Adriana Yepes Mayorga

**Desenvolvimento e efeito da concentração
atmosférica de CO₂ e da temperatura em
plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L.,
jatobá**

São Paulo

2010

Adriana Yepes Mayorga

**Desenvolvimento e efeito da concentração
atmosférica de CO₂ e da temperatura em
plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L.,
jatobá**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutro em Ciências, na área de
Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira
BUCKERIDGE

São Paulo

2010

Ficha catalográfica

Adriana Yepes Mayorga

Desenvolvimento e efeito da concentração atmosférica de CO₂ e da temperatura em plântulas juvenis de *Hymenaea courbaril* L, jatobá

Número de páginas: 180

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Atmosfera enriquecida de CO₂ 2. Elevada temperatura 3. jatobá

I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof. Dr. Marcos Silveira BUCKERIDGE
Orientador

A Hugo y Susana

Dedico

**“Felizes aqueles que aprendem a dar sem lembrar e
a receber sem esquecer”**

São Agustín

Agradecimentos

A Deus.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge, pela oportunidade de ter sido sua orientanda e pelo seu apoio em momentos chave!

Ao Prof. Sérgio Tadeu Meireles pela orientação estatística, conversas esclarecedoras e amistosas....

Ao agora Prof. Dr. Luciano Freschi e minha amiga Auri Rodrigues, pela amizade, solidariedade, importantes observações e sugestões.

À Mari Ionashiro e Mauro Marabesi, pela amizade, paciência, valiosas conversas e apoio abnegativo.

A Ivan Salles, pela amizade e ajuda.

À Andrea Brandão, pela amizade e persistência com o Peak-Net!

À Adriana Grandis, pela hospitalidade dada à minha chegada em São Paulo.

Aos professores Helenice Mercier, Gilberto Kerbauy, Gregório Cercantty, Carlos Martínez, Enyl Flow, Marcos Aidar, Plínio Camargo pelas conversas esclarecedoras e pelo apoio operacional.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal pelo apoio, momentos de alegria e de compartilhar!

Ao pessoal técnico administrativo do Departamento de Botânica: Aline B., Palomita, Amanda Bio-Cel, Paula, Eglee, Danilo, Ronaldo, Anita, Susi... e a todos aqueles que indiretamente também foram chaves no desenvolvimento da pesquisa

À Ale, Cassinha e Camila, pela companhia e apoio nas longas jornadas de trabalho!

Aos meus colegas, orientandos do Prof. Marcos S. Buckeridge, pelo apoio cotidiano e amizade.

A Hugo Niño pelo amor, paciência, apoio incondicional e sabedoria sempre oportuna e constante ao longo deste processo.

A Susana Mayorga e todos os membros de minha família, pelo carinho e paciência inalteráveis.

À FAPESP e ao CNPq pelas bolsas outorgadas.

A todos os brasileiros, essência desta grande nação, que fizeram do meu processo de doutorado uma experiência plena, com aprendizados e lembranças, os quais permanecem para o resto de vida. Muito obrigada!

ABREVIATURAS

ACP: análise de componentes principais

af: área foliar total(cm^2)

AGPase: ADP-glc pirofosforilase

A_{max} : taxa de assimilação de CO_2 em irradiação de saturação ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$);

A_L : taxa de assimilação líquida de CO_2 , $A_L = A_{\text{max}} - R_e$ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Aux: auxinas

B; b: biomassa (g)

Ca: fração molar de CO_2 atmosférico ($\mu\text{mol.mol}^{-1}$)

CAB: família de genes da proteína de união da clorofila a,b em *Arabidopsis*

Chl a+b: conteúdo total de clorofilas (nmol.cm^{-2})

C_i : fração molar de CO_2 intercelular ($\mu\text{mol.mol}^{-1}$)

C_i/C_a : razão fração molar de CO_2 intercelular / fração molar de CO_2 ambiente

CTA: câmaras de topo aberto

C/N: razão carbono/nitrogênio

CW-INV: invertase de parede celular

dap: dias após o plantio

dpV: déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (kPa)

$e\text{CO}_2\text{-aT}$: elevada concentração de CO_2 (760 ppm), temperatura ambiente

$e\text{CO}_2\text{-eT}$: elevada concentração CO_2 (760 ppm), temperatura elevada ($+3^\circ\text{C}$)

$a\text{CO}_2\text{-aT}$: concentração de CO_2 ambiente, temperatura ambiente

$a\text{CO}_2\text{-eT}$: concentração de CO_2 ambiente, temperatura elevada ($+3^\circ\text{C}$)

E: taxa transpiratória ($\text{mmol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

EUA: eficiência de transpiração instantânea (A/E ; ($\mu\text{mol.mmol}^{-1}$) LAMBERS (2008)

EiUA: eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s ; ($\mu\text{mol.mol}^{-1}$) LAMBERS (2008)

EQ (Φ): eficiência quântica de CO_2 , obtido dos primeiros pontos do coeficiente de regressão linear de curvas de luz

F_C : fração caule; biomassa do caule/biomassa total da planta (g.g^{-1})

F_F : fração folhas; biomassa foliar/biomassa total da planta (g.g^{-1})

F_R : fração raiz; biomassa da raiz/biomassa total da planta (g.g^{-1})

FFFA: fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Fru: frutose ($\mu\text{g} . \text{mg}^{-1}$ de massa seca)

F-1,6-bP (FBP): frutose bifosfato

F6P: frutose 6-fosfato

F_v/F_m : eficiência quântica potencial do fotossistema II (PSII)

Glc: glicose ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de massa seca)

G6P: glicose 6-fosfato

gs: condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

h: altura (cm)

HXK: hexoquinase

INV: invertase

nf: número de folhas

PCL: ponto de compensação de luz ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); $\text{PCL} = R_e / \Phi$

PSL: ponto de saturação de luz para assimilação máxima ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

Pi: fósforo inorgânico

Re: respiração no escuro ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

SPS: sacarose-P sintase

SPP: sacarose-P fosfatase

Triose-P: triose fosfato

Triose-P – Pi: cotransportador triose-P e Pi

TCR: taxa de crescimento relativo ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)

R:PA: razão raiz/parte aérea; biomassa da raiz/(biomassa do caule + biomassa foliar)

RuBP: ribulose-1,5- bifosfato

RUBISCO: ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase

Sac: sacarose ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de massa seca)

SUS, sacarose sintase

Tf: temperatura da folha ($^{\circ}\text{C}$)

XG: xiloglucanos

XTH: xiloglucano transglicosilase-hidrolase XTHs (antes xiloglucano endotransglicosidases, XET)

Φ : eficiência quântica de CO_2

Θ : convexidade

u. r. : umidade relativa (%)

UDP-Glc: UDP-glicose

UGPase: UDP-glicose pirofosforilase

V-INV: invertase no vacúolo

CAPÍTULO I

Introdução geral	12
Referências bibliográficas	16

CAPITULO II

Influência das elevadas concentrações de CO₂ e de temperatura no crescimento, alocação de biomassa e fotossíntese em plantas juvenis de jatobá	19
2.1 Introdução	20
2.2 Objetivos	36
2.3 Materiais e Métodos	37
2.3.1 Obtenção do material vegetal	37
2.3.2 Desenho, construção e avaliação do sistema das câmaras de topo aberto (CTA)	37
2.3.3 Delineamento experimental	41
2.3.5 Parâmetros avaliados	44
2.4 Resultados	51
2.4.1 Desenvolvimento inicial de plantas de jatobá	51
2.4.2 Crescimento e alocação de biomassa	54
2.4.3 Medições de trocas gasosas e padrão de uso da luz	63
2.5 Discussão	83
2.6 Referências bibliográficas	92

CAPITULO III

Influência das elevadas concentrações de CO₂ e de temperatura no particionamento de carboidratos não estruturais em plantas juvenis de jatobá	104
3.1 Introdução	105
3.2 Objetivos	116
3.3 Materiais e Métodos	118
3.3.1 Condições experimentais e do material vegetal	117
3.3.2 Desenho experimental	117
3.3.3 Parâmetros avaliados	119

3.4 Resultados	122
3.4.1 Analise de produção de carboidratos não estruturais	122
3.4.2 Analise do ciclo diário de produção de carboidratos não estruturais em plantas de <i>Hymenaea courbaril</i> L.	122
3.4.3 Estudo da produção líquida de carboidratos não estruturais (CNE) em plantas de <i>Hymenaea courbaril</i> L., em cada tratamento	124
3.5 Discussão	146
2.6 Referências bibliográficas	152
 CAPITULO IV	
Conclusões	157
Resumo	162
Abstract	164
 APÊNDICES	166

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento das plantas compreende uma série de processos entre os quais se encontram o crescimento (aumento irreversível de tamanho), a diferenciação celular (especialização) e a morfogênese (aquisição de forma específica). Segundo WALTER (2009), o crescimento de uma planta pode ser expresso pelo aumento em massa, tamanho ou volume de um tecido, de um órgão ou da planta inteira, que ocorrem como consequência da interação de diferentes processos, como fotossíntese, transporte de fotoassimilados, respiração e nutrição. Embora os padrões de alocação de biomassa entre os diferentes órgãos sejam predeterminados pela ontogenia da planta, as condições ambientais podem interferir neles, como no exemplo: uma alocação de recursos na raiz é observada em condições da limitação de um recurso subterrâneo (água, nutrientes), de outro lado, a estimulação do crescimento na parte aérea ocorre quando existe uma limitação do recurso atmosférico, como a luz ou o CO₂ (BLACKMAN, 1919; POORTER, 2007). A taxa de crescimento relativo (TCR) é um importante parâmetro de avaliação de crescimento, ao permitir correlacionar o acúmulo de biomassa com o tempo. As TCRs mudam com a ontogenia, sendo que plantas grandes têm de alocar mais recursos longe de seus órgãos de assimilação e investir em órgãos de suporte, como caules e pecíolos (HUNT, 1987; ROBBINSON 1991; POORTER 1992).

No cenário ambiental atual, o enriquecimento da atmosfera com CO₂, produto principalmente das atividades antropogênicas, tem se revelado particularmente importante para o crescimento vegetal, assim como a consequente elevação na temperatura ambiente, a qual poderá ser, segundo as previsões meteorológicas, de até três graus Celsius. Em conjunto, aparecem também mudanças nos padrões de precipitação, estabelecendo-se o cenário conhecido como mudanças climáticas globais (IPCC WG I, 2007).

Ao longo dos últimos 30 anos, estudos realizados sobre os efeitos das concentrações elevadas de CO₂ em plantas revelam algumas respostas características das espécies com fotossíntese C₃, com um aumento nas taxas de carboxilação, o qual produz um estímulo de ganho fotossintético de carbono e da produtividade primária em longo prazo, um aumento na eficiência de uso da água, uma diminuição da condutância estomática, aumento das concentrações foliares de carboidratos não estruturais, entre outros (LONG *et al* 1993; SAGE, 1994; AINSWORTH *et al.* 2002; AINSWORTH *et al.* 2005; BERNACCHI *et al.* 2005; LONG *et al* 2004; LEAKEY *et al* 2009).

Não obstante, a maioria destas pesquisas tem avaliado as respostas das plantas à atmosfera enriquecida com CO₂ desconsiderando o subsequente aumento nas temperaturas, ou ignorando a interação entre estes efeitos, ou ainda, tratando-os como variáveis independentes (LONG, 1991). Modelos teóricos indicam a existência de sinergismo entre as concentrações elevadas de CO₂ e a elevada temperatura, potencialmente resultando no aumento nas taxas de assimilação de CO₂ em plantas C₃.

Os trabalhos de pesquisa com espécies nativas neotropicais, crescidas em atmosferas enriquecidas com CO₂, mostraram que as plântulas de jatobá respondem às concentrações elevadas de CO₂ com um aumento no crescimento e nas taxas de assimilação líquida (AIDAR, 2002; GODOY, 2007). Na atualidade também se desenvolvem pesquisas com interação do CO₂ e elevada temperatura (+2°C) com as espécies arbóreas da família Bignoniaceae *Cybistax antispyhilitica* (Mart.) Mart. e *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.).

Hymenaea courbaril L. var *stilb.* (jatobá) é uma espécie de leguminosa arbórea clímax, considerada tolerante à sombra, a qual apresenta ampla distribuição geográfica neotropical, relatada desde o sul do México, passando pela América Central, Colômbia, Venezuela. No Brasil esta espécie pode se encontrar desde o Piauí até o norte do Paraná, particularmente em florestas semidescíduas, tanto em solos de alta quanto de média fertilidades (cerradões) (LANGENHEIM *et al.*, 1973; LEE e LANGENHEIM, 1975). O jatobá é uma árvore que pode crescer e se desenvolver no sub-bosque, mas pode também alcançar e compor o dossel florestal ou a condição emergente (GANDOLFI, 1995).

O jatobá possui grandes sementes que garantem o suprimento de carboidratos e proteínas na fase de estabelecimento das plântulas (TINÉ, 2000; SANTOS e BUCKERIDGE, 2004). A mobilização das reservas cotiledônares tem início logo após a embebição e continua por cerca de 50 dias após o plantio (dap), quando as plantas perdem seus cotilédones. Foi sugerida por SANTOS e BUCKERIDGE (2004) a existência três fases no desenvolvimento inicial de jatobá: 1. Germinação, fase heterótrofa; 2. Fase de transição, em que ocorre simultaneamente a mobilização de reservas de parede celular (xiloglucanos - XG) e proteínas com a fotossíntese; 3. Autotrofia. A temperatura é um fator ambiental determinante na germinação, responsável pela coordenação de mobilização de oligossacarídeos da série rafínósica (TINÉ *et al.* 2000), que são reservas utilizadas para suprir as demandas energéticas durante o processo de germinação. Segundo SANTOS e

BUCKERIDGE (2004), na fase dois a temperatura e a luz seriam os fatores ambientais que exercem maior influência sobre a fotossíntese e mobilização de XG. Já na fase de completa autotrofia, o fator com maior influência no crescimento seria a luz.

Na presente pesquisa, por meio do acompanhamento do crescimento de plântulas de jatobá por 240 dias após o plantio (dap) em câmaras de topo aberto CTA, evidenciou-se que, desde a germinação até aproximadamente os 85 dap, as plantas apresentam um crescimento linear, seguido de estabilização do crescimento com aumento gradativo até o final do período avaliado.

Em se procurando o entendimento do efeito desses fatores no estabelecimento de plantas juvenis de jatobá, esta pesquisa propõe o estudo das respostas em dois momentos: o primeiro no estabelecimento inicial de *H. courbaril* (na fase linear de crescimento aos 68 dap), e o segundo na fase de estabilização do crescimento, aos 95 dap), em quatro cenários ambientais diferentes, dentro dos quais as interações entre a concentração atmosférica de CO₂ e a temperatura ambiente serão avaliadas.

O presente documento apresenta os resultados em dois capítulos, seguido da discussão geral. No primeiro capítulo foi abordada a hipótese de que as concentrações de CO₂ (eCO₂-elevada e aCO₂-ambiente) e as temperaturas (eT-elevada e aT-ambiente) atuam de forma diferenciada em plantas juvenis de jatobá em cada uma das duas fases identificadas no crescimento inicial desta espécie. A segunda hipótese avaliada neste trabalho, apresentada no segundo capítulo, argumenta se que os fatores CO₂, T e a fase de desenvolvimento também afetam os padrões de partição dos fotoassimilados, particularmente os carboidratos não estruturais, como a sacarose, glicose, frutose e amido, nos diferentes órgãos: raízes, caules e folhas.

Por conseguinte, evidenciam-se, nesta pesquisa, que as condições ambientais previstas para final de século (eCO₂ e eT), possuam o potencial de favorecer o estabelecimento inicial e o crescimento de plantas de jatobá, outorgando-lhes vantagens para o seu estabelecimento.

2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, E.A., DAVEY, P.A., BERNACCHI, C.J., DERMODY, O.C., HEATON, E.A., MORGAN, P.B., NAIDU, S.L., YOO RA, H-S., ZHU, X-G., CURTIS, P.S., LONG, S.P. 2002. A meta analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change biology* **8**: 695-709
- AINSWORTH, E.A. e LONG, S.P. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* **165**: 351-372
- AIDAR, M.P.M., MARTINEZ, C.A., COSTA, A.C., COSTA, P.M.F., DIETRICH, S.M.C. e BUCKERIDGE, M.S. 2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá (*Hymenaea courbaril* L.-Leguminosae-Caesalpinioideae). *Biota Neotropica* **2** (1). (<http://www.biotaneotropica.org.br>)
- BERNACCHI, C.J., MORGAN, P.B., ORT, D.R., LONG, S.P. 2005. The growth of soybean under free air [CO₂] enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing in vivo RUBISCO capacity. *Planta* **220**: 434-44
- BLACKMAN, V.H. 1919. The compound interest law and plant growth. *Annals of Botany* **33**: 353-360.
- GANDOLFI, S., LEITÃO FILHO, H. F. e BEZERRA, C. L. F. 1995. Levantamento florístico e caráter sucessional das espécies arbustivo-arbóreas de uma Floresta Mesófila Semidecídua no município de Guarulhos. *Revista Brasileira de Biologia* **55**: 753-767
- GODOY, J. 2007. Ecofisiologia do estabelecimento de leguminosas arbóreas da Mata Atlântica, pertencentes a diferentes grupos funcionais, sob atmosfera enriquecida com CO₂: uma abordagem sucessional. São Paulo, 2007. 114 p. Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007
- HUNT R. 1987. Plant Growth Curves. The Functional Approach to Plant Growth Analysis. E. Arnold, London.

- IPCC. 2007. Workgroup I Report. Fourth assesment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Em: Watson, R.T., *et al* (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- LANGENHEIM, J. H. , LEE, Y. e MARTINS, S.S. 1973. An evolutioanary and ecological perspective of Amazonian Hylaea species of Hymenaea (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Acta amazonica* **3**: 5-38
- LEAKEY, A. D. B., E. A. AINSWORTH, C. J. BERNACCHI, A. ROGERS. S. LONG Y D. R. ORT. 2009. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**, pp. 2859-2876
- LEE, Y. e LANGENHEIM, J. H. 1975. Systematics of the genus Hymenaea L. (Leguminosae, Caesalpinoideae, Detarieae). University of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- LONG SP, DRAKE, B. G. 1991. Effect of the Long-Term Elevation of CO₂ Concentration in the Field on the Quantum Yield of Photosynthesis of the C₃ Sedge, Scirpus olney. *Plant Physiology* **96**: 221-225
- LONG, S.P., AINSWORTH, E.A., ROGERS, A., ORT, D.R. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: Plants face the future. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **55**: 591-628
- LONG SP, HÄLLGREN JE 1993. Measurements of CO₂ assimilation by plants in the field and the laboratory. In: Hall DO, Scurlock JMO, Bolhàr-Nordenkampf HR, Leegood RC, Long SP (eds) Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual, Chapman & Hall, London, England. pp.129-167.
- POORTER, H. AND P. POTHMANN. 1992. Growth and carbon economy of a fast-growing and a slow-growing grass species as dependent on ontogeny. *New Phytologist* **120**: 159–166.

- POORTER, H. GARNIER E. 2007. Ecological Significance of Inherent Variation in Relative Growth Rate and its Components. In Functional Plant Ecology. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. Cap 3: 67-108
- ROBINSON, D. 1991. Strategies for optimising growth in response to nutrient supply. In: J.R. Porter and D.W. Lawlor, eds. Plant Growth. Interactions with Nutrition and Environment. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 177–199.
- SAGE, R. F. 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. *Photosynthesis Research* **39**, 351-368.
- SANTOS, H.P., PURGATO, E., MERCIER, H. e BUCKERIDGE, M.S. 2004. The Control of Storage Xyloglucan Mobilization in Cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. *Plant Physiology* **135**: 287-299
- TINÉ, M. A. S.; CORTELAZZO, A. L., BUCKERIDGE, M. S. 2000. Xyloglucane mobilization in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae) *Plant Science* **154**: 117-126
- WALTER, A., SILK, W., SCHURR, U. (2009). Environmental Effects on Spatial and Temporal Patterns of Leaf and Root Growth. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 279–304

CAPÍTULO II

Influência das elevadas concentrações de CO₂ e de temperatura no crescimento, alocação de biomassa e fotossíntese em plantas juvenis de jatobá.

2.1 INTRODUCAO

2.1.1 Desenvolvimento vegetal.

A capacidade de regenerar novos tecidos e órgãos durante a vida pós-embrionária é uma característica do crescimento indeterminado das plantas (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Esta capacidade de manter o crescimento vegetativo e o florescimento por um período prolongado, enquanto as condições e recursos ambientais o permitam, é possível, graças aos meristemas apicais, caulinares e radiculares, e à repetição de estruturas ou módulos. Os fitômeros constituem uma unidade do desenvolvimento, que consiste em uma ou em mais folhas, o nó em que as folhas estão inseridas, o entrenó abaixo do nó e uma ou mais gemas axilares (TAIZ, *et al.*, 2009). A plasticidade das plantas ao se adaptarem aos diferentes ambientes é, em grande parte, produto da capacidade de crescer e de se desenvolver modularmente. O crescimento depende dos meristemas, sendo que este se produz com um aumento de massa celular (por divisões celulares nos meristemas, quanto pela síntese de macromoléculas) aliado à expansão e aumento individual de volume (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Existe um balanço dinâmico entre a proliferação e a diferenciação das células recém produzidas para a incorporação nos órgãos, o qual é controlado por um padrão hormonal, um programa específico de expressão gênica, assim como os sinais ambientais (luz, temperatura). O ajuste desses eventos gera as condições para que as células meristemáticas se dividam (entrem no ciclo celular), ou permaneçam em repouso (G0 do ciclo celular) ou então se diferenciem (MERCIER, 2008).

A região periférica dos meristemas apicais envolvidos na formação de órgãos coincide com locais com acúmulo de auxina, sendo que este hormônio é considerado como um sinal desencadeador da morfogênese, a qual determina a localização na qual as células adquirirão a identidade de iniciadoras de órgãos (especificação meristemática e iniciadora de órgãos) (RODRIGUES *et al.*, 2009). A formação de órgãos envolve a divisão e expansão celular, diferenciação dos tecidos e tipos celulares e o estabelecimento do padrão estrutural como um todo (MERCIER, 2008; PERES *et al.*, 2008).

A auxina está envolvida em diversos processos do crescimento e do desenvolvimento. Em nível celular, participa como sinal para a divisão e diferenciação, aliado às citocininas, e para o alongamento, aliado às giberelinas. Também exerce um

papel importante na formação de raízes, na dominância apical, no tropismo e na senescência (MERCIER, 2008).

O aumento em tamanho de uma célula não meristemática é um aumento não reversível de volume, podendo ocorrer por expansão (aumento do tamanho em duas ou em três dimensões) ou por alongamento, que é a expansão numa direção só. A taxa de expansão-alongamento da parede celular é definida por alguns fatores intrínsecos, tais como a idade da célula, presença de auxina e giberelina e por fatores extrínsecos, como disponibilidade de luz, temperatura e gravidade. Para que as células se expandam, a parede celular deve ser afrouxada, caso contrário, ocorre o espessamento da parede celular. O processo de expansão é explicado com a *hipótese de crescimento ácido*: a auxina acidifica a região da parede celular, estimulando a célula em questão a secretar prótons, o que leva a uma diminuição do pH extracelular. Por sua vez, este pH aumenta a atividade das proteínas de parede, chamadas expansinas (COSGROVE, 1997), as quais causam o afrouxamento da parede por atuarem sobre as ligações pontes de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses. Esta mudança de pH também faz com que as hidrolases de polissacarídeos de parede atinjam suas velocidades máximas uma vez que o pH ótimo destas está ao redor de 5. Simultaneamente ao afrouxamento da parede celular, o protoplasma absorve água, o que permite a expansão celular (BUCKERIDGE *et al.*, 2008c).

