

Título: Aspectos ecofisiológicos de espécies de plantas ameaçadas: Como a biossíntese de ácido abscísico (ABA) em folha pode ser a principal fonte da resposta da floresta tropical à seca e às altas temperaturas?

Projeto apresentado ao comitê de Seleção de bolsistas da **chamada 02/2019** do Bolsas Funbio – Conservando o Futuro do Programa de Bolsas para Pesquisa de Campo na **modalidade Doutorado**.

Dados do Proponente

Proponente: Israel de Jesus Sampaio Filho,
Instituição – Instituto Nacional de
Pesquisa da Amazônia – INPA
Mestre em Clima e
Ambiente – CliAmb-INPA/UEA, estudante
de Doutorado CFT/INPA
Currículo:
<http://lattes.cnpq.br/6479561312906094>

Dados do Orientador

Dr. Kolby Jeremiah Jardine
PhD em Atmosfera e Ciência Marinha em Stony
Brook University, EUA.
Cargo: PI – Investigador Principal/Cientista no
Departamento de Ciências Climáticas do
Laboratório Nacional Lawrence Berkeley - EUA,
Tipo de vínculo com a IES: Professor/Orientador
dos Programas de Pos-Graduação em Ciências de
Florestas Tropicais CFT-INPA e Clima e
Ambiente CliAmb-INPA/UEA
Currículo:
<http://lattes.cnpq.br/9723714566253578>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	3
2 JUSTIFICATIVA.....	4
3 HIPÓTESE.....	5
4 OBJETIVOS	7
4.1 Obejetivos específicos.....	7
5 MATERIAL E MÉTODOS	8
5.1 Caracterização da área de estudo	8
5.2 Desenho experimental e seleção das espécies.....	9
5.3 Lista de equipamentos.....	10
5.4 Organograma de execução	11
6 ETAPAS E ATIVIDADES	11
6.1 <i>Medições fisiológicas: transpiração, fotossíntese líquida, condutância estomática, potencial hídrico da folha e suas sensibilidades à alta temperatura e à seca</i>	11
6.2 <i>Análise de concentração de ABA baseado em LC-MS</i>	12
6.2.1 <i>Casa de vegetação</i>	12
6.2.2 <i>Campo</i>	14
6.3 <i>Caracterização anatômica da folha</i>	14
6.3.1 <i>Casa de vegetação</i>	14
6.3.1 <i>Campo</i>	15
6.4 <i>Atividade 4</i>	15
6.4.1 <i>Análise estatística</i>	15
6.4.2 <i>Divulgação</i>	15
6.4.2.1 <i>Apresentação e palestras</i>	15
6.4.2.2 <i>Publicação de artigo científico</i>	16
7 RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO PREVISTO DO PROJETO.....	16
8 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	16
9 REFERÊNCIAS	17
10 ANEXO 1 - ORÇAMENTO DETALHADO.....	19

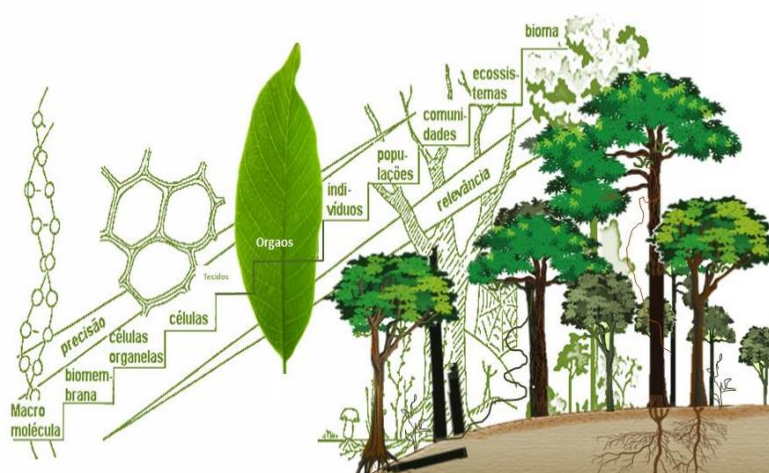
1 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais, com sua rica biodiversidade, desempenham um papel central no sistema de clima da terra por atuar nos ciclos globais do carbono e da água (Schimel, 1995), a partir da absorção do CO₂ atmosférico, acarretando um grande efeito atenuante do aquecimento global. As florestas tropicais absorvem grandes quantidades de CO₂ atmosférico, representando ~ 34% (42 PgC ano⁻¹) (Beer *et al.*, 2010) da produtividade primária bruta (GPP) do total global. Uma alta sensibilidade a eventos de seca desse grande sumidouro de carbono terrestre tem sido cada vez mais documentada, incluindo reduções na produtividade primária líquida (NPP), resultando em diminuição dos ganhos de biomassa, ou seja, com o aumento da mortalidade da vegetação durante as generalizadas secas de 2005, 2010 e 2015 na Amazônia (Zeng *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2009; Higuchi *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2011; Laan-Luijckx *et al.*, 2015; Jardine *et al.*, 2017). Portanto, as tendências de aquecimento provocadas pela mudança climática ameaçam a capacidade dos ecossistemas tropicais de manter um sumidouro de carbono líquido ao longo do século XXI e, conseqüentemente, atenuar os efeitos de alterações climáticas antropogênicas na atmosfera (Sampaio-Filho *et al.*, 2018). Um dos primeiros processos em resposta da planta à alta temperatura e seca, ou seja, condições de estresse, é a acumulação rápida do isoprenóide fitohormônio ácido abscísico (ABA), que estimula o fechamento estomático e de espécies reativas de oxigênio (ROS) que inicialmente funcionam como sinais que ativam respostas de defesa (Tan *et al.*, 1998). Dado o seu importante papel na indução de reduções da condutância estomática (gs), o ABA tem sido implicado no comportamento isohídrico das plantas. As plantas isohídricas são capazes de responder rapidamente à escassez de água manifestada por diminuição do potencial hídrico foliar durante o final da manhã até o início da tarde, fechando seus estômatos para reduzir a transpiração, levando a uma supressão da fotossíntese líquida (Schulze e Hall, 1982). Mudanças nas características funcionais hidráulicas das plantas estão altamente associadas às variações locais no tipo de solo, estrutura da floresta e disponibilidade de umidade. Por exemplo, na Amazônia central, vales (“Baixios”) com solos arenosos predominantes estão verticalmente próximos do lençol freático acesso ilimitado à água por raízes (Cosme *et al.*, 2017). Assim, a perda de turgescência foliar fornece um sinal endógeno que parece desencadear o acúmulo de ABA. Esta dificuldade é ainda mais amplificada nos trópicos devido à baixa velocidade do transporte de seiva (< 30 cm h⁻¹) e alturas de árvore de grande porte (até 45 m) como demonstrado por (Sampaio-Filho *et al.*, 2018) em uma floresta tropical madura não perturbada na Amazônia central, durante um período de 12 dias na estação seca. Os resultados mostram que para a altura das árvores de 19,8 para 31,0 m, a velocidade média de

seiva diária variou entre 0,4 e 1,4 m/dia com o transporte das raízes para o dossel entre 22 e 49 dias. Estes tempos de transporte extremamente longos tornam o cenário do regulamento estomático rápido com o transporte de ABA da raiz para as folhas improvável, sugerindo a importância de uma fonte direta de ABA na folha. Assim, esse projeto visa investigar a principal fonte de biossíntese desse potente fitohormônio ABA e descrever como os aspectos ambientais e fisiológicos estão relacionados.

