duas moléculas de ATP (BAILEY- SERRES e VOESENEK, 2008). Estes resultados foram similares aos encontrados em um estudo com pepino (*Cucumis sativus* L.) sob condições de hipóxia (WANG et al., 2014).

Em nosso estudo não foi possível obter um bom valor para a eficiência do gene *Cinv 1*, conforme descrito na tabela 2, no entanto, foi realizada a avaliação da expressão do gene para as condições experimentais impostas. Os valores de expressão das invertases neste estudo foram baixos (Figura 5 B), porém, é possível que esta via tenha se mantido ativa durante o experimento. Uma possibilidade é a ação de outras invertases, uma vez que, somente a *Cinv 1* apresentou expressão neste estudo, sendo que as demais avaliadas não tiveram resultados consistentes (dados não apresentados). Existem três diferentes tipos de invertases, dependentes de sua solubilidade, localização e pH ótimos, sendo, *invertases vacuolares (VINV)*, de *parede celular (CWINV)* e *citossólicas (CINV1)* (TIMOWSKA-LALANNE et al., 1998). O aumento expressivo da *Cinv1* com 32 horas pode ser explicado devido a possível oxigenação da água ao final do experimento.

Segundo Arora et al. (2017), as *hexoquinases (HXK)* são as únicas enzimas vegetais capazes de fosforilar a glicose e frutose, portanto, são consideradas muito importantes para manter o fluxo glicolítico em condições de alagamento do solo. Diante das nossas condições experimentais, a expressão das *HXK* foi alta (Figura 6 A), e isto auxilia na hipótese de que a via das *invertases* esteja ativa, devido as *HXK* fosforilarem frutose e glicose, que são produtos do catabolismo da sacarose pelas *invertases*, para a formação de Frutose 6-P e Glicose 6-P, com a utilização de dois ATPs (MELLO, 1998). No entanto, as *HXK* também podem utilizar a frutose proveniente da clivagem da sacarose pela enzima *SUS*, que utiliza uma molécula de uridina difosfato (UDP) para a formação de Frutose 6-P (TAIZ E ZEIGER, 2017).

Portanto, é possível que ambas vias tenham sido ativadas, utilizando das *HXK* para fosforilar a frutose. Resultados semelhantes foram encontrados por Mello et al. (2001) em um estudo com *C. zedoaria* e *P. vulgaris*.

A *fosfoglicomutase (PGM)* é uma enzima presente na via da *SUS* e pode atuar em duas direções: na síntese e consumo de sacarose. Duas isoformas de fosfoglicomutase estão presentes nas plantas, uma localizada no citosol e o outro no estroma do cloroplasto (MANJUNATH et al., 1998).

Em nosso estudo o gene codificador da enzima *PGM* apresentou expressão semelhante ao gene que codifica para a *SUS*, principalmente nos tempos com duas e 16 horas de estresse (Figuras 5A, 6B). É possível inferir a este resultado que a via alternativa da *SUS* tenha sido ativa com duas horas após a submissão do estresse afim de economizar ATP, e com 16 horas ocorreu uma aceleração da sua atividade, devido este período coincidir com a noite (escuro), e assim não ocorrer fotossíntese e consequentemente haver redução do substrato respiratório (carboidratos), sendo acompanhada pela enzima *PGM*, presente na via da *SUS*. Em um estudo com dois porta-enxertos de *Prunus*, 'Mariana 2624' (tolerante) e 'Mazzard F12' (sensível), Salvatierra et al. (2020) demonstraram que porta-enxertos tolerantes apresentam expressão *down-regulated* da enzima fosfoglicomutase, diferentemente dos porta-enxertos considerados sensíveis, atribuindo à este resultado uma possível inibição da via da gliconeogênese, a qual atua na conversão inversa de substratos em glicose diante à condições de hipóxia, afim de manter o fornecimento de carboidratos.

Por sua vez, a enzima *GAPDH* (dependente de NAD⁺) tem importante papel na glicólise, sendo ela responsável pela conversão do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3 bifosfoglicerato e NADH e esta reação pode ser inversa. Também, é a partir desta etapa que a rota glicolítica consegue extrair energia dos substratos orgânicos através da produção de ATP e NADH. No presente estudo, o gene codificador da enzima *GAPDH* apresentou expressão positiva em todo o experimento, destacando-se nos tempos de oito e 16h de submissão ao alagamento, pelos maiores valores de expressão (Figura 7A). Portanto, a partir do exposto, sugere-se que ocorra o aumento da atividade da glicólise em plantas sob condições de hipóxia.

Albina et al. (1999) e Marcondes (2009) destacam que a enzima *GAPDH* está relacionada ao aumento do fluxo glicolítico, também conhecido como efeito *Pasteur*, para a conversão de hexoses a piruvato o mais rápido possível, principalmente para

manter os níveis de ATP adequados na ausência de oxigênio. No entanto, essa aceleração causa rápida depleção nas reservas de carboidrato (BASHAR et al., 2020).

Em situações de alagamento a respiração radicular fica prejudicada, ocorrendo a inibição da fosforilação oxidativa devido à baixa concentração de oxigênio, sendo esta via responsável por boa parte da produção de ATP para a célula vegetal, e também por reciclar poder redutor [NAD(P)H e FADH]. Como resultado desta inibição, ocorre o acúmulo de elétrons, assim como NADH, prejudicando o funcionamento da enzima *GAPDH*, devido ao não suprimento de NAD⁺, e assim inibindo a atividade da glicólise (BUI et al., 2019). Partindo disto, as plantas precisam reprogramar outras vias alternativas como parte do mecanismo de adaptação em condições de hipóxia. Estas vias devem regenerar o poder redutor (NAD⁺), que é o cofator da enzima *GAPDH* para a reoxidação e reciclagem de NADH, permitindo que a glicólise continue (MANCUSO e MARRAS, 2006).

A principal via alternativa para manter a regeneração de NAD⁺ é denominada via da fermentação anaeróbica, que é considerada um ajuste de curto prazo para permitir a manutenção da produção de ATP pela glicólise, e através do aumento na transcrição de genes e ativação das enzimas *LDH*, *PDC* e *ADH*, que atuam no catabolismo de piruvato até lactato ou etanol, regenerando NAD⁺ (ZHANG et al., 2017). No entanto, esta via pode causar queda na produção de ATP, redução de pH, acidificação do citoplasma e produção de subprodutos metabólicos prejudiciais quando em excesso, como o lactato e etanol, sendo o lactato mais danoso devido difundir-se mais lentamente, podendo causar a morte celular (ZHOU et al., 2013; KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014).

Com a ativação da via fermentativa, inicialmente o piruvato é reduzido a ácido láctico pela *lactato desidrogenase (LDH)* com uma oxidação concomitante de NADH, devido ao pH alcalino do citoplasma, visto que, a *LDH* atua em uma faixa ótima de pH em torno de 7,4 (TADEGE et al., 1999). Partindo disto, avaliar plantas de *Prunus* em situação de alagamento à curto prazo nos permite identificar o começo das respostas ao estresse. Um estudo desenvolvido por Ren et al. (2017) apoiam esta ideia, visto que, em seu trabalho propuseram que a *LDH* é ativada em estágios iniciais à hipóxia radicular devido ao alagamento em plantas de *Sesbania cannabina*, até as três horas de estresse, após este período ativando a *ADH*.

Em nosso estudo, foram avaliados dois genes que codificam para isoformas diferentes da enzima *LDH* (*LDH1* e *L-LDH*). Estes genes apresentaram comportamentos semelhantes entre si diante das condições do experimento. Segundo os dados obtidos, com duas horas de estresse a expressão de *LDH* apresentou-se elevada, podendo assim atribuir a este fato o início da ativação da via fermentativa láctica com a ativação desta enzima (Figura 7B).

No entanto, devido ao alto acúmulo de lactato que, em excesso, é prejudicial as células vegetais e pode causar a morte das plantas. Em um estudo com plantas de *Prunus*, Zhou et al. (2013) relataram que *P. amygdalus* priorizou a fermentação láctica, prejudicando a atividade das enzimas *PDC* e *ADH* e induziu a acidificação citoplasmática, causando prejuízos as plantas desta espécie. Neste mesmo estudo, plantas de *Prunus persica* apresentaram comportamento diferentes, vindo a priorizar a fermentação etanólica. Kreuzwieser et al. (2009) identificaram que a fermentação etanólica resultou na produção de energia com cinco horas de estresse após o alagamento, em plantas de álamo cinza.

Em nosso estudo, ambas isoformas de *LDH* apresentaram alta expressão com 32 horas de imposição ao estresse, é possível que diante ao tempo de exposição, esteja ocorrendo um acúmulo de acetaldeído/etanol pela via da *PDC/ADH* e, portanto, o retorno da oxidação do piruvato pela *LDH* seja necessário afim de evitar este acúmulo. O acúmulo de etanol no sistema radicular pode danificar severamente as raízes, como descrito por Gu et al. (2020) em um estudo com *Prunus persica*.

A fermentação etanólica é ativada com a acidificação do pH citoplasmático, de forma a manter o equilíbrio do pH em torno de 6,8, portanto é possível atribuir ao pH o direcionamento das vias metabólicas de *LDH* ou *PDC/ADH* (ZHANG et al., 2017). Esta via ocorre através da transcrição de genes codificadores da enzima piruvato descarboxilase (*PDC*), a qual atua na conversão do piruvato em acetaldeído que, por sua vez, é reduzido a etanol pela álcool desidrogenase (*ADH*) (SAIRAM et al., 2008; XU et al., 2016; RUBIO-CABETAS et al., 2018).

A expressão do gene que codifica para a enzima *PDC* começou a apresentar valores de QR relativamente altos com quatro horas de estresse (Figura 8A), demonstrando alterações metabólicas e transcricionais importantes, resultado que corrobora com a hipótese da mudança do metabolismo láctico para etanólico, como descrito anteriormente.

Neste estudo a expressão relativa de *PDC* não foi acompanhada com a mesma intensidade pelos níveis de expressão da *ADH*, demonstrando desconformidades na relação destas duas enzimas, o que ocasionaria acúmulo de acetaldeído e a não formação de etanol (Figura 8A e 8B). Foram avaliadas diferentes isoformas de *ADH*, afim de reduzir a lacuna desta desconformidade, conforme foi questionado por Klumb et al. (2020), em um estudo com *Prunus* com resultados semelhantes. Porém, mesmo com a avaliação de diferentes isoformas de *ADH*, a expressão destes genes não acompanhou os níveis de expressão de *PDC*, sendo que a isoforma *ADH2* foi a mais expressa neste estudo.

Para Bui et al. (2019), em um estudo com *Arabidopsis thaliana*, a enzima *PDC* apresentou um papel mais importante que a *ADH*, devido a depleção de piruvato ser considerada um gargalo mais relevante que a oxidação de NADH para NAD⁺ visando manter a atividade da glicólise. Este fato justificaria a alta expressão de *PDC* em relação a *ADH*. Adicionalmente, a superexpressão de *PDC* pode estar relacionada a espécie e ao tipo de tecido avaliados, assim como, o acetaldeído produzido por *PDC* pode ser difundido para fora da célula, sem causar danos ou que os níveis de *ADH* encontrados sejam suficientes para remover o acetaldeído, como descrito por Ismond et al. (2003) em um estudo com *Arabidopsis*.

Além do mais, o etanol produzido pela *ADH*, mesmo sendo considerado não nocivo às células das plantas, pode tornar-se prejudicial quando em excesso, podendo dificultar o transporte de íons na planta, como sugerido por Maricle et al. (2014), em seu trabalho desenvolvido com trigo (*Triticum aestivum* L.), sugerindo que, com o aumento de etanol, ocorre a redução da atividade de *ADH*, indicando uma correlação da tolerância ao alagamento com a tolerância ao excesso de etanol.

Considerando que existe uma multiplicidade de respostas das diferentes espécies de plantas ao estresse por hipóxia, este trabalho foi desenvolvido de forma a elucidar algumas dúvidas do comportamento de plantas de *Prunus* ao estresse por hipóxia devido ao alagamento do solo, de forma a trazer mais evidências para explicar questões levantadas em outros estudos com o gênero *Prunus* sob estas condições presentes na literatura (ZHOU et al., 2013; KLUMB et al., 2020).

O experimento foi realizado de modo a identificar respostas de curto prazo, sendo assim possível identificar as primeiras respostas das plantas como mecanismo de tolerância ao estresse. Quando analisados os dados da condutância estomática,

ficou evidenciado que para 'Tsukuba 1' este parâmetro é afetado ao longo do experimento. Em relação às avaliações da expressão gênica, foi possível identificar como a expressão de genes da via glicolítica e fermentativa das raízes respondem rapidamente às condições de estresse impostas. Estudos como o desenvolvido em nosso trabalho, auxiliam na identificação e esclarecimento de como plantas de *Prunus* respondem as condições de estresse por hipóxia. No entanto, acreditamos que este trabalho possa servir de base para outros, com a inclusão de novos questionamentos, como, por exemplo, se outros genótipos vão apresentar as mesmas respostas, assim como, se plantas com diferentes combinações de enxertia (porta-enxerto/copa) terão o mesmo comportamento. Além da exploração de novas rotas, como às presentes no metabolismo de carboidratos, fotossintético e do óxido nítrico, assim como as aquaporinas. A realização de novas análises bioquímicas, como a quantificação de carboidratos, e também morfoanatomias em raízes, ainda, moleculares com genes presentes nos diferentes metabolismos a serem estudados, com o intuito de obter a seleção de novos porta-enxertos que sejam tolerantes ao estresse.

5 Conclusões

A condutância estomática das plantas é drasticamente afetada diante ao alagamento do solo mesmo em estresse à curto prazo.

O gene da sacarose sintase (*SUS*) é regulado positivamente em raízes do porta-enxerto 'Tsukuba 1' já nas horas iniciais de exposição ao alagamento.

Em plantas de 'Tsukuba 1' o metabolismo fermentativo das raízes parece ser ativado com duas horas de experimento com a ativação da fermentação láctica, e com quatro horas é constatada a fermentação etanólica.

A glicólise é intensificada em raízes de 'Tsukuba 1' diante ao estresse por hipóxia no decorrer das oito e dezesseis horas de experimento.

O genótipo 'Tsukuba1' demonstra respostas rápidas ao estresse à curto prazo.

Referências

- ALBINA, J. E.; MASTRO FRANCESCO, B.; REICHNER, J. S. Acyl phosphatase activity of NO-inhibited glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): a potential mechanism for uncoupling glycolysis from ATP generation in NO producing cells. **Biochemical Journal**, v. 341, n.1, p. 5-9, 1999.
- ALBRECHT, G.; MUSTROPH, A. Localization of sucrose syntase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hipóxia. **Planta**, v. 217, n.2, 9. 252-260, 2003.
- ALVES, J.D.; ZANADREA, I.; DEUNER, S. et al. Antioxidantive responses and morpho-anatomical adaptions to waterlogging in *Sesbania virgata*. **Trees**, v. 27, n. 3, p. 717- 728, 2013.
- AMADOR, M. L.; SANCHO, S.; BIELSA, B.; GOMEZ-APARISI, J.; RUBIO-CABETAS, M.J. Physiological and biochemical parameters controlling waterlogging stress tolerance in *Prunus* before and after drainage. **Physiologia Plantarum**, v. 144, n.4, p. 357-368, 2012.
- ASHRAF, M. A. Waterlogging stress in plants: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 13, p. 1976-1981, 2012.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Plant Biology**, v. 59, p. 313–339, 2008.
- BAILEY-SERRES, J.; COLMER, T.D. Plant tolerance of flooding stress- recente advances. **Plant Cell & Environment**, v.37, n.10, p.2211-2215, 2014.
- BANSAL, R.; SRIVASTAVA, J. P. Antioxidative responses to short term waterlogging stress in pigeon pea. **Indian Journal Plant Physiology**, v. 20, n.2, p. 182–185, 2015.
- BASHAR, K. K.; TAREQ, M. Z.; ISLAM, M. S. Unlocking the mistery of plants survival capability under waterlogging stress. **Plant Science Today**, v.7, n.2, p. 142-153, 2020.
- BUI, L. T.; NOVI, G.; LOMBARDI, L.; IANNUZZI, C.; ROSSI, J.; SANTANIELLO, A.; LICAUSI, F. Conservation of ethanol fermentation and its regulation in land plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n.6, p. 1815-1827, 2019.
- COLMER, T.D.; VOESENEK, L.A.C.J. Flooding tolerance: suites of plants traits in variable environments. **Functional Plant Biology**, v. 36, n.8, p 665-681, 2009.
- CHUGH, V.; KAUR, N; GUPTA, A.K.; Role of antioxidant and anaerobic metabolism enzymes in providing tolerance to maize (*Zea mays*) seedlings against waterlogging. **Indian Journal Biochemistry Biophysics**, v. 48, p. 346-352, 2011.

DIAS-FILHO, M.B. Respostas morfofisiológicas de *Brachiaria* spp. Ao alagamento do solo e a síndrome da morte do capim-marandu. Em: BARBOSA, RA (Ed.) Morte de pastos de braquiárias. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, p.83-101, 2006.

ELSE, M.A.; JANOWIAK, F.; ATKINSON, C.J.; JACKSON, M.B. Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. **Annual Botanic**, v.103, p 313–323, 2009.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 1-47, 2003.

GU, X., XUE, L., LU, L., XIAO, J., SONG, G., XIE, M.; ZHANG, H. Melatonin Enhances the Waterlogging Tolerance of *Prunus persica* by Modulating Antioxidant Metabolism and Anaerobic Respiration. **Journal of Plant Growth Regulation**, p.1-13, 2020.

HENRIQUE, P. C.; ALVES, J. D.; GOULART, P.D. F. P.; DEUNER, S.; SILVEIRA, N. M.; ZANANDREA, I.; CASTRO, E. M. D. Características fisiológicas e anatômicas de plantas de sibipiruna submetidas a hipóxia. **Ciência Rural**, v.40, n. 1, p 70-76, 2010.

IACONA, C.; CIRILLI, M.; ZEGA, A.; FRIONI, E.; SILVESTRI, C., MULEO, R. A somaclonal myrobalan rootstock increases waterlogging tolerance to peach cultivar in controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 156, p.1-8, 2013.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Tabelas. 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>. (Accessed 22 fevereiro de 2020).

ISMOND, K.P.; DOLFERUS, R.; De PAUW M.; DENNIS, E.S.; GOOD, A. G. Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. **Plant physiology**, v. 132, n.3, p. 1292-1302, 2003.

INSAUSTI, P.; GORJÓN, S. Floods affect physiological and growth variables of peach trees (*Prunus persica* (L.) Batsch), as well as the postharvest behaviour of fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 152, p. 56-60, 2013.

JIA, L.; QIN, X.; LYU, D.; QIN, S.; ZHANG, P. ROS production and scavenging in three cherry rootstocks under short-term waterlogging conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 257, p. 108-647, 2019.

KLUMB, E. K.; RICKES, L. N.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J. Evaluation of gas exchanges in different *Prunus* spp. Rootstocks under drought and flooding stress. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n.4, 2017.

KLUMB, E. K.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J. Differential expression of genes involved in the response of *Prunus* spp. Rootstocks under soil flooding. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 109-038, 2020.

KREUZWEISER, J.; RENNENBERG, H. Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 10, p. 2245-2259, 2014.

KREUZWEISER, J.; HAUBERG, J.; HOWELL, K.A.; CARROL, A.; RENNENBERG, H.; MILLAR, A.H.; & WHELAN, J. Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. **Plant physiology**, v.149, n.1, p. 461-473, 2009.

LAL, M.; KUMARI, A.; POOJA & SHEOKAND, S. Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species and Oxidative Metabolism Under Waterlogging Stress. **Reactive Nitrogen and Sulfur Species in Plants**, p. 777-812, 2019.