A auxina atua sinergisticamente com o ácido giberélico no processo expansão/alongamento. As giberelinas são reconhecidas por estimular a produção de enzimas da família xiloglucano transglicosilase-hidrolase XTHs (antes conhecidas como xiloglucano endotransglicosidases XETs), sendo estas responsáveis pela transglicosilação e hidrólise do xiloglucano (XG). O XG é o principal componente da fração hemicelulósica na parede celular primária das Eudicotiledôneas e a sua principal função em nível celular é a orientação das microfibrilas de celulose. A auxina também está relacionada à biossíntese de polissacarídeos da parede celular (MERCIER, 2008; BUCKERIDGE *et al.*, 2008c).

As citocininas são substâncias que promovem a citocinese em células vegetais (PERES *et al.*, 2008). Sua função é a regulação da atividade das ciclinas em etapas específicas do ciclo celular. As citocininas também são as responsáveis pelo controle da diferenciação celular.

A auxina e as citocininas controlam o desenvolvimento vegetal ao atuarem diretamente na definição dos meristemas apicais caulinares e apicais radiculares, através do

transporte polar de auxinas. As citocininas produzidas na raiz são transportadas para a parte aérea, estimulando-a e produzindo auxinas, as quais são transportadas para as raízes, estimulando seu crescimento. Como este transporte depende da taxa transpiratória, o ABA pode influenciar no conteúdo de citocininas na parte aérea devido ao fato deste hormônio estar diretamente relacionado com o fechamento estomático. O ABA também atua como um inibidor de regiões de replicação de DNA durante a mitose, sendo que as citocininas exercem o efeito contrário. Assim, este ciclo faz com que o crescimento seja equilibrado entre as raízes e o caule, devido à importância na interação desses órgãos (PERES *et al.*, 2008).

2.1.1.1 Crescimento vegetal.

Como foi descrito acima, o desenvolvimento abrange processos de crescimento (aumento irreversível de tamanho), diferenciação celular (especialização) e morfogênese (aquisição de forma específica).

WALTER (2009) descreve o crescimento como o aumento irreversível em massa, tamanho ou volume de um tecido, órgão ou planta, como consequência da interação de processos tais como fotossíntese, transporte de fotoassimilados, respiração, relações hídricas e nutrição e sua fase de desenvolvimento. O crescimento pode ser avaliado usando-se diferentes parâmetros: altura, área foliar, número de folhas ou acúmulo de biomassa. Embora as taxas de crescimento sejam determinadas pelos padrões de expressão gênica, elas interagem com as condições ambientais, podendo ser alteradas ou não.

Uma característica variável do crescimento de plantas em ambientes contrastantes é o acúmulo de biomassa, o qual reflete o montante de carbono assimilado pelas plantas e se elas possuem a capacidade de manter um balanço positivo de carbono em condições adversas (SILVESTRINI, 2000).

O conceito de taxa de crescimento relativo (TCR) é importante para descrever o crescimento vegetal. Foi introduzido por BLACKMANN em 1919, que identificou que a biomassa de uma planta, em um período de tempo, é proporcional à biomassa presente no início desse período. A nova biomassa pode ser empregada para fixar o novo carbono e adquirir nutrientes extras e água, o que conduz a um acréscimo progressivo de biomassa.

Inicialmente BLACKMANN (1919) considerou a TCR como uma constante fisiológica, característica de uma espécie sob determinadas condições ambientais. No entanto, uma TCR constante significaria que as plantas crescem exponencialmente ao

longo de suas vidas. Na realidade, as plantas dificilmente apresentam uma fase de crescimento com comportamento exponencial, já que as TCRs mudam com a ontogenia (HUNT, 1987; ROBBINSON 1991; POORTER 1992). A fase de germinação apresenta um crescimento de características exponenciais, com uma transição entre a fase heterotrófica de dependência da plântula pelas reservas da semente, para a completa autotrofia. Ademais, as plantas grandes têm que alocar mais recursos longe dos órgãos de assimilação e das raízes, e investir mais em órgãos de suporte (caule, pecíolos). Nas plantas grandes, as folhas superiores podem sombrear as folhas inferiores. Deste modo, a TCR tende a diminuir com o tempo e com o tamanho (POORTER, 2007).

As TCR são representações de processos muito complexos, os quais dependem da ontogenia da planta em combinação às condições ambientais (fatores abióticos: luz, água, nutrientes, temperatura; e bióticos: competidores, herbívoros e patógenos). Os fatores reportados na literatura como responsáveis principais pelo aumento na TCR são a área foliar e as taxas de assimilação líquida (GARNIER, 1992; POORTER 2007). Faz-se evidente que uma alta TCR pode ser associada a uma alta taxa de fotossíntese (ou a uma baixa respiração da planta toda), a uma alta área foliar específica ou a uma alta fração de biomassa nas folhas (POORTER 2007).

Desse modo, a análise de taxas de crescimento relativo é o parâmetro de crescimento mais apropriado para se usar, considerando-se que o crescimento das plantas, de alguma forma, depende da biomassa preexistente. Geralmente, as TCR são calculadas com base na massa seca, mas é usual que sejam usados outros parâmetros, como massa fresca, peso dos brotos, área foliar ou o número de folhas (POORTER, 2007).

Assim, o processo de crescimento não se faz apenas pela fotossíntese, mas ele é o balanço entre ganho de carbono por unidade de área foliar e a perda por respiração, exsudação da folha e da raiz, corrigido para a concentração de carbono da nova biomassa formada (POORTER, 2007; LAMBERS, 2008).

2.1.1.2 Padrões de alocação de biomassa vegetal.

As plantas possuem uma importante capacidade de coordenar o crescimento de seus órgãos, gerando um balanço delicado entre a biomassa investida em seus brotos e na raiz. Os estudos desenvolvidos por PEARSALL (1927) mostraram que o investimento de biomassa apresenta uma correlação linear entre o log da biomassa investida na raiz e o log da biomassa investida na parte aérea (POORTER, 2000). Diferentes estudos foram

desenvolvidos que complementam esta idéia. BROWNER (1962) propôs a teoria do “equilíbrio funcional”, segundo a qual as plantas conduzem a alocação na raiz em condições de limitação por um recurso subterrâneo, como nutrientes ou água. As plantas também podem conduzir a alocação na parte aérea, caso exista uma limitação de um recurso atmosférico, como luz ou CO₂ (POORTER, 2000).

A quantidade de carbono fixado disponível para a folha é determinada pelas taxas fotossintéticas. No entanto, a quantidade de carbono fixado disponível para a translocação depende dos eventos metabólicos subsequentes à fixação. A regulação da distribuição do carbono fixado em várias rotas metabólicas (armazenagem, uso, transporte) é denominada alocação. Em contrapartida, a distribuição diferencial dos fotoassimilados para diferentes drenos na planta é chamada de partição (TAIZ *et al.*, 2009). O uso desta terminologia não é universal, embora outros autores denominem **alocação** à distribuição diferencial dos fotoassimilados nos órgãos e **partição** ou **particionamento** à distribuição dos fotoassimilados em sacarose, hexoses ou amido, segundo o processo metabólico ao qual seja destinado (transporte, respiração, armazenamento, respectivamente) (POORTER, 2000; LAMBERS, 2008). No presente trabalho é empregada a última abordagem mencionada.

2.1.2 Metabolismo fotossintético e respiratório das plantas

2.1.2.1 Fotossíntese

A fotossíntese é o processo que sustenta a vida no planeta. Por meio dele, as plantas fixam CO₂ em compostos orgânicos para seu crescimento e sobrevivência, durante a maior parte de seu ciclo de vida, por intermédio da enzima *ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase* (RUBISCO). Esta enzima é bifuncional porque catalisa tanto a carboxilação como a oxigenação do substrato ribulose-1,5- bifosfato (RuBP), sendo que o CO₂ e o O₂ competem pelo mesmo sitio ativo da RUBISCO (MOORE *et al.*, 1999).

A carboxilação produz duas moléculas de um ácido orgânico de três carbonos, o 3-fosfoglicerato, ao gerar uma série de reações bioquímicas que produzem vários carboidratos e que regeneram, simultaneamente, a RuBP que reage com o CO₂. Esta via metabólica é conhecida como *ciclo de Calvin e Benson* ou *ciclo fotossintético redutivo C₃* ou *ciclo C₃*. Este ciclo é o responsável pela geração dos carboidratos precursores de todas

as moléculas orgânicas existentes nos organismos fotossintetizantes e heterotróficos (TAIZ *et al.*, 2009).

A oxigenação produz uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de 2-fosfoglicolato, sendo que este último só pode ser processado pela via metabólica *fotorrespiratória* ou *ciclo C₂*, com o consumo de O₂ e com a perda de CO₂ já fixado. Segundo MANN (1999), cerca de 20 a 50 % do carbono já fixados pela fotossíntese podem ser perdidos pela fotorrespiração. Assim sendo, o ciclo C₃ conduz ao ganho de carbono e o ciclo C₂ conduz à perda de carbono, sendo que o ganho líquido de carboidratos é determinado pela velocidade de cada um destes ciclos. As taxas relativas entre as vias C₃ e C₂ dependem da concentração relativa de CO₂ e de O₂ no interior do estroma dos cloroplastos do mesófilo foliar, onde atua a RUBISCO (MAJEROVICS, 2008).

Figura 1: Vias metabólicas de concentração de CO₂. A. Ciclos C₂ e C₃; B. Ciclo C₄. C. Ciclo MAC (MAJEROWICS, 2008).

As plantas têm desenvolvido estratégias de para reduzir o funcionamento da via C₂, com mecanismos concentradores de CO₂ junto ao sitio de carboxilação da RUBISCO. Plantas com *metabolismo C₄* e *metabolismo ácido das crassuláceas*, MAC, utilizam este sistema, sendo que a concentração de CO₂ em ambos dos casos através de um bombeamento bioquímico de CO₂ (LEEGOOD, 1993), cuja descrição geral pode ser observada na Figura 1.

2.1.2.2. Respiração.

A respiração é o processo que cumpre as funções vitais de produção de ATP, ao liberar, de forma controlada, a energia armazenada, principalmente nos compostos de carbono para uso celular. Ao mesmo tempo, a respiração gera precursores de carbono para

biossíntese. A respiração é um processo importante no balanço de carbono e de produtividade dos ecossistemas (LEAKEY *et al.* 2009b).

Nas plantas, todos os tecidos respiram durante as 24 horas do dia, embora só os tecidos verdes fotossintetizem (BUCKERIDGE *et al.*, 2008b). Da taxa máxima de fotossíntese, a respiração mitocondrial pode representar entre 5 e 15%. Em regiões tropicais, de 70 a 80% do ganho fotossintético diário podem ser perdido para a respiração, devido às altas taxas de respiração no escuro, favorecidas pelas elevadas temperaturas noturnas.

WILLIAMS e FARRAR (1990) verificaram que as taxas de respiração podem ser controladas pela demanda de ATP (que controla o fluxo respiratório em curto prazo), ou pela disponibilidade de substrato (determina a capacidade da respiração em longo prazo).

O potencial das elevadas concentrações de CO₂ em alterar as taxas de respiração ainda se encontra em discussão, porque esse processo é, por ora, relativamente pouco compreendido, em comparação à fotossíntese. Há desafios grandes para medir a respiração nos diversos tecidos (raiz, caule e folhas) e sua relação destes com a produtividade vegetal é diferente (LEAKEY *et al.*, 2009b), por conseguinte, uma vez que os resultados obtidos não são consistentes, demonstra-se que, em alguns casos, não há resposta.

No entanto, em elevadas concentrações de CO₂ é estimulada a respiração no escuro (Re) de folhas de soja. AINSWORTH *et al.* (2006) examinaram transcritos, status de carboidratos e taxas de crescimento em folhas maduras e juvenis numa fase vegetativa inicial de soja e LEAKEY *et al.* (2009b) examinaram transcritos, status de carboidratos, taxas de fotossíntese e respiração de folhas maduras em diferentes fases do desenvolvimento dessa espécie. Eles reportaram que o crescimento em elevado CO₂ em longo prazo leva a uma reprogramação transcricional, a qual favorece a respiração, ao envolver as enzimas do amido e as do metabolismo dos carboidratos, glicólise, ciclo do ácido cítrico e transporte mitocondrial de elétrons. No entanto, as mudanças em abundância de transcritos nem sempre estão correlacionadas às mudanças diretas do conteúdo de proteína, da atividade ou da fisiologia. Os autores supra-referidos destacam que é preciso uma maior expressão gênica para que os mecanismos do metabolismo de carboidratos e da respiração produzam um número grande de mitocôndrias por célula, como foi observado em muitas espécies, inclusive em soja, por GRIFFIN *et al.*, (2001). Percebeu-se que as concentrações elevadas de CO₂, aumentam o número de mitocôndrias por volume celular sugerindo que as atividades respiratórias podem aumentar.

2.1.3 Eficiência quântica do fotossistema II.

Os pigmentos fotossintéticos, após receberem a energia proveniente da luz, dissipam-na através de três vias: 1) dissipação fotoquímica, que é o uso da energia luminosa para processos fotoquímicos da fotossíntese; 2) dissipação por fluorescência, que é a emissão de radiação na região vermelho; e 3) dissipação não-fotoquímica que envolve a produção de calor (LAMBERS, 2008).

O potencial máximo fotoquímico aparente é proporcional ao valor da razão F_V/F_M (KIJITAMA e BUTLER, 1975). Em ausência de luz e antes da aplicação de um pulso de luz saturante, a emissão da fluorescência é mínima (F_0). Durante a aplicação do pulso saturante de luz, a emissão da fluorescência é máxima (F_M). O aumento obtido com o pulso gera o valor da fluorescência variável ($F_M - F_0$). Assim, o rendimento quântico máximo aparente do fotossistema II, quando a amostra é adaptada no escuro (ou seja, não existem elétrons sendo transportados no sistema), pode ser descrito a seguir:

$$\Phi_{II\text{m}} = (F_M - F_0)/F_M = F_V/F_M$$

BJÖRKMAN E DEMMIG (1987) determinaram que em folhas saudáveis o valor de F_V/F_M gira em torno de $0,832 \pm 0,004$, o que significa que ao redor de 80% a energia luminosa estaria sendo usada nos processos fotoquímicos da fotossíntese.

2.1.4 Mudanças climáticas

As mudanças climáticas modernas perfazem um conjunto de eventos meteorológicos que envolvem aumento de temperatura, aumento de nível do mar e mudanças nos padrões de precipitações (secas e enchentes). Seus efeitos atingem desde os sistemas naturais, fontes de alimentos e água, a biodiversidade dos ecossistemas, até os sistemas humanos, seus assentamentos, a saúde pública, entre outros. Estes eventos estão correlacionados ao excesso nas emissões de dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), clorofluorcarbonatos (CFCs como HFCs e PFCs), óxidos de nitrogênio (NO_x), e fluoretos de enxofre (SF_6), produto das atividades humanas. Estes gases aumentaram aproximadamente em 70 % entre 1977 e 2004 e, por serem uma mistura de gases de efeito estufa, tanto o poder de aquecimento quanto o seu tempo de retenção na atmosfera representam um elevado potencial de aquecimento da terra (IPCC, 2007).

A concentração de CO_2 aumentou de modo acelerado desde o início das atividades agrícolas primitivas do homem. Antes da Revolução Industrial as concentrações de CO_2 eram cerca de 270 ppm. Já no ano de 2010 as concentrações de CO_2 se encontram ao redor

de 390 ppm em regiões urbanas, estimando-se que este valor aumente próximo ao dobro durante o século XXI, atingindo cerca de 700 ppm (PRENTICE *et al.*, 2001; LONG, 2004).

A elevação nas concentrações dos gases de efeito estufa gera um aumento da temperatura, principalmente como consequência de seu *forçamento radiativo*, o que leva adicionalmente a uma alteração nos padrões de precipitação. O *forçamento radiativo* aquece a superfície da atmosfera o que aumenta a evaporação da água. A umidade atmosférica, as precipitações e a circulação atmosférica geram mudanças que afetam o ciclo hidrológico e a quantidade, frequência, intensidade, duração e tipo das precipitações. Estes eventos têm sido relacionados à interação de poluentes, como aerossóis, com as nuvens (IPCC, 2007).

Com o Protocolo de Kioto (ONU; 1997) foi revalidado o potencial da vegetação como sequestrador de carbono através da fotossíntese e da produção de compostos de carbono. O sequestro de carbono e a sua alocação em biomassa nas plantas são considerados uma das ferramentas mais promissoras para a minimização dos efeitos deletérios do efeito estufa. Estima-se que os biomas terrestres retirem cerca de dois bilhões de toneladas de carbono por ano da atmosfera (PHILLIPS *et al.*, 1998).

Existem, de fato, duas abordagens básicas em relação ao sequestro de carbono:

1. proteção dos ecossistemas que acumulam carbono, favorecendo sua manutenção e seu incremento;
2. manipulação de ecossistemas (seleção e plantio de espécies, bioengenharia e melhoramento genético) a fim de elevar a fixação de carbono.

Há um crescente interesse por compreender e prever como vai se comportar a produtividade primária líquida no cenário das mudanças climáticas. Os estudos das respostas de plantas em altas concentrações de gás carbônico têm gerado grande interesse da comunidade científica e os resultados sugerem que estas condições possam beneficiar o crescimento das plantas com fotossíntese C_3 . No entanto, as interações com outros fatores como a temperatura e a disponibilidade de nutrientes alteram o nível de aumento da fotossíntese (AIDAR *et al.*, 2002; TURNBULL *et al.*, 2002; KRUSE *et al.*, 2003; WALTER *et al.*, 2005; DRUART *et al.*, 2006).

2.1.4.1 Respostas das plantas às concentrações elevadas de CO_2

Considerando-se que a atividade da RUBISCO em plantas C_3 é limitada pelo CO_2 sob as atuais condições de pressão atmosférica, as taxas de assimilação fotossintética de

CO₂ em condições de elevadas concentrações de CO₂ (eCO₂) aumentam as taxas de sua assimilação em cerca de 50% ou mais em curto prazo. No entanto, em longo prazo (de dias a semanas), a estimulação inicial de tomada de carbono é seguida por mudanças bioquímicas e moleculares, as quais resultam numa diminuição da capacidade fotossintética por aclimação da fotossíntese (MOORE *et al.*, 1999). Assim, os níveis de produtividade primária já estabelecida, em longo prazo aumentariam muito pouco (LONG *et al.* 1993; SAGE, 1994; NORBY *et al.*, 1999; AINSWORTH *et al.* 2002; JIFON *et al.*, 2002; AIDAR, 2002; LONG *et al.* 2004; AINSWORTH *et al.* 2005; BERNACCHI *et al.* 2005; GODOY, 2007; MARABESI, 2007; BUCKERIDGE *et al.*, 2008a; LEAKEY *et al.* 2009a).

A aclimação da fotossíntese às elevadas concentrações de CO₂ origina-se nos processos celulares da planta. O ponto central é a redução no conteúdo da proteína RUBISCO, sendo que esta redução depende do uso diferencial e do controle temporal de processos moleculares de cada espécie. MOORE *et al.* (1999) observaram que o crescimento de plantas em elevadas concentrações de CO₂ pode afetar o conteúdo de RUBISCO como resultado da diminuição dos níveis de subunidade pequena da RUBISCO (*rbcS* mRNA), cujo pico de produção está ajustado ao ciclo circadiano. Dessa maneira, foi sugerido que possa existir variação temporal na produção e transdução de sinais primários, os quais iniciam tais respostas. Muitos estudos apontam que a aclimação da fotossíntese resulta de ajustes na sinalização de carboidratos foliares. Sabe-se que os processos metabólicos são governados pelos ciclos diários e ritmo circadiano, de tal forma que o efeito das altas concentrações de CO₂ seja possível a ser refletido na amplitude e nas fases do ciclo de crescimento diário (WALTER *et al.* 2002).

Além da diminuição em conteúdo de RUBISCO, o conteúdo de clorofila diminui sob elevadas concentrações de CO₂, assim como os níveis de transcritos relacionados com os tilacóides de genes codificados no núcleo, como o CAB (VAN OOSTEN *et al.*, 1994; MOORE *et al.*, 1998). A aclimação fotossintética de folhas maduras em elevadas concentrações de CO₂ pode permitir a otimização do uso de nitrogênio, redistribuindo-o de folhas fonte para tecidos dreno.

O citado aumento nas taxas de carboxilação é devido principalmente ao aumento das concentrações intracelulares de CO₂ (C_i) e, por conseguinte, à diminuição da razão O₂:CO₂. Uma menor razão O₂:CO₂ faz com que as taxas de fotorrespiração diminuam.

Outra resposta observada é a diminuição da condutância estomática, o que melhora a eficiência do uso da água tanto em escala foliar como ao nível da comunidade vegetal (LEAKEY *et al.*, 2009). A diminuição da condutância estomática pode estar correlacionada ao índice e à densidade estomática, sendo observada em espécies como *Hymenaea courbaril* e *Hymenaea stagnocarpa* (COSTA, 2004; MACHADO, 2007). O número de estômatos é fortemente controlado por sinais ambientais, tais como luz e pressão parcial de CO₂. O desenvolvimento celular da epiderme durante a fase inicial do crescimento foliar envolve mudanças tanto na densidade de células da superfície como na proporção de células que se diferenciam em estômatos (LAKE *et al.*, 2002; LAKE *et al.*, 2001). Dentro destas mudanças, foi observado o papel de ácidos graxos de cadeias longas na comunicação célula a célula. Em plantas de *Arabidopsis* existem evidências indiretas de que estes lipídeos estão envolvidos na sinalização de longa distância de folhas maduras que levam à modificação tanto na densidade como no índice estomático em folhas jovens que estão se expandindo (LAKE *et al.*, 2001). Esta condição de diminuição na condutância estomática também permitiu, em experimentos em longo prazo, que as plantas se apresentarem menos susceptíveis nos intervalos de seca durante a estação de crescimento, sendo também observada diminuição de perdas por percolação (LEAKEY *et al.*, 2009).

POORTER e NAVAS (2003) estimaram em plantas crescidas em eCO₂ um aumento de 45% de biomassa em espécies de herbáceas C₃, 48% em arbóreas C₃, 23 % em plantas CAM e 12% em plantas C₄. Em nível celular este acréscimo se traduz em aumento da divisão celular e da expansão.

O carbono fixado pelas plantas através do processo de fotossíntese pode ser transformado, entre outros, em carboidratos estruturais e não estruturais. Em plantas de jatobá crescidas em eCO₂, observou-se um aumento em celulose em metáfios e caule (COSTA, 2004), assim como em *Saccharum ssp* (SOUSA, 2007). Esse aumento em celulose tem se correlacionado com uma diminuição no conteúdo de lignina em plantas adultas de *Fagus sp.* e *Quercus litter* (KÖRNER, 2005). Os resultados podem indicar o deslocamento das frações de carbono, desde formas recalcitrantes (celulose) a compostos mais lábeis (lignina).

AIDAR *et al.* (2002) observou que uma atmosfera enriquecida de CO₂ parece amortizar a mobilização de XG em plântulas de jatobá, considerando a grande quantidade de reservas cotiledonares que elas possuem.

Outras respostas vegetais descritas na literatura em condições de atmosfera enriquecida por CO₂ compõem a melhora na eficiência do uso de nitrogênio e um estímulo da respiração no escuro (LEAKEY *et al.*, 2009; BUCKERIDGE *et al.* 2008b).

2.1.3.2. Respostas das plantas às variações de temperatura.

Cada processo vital e cada nível de desenvolvimento estão restritos a uma faixa de temperatura. A temperatura é um dos principais controladores da distribuição e produtividade das plantas, com efeitos importantes na atividade fisiológica em todas as escalas temporais e espaciais (SAGE, 2007).

As respostas fisiológicas das plantas dependem do regime de temperatura avaliado. A produção de massa seca e o crescimento acontecem entre os 5°C e os 40°C. Não obstante, para espécies tropicais e subtropicais as temperaturas ótimas estão entre 15°C e 35 °C.