2 JUSTIFICATIVA

O fitohormônio ABA pode ajudar a conservar a água, manter a integridade da membrana celular e diminuir o estresse oxidativo e também tem mostrado ser um bom indicador de termotolerância em plantas (Sampaio-Filho et al., 2018). No atual cenário de pesquisas envolvendo as florestas tropicais, ainda é pouco elucidado a compreensão da relação de fatores ambientais, fisiológicos e bioquímicos, fatores extremamente importantes. A importância da relevância da escala dessa pesquisa (**Figura 1**), considerando os processos fisiológicos e bioquímicos em folha são essenciais para a precisão, calibração e melhoramento de modelos de sistemas terrestres (ESMs), para o entendimento de como as florestas tropicais estão respondendo às mudanças climáticas e como elas sobreviverão em caso de eventos extremos de seca e alta temperatura, dada sua importância no ciclo de carbono e de água. Compreender o mecanismo de sinalização do ABA é fundamental para entender o desempenho da planta sob ambientes de estresse, e como o balanço de carbono das florestas tropicais e os feedbacks dos sistemas climáticos responderão aos impulsionadores ambientais em mudança ao longo do século XXI, diminuindo as incertezas dos cenários futuros para o clima (Sampaio-Filho et al., 2018).



Fonte, Körner, C. (1993), (Rezende, 2015). Adaptado.

Figura 1: Representação da importância do estudo a nível de escala.

Neste estudo, contaremos com colaboração de uma equipe de pesquisadores renomados com experiência em ecofisiologia de plantas (Ms. Israel Sampaio, proponente da proposta e estudante de doutorado do PPG-CFT/INPA); fisiologia e bioquímica de plantas, metabolômica volátil, química analítica e redes de sensores ambientais (Dr. Kolby Jardine do Lawrence Berkeley National Laboratory Berkeley-EUA); manejo florestal (Dr. Niro Higuchi Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA); anatomia e histoquímica vegetal (Dr. Fabiano Martins da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB); ecofisiologia de plantas e ecologia de ecossistemas terrestres (Dr. João Victor Rodrigues da Universidade Federal do Amazonas-UFAM e do Dr. Ricardo Marengo do INPA); química de produtos naturais nas áreas de medicamentos, alimentos, cosméticos e de geração de energia (Dr. Sérgio Nunomura do LTQPN-INPA); e especialista em identificação de árvores o Sr. Francisco Reis do INPA e de um mateiro especialista em arborismo Sr. Sidney Souza do INPA.

3 HIPÓTESE

Esse estudo evidencia a hipótese de que, devido à forte conexão entre o ciclo de Calvin e via MEP, as variáveis que influenciam a fotossíntese, incluindo temperatura foliar, concentração interna de CO_2 que também podem afetar a produção de ABA na folha, e que as variáveis que influenciam o estado da água na folha, incluindo déficit de pressão de vapor da atmosfera (DPV) e potencial hídrico foliar também são esperadas para influenciar a produção de ABA (**Figura 2**).

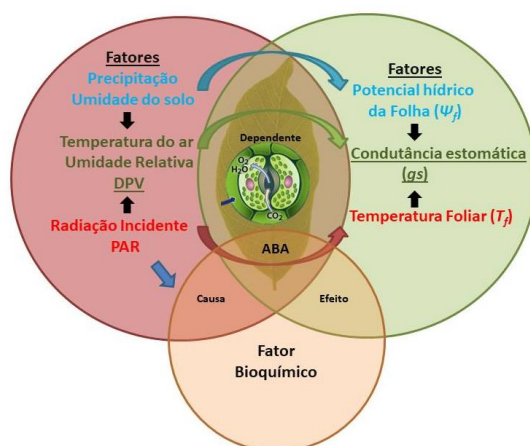


Figura 2: Representação de como se relacionam fatores ambientais, fisiológicos e bioquímicos.

Como tem sido demonstrado para a biossíntese de isopreno e monoterpenos ligada à fotossíntese com carbono marcado através da via MEP (Jardine *et al.*, 2010; Jardine *et al.*, 2011; Jardine *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2014), propomos a hipótese de que as taxas de

produção de ABA podem continuar a aumentar com a temperatura da folha, pode apresentar um feedback positivo do fechamento estomático, a minimização da perda de água e a prevenção de falha hidráulica e mortalidade. Assim, através da regulação dos estômatos e da sinalização de estresse que altera fluxos de água e carbono, nossa hipótese geral é : **ABA esta no centro do Nexo Carbono-Água da resposta das plantas tropicais à alta temperatura e ao estresse hídrico** e será testada com as sub-hipóteses seguintes.

H1: A produção de ABA e o fechamento estomático têm uma forte relação com as estratégias hidráulicas da planta e com a vulnerabilidade de seu sistema hidráulico. Além disso, o colapso do sistema de transporte de água segue a alta produção de ABA e está intimamente ligado à falha hidráulica sob condições de seca. Isso leva à hipótese de que existe um feedback positivo entre o aquecimento das folhas, a concentração de ABA, o fechamento dos estômatos e a tensão folha/xilema. Esta sub-hipótese será testada com a **Atividade 1 e 2**, onde serão conduzidos experimentos controlados de disponibilidade hídrica e temperatura foliar, e determinando padrões diurnos em ABA foliar, condutância estomática, potencial hídrico foliar, perda de turgescência foliar e condutividade do xilema.

H2: A alta temperatura e o estresse por umidade ativam a biossíntese de ácido abscísico foliar (ABA), que induz o fechamento estomático. Embora geralmente assumido derivar de raízes durante o estresse hídrico, a produção foliar de ABA ligada à fotossíntese pode ser a fonte dominante de ABA na planta. Esta hipótese prevê que a fotossíntese sob $^{13}\text{CO}_2$ resultará em rápida marcação com ^{13}C de isoprenóides derivados de folhas, incluindo isopreno, monoterpenos, carotenóides e ABA. Esta sub-hipótese será testada com a **Atividade 2**, onde será demonstrado pela primeira vez como ocorre a biossíntese de ABA na folha via processo fotossintético.