MALIK, A. L; COLMER T.D.; LAMBER, H.; SCHORTEMAYER, M. Changes in physiological and morphological traits of roots and shoots of wheat in response to different depths of waterlogging. **Journal Plant Physiological**, v. 28, p. 1121-1131, 2001.

MANCUSO, S.; MARRAS, A.M. Adaptive response of vitis root to anoxia. **Plant and Cell Physiology**, v.47, n.3, p. 401-409, 2006.

MANJUNATH, S.; KENNETH, S.H.L.; VANWINKLE, P.; BAILEY-SERRES, J. Molecular and Biochemical Characterization of cytosolic Phosphoglucosyltransferase in maize. **Plant Physiology**, v.117, p. 997-1006, 1998.

MARCONDES, M. C. Fosfofrutocinase-1, Clotrimazol e Aldolase: um estudo sobre as propriedades cinéticas e regulações da enzima chave da glicólise. 2009. 119 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MARTINAZZO, E.G.; PERBONI, A.T.; OLIVEIRA, P.V.; BIANCHI, V.J.; BACARIN, M.A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência Rural**, v. 43, p. 35-41, 2013.

MATELUNA, P.; SALVATIERRA, A.; SOLIS, S.; NUÑEZ, G.; PIMENTEL, P. Involvement of aquaporin NIP1; 1 in the contrasting tolerance response to root hypoxia in *Prunus* rootstocks. **Journal of Plant Physiology**, v. 228, n. 9, p.19-28, 2018.

MAYER, N. A; BIANCHI, V. J.; CASTRO, L. A. S.; Porta enxertos. In. *Pessegueiro. Raseira*, M.C.B; Pereira, J.F.M.; Carvalho, L.C. (eds). Brasília, DF: **Embrapa**, 2014. p. 173-225.

MELLO, M. O. Utilização das fontes de carbono sacarose, galactose, sorbitol, glicerol por células in vitro de plantas. 1998, 106 f. **Dissertação** (Mestrado em

Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1998.

MELLO, M. O.; AMARAL, A. F. C.; MELO, M. Enzimas metabolizadoras de sacarose em culturas de suspensão forficata de Bauhinia forficata, Curcuma zedoaria e Phaseolus vulgaris. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 9, p. 1085-1092, 2001.

PARENT, C.; BERGER A.; FOLZER, H.; DAT, J.; CREVECOUER, M.; BADOT, P. M.; CAPELLI, N. A novel nosymbiotic hemoglobin from aok: Cellular and tissue specificity of gene expression. **New Phytology**, v. 177, p. 142-154, 2008.

PIMENTEL, P.; ALMADA, R. D.; SALVATIERRA, A.; TORO, G.; ARISMENDI, M. J.; PINO, M. T.; PINTO, M. Physiological and morphological responses of Prunus species with degree of tolerance to long- term root hypoxia. **Scientia Horticulturae**, v. 180, p. 14-23, 2014.

PONNAMPERUNA, F. Effects of flooding on soils. In 'Flooding and plant growth'. (Ed. T Kozlowski) (**Academic Press: New York**), p. 9-45, 1984.

QI, X. H.; XU, X.W, LIN, X.J.; ZHANG, W. J.; CHEN, X.H. Identification of differentially expressed genes in cucumber (Cucumis sativus L.) root under waterlogging stress by digital gene expression. **Genomics**, v. 99, n. 3, p. 160-168, 2012.

REN, C. G.; KONG, C.C.; YAN, K.; ZHANG, H.; LUO, Y. M & XIE, Z. H. Elucidation of the molecular responses to waterlogging in Sesbania cannabina roots by transcriptome profiling. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p. 1-12, 2017.

RUBIO-CABETAS, M. J. PONS, C.; BIELSA, B.; AMADOR, M. L.; MARTI C.; GRANELL, A. Preformed and induced mechanisms underlies the differential responses of Prunus rootstock to hypoxia. **Journal of Plant Physiology**, v. 228, p. 134-149, 2018.

SAIRAM, R. K.; KUMUTHA, D.; EZHILMATHI, K., DESHMUKH, P. S., SRIVASTAVA, G. C. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 401, 2008.

SALVATIERRA, A.; TORO, G.; MATELUNA, P.; OPAZO, I.; ORTIZ, M.; PIMENTEL, P. Keep Calm and Survive: Adaptation Strategies to Energy Crisis in Fruit Trees under Root Hypoxia. **Plants**, v. 9, p. 1108, 2020.

SHAO, G.C.; LAN, J. J.; YU, S. E.; LIU, N.; GUO, R. Q.; SHE, D. L. Photosynthesis and growth of winter wheat in response to waterlogging at different growth stages. **Photosynthetica**, v. 51, n. 3, p. 429-437, 2013.

SOUZA, A.G.; CHALFUN, N.N.J.; FAQUIN, V.; SOUZA, A.A. Production of peach grafts under hydroponic conditions. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 322-326, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6° edição, 918 p., 2017.

TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. **Trend in Plants Science**, v.4, n.8, p. 320-325, 1999.

TORO, G.; PINTO, M. Plant respiration under low oxygen. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.75, n. 9, p. 57-70, 2015.

TYMOWSKA-LALANNE, Z.; KREIS, M. Expression of the Arabidopsis thaliana invertase gene Family. **Planta**, v. 207, n.2, p. 259-265, 1998.

TUO, X-Q.; LI, S.; WU, Q.S.; ZOU, Y. N. Alleviation of waterlogged stress in peach seedlings inoculated with *Funneliformis mosseae*: Changes in chlorophyll and proline metabolism. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 130-134, 2015.

VAN DONGEN, J. T.; GUPTA, K. J.; RAMIREZ-AGUILAR, S.J.; ARAÚJO, W.L.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A.R. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n.12, p. 1434-1443, 2011.

WANG, H.; SUI, X.; GUO, J.; WANG, Z.; CHENG, J.; MA, S.; ZHANG, Z. Antisense suppression of cucumber (*Cucumis sativus* L.) sucrose synthase 3 (*CsSUS3*) reduces hypoxic stress tolerance. **Plant, Cell & Environment**, v.37, n.3, p. 795-810, 2010.

XU, B.; CHENG, Y.; ZOU, X.; ZHANG, X. Ethanol content in plants of *Brassica napus* L. correlated with waterlogging tolerance index and regulated by lactate dehydrogenase and citrate synthase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 3, p. 81, 2016.

ZHANG, P.; LYU, D.; JIA, L.; HE, J.; QIN, S. Physiological and de novo transcriptome analysis of the fermentation mechanism of *Cerasus sachalinensis* roots in response to short term waterlogging. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 649, 2017.

ZIEGLER, V. H.; PLOSCHUK, E.; WEIBEL, A.; INSAUSTI, P. Short-term responses to flooding stress of three *Prunus* rootstocks. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 135-141, 2017.

ZHOU, C.; BAI, T.; WANG, Y.; WU, T.; ZHANG, X.; XU, X.; HAN, Z. Morphological and enzymatic responses to waterlogging in three *Prunus* species. **Scientia Horticulturae**, v. 221, p. 65-67, 2017.

CAPÍTULO 2

Alterações no teor de carboidratos e respostas da expressão diferencial de genes envolvidos nos metabolismos de carboidratos e fermentativo em plantas enxertadas de *Prunus persica* submetidas ao alagamento do solo

1 Introdução

O pessegueiro (*Prunus persica* L. Bastch) é pertencente ao grupo das frutíferas de caroço com importância econômica no Brasil, e conta com uma produção de aproximadamente 183.132 toneladas de pêssegos, provenientes de 16.101 mil hectares cultivados (IBGE, 2019). O Rio Grande do Sul (RS) é responsável por 60% dessa produção, tornando-se o principal estado produtor de pêssegos do país (IBGE, 2019). Para as frutíferas de caroço, especialmente o pessegueiro, o método mais utilizado entre os produtores e viveiristas na obtenção das mudas, é a enxertia, onde a cultivar copa é enxertada em porta-enxertos de espécies pertencentes ao gênero *Prunus* (MAYER et al., 2019). Os porta-enxertos são amplamente utilizados na fruticultura moderna por apresentarem características que vão auxiliar no aumento da produtividade e qualidade dos frutos, além da adaptação a diversas condições ambientais e, principalmente de solo, como o ataque de pragas e doenças e ao estresse hídrico (encharcamento/seca) (GAINZA et al., 2015).

Para o sucesso dos pomares de pessegueiro é preciso que o produtor invista em mudas de qualidade, com a escolha da cultivar copa e porta-enxerto adequados ao local de cultivo, que associadas a um manejo fitotécnico correto do pomar vão determinar a produtividade (FACHINELLO et al., 2005). No entanto, tradicionalmente no RS, as mudas de pessegueiro vêm sendo obtidas através da enxertia em porta-enxertos oriundos na maioria das vezes da mistura varietal de caroços disponíveis nas indústrias conserveiras (SCHMITZ et al., 2014). Tal atividade pode ser extremamente prejudicial, devido à alta variabilidade genética deste material, e assim o porta-enxerto não apresenta fidelidade genética e nem qualidade fitossanitária, além de que, pode não ser adequado as condições de cultivo do RS (MAYER et al., 2017).

Atribuída às mudanças climáticas das últimas décadas, as precipitações intensas e inundações têm se tornado mais frequentes e severas nos últimos 50 anos, causando prejuízos às plantas terrestres (HIRABAYASHI et al., 2013; SASIDRAHAN

et al., 2018). Especialmente na metade sul do RS, que possui a maior área cultivada com pessegueiros do País, grande parte destas áreas possui solos com características hidromórficas, com limitada drenagem, que associada ao excesso de chuvas, mais frequentes e pesadas em períodos críticos para a cultura, têm causado prejuízos a cultura do pessegueiro, principalmente por coincidirem com as fases de desenvolvimento vegetal, afetando consideravelmente a floração e início da brotação e a produtividade (SILVA NETO, 2010; MARTINAZZO et al., 2013).

A nível fisiológico, a redução da condutância estomática nas folhas parece ser uma resposta ao estresse por alagamento do solo, afim de evitar a perda de água, no entanto, quando os estômatos estão fechados ocorre a redução da assimilação líquida de CO₂ pelas folhas e conseqüente redução da fotossíntese e das trocas gasosas (RODRIGUEZ-GAMIR, et al., 2011; POLACIK et al., 2013). A interação entre fatores envolvidos no fechamento estomático pode ter variações entre espécies e, portanto, ainda estão sendo elucidados, dos quais, à redução da condutividade hidráulica e a queda de absorção de água pelas raízes, assim como, os sinais químicos gerados nas raízes, como a síntese de transporte do hormônio ácido abscísico (ABA) são citados em alguns trabalhos (KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014; CÁMISON et al., 2019).

A fotossíntese é um processo químico que utiliza a energia luminosa para a síntese de carboidratos e a liberação de oxigênio a partir de CO₂ e água (TAIZ e ZEIGER, 2017), entretanto, em situações de alagamento do solo, ocorre o prejuízo da absorção e transporte de água, interferindo no status hídrico da planta, ocorrendo o fechamento estomático e assim afetando diretamente a fotossíntese que pode ser reduzida e/ou cessada por completo, causando uma diminuição na produção de carboidratos (GARCIA-SANCHES et al., 2007; PERATA et al., 2011).

O processo da fotossíntese é dividido em duas etapas, conhecidas como reação fotoquímica (fase clara), onde a luz associada a foto-oxidação de água para oxigênio gera ATP e nucleotídeo reduzido de ferredoxina e piridina (NADPH), estes subprodutos são utilizados na segunda etapa, denominada reação de carboxilação (fase escura), onde a mais importante rota autotrófica de fixação de CO₂ é conhecida como ciclo de Calvin-Benson e ocorre nos cloroplastos, produzindo trioses fosfatos (triose-P) que vão ser utilizadas na biossíntese de amido e sacarose (TAIZ e ZIEGER, 2017).

Na maioria das plantas superiores, a sacarose é o principal produto da fotossíntese, e a forma mais comum de carboidrato transportado da fonte ao órgão dreno (ARENQUE, 2010). Este carboidrato, é composto por uma molécula de glicose e outra de frutose e pode ser degradado por duas principais enzimas, invertases (INV) que hidrolisa a sacarose em glicose e frutose ou *sacarose sintase (SUS)* que degrada a sacarose em UDP- glicose e frutose (RUAN, 2012; STEIN e GRANOT, 2019).

Sendo um dos carboidratos mais abundantes nas células vegetais, a sacarose apresenta importantes funções, sendo utilizado como um importante açúcar de transporte, devido sua característica não redutora (ARENQUE, 2010) assim como, pode exercer uma importante participação na função de sinalização, regulando a expressão de genes que codificam enzimas, transportadores e proteínas de reserva envolvidas em processos de desenvolvimento, como florescimento, diferenciação de tecidos, desenvolvimento de sementes e acumulação de produtos de reserva (TAIZ e ZIEGER, 2017; LUNN, 2016).

A síntese de sacarose ocorre no citosol, no entanto, as triose-P são produzidas no cloroplasto e exportadas ao citosol, por meio do translocador de triose-P em troca de Pi, (TAIZ e ZIEGER, 2017). No citosol, as trioses-P são catalisadas pela *aldolase* para formar frutose-1,6-bisfosfato (F1,6BP), que é então desfosforilada pela *frutose-1,6-bisfosfatase citosólica (F1,6BPase)* em frutose-6-fosfato (F6P). As enzimas *glicose-6-fosfato isomerase (G6PI)* e a *fosfoglicomutase (PGM)* organizam e equilibram através de interconversões um 'pool' de hexoses fosfato (Hexoses P) entre F6P; glicose-6-fosfato (G6P); e a glicose-1-fosfato (G1P) (RUAN, 2014). Este último, G1P, junto com o nucleotídeo uridina trifosfato (UTP), dão origem ao UDP-glicose pela enzima *UDP-glicose pirofosforilase (UDPase)* liberando fosfato inorgânico (JOHN e LUNN, 2016). Esse UDP-glicose é então combinado com F6P formando sacarose-6-fosfato (S6P) em uma reação catalisada por *sacarose fosfato sintase (SPS)* e posterior clivagem pela *sacarose fosfato fosfatase (SPP)* em sacarose (STEIN e GRANOT, 2019) (Figura 1).

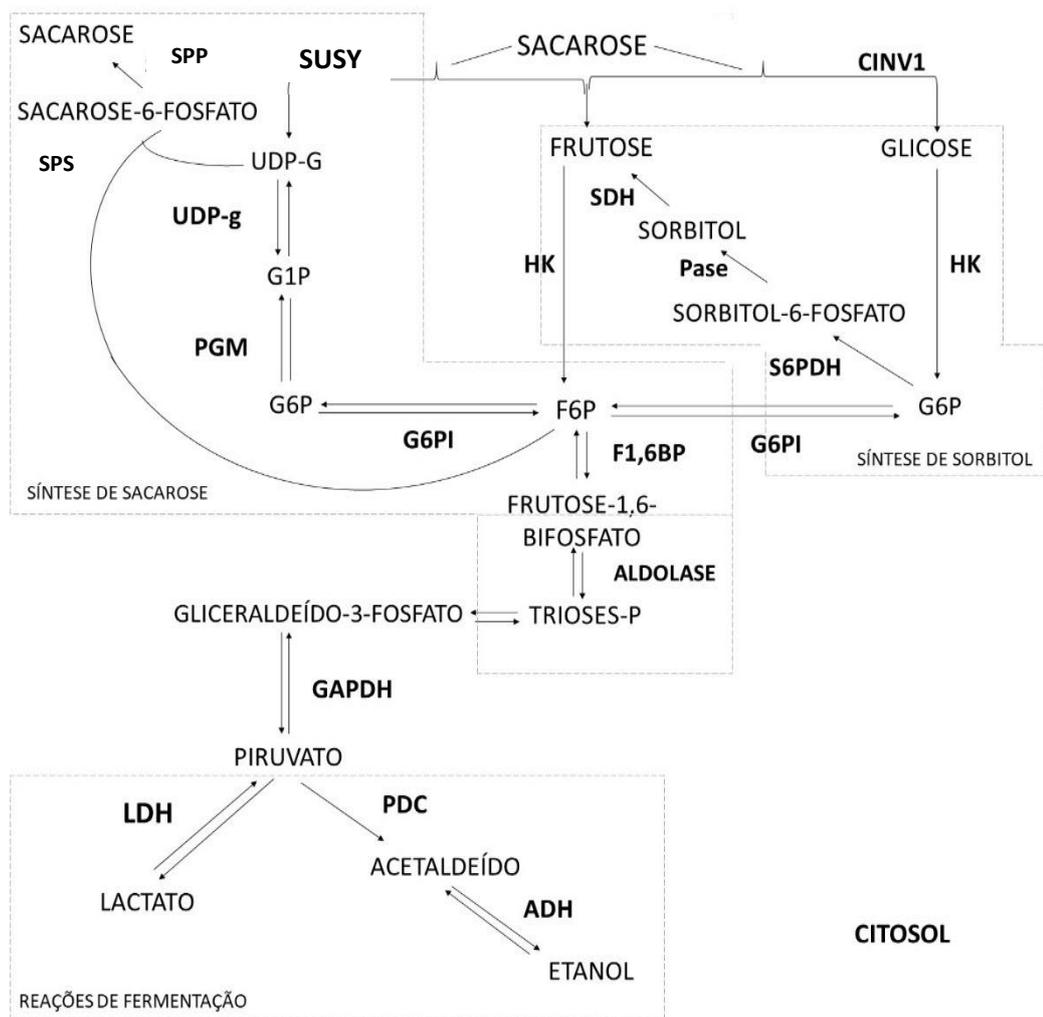


Figura 1. Modelo representativo mostrando a via de biossíntese da sacarose e sorbitol, assim como a fase inicial da glicólise e a via fermentativa. Na síntese de sacarose as enzimas G6PI, PGM, UDPase, SPS e SPP estão envolvidas e na síntese de sorbitol, a S6PDH e SDH. Além disso, as enzimas CINV1, SUS e HKX que fazem parte da fase inicial da glicólise também estão representadas, e adicionalmente, as enzimas LDH, PDC e ADH da via fermentativa. A sigla em negrito representa a enzima catalisando o passo de reação correspondente. Abreviações: **G6PI** - glicose-6-fosfato isomerase; **PGM** - fosfoglicomutase; **UDPase** - UDP glicose pirofosforilase; **SPS** - Sacarose fosfato sintase; **SPP** - Sacarose fosfatase; **S6PDH** - sorbitol-6-fosfato desidrogenase; **SDH** - Sorbitol desidrogenase; **CINV** – Invertases; **SUS** - sacarose sintase; **HXX** – hexoquinase; **LDH** - Lactato desidrogenase; **PDC** - piruvato descarboxilase e **ADH** - Alcool desidrogenase.

O amido é o carboidrato de reserva mais abundante nas plantas superiores e um dos principais produtos da fotossíntese. É uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, esta última constitui, aproximadamente, 80% dos polissacarídeos existentes no grão de amido (TAIZ e ZIEGER, 2017).

Existem dois tipos de amido, o transitório e o de reserva. O transitório é acumulado durante o dia na folha e degradado a noite, proporcionando um suprimento adequado de substratos que serão utilizados na síntese de sacarose, sorbitol ou

outros açúcares que serão transportados via floema. Este açúcar aporta tanto tecidos foliares quanto os não fotossintetizantes, evidenciando sua importância no desenvolvimento e crescimento da planta (CHAVES FILHO, 2008; ARENQUE, 2010). O amido de reserva geralmente é acumulado em tecidos não fotossintéticos, como sementes, raízes e tubérculos, e está localizado em plastídeos não-verdes denominados amiloplastos, servindo como uma fonte de energia de médio a longo prazo para os processos de crescimento (ARENQUE, 2010; STREB e ZEEMAN, 2012).