A temperatura exerce a sua ação em diferentes aspectos do metabolismo da planta. As respostas às elevadas temperaturas estão intimamente ligadas ao estresse hídrico, entre elas ocorrem alterações da condutância estomática e da difusividade no mesófilo, inibindo a expansão foliar, promovendo a abscisão e o crescimento acentuado de raízes. As injúrias por altas temperaturas incluem diminuição da fotossíntese com dano aos cloroplastos e parada do fluxo de metabólitos através do plasmalema. Num extremo ocorre perda de semipermeabilidade da membrana celular (desnaturação das proteínas da membrana celular) e colapso dos tilacóides (LAMBERS 2008; BUCHANAN, 2001; SCHRADER, 2004).

A sensibilidade da fotossíntese ao calor deve-se principalmente ao dano dos componentes do fotossistema II (membranas do tilacóides do cloroplasto) e das propriedades da membrana (BERRY, 1980; AL-KHATIB, 1999). Estudos comparativos de respostas ao calor indicam que o fotossistema II de espécies de regiões temperadas é mais sensível ao calor do que as espécies de climas quentes adaptadas às temperaturas mais altas (AL-KHATIB, 1999; YORDANOV, 1986). Durante esses episódios, o fotossistema II pode ser protegido por mecanismos que ajudam reduzir a fotooxidação como o ciclo das xantofilas (HAVAUX, 1998) ou pela produção do isopreno (SINGSAAS *et al.*, 1997).

Plantas com fotossíntese C₃ experimentam a competição da carboxilação e oxidação da RUBISCO. A temperatura ótima para a fotossíntese deriva da diferença entre a solubilidade do oxigênio e do gás carbônico numa dada temperatura do mesófilo. O

aumento da temperatura diminui a solubilidade do CO₂ em relação ao O₂, o que aumenta a atividade oxigenase da RUBISCO (LEA e LEEGOOD, 1999). Além da solubilidade, adicionalmente existe um efeito da temperatura sob Km_{CO2} (K_C) e na V_C (V_{max} (CO₂)), sendo que as elevadas temperaturas diminuem a especificidade CO₂/O₂ da RUBISCO (JORDAN e OGREN, 1984).

No evento natural de aumento de temperatura de 2003 (até 5°C a mais, não como evento episódico, mas sim distribuído nos meses do verão), as florestas da Europa Central mostraram uma rápida adaptação às altas temperaturas. RENNENBERG *et al* (2007) avaliaram a condutância do CO₂ em quatro espécies de árvores antes, durante e depois da seca de 2003. Estas medidas confirmaram a redução substancial da condutância do mesófilo e do estômato, reduzindo a concentração do CO₂ do cloroplasto. Deste modo, a desativação da RUBISCO pode de fato ser causada pela baixa quantidade de CO₂ disponível nos cloroplastos. Não é possível determinar se a redução da difusividade na condutância é a causa do estresse por calor ou pelo estresse hídrico, ou pela combinação de ambos (RENNENBERG *et al* 2007).

No entanto, as plantas podem adquirir termotolerância se submetidas ao um aumento de temperatura não letal por algumas horas, antes de se encontrarem em condições de choque térmico. Uma planta aclimatada pode sobreviver às exposições às temperaturas as quais poderiam, em outras circunstâncias, serem letais. O processo de aclimação envolve a síntese de novas proteínas em resposta à temperatura alta, e que conferem termotolerância ao organismo (HALL, 2001). Desta forma, por exemplo, a maioria das espécies pode aclimatar-se às mudanças na temperatura de crescimento ao modificar o seu aparato fotossintético, de maneira que melhore o desempenho no novo ambiente de crescimento.

2.1.5 Ecofisiologia de *Hymenaea courbaril* L.

Os distúrbios naturais são os eventos que favorecem o processo de sucessão ecológica e regeneração nas florestas tropicais (BAZZAZ, 1984; SILVESTRINI, 2000). O *continuum* de diversidade de espécies e de microambientes é definido pela disponibilidade de nutrientes, água e especialmente de luz, sendo este último o recurso mais limitante na distribuição de espécies de floresta. WHITMORE (1996) apresentou alguns aspectos da ecologia de plântulas de florestas tropicais, descrevendo espécies que precisam de luz intensa para sua germinação e desenvolvimento (espécies pioneiras), espécies cuja

tolerância à disponibilidade de luz é média (secundárias iniciais) e espécies que se estabelecem sob o dossel da floresta (secundárias tardias ou clímax) (CANHAN, 1989). A classificação de uma espécie num grupo ou outro deve ser baseada no conhecimento da ecologia das sementes e plântulas (WHITMORE, 1989; GARWOOD, 1995), desde que, tanto a germinação como o estabelecimento são as fases com a maior mortalidade (DENSLOW, 1980). Portanto, são as fases com as maiores pressões seletivas do ambiente (SILVESTRINI, 2000; GATSUK *et al.* 1980). O enverdecimento tardio (do inglês *delayed green*) é um fenômeno observado numa terça parte das espécies tropicais de sub-bosque, caracterizado por um atraso da acumulação de clorofilas em folhas jovens, resultando numa aparência amarela ou azul-vermelha, produto da falta de pigmentos ou do elevado conteúdo de antocianinas, respectivamente. Nelas, a acumulação de clorofilas aumenta durante o desenvolvimento foliar (CZECH *et al.*, 2009). Foi proposto que o enverdecimento tardio pode ser uma estratégia de adaptação de plantas evoluídas na sombra para deter o investimento em componentes fotossintetizantes até que as folhas fossem estruturalmente resistentes. Outra hipótese é que o enverdecimento tardio atua como fotoprotetor para folhas jovens em desenvolvimento (KURSAR e COLEY, 1992; GOULD *et al* 1995).

GANDOLFI (1995) descreve que entre as espécies clímax, com maior ocorrência, abundância e permanência no sub-bosque, podem ser identificados dois grupos: espécies que permanecem toda a vida no sub-bosque (típicas do sub-bosque) e as espécies que podem crescer e se desenvolver no sub-bosque, mas que também podem alcançar e compor o dossel florestal ou a condição emergente (típicas do dossel), o que é observado para a espécie *Hymenaea courbaril* L.

Hymenaea courbaril L. var *stilb.* (jatobá) é uma espécie leguminosa arbórea clímax, considerada tolerante à sombra e com uma larga distribuição geográfica neotropical, sendo encontrada desde o sul do México, passando pela América Central, Colômbia, Venezuela. No Brasil esta espécie pode ser encontrada desde o Piauí até o norte do Paraná, particularmente em florestas semidescíduas, tanto em solos de alta e de média fertilidade (cerradões) (LANGENHEIM *et al.*, 1973; LEE e LANGENHEIM (1975).

As árvores de jatobá podem atingir a altura de 15-20 m, com tronco de até 1 m de diâmetro. Possuem folhas compostas de dois folíolos brilhantes, de 6-14 cm de comprimento. O fruto é um legume indeiscente, marrom, com 2-4 sementes envoltas por uma polpa farinácea de cor amarela e com cheiro forte. Esta farinha é nutritiva, e

consumida pelo homem assim como por animais silvestres (LEWINSOHN, 1980; LORENZI, 1998).

Sua madeira é pesada, e muito dura ao corte. A madeira é empregada na construção civil, para confecção de artigos esportivos, cabos de ferramentas, peças torneadas, esquadrias e móveis. A árvore de fácil multiplicação, não pode faltar na composição de reflorestamentos heterogêneos e na arborização de parques e grandes jardins (LEWIS, 2003).

As plântulas de jatobá são relativamente grandes, com cotilédones de reserva epígeos e bem adaptados aos ambientes sombreados com baixas taxas de crescimento relativo e baixos pontos de compensação luminosa (FLORES e BENAVIDES, 1990; KATAJIMA 1994).

As sementes de jatobá são ricas em xiloglucano (XG), cuja importância compreende desde a proteção inicial da semente contra o dessecamento até o fornecimento de carbono para o estabelecimento da superfície foliar, capazes de manter o crescimento autotrófico das plântulas no interior de uma floresta tropical (TINÉ *et al.*, 1997; BUCKERIDGE *et al.* 2000).

O processo de germinação, segundo BEWLEY (1997) inicia-se com a embebição das sementes e se completa com a protrusão da radícula. A extensão da radícula através dos tecidos que a envolvem, leva ao início do crescimento da plântula, na fase pós-germinativa, quando as reservas armazenadas são mais intensamente mobilizadas. SANTOS *et al.* (2004a) observaram em plântulas de jatobá que os eófilos e metáfilos em expansão produzem auxina que, através do transporte polar é levada aos cotilédones. As auxinas modulam a expressão de genes que codificam hidrolases promovendo a degradação de XG em monossacarídeos, com os quais também é sintetizada Sac para exportar às folhas em expansão, favorecendo a manutenção deste ciclo (BRANDÃO *et al.*, 2009). TINÉ *et al.* (2000) observaram que o xiloglucano é mobilizado depois da germinação, especificamente depois da emergência dos eófilos, o que reflete a sincronização entre crescimento de brotos e degradação de reservas em cotilédones (SANTOS e BUCKERIDGE, 2004b).

A duração da fase de pós-germinação (BEWLEY, 1997) é determinada pela taxa de crescimento da plântula e depende das condições ambientais. SANTOS e BUCKERIDGE (2004b) descrevem três fases do crescimento inicial de jatobá e os fatores ambientais chaves nelas. Os autores propõem que desde a germinação até o estabelecimento ativo da

fotossíntese nos eófilos é a temperatura o fator determinante, por coordenar a mobilização de carboidratos da série rafínosica dos cotilédones para os eixos de desenvolvimento da plântula (TINÉ *et al.*, 2000). Na segunda fase, quando ambos os processos mobilização de XG e fotossíntese, apresentam-se simultaneamente seriam a temperatura e a luz os fatores determinantes. Nesta fase foi observado que a razão *vermelho:vermelho distante* promove a síntese de auxina, que por sua vez favorece a degradação de XG. De outro lado, estes autores observaram que em locais com intensidade de luz relativamente maior, as plântulas de jatobá apresentaram maior área foliar total e altura. No terceiro período, após a senescência dos cotilédones, quando as plantas atingem a autotrofia, o fator determinante no desenvolvimento seria a luz.

A Figura 9b apresenta uma aproximação cronológica destas fases durante o desenvolvimento da presente pesquisa. Neste trabalho, são consideradas plantas juvenis aquelas na fase de pós-germinação (fase 3 de SANTOS e BUCKERIDGE, 2004b), cujos cotilédones já senesceram devido à terminação do processo de mobilização de reservas e possuem folhas fotossintetizadoras.

Tendo em vista a importância de *Hymenaea courbaril* L. nas florestas do Neotrópico, esta espécie parece ser um modelo biológico bastante interessante para o estudo do seu estabelecimento e crescimento inicial num cenário de mudanças climáticas.

2.2 OBJETIVOS

Considerando-se os inúmeros processos metabólicos que podem ser alterados pelas concentrações de CO₂ e da temperatura, os quais desencadeiam respostas específicas para cada espécie vegetal, o presente trabalho teve como objetivo identificar as respostas de crescimento, alocação de biomassa, fluorescência e fotossíntese em dois momentos do desenvolvimento inicial de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilb*, quando crescidas em quatro cenários ambientais distintos, nos quais interagem a concentração atmosférica de CO₂ e a temperatura ambiente, sendo eles: eCO₂-aT: elevado CO₂, ambiente temperatura; eCO₂-eT: elevado CO₂, temperatura elevada; aCO₂-aT: CO₂ ambiente, temperatura ambiente e aCO₂-eT: CO₂ ambiente, temperatura elevada.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Obtenção do material vegetal.

As sementes de *Hymenaea courbaril* var. *stilb.* foram adquiridas no Instituto Florestal, Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, procedentes da Estação Experimental de Casa Branca.

O peso médio das sementes selecionadas encontrava-se entre 4,5 e 5,5 g. As sementes foram previamente lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio 10% e foram armazenadas em frascos de vidro tampados num local fresco e seco.

Com a ajuda de um esmeril, as sementes foram escarificadas na região do hilo até que parte do cotilédone ficasse exposta (cerca de 1mm²). As sementes foram posicionadas para embeber água por 12 horas e posteriormente foram colocadas para germinar em câmaras de crescimento a 25°C, com fotoperíodo de 12h, dentro de bandejas perfuradas contendo como substrato vermiculita úmida.

Após a protrusão da radícula, aos 18 dap, as sementes germinadas foram transferidas para vasos com 6 litros de capacidade, com substrato composto por areia 2:3 vermiculita, uma planta por vaso. Os eófilos constituem o primeiro par de folhas que se desenvolve após a emergência. Aos 26 dias após o plantio (dap) foram escolhidas as plântulas com eófilos desenvolvidos, mas ainda fechados e, nessas condições, as plântulas foram colocadas nos tratamentos nas câmaras de topo aberto (Figura 4). Sabe-se (SANTOS & BUCKERIDGE, 2004b) que neste estágio, as folhas ainda não são fotossinteticamente ativas. As plântulas foram regadas com água pelo menos duas vezes por dia e com 100 ml solução nutritiva (formulação Hoagland) duas vezes por semana.

Os experimentos foram desenvolvidos a partir do outono de 2008 (março – novembro) e outono de 2009 (março – julho), com fotoperíodo natural (cerca de 12 horas), com a irradiação máxima de até 1200 FFFA de luz natural, atingida em casa de vegetação.

2.3.2 Desenho, construção e avaliação do sistema das câmaras de topo aberto (CTA).

As câmaras de topo aberto foram construídas dentro da estufa do Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO), do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da USP (S 23°33'912; W 046°, 43'870), conforme *design* descrito por AIDAR *et al* (2002), modificado. O sistema foi testado e avaliado, ficando como desenho definitivo, o descrito à continuação: As CTA são pequenas torres circulares de metal, com 1,7 m de diâmetro e uma altura total de 1,67 m, construídas em ferro perfil tipo “t”, galvanizado,

fechadas nas laterais por uma camada de policarbonato transparente, com proteção contra raios ultravioleta para evitar também um aumento de temperatura devido à irradiação (Figura 2). O enriquecimento do ar com CO₂ é feito através da injeção do gás com uma válvula solenóide no sistema lateral de circulação de ar por ventilação, onde o ar se mistura com CO₂ antes de ser empurrado para dentro das câmaras. As câmaras contam com uma saída de ar na parte superior, para fluxo contínuo (Figura 3).

A temperatura das câmaras com elevada temperatura foi aumentada com uma resistência com potência 1500 W, montada no sistema de circulação de ar, cujo funcionamento é ajustado com o softwares RICS (Remote Integrated Control System) para aquecer o ar 3°C acima da temperatura ambiente, sendo estas as condições previstas pelo IPCC (2007, WG I) até meados do século XXI.

As CTAs com elevada concentração de CO₂ (eCO₂) funcionaram em concentrações de 760 ppm (± 100 ppm) e as câmaras com concentração ambiente de CO₂ (aCO₂) funcionaram em 380 ppm (± 50 ppm), sendo que uma de cada par funcionou à temperatura ambiente e a outra com temperatura elevada. Como fonte de CO₂ foram utilizados cilindros pressurizados com 98% de CO₂ (Figura 2). A concentração atmosférica de CO₂ foi monitorada através de um medidor manual de CO₂ Testo 535 (erro ± 50 ppm) (Figura 4A). O tempo de renovação completa do ar verificado para as câmaras foi de 60 s.

A temperatura e a umidade relativa do ar dentro das câmaras foram monitoradas individualmente através de sensores específicos com o Software RICS. Os dados são armazenados em planilhas conversíveis para Excel®, a cada 10 minutos, durante 24 horas, durante todo o período experimental. O comportamento destes parâmetros no ciclo 24 horas aos 68 dap e aos 95 dap é apresentado na Figura 8. No apêndice 1 é mostrado o acompanhamento da temperatura (°C) e da umidade relativa (%) durante todo o período de crescimento dos períodos de 2008 (A e B) e 2009 (C e D).

No ano de 2008 o crescimento foi avaliado aos 26, 40, 55, 68, 85, 95, 120, 150, 180 e aos 240 dap com coletas não destrutivas, e com coletas destrutivas aos 26, 68, 95 e 240 dap. No ano de 2009 os parâmetros avaliados foram medidos aos 26, 68 e aos 95 dap.

Figura 2: Sistema de funcionamento e monitoramento das CTA. A. CTA; B. Cilindro de CO₂, com detalhe de válvula reguladora de pressão; C. Detalhe de ventilador, resistência (seta vermelha) e ponto de injeção de CO₂ (seta verde); D. Tela externa de monitoramento de temperatura e umidade relativa; E. Tela de software de monitoramento, RICS.

Figura 3: Diagrama do funcionamento do sistema das Câmaras de Topo Aberto (CTA). Para o fornecimento de CO_2 , nos tratamentos com eCO_2 , foram usados cilindros deste gás comprimido (A). O CO_2 ingressa ao sistema das CTA (D) no sistema de ventilação. Um ventilador (B) conduz o ar através de uma parede furada, que ajuda a misturar os gases antes de entrarem nas CTA. Somente nas CTA com eT, o ar é aquecido por resistências (C). Os gases misturados saem pela parte superior das câmaras. Sensor de temperatura (E) e de umidade relativa (F).

As coletas destrutivas foram feitas em cada uma das fases de desenvolvimento:

1. aos 68 dap, durante a fase linear de crescimento, quando ainda há fortes efeitos das reservas cotiledonares;
2. aos 95 dap, no início da fase de estabilização do crescimento, fase em que a fotossíntese passa a ser a única fonte de carbono para a plântula.

Os tratamentos avaliados foram: eCO₂-aT: elevado CO₂, ambiente temperatura; eCO₂-eT: elevado CO₂, temperatura elevada; aCO₂-aT: CO₂ ambiente, temperatura ambiente e aCO₂-eT: CO₂ ambiente, temperatura elevada.

Com o intuito de homogeneizar as condições de crescimento das plantas dentro das câmaras, o posicionamento dos vasos foi trocado duas vezes na semana.

2.3.4 Delineamento experimental.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, seguido do esquema fatorial 2 x 2 (concentrações de CO₂ x regimes de temperatura), completando 4 tratamentos, com 35 repetições cada, considerando cada planta como uma unidade experimental e uma réplica por tratamento. Cada tratamento foi desenvolvido numa CTA. As medições foram feitas em 6 plantas sorteadas ao acaso para as medidas de crescimento e em 3 plantas para coletas destrutivas de biomassa e para a dosagem de carboidratos não estruturais.

Com a ajuda de diagramas do tipo box-plot, foram retirados os valores extremos (fora de tendência). Os efeitos dos tratamentos foram identificados a partir do uso de análise de variância, considerando-se a fase de desenvolvimento, concentração de CO₂ e temperatura como efeitos fixos. Os testes *a posteriori* foram realizados usando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos utilizando-se como marcadores letras iguais para identificar tratamentos sem diferença significativa, ou letras diferentes para identificar tratamentos com diferenças significativas.

As transformações foram usadas para homogeneizar a variância quando necessárias (dados de carboidratos não estruturais), utilizando-se a transformação logarítmica e raiz quadrada. As análises foram realizadas usando o software SSPS Statistics, 17.1.

Figura 4 : A. Plântulas de *Hymenaea courbaril* L. aos 26 dap, no início dos tratamentos; B. Plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. aos 68 dap representativas de cada um dos tratamentos avaliados; C. Plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. aos 95 dap, representativas de cada um dos tratamentos avaliados.

Na análise os fatores avaliados foram momentos da fase de desenvolvimento, a concentração de CO₂ e o regime de temperatura, e as variáveis dependentes foram crescimento, alocação de biomassa, trocas gasosas, eficiência quântica potencial do PSII, clorofilas totais, razão C/N em folhas, raiz e caule, conteúdo de nitrogênio foliar e conteúdo de carboidratos estruturais.

Análise de componentes principais (ACP). Considerando a natureza contínua das variáveis, as relações entre os parâmetros avaliados e os tratamentos de interesse foram exploradas através de uma análise de componentes principais, empregando-se matrizes centradas e padronizadas. A análise foi realizada com os dados obtidos aos 68 dap e dos 95 dap. Os grupos de dados analisados foram:

- a. Crescimento e alocação de biomassa: altura-h, área foliar-af, fração folha-ff, fração caule fc, fração raiz fr, razão raiz: parte aérea R:PA, biomassa-b;
- b. Assimilação de CO₂: assimilação líquida de CO₂ (A_L); condutância estomática (gs); razão Ci/Ca; concentração intercelular de CO₂ (Ci); déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpv); transpiração (E); eficiência intrínseca do uso da água (EiUA, A/g); eficiência de transpiração instantânea (EUA, A/E);
- c. Curvas de luz: assimilação líquida de CO₂ (A_L); respiração no escuro (Re); eficiência quântica de CO₂ (EQ); ponto de compensação de luz (PCL); ponto de saturação de luz (PSL);
- d. Padrões de uso da luz e de nitrogênio: F_v/F_M, conteúdo total de clorofilas (Chl *a+b*), razão C/N e conteúdo de nitrogênio foliar (N_F).

Os dados originais foram centralizados e padronizados, proporcionando uma matriz de correlação. As amostras respectivas foram relacionadas com grupos dos tratamentos (**a**-aCO₂-aT; **ae**-aCO₂-eT; **e**: eCO₂-eT; **ea**-eCO₂-aT).

Para explorar a relação entre os eixos principais e os centróides definidos pelos escores dos tratamentos (média dos escores nos dois primeiros eixos) foram confeccionados gráficos com escalas padronizadas (biplots euclidianos).

As correlações entre os principais fatores determinados pelo processamento e os escores individuais, gerados pelo ACP foram interpretados seguindo a análise proposta por COHEN (1988): 1) valores positivos de 1.00 a 0.50 e negativos de -1.00 a -0.50 foram consideradas correlações grandes (g); 2) valores positivos de 0.49 a 0.30 e negativos de

-0,49 a -0,30 foram consideradas correlações medianas (m) e 3) valores positivos de 0,29 a 0,10 e negativos de -0,29 a -0,10 foram consideradas correlações pequenas (p).

Para as análise de carboidratos não estruturais (Sac, Glc, Fru, Amido) os resultados da ACP incluem a distribuição dos horários de coleta (sete horários aos 68 dap e 4 horários aos 95 dap). Neste caso, a progressão no tempo foi representada ligando-se os pontos amostrais de horários sucessivos no biplot. Cada momento da fase de desenvolvimento (os 68 dap e os 95 dap) foi analisado separadamente também neste caso.

2.3.5 Parâmetros avaliados

2.3.5.1 Crescimento

Os parâmetros avaliados foram:

a. Altura (h, cm) foi medida a partir da base do caule até a base da gema apical, usando-se, inicialmente, o paquímetro e para plantas maiores, a régua milimetrada.

b. Área foliar total (AF, cm²) de cada planta foi calculada somando a área foliar de cada folha composta, seguindo a metodologia usada por Godoy (2007). A área foliar de cada um dos folíolos foi calculada ao multiplicar o comprimento e largura de cada folíolo (área aparente) por um fator de correção (Fc) para se obter a área real de cada folíolo. O fator de correção da área aparente foi calibrado através da determinação da área real com o programa de integração de área Leaf Area Measurement, version 1.3, disponibilizado pela internet no endereço www.shef.ac.uk/~nuccpe/.

Para tal efeito, foram medidos o comprimento e largura de folhas de diferentes tamanhos. Posteriormente, estas mesmas folhas foram digitalizadas em scanner HP Deskjet F380 através do programa Leaf Area, com o qual foi determinada a área real. Os valores obtidos foram colocados em gráficos de dispersão, nos quais foram comparadas as área aparente e a real, e gerou-se um fator de correção através da regressão linear. O fator de correção foi usado para o cálculo da área foliar real.

c Biomassa b [g]. O material obtido nas coletas destrutivas foi separado em raiz, caule e folhas, individualizando os materiais por planta. Os materiais foram congelados em nitrogênio líquido e as amostras foram armazenadas a -20°C, até serem liofilizadas. Uma vez secas, elas foram pesadas em balança analítica.