H3: Mudanças nas características funcionais hidráulicas das plantas como o diâmetro de elementos de vasos e densidade da madeira estão altamente associadas às variações locais no tipo de solo, estrutura da floresta e disponibilidade de umidade (Cosme et al., 2017), isso demonstra diferentes estratégias da planta para controlar a perda de água (**Figura 3**), assim essas estratégias tem forte ligação com aspectos bioquímicos da planta e a biossíntese de ABA pode estar diretamente associados as características funcionais essa hipótese será testada com a **Atividade 3**.

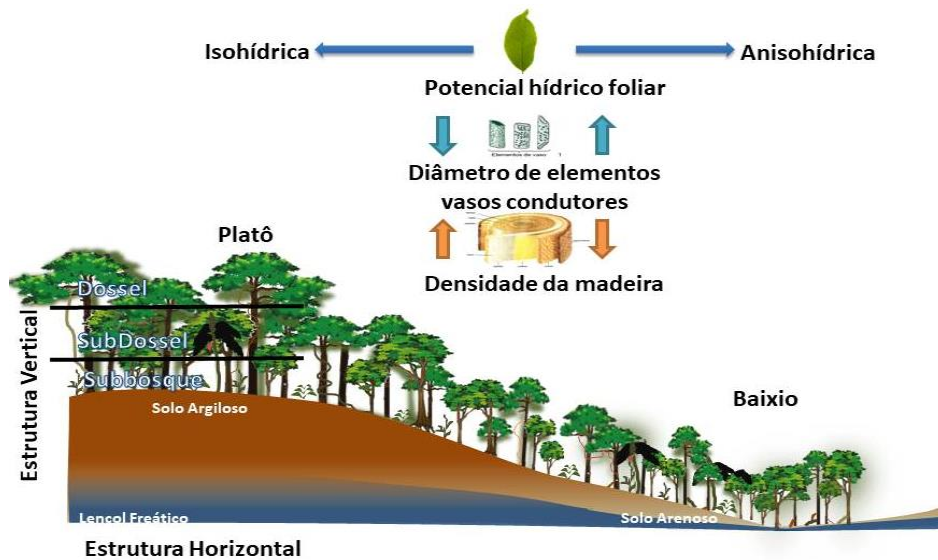


Figura 3. Mudanças nas características funcionais hidráulicas das plantas como o diâmetro de elementos de vasos e densidade da madeira estão altamente associadas às variações locais no tipo de solo, estrutura da floresta e disponibilidade de umidade.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Entender e descrever os mecanismos bioquímicos para a principal fonte de biossíntese do fitohormônio ácido abscísico (ABA) e sua relação com aspectos ambientais e fisiológicos de plantas ameaçadas em situação de estresse hídrico e aumento de temperatura.

4.2 Objetivos específicos

- Investigar a fonte de biossíntese de ABA e sua relação com aspectos ambientais e fisiológicos;
- Investigar e descrever a biossíntese de ABA nas folhas;
- Descrever e comparar a anatomia foliar de duas espécies em fase juvenil (casa de vegetação) e em fase adulta (Campo) e suas relações com a biossíntese de ABA;
- Descrever e comparar a anatomia do xilema de duas espécies em fase juvenil (casa de vegetação) e em fase adulta (Campo) e suas relações com a biossíntese de ABA.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Caracterização da área de estudo

O sítio do Experimento de Larga Escala na Biosfera-Atmosfera na Amazônia - LBA em Manaus ($2^{\circ}36'32''$ S, $60^{\circ}12'33''$ O, 140m de altitude.) localiza-se na Reserva Biológica do Rio Cuieiras (**Figura 4**) cerca de 80 km ao norte da cidade de Manaus, Amazonas, (INPA, 2016). A área é acessada por uma estrada vicinal (ZF-2) até o km 34 à oeste da rodovia BR-174 (Manaus-Caracas). Apresenta variações de ondulações topográficas, como: vales (baixio), planície (platôs) e encostas (vertentes) (**Figura 4. a e b**), além de diferentes tipologias florestais entre essas superfícies (Rennó et al., 2008).

Mapa de Localização e Diagrama de Perfil da Área de Estudo

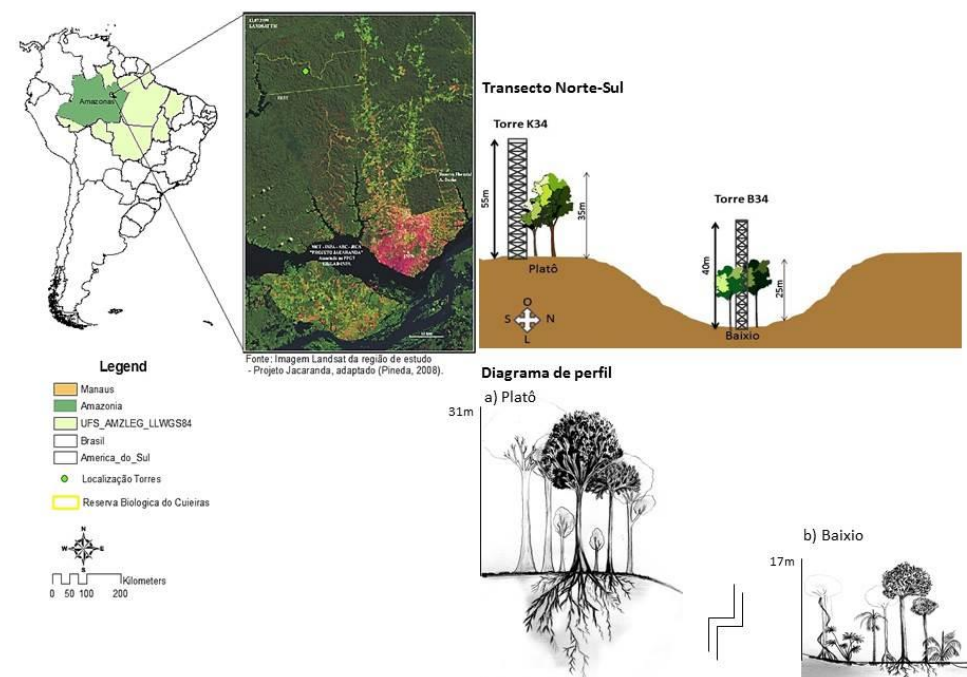


Figura 4: Mapa de localização da área de estudo – ZF2, Manaus. Desenho esquemático da localização das torres B34 e K34 no transecto Norte-Sul. Diagrama de perfil que representa a fisionomia da área de estudo, a) fisionomia da floresta no Platô e b) fisionomia da floresta no Baixio.

A vegetação é do tipo Floresta Tropical Úmida de Terra-Firme, caracterizada pela alta diversidade de espécies florestais lenhosas e herbáceas, com presença abundante de lianas e palmeiras. (Higuchi et al., 1997; Carneiro et al., 2005). As famílias botânicas mais abundantes na área são: Ceasalpiniaceae, Vochysiaceae, Euphorbiaceae, Clusiaceae, Sapotaceae, Myristicaceae, Rutaceae, Malpighiaceae, Anacardiáceae (Araújo et al., 2002).