Em todas as plantas superiores o amido é sintetizado no interior dos plastídeos, como os cloroplastos das folhas e os amiloplastos de órgãos de reserva (CHAVES FILHO, 2008). O substrato para a síntese de amido é o doador de glicosil ativado ADP-glicose (ADPGlc). Nos cloroplastos, o fornecimento de ADPGlc está diretamente ligado ao ciclo de Calvin, e é obtido a partir de G1P (proveniente do pool de hexoses) e ATP catalisada pela *ADP-glicose pirofosforilase (AGPase)*, que converte Glc1P e ATP em ADPGlc e pirofosfato inorgânico (PPi), e através da enzima *amido sintase* ocorre a formação do amido (ARENQUE, 2010; GEORGE et al., 2010; STREB e ZEEMAN, 2012).

A sacarose é o açúcar mais abundante e mais comumente translocado nas plantas. No entanto, em algumas espécies como as rosáceas, destacando o gênero *Prunus*, o sorbitol é o principal produto fotossintético sintetizado e translocado (MERLO e PASSERA, 1991; YASSEN et al., 2013). Como descrito por Ruzic et al., (2008) em experimentos de multiplicação in vitro com diferentes espécies de *Prunus*, onde determinou que o sorbitol foi uma fonte de carbono mais eficiente que sacarose para este gênero. Em pessegueiros (*Prunus persica*), o sorbitol representa de 60 a 90% do carbono total exportado das folhas (TAIZ e ZIEGER, 2017).

O sorbitol é pertencente ao grupo dos polióis (açúcar-álcool) que são carboidratos hidrogenados, não redutores de alta solubilidade e, portanto, adequados como carboidratos translocáveis semelhantes à sacarose, geralmente formados através da redução do monossacarídeo glicose (YASSEN, et al., 2013).

Na síntese de sorbitol está envolvido três principais enzimas, a *sorbitol-6-fosfato desidrogenase (S6PDH)*, que atua na primeira etapa da síntese, convertendo glicose-6-fosfato (G6P) em sorbitol-6-fosfato (S6P), que é então convertido em sorbitol pela *fosfatase específica de S6P (Pase)*. A última enzima envolvida na rota do sorbitol

é a enzima dependente de NAD, *sorbitol desidrogenase (SDH)*, que catalisa a oxidação de sorbitol em frutose. Esta enzima é considerada uma enzima chave, uma vez que, na oxidação do sorbitol a frutose, gera um NADH que pode ser utilizado para formação de ATP, sendo mais eficiente que a sacarose (KARAKAS, 2001; KANAIIAMA, 2009; YASSEN et al., 2013) (Figura 1).

O metabolismo destes carboidratos assume um importante papel diante ao estresse por alagamento, portanto, a compreensão a nível transcricional e pós-transcricional dos genes codificadores das enzimas presentes nesses metabolismos podem ser útil em elucidar algumas dúvidas que ainda persistem referentes as respostas das plantas diante ao estresse por alagamento do solo.

Um adequado suprimento de carboidratos para as raízes, possibilita que a glicólise continue de forma acelerada, sendo a principal via de produção de energia diante ao estresse por alagamento. Existem evidências experimentais claras que plantas tolerantes e sensíveis diferem quanto ao suprimento e catabolismo de carboidratos em condições de alagamento prolongado, onde as tolerantes conseguem manter os níveis de carboidratos mais altos, diferente das sensíveis que esgotam rapidamente o suprimento (FERNER et al., 2012; KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014).

Embora a respiração e o crescimento parecem demandar a maioria dos carboidratos produzidos (CARBONE e TRUMBORE, 2007), o armazenamento destes possui grande relevância, uma vez que, podem ser remobilizados e utilizados no futuro para apoiar funções vitais da planta, principalmente em condições adversas (CHAPIN et al., 1990; MAGUIRE et al., 2015; SMITH et al., 2018; CAMISÓN et al., 2019).

O alagamento reduz rapidamente o oxigênio na solução do solo, levando a consequências drásticas a nível fisiológico no funcionamento celular do sistema radicular de plantas não adaptadas a tal estresse (KLUMB et al., 2019). Diante a tal situação, algumas espécies de plantas possuem e/ou ativam mecanismos de tolerâncias fisiológicos e moleculares essenciais para a sobrevivência, como a reconfiguração da expressão gênica e do metabolismo energético (BAILEY-SERRES e COLMER, 2014; IACONA et al., 2019).

A respiração aeróbica é dependente do suprimento constante de O₂, que atua como acceptor final na cadeia de elétrons mitocondrial. Esse processo, que é crucial

para o metabolismo energético, é prejudicado em condições de hipóxia (baixas concentrações de O₂) ou até mesmo completamente inibido sob anóxia (ausência de O₂) (KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014; SASIDHARAN et al., 2018). Assim, quando o oxigênio celular começa a atingir níveis críticos para manter o funcionamento da cadeia respiratória, a glicólise é a principal etapa da respiração responsável pela geração de ATP durante o alagamento, ocasionando uma crise energética, devido a limitação do NAD⁺. Desta maneira, para manter a geração de ATP, em resposta ao bloqueio parcial ou total da respiração aeróbica, as plantas ativam o metabolismo fermentativo (respiração anaeróbica), que vai oxidar NADH e manter o suprimento de NAD⁺, evitando o bloqueio da glicólise (Figura 1) (BAILEY-SERRES e COLMER; PUCCIARIELLO et al., 2014)

Um marco do início do metabolismo fermentativo é o aumento da transcrição de genes e a produção de três principais enzimas, inicialmente a enzima lactato desidrogenase (*LDH*) atua no catabolismo do piruvato, ocorrendo então a fermentação láctica. No entanto, o lactato produzido contribui com a redução do pH citosólico o que reduz a atividade da enzima *LDH* e ativando a enzima piruvato descarboxilase (*PDC*) seguida da álcool desidrogenase (*ADH*) que compõem via da fermentação alcóolica (BUI et al., 2019).

Várias espécies de *Prunus* spp. são relatadas como intolerantes as condições de hipóxia, prejudicando seu crescimento e desenvolvimento (PISTELLI et al., 2012; RUBIO-CABETAS et al., 2018; IACONA et al., 2019). Portanto, estudos com plantas lenhosas têm sido desenvolvidos e indicaram modificações fisiológicas e moleculares como respostas adaptativas ao alagamento do solo (KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014; ZHU et al., 2018).

Com relação aos porta-enxertos de *Prunus* spp. o conhecimento sobre os mecanismos de respostas fisiológicos, morfológicos e moleculares envolvidos na tolerância a situações de privação de oxigênio ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, obter novos conhecimentos poderão ser extremamente úteis para estabelecer critérios de seleção e ser aplicados como ferramentas em programas de melhoramento de porta-enxertos (PIMENTEL et al., 2014).

Diante ao exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar as respostas moleculares e fisiológicas adaptativas ao estresse e a influência de dois porta-enxertos de *Prunus* spp. quando enxertados com a cultivar copa 'Rubimel', e o

comportamento dos mesmos quando não enxertados e submetidos ao alagamento do solo. Para isso, foram realizadas avaliações dos parâmetros fisiológicos, da expressão diferencial de genes das rotas glicolítica, fermentativa e de síntese e transporte de carboidratos e a quantificação de carboidratos em raízes.

2 Material e Métodos

2.1 Material Vegetal

Dois genótipos de pessegueiro (*Prunus persica*) foram utilizados como porta-enxertos no presente trabalho, sendo eles: 'Tsukuba 1' e a cultivar copa 'Capdeboscq', ambos obtidos por sementes. Sendo que parte do material foi mantido como pé-franco (não enxertado) e parte foi enxertado com a cultivar copa Rubimel.

Os porta-enxertos foram cultivadas em sacos de plástico com capacidade de 2 litros, contendo uma mistura de esterco e solo (3 solo: 1 esterco – v:v) e mantidas no viveiro do Centro Agropecuário da Palma, sendo a enxertia realizada no mês de dezembro de 2018, quando os porta-enxertos apresentavam seis meses de idade. Em agosto de 2019, as plantas foram levadas para a casa de vegetação, onde ocorreu a troca de substrato e de recipientes, padronizando todas as plantas com o mesmo substrato (Turfa fértil) em recipientes plásticos de 5 litros e mantidas na casa de vegetação com irrigação de acordo com a capacidade de campo, e aplicação de 100 mL de solução nutritiva Maxsol (SOUZA et al., 2011) uma vez na semana.

Após quatro meses mantidas nestas condições, as plantas foram utilizadas para o experimento, que foi conduzido em casa de vegetação, durante o mês de dezembro de 2019, no Campus Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas.

Durante o experimento, três plantas foram mantidas sob irrigação diária, baseada na sua capacidade de campo, as quais serviram de controle e meio de comparação para acompanhamento em relação às plantas sob condições de alagamento do solo. As demais plantas foram submetidas ao alagamento, sendo os recipientes plásticos acondicionados em um tanque, o qual foi preenchido por água, onde se manteve o nível da água 3 cm acima do nível do substrato contendo as plantas.

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, em um esquema trifatorial (condição hídrica x genótipos/combinções x tempo após a submissão por alagamento). Sendo a condição hídrica (controle e alagamento do

solo); genótipos/combinções: a) 'Capdeboscq' pé franco, b) 'Tsukuba 1' pé franco, c) 'Rubimel' enxertada em 'Capdeboscq', e d) 'Rubimel' enxertada em 'Tsukuba 1'; e tempo, em horas, foram de acordo com as avaliações realizadas ao longo do período de alagamento. Cada tratamento foi composto de três repetições biológicas e cada repetição foi representada por uma planta.

2.2 Análises Fisiológicas

Foi realizado a avaliação da condutância estomática, como parâmetro fisiológico, sendo as leituras realizadas nos tempos de: oito, 24, 28, 48 e 72 horas e respectivos controles, em duas folhas por planta, completamente expandidas e saudáveis, localizadas no terço médio de cada ramo, utilizando-se porômetro (Leaf Porometer - modelo Decagon Devices, Inc 2365 NE Hopkins Ct. Pullman, WA 99163, USA) e o resultado expresso em $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Adicionalmente foram feitos monitoramentos das concentrações de oxigênio na solução do solo através do medidor de oxigênio dissolvido em solução (Oxímetro: Schott- Dissolved Oxygen Meter- HANDYLAB OX1). As avaliações ocorreram nos tempos de zero, oito, 24, 28, 48 e 72 horas, sendo o resultado expresso em mg L^{-1} de O_2 na solução.

Os resultados obtidos foram avaliados pelo programa estatístico SISVAR, onde a análise de variância foi realizada e as médias de cada dia de avaliação e de cada cultivar foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (FERREIRA, 2011).

O material vegetal para análise molecular foi coletado em três momentos de submissão do estresse: controle; oito e 72 horas após a submissão do alagamento, o qual teve início às 11 horas da manhã. Após a coleta, as amostras de raízes e folhas foram acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

2.3 Análise de Expressão Gênica

2.3.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir de 200 miligramas de material vegetal de acordo com o protocolo de cloreto de lítio (Chang et al., 1993). Os procedimentos que envolveram a extração e manipulação do RNA foram realizados na capela de exaustão, sempre com a utilização de vidrarias e materiais esterilizados.

A concentração e pureza do RNA foram mensuradas em NanoDrop ND-1000, enquanto que a qualidade e integridade foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,0%. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 1,5 µg de RNA total utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), numa reação com volume final de 20 µL utilizando *primers* oligo dT de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.2 Escolha dos Genes Alvo e Síntese de Primers

A escolha dos genes baseou-se em estudos já desenvolvidos por Klumb et al. (2019), além de uma vasta pesquisa na literatura. Além disso, a síntese de *primers* para alguns genes alvo foi realizada com uso da ferramenta *Primer Designing tool*, encontrada no banco de dados do NCBI – *National Center for Biotechnology Information*, sendo suas sequências apresentadas na Tabela 3.

Tabela 1. Descrição dos quinze genes e normalizadores utilizados nas reações de RT-qPCR em folhas e raízes das combinações ‘Capdeboscq’/‘Rubimel’ e ‘Tsukuba1’/‘Rubimel’ sob condições de alagamento do solo.

GENE	DESCRIÇÃO	PRIMER FOWARD (5'-3')	PRIMER REVERSE (5'-3')	REFERÊNCIA
<i>TUA</i> - RAIZ Normalizador	α - Tubulina	TTCTCTCTACTCATTCCCTCCTTG	GATTGGTGTATGTTGGTCTCTCG	TONG et al. 2009
<i>TUB</i> - FOLHA Normalizador	β -Tubulina	CCGAGAATTGTGACTGCCTTCAAG	AGCATCATCCTGTCTGGGTATTCC	TONG et al. 2009
<i>CINV1</i>	<i>Invertase Citosólica CINV1</i>	TGAATGGTGAGCCTGAGA	GGATAGGGTCGTGAAGAA	ZHANG et al., 2013
<i>G6PI</i>	<i>Glicose 6 fosfato isomerase</i>	CCAGGGCCGTGTTATTCCTT	GGTTGCTCACCACTTCACCT	KC345022
<i>PGM</i>	<i>Fosfoglicomutase</i>	CCCCATCGGATTCTGTAGCC	CTCCTGGCAACTCCCTTCAG	XM_007222235
<i>UDPase</i>	<i>UDP glicose pirofosforilase</i>	TGGAGAGCCTTGAAGGTGAT	ACCAAATTTTCATCTGACAGCCA	XM_007221966.2
<i>SPS</i>	<i>Sacarose fosfato sintase</i>	CATACCCCAAACACCACAA	TATCAACAGGACCCCC	ZHANG et al., 2013
<i>S6PDH</i>	<i>Sorbitol-6-fosfato desidrogenase</i>	ACATGGCAGCATGGAAAAGAC	AATTGGCTCACTTGAGGCTTGAT	JIMENEZ et al. 2013
<i>SDH</i>	<i>Sorbitol desidrogenase</i>	CGAAGTTGGTAGCTTGGTGAAGA	CTTGCACTGCTCACATCTCCA	JIMENEZ et al. 2013
<i>SOT1</i>	<i>Transportador de sorbitol</i>	GGTGTCTTAACAATGCCCGAGTCG	TGGGGACCTGAACAACGTCTTCGG	JIMENEZ et al. 2013
<i>P5SC</i>	Δ - 1- pirrolina-5-carboxilato sintase	CGAATTGCTGTGGATGCAAAAGT	GCGAAGGTCAACCACAAGATCA	PISTELLI et al. 2012
<i>GTL</i>	<i>Glicosiltransferase Like gene</i>	AACAGCTTCAGAGGAGTGGTCGTT	GATTGGTGTCCGGCCATCATCATT	PISTELLI et al. 2012
<i>ACO1</i>	<i>aminociclopropano-1- oxidase</i>	TTCCAGGATGACAAGGTCAGTGGT	GTTTGGGCAATCACTCTGTTGCTCC	PISTELLI et al. 2012
<i>GAPDH</i>	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>	ATTTGGAATCGTTGAGGGTCTTATG	AATGATGTTGAAGGAAGCAGCAC	TONG et al. 2009
<i>LDH1</i>	<i>Lactato desidrogenase</i>	GACTCGGCTAACACCATCTTGGA	AGCCAAAACCGCATTACAACGTG	KLUMB et al., 2020
<i>PDC</i>	<i>Piruvato descarboxilase</i>	GCTGTTCCCTGAGAAGCGAGTG	TTGTGGATGGCATCAACAAGTC	KLUMB et al., 2020
<i>ADH1</i>	<i>Álcool desidrogenase</i>	GGGATCTTCAGTTGCTGTCTTTGG	CACTGGTTTGTGTCATGGTCCCTTTGG	PISTELLI et al. 2012

2.3.3 Reações de RT-qPCR e Quantificação Relativa

As reações de RT-qPCR e quantificação relativa no presente experimento foi realizada apenas em parte do experimento, sendo analisado em folhas e raízes dos tratamentos compostos por plantas enxertadas, de ambas combinações: 'Tsukuba1'/'Rubimel' e 'Capdeboscq'/'Rubimel'.

O volume total para cada reação de RT-qPCR foi de 12 µL, sendo 6,25 µL do fluoróforo SYBR Green (Invitrogen®), 0,25 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*, 10 µM cada), 1 µL de cDNA (diluição 1:5, previamente definida), 4,15 µL de água ultra pura e 0,1 µL de ROX. A amplificação foi padronizada em equipamento CFX-96 Real Time Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizando-se as seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos para a extensão, com inserção da curva de *melting* de 65 a 95°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência. Foram utilizadas três repetições biológicas para cada coleta.

A partir dos valores de CT (*Cycle Threshold*) obtidos, foram calculados os valores de Quantificação Relativa de Expressão (QR), através da seguinte equação: $QR = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Como normalizadores internos da reação foi utilizado o gene *TUA* para raiz e *TUB* para folha (Rubimel), definido em análise prévia com um conjunto de oito potenciais genes normalizadores (dados não apresentados).

2.4 Quantificação de Carboidratos de folhas e raízes

2.4.1 Preparo das amostras para quantificar Açúcar Solúvel Total (AST) e Sacarose

Os extratos para dosagem de açúcares solúveis totais (AST) e sacarose, em folhas e raízes foram obtidos conforme metodologia de Bielecki e Turner (1966) com modificações. Primeiramente, 300 mg de material vegetal (folhas e raízes) foram macerados com nitrogênio líquido (N₂) e homogeneizados inicialmente com 8mL de MCW (metanol: clorofórmio: água), na proporção de 12:5:3. Após 24 h, foi adicionado mais 2mL de MCW nos extratos e foram centrifugados a ~630g por 30 min em 15°C. Recuperou-se a fração sobrenadante deixando o pellet restante secando para posterior extração de amido. A partir do volume de sobrenadante calculou-se proporcionalmente, para cada 4 mL de sobrenadante coletado, acrescentou-se 1,0 mL

de clorofórmio e 1,5 mL de água e centrifugou-se novamente para a separação de fases. Desprezou-se o a fase inferior contendo o clorofórmio e a fase aquosa (superior) contendo os metabólitos, foi coletada e transferida para banho-maria a 60°C por cerca de 8 h para eliminação do resíduo de clorofórmio e concentração das amostras para as análises de açúcares e sacarose. Posterior a isto, as amostras foram armazenadas a -18°C até a utilização.

2.4.2 Preparo das amostras para quantificação de amido

O pellet obtido na extração de AST e sacarose foi posteriormente seco a temperatura ambiente por 72 horas. Após esse período foi homogeneizado em 10 mL de ácido tricloroacético 10% (TCA), centrifugado a ~400 g por 30 min em 25°C, posteriormente ficando em repouso por 24h. Após o pellet foi ressuspendido em 10 mL de ácido perclórico 30% (PCA), colocado em um agitador orbital por 30 min e centrifugado novamente a ~400 g, por 30 min, seguido do armazenamento a -18°C até a utilização, conforme descrito por McCready et al. (1950).

2.4.3 Determinação do Teor Total de Açúcar Solúveis (AST) e Amido

A dosagem de AST e amido foi baseada em Graham e Smydzuk (1965), conhecido como método da antrona. De cada amostra de extrato obtidos no item 2.3.1 (AST) e 2.3.2 (AMIDO), foi realizado as diluições em tubos de ensaio, utilizando-se 0,5mL do extrato diluído e acrescido 4,5 mL de água, totalizando 5 mL, e para o branco foi utilizado somente os 5 mL de água. Após feita as diluições, adicionou-se 3 mL de solução de antrona (0,15% em ácido sulfúrico concentrado) resfriado em cada tubo, cobrindo imediatamente com bolinhas de vidro, após 15 min em banho de gelo, agitaram-se os tubos e incubou-se em banho-maria a 90°C por 20 min. Em seguida, mantiveram-se os tubos no escuro até a atingir temperatura ambiente e mediu-se a densidade óptica (D.O.) dos padrões e amostras a 620 nm contra o branco. Para calcular os níveis de açúcares solúveis, uma curva de calibração foi construída com soluções de glicose em uma faixa de concentrações de 0 a 150 mg L⁻¹.