2.3.5.2 Alocação de biomassa:

A taxa de crescimento relativo TCR ($\text{mg. g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) foi calculada:

$$\text{TCR} = (\ln B_2 - \ln B_1) / (t_2 - t_1)$$

A TCR são os miligrama de massa seca incorporada por cada grama de massa seca já existente, por dia.

B_1 = massa seca na coleta 1

B_2 = massa seca na coleta 2

$\ln$ = logaritmo natural

t_1 = tempo da coleta 1

t_2 = tempo da coleta 2

A razão raiz:parte aérea (R:PA, g.g^{-1}) foi calculada:

R:PA = biomassa da raiz / (biomassa do caule + biomassa das folhas)

Fração raiz, caule e folha (F_R , F_C e F_F , respectivamente)

F_F = biomassa foliar / biomassa total da planta (g.g^{-1})

F_C = biomassa do caule / biomassa total da planta (g.g^{-1})

F_R = biomassa da raiz / biomassa total da planta (g.g^{-1})

2.3.5.3 Fotossíntese

Trocas gasosas: as medições de trocas gasosas foram obtidas usando-se o analisador de gases por infravermelho (I.R.G.A.) do sistema portátil LI-6400X (Li-Cor, USA), equipado com uma fonte de luz artificial vermelho-azul LI-6400-02. As medições foram realizadas em pelo menos três plantas de cada tratamento, sempre entre as 9:00 e as 16 horas, e nas coletas destrutivas foram realizados acompanhamentos diários até às 20 horas. As medições foram feitas com a FFFA ambiente, concentração de CO_2 do tratamento correspondente e temperatura ambiente (aos 68 dap, temperatura foliar dos tratamentos com $aT = 21^\circ\text{C}$ e $eT = 24^\circ\text{C}$; aos 95 dap, temperatura foliar dos tratamentos com $aT = 25^\circ\text{C}$ e $eT = 28^\circ\text{C}$).

Os valores de fração molar de CO_2 atmosférico (C_a), temperatura da folha (T_f , $^\circ\text{C}$), a condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a taxa transpiratória (E , $\text{mmol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foram obtidos por meio dos sensores do equipamento, e os parâmetros como déficit de pressão de vapor baseada na temperatura foliar (dp_v) e fração molar de CO_2 intercelular (C_i , $\mu\text{mol CO}_2$) foram estimados pelo software do I.R.G.A.

As trocas gasosas foram avaliadas através dos seguintes parâmetros:

- taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_L , $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$),
- eficiência de transpiração instantânea (EUA, A/E , $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$),
- eficiência intrínseca do uso da água (EiUA – A/g_s , $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol H}_2\text{O}^{-1}$),
- razão C_i/C_a (concentração intracelular de CO₂ / concentração ambiente de CO₂),

Curvas de resposta à temperatura: Para conseguir usar o sistema de análise de trocas gasosas por infravermelho (I.R.G.A.) para produzir curvas de taxas de assimilação líquida (A_L) vs. temperatura foliar (T_f) foi necessário construir uma câmara que permitisse a estabilização das condições ambientais (temperatura e umidade) para o sensor. Uma imagem da montagem pode ser vista na Figura 5. As curvas de assimilação de CO₂ vs temperatura foliar foram feitas dos 15°C aos 40°C de temperatura foliar, a cada cinco graus.

Curvas de resposta à luz: Estas foram feitas na mesma semana da coleta destrutiva. As curvas foram obtidas usando-se o analisador de gases por infravermelho (I.R.G.A.) do sistema portátil LI-6400X (Li-Cor, USA), equipado com uma fonte de luz artificial vermelho-azul LI-6400-02. As medições foram feitas em diferentes níveis de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos incidentes na superfície da folha (FFFA): 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700 e 900 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. As medições sempre foram feitas dos valores maiores para os valores menores de irradiância. Foram modificados os valores da concentração CO₂ de tratamento, da temperatura da folha, sendo 21°C para as plantas crescidas em temperatura ambiente e 24°C para os tratamentos com temperatura elevada.

a. A assimilação líquida (A_L), a respiração no escuro (R_e), o ponto de compensação de luz (PCL) e o ponto de saturação de luz (PSL) foram calculadas com a ajuda da planilha para curvas de luz “Light Fit (1)” baseada em LONG e HÄLLGREN (1993).

b. Eficiência quântica de CO₂ (Φ) foi obtida a partir do coeficiente de regressão linear dos primeiros pontos obtidos a partir das medições em cada uma das plantas avaliadas de cada tratamento.

c. A convexidade (Θ), termo exigido pelo modelo da hipérbole não retangular, foi calculada na planilha de acordo com o melhor ajuste aos pontos, sendo que os valores obtidos estiveram entre 0,81 e 0,94 nos dois períodos avaliados.

Figura 5 Diagrama da montagem de câmara de estabilização de temperatura e umidade em uso conjunto com o sensor por infravermelho do LI-6400XT. Do sistema portátil de fotossíntese LI-6400XT (A) é colocada a sua câmara de sensores IRGA (B) dentro da câmara de estabilização de temperatura e umidade (C). Uma vez estabilizadas as condições internas de (C), foi colocada a folha da planta de interesse (D) para serem feitas as medições de trocas gasosas sob diferente temperatura foliar. A temperatura interna de (C) pode ser visualizada e controlada em (E).

d. O ponto de saturação de luz (PSL) foi calculado como a intensidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativo necessário para atingir 0,9 de $A_{\max}$. Os principais parâmetros obtidos de curvas de luz aparecem na figura 6.

Figura 6 : Principais parâmetros obtidos da resposta das taxas de assimilação de CO₂ a diferentes intensidades de luz, curva de luz. Θ : convexidade; Φ : eficiência quântica de CO₂; PCL: ponto de compensação de luz; PSL: ponto de saturação de luz; R_e : respiração no escuro. No gráfico são apontadas as fases (regiões delimitadas por linhas retas tracejadas em cinza) em que a fotossíntese é limitada pela luz e em seguida em que há limitação pelo processo de carboxilação.

2.3.5.4 Fluorescência

Para as medidas de fluorescência da clorofila *a* foi utilizada a câmara de fluorescência do LI-COR 6400-40, *Leaf Chamber Fluorometer*. A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada

através de medidas pontuais, ao longo do experimento, da eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_V/F_M), calculada através da fórmula:

$$F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$$

sendo que F_M é a fluorescência máxima e F_0 é a fluorescência mínima de folhas adaptadas ao escuro por 30 minutos.

2.3.5.5 Pigmentos

O conteúdo de clorofilas foi medido com um SPAD-502 chlorophyll meter (Konica- Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan). O aparelho foi calibrado para metáfilos de jatobá. Para a calibração, foram coletados discos foliares de 0,24 cm² de folhas com diferentes fases de desenvolvimento e congeladas em nitrogênio líquido (N₂). Os pigmentos foram extraídos com metanol 80% de acordo com a metodologia de PORRA *et al* (1989). A curva de calibração obtida para folhas de jatobá foi:

$$\text{Chl } a + b \text{ [nmol.cm}^{-2}\text{]} = 2,11 \cdot e^{0,0622[\text{spad}]}$$

Foram realizadas três medições em diferentes pontos da lâmina (base, centro, ápice), em folhas completamente expandidas de três plantas diferentes, para cada tratamento, e a média foi usada como [spad] para a folha.

Figura 7: Gráfico de calibração da concentração de Chl *a+b* vs SPAD de metáfilos de jatobá.

2.3.5.6 Razão Carbono/Nitrogênio e conteúdo total de nitrogênio foliar.

Amostras de tecidos vegetais (raiz, caules e folhas) liofilizados e moídos foram analisadas no Laboratório de Ecologia Isotópica, CENA/USP (Piracicaba, SP) por fluxo contínuo em analisador elementar (Carlo Erba) em linha com um espectrômetro de massas (Finnegan Delta Plus), onde se obtiveram a razão dos isótopos estáveis do nitrogênio e carbono ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$) e suas concentrações totais (% Nitrogênio, % Carbono).

Figura 8: Ciclo diário (24 h) da temperatura (°C) e da umidade relativa (u.r.) durante os dias 68 (esq) e 95 dap (der) dentro das câmaras de topo aberto (CTA), cinza (eT); preto (aT).

2.4 RESULTADOS

Para evidenciar como foram as condições ambientais particulares do local onde se desenvolveu a presente pesquisa (estufa do departamento de Botânica da USP (S 23°33'912; W 046°, 43'870), foram comparados os dados de temperatura em °C e umidade relativa (%) mínimas, máximas e médias em 24 horas nas câmaras de topo aberto à temperatura ambiente, de outono dos anos 2008 e 2009 com o comportamento destes parâmetros durante a primavera de 2008 (Tabela de dados no Apêndice 1). O comportamento da umidade relativa (u.r.) dentro das câmaras de topo aberto apresentou o mesmo padrão de comportamento que nos sistemas naturais: ao aumentar temperatura ambiente a umidade relativa diminui e, ao diminuir a temperatura ambiente a umidade relativa aumenta. As umidades relativas mínima e média foram relativamente inferiores no outono de 2008, por apresentarem naquele período as temperaturas mínimas e médias maiores quando comparadas à da primavera de 2008. A u.r. máxima foi similar nos três períodos comparados (95% e 89% nos outonos de 2008 e 2009, respectivamente, e de 92% durante a primavera de 2008). A temperatura média oscilou entre 22°C e 26°C (sendo de 26,1°C e 22,3°C no outono de 2008 e 2009, respectivamente, e de 24°C durante a primavera de 2008). Por outro lado, a temperatura mínima noturna em outono de 2008 atingiu valores superiores aos observados durante primavera daquele mesmo ano (18°C em outono e 13°C na primavera). A temperatura mínima no outono de 2009 foi de 3°C, menor do que a apresentada na primavera de 2008.

2.4.1 Desenvolvimento inicial de plantas juvenis de jatobá.

Foi evidenciado que, independentemente do tratamento, as plantas juvenis de jatobá apresentaram um padrão de crescimento bem definido. Depois da germinação até ao redor dos 85 dap, houve um crescimento linear seguido de uma estabilização do crescimento com aumento gradativo. Foi observado que se mantiveram as diferenças entre os tratamentos, estabelecidas na fase linear de crescimento até os 240 dap (Figura 9). Este padrão de crescimento durante 240 dap pode ser evidenciado também através dos parâmetros de desenvolvimento, tais como a área foliar e o número de folhas (Apêndice 2). A estabilização na taxa de crescimento ao redor dos 130 dap (diminuição da área foliar total e do número de folhas) foi provavelmente decorrente de uma limitação no volume do substrato, razão pela qual as plantas foram transplantadas para um vaso maior (ver Apêndice 2).

Figura 9: Padrão de desenvolvimento de plantas juvenis de jatobá, usando como referência o comportamento da altura, durante 240 dias após o plantio sob os tratamentos eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT (tratamento controle) e aCO₂-eT. Linha azul: data da primeira coleta destrutiva (68 dap); linha vermelha: finalização da fase de crescimento linear; linha verde: data da segunda coleta destrutiva (95dap); linha amarela: início da mudança de orientação do crescimento para plagiotrópico.

Figura 9b: Cronologia do desenvolvimento inicial de plantas de jatobá, observada nesta pesquisa (preto). Setas incompletas indicam processos cujo seguimento não foi acompanhado. Em cinza, 1, 2, 3: fases do desenvolvimento inicial, propostas por SANTOS E BUCKERIDGE (2004b); CD: coletas destrutivas para análise de biomassa e de carboidratos não estruturais, CD1: aos 68 dap; e CD2: aos 95 dap.

Ao redor dos 130 dap a orientação ortotrópica do crescimento do primeiro eixo característica até então, é substituída pelo desenvolvimento das gemas laterais, cuja orientação vira plagiotrópica nas plantas de jatobá.

Na Figura 9, produto das medições feitas no ano 2008, pode-se observar a tendência de maior crescimento dos tratamentos com elevada temperatura, comparados àqueles à temperatura ambiente.

A Figura 9b apresenta a cronologia do desenvolvimento inicial de plântulas de jatobá nos primeiros 240 dap.

2.4.2 Crescimento e alocação de biomassa.

Ao comparar as respostas dos parâmetros avaliados foi evidenciado que cada uma das duas fases de desenvolvimento determina respostas próprias de crescimento assim como os parâmetros de alocação de biomassa. A Figura 10 apresenta plantas juvenis de jatobá aos 68 dap, crescidas no ano 2009.

Os tratamentos com eCO₂ apresentaram diferenças significativas na altura e na biomassa aos 95 dap. Para a área foliar total a diferença foi significativa somente no tratamento eCO₂-eT aos 95 dap (Figura 11).

Aos 65 dap a concentração de CO₂ e a temperatura modificaram a razão C/N, assim como a biomassa (Figura 11 e 12). Porém, aos 95dap a influência das eCO₂ associadas com às elevadas temperaturas foram evidentes, alterando todos os parâmetros de crescimento avaliados. Aos 95 dap o crescimento das plantas foi afetado pelas eCO₂ e eT na altura (+30%), área foliar total (+77%) e biomassa (+70%) em relação ao tratamento controle, aCO₂-aT (Figura 11). Estes parâmetros são indicadores importantes de produtividade em plantas, assim como o número de folhas, que também aumentou em aproximadamente 35% em comparação ao controle (dados não apresentados).

Tabela 1: Aumento em porcentagem (%) de área foliar total (AF) e biomassa (B) dos 68 para os 95 dap.

%	eCO ₂ -aT	eCO ₂ -eT	aCO ₂ -aT	aCO ₂ -eT
AF (cm ²)	1,2	46	19	15
(g)	115	103	75	40

Ao compararmos as respostas dos parâmetros avaliados nos 68 dap para os de 95 dap (Tabela 1), foi evidenciado que o tratamento com eCO₂-aT apresentou o menor

aumento em área foliar total neste período. No que se refere ao comportamento da biomassa nesse período, o tratamento eCO₂-aT apresentou o maior aumento (115%), e as plantas do tratamento aCO₂-eT apresentaram o menor aumento (40%).

Sobre os parâmetros de alocação, a razão R:PA foi ligeiramente superior no tratamento eCO₂-aT aos 68 dap, mas não para os 95 dap. Esta tendência coincide com a fração raiz (FR) aos 68dap. Já aos 95 dap os tratamentos com eT investiriam 5% mais na biomassa da raiz (Figura 12).

Foi observado que as plantas juvenis de jatobá investem mais biomassa em folhas do que em caules e raízes, durante ambos os períodos. No entanto, houve uma pequena redução da biomassa acumulada nas folhas aos 95 dap, com um aumento concomitante da fração raiz e caule, em todos os tratamentos, exceto no cenário eCO₂-aT (Figura 12)

Figura 10: Plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT (tratamento controle) e aCO₂-eT aos 68 dap.

Figura 11: Altura (cm), biomassa (g) e área foliar total (cm²) de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT e aCO₂-eT aos 68 dap e aos 95 dap. (Média ± ep, n=6. diferenças significativas entre médias (P<0,05).

Figura 12: Porcentagem de mudança (%) em parâmetros de crescimento (esq) e alocação de biomassa (der) comparados com o tratamento controle aCO₂-aT: b – biomassa (g); h – altura do caule (cm); AFt – área foliar total (cm²); R:PA – razão raiz: parte aérea; C/N_F – razão carbono:nitrogênio em folhas; N_F – nitrogênio foliar (mg N. g⁻¹ MS); Fc – fração caule (g.g⁻¹); Fr – fração raiz (g.g⁻¹); Ff - fração folha (g.g⁻¹) em plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob os tratamentos eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-eT aos 68 dap (A) e aos 95 dap (B).

Figura 13A: Interpolação entre os escores das variáveis e amostras nos dois primeiros eixos resultantes da análise de componentes principais. O diagrama mostra a relação entre as variáveis mensuradas (biomassa (b), altura (h), área foliar (AF), fração caule (Fc), fração folha (Ff), fração raiz (Fr), razão raiz: parte aérea (R-PA)) aos 68 dap, e os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são apresentados.

Figura 13B: Interpolação entre os escores das variáveis e amostras nos dois primeiros eixos resultantes da análise de componentes principais. O diagrama mostra a relação entre as variáveis mensuradas (biomassa (b), altura (h), área foliar (AF), fração caule (Fc), fração folha (Ff), fração raiz (Fr), razão raiz: parte aérea (R-PA)) aos 95 dap, e os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais (componente 1 e 2). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são apresentados.

Foi observado que a razão C/N foi maior no caule, seguido das raízes e das folhas nos dois períodos avaliados (Figura 12). Sobre a resposta dos tratamentos, a razão C/N foi maior naqueles com eCO₂, em todos os órgãos avaliados. Mesmo assim, as folhas do tratamento eCO₂-aT continham até 22% mais de razão C/N, mas 18% menos de nitrogênio que o tratamento controle.

Os tratamentos com maiores taxas de crescimento relativo, durante o período de crescimento nas CTA, foram aqueles com eCO₂, seguidos do tratamento com eT e por último o tratamento controle (Tabela 2).

As análise de variância dos parâmetros de crescimento aparecem no apêndice 4.

Tabela 2: Taxa de crescimento relativo (TCR) (mg.g⁻¹.dia⁻¹) avaliada no período de crescimento dos 26 para os 95 dap.

TCR (mg.g ⁻¹ .dia ⁻¹) do 26dap ao 95 dap				
	eCO ₂ -aT	eCO ₂ -eT	aCO ₂ -aT	aCO ₂ -eT
média	7,10	9,19	2,26	4,07

Análise de componentes principais.

A matriz de correlação empregada na análise de componentes principais levando em conta as variáveis biomassa (b), altura (h), área foliar (af), fração caule (F_C), fração folha (F_F), fração raiz (F_R), razão raiz: parte aérea (R-PA), por amostra dos tratamentos eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT e aCO₂-eT aos 68 dap é apresentada na Tabela 3A. A análise resultou num arranjo contendo 54% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 33% no primeiro eixo e 21 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Tabela 4A) mostra uma contribuição maior das variações F_R e R-PA, no primeiro eixo e a F_C no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra uma polarização entre as variáveis F_R, R-PA e b, h, sendo as primeiras correlacionadas positivamente ao eixo e as últimas negativamente.

Os escores de elementos amostrais encontram-se segregados no primeiro eixo da análise (Figura 13A) que possui uma maior contribuição das variáveis raiz-parte aérea (R-PA) e fração raiz (F_R). Observa-se uma maior segregação do tratamento eCO₂-aT (ea) entre o primeiro e /ou segundo eixo, sendo encontrado o tratamento ao longo das variações de

raiz-parte aérea (R-PA) e fração raiz (F_R), refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento.

Foi observada polarização entre altura (h) - biomassa (b) com raiz-parte aérea (R-PA) e fração raiz (F_R), provavelmente dada pelos efeitos do tratamento eCO_2-eT (e). Os efeitos dos tratamentos aCO_2-eT (ae) e aCO_2-aT (a) estão associados aos maiores valores de F_F , sendo que os valores de F_F aumentam nestes tratamentos e diminuem no eCO_2-aT (ea).

Os resultados com contribuição balanceada de todas as variáveis estão representados no centro do biplot.

Em outra matriz de correlação (Tabela 3B) contendo as variáveis: biomassa (b), altura (h), área foliar (af), fração caule (F_C), fração folha (F_F), fração raiz (F_R), razão raiz: parte aérea (R-PA), por amostra dos tratamentos $eCO_2.aT$, $eCO_2.eT$, $aCO_2.aT$ e $aCO_2.eT$ aos 95 dap, a análise de componentes principais resultou num arranjo contendo 73% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 46% no primeiro eixo e 27 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Tabela 4B) mostra uma contribuição maior da variação da área foliar total (Af) seguida da biomassa (b), altura (h), e fração caule (F_C) no primeiro eixo e das variáveis raiz-parte aérea (R-PA) e fração raiz (F_R) no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo (Figura 13B) mostra uma polarização entre as variáveis: biomassa (b), altura (h), área foliar total (Af) e fração caule (F_C) com a fração folhas (F_F), sendo as primeiras correlacionadas positivamente com o eixo e as segundas negativamente.

Os escores de elementos amostrais que se encontram segregados no primeiro eixo da análise (Figura 13B) que possui uma maior contribuição das variáveis área foliar total (Af) seguida da biomassa (b), altura (h), e fração caule (F_C). Observa-se uma maior segregação do tratamento eCO_2-eT (e) entre o primeiro e /ou segundo eixo, encontrando este tratamento ao longo das variações área foliar total (Af) seguida da biomassa (b), altura (h), e fração caule (F_C), refletindo a contribuição das variações na resposta obtida no presente experimento.

Foi observada uma polarização entre área foliar total (Af) e fração folhas (F_F) provavelmente dada pelos efeitos do tratamento eCO_2-eT (e) eCO_2-aT (ea), respectivamente.

Os resultados com contribuição balanceada de todas as variáveis estão representados no centro do biplot.

Tabela 3: Valores das correlações entre as sete variáveis analisadas biomassa (b), altura (h), área foliar (af), fração caule (Fc), fração folha (Ff), fração raiz (Fr), razão raiz: parte aérea (R-PA) aos (A) 68 dap e (B) 95 dap, calculadas conjuntamente para todos os tratamentos, interpretados seguindo a análise proposta por COHEN (1988) (ver materiais e métodos). $P(<0,05)$.

A. 68 dap	área foliar	biomassa	R-PA	Fração folhas	Fração caule	Fração raiz
Altura	0,1046	0,5102	-0,4964	0,0415	0,0222	-0,2093
Área foliar t.		-0,0140	0,4542	-0,1128	0,0691	0,1338
Biomassa			-0,4195	0,1696	0,0810	0,0656
R-PA				-0,3028	-0,0911	0,4554
Fração folhas					-0,4717	-0,4233
Fração caule						-0,2900

B. 95 dap	área foliar	biomassa	R-PA	Fração folhas	Fração caule	Fração raiz
Altura	0,7196	0,6297	0,0652	-0,3893	0,2850	0,0813
Área foliar t.		0,7315	0,0962	-0,5754	0,5355	0,1362
Biomassa			0,0584	-0,2645	0,3412	-0,0754
R-PA				-0,2406	-0,2347	0,7503
Fração folhas					-0,7455	-0,5557
Fração caule						0,0523

Tabela 4: Proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 e PC2) gerados pelo análise de componentes principais dos parâmetros de crescimento biomassa (b), altura (h), área foliar total (af), fração caule (Fc), fração folha (Ff), fração raiz (Fr), razão raiz: parte aérea (R-PA) aos 68 dap (A) e aos 95 dap (B). Valores dos coeficientes calculados para cada uma das variáveis inclusas na análise.

Componentes		
A. 68 dap	Primero	Segundo
Altura	-0,4267	0,3402
Área foliar t.	0,2417	0,2751
Biomassa	-0,3829	0,2867
R-PA	0,586	-0,0315
Fração folhas	-0,3385	-0,5763
Fração caule	-0,0240	0,623
Fração raiz	0,3929	0,0682

Componentes		
B. 95 dap	Primero	Segundo
Altura	0,4225	-0,1488
Área foliar t.	0,5037	-0,1343
Biomassa	0,4010	-0,2452
R-PA	0,1217	0,6301
Fração folhas	-0,4513	-0,2058
Fração caule	0,3861	-0,1828
Fração raiz	0,1987	0,6533

2.4.3 Medições de trocas gasosas.

A partir das medições de trocas gasosas (medições pontuais, curvas de luz, resposta das trocas gasosas à temperatura) foi evidenciado que as elevadas concentrações de CO₂, com ou sem aumento na temperatura, aumentam as taxas de assimilação líquida de CO₂ (A_L). Nas medições pontuais (Tabela 5) nos dois períodos avaliados, os tratamentos com eCO₂ apresentaram menor condutância estomática e uma diminuição das taxas de transpiração, o que gerou um aumento na eficiência de uso da água especialmente no

tratamento eCO₂-aT. A taxa de assimilação líquida no tratamento controle, é menor aos 68 dap do que aos 95 dap.