O clima da região segundo a classificação de Köppen-Geiger é “Afi” (Peel et al., 2007) caracterizado por chuvas abundantes, bem distribuídas ao longo do ano. A precipitação anual média é 2.286 mm/ano, com a presença de curta estação seca definida pela precipitação mensal inferior a 150 mm nos meses de julho a setembro. Os solos próximos à área apresentam no platô solo de textura argilosa, nas vertentes os solos variam de argilo-arenoso a arenoso-argiloso, e no baixio os solos são de textura arenosa (Ferraz et al., 1998; Ribeiro et al., 1999).

5.2 Desenho experimental e seleção das espécies

A abordagem geral é estudar os principais processos que se espera que sejam generalizáveis em ambientes experimentais controlados em casa de vegetação e laboratório, e então desenvolver essa compreensão em árvores maduras em estudos observacionais e experimentais no sítio objeto de estudo desse projecto numa floresta primária intacta Floresta Úmida de Terra Firme. A investigação desses processos bioquímicos, fisiológicos e físicos é complexa, devido à ampla escala espacial sobre a qual são influenciados e sobre os quais reagem: fotossíntese, respiração/fotorrespiração, biossíntese da parede celular que impactam a estrutura e dinâmica da floresta, incluindo a direção e a magnitude dos fluxos H₂O e CO₂ na escala do ecossistema. Assim se faz necessário dividir esse estudo em duas grandes etapas.

Na primeira etapa (**E1**) será realizado um experimento controlado em casa de vegetação no INPA onde serão utilizadas duas espécies, correspondente a dois grupos de sucessão ecológica (pioneira e clímax). O critério usado para a seleção das espécies leva em conta a importância econômica e social bem como a lista de espécies ameaçadas de extinção da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) e do Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Espécies selecionadas de acordo com sua situação na lista de espécies ameaçadas.

Nome popular	Nome científico	Família	Bioma	Categoria*	Grupo Ecológico
Ucuúba	<i>Virola surinamensis</i> (Rol. ex Rottb.) Warb.	Myristicaceae	Amazônia; ou Caatinga	EN	Clímax
Mogno	<i>Swietenia macrophylla</i> King.	Meliaceae	Amazônia	VU	Pioneira

*Categoria de espécies ameaçadas - Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) e da Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora).

EN - Em Perigo

VU - Vulnerável

Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Swietenia macrophylla](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Swietenia%20macrophylla)>. Acesso em 22 julho 2019.

O desenho experimental será inteiramente causalizado com duas espécies com três tratamentos de regime de irrigação (100%, 50% e 25%) da capacidade de campo (**Figura 5**).

O experimento será inicializado após período de aclimação de 20 dias das mudas, serão três repetições para cada espécie dentro dos tratamentos. A segunda etapa (ET2) será conduzida no campo com as mesmas espécies arbóreas em estágio adulto com três repetições por espécies em dois ambientes distintos (baixio e platô) em dois períodos de regimes de precipitação (seco e chuvoso) próximos a torres de monitoramento climático do LBA no transecto Norte-Sul (**Figura 5**). As espécies no campo serão identificada por um parobotânico especialista em identificação de espécies, serão coletadas amostras de galhos onde serão feitas exsicatas para posterior confirmação no banco de dados de coleção botânica do INPA.

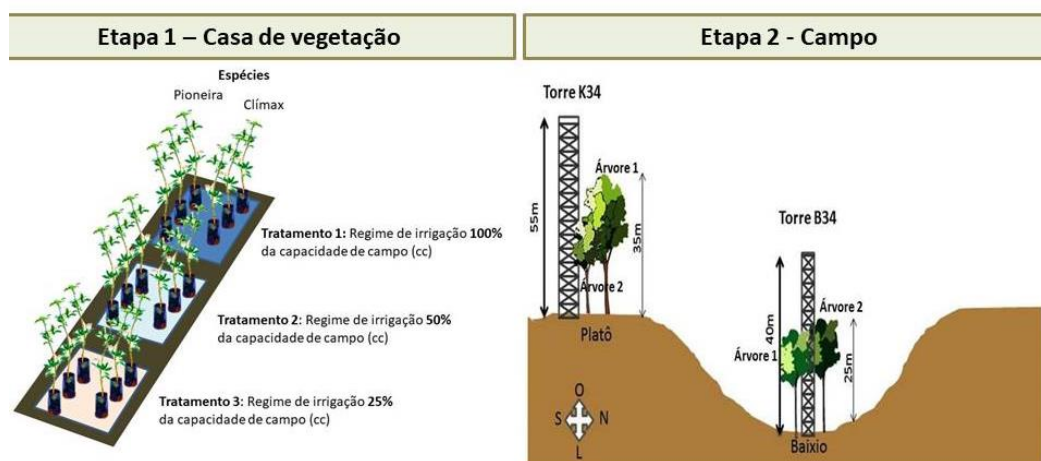


Figura 5: Representação esquemática das etapas do experimento e desenho experimental. Etapa 1 será realizado em um experimento controle em casa de vegetação e Etapa 2 em uma floresta preservada.

5.3 Equipamentos

Nesse projeto serão utilizados uma série de equipamentos de alta tecnologia para coleta e análise de dados ecosifiológicos descritos na seção Etapas e Atividades abaixo (**Figura 7**).



Figura 7: Exemplo de equipamentos que serão utilizados no desenvolvimento dos experimentos.

5.4 Organograma de execução

No **(Quadro 1)** estão organizados as etapas e as atividades que serão desenvolvidas, bem como o local e a equipe executora com os principais colaboradores.

Quadro 1: Descrição das etapas e atividades que serão desenvolvidas.