2.4.4 Determinação do Teor de Sacarose

A dosagem de sacarose foi determinada de acordo com Handel (1968). Pipetou-se em tubos de ensaio 100 µL de cada extrato 100 µL de água, totalizando 200 µL, e também o branco (água) ou padrões, e adicionou-se 200 µL de KOH (15%

em solução aquosa) e homogeneizou-se com vórtex. Os tubos foram cobertos com bolinhas de vidro e incubados em banho-maria por 10 min a 100°C. Após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 3 mL de antrona (0,15% em ácido sulfúrico 70%) em cada tubo, novamente cobriu se com as bolinhas e aguardou-se 5 min, após incubou-se em banho-maria a 40°C por 15 min., seguido da medição da D.O. a 620 nm dos padrões e amostras contra o branco. Para calcular os níveis de sacarose, uma curva de calibração foi construída com soluções de sacarose em uma faixa de concentrações de 0 a 100 mg L⁻¹.

2.4.5 Análises estatísticas

Os resultados obtidos na análise de carboidratos foram avaliados pelo programa estatístico SISVAR, onde a análise de variância foi realizada em um esquema bifatorial entre tratamento (controle e alagamento por 72 horas) e cultivares (combinações) sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (p <0,05) (FERREIRA, 2011).

3 Resultados

A concentração de oxigênio na solução do solo foi medida em cada período de coleta (zero; oito; e 72 horas após a submissão do alagamento), além de três medições adicionais (24; 28; e 48 horas após a submissão do estresse) de modo obter uma curva de redução da concentração em solução (Figura 2). Na primeira medição, tempo zero, a concentração de oxigênio (O₂) na solução encontrava-se com um valor de 8,26 mg L⁻¹, apresentando queda considerável de 26,15% na segunda medição com oito horas de exposição ao estresse (6,10 mg L⁻¹). Conforme o tempo de estresse aumentou a concentração de O₂ diminuiu em 62,35%, apresentando o menor valor com 72 horas de 3,11 mg L⁻¹. As temperaturas mantiveram valores próximos entre os intervalos de medições, sendo que a temperatura mais baixa (29°C) foi identificada com oito horas após a submissão ao alagamento e a maior temperatura (34,9°C) com 28 horas de estresse.

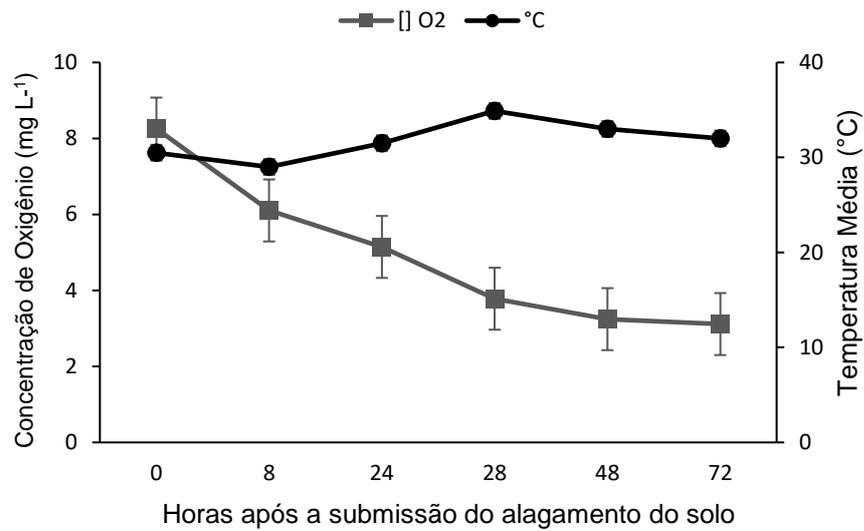


Figura 2. Concentração de oxigênio na solução de alagamento do solo e temperaturas médias do ambiente em seis medições ao longo do experimento. As barras indicam erro padrão n=3.

Para a condutância estomática (g_s), ocorreu interação significativa ($P < 0,05$) entre os fatores (genótipos/combinções x condição hídrica) e (horas após a submissão do alagamento x condição hídrica).

Quando avaliamos cada combinação de genótipo dentro de cada nível do fator condição hídrica (controle e alagamento) não ocorreu diferenças entre as combinações no tratamento controle, porém quando analisado o estresse por alagamento, a combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' apresentou redução significativa da g_s , sendo inferior aos demais, enquanto a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' apresentou valores de g_s intermediários, porém não diferindo dos porta-enxertos de pé franco (Tabela 2).

Por sua vez, quando comparado o efeito do estresse em cada combinação de genótipo individualmente, verificou-se diferenças significativas apenas nas duas combinações de plantas enxertadas, onde as plantas sob alagamento apresentaram valores de condutância estomática (g_s) inferiores as plantas controle. Já nas plantas de pé-franco, o alagamento não proporcionou reduções significativas nos valores médios de g_s , indicando a existência de efeito do fator enxertia sobre tal variável (Tabela 2).

Tabela 2. Condutância Estomática (gs) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em dois genótipos porta-enxerto de Prunus 'Capdeboscq' e 'Tsukuba 1' pé franco e enxertados com 'Rubimel' submetidos ao alagamento do solo.

Genótipos/Combinações	Condição Hídrica	
	Controle	Alagamento
'Capdeboscq'	179,17 aA	166,39 aA
'Tsukuba 1'	163,02 aA	137,21 aA
'Capdeboscq' / 'Rubimel'	180,01 aA	128,57 bA
'Tsukuba 1' / 'Rubimel'	199,68 aA	69,16 bB

*Médias não seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na tabela 3, quando avaliado o efeito do estresse sobre os valores médios de gs em cada tempo de avaliação, nota-se que a partir de 28 horas de estresse as plantas alagadas tiveram uma redução significativa de gs, sendo a maior diferença de 51,07% após 72 horas de estresse em comparação com as controle.

Já na avaliação do fator tempo, dentro de cada nível do fator estresse, os valores de gs não apresentaram diferenças nas plantas do tratamento controle, com exceção do tempo de 8 horas, devido a leitura ter coincidido com o período noturno e conseqüentemente ocorreu uma menor condutância estomática. Entretanto, para plantas alagadas, ocorreu uma redução gradual ao longo do tempo, a partir das 28 horas de estresse. Muito embora, estatisticamente o valor de gs não seja significativamente diferente entre as médias registradas a partir de 24 horas, acredita-se que as reduções são importantes, pois representa uma redução de 32,9% da média entre 24h e 72h de alagamento.

Tabela 3. Condutância estomática (gs) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em diferentes períodos após a submissão do alagamento em porta enxertos de Prunus pé-franco e enxertados com 'Rubimel'.

Horas de submissão ao alagamento	Condição Hídrica	
	Controle	Alagamento
8 horas	70,57 aB	85,97 aB
24 horas	210,88 aA	166,83 aA
28 horas	197,35 aA	141,95 bAB
48 horas	194,77 aA	119,96 bAB
72 horas	228,82 aA	111,95 bAB

*Médias não seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Afim de explorar uma possível relação do estresse por alagamento e a síntese, transporte e utilização de açúcares, foi medido em folhas e raízes das plantas enxertadas com as combinações 'Capdeboscq'/'Rubimel' e 'Tsukuba 1'/'Rubimel' o teor de amido, açúcares solúveis totais e de sacarose em folhas e raízes das plantas avaliadas (Tabela 4 e 5). Para as folhas ocorreu interação significativa ($P < 0,05$) entre os fatores [condição hídrica (controle e alagamento) x genótipo/combinações] apenas para as concentrações de amido (mg g^{-1} MF).

Na tabela 4, quando analisado os resultados para os teores de amido (mg g^{-1} MF) em folhas dentro de cada nível do fator condição hídrica, verificou-se que as plantas controle da combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' apresentaram superioridade nos teores de amido em relação a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel', enquanto que dentro do nível alagamento (72 horas), não se verificou diferenças entre combinações porta-enxerto/cultivar copa.

Por outro lado, quando avaliado o teor de amido nas folhas para cada nível do fator combinação de enxertia, 'Capdeboscq'/'Rubimel' apresentaram maior teor de amido nas folhas sob alagamento em relação as plantas controle. Por sua vez, para 'Tsukuba 1'/'Rubimel' apresentou uma resposta contrária, com maior teor de amido nas plantas controle em relação às plantas alagadas (Tabela 4).

Com relação ao teor de açúcares solúveis totais (AST) nas folhas, não se registrou diferença entre tratamentos sendo que o teor médio de AST foi de $9,85 \text{ mg g}^{-1}$ MF (Tabela 4), muito embora em termos absolutos se tenha observado uma tendência de haver maior concentração nas plantas da combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' submetidas ao alagamento, em relação as plantas controle da mesma combinação, e em relação as plantas de 'Capdeboscq'/'Rubimel' submetidas ao alagamento. Diferentemente, esta última combinação em termos absolutos apresentou o menor teor de AST dentre os tratamentos avaliados (Tabela 4).

Não se registrou interação significativa entre fatores para os teores de sacarose nas folhas, onde o teor médio de sacarose foi de $0,694 \text{ mg g}^{-1}$ MF. Entretanto obteve-se diferenças para plantas dos tratamentos controle, onde a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' apresentou teores de sacarose maiores que a combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel'. Nos tratamentos sob alagamento, não ocorreu diferenças entre as combinações (Tabela 4).

Tabela 4. Teores de amido, açúcares solúveis (AST) e sacarose em (mg g⁻¹ MF), quantificados em folhas da cultivar copa 'Rubimel' enxertada sob dois porta-enxertos, 'Capdeboscq' e 'Tsukuba1' submetidos ao alagamento por 72 horas.

Combinções porta-enxerto /Cultivar copa	Amido		AST		Sacarose	
	Condição hídrica		Condição hídrica		Condição hídrica	
	Controle	Alagamento	Controle	Alagamento	Controle	Alagamento
'Capdeboscq' / 'Rubimel'	0,53bB	3,20aA	9,23*	8,63*	0,76a	0,80*
'Tsukuba 1' / 'Rubimel'	3,41aA	2,12aB	9,430	12,12	0,55b	0,65
Média geral	2,32		9,85		0,69	
CV (%)	29,20		19,66		15,56	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste T, ao nível de 5% de probabilidade. * não significativo.

Para os teores de amido (mg g⁻¹ MF) nas raízes, quando avaliado cada combinação dos genótipos dentro de cada nível do fator condição hídrica, não houve diferenças entre as plantas controle, nem entre plantas dentro do nível alagamento. Também não se registrou diferenças para cada combinação de enxertia em relação aos níveis de condição hídrica. Sendo o teor médio de amido de 2,88 mg g⁻¹ MF (Tabela 5).

Na tabela 5, os teores de AST (mg g⁻¹ MF) nas raízes, para as combinações dentro de cada nível da condição hídrica, em ambos (controle e alagamento) não houve diferenças estatísticas entre as combinações, no entanto, a valores absolutos 'Capdeboscq'/'Rubimel' foi superior a combinação 'Tsukuba 1'/'Rubimel' nos dois níveis da condição hídrica. E quando analisado o fator condição hídrica para cada combinação de enxertia, também não ocorreu diferenças significativas, mas para ambas combinações em valores absolutos, as plantas controle apresentaram maiores teores de AST (mg g⁻¹ MF).

Ao analisar os teores de sacarose nas raízes, dentro de cada nível do fator condição hídrica, para o nível controle não houve diferenças significativas entre as combinações. Agora, para o alagamento teve diferenças significativas, onde a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' apresentou superioridade quando comparada à combinação 'Tsukuba 1'/'Rubimel'. E quando avaliado a condição hídrica dentro de cada combinação, não houve diferenças estatísticas para ambas combinações, no entanto, a valores absolutos, 'Capdeboscq'/'Rubimel' apresentou maiores teores de sacarose quando em estresse por alagamento, diferentemente de 'Tsukuba 1'/'Rubimel' que teve maiores valores nas plantas controle. (Tabela 5).

Tabela 5. Teores de amido, açúcares solúveis (AST) e sacarose (mg g⁻¹ MF), quantificados em raízes da cultivar copa 'Rubimel' enxertada sob dois porta-enxertos, 'Capdeboscq' e 'Tsukuba1' submetidos ao alagamento por 72 horas.

Combinções porta-enxerto /Cultivar copa	Amido		AST		Sacarose	
	Condição hídrica		Condição hídrica		Condição hídrica	
	Controle	Alagamento	Controle	Alagamento	Controle	Alagamento
'Capdeboscq' / 'Rubimel'	2,98*	3,20*	20,14*	14,41*	0,90*	1,20 a
'Tsukuba 1' / 'Rubimel'	2,99	2,33	15,80	8,19	0,47	0,21 b
Média geral	2,88		14,64		0,70	
CV (%)	18,54		38,78		59,22	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste T, ao nível de 5% de probabilidade. * não significativo.

Para avaliar as respostas a nível transcricional diante ao estresse por alagamento do solo, foi realizada a quantificação da expressão relativa de genes-chaves envolvidos nos metabolismos de açúcares, glicolítico, fermentativo e de síntese do etileno e prolina, em folhas e raízes da combinação porta-enxerto/copa 'Capdeboscq'/'Rubimel' e 'Tsukuba 1'/'Rubimel' submetidos ao alagamento do solo e avaliados no tempo de oito e 72 horas de estresse.

Os dados de expressão gênica apresentam-se baseados nos valores de QR, onde o controle é o QR=1,0; valores de QR abaixo de 1,0 representam regulação negativa (*down-regulated*) e valores acima de 1,0 correspondem a regulação positiva (*up-regulated*), e estão representados graficamente no corpo do texto. Em anexo os dados estão representados em log 2, onde valores na escala de cor vermelho são considerados *up-regulated* e são *down-regulated* na escala de cor azul.

Nas folhas, o gene *S6PDH* teve expressão positiva com 72 horas de submissão ao alagamento para ambas combinações, sendo que na combinação 'Tsukuba 1'/'Rubimel' (QR=2,21) foi ~1,99 vezes maior que 'Capdeboscq'/'Rubimel' (Figura 3; Anexo 1 A). Nas raízes, o gene foi regulado positivamente em ambos tempos para 'Tsukuba 1'/'Rubimel' (QR=1,92), sendo este ~1,6 vezes maior que no tempo de oito horas, e ~2,43 vezes maior que 'Capdeboscq'/'Rubimel' (QR=0,79) com 72 horas de estresse (Figura 3; Anexo 1 B).

Para o gene *SDH*, a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' teve expressão positiva nos dois tempos, e também apresentou maior expressão que 'Tsukuba 1'/'Rubimel' em ambos tecidos. Nas folhas, a expressão de *SDH* para a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' no tempo de oito horas chega a ser de ~7,83 vezes maior que

'Tsukuba 1'/'Rubimel', e com 72 horas essa diferença é de ~2,99 vezes maior (Figura 3 C; Anexo 1 A).

O gene *SOT1* nas folhas, somente teve expressão positiva com 72 horas na combinação 'Tsukuba 1'/'Rubimel' (QR= 1,17), sendo ~2,08 vezes maior que a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' (Figura 3 E; Anexo 1 A). Nas raízes, a expressão de *SOT1* neste genótipo foi regulada negativamente, sendo ~1,21 vezes menor que na folha com 72 horas (Figura 3E; F; Anexo 1 A; B). A combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' teve expressão positiva, com um aumento da expressão de ~1,5 vezes do tempo de oito para 72 horas (Figura 3 E; F; Anexo 1 A; B) ainda nas raízes, 'Capdeboscq'/'Rubimel' teve uma expressão de ~1,59 vezes maior que 'Tsukuba1'/'Rubimel' com 72 horas de alagamento (Figura 3 F; Anexo 1 B).

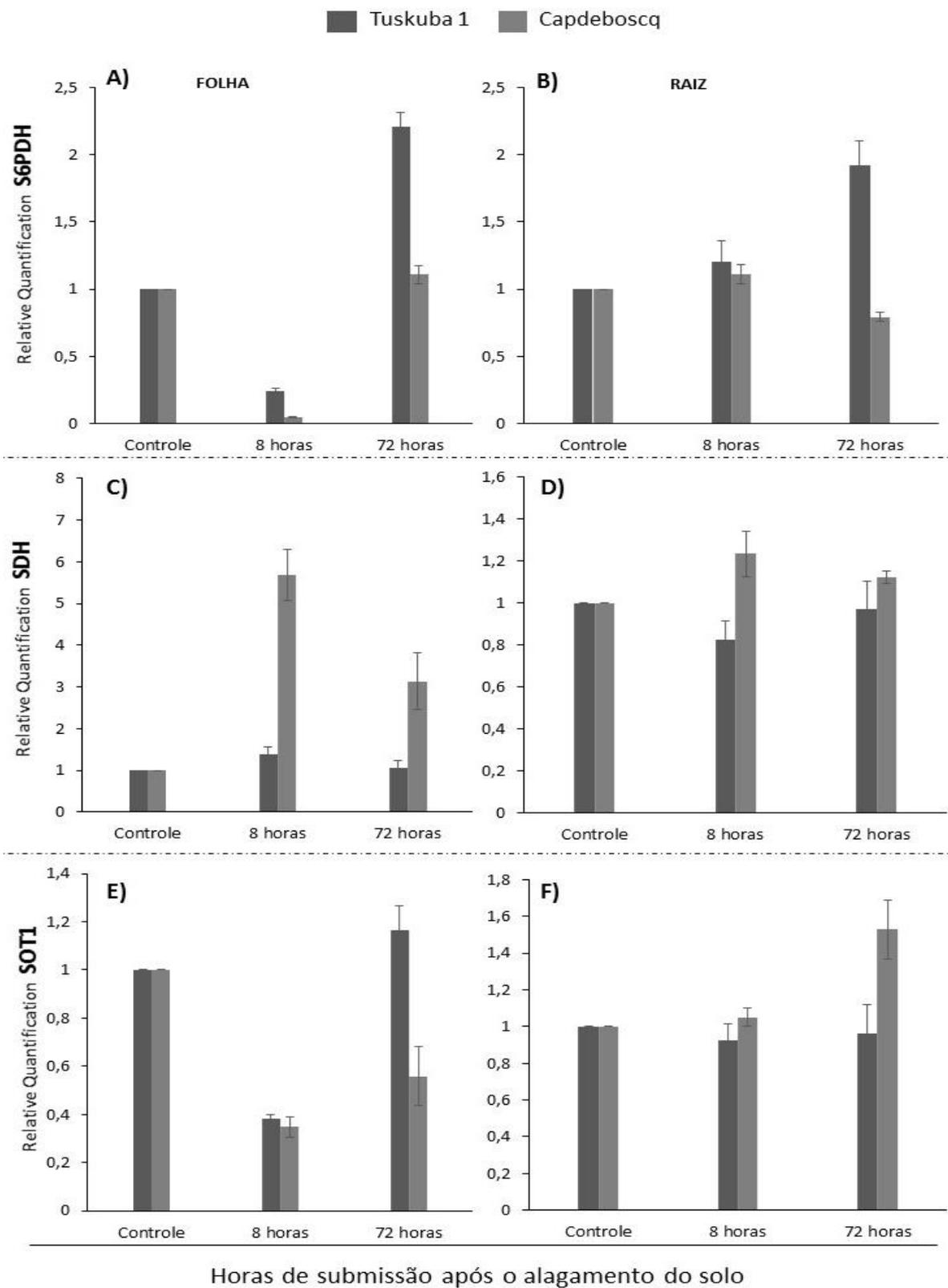


Figura 3. Quantificação relativa (QR) de genes envolvidos na síntese, catabolismo e transporte de sorbitol, respectivamente *S6PDH*, (A;B); *SDH* (C;D) e *SOT1* (E;F) em folhas da cultivar copa Rubimel enxertada e raízes dos porta-enxertos 'Tuskuba1' e 'Capdeboscq' submetidos ao alagamento do solo.