Os parâmetros das curvas de resposta à luz (Tabela 6) mostraram diferenças significativas determinadas pela fase de desenvolvimento. A respiração no escuro (Re) nos tratamentos com eCO₂-aT apresentaram os menores valores em ambas as fases avaliadas. Aos 68 dap, os maiores valores estiveram nos tratamentos com eT. No entanto, aos 95 dap, o tratamento só com eT diminuiu as taxas de Re. Sobre a eficiência quântica de CO₂ (Φ), foi observado que os valores diminuíram dos 68 para os 95 dap. Os tratamentos com eCO₂ apresentam maiores valores de Φ em ambos dos períodos. O comportamento do ponto de compensação de luz (PCL) apresentou diferenças significativas aos 68 dap com os tratamentos com eT, comportamento que não foi visto aos 95 dap quando não foram observadas diferenças significativas. A resposta do ponto de compensação da luz parece ser determinada principalmente pela resposta da respiração no escuro. Os gráficos das curvas de luz em cada um dos tratamentos podem ser observados no Apênd. 3, Figs. 1 e 2.

Tabela 5: Propriedades de trocas gasosas em folhas completamente expandidas de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT e aCO₂-eT aos 68 dap e aos 95 dap. Média $\pm$ ep, n = 3. Diferenças significativas (P<0,05)

	eCO ₂ -aT		eCO ₂ -eT		aCO ₂ -aT		aCO ₂ -eT	
68 dap	Média	ep	média	ep	média	ep	média	ep
A _L	8,52ab	1,82	9,29b	0,49	4,24a	0,18	7,94b	0,46
gs	0,07a	0,02	0,086a	0,01	0,11ab	0,03	0,18b	0,01
Ci/Ca	0,69a	0,07	0,73a	0,03	0,76a	0,02	0,76a	0,00
Ci	482,02ab	89,30	543,6b	22,97	281,40a	6,81	282,68a	1,81
E	0,63a	0,01	2,15b	0,15	1,49ab	0,32	3,81c	0,20
EiUA	152,1a	56,02	107,89a	13,77	40,96a	8,16	44,41a	1,13
EUA	13,61b	3,04	4,39a	0,50	3,1a	0,55	2,08a	0,03
	eCO ₂ -aT		eCO ₂ -eT		aCO ₂ -aT		aCO ₂ -eT	
95 dap	Média	ep	média	ep	média	ep	média	ep
A _L	8,35a	0,59	8,4a	0,04	7,22a	0,11	7,5a	0,73
gs	0,06a	0,01	0,05a	0,01	0,11ab	0,01	0,12b	0,02
	0,67a	0,04	0,66	0,08	0,69a	0,03	0,70a	0,03
Ci	508,71b	32,13	502,03b	60,76	257,96a	11,42	265,25a	9,82
E	0,55a	0,03	1,01ab	0,13	1,23ab	0,16	1,65b	0,28
EiUA	147,64b	19,51	172,67b	12,32	69,65a	7,29	64,27a	6,38
EUA	15,16b	0,32	8,66a	1,21	6,08a	0,87	4,90a	1,10

A_L: taxa de assimilação líquida ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); gs: condutância estomática ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); Ci: concentração intercelular de CO₂ ($\mu\text{mol.mol}^{-1}$); E: taxas de transpiração de água ($\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); EiUA: eficiência fotossintética intrínseca do uso da água ($\text{EiUA} = A/\text{gs}$; ($\mu\text{mol.mol}^{-1}$)); EUA: eficiência fotossintética do uso da água (A/E ; ($\mu\text{mol.mmol}^{-1}$)) LAMBERS (2008).

Tabela 6: Parâmetros das curvas de resposta à luz da primeira folha completamente expandida de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT e aCO₂-eT, aos 68 dap e aos 95 dap. Média ± ep, n = 3. Diferenças significativas (P<0,05)

	eCO ₂ -aT		eCO ₂ -eT		aCO ₂ -aT		aCO ₂ -eT	
	média	ep	média	ep	média	ep	média	ep
68 dap								
A _L	14,66 b	0,91	14,65 b	0,42	11,06 a	0,28	11,94 a	0,58
Re	0,43 a	0,03	1,28 b	0,03	0,37 a	0,15	1,64 b	0,07
EQ	0,06 c	0,00	0,056 b	0,00	0,046 b	0,00	0,045 a	0,00
PCL	6,86 a	0,22	23,5 b	2,03	8,21 a	3,69	32,09 b	2,22
PSL	507,67a	10,11	591,67a	43,72	458,33a	57,83	470,00a	14,43
95 dap								
A _L	15,07 b	0,35	14,9 b	0,54	11,01 a	0,37	10,8 a	0,41
Re	1,05 a	0,12	1,8 b	0,13	1,65 ab	0,12	1,33 ab	0,17
EQ	0,05 ab	0,00	0,06 b	0,00	0,05 ab	0,00	0,04 a	0,00
PCL	21,5 a	1,78	28,9 a	1,72	32,8 a	2,98	30,4 a	3,32
PSL	505 ab	23,63	615 b	47,70	406 a	21,28	438 ab	8,82

A_L: taxas de assimilação líquida ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); Re: respiração no escuro ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); EQ: eficiência quântica de CO₂(Φ); PCL: ponto de compensação de luz ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); PSL: ponto de saturação de luz ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

As curvas de resposta das taxas de assimilação à temperatura (Figura 14) apresentaram diferenças para cada um dos cenários propostos. Os tratamentos com eCO₂ apresentaram um aumento em sua temperatura ótima para as taxas de assimilação, sendo esta entre 25°C e 35°C. Este valor foi maior em 5°C ao apresentado nos tratamentos com CO₂ ambiente. À temperatura menor (10°C), as taxas de assimilação não apresentam diferenças entre os tratamentos com eCO₂. Em temperaturas elevadas (40°C), o tratamento eCO₂-eT apresentou as maiores taxas de assimilação de CO₂.

A razão F_V/F_M (Tabela 7) apresentou diferenças significativas tanto entre os tratamentos aos 68 dap, mas sim quanto entre os tratamentos eCO₂ eT aos 95 dap. A elevação da temperatura parece ter aumentado a eficiência dos sistemas fotossintéticos, já que a razão F_V/F_M aumentou em ambos os tratamentos com eT, independente da concentração de CO₂ aos 95 dap.

O conteúdo de clorofila total (a+b, Tabela 7) está relacionado com a fase de desenvolvimento, sendo maior aos 95 dap do que aos 68 dap em folhas completamente expandidas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos aos 95

dap, mas sim aos 68 dap, quando os teores de clorofila foram maiores em eCO₂-eT. A elevação do CO₂ apenas levou ao menor teor de clorofilas, o que é condizente com o fato de que a eficiência fotossintética em geral é mais alta em eCO₂-aT (Tabela 6).

As análises de variância dos parâmetros de trocas gasosas e padrão de uso da luz aparecem no apêndice 5.

Tabela 7: Razão F_v/F_m e conteúdo de clorofila Chl $a+b$ (nmol.cm⁻²) em folhas completamente expandidas de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L crescidas sob eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT and aCO₂-eT aos 68 dap e aos 95 dap, durante 2009. Média $\pm$ ep, (n = 3 para F_v/F_m ; n=9 para Chl $a+b$). Diferenças significativas (P<0,05)

	eCO ₂ -aT		eCO ₂ -eT		aCO ₂ -aT		aCO ₂ -eT	
	Média	ep	média	ep	média	ep	média	ep
68dap								
F_v/F_m	0,78a	0,01	0,80a	0,01	0,80a	0,01	0,79a	0,00
Chl $a+b$	18,85a	3,180	34,23b	4,607	27,06ab	3,416	24,89ab	1,592
<hr/>								
	eCO ₂ -aT		eCO ₂ -eT		aCO ₂ -aT		aCO ₂ -eT	
	Média	ep	média	ep	média	ep	média	ep
95 dap								
F_v/F_m	0,76a	0,02	0,82b	0,01	0,78 ab	0,01	0,81 b	0,01
Chl $a+b$	34,27a	2,904	45,34a	1,771	41,01a	3,509	36,12a	3,484

Análise de componentes principais.

Na Tabela 8A é apresentada a matriz de correlação entre as variáveis assimilação líquida de CO₂, (A_L) concentração intercelular de CO₂ (C_i), condutância estomática (gs), transpiração (E), razão C_i/C_a , déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpv), eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), eficiência do uso da água (EUA), por amostra dos tratamentos eCO₂-aT (ea), eCO₂-eT (e), aCO₂-aT (a) e aCO₂-eT (ae) aos 68 dap. A análise de componentes principais aplicada a essa matriz resultou em um arranjo que continha 76% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 51% no primeiro eixo e 25 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Tabela 9A) mostra contribuição maior das variações eficiência intrínseca do uso da água (EiUA, A/gs) e eficiência do uso da água (EUA, A/E) no primeiro eixo, e do déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpV) seguido da assimilação líquida de CO₂, (A_L) e da concentração intercelular de CO₂ (C_i) no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra polarização entre as eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) e da eficiência do uso da água (EUA) e as variações da razão C_i/C_a , condutância estomática (gs)

e transpiração (E), sendo as primeiras correlacionadas positivamente com o eixo e as segundas negativamente. A polarização observada no primeiro eixo provavelmente esta dada pelo efeito do tratamento eCO₂-aT (ea) e a polarização negativa esta dada provavelmente pelo tratamento aCO₂-eT (ae). Os escores de elementos amostrais encontram-se segregados no primeiro eixo da análise (Figura 15A) que possui maior contribuição das variáveis eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) e a eficiência do uso da água (EUA). Observa-se maior segregação do tratamento eCO₂-aT (ea) entre o primeiro e /ou segundo eixo, encontrando estes tratamentos ao longo das variações de eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) e eficiência do uso da água (EUA, A/E) refletindo a contribuição das variações na resposta obtida no presente experimento. adicionalmente observa-se maior segregação do tratamento aCO₂-eT (ae) entre o primeiro e /ou segundo eixo, encontrando estes tratamentos ao longo das variações da razão Ci/Ca, da condutância estomática (gs), transpiração (E), refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento.

Figura 14: A. Taxa de assimilação líquida de CO₂, B. condutância estomática, g_s C. concentração interna de CO₂, C_i , em diferentes temperaturas foliares (Tf, °C).

Figura 15A: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP aplicada às variáveis A_L , C_i , C_i/C_a , E , $EiUA$, EUA , dpV aos 68 dap. O círculos identificam os escores das amostras para cada tratamento (a; ae; e; ee) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são apresentados.

Figura 15B: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP aplicada às variáveis A_L , C_i , C_i/C_a , E , $EiUA$, EUA , dpV aos 95 dap. Os círculos identificam os escores das amostras para cada tratamento (a; ae; e; ee) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são apresentados.

Tabela 8: Valores das correlações entre as sete variáveis analisadas assimilação líquida de CO₂, (A_L), concentração intercelular de CO₂ (Ci), condutância estomática (gs), transpiração (E), razão Ci/Ca, déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpv), eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), eficiência do uso da água (EUA), (A) 68 dap e (B) 95 dap, calculadas conjuntamente para todos os tratamentos, interpretados seguindo a análise proposta por Cohen (1988) (ver materiais e métodos). P(<0,05).

A. 68 dap	gs	ci	Ci/Ca	E	dpv	EiUA	EUA
A _L	-0,1988	0,2886	-0,5188	0,1217	0,4738	0,7221	0,4988
gs		-0,4416	0,5703	0,8397	0,2898	-0,7278	-0,6443
Ci			0,1147	-0,3689	0,4019	0,2464	0,2583
Ci/Ca				0,3293	0,2568	-0,8559	-0,6070
E					0,6134	-0,5007	-0,6856
dpv						-0,1424	-0,4060
EiUA							0,8560
EUA							

B. 95 dap	gs	ci	Ci/Ca	E	dpv	WUEi	WUE
A _L	-0,2144	0,6367	0,1081	-0,4305	-0,1330	0,4530	0,5135
gs		-0,6912	0,4601	0,7393	-0,3317	-0,9117	-0,6535
Ci			0,1908	-0,5947	0,1494	0,7418	0,6716
Ci/Ca				0,3760	-0,1424	-0,4671	-0,2737
E					0,3572	-0,6997	-0,9158
dpv						0,3425	-0,4076
EiUA							0,6739
EUA							

Tabela 9: Proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (componente principal CP1 e CP2) gerados pelo análise de componentes principais dos parâmetros de trocas gasosas assimilação líquida de CO₂, (A_L), concentração intercelular de CO₂ (Ci), condutância estomática (gs), transpiração (E), razão Ci/Ca, déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpv), eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), eficiência do uso da água (EUA), aos 68 dap (A) e aos 95 dap (B). Valores dos coeficientes calculados para cada uma das variáveis incluídas na análise.

A. 68 dap	Componentes	
	Primeiro	Segundo
A _L	0,2466	0,5787
gs	-0,4269	0,1053
Ci	0,1662	0,2824
Ci/Ca	-0,3818	-0,0641
E	-0,3720	0,3656
dpv	-0,1654	0,6357
EiUA	0,4660	0,1781
EUA	0,4480	-0,0246

B. 95 dap	Componentes	
	Primeiro	Segundo
A _L	-0,3305	-0,3305
gs	-0,4231	-0,3078
Ci	0,3920	-0,0961
Ci/Ca	-0,1725	-0,4076
E	-0,4289	0,1764
dpv	0,0033	0,6705
EiUA	0,4417	0,2624
EUA	0,4260	-0,2667

Os escores de elementos amostrais encontram-se segregados no segundo eixo da análise que possui maior contribuição das variáveis: assimilação líquida de CO₂, (A_L), concentração intercelular de CO₂ (Ci) e déficit de pressão de vapor (dpV) baseado na temperatura foliar. Observa-se maior segregação do tratamento eCO₂.eT (e) entre o segundo e ou primeiro eixo, encontrando estes tratamentos ao longo das variações assimilação líquida de CO₂, (A_L), concentração intercelular de CO₂ (Ci) e déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpV).

Em outra matriz de dados (Tabela 8B) contendo as variáveis: assimilação líquida de CO₂, (A_L), concentração intercelular de CO₂ (Ci), condutância estomática (gs), transpiração (E), razão Ci/Ca, déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpV), eficiência intrínseca do uso da água (EiUA, A/gs), eficiência do uso da água (EUA,

A/E), por amostra dos tratamentos eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT e aCO₂-eT aos 95 dap resultou num arranjo contendo 75% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 54% no primeiro eixo e 21 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Tabela 9B) mostra contribuição maior das variações eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), eficiência do uso da água (EUA) seguidos da assimilação líquida de CO₂, (A_L), C_i: concentração intercelular de CO₂ (μmol.mol⁻¹) no primeiro eixo e do déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpv) no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo (Figura 15B) mostra polarização entre as variáveis eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) e eficiência do uso da água (EUA) e entre a condutância estomática (g_s), transpiração (E), razão C_i/C_a, sendo as primeiras correlacionadas positivamente com o eixo e as segundas negativamente. A polarização observada no primeiro eixo provavelmente esta dada pelo efeito do eCO₂, sendo que a polarização positiva provavelmente decorre dos efeitos dos tratamentos eCO₂-eT (e) e eCO₂-eT (ea) e a polarização negativa esta dada provavelmente pelos tratamentos aCO₂-aT (a) e aCO₂-eT (ae).

Os escores de elementos amostrais encontram-se segregados no primeiro eixo da análise (Figura 15B) que possui maior contribuição das variáveis eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), eficiência do uso da água (EUA) seguidas de assimilação líquida de CO₂, (A_L), concentração intercelular de CO₂ (C_i). Observa-se maior segregação dos tratamentos eCO₂-aT (ea) e eCO₂-eT (ee) entre o primeiro e /ou segundo eixo, encontrando estes tratamentos ao longo das variações de eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), eficiência do uso da água (EUA), assimilação líquida de CO₂, (A_L), concentração intercelular de CO₂ (C_i), refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento. Também, se observa maior segregação dos tratamentos aCO₂-aT (a) e aCO₂-eT (ae) entre o primeiro e /ou segundo eixo, encontrando estes tratamentos ao longo das variações da condutância estomática (g_s), transpiração (E) e da razão C_i/C_a, refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento.

A disposição das variáveis no primeiro eixo (EiUA, EUA) mostra um posicionamento ortogonal com as variáveis déficit de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (dpV), pelo que não haveria efeito de um com o outro.

Figura 16A: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (assimilação líquida de CO_2 (A_L), respiração no escuro (Re), eficiência quântica de CO_2 (EQ), ponto de compensação de luz (PCL), ponto de saturação de luz (PSL)) aos 68 dap, os centróides para cada tratamento (a ; ae ; e ; ea). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são apresentados.

Figura 16B: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (assimilação líquida de CO_2 (A_L), respiração no escuro (Re), eficiência quântica de CO_2 (EQ), ponto de compensação de luz (PCL), ponto de saturação de luz (PSL)) aos 95 dap, os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são apresentados.

Na análise de componentes principais aplicada à matriz de correlação de dados (Tabela 10A) contendo as variáveis produto das curvas de luz: assimilação líquida de CO₂ (A_L), respiração no escuro (Re), eficiência quântica (EQ), ponto de compensação de luz (PCL), ponto de saturação de luz (PSL), por amostra dos tratamentos eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT e aCO₂-eT aos 68 dap resultaram num arranjo contendo 83% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo no primeiro eixo 43% e 40 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Tabela 11A) mostra contribuição maior das variações respiração no escuro (Re) e ponto de compensação de luz (PCL) no primeiro eixo e da assimilação líquida (A_L) seguida do ponto de saturação da luz (PSL) e da eficiência quântica (EQ) no segundo eixo.

Os escores de elementos amostrais encontram-se segregados no primeiro eixo da análise (Figura 16A) que possui maior contribuição das variáveis ponto de compensação de luz (PCL) e respiração no escuro (Re). Observa-se maior segregação do tratamento aCO₂-eT (ae) entre o primeiro e /ou segundo eixo, encontrando este tratamento ao longo das variações de variáveis ponto de compensação de luz (PCL) e respiração no escuro (Re), refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento. Os escores dos elementos amostrais segregados no segundo eixo possuem maior contribuição da assimilação de CO₂ (A_L). Observa-se maior segregação do tratamento eCO₂-eT (e) entre o segundo e /ou primeiro eixo, encontrando este tratamento ao longo das variações das variáveis taxa de assimilação de CO₂ (A_L) e ponto de saturação de luz (PSL), refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento.

Em outra matriz de correlação de dados (Tabela 10B) contendo as variáveis: assimilação líquida de CO₂ (A_L), respiração no escuro (Re), eficiência quântica de CO₂ (EQ), ponto de compensação de luz (PCL), ponto de saturação de luz (PSL), por amostra dos tratamentos eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT e aCO₂-eT aos 95 dap resultou num arranjo contendo 85% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 46% no primeiro eixo e 39 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Tabela 11B) mostra contribuição maior das variações assimilação líquida de CO₂ (A_L) e ponto de saturação de luz (PSL) no primeiro eixo e das variáveis respiração no escuro (Re) e ponto de saturação de luz (PCL) no segundo eixo.

Os escores de elementos amostrais encontram-se segregados no primeiro eixo da análise (Figura 16B) que possui maior contribuição das variáveis assimilação líquida de CO₂ (A_L) e ponto de saturação de luz (PSL). Observa-se maior segregação do tratamento

eCO₂.eT (e) entre o primeiro e /ou segundo eixo, encontrando este tratamento ao longo das variações de raiz assimilação líquida de CO₂ (A_L) e ponto de saturação de luz (PSL) e eficiência quântica do CO₂, refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento. Os escores dos elementos amostrais segregados no segundo eixo possuem maior contribuição da respiração no escuro (Re) e do ponto de compensação de luz (PCL). Observa-se uma maior segregação dos tratamentos aCO₂.eT (ae) e aCO₂.aT (a) entre o segundo e /ou primeiro eixo, encontrando este tratamento ao longo das variações de variáveis ponto de compensação luz (PCL), refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento.

Tabela 10: Valores das correlações entre as variáveis analisadas assimilação líquida de CO₂ (A_L), respiração no escuro (Re), eficiência quântica de CO₂ (EQ), ponto de compensação de luz (PCL), ponto de saturação de luz (PSL), aos (A) 68 dap e (B) 95 dap, calculadas conjuntamente para todos os tratamentos, interpretados seguindo a análise proposta por COHEN (1988) (ver materiais e métodos). P(<0,05).

A. 68 dap	Re	EQ	PCL	PSL
A _L	-0,0027	0,8066	-0,0969	0,4312
Re		-0,1061	0,9843	0,2948
EQ			-0,2434	0,2102
PCL				0,2691
PSL				

B. 95 dap	Re	EQ	PCL	PSL
A _L	-0,0598	0,3908	-0,6655	0,7500
Re		0,4530	0,7100	0,3827
EQ			0,0000	0,4345
PCL				-0,2104
PSL				

Tabela 11: Proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (componente principal CP1 e CP2,) gerados pelo análise de componentes principais dos parâmetros de trocas gasosas assimilação líquida de CO₂ (A_L), respiração no escuro (Re), eficiência quântica de CO₂ (EQ), ponto de compensação de luz (PCL), ponto de saturação de luz (PSL), aos 68 dap (A) e aos 95 dap (B). Valores dos coeficientes calculados para cada uma das variáveis incluídas na análise.

Componentes		
A. 68 dap	Primeiro	Segundo
A _L	-0,1902	0,6397
Re	0,6359	0,1896
EQ	-0,2942	0,5618
PCL	0,6607	0,1146
PSL	0,1907	0,4755

Componentes		
B. 95 dap	Primeiro	Segundo
A _L	0,6202	-0,1516
Re	0,0778	0,6907
EQ	0,3978	0,3554
PCL	-0,3622	0,5801
PSL	0,5655	0,1927

A análise de componentes principais aplicada à matriz de correlação de dados (Tabela 12A) contendo as variáveis correspondentes aos padrões de uso da luz e de nitrogênio: F_V/F_M, conteúdo total de clorofilas (Chl *a+b*), razão C/N_F e conteúdo de nitrogênio foliar (N_F), por amostra dos tratamentos eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT e aCO₂-eT aos 68 dap resultou num arranjo contendo 91% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 63% no primeiro eixo e 28 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Tabela 13A) mostra contribuição maior dos valores de N_F, razão F_V/F_M e Chl*a+b*, no primeiro eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra polarização entre as variáveis N_F, razão F_V/F_M e razão C/N_F, sendo as primeiras correlacionadas positivamente com o eixo e a segunda negativamente.

Os escores de elementos amostrais encontram-se segregados no primeiro eixo da análise (Figura 17A) que possui maior contribuição das variáveis N_F, razão F_V/F_M e razão C/N_F. Observa-se maior segregação dos tratamentos aCO₂-aT (a), eCO₂-eT (e), aCO₂-eT (ae), entre o primeiro e /ou segundo eixo, encontrando estes tratamentos ao longo das

variações de N_F , razão F_V/F_M e conteúdo de clorofilas $a+b$, refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento.

Foi observada polarização entre N_F e razão F_V/F_M com razão C/N_F provavelmente dada pelos efeitos do tratamento eCO_2 -aT (ea). O efeito do tratamento eCO_2 -aT (ea) esta associado a maiores valores de razão C/N_F , sendo que os valores de razão C/N_F aumentam neste tratamento e diminuem no aCO_2 -aT (a) e no aCO_2 -eT (ae).

Os resultados com contribuição balanceada de todas as variáveis estão representados no centro do biplot.