Experimentos/ Etapas	Atividade	Detalhamento da Atividade	Local de realização da atividade	Equipe/Colaboradores
CASA DE VEGETAÇÃO/ ETAPA 1	ET1-A1	Medições fisiológicas: transpiração, fotossíntese líquida, condutância estomática, potencial hídrico da folha e suas sensibilidades à alta temperatura e a seca.	Casa de vegetação INPA-Campus V8	Ms.Israel Sampaio (INPA) Colaborador Principal: Dr. Ricardo Marengo (INPA) – Dr. João Victor Rodrigues (UFAM) Dr. Kolby Jardine (LNB– Berkeley) Dr. Niro Higuchi (INPA) Dr. Savio Ferreira (INPA)
	ET1-A2	Análise de concentração de ABA baseado em LC-MS	Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais – INPA Campus 1 Rodrigo Otávio	Ms.Israel Sampaio (INPA) Colaborador Principal: Dr. Sérgio Nunomura (INPA) Dr. João Victor Rodrigues (UFAM) Dr. Kolby Jardine (LNB– Berkeley) Dr. Niro Higuchi (INPA)
	ET1-A3	Caracterização Anatômica foliar e da madeira	Laboratório de Anatomia e Histoquímica vegetal da UFRB, Bahia.	Ms.Israel Sampaio (INPA) Colaborador Principal: Dr. Fabiano Martins (UFRB)- Dr. João Victor Rodrigues (UFAM) Dr. Kolby Jardine (LNB– Berkeley)
CAMPO SÍTIO EXPERIMENTAL ZF2/ ETAPA 2	ET2-A1	Medições fisiológicas: transpiração, fotossíntese líquida, condutância estomática, potencial hídrico da folha e suas sensibilidades à alta temperatura e a seca.	Sítio Experimental do Programa de Larga Escala na Biosfera-Atmosfera na Amazônia - LBA, ZF2-Manaus, AM.	Ms.Israel Sampaio (INPA) Colaborador Principal: Dr. Niro Higuchi (INPA) Dr. João Victor Rodrigues (UFAM) Mateiro: Sidney Souza (ZF2) Mateiro: Francisco (ZF2) Dr. Kolby Jardine (LNB– Berkeley)
	ET2-A2	Análise de concentração de ABA baseado em LC-MS	Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais – INPA Campus 1 Rodrigo Otávio	Ms.Israel Sampaio (INPA) Colaborador Principal: Dr. Sérgio Nunomura (INPA) Dr. João Victor Rodrigues (UFAM) Dr. Kolby Jardine (LNB– Berkeley) Dr. Niro Higuchi (INPA)
	ET2-A3	Caracterização Anatômica foliar e da madeira	Laboratório de Anatomia e Histoquímica vegetal da UFRB, Bahia.	Ms.Israel Sampaio (INPA) Dr. Fabiano Martins (UFRB)- Colaborador Principal Dr. João Victor Rodrigues (UFAM) Dr. Kolby Jardine (LNB– Berkeley)
DIVULGAÇÃO	A4	Publicação de artigo científico	INPA	Todos os envolvidos.

6 ETAPAS E ATIVIDADES

6.1 Medições fisiológicas: transpiração, fotossíntese líquida, condutância estomática, potencial hídrico da folha e suas sensibilidades à alta temperatura e à seca

6.1.1 Casa de vegetação

Nesta tarefa, testaremos a hipótese **H1** de que a produção de ABA e o fechamento estomático têm uma forte relação com as estratégias hidráulicas da planta e com a vulnerabilidade de seu sistema hidráulico. Acredita-se que o aumento nas concentrações de ABA foliar, produzido em resposta ao declínio da pressão do turgor foliar e aumento da tensão do xilema, fecha os estômatos. Para que os estômatos reabram após um período de estresse hídrico, as concentrações de ABA devem diminuir (Seo & Koshiba, 2002; McAdam & Brodrib, 2016). Devido à sua influência sobre o potencial físico (por exemplo, transpiração e água da folha) e bioquímica (atividade enzimática) das propriedades foliares, as influências dos regimes de precipitação (seco e chuvoso) sobre gs e a contração de ABA na folha devem

ser explorados. Para cada espécie conduziremos curvas de resposta de temperatura foliar controladas (30-40 ° C) usando um Li-Cor 6400 XT sistema de fotossíntese portátil (Li-Cor, Lincoln®, NE, United States) para quantificar as respostas de transpiração, fotossíntese líquida e condutância estomática sob (luz e concentrações de CO₂ de referência mantidas constantes). Para cada indivíduo serão selecionadas 2 folhas (uma curva de resposta a temperatura por folha) serão estudadas durante as 10:00AM - 14:00PM no período de 7 dias após o período de aclimatação das mudas ao experimento com 3 tratamentos.

6.1.2 Campo

Nesta atividade, avaliaremos também os impactos sobre a hidráulica vegetal e processos fisiológicos de plantas durante tratamentos de alta temperatura para testar a **H1**. Para cada período/regime de precipitação serão feitas três coletas de folhas cujos os galhos estejam totalmente expostos ao sol. Para cada espécie conduziremos curvas de resposta de temperatura foliar controladas (30-40 ° C) usando um Li-Cor 6400 XT sistema de fotossíntese portátil (Li-Cor, Lincoln®, NE, United States) para quantificar as respostas de transpiração, fotossíntese líquida e condutância estomática sob (luz e concentrações de CO₂ de referência mantidas constantes). Para cada indivíduo serão selecionadas três folhas (uma curva de resposta a temperatura por folha) serão estudadas durante as 10:00AM - 14:00PM. Além disso, para avaliar a sensibilidade ao regime de precipitação em maior detalhe, geraremos curvas Folha-Pressão (Volume PV) e perda percentual de condutividade hidráulica (PLC) utilizando a secagem em bancada com método de pressurização repetida (Sack *et al.*, 2003) usando um instrumento de câmara de pressão (Modelo 1000, PMS Instrument Company®).

6.2 Análise de concentração de ABA baseado em LC-MS

6.2.1 Casa de vegetação

As espécies serão selecionadas aleatoriamente, uma planta de cada grupo de sucessão para condução do experimento de ABA marcado. Assim, será realizado dois subtratamentos, ST1 e ST2. Primeiramente no ST1 se fará uma coleta controle com fluxo de 400ppm de CO₂ a 30°C durante 15min, posteriormente (a folha será submetida a um Fluxo de 400ppm de ¹³CO₂, 30°C, 1000 PARin com intervalos de tempo de exposição de: 15, 30, 60, 90, 120, 180 min), finalmente se fará outra coleta controle. Posteriormente se fará o ST2 com ¹³CO₂ x curva resposta a temperatura (30-40°C) durante 10min, ocorrerá a coleta do controle antes e depois em condições de fluxo de 400ppm de CO₂ e temperatura foliar de 30°C, serão coletados também dados de temperatura foliar com uma câmera digital termal (Flir, EUA).

As coletas de amostras das folhas (10 folhas por muda e duas amostras de 3cm² de comprimento por folha) serão submetidas a um ambiente com fluxo de 400ppm de ¹³CO₂ – carbono marcado, usando o sistema IRGA do Li-Cor 6400 XT sistema de fotossíntese portátil (Li-Cor, Lincoln®, NE, United States) por 5 períodos de tempo (15, 30, 60, 120, 180min) uma folha para cada período de tempo. Simultaneamente, serão coletados dados de gs. Será utilizado um analisador de carbono isotópico em CO₂ com espectroscopia de cavidade ressonante do tipo ring-down (ECRRD) (Cavity RingDown Spectroscopy - CRDS), que é uma técnica baseada em laser. O objetivo deste procedimento é obter a assinatura isotópica ¹³C/¹²C para testar a **H2** onde a principal fonte de ABA nas folhas é via processo fotossintético. Portanto, novos marcadores de carbono serão observados na biossíntese de seus precursores¹, em ABA * e nos seus produtos**(Tabela 2).

Tabela 2: Descrição dos principais compostos envolvidos na biossíntese de ABA.