O gene *G6PI* foi regulado positivamente nas folhas em ambos tempos para a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' e nas raízes apenas com 72 horas (Figura 4A; B; Anexo 1 A; B), diferentemente de 'Tsukuba1'/'Rubimel' que teve *down-regulation* em toda a avaliação (Figura 4). Nas folhas, 'Capdeboscq'/'Rubimel' foi 1,33 vezes maior que a combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' 1' com oito horas e 3,65 vezes maior com 72 horas (Figura 4 A; Anexo 1 A) e nas raízes, 'Capdeboscq'/'Rubimel' seguiu sendo maior com 2,45 e 3,12 vezes com oito e 72 horas, respectivamente (Figura 4 B; Anexo 1 B).

Com relação ao gene *PGM*, nas folhas foi *up-regulated* somente para a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' com 72 horas de estresse e nas raízes somente para a mesma combinação foi regulada positivamente em ambos tempos (Figura 4). A combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' em ambos tecidos foi 1,85 vezes maior que 'Tsukuba1'/'Rubimel' com 72 horas de estresse (Figura 4 C; D; Anexo 1 A; B).

A expressão do gene *UDPase* nas folhas foi regulada negativamente para ambas combinações, e nas raízes foi positiva, com maior expressão em 'Capdeboscq'/'Rubimel' com 72 horas de estresse (Figura 4). Nas raízes, 'Capdeboscq'/'Rubimel' teve 1,12 e 1,49 vezes maior expressão que 'Tsukuba1'/'Rubimel' com oito e 72 horas, respectivamente (Figura 4 F; Anexo 1 B).

O gene da *SPS* foi regulado positivamente nas folhas de 'Tsukuba1'/'Rubimel' nos dois tempos, e 'Capdeboscq'/'Rubimel' somente com 72 horas. Na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' foi 19,88 e 1,85 vezes mais expresso do que em 'Rubimel/Capdeboscq' nos tempos de oito e 72 horas, respectivamente (Figura 4 G; Anexo 1 A). Nas raízes de 'Capdeboscq'/'Rubimel' foi regulado positivamente em ambos tempos, já 'Tsukuba1'/'Rubimel' somente com 72 horas. No entanto, esta combinação com 72 horas foi 1,78 vezes maior que 'Capdeboscq'/'Rubimel' (Figura 4 H; Anexo 1 B).

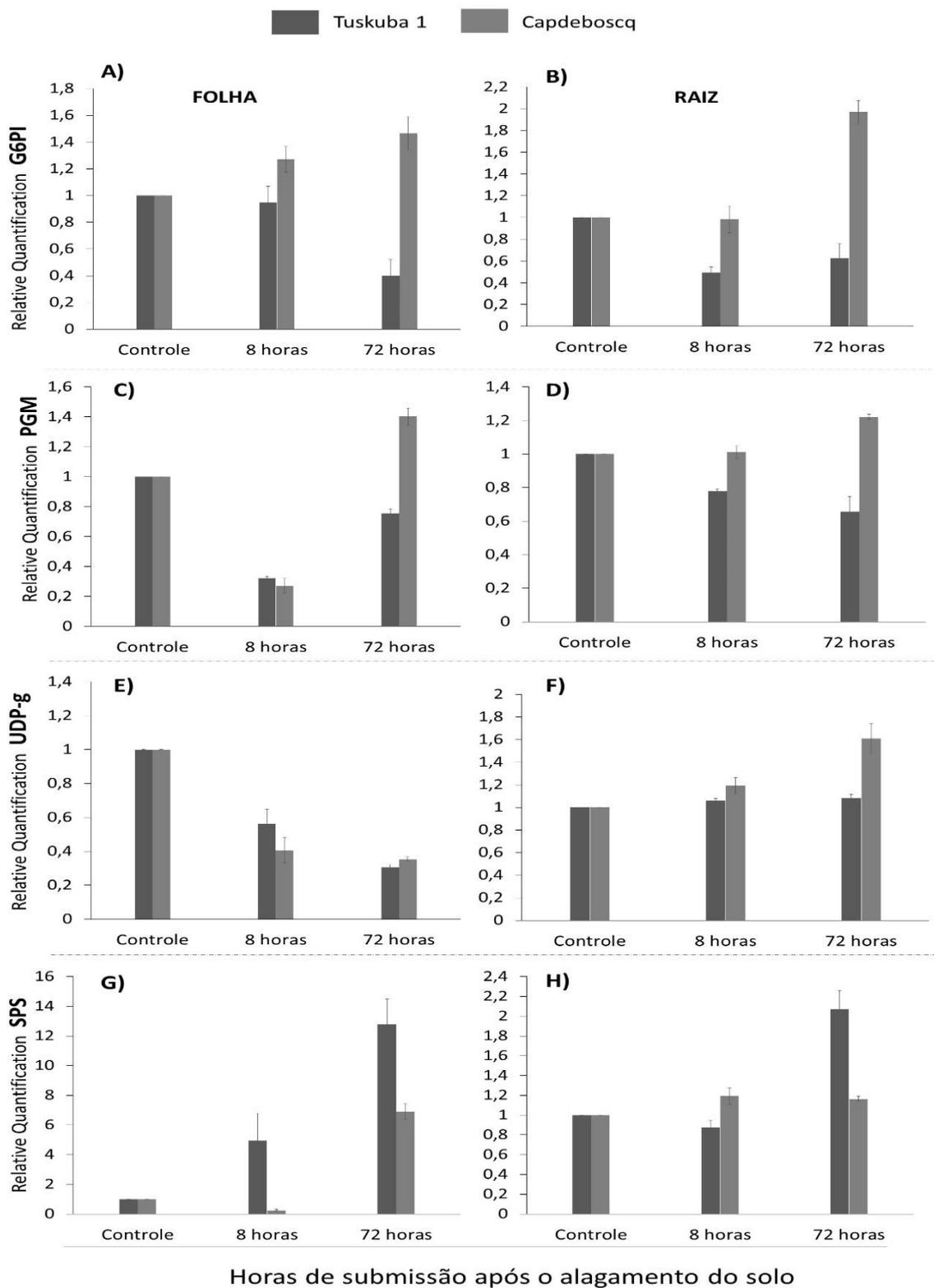


Figura 4. Quantificação relativa (QR) de genes envolvidos na síntese de sacarose *G6PI* (A; B); *PGM* (C; D); *UDPase* (E; F) e *SPS* (G; H) em folhas da cultivar copa Rubimel e raízes dos porta-enxertos 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq' submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=3).

O gene *P5SC* na folha apresentou expressão positiva apenas para a combinação “Capdeboscq’/’Rubimel” com 72 horas de alagamento. Esta combinação teve um aumento de expressão de ~5,26 vezes maior em relação ao tempo de oito horas e ~3,53 vezes maior quando comparado com “Tsukuba1’/’Rubimel’ dentro das 72 horas de estresse (Figura 5 A; Anexo 1 A). Nas raízes, “Capdeboscq’/’Rubimel” apresentou comportamento distinto, tendo uma expressão positiva, baixa, com oito horas de estresse e negativa com 72 horas, tendo uma redução na expressão de ~3,18 vezes em comparação com os tecidos foliares. Diferentemente, “Tsukuba1’/’Rubimel’ apresentou expressão positiva em ambos tempos, tendo maior expressão com 72 horas de alagamento (Figura 5 B; Anexo 1 B).

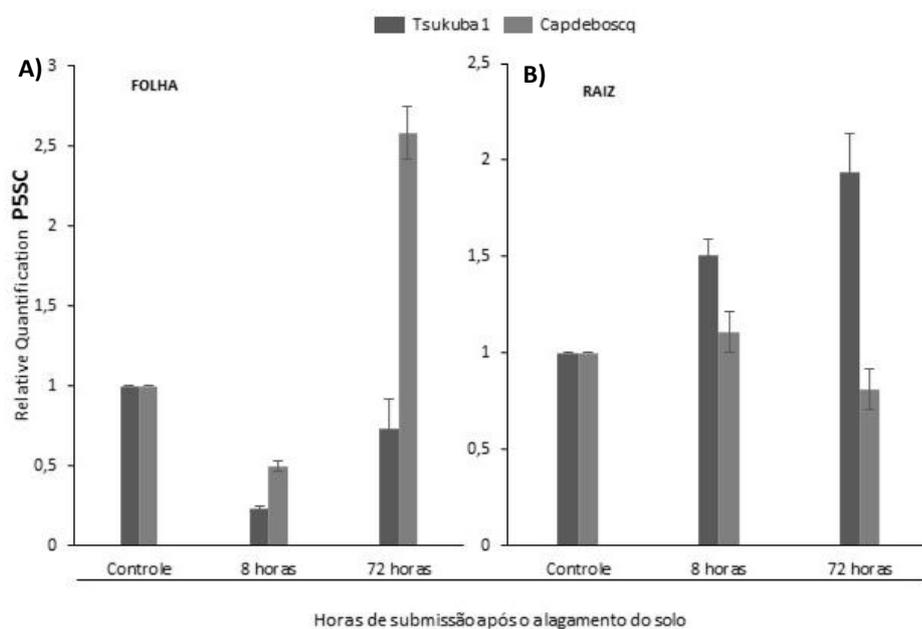


Figura 5. Quantificação relativa (QR) do gene envolvido na síntese de prolina *P5SC* em folhas da cultivar copa Rubimel enxertada (A) e raízes dos porta-enxertos 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq' (B) submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=3).

A expressão dos genes *ACO1* e *GTL* foram avaliados apenas nos tecidos foliares. O gene *ACO1* foi testado também para as raízes, no entanto, não apresentou especificidade para tais genótipos e condições experimentais impostas, vindo a anelar-se a duas isoformas distintas, sendo então desconsiderado das avaliações (Dados não apresentados).

Para *ACO1*, a combinação “Capdeboscq”/“Rubimel” com oito horas de estresse teve expressão negativa e com 72 horas apresentou expressão positiva nas folhas, com um aumento de ~2,86 vezes entre os tratamentos (Figura 6 A). “Tsukuba1”/“Rubimel” teve expressão positiva em ambos tempos, apresentando valores de QR próximos, contudo, em relação a combinação “Capdeboscq”/“Rubimel” com oito horas de estresse foi superior com uma maior expressão (~1,76 vezes), já no tempo de 72 horas a combinação “Capdeboscq”/“Rubimel” teve maior expressão (~1,66 vezes) que “Tsukuba1”/“Rubimel”, apresentando o maior valor de QR (2,57) para este gene (Figura 6 A; Anexo 1 A).

O gene *GTL* ficou reprimido ao longo de todo o experimento, apresentando expressão negativa para ambos genótipos e em ambos tempos. No entanto, é possível observar que a combinação “Capdeboscq”/“Rubimel” em ambos tempos teve uma expressão maior que “Tsukuba1”/“Rubimel” (Figura 6 B; Anexo 1 A).

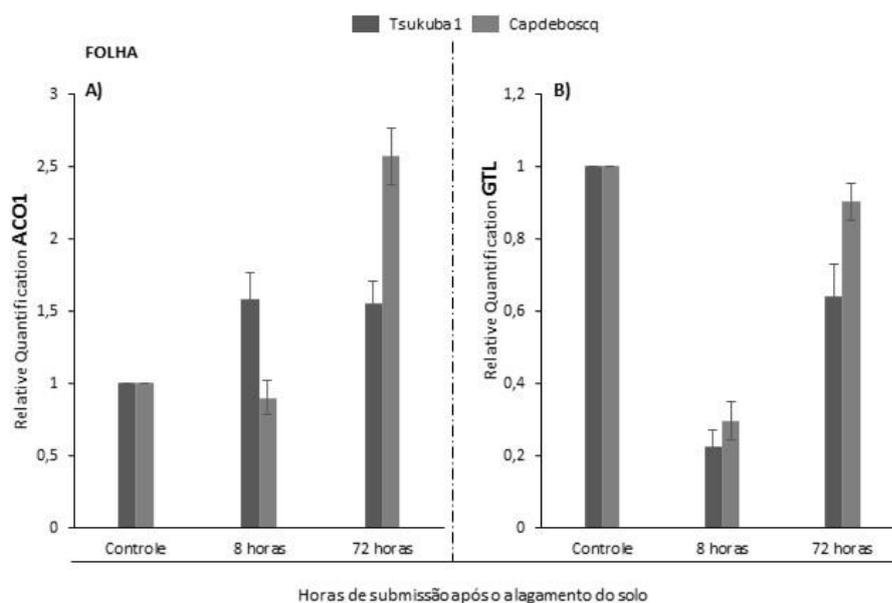


Figura 6. Quantificação relativa (QR) dos genes *ACO1* (A) e *GTL* (B) em folhas da cultivar copa Rubimel enxertada nos porta-enxertos ‘Tsukuba 1’ e ‘Capdeboscq’ submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão (n=3).

O gene *GAPDH* foi analisado nas folhas e raízes da combinação ‘Rubimel’ enxertada nos porta-enxertos ‘Capdeboscq’ e ‘Tsukuba1’. O comportamento de expressão do gene foi semelhante em ambos tecidos (foliar e radicular), onde ‘Tsukuba 1’/‘Rubimel’ apresentou expressão negativa para ambos tempos (8 e 72

horas) e ‘Capdeboscq’/‘Rubimel’ negativa com oito horas de estresse vindo a aumentar a expressão com 72 horas em $\sim 3,93$ e $\sim 2,23$ vezes nas folhas e raízes, respectivamente (Figura 15). Quando analisado a expressão entre combinações, ‘Capdeboscq’/‘Rubimel’ apresentou maior expressão que ‘Tsukuba1’/‘Rubimel’ principalmente com 72 horas de estresse em $\sim 3,71$ vezes nas folhas (Figura 7 A; Anexo 1 A) e $\sim 3,12$ vezes na raiz (Figura 7 B; Anexo 1 B).

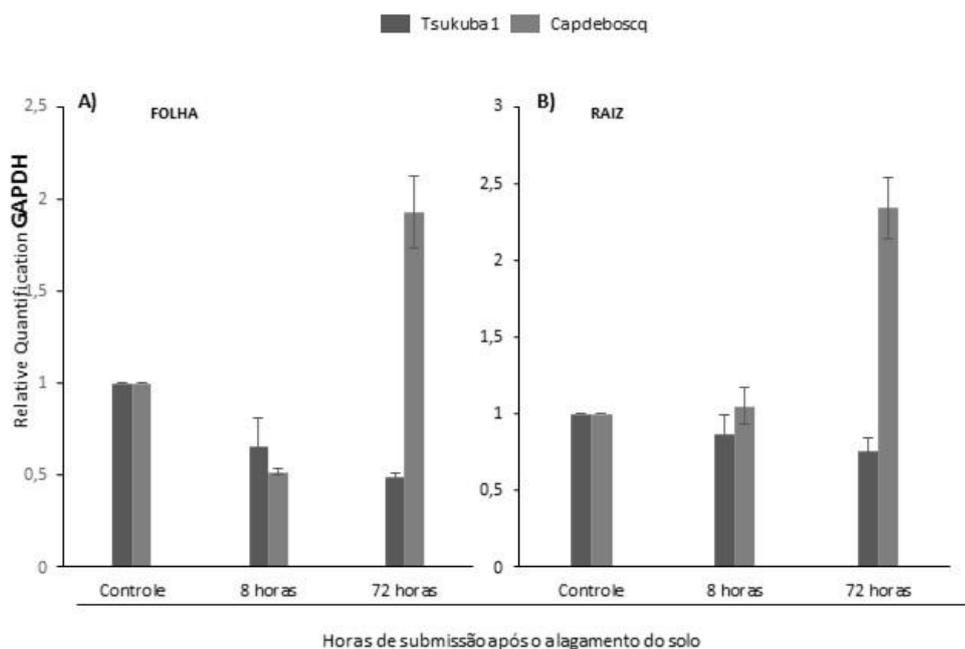


Figura 7. Quantificação relativa (QR) do gene *GAPDH* em folhas da cultivar copa Rubimel enxertada (A) nos porta-enxertos ‘Tsukuba 1’ e ‘Capdeboscq’ (B) submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam erro padrão n=3.

A figura 8, está apresentando os valores de QR para os genes envolvidos no metabolismo glicolítico (*CINV1*) e fermentativo (*LDH1*; *PDC* e *ADH1*) somente avaliados nas raízes dos porta-enxertos ‘Tsukuba 1’ e ‘Capdeboscq’ enxertados com a cultivar copa Rubimel e submetidos ao alagamento do solo.

Para o gene *CINV1*, com oito horas de estresse ambas combinações apresentaram expressão negativa e com 72 horas somente ‘Capdeboscq’/‘Rubimel’ teve expressão positiva (QR=1,35). Entre as combinações, ‘Capdeboscq’/‘Rubimel’ foi $\sim 2,8$ e $\sim 1,5$ vezes maior no tempo de oito e 72 horas respectivamente quando comparado a ‘Tsukuba1’/‘Rubimel’ (Figura 8 A; Anexo 1 B).

Para o gene *LDH1*, ‘Tsukuba 1’ apresenta expressão positiva já com oito horas de estresse, aumentando sua expressão em $\sim 2,2$ vezes no tempo de 72 horas de imposição. Já para ‘Capdeboscq’/‘Rubimel’ a expressão é negativa com oito horas e

baixa com 72 horas (QR=1,08). 'Tsukuba1'/'Rubimel' apresentou expressão ~2,4 vezes maior que 'Capdeboscq'/'Rubimel' com 72 horas de estresse por alagamento (Figura 8 B; Anexo 1 B).

Na figura 8 C, o gene *PDC* é expresso positivamente em ambos tempos e genótipos. Sendo que, com oito horas de estresse 'Capdeboscq'/'Rubimel' é ~1,31 vezes maior que 'Tsukuba1'/'Rubimel', no entanto, com 72 horas a expressão de 'Capdeboscq'/'Rubimel' é diminuída em ~1,74 vezes em comparação ao tempo de oito horas de alagamento, e a combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' passa então a ter ~2,40 vezes mais expressão neste tempo (Anexo 1 B).

Para o gene *ADH1*, em ambos tempos de exposição ao alagamento na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' ocorreu expressão positiva, diferentemente da combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' cuja expressão foi negativa. A expressão de *ADH1* na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' foi de 2,36 e 2,66 vezes maior que 'Capdeboscq'/'Rubimel' nos tempos de oito e 72 horas de exposição ao alagamento, respectivamente (Figura 8 D; Anexo 1 B).