Em outra matriz de dados (Tabela 12B) contendo as variáveis: F_V/F_M , conteúdo total de clorofilas (Chl $a+b$), razão C/N_F e conteúdo de nitrogênio foliar (N_F), por amostra dos tratamentos eCO_2 -aT, eCO_2 -eT, aCO_2 -aT e aCO_2 -eT aos 95 dap resultou num arranjo contendo 90% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 64% no primeiro eixo e 26 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Tabela 13B) mostra contribuição maior da variação razão C/N no primeiro eixo e da variável conteúdo de Chl $a+b$ no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo (Figura 15B) mostra polarização entre as variáveis: razão C/N_F com conteúdo de nitrogênio foliar (N_F) e razão F_V/F_M sendo a primeira correlacionada positivamente com o eixo e a segunda negativamente.

Os escores de elementos amostrais encontram-se segregados no primeiro eixo da análise (Figura 17B) que possui maior contribuição da variável razão C/N . Observa-se maior segregação do tratamento eCO_2 -aT (ea) entre o primeiro e/ou segundo eixo, encontrando este tratamento ao longo das variações da razão C/N_F , refletindo a contribuição dessas variações na resposta obtida no presente experimento.

Foi observada polarização entre razão C/N_F e conteúdo de nitrogênio foliar provavelmente dada pelos efeitos do tratamento eCO_2 -aT (ea). Os efeitos dos tratamentos aCO_2 -eT (ae) estão associados a maiores valores de N_F , sendo que os valores de N_F aumentam nestes tratamentos e diminuem no eCO_2 -aT (ea).

Os resultados com contribuição balanceada de todas as variáveis estão representados no centro do biplot.

Figura 17A: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (F_v/F_m , conteúdo total de clorofilas (Chl $a+b$), razão C/N foliar (C/N_F) e conteúdo de nitrogênio foliar (N_F)) aos 68 dap, os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são apresentados

Figura 17B: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (F_v/F_m , conteúdo total de clorofilas ($Chl\ a+b$), razão C/N foliar (C/N_f) e conteúdo de nitrogênio foliar (N_f)) aos 95 dap, os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais (componente 1 e 2). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são apresentados

Tabela 12: Valores das correlações entre as variáveis analisadas F_v/F_m , conteúdo total de clorofilas (Chl $a+b$), razão C/N_F e conteúdo de nitrogênio foliar (N_F), aos (A) 68 dap e (B) 95 dap, calculadas conjuntamente para todos os tratamentos, interpretados seguindo a análise proposta por Cohen (1988) (ver materiais e métodos). $P(<0,05)$.

A. 68 dap	C/N_F	N_F	Chl $a+b$
F_v/F_m	-0,4138	0,4391	0,6728
C/N_F		-0,9554	-0,2610
N_F			0,2899
Chl $a+b$			

B. 95 dap	C/N_F	N_F	Chl $a+b$
F_v/F_m	-0,7412	0,6479	0,0833
C/N_F		-0,9393	0,1439
N_F			-0,1854
Chl $a+b$			

Tabela 13: Proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (componente principal CP1 e CP2,) gerados pelo análise de componentes principais dos parâmetros F_v/F_m , conteúdo total de clorofilas (Chl $a+b$), razão C/N e conteúdo de nitrogênio foliar (N), aos 68 dap (A) e aos 95 dap (B). Valores dos coeficientes calculados para cada das variáveis incluídas na análise.

A. 68 dap	Componentes	
	Primeiro	Segundo
F_v/F_m	0,4829	0,4626
C/N_F	-0,5430	0,4534
N_F	0,5527	-0,4253
Chl $a+b$	0,4080	0,6321

B. 95 dap	Componentes	
	Primeiro	Segundo
F_v/F_m	-0,5236	0,2906
C/N_F	0,6073	0,0162
N_F	-0,5895	-0,0841
Chl $a+b$	0,0973	0,9530

2.5 DISCUSSÃO.

A intensidade das respostas de crescimento é determinada pelas condições ambientais e experimentais. Experimentos desenvolvidos em regiões temperadas durante diferentes estações do ano (períodos meteorológicos) apresentam respostas diferenciadas em intensidade mantendo-se, no entanto, o padrão geral do desenvolvimento da espécie nos dois períodos. Dias longos e uma maior irradiação favorecem o maior crescimento, porém menores temperaturas, especialmente em noites frias, levam a menor mobilização noturna de amido (LEAKEY *et al.*, 2009a), com o que se afeta, entre outros, a razão fonte-dreno nas plantas. Na presente pesquisa, a partir dos resultados obtidos do monitoramento da temperatura e da umidade relativa dentro das câmaras do topo aberto, ao longo do período experimental, é possível conferir que o outono em São Paulo é uma estação sem temperaturas extremas, com temperaturas noturnas amenas superiores às observadas em primavera (entre 13 e 18°C) (Apêndice 1) e com irradiação favorecida por uma menor presença de nuvens comparada com a primavera e verão.

A fase de germinação termina com a protrusão da radícula e na fase de pós-germinação, o crescimento da plântula está determinado pela mobilização destas reservas (BEWLEY, 1997). A fase inicial de crescimento nas plântulas de jatobá tem sido alvo de interesse em diversas pesquisas há mais de 10 anos. Já foram descritos processos de grande importância que ocorrem durante a fase de germinação e pós-germinação como são os a mobilização inicial da série rafínósica, a função de reserva dos xiloglucanos nestas sementes e sua mobilização (TINÉ *et al.*, 2000), e como os fatores ambientais que controlam este processo (SANTOS *et al.*, 2004a; SANTOS E BUCKERIDGE, 2004b). Por estes últimos autores foi evidenciado que maior razão vermelho-vermelho distante favorece a expansão foliar dos eófilos, que por sua vez favorece maior produção de auxinas com o que é promovida a degradação de xiloglucano, o que reflete um crescimento maior das plântulas.

Na presente pesquisa, a partir do acompanhamento dos parâmetros de crescimento: altura, área foliar e número de folhas durante 240 dias, foram identificados dois momentos do estabelecimento das plantas juvenis: 1. o crescimento com comportamento linear, correlacionado com a mobilização de reservas, e 2. a estabilização do crescimento, correlacionado com o esgotamento destas reservas. Nas condições de crescimento estabelecidas nesta pesquisa, a fase linear tem uma duração de ao redor de 85 dap e durante ela ocorrem as fases de germinação e pós-germinação.

As três fases de desenvolvimento no crescimento inicial de jatobá propostas por SANTOS E BUCKERIDGE (2004b) (heterotrofia, heterotrofia-autotrofia e autotrofia) acontecem durante o crescimento linear. Os autores correlacionaram a fase autotrófica com a senescência dos cotilédones e o estabelecimento da fotossíntese, por volta dos 45 dap. A estabilização do crescimento ocorre por volta dos 85 dap, sendo que boa parte do início da fase autotrófica acontece durante o crescimento linear. Assim, foi considerado que as plântulas de jatobá armazenam compostos de reserva durante a mobilização de XG, que seria uma reserva que as plântulas de jatobá usam durante o estabelecimento da autotrofia. Sobre o uso dos recursos, as folhas de plantas de sucessão secundária tardia investem o nitrogênio primeiro no estabelecimento do sistema captador de luz e depois em RUBISCO e demais componentes que levem ao amadurecimento do sistema de assimilação (DE SOUZA, 1996). Esta estratégia é justificada no fato de que no sub-bosque, local de estabelecimento natural das plântulas de jatobá, as intensidades luminosas são muito baixas (de até 1 % da irradiância plena), sendo que um desenvolvimento do sistema fotossintetizante seria de pouca vantagem para esses ambientes. O uso de compostos de reserva pode ser uma importante estratégia de administração de recursos de plantas de jatobá, com o que é garantido o crescimento das plântulas até o amadurecimento de seu sistema de assimilação de CO₂ e que as folhas completamente expandidas sejam autotróficas propriamente ditas.

DENSLOW (1980) salientou que a germinação e o estabelecimento são fases fundamentais sendo que a maior taxa de mortalidade ocorre nesta fase. Em jatobá, outro fator a destacar na fase linear de crescimento é que nela acontece a determinação do padrão de crescimento das plantas juvenis observado durante o tempo de avaliação deste experimento (240 dias). Desta maneira, as concentrações de CO₂ e o regime de temperatura atuam durante a fase de pós-germinação e de estabelecimento inicial das plantas de jatobá, gerando padrões diferenciados de crescimento (Figura 10) e de fotossíntese. O tratamento com maior crescimento foi eCO₂-eT, seguido de eCO₂-aT, aCO₂-eT e por último do controle (Figuras 11 e 12), sendo confirmado este padrão pelas taxas de crescimento relativo dos 69 dias de crescimento das plantas nas câmaras de topo aberto (Tabela 2).

Nesta pesquisa foi evidenciado que as plantas dos tratamentos com maior temperatura tiveram um maior investimento em área foliar, o que coincide com a sugestão de SANTOS e BUCKERIDGE (2004b), que a temperatura seria um fator importante na

fase de pós-germinação, especificamente na mobilização de XG. Uma maior área foliar total pode significar, na fase de pós-germinação, a mobilização mais rápida deste carboidrato de reserva com o que as plântulas ficam maiores mais rapidamente. Isto leva a um ciclo virtuoso, já que quanto maiores as plantas, maior é a possibilidade de estas crescerem ainda mais. Em plântulas de jatobá, após sua germinação e emergência dos eófilos (de 30 a 50 dias após a embebição das sementes, dap), o XG se torna a principal fonte de carbono sendo que os produtos de sua degradação são direcionados principalmente para a expansão dos eófilos e do primeiro metafile (SANTOS, 2002; SANTOS *et al.*, 2004a). Assim, plantas de jatobá sem cotilédones, apresentam uma diminuição de 77% de área foliar total, o que prejudica seu desempenho especialmente no sub-bosque. BLACKMANN (1919) propôs a lei de juros compostos para plantas (do inglês, *compound interest law*), pela que pequenas mudanças no investimento das plantas em folhas significam mudanças em taxas de assimilação que, com o tempo, representam um crescimento mais rápido e maior, o que determinaria as diferenças entre os tratamentos observadas na presente pesquisa. Nesse sentido, foi observado também que a área foliar total do tratamento eCO₂-aT aumentou muito pouco dos 68 para os 95 dap.

Sobre as respostas dos tratamentos nos parâmetros avaliados, foram encontradas respostas diferenciadas de acordo com o momento da fase de desenvolvimento estudada. Aos 68 dap foram observadas diferenças significativas na biomassa, na altura e na razão C/N_F. Já aos 95 dias foram observadas diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados.

Os tratamentos com eCO₂ apresentam maiores valores de razão C/N_C. O tratamento eCO₂-aT foi aquele com maiores valores de razão C/N_F e menor conteúdo de nitrogênio foliar. Esta resposta reflete uma regulação negativa do eCO₂ devido à diminuição no investimento de proteínas relacionadas ao aparato fotossintético, que pode ser modulado pelos altos níveis foliares de carboidratos (DRAKE *et al.*, 1997; POORTER *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 1999; SAGE, 2002; LONG, 2004). MOORE *et al.*, (1999) propõem que a aclimação de folhas maduras às elevadas concentrações de CO₂ pode ser um mecanismo de otimização do uso de nitrogênio na planta como um todo, sendo que o nitrogênio de folhas fonte é redistribuído para os tecidos dreno.

A porcentagem de mudança nestes parâmetros do tratamento eCO₂-eT (razão C/N e N_F) é bem menos pronunciada do que a observada no tratamento eCO₂-aT, presumivelmente pela maior força do dreno, a qual leva as plantas a transpirem mais,

absorverem mais nutrientes e por conseguinte a crescerem mais. O tratamento aCO₂-eT apresentou os maiores valores de nitrogênio foliar. Com maior conteúdo de N_F, as plântulas apresentam maior biossíntese de proteínas e de ácidos nucleicos, requeridos para os processos de divisão celular. Em contrapartida, as elevadas concentrações de CO₂ promovem a produção de mais esqueletos de carbono pelas plântulas para os processos metabólicos estimulados pela temperatura mais alta.

O padrão de alocação de biomassa muda de acordo à ontogenia. Segundo a teoria do equilíbrio funcional de BROWNER (1962), as mudanças nos padrões de alocação de biomassa tendem sempre a otimizar as taxas de obtenção de um recurso. Na fase linear de crescimento, as plantas de jatobá priorizam a alocação nas folhas sobre a alocação no caule e por último nas raízes (SANTOS & BUCKERIDGE, 2004a). As plântulas investem preferencialmente em biomassa no estabelecimento do sistema captador de luz e do sistema fotossintetizante, necessário para atingir a autotrofia. Na presente pesquisa não foi evidente que os fatores avaliados (CO₂ e T) influenciem tal comportamento. No entanto, no tratamento eCO₂-eT foi observada uma pequena mudança do padrão de alocação dos 68 dap para os 95 dap, com diminuição do investimento em folhas para um aumento em raízes, sem detrimento da biomassa acumulada no caule. A mudança de alocação de biomassa pode estar relacionada ao tamanho das plantas, já que este foi o tratamento em que as plantas mais cresceram, como evidenciado no valor das taxas de crescimento relativo (Tabela 2). No caso do tratamento com eCO₂-aT a mudança nos padrões de alocação não foi observada, mantendo-se basicamente o mesmo padrão de alocação de biomassa dos 68 dap para os 95 dap.

Sobre as análises de componentes principais, (ACP), foi feita a primeira abordagem com todos os dados de crescimento e alocação, aos 68 dap e aos 95 dap, e observado que as dispersões observadas nas análise de componentes principais foram determinadas pelo momento da fase de desenvolvimento, não pelos tratamentos (dados não apresentados).

As ACP de crescimento e alocação de biomassa amostram que aos 68 dap o tratamento eCO₂-aT (ea) e aCO₂-eT (ae) geram uma tendência de maior razão R-PA, sendo que as diferenças não foram identificadas pela análise posterior. Considerando que a razão R-PA é composta pelas frações de cada órgão, a variação observada do tratamento eCO₂-aT (ea) produz grande dispersão dos valores de R-PA e Fr, sendo que este último parâmetro seria responsável pelas respostas da razão R-PA. De outro lado, a Ff aumenta com aCO₂-aT (a). As condições eCO₂-aT (ea) seriam as responsáveis pela diferença nos

parâmetros de alocação de biomassa aos 68 dap, no que as plântulas do tratamento referido investiram mais em raiz, comparado com os outros tratamentos. Aos 95 dap foi evidenciado que as condições de eCO₂-eT favoreceram a área foliar total, simultaneamente favorecendo a biomassa, a altura e a fração caule nas plantas de jatobá, por conseguinte o crescimento geral das plantas, como foi evidenciado também com o Test de Tukey, nas análise *post-hoc*.

Com relação às trocas gasosas em plantas juvenis de jatobá não foram observadas diferenças significativas nas taxas de assimilação líquida de CO₂ nos períodos e nos tratamentos avaliados, exceto no tratamento controle (Tabela 7). Embora a folha tenha atingido sua expansão total, CAI *et al.*, (2005) observaram existência de folhas de enverdecimento tardio das espécies de sucessão ecológica secundária tardia, uma vez as folhas tenham atingido a expansão total, é necessário mais tempo para que o aparelho fotossintetizante se desenvolva completamente. As taxas de assimilação de CO₂ máximas nessas espécies foram atingidas entre 10 e 15 dias depois de atingida a expansão foliar total. Na presente pesquisa, foram observadas menores taxas de assimilação líquida do tratamento controle aos 68 dap. Assim, é possível que os fatores CO₂ e temperatura favoreçam um estabelecimento mais rápido do sistema fotossintetizante nas primeiras folhas completamente expandidas de jatobá.

Comparando as respostas dos tratamentos crescidos em eCO₂ com o controle, se apresentou um aumento nas taxas de assimilação de CO₂, sendo maior na fase linear de crescimento (68 dap) (+100% em aT e +119% em eT), do que na fase de estabilização (+16% sob qualquer regime de temperaturas) (Tabela 7).

As diferenças nas taxas de assimilação entre os tratamentos também podem estar correlacionadas ao aumento da concentração interna de CO₂ (C_i) e com a diminuição na condutância estomática. Os baixos valores de condutância estomática encontrados ao longo do experimento em jatobá são típicos para espécies classificadas como secundárias tardias no processo de sucessão (OBERBAUER E STRAIN, 1984; RIDDOCH *et al.*, 1991b; TURNBULL, 1991; WALTERS *et al.* 1993). Com o acompanhamento dos valores da razão C_i/C_a durante o experimento, verifica-se que os valores das taxas de assimilação não foram influenciadas pela alteração da condutância estomática. Nesta pesquisa, houve diminuição da condutância estomática correlacionada à diminuição no índice estomático só no tratamento com eCO₂-aT (HAMACHI, 2009). Como foi evidenciado por LAKE *et al* (2001) as folhas maduras de plantas de *Arabidopsis* reconhecem as mudanças na

concentrações de CO₂ e conduzem as repostas das folhas novas sobre índice estomático. A diminuição no índice estomático (HAMACHI, 2009; COSTA, 2004; MACHADO, 2007) produziria também uma redução nas taxas de transpiração, o que favorece a eficiência do uso da água dos tratamentos com eCO₂, como foi evidenciado também para jatobá por AIDAR *et al* (2002) e GODOY (2007), e por OLIVEIRA (2006) em outras espécies. Neste experimento (Tabela 7), as respostas na condutância estomática também foram observadas e independentes do regime de temperatura e da fase de desenvolvimento durante o qual as plantas foram avaliadas.

Os resultados obtidos das análise de componentes principais apresentam sendo a eficiência no uso da água e a eficiência intrínseca do uso da água como os fatores com maior contribuição das variações, correlacionadas estas ao tratamento com eCO₂-aT nos dois períodos avaliados. Este comportamento também está vinculado à diminuição da condutância estomática, e por sua vez às menores taxas de transpiração neste tratamento. Em contrapartida, o tratamento com eCO₂-eT é segregado ao longo das variações de taxas de assimilação de CO₂ (A) e da concentração intercelular de CO₂ (Ci), em ambos os períodos estudados. Nesse aspecto, nas análises dos componentes principais há segregação diferenciada dos tratamentos com eCO₂ nas taxas de assimilação de CO₂, o que não é possível identificar nas análise *post-hoc*, teste de Tukey ($P \leq 0,05$), nas quais os tratamentos com eCO₂ não apresentam diferenças significativas. A maior contribuição das variações da condutância estomática e de transpiração está correlacionada ao tratamento aCO₂-eT, sendo que nas análise *post-hoc* estes parâmetros apresentaram diferenças significativas ao tratamento.

Sobre as respostas fotossintéticas à luz, foram observadas maiores taxas de assimilação líquida (A_L) nos tratamentos com eCO₂, também correlacionados às respostas acima descritas (Tabela 8). Embora a respiração no escuro, obtida através das curvas de luz, seja uma fração da respiração noturna (TAIZ *et al.*, 2009), esta é usada por alguns autores como um indicador diurno do metabolismo das plantas (AINSWORTH *et al.*, 2006; LEAKEY *et al* 2009b). Na presente pesquisa, dos 68 para os 95 dap é observado aumento nas taxas de respiração no escuro em todos os tratamentos, sendo maior no tratamento com eCO₂-eT, o que coincide com as respostas de crescimento do tratamento. As taxas de respiração dependem do status de carboidratos e refletem as taxas metabólicas das plantas dos tratamentos avaliados, sendo que o metabolismo é favorecido com maior temperatura de crescimento (LAMBERS *et al.*, 2008).

Os valores de eficiência quântica (EQ) observados (Tabela 8) foram menores no tratamento com aCO₂-eT do que os apresentados nos tratamentos com eCO₂. Estes últimos apresentaram os maiores valores de EQ, o que coincide com as previsões de LONG (1991a), segundo as quais plantas C₃ responderiam às eCO₂ e ao eT com aumento na eficiência quântica.

O PCL aos 68 dap é maior e apresenta diferenças significativas nos tratamentos com eT. Para aos 95 dap o PCL aumentou, mas não houve diferenças significativas entre os tratamentos. A resposta do PCL é determinada pela resposta da Re e da eficiência quântica de CO₂ ($PCL = R_e/\Phi$). Assim, considerando que a eficiência quântica de CO₂ manteve o mesmo padrão aos 68 dap e aos 95 dap entre os tratamentos, o aumento na Re, dos 68 dap para os 95 dap, seria o fator que responsável por este comportamento do PCL.

O PSL reflete os níveis de fluxo fotônico máximo aos quais foram expostas as folhas durante seu desenvolvimento. Após do PSL as enzimas do Ciclo de Calvin são incapazes de acompanhar o fluxo de compostos redutores (ATP e NADPH) produzidos pelo processo de captura de luz (TAIZ *et al.*, 2009). Nesta pesquisa, o ponto de saturação da luz aos 68 dap foi maior nos tratamentos com eCO₂-eT (30%), com eCO₂-aT (11%), e com aCO₂-eT (2,5%) comparados com o controle. Aos 95 dap, o PSL aumentou em relação ao primeiro período e manteve o padrão de diferença em comparação com o tratamento controle (+51%, +24% e +8%, eCO₂-eT, eCO₂-aT e aCO₂-eT respectivamente).

No que tange aos resultados de análise dos componentes principais nas respostas fotossintéticas à luz, a respiração no escuro e o ponto de compensação de luz são os fatores com maior contribuição das variações, sendo que o tratamento aCO₂-eT estaria mais segregado ao longo destas variações. Por outro lado, a segregação do tratamento eCO₂-eT ocorre ao longo das variações das taxas de assimilação líquida de CO₂, em ambos os períodos. O comportamento das taxas de assimilação de CO₂ observado nas curvas de luz coincide com o observado nas ACP a partir dos resultados de trocas gasosas.

No que concerne às respostas da taxa de assimilação de CO₂ à temperatura, foi observado aumento na temperatura ótima (temperatura na que as taxas de assimilação são máximas) de 5 °C comparado com os tratamentos a CO₂ ambiente (Figura 14). O aumento em concentração atmosférica de CO₂ produz progressão na assimilação de saturação com a temperatura, em 5°C a 650 ppm (LONG, 1991b). Este pesquisador considerou as elevadas concentrações de CO₂ não apenas como um fator que aumenta as taxas de assimilação, mas também que modifica a resposta da temperatura. Segundo sua modelagem, a interação

entre a concentração de CO₂ e a temperatura produz aumento na temperatura ótima, assim como uma mudança na direção do aumento em plantas C₃. Portanto, sob baixa temperatura foliar o aumento nas taxas de assimilação de CO₂ é baixo, e sob elevada temperatura foliar, o aumento nas taxas de assimilação é maior, padrão que coincide com o comportamento observado nesta pesquisa.

Os valores obtidos da eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) permitem excluir a possibilidade de fotoinibição nas plantas durante seu crescimento nos tratamentos avaliados. Ao contrário, houve inclusive um aumento neste parâmetro com a elevação da temperatura. Isto contrasta com o fato de que alguns autores encontraram níveis relativamente baixos da eficiência quântica do PSII em folhas de espécies clímax, como foi descrito por RIBEIRO *et al* (2005) e OLIVEIRA (2006). Dentre os tratamentos avaliados neste trabalho foi o tratamento com eCO₂-aT o que apresentou os menores valores nos dois períodos avaliados. Estes valores também podem estar correlacionados ao baixo conteúdo de clorofilas *a+b* encontradas no tratamento.

Sabe-se que as espécies de estádios tardios de sucessão e tolerantes ao sombreamento possuem baixa habilidade de aumentar sua capacidade de utilização de altas densidades de fluxo de fótons. Estas espécies possuem menor capacidade de fixação de CO₂, ao menos em parte, devido ao conteúdo baixo de RUBISCO. A redução no conteúdo de proteína seria um importante mecanismo de economia do nitrogênio disponível, já que seria investido em complexos captadores de luz (BJORKMANN e DEMMIG, 1987). A adaptação fotossintética à sombra envolve redução no nível de outras enzimas do ciclo de Calvin e de componentes da cadeia de transporte de elétrons, contribuindo para a redução da capacidade fotossintética ou pelo menos ao estabelecimento mais lento do amadurecimento do sistema fotossintetizante em espécies clímax, como foi proposto por CAI *et al* (2005) e DE SOUZA (1996).