Compostos	Fórmula Molecular	Massa molecular
9'-cis-neoxanthin ¹	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600.884 g/mol
9-cis-violaxanthin ¹	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600.884 g/mol
Xanthoxin ¹	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250.338 g/mol
Abscísico Aldeído ¹	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	248.322 g/mol
Ácido abscísico*	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,32 g/mol
Ácida abscísico Éster **	C ₂₁ H ₃₀ O ₉	426.4575 g/mol
Ácido Faseico **	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280,31 g/mol
Ácido di-hidrofaseico **	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	282.336 g/mol

As amostras serão colocadas em tubos eppendorf de 3ml que serão armazenados no dry-shipper com Nitrogênio líquido e enviadas para o laboratório de Manejo Florestal onde serão adicionado metanal para posterior análise de ABA. Para análise de concentração de ABA seus precursores e derivados na folha será usado a Cromatografia Líquida de Alta Performance Espectrométrica (UPLC-MS) como descrito por (Symons *et al.*, 2012), no Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (LTQPN) do INPA. No LTQPN, resumidamente, as amostras de (10g) serão moídas em nitrogênio líquido usando um almofariz e cadinho. Após, será utilizado 1g de pó que será misturado com 10 mL de 80% de metanol contendo 1mg de 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT 99,0%, Aladdin Industrial Inc., Xangai, China). A mistura será mantida a 4°C durante a noite e depois filtrada através de um papel de filtro Whatman N^o.1. O líquido será concentrada a menos de 1mL utilizando vácuo de velocidade 35°C. Do concentrado será então tomado 3x3mL de 10% (v/v) metanol e 0,4% (v/v) de ácido acético e injetado num cartucho Sep-Pak C₁₈ (6cc/500 mg, Waters

Corporation, Milford, MA, EUA). O hormônio vegetal ABA será eluído a partir do Sep-Pak com 0,4% (v/v) de ácido acético-metanol solução após uma lavagem com 10% (v/v) de metanol e 0,4% (v/v) ácido acético. Após serão secos sob vácuo, e o resíduo será ressuspensão em 20% (v/v) metanol-0,4% (v/v) ácido acético e centrifugado a 12.000xG por 3 min. O ABA será então analisado usando um Sistema LC/MS triplo quadruplo 6460 da Agilent (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA).

6.2.2 Campo

Serão feitas coletas de amostras das folhas (3 folhas por espécie e três amostras de 12cm de diâmetro por folha) totalmente expostas ao sol em dois períodos diferentes de regimes de precipitação local (seco e chuvoso). Os ramos serão coletados por um especialista em arborismo. As amostras serão colocadas em eppendorf de 3ml, devidamente identificados e armazenada em dry-shipper com nitrogênio líquido. As amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Manejo Florestal-INPA onde será adicionado a cada amostra metanol 99%. As amostras serão encaminhadas ao LTQPN onde serão realizados os mesmos procedimentos descritos na ET1-A2 para análise de concentração de ABA baseado em LC-MS.

6.3 Caracterização anatômica da folha

6.3.1 Casa de vegetação

Para testar a **H3** serão selecionadas folhas de duas espécies de cada grupo ecológico, onde serão retiradas 3 amostras no terço médio da folha para análise anatômica. As amostras serão fixadas em FAA 50% (Johansen 1940) por 24 horas, submetidas a vácuo e transferidas para Álcool etílico 70%. Fragmentos serão isolados e desidratados em série etílica e incluídos em glicol-metacrilato (Meira & Martins 2003). Os blocos serão seccionados em micrótomo rotativo com espessura entre 8 e 12µm. As laminae serão coradas com azul de toluidona 0,05% pH 4,7 (O'Brien et al. 1964) e montadas em resina sintética Permaunt[®]. Para analisar a epiderme em vista frontal, as amostras do meio da lâmina foliar serão submetidas a diafanização por tratamento com hidróxido de sódio a 5%, lavado em água destilada, submetida a hipoclorito de sódio a 20% e será corado com safranina alcoólica a 2% (Berlyn e Miksche 1976). Todas as espécies serão comparadas de acordo com características estruturais (caracteres morfo-anatômicos) numa matriz de presença/ausência.

6.3.1 Campo

Para anatomia foliar serão três folhas de cada grupo de espécies e seguirá mesma metodologia citada acima e teste da **H3**. Para anatomia do xilema, serão coletados núcleo do xilema do caule com um diâmetro de 6,0mm de comprimento aproximadamente igual ao raio do caule (incluindo assim seiva e cerne na amostra) que serão retiradas de cada indivíduo com uma broca Pressler a 1,20m acima do solo e serão armazenados em tubos de ensaio para evitar quebras e dessecação. No laboratório, será conduzido a caracterização das fibras e elementos de vasos, onde as amostras serão submetidas a solução de Ácido crômico e Ácido nítrico. O material será macerado e desidratado, corado com Safrina alcoólica e montada em resina sintética. As amostras serão posteriormente transferidos para xileno puro e montado em lâminas com Permount[®]. Os cortes transversais serão fotografados com um câmera conectada a um microscópio de luz.

6.4 Atividade 4

6.4.1 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado será inteiramente casualizado, tendo como 3 tratamentos diferentes de regime de irrigação na casa de vegetação para 2 espécies de 2 grupos ecológicos com 3 repetições e no campo as mesmas espécies em estagio adulto em 2 ambientes distintos (Baixio e Platô) em 2 épocas do ano (de seca e chuvosa) com 3 repetições. Análises de variância (ANOVA) serão aplicadas para testar se ocorre diferenças significativas quanto as variáveis estudadas. A partir da Anova será procedido a análise de variância das medidas das variáveis fisiológicas, bioquímicas e anatômicas durante os testes de hipótese H1, H2 e H3. Será utilizado o programa estatístico para análises SigmaPlot versão 11.0.

6.4.2 Divulgação

6.4.2.1 Apresentação e palestras

O proponente fará quando necessário a divulgação do projeto e atividades desenvolvidas em reuniões e eventos organizados pelo Funbio bem como realizará relatórios de atividades no decorrer das etapas e atividades desenvolvidas. O proponente também se compromete em divulgar em forma de folder, banner e palestras em espaços da instituição de divulgação científica seguindo as recomendações presentes no edital chamada 02/2019.

6.4.2.2 Publicação de artigo científico

Com o desenvolvimento das atividades acima espera-se a partir da análise dos resultados concluí-las com a publicação de artigo científico em periódico com grande fator de impacto como a *New Phytologist*.