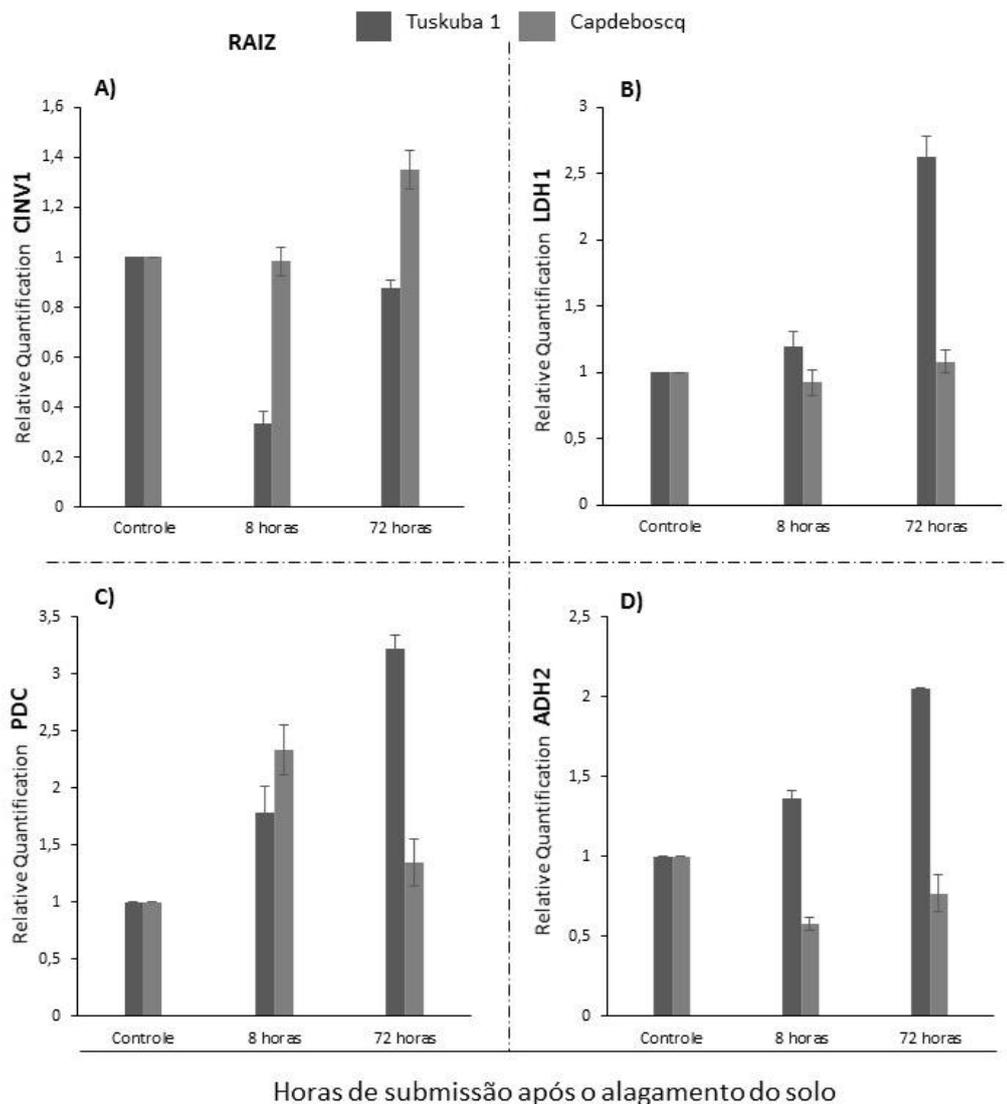


Figura 8. Quantificação relativa (QR) dos genes *Cinv1*(A); *LDH1* (B), *PDC* (C) e *ADH1* (D) em raízes das combinações da cultivar copa Rubimel enxertada nos porta-enxertos ‘Tuskuba 1’ e ‘Capdeboscq’ submetidos ao alagamento do solo. O controle representa o valor de QR=1,0 das amostras no tempo zero. As barras indicam o erro padrão n=3.

4 Discussão

O excesso de água promove uma deficiência de O₂ no solo, devido a água ocupar os poros antes ocupados por ar rico em O₂. Além disso, promove a redução da taxa de difusão dos gases, que é 10.000 vezes mais lenta na água do que no ar (ASHRAF, 2012), impedindo severamente a troca de gases, o que leva ao esgotamento do oxigênio e ao acúmulo de dióxido de carbono devido à respiração microbiana e radicular (PONNAMPERUMA et al., 1984; IRFAN et al., 2010; MANCUSO e SHABALA, 2010). Esta condição foi observada em nosso estudo, onde

a concentração de O₂ foi monitorada ao longo do experimento, apresentando um declínio acentuado (68%) até as 72 horas de exposição ao estresse por alagamento (Figura 2), demonstrando que a imposição ao alagamento afeta efetivamente a concentração de O₂ no solo. Resultados similares foram descritos por Ow et al. (2019), em três espécies de árvores, com diferentes tolerâncias ao alagamento.

A condutância hidráulica das plantas está diretamente relacionada à tolerância ao estresse por alagamento (BASHAR et al., 2019). No entanto, em um estresse prolongado por hipóxia, a condutividade hidráulica da raiz pode diminuir, reduzindo a absorção de água e, conseqüente, a condutância estomática (TOMBESI et al., 2010). O transporte de água também é severamente afetado nestas condições, devido à redução da funcionalidade das aquaporinas, por conseqüência o transporte de água, devido à depleção de energia das raízes (ATP) e a acidose citosólica (TOURNAIRE-ROUX et al., 2003), assim como, a indução da suberização da raiz, afetando o transporte apoplástico da água e danos massivos ao sistema radicular (TYLOVA et al., 2017; SALVATIERRA et al., 2020).

Nas nossas condições experimentais, o estresse por alagamento do solo reduziu a condutância estomática (*g_s*) de forma significativa nas plantas alagadas em comparação com as controle somente para as plantas enxertadas. Este fato pode estar relacionado ao porte das plantas, sendo que as enxertadas são plantas maiores quando comparadas com as não enxertadas, influenciando a condutividade hidráulica destas plantas, além de que a cultivar copa 'Rubimel' apresenta folhas mais expandidas e, deste modo uma transpiração mais expressiva (Tabela 2).

Com o aumento do tamanho da planta, a água e os nutrientes devem ser transportados a distâncias mais longas da raiz até o ápice, e isto, influencia no suprimento de água até as folhas do ápice devido a restrição imposta pela gravidade e condutividade hidráulica (DAY et al., 2002). Uma das respostas para manter o equilíbrio hídrico dentro da planta é a redução da condutância estomática. Segundo Hubbard et al., (2001), a redução da condutividade hidráulica prejudica o estado hídrico das plantas, e a redução da condutância estomática parece contornar esta situação, diminuindo o estresse hídrico interno da planta.

Nicolás et al. (2005) atribuíram a redução da condutividade hidráulica como sendo o fator responsável pela queda da condutância estomática em resposta ao estresse por alagamento em plantas de damasqueiro (*Prunus armeniaca*). Em plantas

de pessegueiro (*Prunus persica*) enxertadas, a diminuição da condutividade hidráulica quando em estresse por inundação foi associada à redução da condutância estomática das plantas aos 25 dias de estresse (INSAUSTI et al., 2012).

O porta-enxerto 'Tsukuba 1' enxertado com 'Rubimel' apresentou menores valores de *gs* diante as condições de alagamento do solo, diferentemente do porta-enxerto 'Capdeboscq' enxertado que não apresentou diferenças significativas entre os genótipos pé franco (Tabela 2). Ambos genótipos foram considerados vigorosos quando enxertados com a cultivar copa 'Chimarrita' (PICOLOTTO et al., 2009; SCHMITZ et al., 2012), no entanto, diante aos nossos resultados podemos atribuir ao genótipo 'Capdeboscq' como mais vigoroso quando enxertado com 'Rubimel'. Porta-enxertos mais vigorosos parecem ter maior facilidade na condutividade hidráulica, por apresentar um menor número de vasos do xilema, no entanto, vasos com diâmetros maiores, que facilitam a translocação de água das raízes para o dossel (TOMBESI et al., 2011), reduzindo o déficit hídrico interno na planta.

Em nosso estudo, as plantas apresentaram redução na condutância estomática a partir de 28 horas de estresse. Adicionalmente, a concentração de oxigênio na solução do solo já havia reduzido em torno de 54% (Tabela 3). Avaliando diferentes porta-enxertos de *Prunus*, Klumb et al. (2019) constataram que frente aos efeitos do alagamento do solo, os genótipos podem diferir quanto a tolerância ao estresse, visto que, os genótipos NR0170401 (pessegueiro) e Mirabolano 29-C (ameixeira) apresentaram queda na condutância com 24 horas de estresse, diferentemente de Mariana 2624 (ameixeira) que com apenas 72 horas de imposição ao alagamento teve redução significativa na condutância estomática. Portanto, fica evidenciado que porta-enxertos de *Prunus* têm diferentes respostas a privação de O₂, e estas são dependentes de fatores, como o tempo de duração do agente estressor e do nível de tolerância do genótipo.

A redução da condutância estomática pode limitar a captação de dióxido de carbono (CO₂) pelas folhas e prejudicar a fotossíntese que, por sua vez, tem grande importância nestas condições, por garantir a produção de carboidratos, onde o nível de reservas ou a capacidade de manter o transporte destes é um fator importante na tolerância a hipóxia (IACONA et al., 2019; PARENT et al., 2008).

Na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' é possível observar uma relação entre as concentrações de carboidratos nas folhas (amido e AST), onde ocorre uma redução

significativa do amido (37,6%) quando comparado com as plantas controle e uma elevação dos teores de AST (28,9%) (Tabela 4). Provavelmente o aumento de AST nas folhas das plantas alagadas esteja intimamente relacionado com a conversão do amido à glicose, por ação de *amilases*, que são enzimas induzidas pelo alagamento do solo, como verificado por Bailey -Serres e Voesenek (2008) em algumas plantas e tecidos.

Outra possível explicação pode ser a atividade da enzima *S6PDH*. Na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' a enzima *S6PDH* demonstrou regulação positiva (*up-regulated*) nas folhas e raízes com 72 horas de estresse (Figura 3 AB; Anexo 1). Diante a isto, é possível inferir que está havendo uma elevação na produção de sorbitol nas plantas as custas da redução nos teores de amido, que pode estar associada a atividade desta enzima, sendo que o mesmo pode estar acontecendo nas raízes. Segundo Kanamaru et al. (2004), o aumento da atividade de *S6PDH* está diretamente relacionado ao fornecimento de substratos, devido ativar a síntese de sorbitol e ou aumentar os produtos da hidrólise de amido, o qual pode ser uma resposta que pode estar associada a proteção das plantas contra a perda excessiva de água, uma vez que o sorbitol é um açúcar que atua como substrato respiratório e osmoprotetor sob condições de estresse hídrico da planta. Já a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' demonstrou expressão negativa (*down-regulated*) para esta enzima, mesmo não havendo uma produção expressiva de sorbitol nas folhas desta combinação, as concentrações de AST não diferem das plantas alagadas e controle (Tabela 4; Figura 3A; Anexo 1). Segundo Pistelli et al, (2012) um aumento ou a manutenção da concentração AST nas folhas, pode estar atrelado a regulação do potencial osmótico pela maior concentração de açúcares, neste caso especialmente o Sorbitol que tem importante função na regulação do potencial osmótico dos tecidos.

Na combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' o amido teve uma elevação considerável nas folhas das plantas alagadas em relação ao controle (Tabela 4). É observado que geralmente em plantas sob estresse por alagamento a condutância estomática é reduzida e ocorre o conseqüente prejuízo da fotossíntese, devido prejudicar as trocas gasosas. Como observado em plantas de ameixeira (*Prunus salicina* Lindh.), onde Martinazzo et al. (2013), inferiu que a redução da fotossíntese líquida está relacionada a redução da condutância estomática. No entanto, esta combinação mesmo apresentando uma redução significativa da *gs* em

relação ao controle, conseguiu manter 71% da *gs* em funcionamento (Tabela 2). Este fato pode estar atrelado a alta produção de amido observada, já que a síntese de amido está interligada com o ciclo de Calvin de Benson, que atua na fixação de CO₂ (STREB e ZEEMAN, 2012). Segundo Schuter e Crawford (2001), a disponibilidade de CO₂ auxilia na fixação de carbono as plantas, estimulando o crescimento e desenvolvimento destas por meio da produção de carboidratos, entre eles o amido.

Este acúmulo de amido nas folhas da combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel', pode estar relacionado também a expressão diferencial do gene *SDH* (Figura 3; Anexo 1). Segundo Li et al. (2011), esta enzima apresenta um importante papel crítico na regulação de sorbitol, sendo observado em seu estudo que a degradação reduzida deste açúcar pela *SDH*, pode estar envolvido no acúmulo de sorbitol em folhas de macieira micropropagadas.

Em nosso estudo a expressão diferencial para o gene *SDH* foi *up regulated* em 'Capdeboscq'/'Rubimel' em folhas e raízes, sendo mais expressiva com 8h de estresse, corroborando com a possível maior disponibilidade de carboidratos totais nestas plantas (Figura 3CD; Anexo 1). Diante a isto, é possível que as plantas mesmo diante ao estresse por hipóxia, estejam com o conteúdo de carboidratos adequado, e, portanto, o sorbitol presente nestes tecidos esteja sendo degradado a hexose pela *SDH*, e está sendo redirecionada para a síntese de amido e posterior armazenamento como tal. Segundo Fang et al. (2019), a enzima *SDH* tem um papel crucial no acúmulo de sorbitol em frutas de maçã, como observado que diante a sua alta expressão, o acúmulo de sorbitol foi menor durante o desenvolvimento das frutas. Na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' esta enzima demonstrou expressão *down regulated*.

Ainda na combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel', essa hipótese pode ser apoiada ao avaliarmos a expressão do gene codificador do transportador de sorbitol *SOT1*, nas raízes este transportador teve expressão *up regulated* sendo 1,53 vezes maior que o controle com 72h de imposição, indicando um maior carregamento de sorbitol no floema e descarregamento nas raízes (Figura 3F; Anexo 1 B). Conforme Li et al. (2012), o aumento da transcrição dos transportadores de sorbitol, em plantas de macieira sob estresse hídrico, pode estar associado a capacidade das plantas em adaptar sua produção de carboidratos diante a condições de estresse. Já nas folhas desta combinação, *SOT1* teve expressão *down regulated* (Figura 3E; Anexo 1 A), é possível inferir que os teores de sorbitol estejam adequados tanto nas folhas quanto

nas raízes, e, portanto, não ocorra alterações significativas na atividade dos transportadores, conforme proposto por Rickes et al. (2019), em um estudo com combinações de cultivar copa/porta-enxertos de *Prunus persica* 'Chimarrita sobre Tsukuba2/Aldrighi' submetidos ao estresse hídrico por nove dias.

Outra provável explicação para a alta concentração de amido nas folhas da combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' é a atividade da *SPS*. Segundo Kuai et al. (2020), a *SPS* é uma enzima chave no metabolismo de carbono, e além de atuar na regulação da síntese de sacarose em plantas, auxilia a distribuição entre a sacarose e o amido nas folhas. Com base nos nossos resultados, a *SPS* foi *down regulated* no tempo de 8 h de estresse nas folhas (Figura 4G; Anexo 1 A). Diante a isto, é possível inferir que as trioses provenientes do ciclo de Calvin estejam sendo redirecionada para síntese de amido, isto pode ser reafirmado ao avaliarmos as quantificações deste carboidrato que apresentou altos teores (3,204 mg/g⁻¹ MF) em comparação ao controle (0,538 mg/g⁻¹ MF) (Tabela 4). Já com 72h de estresse a *SPS* foi ~27,6 vezes maior quando comparado com o de 8h de estresse e a sacarose nas folhas das plantas alagadas aumentou 5,69% em comparação ao controle (Figura 4G; Tabela 4).

Em tecidos não fotossintetizantes, a sacarose e/ ou amido são degradados e a *SPS* pode atuar de forma a ressintetizar a sacarose nos tecidos (PARK et al., 2007). Em nosso estudo, nas raízes da combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel', a *SPS* e os demais genes envolvidos na via da síntese de sacarose, *G6PI*, *PGM* e *UDPase*, foram expressos positivamente com 8 e 72 h após o estresse, indicando que a ressíntese está ativa e a sacarose está sendo ressintetizada neste tecido para esta combinação (Figura 4). Esta hipótese pode ser corroborada com os teores de açúcares encontrados neste estudo, onde a sacarose teve um acréscimo de 33,33% nas raízes das plantas alagadas em relação as plantas controle (Tabela 5). A concentração de amido nas raízes não diferiu estatisticamente entre plantas controle e alagadas (Tabela 5). Diante a isto, é possível que esta combinação consiga manter de forma mais eficiente suas reservas. Segundo alguns autores, plantas que mantém maior concentração de açúcares diante a condições de estresse por hipóxia podem ser consideradas mais tolerantes (ASHRAF, 2012; PISTELLI et al., 2012; KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014).

Em raízes da combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' os teores de AST obtiveram redução (48%) diante ao alagamento, assim como os teores de amido (25%) e

sacarose (54,3%), diferindo da combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' que apresentou redução nos teores de carboidratos nas raízes apenas para AST (5%) em comparação ao controle (Tabela 5). Diante a condições de hipóxia, a deficiência de oxigênio desfavorece a atividade de várias vias metabólicas, incluindo o metabolismo respiratório das raízes, levando a um déficit energético, e, portanto, maior consumo de suas reservas para manter o status o energético e crescimento das raízes (KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014; RENNENBERG, 2004).

Uma das estratégias adotadas por muitas espécies de plantas é a modificação morfoanatômica das raízes. Portanto, é possível inferir que as raízes estão utilizando de suas reservas para a manutenção do metabolismo respiratório e crescimento das raízes, e que o transporte via floema está comprometido, não translocando açúcares das folhas às raízes, como pode ser indicando um estresse elevado com 72 horas de submissão ao alagamento.

Podemos apoiar esta hipótese com a expressão do gene codificador de *SOT1*, onde foi *up regulated* nas folhas e *down regulated* nas raízes (Figura 3EF; Anexo 1), isto nos indica, diante aos nossos resultados que é possível que o transporte via floema esteja prejudicado, e mesmo que ocorra alguma atividade de carregamento de sorbitol no floema, nas folhas, não está ocorrendo este transporte, e portanto, este sorbitol não descarrega nas raízes, havendo então acúmulo na folha de AST e queda das concentrações nas raízes. Resultados similares foram encontrados por Pistelli et al. (2012), em porta enxertos somaclonais de *Prunus*, clone S.4, submetidos ao alagamento por seis dias.

Ainda, é possível corroborar esta hipótese com os resultados encontrados para a expressão transcricional de *SPS* que teve uma expressão *up regulated* nos dois tempos de avaliação nas folhas, já nas raízes apenas com 72h, indicando que está ocorrendo síntese e ressíntese deste carboidrato na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' (Figura 4G;H; Anexo 1). Porém, com o floema comprometido a sacarose produzida na folha não pode ser transportada, e a ressíntese nas raízes está consumindo amido e AST de forma rápida e não compensatória, visto que sacarose reduziu 54,3% nas plantas alagadas (Tabela 5). Estes resultados podem estar relacionados com os encontrados por Hsu et al. (1998), em folhas e raízes de *Syzygium samarangense* Merr. Et Perry (maçã de cera), onde a redução da translocação pelo floema ocasionou acúmulo de amido nas folhas, e nas raízes ocorreu acúmulo de açúcares solúveis,

devido a redução do crescimento e das atividades metabólicas das raízes. Pimentel et al. (2014) relataram que o porta-enxerto *Prunus* 'Mariana 2624' considerado tolerante à hipóxia foi capaz de desenvolver raízes adventícias. Portanto, é possível inferir que o consumo de reservas esteja ocorrendo de forma acelerada, visando a produção de ATP para manter as atividades metabólicas associadas a homeostase celular das raízes na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' sob estresse por hipóxia, mais do que para suportar a divisão celular que leva ao crescimento de novas raízes sob tal condição de estresse.

Um dos intermediários para SPS é o UDP- glicose (UDP-G), que é obtido através de interconversões das enzimas *G6PI*, que utiliza F6P para formar glicose-6-fosfato (G6P), esta é isomerizada por PGM à glicose-1-fosfato (G1P), que é o precursor de UDP-G através de *UDPase* (STEIN e GRANOT, 2019). Em nosso estudo a expressão dos genes *G6PI*, *PGM* e *UDPase* foram *down-regulated* em ambos tecidos da combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' (Figura 4), indicando um prejuízo no suprimento de UDP-G e, conseqüentemente, na síntese de sacarose. No entanto, a expressão transcricional de SPS foi *up regulated* nos dois tempos de avaliação nas folhas, já nas raízes apenas com 72h para esta combinação (Figura 4G; H; Anexo 1).