Os valores de clorofila *a+b* observados nos tratamentos estudados aumentaram dos 68 para os 95 dap. No tratamento eCO₂-aT foram observados menores valores de clorofila *a+b* assim como menor conteúdo de nitrogênio foliar. Estas observações coincidem com MOORE *et al.*, (1998), nas que além da diminuição própria da aclimação às eCO₂, foi observado que o conteúdo de clorofilas frequentemente diminui em condições de eCO₂. Mesmo que os estudos o tenham encontrado em folhas de enverdecimento tardio que atingiram a completa expansão, o conteúdo de clorofilas continuou aumentando até chegarem ao ponto de equilíbrio nas folhas amadurecidas (CAI *et al.*, 2005; CZECH *et al.*,

2009) e o conteúdo de clorofilas no tratamento apenas com eCO₂ é sempre o menor de todos os tratamentos avaliados.

Referente aos resultados de análise de componentes principais nas respostas de padrões de uso da luz, a maior contribuição para a segregação é das variáveis N_F, razão F_V/F_M e razão C/N_F, encontrando se todos os tratamentos exceto eCO₂-aT segregados ao longo das variações. Este tratamento permanece mais segregado ao longo das variações da razão C/N_F. Seus resultados sugerem que são as variações do conteúdo de nitrogênio foliar sejam o fator que determina a razão C/N_F, as respostas da eficiência quântica do fotossistema II e do conteúdo de clorofilas totais.

Levando em consideração a importância do metabolismo de carboidratos não estruturais e sua participação nas respostas de crescimento alocação de biomassa e de trocas gasosas, nas duas fases de desenvolvimento identificadas nesta pesquisa, é provável que o status destes carboidratos esteja envolvidos nas respostas do conteúdo de nitrogênio, o que determinaria as respostas nas outras variáveis estudadas.

Um aumento em área foliar, durante o processo de pós-germinação, levaria a um aumento na produção de auxinas, que influenciam os processo de degradação dos xiloglucanos e de expansão da parede celular, este último aliado as giberelinas.

O melhor balanço do metabolismo de carboidratos aliado ao de nitrogênio, uma alta razão fonte dreno apresentada nos tratamentos com eT, especialmente no tratamento eCO₂-eT, seriam as condições ideais que favorecem as respostas de crescimento das plantas juvenis de jatobá. Estes aspectos serão abordados no capítulo 2.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, E.A., DAVEY, P.A., BERNACCHI, C.J., DERMODY, O.C., HEATON, E.A., MORGAN, P.B., NAIDU, S.L., YOO RA, H-S., ZHU, X-G., CURTIS, P.S., LONG, S.P. 2002. A meta analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change biology* **8**: 695-709
- AINSWORTH, E.A. e LONG, S.P. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* **165**: 351-372
- AINSWORTH, ELIZABETH A, ROGERS, ALISTAIR., VODKIN, LILA O, WALTER, ACHIM AND SCHURR, ULRICH. 2006. The Effects of Elevated CO₂ Concentration on Soybean Gene Expression. An Analysis of Growing and Mature Leaves. *Plant Physiology* **142**: 135-147
- AIDAR, M.P.M., MARTINEZ, C.A., COSTA, A.C., COSTA, P.M.F., DIETRICH, S.M.C. e BUCKERIDGE, M.S. 2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá (*Hymenaea courbaril* L.-Leguminosae-Caesalpinioideae). *Biota Neotropica* **2** (1). (<http://www.biotaneotropica.org.br>)
- AL-KHATIB, K. e G. M. PAULSEN. 1999. High-temperature effects on photosynthetic processes in temperate and tropical cereals. *Crop Science* **39**: 119-125.
- BAZZAZ, F. A. 1984. Dynamics of wet tropical forests and their species strategies. P. 233-243. In E. Medina, H. A. Mooney, e C. Vásquez-Yanes (eds.). Physiological ecology of plants of the wet tropics. Dr W. Junk, The Hague.
- BERNACCHI, C.J., MORGAN, P.B., ORT, D.R., LONG, S.P. 2005. The growth of soybean under free air [CO₂] enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing in vivo RUBISCO capacity. *Planta* **220**: 434-44
- BERRY J., BJÖRKMAN, O., 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **31** 491-543.

- BEWLEY, J. D. 1997. Seed germination and plant dormancy. *Plant Cell* **9**: 1055-1066
- BJÖRKMAN O e B DEMMING. 1987 Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504.
- BLACKMAN, V.H. 1919. The compound interest law and plant growth. *Annals of Botany* **33**: 353–360.
- BRANDÃO, A. D., DEL BEM, L. E. V., VINCENTZ, M., BUCKERIDGE, M. S. B. 2009. Expression pattern of four storage xyloglucan mobilization-related genes during seedling development of the rain forest tree *Hymenaea courbaril* L. *Jornal of Experimental Botany* **60**: 1191-1206
- BROWNER R. 1962. Distribution of dry matter in the plant. *Netherlands Journal of Agricultural Sciences* **10** 399-408
- BUCHANAN, B.B., W. E GRUÍSSEM, R. JONES. 2001. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. ASPP. 650 pp
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P. e TINÉ, M.A.S. 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology & Biochemistry* **38**: 141-156.
- BUCKERIDGE, M. S., L. MORTARI, M. MACHADO. 2007. Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema? En: Fenologia: ferramenta para conservação, melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos [recurso eletrônico / editores técnicos, Gizelda Maia Rego.[et al.]. – Dados eletrônicos. Colombo : Embrapa Florestas.
- BUCKERIDGE, M. S., AIDAR, M. P. M., MARTINEZ, C. SILVA, E. 2008a. Respostas de plantas às mudanças climáticas globais. Em: Buckeridge, M. S. (Ed) Biologia e Mudanças climáticas no Brasil. Ed. Rima. São Carlos, pp. 295
- BUCKERIDGE, M. S., TINÉ, M. A., MINHOTO, M. J., DE LIMA, D. U. 2008b. Respiração. Em: Kerbaui B., G. (Ed) Fisiologia Vegetal. Segunda Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp. 431.

- CAI, Z-Q., SLOT, M., FAN, Z-X. 2005. Leaf development and photosynthetic properties of three tropical tree species with delayed greening. *Photosynthetica* **43**: 91-98
- CANHAM C. 1989. Different responses to gaps among shade-tolerant tree species. *Ecology* **70**: 548-550
- COHEN J. 1988. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale: Erlbaum.
- COSTA, P. 2004. Efeitos da alta concentração de CO₂ sobre o crescimento e o estabelecimento de plântulas do jatobá de mata *Hymenaea courbaril* L. Var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Langenheim (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). Tese de Mestrado. UNICAMP. Campinas, Brasil
- COSGROVE, D.J. 1997. Relaxation in a high-stress environment: The molecular basis of extensible walls and cell enlargement. *Plant Cell* **9**:1031-1041
- CZECH, A., STRZATKA, K. SCHURR, U. MATSUBARA, S. 2009. Developmental stages of delayed-greening leaves inferred from measurements of chlorophyll content and leaf growth. *Functional Plant Biology* **36**: 654-664
- DENSLOW, J. S. 1980. Gap partitioning among tropical rainforest trees. *Biotropica* **12**: 47-55.
- DRAKE, B. G., GONZÁLEZ-MEIER, M. A., LONG S. P. 1997. More efficient plants: A Consequence of Rising Atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* **48**: 609-639
- DRUART, N., M. RODRÍGUEZ-BUEY, G. BARRON-GAFFORD, A. SJÖDIN, R. BHALERAO Y V. HURRY. 2006. Molecular targets of elevated [CO₂] in leaves and stem of *Populus deltoides*: implications for future tree growth and carbon sequestration. *Functional Plant Biology* **33**: 121-131.
- DE SOUZA P., ROGÉRIA. 1996. Germinação, crescimento, atividade fotossintética e translocação de compostos de carbono em espécies arbóreas tropicais: estudo comparativo e influencia de sombreamiento natural. Tese (Doutorado). UNICAMP. SP, Brasil

- FLORES, E. M. e BENAVIDEZ, C. E. 1990. Germinación y morfología de la plántula de *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinaceae). *Rev. Biol. Trop.* **38**: 91:98.
- GANDOLFI, S., LEITÃO FILHO, H. F. & BEZERRA, C. L. F. 1995. Levantamento florístico e caráter sucessional das espécies arbustivo-arbóreas de uma Floresta Mesófila Semidecídua no município de Guarulhos. *Revista Brasileira de Biologia* **55**: 753-767.
- GARNIER, E. 1992. Growth analysis of congeneric annual and perennial grass species. *Journal of Ecology* **80**: 665–675.
- GARWOOD, N. C. 1995. Functional morphology of tropical tree seedlings. In Swaine, M. D., Alexander, I. J. e Hadley, M. (Eds). *The ecology of tropical forest tree seedlings*. Paris: UNESCO and Carnforth, UK: Parthenon.
- GATSUK *et al.* 1980. Age states of plants of various growth forms: a review. *Journal of Ecology* **68**: 675-696
- GODOY, J. 2007. Ecofisiologia do estabelecimento de leguminosas arbóreas da Mata Atlântica, pertencentes a diferentes grupos funcionais, sob atmosfera enriquecida com CO₂: uma abordagem sucessional. Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 114 p.
- GOULD, K. S. KUHN, D. N. LEE D. W. OBERBAUER S. F. 1995. Why leaves are sometimes red? *Nature* **378**: 241-242
- GRIFFIN, K. L. *et al.* 2001. Plant growth in elevated CO₂ alters mitochondrial number and chloroplast fine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2473-2478
- HALL, A. E. 2001. Crop Responses to Environment. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- HAMACHI, L., BUCKERIDGE, M. S. 2009. Efeito das elevadas concentrações de CO₂ no índice estomático de diferentes espécies de Leguminosas. Trabalho de iniciação científica. IB-USP.
- HAVAUX M. 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **3**: 147–151.

- HUNT R. 1987. Plant Growth Curves. The Functional Approach to Plant Growth Analysis. E. Arnold, London.
- IPCC WG I, 2007. Resumen técnico. Grupo intergovernamental de expertos sobre as mudanças climáticas. Grupo de trabajo (WG) I.
- JIFON, J.L. e WOLFE, D.W. 2002. Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ in *Phaseolus Vulgaris* L. is altered by growth response to nitrogen supply. *Global Change Biology* **8**: 1018-1027
- JORDAN, D., e OGREN, W. 1984. The CO₂/O₂ specificity of ribulose 1,5-biphosphate carboxilaxe/oxigenase. *Planta* **161**:308-313
- KITAJIMA, M., BUTLER, W. L. 1975 Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochem Biophy Acta* **376**:105-115
- KATAJIMA, K. 1994. Relative importance of photossynthetic traits and allocation patthens as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia* **113**: 53-66.
- KÖRNER C., R. ASSHOFF, O. BIGNUCOLO, S. HÄTTENSCHWILER, S.G. KEEL, S. PELÁEZ-RIEDL, S. PEPIN, R.T.W. SIEGWOLF Y G. ZOTZ. 2005. Carbon Flux and Growth in Mature Deciduous Forest Trees Exposed to Elevated CO₂. *Science* **309**: 1360-1362
- KRUSE J., I. HETZGER, C. MAI, A. POLLE Y H. RENNENBERG. 2003. Elevated pCO₂ affects N metabolism of young poplar plants (*Populus tremolo* XP. alba) differently at deficient and sufficient N-supply. *New Phytologist* **157**: 65–81.
- KURSAR, T.A. e COLEY, P. D. 1992. Delayed greening in tropical leaves: An anti-herbivore defense? *Biotropica* 24: 256-262.
- LEA, P. J., R. C. LEEGOOD. 1999. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Chichester, UK: Wiley.

- LEEGOOD R. C. 1993. Carbon dioxide-concentrate mechanisms. In: Lea PJ, Leegood RC (Eds). *Plant Biochemistry and molecular biology*, 1st Ed. New York: John Wiley & Sons. 1993, p 47 -72.
- LAKE, J. A., W. P. QUICK, D. J. BEERLING Y F. I. WOODWARD. 2001. Signals from mature to new leaves. *Nature* **411**: 154-155
- LAKE, J. A., F. I. WOODWARD Y W. P. QUICK. 2002. Long distance CO₂ signalling in plantas. *Journal of Experimental Botany* **53**: 183-193
- LAMBERS, H. CHAPIN, F. PONS T. 2008. *Plant Physiological Ecology*. Springer Verlag. Estados Unidos de América.
- LANGENHEIM, J. H. , LEE, Y. e MARTINS, S.S. 1973. An evolutionary and ecological perspective of Amazonian *Hylaea* species of *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Acta amazonica* **3**: 5-38
- LEAKEY, A. D. B., E. A. AINSWORTH, C. J. BERNACCHI, A. ROGERS. S. LONG Y D. R. ORT. 2009a. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**, pp. 2859-2876
- LEAKEY, A. D. B., XU, F., GILLESPIE, K., MCGRATH, J., AINSWORTH, EA., ORT, D. R. 2009b. The genomic basis for stimulated respiration by plants growing under elevated carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106** (9): 3597-3602
- LEE, Y. e LANGENHEIM, J. H. 1975. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). University of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- LEWISOHN, T.M. 1980. Predacao de sementes em *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae): aspectos ecologicos e evolutivos. Tese de mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.

- LONG S. P., DRAKE, B. G. 1991a. Effect of the Long-Term Elevation of CO₂ Concentration in the Field on the Quantum Yield of Photosynthesis of the C₃ Sedge, *Scirpus olneyi*. *Plant Physiology* **96**: 221-225
- LONG, S. P., 1991b. Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations: Has its importance been underestimated? *Plant, Cell and Environment* **14**: 729-739
- LONG SP, HÄLLGREN JE 1993. Measurements of CO₂ assimilation by plants in the field and the laboratory. In: Hall DO, Scurlock JMO, Bolhàr-Nordenkampf HR, Leegood RC, Long SP (eds) Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual, Chapman & Hall, London, England. pp.129-167.
- LONG, S. P., AINSWORTH, E.A., ROGERS, A., ORT, D.R. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: Plants face the future. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **55**: 591-628
- LORENZI, H. 1998. Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil – vol 1. 2 ed. Editora Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 352 p.
- MACHADO, MARCELO. 2007. Estudo bioquímico e da estrutura foliar de plântulas do jatobá da mata (*Hymenaea courbaril* L.) e do cerrado (*Hymenaea stignocarpa* Mart.) expostas à concentração elevada de CO₂. Tese (Doutorado). UNICAMP. Campinas, Brasil
- MAJEROWICS, N., 2008. Fotossíntese. Em: Kerbaux B., G. (Ed) Fisiologia Vegetal. Segunda Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp. 431.
- MANN, C. C. Genetic engineers aim to soup up crop photosynthesis. *Science* **283**: 314-316
- MARABESSI, MAURO. 2007. Efeito do alto CO₂ no crescimento inicial e na fisiologia da fotossíntese em plântulas *Senna alata* (L.) Roxb. Dissertação (Mestrado). Instituto de Botânica. São Paulo, Brasil

- MERCIER, H., 2008. Auxinas. Em: Kerbaudy B., G. (Ed) Fisiologia Vegetal. Segunda Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp. 431.
- MOORE B. D., CHENG S.-H., RICE J. e SEEMANN J. R. 1998. Sucrose cycling, rubisco expression and prediction of photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Cell and Environment* **21**: 905-915.
- MOORE B. D., CHENG S.-H., SIMS, D. e SEEMANN J. R. 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell and Environment* **22**: 567-589.
- NORBY, R.J., WULLSCHLEGER, S.D., GUNDERSON, C.A., JOHNSON, D.W., CEULEMANS, R. 1999. Trees responses to rising CO₂ in the field experiments: implications for the future forest. *Plant, Cell and Environment* **22**: 683-714
- OBERBAUER, S. F. e STRAIN, B. R. 1984. Photosynthesis and sucessional status of COSTA Rica rain forests trees. *Photosynthesys Research* **5**: 227-232
- OLIVEIRA, E.A.D. 2006. Efeitos de três concentrações de CO₂ sobre a fisiologia e partição de biomassa no crescimento inicial de *Croton urucurana* Baill e *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze, numa simulação climática futura. Monografia de bacharelado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 56pp.
- ONU, 1997. Protocolo de Kioto.
- OOSTEN, J. J., WILKINS D. e BESFORD, R. T. 1994. Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO₂ is mimicked by regulation by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂? *Plant, cell and environment* **17** (8): 913-923
- PEARSALL, WH. 1927. Growth studies. VI. On the reltive sizes of growing plants organs. *Annals of Botany* **41**: 549-556
- PERES, L., KERBAUY, G. B. 2008. Citicininas. Em: Kerbaudy B., G. (Ed) Fisiologia Vegetal. Segunda Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp. 431.

- PHILLIPS, O.L., Y. MALHI, N. HIGUCHI, W.F. LAURANCE, R.M. NÚÑEZ, D.J.D. VÁXQUEZ, L.V. LAURANCE, S.G. FERREIRA, M. STERN, S. BROWN Y J. GRACE. 1998. Changes in the carbon balance of tropical forests: evidence from long-term plots. *Science* **282**: 439-442.
- POORTER, H. AND P. POTHMANN. 1992. Growth and carbon economy of a fast-growing and a slow-growing grass species as dependent on ontogeny. *New Phytologist* **120**: 159–166.
- POORTER H., BERKEL Y., BAXTER R., HERTOOG J., DIJKSTRA P., GIFFORD R. M., GRIFFIN K. L., ROUMET C., ROY J. WONG S. C., 1997. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C-3 species. *Plant Cell and Environment* **20**: 472–482
- POORTER, H. NAGEL O., 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 595-607
- POORTER H, NAVAS, M. L. 2003. Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist* **157**: 175–198.
- POORTER, H., GARNIER E. 2007. Ecological Significance of Inherent Variation in Relative Growth Rate and its Components. In Functional Plant Ecology. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. Cap 3: 67-108
- PORRA, R. J., Thompson W. A., Kriedemann P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochemica et Biophysica Acta*, **975**: 384-394
- PRENTICE I. C. 2001. The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide. In: Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, Linden PJ van der, Dai X, Maskell K, Johnson CA (eds) Climate change 2001: the scientific basis. Cambridge University Press, Cambridge, pp 183–238

- RENNENBERG, F., LORETO, A., POLLE, F., BRILLI, S., FARES BENIWAL R. S. e GESSLER, A. 2007. Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* **8**: 556-571
- RIBEIRO, R.V., SOUZA, G.M., OLIVEIRA, R.F. & MACHADO, E.C. 2005. Photosynthetic responses of tropical tree species from different successional groups under contrasting irradiance conditions. *Revista Brasileira de Botânica*: **28**(1): 149-161
- RIDDOCH, I. *et al.* 1991. Photosynthesis of tropical tree seedlings in relation to light and nutrient supply. *New Phytologist* **119**: 137-147
- ROBINSON, D. 1991. Strategies for optimising growth in response to nutrient supply. In: J.R. Porter and D.W. Lawlor, eds. *Plant Growth. Interactions with Nutrition and Environment*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 177–199.
- RODRIGUES, M. A., KERBAUY, G. K. 2009. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. *Hoehnea* **36** (4): 525-549
- SAGE, R. F. 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. *Photosynthesis Research* **39**, 351-368.
- SAGE, R. F. 2002. How Terrestrial Organisms Sense, Signal, and Response to Carbon Dioxide. *Integrative and Comparative Biology* **42**: 469-480
- SAGE, R. F., KUBIEN D., 2007. The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* **30**, 1086–1106
- SANTOS, H. P. 2002. Importância ecofisiológica da reserva de xiloglucanos e o controle de sua mobilização em cotilédones de *Hymenaea courbaril*. Tese de doutorado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brasil.
- SANTOS, H.P. e BUCKERIDGE, M.S. 2004a. The Role of the Storage Carbon of Cotyledons in the Establishment of Seedlings of *Hymenaea courbaril* Under Different Light Conditions. *Annals of Botany* **94** (6): 819-830

- SANTOS, H.P., PURGATO, E., MERCIER, H. e BUCKERIDGE, M.S. 2004b. The Control of Storage Xyloglucan Mobilization in Cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. *Plant Physiology* **135**: 287-299
- SILVESTRINI, M. 2000. Fotossíntese e cúmulo de biomassa em plantas jovens de duas espécies arbóreas de diferentes grupos ecológicos (pioneira e climática) de uma floresta estacional semidescídua. Tese de mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.
- SCHRADER, S. M., R. R. WISE, W. F. WACHOLTZ, D. R. ORT Y T. D. SHARKEY. 2004. Thylakoid membrane responses to moderately high leaf temperature in Pima cotton. *Plant, Cell and Environment* **27**: 725–735.
- SOUZA, R.P. e VÁLIO, I.F.M. 1999. Carbon translocation as affected by shade in samplings of shade tolerant and intolerant species. *Biologia Plantarum* **42**: 631-636.
- SOUZA, A. 2007. A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *Saccharum* ssp. Dissertação (Mestrado). UNICAMP.
- SINGSAAS, E. L., M. LERDAU, K. WINTER Y T. D. SHARKEY. 1997. Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. *Plant Physiology* **115**, 1413–1420.
- TAIZ, L. e ZEIGER, E. 2009. Fisiologia Vegetal. Quarta ed. Artmed, Portoalegre, pp. 848.
- TURNBULL, M.H. 1991. The effect of light quantity and quality during development on the photosynthetic characteristics of six Australian rain forest species. *Oecologia* **87**: 110-117
- TINÉ, M. A. S., 1997. Mobilização de xiloglucano de reserva de sementes de *Hymenaea courbaril* L. Unicamp. M.Sc Tese, 85p.
- TINÉ, M. A. S.; CORTELAZZO, A. L., BUCKERIDGE, M. S. 2000. Xyloglucane mobilization in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae) *Plant Science* **154**: 117-126

- WALTER A, FEI R, SCHURR U.. 2002. Restriction of nyctinastic movements and application of tensile forces to leaves affects diurnal patterns of expansion growth. *Functional Plant Biology* **29**: 1247–1258.
- WALTER, A., CHRIST, M. BARRON-GAFFORD, G., GRIEVE K. A., MURTHY R., RASCHER, U., 2005. The effect of elevated CO₂ on dial leaf growth cycle, leaf carbohydrate content and canopy growth performance of *Populus deltoides*. *Global Change Biology* **11**: 1207–1219
- WALTER, A., SILK, W., SCHURR, U. (2009). Environmental Effects on Spatial and Temporal Patterns of Leaf and Root Growth. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 279–304
- WALTERS *et al.* 1993. Growth, biomass, distribution and CO₂ exchange of northern hardwood seedlings in high and low light: relationship with successional status and shade tolerance,. *Oecologia* **94**: 7-16
- WHITMORE, T. C. 1989. Canopy gas and the two major groups of the forest trees. *Ecology* **70** (3): 536-538
- WHITMORE, T. C. 1996. A review of some aspects of tropical rain forest seedling ecology with suggestions for further enquiry. In Swaine, M. D., Alexander, I. J. & Hadley, M. (Eds). *The ecology of tropical forest tree seedlings*. Paris: UNESCO and Carnforth, UK: Parthenon.
- WILLIAMS, J. H. H. e FARRAR, J. F. 1990. Control of barley root respiration. *Physiology Plantarum* **79**: 259-266
- YORDANOV, I., S. DILOVA, R. PETKOVA, T. PANGELOVA, V. GOLTSEV Y K. H. SUESS. 1986. Mechanisms of the temperature damage and accliation of the photosynthetic apparatus. *Photobiochemistry and Photobiophysics* **12**: 147–155.