7 RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO PREVISTO DO PROJETO

A abordagem experimental geral é projetada para investigar a variação entre características funcionais na capacidade das espécies de árvores tolerarem ao estresse de umidade e temperatura, com um objetivo geral de uma compreensão mecanicista muito melhorada do futuro da floresta tropical sob um clima de aquecimento global e eventos extremos de seca e altas temperaturas. Um aspecto essencial derivado da compreensão desses modelos de previsão do clima futuro e como as florestas irão responder frente a cenários extremos do clima deverá ser base para políticas públicas que visem a médio e curto prazo a segurança e soberania nacional, uma vez perpassando por políticas que visem a conservação da biodiversidade. Os resultados dessa pesquisa também serão incorporados ao banco de dados do Next-Generation Ecosystem Experiments-Tropics , NGEE-Tropics que visa preencher as lacunas críticas no conhecimento das interações do sistema florestal tropical e o clima. O objetivo primordial da NGEE-Tropics é desenvolver uma compreensão preditiva de como o balanço de carbono das florestas tropicais e os feedbacks dos sistemas climáticos responderão aos impulsionadores ambientais em mudança ao longo do século XXI. Na atual fase 1 do NGEE-Tropics, estamos avaliando o que se sabe sobre os ecossistemas de florestas tropicais e como esses processos são representados nos modelos de sistemas terrestres (ESMs). Esse estudo proposto de campo e de laboratório fornecerão novos dados de alta prioridade para modelos de ecossistemas florestais. Assim, a curto e longo prazo, esse estudo melhorar a compreensão de como os ecossistemas terrestres, em especial às florestas tropicais e suas espécies ameaçadas respondem às mudanças do clima presente e futuro. Espera-se com os resultados a publicação de no mínimo um artigo em uma revista de alto impacto.

8 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Experimentos/Etapas do Projeto	Descrição das Atividades	Local onde serão realizadas as atividades	2020						2021			
			Jan-Fev	Mar-Abr	Mai-Jun	Jul-Ago	Set-Out	Nov-Dez	Jan-Fev	Mar-Abr	Mai-Jun	
Etapa 1 Experimento em casa de vegetação	ET1-A1 Medições fisiológicas: transpiração, fotossíntese líquida, condutância estomática, potencial hídrico da folha e suas sensibilidades à alta temperatura e à seca	INPA-V8 Manaus										
	ET1-A2 Análise de concentração de ABA baseado em LC-MS.	INPA - I Manaus										
	ET1-A3 Caracterização anatômica da folha	UFRB Bahia										
Relatório de Atividades	Resultados alcançados	INPA										
Etapa 2 Experimento no Campo	ET2-A1 Medições fisiológicas: transpiração, fotossíntese líquida, condutância estomática, potencial hídrico da folha e suas sensibilidades a diferentes regimes de precipitação.	LBA/ZF2 Manaus										
	ET2-A2 Análise de concentração de ABA baseado em LC-MS.	INPA - I Manaus										
	ET2-A3 Caracterização anatômica da folha e da madeira.	UFRB Bahia										
Relatório de Atividades	Resultados alcançados	INPA										
Divulgação	ATIVIDADE 4 Publicação de artigo científico	INPA										

9 REFERÊNCIAS

Aaraújo, A. et al. Comparative measurements of carbon dioxide fluxes from two nearby towers in a central Amazonian rainforest: The Manaus LBA site. *Journal of eophysical Research: Atmospheres*, v. 107, n. D20, 2002. ISSN 2156-2202.

Alves, E.G. et al. Effects of light and temperature on isoprene emission at different leaf developmental stages of *Eschweilera coriacea* in central Amazon. *Acta Amazon*, 44, 9–18. 2014.

Beer, C. et al. Terrestrial gross carbon dioxide uptake: global distribution and covariation with climate. *Science*, v. 329, n. 5993, p. 834-838, 2010. ISSN 0036-8075.

Berlyn GP, Miksche JP 1976. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University, p. 121, 276.

Carneiro, V. et al. Composição Florística e Análise Estrutural da Floresta de terra firme na região de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. Actas das Comunicações-Inventário, Modelação e Gestão. Viso, Portugal: V Congresso Florestal Nacional A Floresta e as Gentes. Available: <http://www.esac.pt/cernas/cfn5/docs/T2-40.pdf>, 2005.

Cosme, L.H. et al. The importance of hydraulic architecture to the distribution patterns of trees in a central Amazonian forest. *New Phytol.* 2017, 215, 113–125.

Ferraz, J.; Ohta, S.; Sales, P. D. Distribuição dos solos ao longo de dois transectos em floresta primária ao norte de Manaus (AM). Higuchi, N., Campos, MAA, Sampaio, PTB, and dos Santos, J., *Espaço Comunicação Ltda.*, Manaus, Brazil, v. 264, 1998.

Higuchi, N. et al. A floresta amazônica e a água da chuva. *Floresta*, v. 41, n. 3, 2011. ISSN 1982-4688.

Higuchi, N. et al. Crescimento e incremento de uma floresta amazônica de terra-firme manejada experimentalmente. MCT-INPA. Biomassa e nutrientes florestais—**Relatório Final do Projeto Bionte**. Manaus, p. 89-131, 1997.

Jardine K, Abrell L, Yanez Serrano AM et al. Ecosystem-scale compensation points of formic and acetic acid in the central Amazon. *Biogeosciences*, 8, 3709-3720. 2011.

Jardine K, et al. Volatile organic compound emissions from *Larrea tridentata* (creosotebush). *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10, 12191- 12206. 2010.

- Jardine, K. J. et al. Monoterpene ‘thermometer’ of tropical forest-atmosphere response to climate warming. **Plant, cell & environment**, v. 40, n. 3, p. 441-452, 2017. ISSN 1365-3040.
- Jardine, K.J.; Abrell, L.; Jardine, A.; Huxman, T.; Saleska, S.; Arneth, A.; Monson, R.; Karl, T.; Fares, S.; Loreto, F.; et al. Within-plant isoprene oxidation confirmed by direct emissions of oxidation products methyl vinyl ketone and methacrolein. **Glob. Chang. Biol.**, 18, 973–984. 2012.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw–Hill.
- Laan-Luijkx, I. et al. Response of the Amazon carbon balance to the 2010 drought derived with CarbonTracker South America. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 29, n. 7, p. 1092-1108, 2015. ISSN 1944-9224.
- Lewis, S. L. et al. The 2010 amazon drought. **Science**, v. 331, n. 6017, p. 554-554, 2011. ISSN 0036-8075.
- McAdam, S.A.; Brodribb, T.J.; Ross, J.J. Shoot-derived abscisic acid promotes root growth. **Plant Cell Environ**, 39, 652–659. 2016.
- Meira, R. M. S. A., and F. M. Martins. 2003. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. *Revista Árvore* **27**: 109– 112.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma****59**(2): 368-373.
- Peel, M. C.; Finlayson, B. L.; McMahon, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and earth system sciences discussions**, v. 4, n. 2, p. 439-473, 2007.
- Phillips, O. L. et al. Drought sensitivity of the Amazon rainforest. **Science**, v. 323, n. 5919, p. 1344-1347, 2009. ISSN 0036-8075.
- Rennó, C. D. et al. HAND, a new terrain descriptor using SRTM-DEM: Mapping terra-firme rainforest environments in Amazonia. **Remote Sensing of Environment**, v. 112, n.9,p. 3469-3481, 2008. ISSN 0034-4257.
- Ribeiro, J. et al. Flora da reserva Ducke: Flora da reserva Ducke: Flora da reserva Ducke: guia de identificação de plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: **INPA**, 1999.
- Sack L, et al. The ‘hydrology’ of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. **Plant, cell & environment**, 26, 1343-1356. 2003.
- Sampaio Filho, IJ et al. Below versus above ground plant sources of abscisic acid (ABA) at the heart of tropical forest response to warming. **Int J Mol Sci**,19(7). 2018.
- Schimel, D. S. Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. **Global change biology**, v. 1, n. 1, p. 77-91, 1995. ISSN 1365-2486.
- Schulze, E.-D., and Hall, A. E. Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. In 'Physiological Plant Ecology 11. Water Relations and Carbon Assimilation'. (Eds O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond and H. Ziegler) **Encycl. Plant Physiol., New Ser.**, Vol. 12B, pp. 181-230. 1982.
- Seo M,; Koshiba T: Complex regulation of ABA biosynthesis. **Trends Plant Sci**, 7:41-48. 2002.
- Symons GM, et al. Mudanças hormonais durante o amadurecimento não-climatérico em morango. **J Exp Bot**, 63: 4741-4750. (2012)
- Tan, S. et al. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. **The Journal of cell biology**, v. 141, n. 6, p. 1423-1432, 1998. ISSN 0021-9525.
- Zeng, N. et al. Causes and impacts of the 2005 Amazon drought. **Environmental Research Letters**, v. 3, n. 1, p. 014002, 2008. ISSN 1748-9326.