Uma provável explicação seria que o UDP-G para a síntese de sacarose esteja sendo fornecido pela via da sacarose sintase (*SUS*), de forma parcial nas folhas e mais intensa nas raízes. Esta via combina sacarose com UDP em UDP- glicose (UDP-G) e frutose, esta frutose é posteriormente fosforilada a F6P pela *hexoquinase* com gasto de ATP, esta F6P pode ingressar na via da glicólise ou ser combinada com UDP-G e ir para a síntese de sacarose (ZHANG et al., 2015; STEIN e GRANOT, 2019). Alguns autores destacam que a utilização da *SUS* para a degradação da sacarose durante a deficiência de O₂ é uma forma mais eficiente em termos energéticos, devido esta via ter menor gasto de energia no fornecimento de hexoses para a glicólise (SANTANIELLO et al., 2014; SALVATIERRA et al., 2020). Esta hipótese pode ser baseada na expressão transcricional do gene da *invertase* (*CINV1*), realizada em raízes, onde está apresentou expressão *down-regulated* em ambos tempos na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' (Figura 8A; Anexo 1). Esta enzima é utilizada em condições de normóxia para a clivagem da sacarose, posteriormente são utilizados dois ATPs para a produção das hexoses-P pela ação de *hexoquinases*, devido a isto, pode ser substituída pela *SUS* diante a hipoxia (SANTANIELO et al.,

2014). Entretanto, o fornecimento de UDP-G para outras vias de síntese, pode prejudicar o aumento do fluxo glicolítico em condições hipóxicas, como descrito por Albrecht e Mustroph (2003), em plantas de trigo, onde *SUS* forneceu UDP-G para a síntese de celulose. Ao avaliarmos os resultados da transcrição do gene *GAPDH* nesta combinação, esta condição foi observada, devido esta enzima estar com expressão *down-regulated* nas folhas e com valores de expressão próximos ao controle nas raízes (Figura 7 A; B; Anexo 1 AB).

A enzima *GAPDH* é de fundamental importância para que a glicólise continue, e atua catalisando a fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3- bifosfoglicerato na presença de NAD⁺ e fosfato inorgânico, sendo também capaz de catalisar a reação inversa (ARRU e FORNACIARI., 2010; VAN DONGEN., 2011). Em nosso estudo, na combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' a expressão desta enzima foi *down-regulated* nas folhas, enquanto nas raízes teve valores próximo ao controle (Figura 7 A;B; Anexo 1 AB). Estes resultados corroboram com o fornecimento de UDP-G para esta combinação através da *SUS*, ocorrendo então prejuízo para a glicólise. O mesmo não é observado para a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel', onde nesta *GAPDH* tem expressão *up-regulated* com 8h (Qr=1,05) e 72 h (~2,23 vezes maior que 8h) após o estresse, em folhas e raízes, respectivamente (Figura 7 A; B; Anexo 1 AB). Isto nos leva a entender, que está havendo um maior fluxo de carboidratos na via da glicólise para ambos tecidos, principalmente com 72h de imposição ao alagamento. Klumb et al. (2020), em um estudo com porta-enxertos de Prunus, atribuíram o aumento da *GAPDH* nas raízes ao intenso fluxo da glicólise, já nas folhas encontraram resultados diferentes, acreditando que a glicólise encontra-se em normóxia ou reduzida, devido a expressão da *GAPDH* estar próxima ao controle.

Diante ao estresse por hipóxia, ocorre a privação de oxigênio e a fosforilação oxidativa é cessada, devido o oxigênio ser o aceptor final na cadeia de elétrons. Esta via não apenas fornece grande parte do ATP para a célula vegetal, mas também regenera NAD⁺ a partir de NADH. Este NAD⁺ é fundamental no processo da glicólise, devido ser necessário para a função da *GAPDH*. No entanto, com a via da fosforilação oxidativa cessada a cadeia transportadora de elétrons fica saturada e há acumulação de NADH. Como solução para este problema, ocorre uma reprogramação molecular, e a transcrição de genes envolvidos no metabolismo fermentativo é ativada, de forma a manter o suprimento de NAD⁺ para *GAPDH*, contudo, ocorre um prejuízo na

produção de ATP, redução de pH e acúmulo de lactato e etanol (KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014; ZHANG et al, 2017).

Inicialmente a célula vegetal começa a fermentação a partir do piruvato, com a enzima lactato desidrogenase (*LDH*), formando lactato. Esta via pode causar uma redução de pH, acidificando o citoplasma, isto é prejudicial as células podendo levar até a morte celular, e, portanto, é um processo transitório. Então, diante a acidificação citoplasmática, a fermentação láctica passa para etanólica, inibindo a *LDH* e ativando a piruvato descarboxilase (*PDC*) seguida pela álcool desidrogenase (*ADH*) (ZHOU et al., 2017).

Neste estudo, somente a combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' apresentou expressão positiva dos genes envolvidos na rota fermentativa, indicando que as plantas estão com déficit energético, já para a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel', é possível que ainda mantenha a respiração aeróbica, mantendo a produção de ATP, demonstrando não estar sob estresse diante as condições de alagamento do solo impostas neste experimento (Figura 8).

Para 'Tsukuba1'/'Rubimel' a expressão transcricional da *LDH* foi *up-regulated* em ambos os tempos (Figura 8B). Segundo Kreuzwieser et al. (2014), a atividade desta enzima em raízes de plantas lenhosas pode acontecer já nas primeiras horas do estresse, onde podemos identificar a expressão desta combinação com 8h de imposição. Kreuzwieser et al. (2009), descreveram em um estudo com choupo-cinzento (*Populus x canescens*) que a ativação das enzimas *PDC* e *ADH* aconteceram após 5h de hipóxia. Em nosso estudo, estas enzimas apresentaram expressão positiva já com 8h de imposição, apresentando aumento da expressão com 72h de hipóxia de 1,8 vezes para *PDC* e 1,5 vezes para *ADH* (Figura 8 C;D).

Alguns autores descrevem que a *PDC* pode ter alta atividade também diante a alguns controles normóxicos (BOUNY e SAGLIO, 1996; TADEGE et al., 1998), isto explicaria a expressão positiva deste gene com 8h de imposição ao estresse para 'Capdeboscq'/'Rubimel'.

Um dos mecanismos adotados pelas plantas diante a condições de estresses bióticos e abióticos, é o ajuste osmótico das células. Este mecanismo, auxilia na manutenção da turgescência celular, contribuindo para o equilíbrio e a preservação da integridade de proteínas, enzimas e membranas. Um dos solutos compatíveis que

podem desempenhar este papel é a prolina, que pode ser acumulada no vacúolo ou citosol (VERBRUGGEN e HERMANS, 2008).

A *pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS)*, atua na etapa inicial da síntese de prolina, regulando sua taxa de biossíntese, bem como inibindo a sua degradação (SIDDIQUE et al., 2018). Em nosso estudo, este gene teve expressão *up-regulated* com 72h de estresse nas folhas para a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' e nas raízes as 8h e 72h para 'Tsukuba1'/'Rubimel' (Figura 5A). Segundo Rickes et al. (2019), a síntese de prolina é aumentada sob estresse osmótico, enquanto seu catabolismo é reprimido. Nas folhas de 'Capdeboscq'/'Rubimel' a *SDH* atua na degradação de sorbitol, que é um açúcar osmoprotetor, isto explicaria a alta expressão do gene codificador da *P5CS* (Figura 3 C; Anexo 1 A). Já nas raízes, as plantas encontram-se com baixo teor AST, e mesmo diante a produção de sorbitol, a *P5CS* tem alta expressão (Figura 5B; Anexo 1 B). Em um estudo com gergelim, o maior acúmulo de prolina nos tecidos foi associada com a inibição do crescimento retardado da planta e com uma menor peroxidação lipídica em estresse salino (KOCA et al., 2007).

As glicosiltransferases (*GTLs*) são enzimas que unem uma molécula de açúcar a um aceptor específico, criando uma ligação glicosídica. Constituem uma grande família envolvida na biossíntese de oligossacarídeos, polissacarídeos e dissacarídeos (KEEGSTRA e RAIKHEL, 2001). Em nosso estudo, a expressão deste gene foi avaliada apenas nos tecidos foliares, e para ambas combinações foi *down regulated* em ambos tempos de exposição a hipóxia (Figura 6 B; Anexo 1 A). A expressão deste gene pode auxiliar na tolerância ao estresse, por participar na síntese de pectinas da parede celular (BRETON et al., 2006). Rickes, et al. (2019), em um estudo de déficit hídrico com plantas enxertadas de *Prunus* encontrou resultados diferentes, e atribuiu o aumento da expressão deste gene a um aumento na tolerância ao estresse pode estar relacionada ao aumento de síntese de cadeias pécicas, nas quais estes compostos podem atuar como agentes gelificantes bem como, anti-dessecantes.

Por sua vez, a *ACC oxidase (ACO1)*, é uma importante enzima presente na síntese do etileno, e é responsável pela conversão de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) em etileno e CO₂, e é dependente de oxigênio (DRUMMOND et al., 2010). O etileno é um dos principais indutores de abscisão de órgãos em espécies vegetais. Isto fica evidente no processo de senescência foliar,

onde o ácido abscísico interfere indiretamente pelo aumento da síntese de etileno (TAIZ e ZIEGER, 2017). Em nosso estudo este gene foi avaliado apenas nas folhas, e na combinação 'Tsukuba 1/Rubimel' foi *up-regulated* em ambos tempos, já 'Capdeboscq'/'Rubimel' apenas com 72h, sendo ~1,66 maior que 'Tsukuba1'/'Rubimel' neste tempo (Figura 6 A; Anexo 1 A). Resultados similares foram descritos por Pistelli et al. (2012) em um estudo com porta-enxertos de *Prunus* submetidos ao alagamento, onde verificaram um aumento na expressão deste gene de até 8 vezes com 6 dias de estresse nas folhas do clone S.1, assim como o murchamento e epinastia destas, associando estes fatores a alta expressão do gene *ACO1*. Nas nossas condições, mesmo diante a alta expressão do gene não foi observado danos nas folhas, como murcha e queda.

Este trabalho foi elaborado com base em estudos já desenvolvidos com diferentes espécies de *Prunus* (PISTELLI et al., 2012; ZHOU et al., 2017; KLUMB et al., 2017;2019; RUBIO-CABETAS et al., 2018). Buscou-se avaliar neste estudo parâmetros fisiológicos como a condutância estomática e bioquímicos, como o teor de carboidratos, em diferentes combinações de plantas enxertadas expostas ao alagamento do sistema radicular. Somado a isso, visando o melhor entendimento sobre as interpelações fisiológicas e bioquímicas, análises da expressão diferencial de genes envolvidos na via metabólica de síntese e degradação de açúcares, bem como das vias glicolítica e fermentativa foram avaliados. Estas avaliações permitiram identificar respostas diferenciais entre combinações de genótipos enxertados, representando um importante avanço no que tange a identificação de parâmetros para auxiliar na seleção de novos genótipos a exemplo da partição/uso diferencial de carboidratos entre tecidos fonte e dreno e sua relação com a expressão diferencial dos genes envolvidos nas respectivas rotas metabólicas.

Entretanto, ainda ficam alguns questionamentos, como aqueles em relação as vias de degradação e acúmulo de carboidratos, havendo necessidade de investigar e comprovar não só atividade das enzimas envolvidas nessas vias metabólicas, mas também a quantificação relativa e dos genes envolvidos na via de degradação e síntese de amido, bem como de outros compostos osmoprotetores como a trealose. Somado a isso, outras vias importantes necessitam ser investigadas, especialmente no que tange a manutenção parcial ou total do ciclo de Krebs e cadeia transportadoras de elétrons e suas interações com a via do GABA e do ciclo do oxido nítrico,

respectivamente, em plantas de *Prunus*, visando identificar se tais vias podem contribuir para mitigar o efeito do estresse por hipóxia e se existe respostas diferenciais entre genótipos, tornando possível o desenvolvimento de porta-enxertos mais tolerantes a tal estresse.

5 Conclusões

Plantas enxertadas respondem diferencialmente das não enxertadas sob estresse por hipóxia.

Sob condições de hipóxia, plantas enxertadas tem valores de *gs* menores, em relação aos porta-enxertos de pé-franco.

A combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' mantém concentrações de carboidratos mais estáveis mesmo diante ao estresse por alagamento.

A expressão dos genes *SPS* e *S6PDH* foi bem pronunciada para a combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' indicando a síntese de sacarose e sorbitol nestas plantas.

As plantas da combinação 'Tsukuba1'/'Rubimel' demonstram ativação da via fermentativa com 8h, persistindo com 72h de imposição ao estresse.

Com base nos parâmetros avaliados, a combinação 'Capdeboscq'/'Rubimel' se mostra mais tolerante às condições de alagamento impostas em comparação com 'Tsukuba1'/'Rubimel'.

Referências

- AGOSTINHO, J. F. A. Propriedades antioxidantes e de conservação de maçã: influência da data de colheita em diferentes cultivares oriundas de pomares da Beira Alta, Portugal. 2013. 95 f. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica) - Universidade de Évora, Portugal, 2013.
- ASHRAF, M. A. Waterlogging stress in plants: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n.13, p. 1976-1981, 2012.
- ARENQUE, B. C. Metabolismo de carboidratos da espécie amazônica *Senna reticulata* sob cultivo em alto CO₂. 2010. 112 f. **Dissertação** (Mestrado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ARRU L.; FORNACIARI S. Root Oxygen Deprivation and Leaf Biochemistry in Trees. In: Mancuso S., Shabala S. (eds) *Waterlogging Signaling and Tolerance in Plants*. **Springer**, Berlim, Heidelberg, p181-195, 2010.
- BAI, T.; LI, C.; MA, F.; FENG, F.; SHU, H. Responses of growth and antioxidant system to root-zone hypoxia stress in two *Malus* species. **Plant Soil**, v. 327, p. 95–105, 2010.
- BAI, T.; LI, C.; LI, C.; LIANG, D.; MA, F. Contrasting hypoxia tolerance and adaptation in *Malus* species is linked to differences in stomatal behavior and photosynthesis. **Physiologic Plant**, v. 147, p. 514–523, 2013.
- BARICKMAN, T. C.; SIMPSON, C. R. SAMS, C. E. Waterlogging causes early modification in the physiological performance, carotenoids, chlorophylls, proline, and soluble sugars of cucumber plants. **Plants**, v. 8, n.6, p. 160, 2019.
- BASHAR, K. K.; TAREQ, M.; AMIN, M.; HONI, U.; TAHJIB-UI-ARIF, M.; SADAT, M.; HOSSEN, Q. M. Phytohormone-Mediated Stomatal Response, Escape and Quiescence Strategies in Plants under Flooding Stress. **Agronomy**, v.9, n.2, p. 43, 2019.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review Plant Biology**, v.59, n.1, p.313-339, 2008.
- BAILEY-SERRES, J.; COLMER, T. D. Plant tolerance of flooding stress—recent advances. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 10, p. 2211-2215, 2014.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.
- BRETON, C.; SNAJDROVÁ, L.; JEANNEAU, C.; KOCA, J.; IMBERTY, A. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 16, n. 2, p. 29R-37R, 2006.

BOUNY, J. M.; SAGLIO, P. H. Glycolytic flux and hexokinase activities in anoxic maize root tips acclimated by hypoxic pretreatment. **Plant Physiology**, v. 111, n. 1, p. 187-194, 1996.

BUI, L. T.; NOVI, G.; LOMBARDI, L.; IANNUZI, C.; ROSSI, J.; SANTANIELLO, A.; ZAGGAGNINI, M. Conservation of ethanol fermentation and its regulation in land plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n.6, p. 1815-1827, 2019.

CAMISÓN, Á.; MARTIN, M. A.; DORADO, F. J.; MORENO, G.; SOLLA, A. Changes in carbohydrates induced by drought and waterlogging in *Castanea sativa*. **Trees**, p. 1-13, 2019.

CARBONE, M. S.; TRUMBORE, S. E. Contribution of new photosynthetic assimilates to respiration by perennial grasses and shrubs: residence times and allocation patterns. **New Phytologist**, v. 176, n. 1, p. 124-135, 2007.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reports**, v.11, p.113-116, 1993.

CHAPIN III, F. S.; SCHULZE, E. D.; MOONEY, H. A. The ecology and economics of storage in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 21, n. 1, p. 423-447, 1990.

CHAVES FILHO, J. T. Variação sazonal de amido em tecidos de reserva do cafeeiro arábica na fase reprodutiva. 2008, 70 p. **Tese** (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica Vegetal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DAS NEVES, T. R.; MAYER, N. A.; UENO, B. Graft incompatibility in *Prunus* spp. preceded by SPAD index reduction. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p. 635-648, 2017.

DAY, M. E.; GREENWOOD, M. S.; WHITE, A. S. Age-related changes in foliar morphology and physiology in red spruce and their influence on declining photosynthetic rates and productivity with tree age. **Tree Physiology**, v. 21, n.16, p. 1195-1204, 2001.

DO CARMO ARAÚJO, S. A.; DEMINICS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 2009.

DOMINGO, R.; PÉREZ-PASTOR, A.; RUIZ-SANCHEZ, M. C. Physiological responses of apricot plants grafted on two different rootstocks to flooding conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 7, p. 725-732, 2002.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMAN, A.; NACTHIGAL, J. C. Propagação de plantas frutíferas. Brasília, **Embrapa Informação Tecnológica**. 221p, 2005.

FANG, T.; CAI, Y.; YANG, Q.; OGUTU, O. C.; LIAO, L.; HAN, Y. Analysis of sorbitol content variation in wild and cultivated apples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 1, p. 139-144, 2020.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERNER, E.; RENNENBERG, H.; KREUZWIESER, J. Effect of flooding on C metabolism of flood-tolerant (*Quercus robur*) and non-tolerant (*Fagus sylvatica*) tree species. **Tree Physiology**, v. 32, n. 2, p. 135-145, 2012.

FRANZON, R. C.; CARPENEDO, S.; SILVA, J. C. S. Produção de mudas: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras. **Brasília: Embrapa Cerrados**, 2010.

GAINZA, F.; OPAZO, I.; MUÑOZ, C. Graft incompatibility in plants: Metabolic changes during formation and establishment of the rootstock/scion union with emphasis on *Prunus* species. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 75, p. 28-34, 2015.

GAO, F.; ZHANG, H.; ZHANG, W.; WANG, N.; ZHANG, S.; CHU, C.; LIU, C. Engineering of the cytosolic form of phosphoglucose isomerase into chloroplasts improves plant photosynthesis and biomass. **New Phytologist**, 2021.

GARCIA-SÁNCHEZ, F.; SYVERTSEN, J. P.; GIMENO, V.; BOTÍA, P.; and PEREZ-PEREZ, J. G. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. **Physiology Plant**, v. 130, p. 532–542, 2007.

GRAHAM, D.; SMYDZUC, J. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 246-255, 1965.

HANDEL, E.V. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, p. 280-283, 1968.

HIRABAYASHI, Y.; MAHENDRAN, R.; KOIRALA, S.; KONOSHIMA, L.; YAMAZAKI, D.; WATANABE, S.; KANAE, S. Global flood risk under climate change. **Nature Climate Change**, v. 3, n.9, p. 816-821, 2013.

HUBBARD, R. M.; RYAN, M. G.; STILLER, V.; SPERRY, J. S. Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n.1, p. 113-121, 2001.

HSU, Y.-M.; TSENG, M.-J.; LIN, C.-H. The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 40, 1999.

IACONA, C.; PISTELLI, L.; CIRILLI, M.; GATTI, L.; MANCINELLI, R.; RIPA, M. N.; MULEO, R. Day-length is involved in flooding tolerance response in wild type and variant genotypes of rootstock *Prunus cerasifera* L. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p. 546, 2019.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Tabelas. 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>. <Acessado em: 22 de outubro de 2020>.

IRFAN, M.; HAYAT, S.; HAYAT, Q.; AFROZ, S.; AHMAD, A. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, v. 241, n. 1-4, p. 3-17, 2010.

KANAYAMA, Y. Physiological roles of polyols in horticultural crops. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 78, n. 2, p. 158-168, 2009.

KARAKAS, B. The role of sorbitol synthesis in photosynthesis of peach (*Prunus persica*). 2001. 133 f. **Dissertation** (Master of Physiology)- University of Georgia 2001.

KLUMB, E. K.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J. Differential expression of genes involved in the response of *Prunus* spp. rootstocks under soil flooding. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 109038, 2020.

KEEGSTRA, K.; RAIKHEL, N.. Plant glycosyltransferases. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 3, p. 219-224, 2001.

KOCA, H.; BOR, M.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 344-351, 2007.

KREUZWIESER, J.; HAUBERG, J.; HOWELL, K. A.; CARROLL, A.; RENNENBERG, H.; HARVEY MILLAR, A.; WHELAN, J. Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 461-473, 2009.

KREUZWIESER, J.; RENNENBERG, H. Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 10, p. 2245-2259, 2014.

KUAI, J.; CHEN, Y.; WANG, Y.; MENG, Y.; CHEN, B.; ZHAO, W.; ZHOU, Z. Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism and the quality of fiber in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 877-897, 2016.

KUAI, J.; LI, X.; LI, Z.; XIE, Y.; WANG, B.; ZHOU, G. Leaf carbohydrates assimilation and metabolism affect seed yield of rapeseed with different waterlogging tolerance under the interactive effects of nitrogen and waterlogging. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 206, n. 6, p. 823-836, 2020.

LAL, S. K.; SACHS, M. M. Cloning and characterization of an anaerobically induced cDNA encoding glucose-6-phosphate isomerase from maize. **Plant physiology**, v. 108, n. 3, p. 1295, 1995.

LI, F.; LEI, H.; ZHAO, X.; TIAN, R.; LI, T. Characterization of three sorbitol transporter genes in micropropagated apple plants grown under drought stress. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 1, p. 123-130, 2012.

LIN, T.; ZHENG, H.; HUANG, Z.; WANG, J.; ZHU, J. Non-structural carbohydrate dynamics in leaves and branches of *Pinus massoniana* (Lamb) following 3-year rainfall exclusion. **Forests**, v. 9, n. 6, p. 315, 2018.

LIU, F.; VAN TOAI, T.; MOY, L.P.; BOCK, G.; LINFORD, L. D.; QUACKENBUSH, J. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 137, n. 3, p. 1115-1129, 2005.

LORETI, E.; POGGI, A.; NOVI, G.; ALPI, A.; PERATA, P. A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in Arabidopsis seedlings under anoxia. **Plant Physiology**, v. 137, n. 3, p. 1130-1138, 2005.

LUNN, J. E. Sucrose metabolism. **eLS**, p. 1-9, 2016.

McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, A.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Analytical Chemistry, Washington**, v. 22, p. 1156-1158, 1950.

MAGUIRE, A.J.; KOBE, R.K. Drought and shade deplete nonstructural carbohydrate reserves in seedlings of five temperate tree species. **Ecology**, vol. 5, p. 5711–5721, 2015.

MANCUSO, S.; SHABALA, S. (Eds.). Waterlogging signalling and tolerance in plants. Berlin Heidelberg, Germany: **Springer**, p. 1-294, 2010.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; OLIVEIRA, P. V. D.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência Rural**, vol. 43, n.1, p. 35-41, 2013.

MAYER, N. A.; UENO, B. Porta-enxerto para Frutíferas de Caroço no Rio Grande do Sul. In: **Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Simpósio Internacional de Fruticultura Temperada em Região Subtropical, 7, 2017, Avaré, SP. Anais... **Holambra: Holantec Consultoria em Fruticultura**, 2017.

MAYER, N.A.; BIANCHI, V. J.; CASTRO, L. A. S. Propagação e produção de mudas. In. Pêssego, nectarina e ameixa: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Newton Alex Mayer, Rodrigo Cezar Franzon, Maria do Carmo Bassols Raseira (editores) Brasília, DF: **Embrapa**, p.79-107, 2019.

NICOLÁS, E.; TORRECILLAS, A.; DELL'AMICO, J.; ALÁRCÓN, J. J. The effect of short-term flooding on the sap flow, gas exchange and hydraulic conductivity of young apricot trees. **Trees**, v. 19, n.1, p. 51-57, 2005.

OW, L. F.; GHOSH, S.; LOKMAN YUSOF, M. Effects of waterlogged soil on N-uptake by flood tolerant and sensitive containerised tree seedlings. **Arboricultural Journal**, v. 41, n.3, p. 172-188, 2019.

PARK, J.; CANAM, T.; KANG, K-Y.; ELLIS, D. Over-expression of an arabidopsis family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. **Transgenic Research**, v. 17, n. 2, p. 181-192, 2008.

PAN, J.; SHARIF, R.; XU, X.; CHEN. Mechanisms of Waterlogging Tolerance in Plants: Research Progress and Prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

PAN, De-Lin.; WANG, G.; WANG, T.; JIA, Z-H.; GUO, Z-R.; ZHANG, J-Y. AdRAP2. 3, a novel ethylene response factor VII from *Actinidia deliciosa*, enhances waterlogging resistance in transgenic tobacco through improving expression levels of PDC and ADH genes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1189, 2019.

PERATA, P.; ARMSTRONG, W.; VOESENEK, L. A.C.J. Plants and flooding stress. **New Phytologist**, v. 190, n. 2, p. 269-273, 2011.

PICOLOTTO, L.; MANICA-BERTO, R.; PAZIN, D., PASA, M. D. S.; SCHMITZ, J. D.; PREZOTTO, M. E.; FACHINELLO, J. C. Características vegetativas, fenológicas e produtivas do pessegueiro cultivar Chimarrita enxertado em diferentes porta-enxertos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 583-589, 2009.

PIMENTEL, P.; ALMADA, R. D.; SALVATIERRA, A.; TORO, G.; ARISMENDI, M. J.; PINO, M. T.; PINTO, M. Physiological and morphological responses of *Prunus* species with different degree of tolerance to long-term root hypoxia. **Scientia Horticulturae**, v. 180, p.14-23, 2014.

PISTELLI, L.; IACONA, C.; MIANO, D.; CIRILLI, M.; COLAO, M. C.; MENSUALI-SODI, A.; MULEO, R. Novel *Prunus* rootstock somaclonal variants with divergent ability to tolerate waterlogging. **Tree Physiology**, v. 32, n.3, p. 355-368, 2012.

POLACIK, K. A.; MARICLE, B. R. Effects of flooding on photosynthesis and root respiration in saltcedar (*Tamarix ramosissima*), an invasive riparian shrub. **Environmental and Experimental Botany**, v. 89, p. 19-27, 2013.

PONNAMPERUMA, F. N. Effect of flooding on soils. In: Kozlowski TT (ed) Flooding and plant growth. **Academic, San Francisco**, p 9–45, 1984.

PUCCIARIELLO, C.; VOESENEK, L. A.; PERATA, P.; SASIDHARAN, R. Plant responses to flooding. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 226, 2014.

RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; ANCILLO, G.; GONZÁLEZ-MAS, M. C. PRIMO-MILLO, E.; IGLESIAS, D. J.; FORNER-GINER, M. A. Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 636-645, 2011.

RUAN, Y. Signaling role of sucrose metabolism in development. **Molecular Plant**, v. 5, n. 4, p. 763-765, 2012.

RUAN, Y. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 33-67, 2014.

RUBIO-CABETAS, M. J.; PONS, C.; BIELSA, B.; AMADOR, M. L.; MARTI, C.; GRANELL, A. Preformed and induced mechanisms underlies the differential responses of Prunus rootstock to hypoxia. **Journal of Plant Physiology**, v. 228, p. 134-149, 2018.

SANTANIELLO, A.; LORETI, E.; GONZALI, S.; NOVI, G.; PERATA, P. A reassessment of the role of sucrose synthase in the hypoxic sucrose-ethanol transition in Arabidopsis. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 10, p. 2294-2302, 2014.

SALVATIERRA, A.; TORO, G.; MATELUNA, P.; OPAZO, I.; ORTIZ, M.; PIMENTEL, P. Keep Calm and Survive: Adaptation Strategies to Energy Crisis in Fruit Trees under Root Hypoxia. **Plants**, v. 9, n.9, p. 1108, 2020.

SASIDHARAN, R.; HARTMAN, S.; LIU, S.; MARTOPAWIRO, S.; SAJEEV, N.; VEEN, H. V.; YEUNG, E.; VOESENEK, A. C. J. Signal dynamics and interactions during flooding stress. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p. 1106-1117, 2018.

SASIDHARAN, R.; BAILEY-SERRES, J.; ASHIKARI, M.; ATWELL, B. J.; COLMER, T. D.; FAGERSTED, K., et al. Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. **New Phytology**, v. 214, p. 1403–1407, 2017.

SMITH, M. G.; STEFAN, K.; ARNDT, S.K.; MILLER, R.E.; KASEL, S.; BENETT, L.T. Trees use more non-structural carbohydrate reserves during epicormic than basal resprouting. **Tree Physiology**, v. 38, p. 1779–1791, 2018.

SIDDIQUE, A.; KANDPAL, G.; KUMAR, P. Proline accumulation and its defensive role under Diverse Stress condition in Plants: **An Overview. Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 1655-1659, 2018.

SILVA NETO, L. de F. Pedogênese e matéria orgânica de solos hidromórficos da Região Metropolitana de Porto Alegre. 2010. 117 f. **Tese** (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SILVEIRA, N. M.; ALVES, J. D.; DEUNER, S.; DOUSSEAU, S.; HENRIQUE, P.D.D. Crescimento e partição de carboidratos em plantas de Sebastiania membranifolia submetidas ao alagamento. **Cerne**, v. 21, n. 1, p. 67-74, 2015.

SOUZA, A. D. G.; CHALFUN, N. N. J.; FAQUIN, V.; SOUZA, A. A. D. Production of peach grafts under hydroponic conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.2, p. 322-326, 2011.

SCHMITZ, J. D.; BIANCHI, V. J.; PASA, M. D. S.; De SOUZA, A. L. K.; FACHINELLO, J. C. Vigor e produtividade do pessegueiro 'chimarrita' sobre diferentes porta-enxertos. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 18, n.1, 2012.

SCHMITZ, J. D.; PASA, M. S.; FISCHER, D. L. O.; FACHINELLO, J. C.; BIANCHI, V. J. Desempenho de porta-enxertos em diferentes sistemas de cultivo na produção de mudas do pessegueiro 'Chimarrita'. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 293-297, 2014.

STREB, S.; ZEEMAN, S. C. Starch metabolism in Arabidopsis. **The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists**, v. 10, 2012.

STEIN, O.; GRANOT, D. An overview of sucrose synthases in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 95, 2019.

TADEGE, M.; BRÄNDLE, R.; KUHLEMEIER, C. Anoxia tolerance in tobacco roots: effect of overexpression of pyruvate decarboxylase. **The Plant Journal**, v. 14, n. 3, p. 327-335, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6ª edição, 918 p., 2017.

TAN, X.; Xu, H.; KHAN, S.; EQUIZA, M. A.; LEE, S. H.; VAZIRIYEGANEH, M.; ZWIAZEK, J. J. Plant water transport and aquaporins in oxygen-deprived environments. **Journal of Plant Physiology**, v. 227, p. 20-30, 2018.

TOMBESI, S.; JOHNSON, R. S.; DAY, K. R.; e JONG, T. M. Relationships between xylem vessel characteristics, calculated axial hydraulic conductance and size-controlling capacity of peach rootstocks. **Annals of Botany**, v. 105, n.2, p. 327-331, 2009.

TOMBESI, S.; ALMEHDI, A.; De JONG, T. M. Phenotyping vigour control capacity of new peach rootstocks by xylem vessel analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 3, p. 353-357, 2011.

TOURNAIRE-ROUX, C.; SUTKA, M.; JAYOT, H.; GOUT, E.; GERBEAU, P.; LUU, D. T.; MAUREL, C. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 393-397, 2003.

TYLOVA, E.; PECKOVÁ, E.; BLASCHEOVÁ, Z.; SOUKUP, A. Casparian bands and suberin lamellae in exodermis of lateral roots: An important trait of roots system response to abiotic stress factors. **Annual Botanic**, 2017.

VAN DONGEN, J.T.; GUPTA, K. J.; RAMIREZ-AGUILLAR, S. J.; ARAUJO, W. L.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 12, p. 1434-1443, 2011.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753-759, 2008.

VOESENEK, L. A. C. J.; SASIDHARAN, R. Ethylene—and oxygen signalling—drive plant survival during flooding. **Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 426-435, 2013.

ZHANG, C.; YU, M.; MA, R.; SHEN, Z.; ZHANG, B.; KORIR, N. K. Structure, expression profile, and evolution of the sucrose synthase gene family in peach (*Prunus persica*). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 4, p. 81, 2015.

ZHU, X.; LI, X.; JIU, S.; ZHANG, K.; WANG, C.; FANG, J. Analysis of the regulation networks in grapevine reveals response to waterlogging stress and candidate gene-marker selection for damage severity. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 6, p. 172-253, 2018.

ZHU, X.; ZHANG, C.; WU, W.; LI, X.; ZHANG, C.; FANG, J. Enzyme activities and gene expression of starch metabolism provide insights into grape berry development. **Horticulture Research**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 2017.

YANG, B.; PENG, C.; ZHU, Q.; ZHOU, X.; LIU, W.; DUAN, M.; WANG, M. The effects of persistent drought and waterlogging on the dynamics of non- structural carbohydrates of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings in Northwest China. **Forest Ecosystems**, v. 6, n. 1, p. 23, 2019.

YANG, B.; PENG, C.; HARRISON, S. P.; WEI, H.; WANG, H.; ZHU, Q.; WANG, M. Allocation mechanisms of non-structural carbohydrates of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings in response to drought and waterlogging. **Forests**, v. 9, n. 1, p. 754, 2018.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A., HAFIZ, I. A. Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.

Considerações Finais

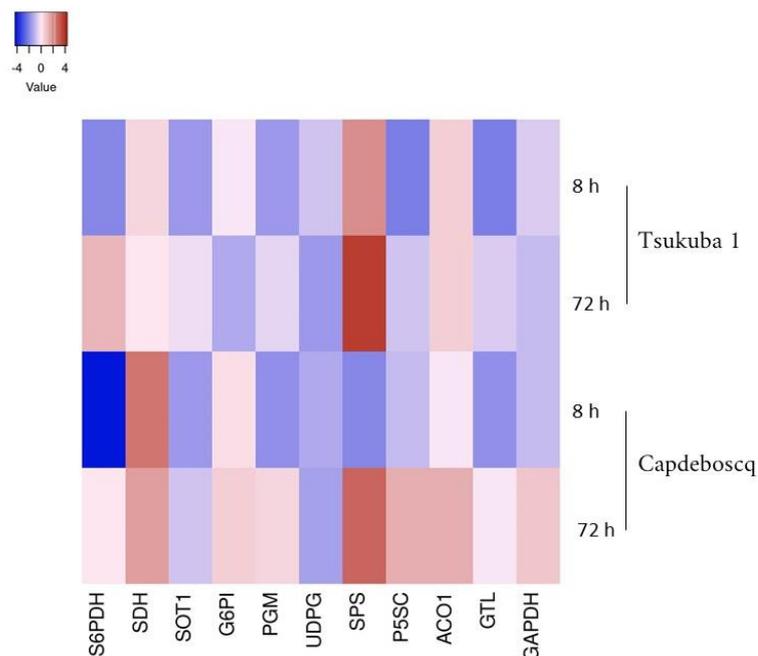
O presente trabalho permitiu obter dados valiosos que auxiliaram na elucidação das respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de porta-enxertos de *Prunus* spp. não enxertados e enxertados com a cultivar copa 'Rubimel' submetidos ao estresse por alagamento do solo de curto e médio prazo. Foi possível observar a partir dos resultados encontrados neste estudo as respostas iniciais do porta-enxerto 'Tsukuba 1' pé franco ao estresse, sendo de suma importância estes dados, podendo serem utilizados como um ajuste fino ao estresse e a determinação de novas avaliações partindo destas respostas. Foi observado diferentes comportamentos à nível fisiológico, bioquímico e transcricional da cultivar copa 'Rubimel' quando enxertada sobre dois porta-enxertos ('Capdeboscq' e 'Tsukuba 1'), assim como, diferenças das plantas enxertadas em comparação com não enxertadas, demonstrando o efeito de enxertia.

No entanto, os dados ainda são exploratórios, sendo possível novas abordagens para a complementação deste estudo, tais como, a investigação e comprovação de outras rotas e vias metabólicas, como as presentes no metabolismo fotossintético, no ciclo de Krebs e cadeia transportadoras de elétrons e suas interações com a via do GABA e do ciclo do óxido nítrico. Além da quantificação relativa dos genes envolvidos na rota do amido, bem como de outros osmoprotetores como a trealose assim como, da atividade das enzimas presentes nas rotas estudadas e das aquaporinas, avaliações morfo-anatômicas das raízes e quantificação de novos carboidratos, como o sorbitol.

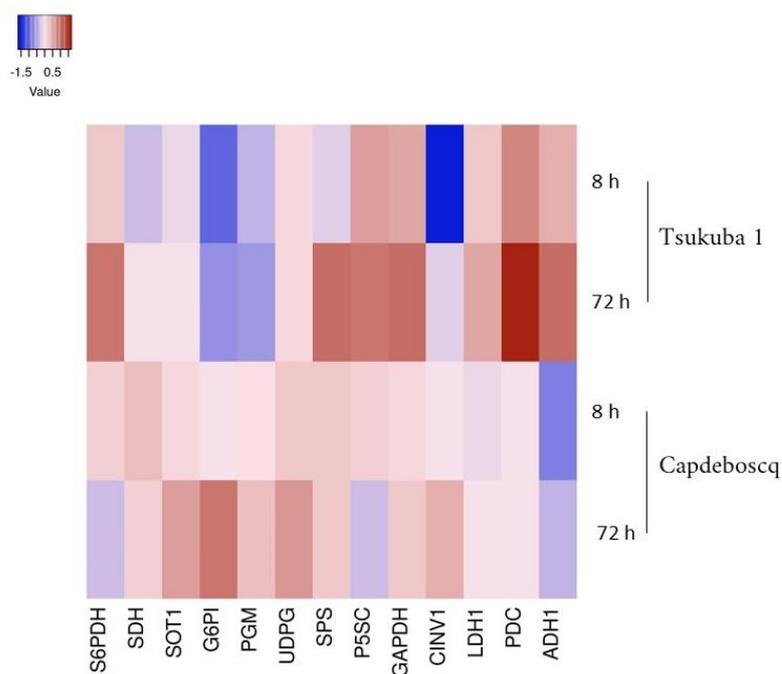
A avaliação de novos genótipos nestas condições é interessante, afim de identificar e utilizar o maior número possível de características desejáveis que auxilie na seleção de um novo genótipo que atenda as demandas de cultivo.

Tudo isso corrobora com a grande necessidade de ampliar a pesquisa nesta área, em função das mudanças climáticas globais que vem ocorrendo, principalmente no Sul do Rio Grande do Sul, afim de obter porta-enxertos de *Prunus* spp. com características adaptáveis as condições edafoclimáticas das regiões produtoras e que propiciem uma alta produtividade e lucratividade aos produtores.

Anexos



Anexo 1 A. Níveis de expressão de onze genes envolvidos na biossíntese de sorbitol, sacarose, prolina, etileno, e, metabolismo glicolítico em folhas (A) de *Prunus persica* cultivar 'Rubimel', enxertadas sobre 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq', sob alagamento do solo. A escala de cores refere-se ao Log2FC. A escala vermelha se refere a genes regulados para cima e a escala azul se refere a genes regulados para baixo.



Anexo 1 B. Níveis de expressão de treze genes envolvidos na biossíntese de sorbitol, sacarose, prolina, e, metabolismos glicolítico e fermentativo em raízes (B) de *Prunus persica* cultivar 'Rubimel', enxertadas sobre 'Tsukuba 1' e 'Capdeboscq' sob alagamento do solo. A escala de cores refere-se ao Log2FC. A escala vermelha se refere a genes regulados para cima e a escala azul se refere a genes regulados para baixo.