10 ANEXO 1 - ORÇAMENTO DETALHADO

Bolsas Fúmbio - Conservando o Futuro
ANEXO I - Orçamento Detalhado

CHAMADA N° 02/2019

Título do projeto	Aspectos ecofisiológicos de espécies de plantas ameaçadas: Como a biossíntese de ácido abscísico (ABA) em folha pode ser a principal fonte da resposta da floresta tropical à seca e às altas temperaturas?	
Nome do Proponente	Israel de Jesus Sampaio Filho	
Instituição de Ensino e Programa	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA	
Tipo de Bolsa (Mestrado ou Doutorado)	Doutorado	
Total requisitado (R\$)	R\$ 37,300.70	

Orçamento da Pesquisa						
Categoria de despesa	Descrição dos itens	Material será cedido para Instituição (Sim ou Não)	Quantidade	Unidade (un; litro; metro; dia; km)	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Uso e consumo	Papel A4	Não	4	Resma	R\$ 25.00	100.00
	Pastas AZ	Não	1	Un	R\$ 20.00	20.00
	Saco plástico para mudas tamanho 15 x 20cm	Sim	50	Un	R\$ 0.80	40.00
	Fita adesiva dupla face	Sim	1	Un	R\$ 6.00	6.00
	Planilha de campo	Sim	1	Un	R\$ 8.00	8.00
	Adubo Fertilizante NPK Uréia Granulada 5kg	Sim	1	Pacote	R\$ 36.00	36.00
	Sementes de Ucuúba	Sim	2	kg	R\$ 70.00	140.00
	Sementes de mogno (100g)	Sim	3	g	R\$ 149.00	447.00
	Gás Nitrogênio Comprimido (N2) 20L	Sim	2	Un	R\$ 300.00	600.00
	Nitrogênio Líquido	Sim	5	litro	R\$ 580.00	2,900.00
	Resina histológica - HISTORESINA - 500 ML - LEICA	Sim	1	Frasco	R\$ 1,419.00	1,419.00
	Lâmina Para Microscopio 26x76 Mm Caixa Caixa com 250	Sim	8	Un	R\$ 34.00	272.00
	Cilindro pra 13C02 (440 ML LECTURE BOTTLE CGA 110/170 BRASS ANGLE	Sim	2	Un	R\$ 370.00	740.00
	Dióxido de Carbono (13C, 99%) (<2% 18O) 5L	Sim	2	Un	R\$ 2,475.00	4,950.00
	Peróxido de hidrogênio 500ml	Sim	2	Un	R\$ 813.00	1,626.00
	Ácido acético 99,0% 1L	Sim	2	Un	R\$ 86.00	172.00
	Álcool étílico 70% FRASCO DE 1000ML	Sim	2	litro	R\$ 16.20	32.40
	Álcool étílico ABSOLUTO 99,5% Frasco 1000ML	Sim	2	litro	R\$ 25.60	51.20
	Formaldeido 37% - P.A., A.C.S. - 1L	Sim	1	litro	R\$ 298.00	298.00
	Azul de Toluidina FRASCO DE 25gr	Sim	2	un	R\$ 80.50	161.00
Laminula para Microscopia Retangular Tamanho 24 x 32mm caixa com 100	Sim	20	un	R\$ 12.28	245.60	
Reagente 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol BHT 99,0% 1Kg	Sim	1	Un	R\$ 633.00	633.00	

Continuação...

Serviço de Terceiros Pessoa Física	Mateiro especialista em identificacao de árvores	Não se aplica	5	dia	R\$ 180.00	900.00
	Mateiro especialista em arborismo	Não se aplica	10	dia	R\$ 150.00	1,500.00
Viagens	Diesel para Deslocamento (INPA-Manaus-Campo/ZF2-INPA-Manaus)	Sim	450	litro	R\$ 4.89	2,200.50
	Passagens áreas (Manaus/Bahia/Manaus)	Não se aplica	4	Un	R\$ 1,300.00	5,200.00
	Hospedagem Pousada do sol Cruz das Almas-BA.	Não se aplica	14	dia	R\$ 80.00	1,120.00
	Transporte aeroporto Salvador/Cruz das Almas/Salvador	Não se aplica	4	Un	R\$ 90.00	360.00
	Alimentacao (Café da manha, almoco e janta)	Não se aplica	14	dia	R\$ 60.00	840.00
Equipamentos	Microcomputador Novo Inspiron 15 3000 DELL (Processador Intel® Core™ i7 Windows 10 Home, HD de 2TB, Memória de 8GB)	Não	1	Un	R\$ 3,200.00	3,200.00
	Impressora Multifuncional HP Ink Tank Wireless 416 - Tanque de Tinta W	Sim	1	un	R\$ 670.00	670.00
	DIPPER coletor de Nitrogênio Líquido	Sim	1	Un	R\$ 887.00	887.00
	Container de Nitrogenio Líquido (Frasco de Dewar) - CAP. 10 LT - DIM. EXT. (A X DIAM) 59,7X28,9 CM	Sim	1	Un	R\$ 5,446.00	5,446.00
Outros	Mochila para campo	Não	1	un	R\$ 80.00	80.00
TOTAL						37,300.70