CAPÍTULO III

**Influência das elevadas concentrações de CO₂ e de temperatura no
particionamento de carboidratos não estruturais em plantas juvenis de
jatobá.**

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Fotossíntese

A fotossíntese é o processo em que as plantas transformam CO_2 em compostos orgânicos para o crescimento e sobrevivência, durante a maior parte do ciclo de vida. Os processos primários da fotossíntese ocorrem no cloroplasto, onde se distinguem:

- a. Absorção de fótons por pigmentos –principalmente clorofilas- associados aos fotossistemas I e II
- b. Transporte de elétrons derivados da hidrólise da água, com a produção simultânea de oxigênio, ao longo da cadeia transportadora de elétrons, o que produz moléculas de doadoras de elétrons (NADPH). ATP sintase usa o gradiente de prótons do lumen para o estroma para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i (MAJEROWICZ, 2008)
- c. Síntese de compostos de três carbonos (trioses fosfato) a partir da utilização das moléculas de NADPH e ATP pela reação de redução do carbono (ciclo de Calvin), sendo que a maior parte das trioses-P remanescentes no cloroplasto são usadas para regenerar RuPB (LAMBERS, 2008). Na redução fotossintética do carbono, o CO_2 entra no ciclo de Calvin reagindo com a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP), reação catalisada pela enzima RUBISCO (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase). O primeiro produto desta carboxilação é o PGA (ácido fosfoglicérico), composto de três carbonos que é reduzido à triose-P (triose fosfato) com o consumo do ATP e NADPH.

A síntese de amido e de sacarose são processos que competem entre si. Durante o dia nos tecidos fonte (Figura 18A), parte da triose fosfato é exportada ao citosol em intercâmbio por P_i (fósforo inorgânico). Quando a concentração de P_i no citosol aumenta, parte da triose-P remanescente no cloroplasto é exportada para o citosol em troca de P_i , através de um co-transportador TP- P_i , e pode ser usada para produzir sacarose e outros metabólitos que são exportados para os drenos pelo floema, ou são usados nos processos de respiração nas próprias folhas. Quando a concentração citosólica de P_i é baixa, as triose fosfato são retidas no cloroplasto e o amido é sintetizado (por meio da UGPase, UDP-glicose pirofosforilase) e armazenado. A noite (Figura 18B), o amido, quando é fosforilado ou hidrolisado com a produção de maltose e glicose, pode ser quebrado os açúcares transformados em trioses fosfato e exportado do cloroplasto. Esta exportação serve para

alimentar o grupo - *pool*- de hexoses fosfato e manter altas as taxas de síntese e exportação de sacarose (SHARKEY *et al*, 2004; ROLLAND *et al*. 2006).

Os fotoassimilados são usados como esqueletos de carbono, para armazenamento, metabolismo, crescimento ou exportação. Os açúcares exportados são utilizados, por sua vez, como fonte de energia para crescimento (ramos, folhas jovens) e como esqueletos de carbono para a construção de compostos orgânicos. Sobre os compostos de reserva, além do amido, os frutanos exercem um importante papel de reserva temporária em folhas de plantas herbáceas, nas quais não são acumuladas nem como sacarose nem como amido (ROMANOVA, 2005). O amido transitório se refere àquele que é produzido para garantir o fornecimento de substrato para a glicólise (ROMANOVA, 2005) e da translocação de sacarose o durante a noite.

Figura 18: Modelo simplificado do fluxo e produção de carboidratos em células fonte durante o dia (A) e a noite (B). SPS, sacarose-P sintase; SPP, sacarose-P fosfatase; AGPase, ADP-glc pirofosforilase; UGPase, UDP-glicose pirofosforilase; INV, invertase; SUS, sacarose sintase; F-1,6-bP, frutose bifosfato; F6P, frutose 6-fosfato; G6P, glicose 6-fosfato (ROLLAND *et al.*, 2006)

3.1.2 Carboidratos Não Estruturais, CNE

3.1.2.1 Grupo - *pool* de hexose fosfato.

O carbono assimilado pela fotossíntese faz parte do grupo - *pool* de hexoses através dos produtos do ciclo de Calvin: diidroxiacetona 3-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato durante o dia ou pela fosforilação de hexoses livres derivadas da quebra de amido durante a noite. O carbono sai do grupo - *pool* de hexose fosfatos via glicólise, pela rota de pentose fosfato (oxidação de açúcares em células vegetais) ou pela síntese de sacarose e polissacarídeos (TAIZ, 2009).

Durante o dia (Figura 18A), no citosol é sintetizada frutose-1,6-bifosfato a partir de diidroxiacetona 3-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. A frutose-1,6-fosfato pode sintetizar frutose-6-P, junto com glicose-6-P e glicose 1-P são as hexose do grupo - *pool* de hexoses sendo que todas estas são convertidas em frutose-1,6-bifosfato com o uso de ATP. A frutose 6-fosfato, com a fosforização do carbono 1 restaura a frutose-1,6-bisfosfato ou com a fosforização do carbono 2 produz frutose-2,6-bisfosfato. A frutose-1,6-bisfosfato fosfatase, enzima responsável pela síntese inicial de frutose-1,6-bisfosfato é fortemente inibida pela frutose-2,6-bisfosfato, tendo com que a frutose-2,6-bisfosfato tem um importante composto regulador da biossíntese de sacarose. A frutose-2,6-bisfosfato é uma molécula chave para identificar o estado da rota P_i -trioses fosfato (HUBER, 1986; STITT, 1990), já que modula a formação do grupo - *pool* de hexose-fosfato não só em resposta aos fotoassimilados fornecidos pelo translocador de triose-fosfato, mas também à demanda de hexose fosfato do próprio grupo- *pool*.

Folhas com elevados níveis de frutose-2,6-bisfosfato participam menos sacarose e aquelas com pouca frutose-2,6-bisfosfato participam a mais sacarose. No entanto, à noite os níveis de frutose-2,6-bifosfato não afetam a produção de sacarose, já que o grupo- *pool* de hexoses é alimentado pela maltose e hexoses originadas da degradação de amido. A noite a frutose-1,6-bisfosfato fosfatase não contribui para o controle do grupo - *pool* de hexose fosfato.

Como já foi descrito acima, os principais fatores que interferem na partição de carbono no citosol (para produção de Sac) e no cloroplasto (para produção de amido) são as concentrações relativas de fósforo inorgânico e de trioses fosfato.

3.1.2.2 Sacarose.

A sacarose é um produto da fotossíntese acumulado fora do cloroplasto, no citosol, cuja função é transportar o carbono assimilado aos tecidos dreno da planta e da mesma folha fonte. A concentração de sacarose nas folhas depende das taxas de fotossíntese (porque as trioses fosfato são exportadas do cloroplasto para o citosol da folha) e das taxas de exportação de carbono das folhas (porque a sacarose preenche a demanda de energia de outros tecidos). A síntese da sacarose é mediada pela sacarose fosfato sintase (SPS) a partir de UDP-glicose (UDP-Glc) com frutose-6-P (do grupo *pool* hexose fosfato). As hexoses fosfato são convertidas em açúcares nucleotídeos (UDP-Glc) mediante as nucleotídeo difosfato-açúcar pirofosfatases (TAIZ *et al.*, 2009).

As plantas podem completar o ciclo vital usando somente a Sac produzida durante o dia, como em mutantes que não produzem amido ou que não degradam amido (CASPAR *et al* 1985; CASPAR *et al* 2001) ou da Sac feita como produto da degradação noturna de amido (plantas sem frutose-1,6-bifosfato fosfatase, FBPase citosólica) (SHARKEY *et al*, 2004). As duas enzimas principais que clivam a sacarose são a invertase ácida (INV) e a sacarose sintase (SUS), ambas capazes de catalisar a primeira etapa de uso da sacarose. A invertase ácida, enzima que cliva sacarose em glicose e frutose, e podem estar ligadas à parede celular (CW-INV) ou acumulada no vacúolo (V-INV). Num estudo em cenoura, quando a invertase de parede celular na raiz é reduzida, diminui a alocação de sacarose na raiz, diminuindo seu desenvolvimento, com o que aumenta o número de folhas na planta, a fração folha e os níveis de amido e sacarose nelas. Neste mesmo caso, uma diminuição na formação de glicose e frutose na parede celular, impede a absorção de açúcar nos tecidos dreno de estocagem, gerando mudanças nos padrões de alocação na planta (TANG *et al*, 1999).

SHARKEY *et al* (2004) observaram que plantas de tomate modificadas, com maior atividade da SPS, tiveram maior partição carboidratos em Sac que em amido, o que não afetou as taxas fotossintéticas. Estes autores observaram que uma mudança nos padrões de partição pode gerar sinais diferenciados no mecanismo sensor de açúcares (do inglês, *sugar sensing*), com o que o desenvolvimento das plantas pode ser afetado.

3.1.2.3 Amido

O amido é um polissacarídeo sintetizado no cloroplasto. A molécula precursora de sua síntese é 6-Glc-1-fosfato, do *pool* de hexose-fosfato, que por sua vez é composto de

dois tipos de moléculas: *amilose* e *amilopectina*. A amilose é um polissacarídeo linear e a amilopectina tem a estrutura ramificada, conferindo-lhe a textura mais firme. As ligações glicosídicas α -D-1,4 estão presentes nos dois tipos de moléculas. No entanto, as ligações α -D-1,6 aparecem só na amilopectina. A biossíntese de amilose é catalisada pela amido sintase (associada à matriz do grânulo). As enzimas de ramificação da amilopectina compreendem várias isoformas que são expressas em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento (TAIZ *et al.*, 2009). Existem outros tipos de enzimas, as isoamilases e as dextrinases-limite, que participam na desramificação das ligações α -D-1,6, cuja função se pressupõe ser a remoção de ramos posicionados inapropriadamente, produzidos na superfície dos grãos de amido.

O amido é o principal carboidrato de reserva na maioria das plantas, cuja sua abundância é excedida apenas pela celulose (TAIZ *et al.*, 2009; BUCKERIDGE *et al.*, 2008).

3.1.3 Relação fonte-dreno

O transporte da seiva no geral é translocado das regiões fonte (de produção) às regiões denominadas dreno, de armazenamento ou de crescimento. As fontes incluem folhas maduras capazes de produzir fotoassimilados além de suas necessidades, ou órgãos não fotossintéticos, os quais em outro período foram drenos (raízes, tubérculos). Os drenos são órgãos não fotossintéticos que não produzem fotossintatos (produtos da fotossíntese) suficientes para suas próprias necessidades. Resultados de análise de seiva indicam que os carboidratos translocados são em sua maioria açúcares não redutores, como sacarose e a rafinose, pois eles são menos reativos que seus equivalentes redutores. Como açúcares álcool transportados estão o manitol e o sorbitol (TAIZ *et al.*, 2009).

Nos tecidos fonte, o carbono fixado pode ser usado para síntese de compostos de reserva como amido, para satisfazer demandas energéticas, e/ou fornecer esqueletos de carbono para síntese de outros compostos necessários à célula. Os açúcares a serem transportados para exportação a tecido dreno podem ser armazenados temporariamente no vacúolo.

Nos tecidos drenos, os açúcares de transporte podem permanecer como tal ou serem transformados em outros compostos. Em relação à armazenagem, pode ocorrer no vacúolo (sacarose, hexose) ou no amiloplasto (amido). Os drenos em crescimento podem

utilizar os açúcares para respiração e para síntese de outras moléculas necessárias ao crescimento.

A quantidade de carbono fixado disponível para a folha é determinada pelas taxas fotossintéticas. No entanto, a quantidade de carbono fixado disponível para a translocação depende dos eventos metabólicos subsequentes à fixação: a distribuição diferencial dos fotoassimilados nos órgãos, a alocação e à distribuição dos fotoassimilados em Sac, hexoses ou amido, segundo o processo metabólico ao qual seja destinado (transporte, respiração, armazenamento), a partição (LAMBERS *et al*, 2008; POORTER *et al*, 2000). A partição interage com a alocação, devido à capacidade do tecido de estocar ou metabolizar os açúcares importados, o que afeta sua capacidade de competir pelos açúcares disponíveis.

O processo de alocação determina os padrões de crescimento, que devem ser balanceados entre a parte aérea (fotossíntese) e as raízes (absorção de água e minerais). Existe um fator adicional nos elementos crivados: a pressão de turgidez, podendo ser um meio importante de comunicação entre as fontes e os drenos na coordenação das taxas de carregamento e descarregamento (LAMBERS, 2008).

As folhas fonte regulam o processo de alocação, considerando-se que os aumentos nas taxas de assimilação refletem em aumentos nas taxas de translocação. Os pontos de controle para a partição de fotossintatos incluem a síntese de trioses-P para regeneração de intermediários do ciclo de Calvin, síntese de amido e/ou síntese de sacarose. Durante o dia, as taxas de síntese amido no cloroplasto devem ser sincronizadas com as de síntese de sacarose. As enzimas chave envolvidas são a Sacarose-fosfato síntese (SPS) e a frutose-1,6-bifosfatase no citoplasma e a ADP-glicose pirofosforilase (AGPase), no cloroplasto (ROLLAND *et al.*, 2006).

Sobre o estudo em cenoura supra-citado, a diminuição na formação de glicose e de frutose na parede celular, impede a absorção de açúcar nos tecidos dreno de estocagem, gerando mudanças nos padrões de alocação na planta (TANG *et al.*, 1999).

Em feijão e milho, foi observado que os genes da invertase ácida são expressos em momentos diferentes durante o desenvolvimento do dreno, precedendo a importação de fotoassimilados. Assim, a enzima tem um papel muito importante nos padrões de importação, tanto durante o programa genético de desenvolvimento quanto durante as respostas aos estresses ambientais (TAIZ *et al*, 2009).

3.1.4 Carboidratos como moléculas sinalizadoras.

Organismos multicelulares como as plantas que suportam permanentes mudanças ambientais, de desenvolvimento e fisiológicas, precisam de mecanismos que coordenem seu funcionamento desde o nível celular até a comunicação de longa distância entre os tecidos.

Os açúcares agem como moléculas sinalizadoras que regulam muitos processos metabólicos e de desenvolvimento nos vegetais, nem só aqueles relacionados à fonte de carbono e de energia metabólica. Diferentes sinais são gerados para modular o crescimento, o desenvolvimento e respostas ao estresse. A abordagem molecular tem revelado interações extensivas entre açúcares e sinalização hormonal e tem se reconhecido à hexoquinase (HXK) como um sensor de glicose. De igual forma, as proteínas quinases, proteínas fosfatases e Ca^{2+} atuam como segundos mensageiros envolvidos na expressão gênica e na atividade enzimática do metabolismo primário como parte da sinalização de açúcares (ROLLAND *et al.*, 2006; MOORE *et al.* 2003).

A sacarose é o fotoassimilado de maior produção e transporte; e muitos pontos de sinalização que afetam o crescimento são atribuídos aos seus produtos da hidrólise: glicose e frutose (ROLLAND *et al.* 2006; SHARKEY *et al.* 2004).

A sacarose é sintetizada pela SPS do citosol e pela fosfatase, podendo manter-se no citosol, no vacúolo ou transportada fora da célula. A sacarose apoplástica ou vacuolar pode ser hidrolisada pela invertase ácida. As hexoses resultantes devem ser fosforiladas pela hexoquinase para que se reintegrem aos processos metabólicos. O primeiro sinal é gerado quando o fluxo de hexose passa através da hexoquinase, como resultado do ciclo de hexose. A segunda rota para produção de hexose pode acontecer pela hidrólise do amido do cloroplasto. A sensação do açúcar (fluxo de hexose), do inglês *sugar sensing*, da hexoquinase pode acontecer com proteínas efetoras (E), as quais incluem quinase e fosfatase que enviam uma sinal ao núcleo, o que presumivelmente altera a transcrição de genes fotossintéticos (MOORE, *et al.*, 1999). A repressão da expressão de genes fotossintéticos ocorre primeiro pelo funcionamento da hexoquinase como um sensor do fluxo de hexose que, por último, afeta a transcrição (Figura 19). Em geral, pela sensação do açúcar, *sugar sensing*, à deficiência de carboidratos aumenta a expressão de genes, promovendo a fotossíntese, a mobilização de reservas e os processos de exportação, enquanto o fornecimento abundante de carbono promove a expressão de genes de estocagem e utilização (KOCH, 1996; HALFORD E PAUL, 2003; ROMANOVA, 2005).

As atividades dreno, como crescimento e armazenamento, são expressas quando há disponibilidade de carbono. Os processos de fotossíntese e crescimento devem ser coordenados rigorosamente, os quais envolvem regulação metabólica e mecanismos específicos de sinalização.

Figura 19: Modelo proposto por MOORE *et al* (1999) descrevendo o metabolismo associado à produção de carboidratos foliares, como sinais potenciais que afetam a expressão gênica em eCO₂. TP: triose fosfato; F-1,6-bP: frutose bifosfato; E: proteínas efetoras (quinases, fosfatases);

3.1.5 Carboidratos e desenvolvimento

A glicose é a chave metabólica. Isto porque ela é a unidade estrutural da celulose, do amido, da sacarose e é o substrato da respiração. As concentrações de glicose, de frutose e de sacarose estão fortemente interligadas, já que representam a forma de transporte central fonte-dreno (WALTER *et al*, 2005), sendo que a diminuição da concentração de sacarose pode afetar os processos de crescimento e de expansão celular, por exemplo, onde participam a glicose e a frutose.

A compreensão da regulação por açúcares do crescimento e desenvolvimento tem sido adiantada principalmente na fase do estabelecimento das plantas. No desenvolvimento inicial de plântulas de *feijão* foi evidenciado que elevada atividade da invertase de parede celular (CW-INV) gera altos níveis de hexose, favorecendo o crescimento de embriões e a divisão celular. A glicose e as citocininas controlam a expressão gênica da ciclina-D, sendo que as ciclinas-D estariam envolvidas na transição G1 para S do ciclo celular (MERCIER, 2008; ROLLAND *et al.*, 2006), o que afeta as taxas de divisão celular. As ciclinas do tipo

D₃ (CYC-D₃) parecem ser um importante fator do ciclo celular mitótico e o início da diferenciação e expansão celular.

O estudo de mutantes insensíveis e de supersensíveis ao açúcar tem revelado conexões extensivas e íntimas entre açúcares e sinalização hormonal. A hexoquinase 1 (HXK1) atua como intermediador da sinalização de glicose que controla o desenvolvimento de plântulas. Em plântulas de *Arabidopsis* foi evidenciada uma interação positiva entre ABA e açúcares, sendo que o ABA participa na intermediação do desenvolvimento pos-germinatório para enfrentar condições de crescimento adversas. A sinalização por glicose envolve aumento em ABA, assim como na síntese e sinalização de expressão gênica. Entre outras, tem se evidenciado que é preciso acúmulo de ABA para sinalização de glicose durante o desenvolvimento juvenil. A sinalização com HXK1 interage positivamente com auxinas e negativamente com citocininas nas fases de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas (ROLLAND *et al.*, 2006). Recentemente, TONINI *et al.* (2010) demonstraram que a glicose está envolvida em um mecanismo de sinalização ligada ao ABA e ao etileno em plântulas de *Sesbania virgata* em desenvolvimento. Este é um sistema análogo ao do jatobá, apenas com a diferença de que, naquele caso o polissacarídeo de reserva é o galactomanano e não o xiloglucano como no caso do último.

Na fase vegetativa o estabelecimento dos drenos parece estar correlacionado ao metabolismo de carboidratos e acúmulo de açúcar, em especial nas enzimas de hidrólise de sacarose. As INVs atuam na regulação de particionamento de carboidratos, no desenvolvimento e nas respostas hormonais, assim como nas respostas ao estresse. As plantas adaptam-se à falta de carboidratos, originada em variações normais no curso do dia ou às condições ambientais, interrompendo o crescimento e redirecionando o metabolismo básico para catabolismo de lipídeos, proteínas e aminoácidos mais que para a glicólise (ROLLAND, 2006).

A plasticidade das plantas pode ser apreciada pelo fato delas desenvolverem diferentes rotas para seus processos metabólicos (FLUGGE *et al.*, 2003). No caso de mutantes de tabaco, que produzem quantidades-traço de amido, eles conseguem compensar a falta diária de amido com uma produção grande de sacarose, desviando seu crescimento para as horas diurnas (GEIGER *et al.* 1995). Em outra pesquisa, as plantas de batata acumulam até quatro vezes mais amido durante o dia, quando a atividade do translocador de fosfato diminui 30% devido à repressão anti-senso de seu RNA. Sob essas condições, o

carbono fixado não pode deixar o cloroplasto, mas o amido continua sendo sintetizando. Todavía à noite, estas plantas conseguem aumentar a exportação de amido, quando um exportador diferente opera entre o cloroplasto e o citoplasma.

3.1.6 Carboidratos não estruturais e elevadas concentrações de CO₂.

Foi observado que as plantas se aclimatam às elevadas concentrações de CO₂ por meio da redução em sua atividade fotossintética (aclimação da fotossíntese associada à diminuição do conteúdo de RUBISCO), a qual por sua vez, é associada ao aumento na concentração de carboidratos solúveis e em amido nas folhas (DRAKE *et al.*, 1997; POORTER *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 1999; SAGE, 2002; LONG, 2004).

A aclimação da fotossíntese às elevadas concentrações de CO₂ tem origem nos processos celulares na planta. O metabolismo de hexose, mais do que a abundância em açúcares, está envolvido na sinalização de açúcares que esta relacionada à expressão gênica de RUBISCO. Como resultado da transdução do sinal dos carboidratos produzidos em elevadas concentrações de CO₂, são afetados os processos de controle em diferentes espécies. MOORE *et al.* (1998) sugeriram que em eCO₂ existe um aumento no ciclo de sacarose, que por sua vez aumenta a provisão de sacarose às invertase ácidas foliares. Adicionalmente, limitações no dreno que acentuam a aclimação da fotossíntese podem resultar em uma diminuição relativa da exportação de sacarose foliar e um subsequente aumento nos níveis celulares de sacarose e de ciclo de sacarose.

O crescimento das plantas crescidas em eCO₂ pode estar limitado pelo dreno (STITT, 1991). O taxa do transporte de carboidratos à distância é uma função do gradiente de pressão de turgidez do floema entre órgãos fonte e dreno, mais do que uma função das concentrações de açúcar do floema. O crescimento dos drenos pode facilitar uma redução na pressão de turgidez do floema durante a descarga normal, do simplasto, influenciando as taxas de translocação e por último a aclimação da fotossíntese às elevadas concentrações de CO₂ (MOORE *et al.*, 1999).

Em condições de elevadas concentrações de CO₂ o observado é que as plantas apresentam uma diminuição da atividade do translocador de TP-Pi, o que leva a mudanças na disponibilidade de fosfato, com o que é particionado mais carbono em amido que em sacarose (ROMANOVA, 2005).

Em condições de elevadas concentrações de CO₂, HAMILTON *et al.* (2005) observaram que o elevado conteúdo de carboidratos não estruturais em folhas de soja gera

um aumento nas taxas de herbivoria por insetos. Por outro lado, uma elevada razão C:N pode levar a respostas negativas na produtividade ao nível do ecossistema (OACHEL *et al*, 1994).

Na presente pesquisa, foi feita uma primeira abordagem para conhecer o padrão de produção de carboidratos durante o crescimento linear (aos 68dap) e na estabilização do crescimento (aos 95 dap) de plântulas de jatobá crescidas nos tratamentos, a seguir: eCO₂-aT: elevado CO₂, temperatura ambiente; eCO₂-eT: elevado CO₂, temperatura elevada; aCO₂-aT: CO₂ ambiente, temperatura ambiente e aCO₂-eT: CO₂ ambiente, temperatura elevada. Foram feitas coletas de ciclo diário (aos 68 dap) e de ciclo diurno (aos 95 dap) para evidenciar mudanças de fase na produção de carboidratos. Também a abordagem tenta entender condições de eCO₂ e eT alterariam o padrão de partição de carboidratos, e determinar de que maneira se refletem nas respostas de crescimento.

3.2 OBJETIVOS

Considerando o efeito das concentrações de CO₂ e da temperatura no crescimento e nas respostas às trocas gasosas observadas em jatobá, o objetivo desta etapa do trabalho foi identificar a influência destes fatores na produção e particionamento de carboidratos não estruturais (carboidratos solúveis: sacarose-Sac, glicose-Glc, frutose-Fru e amido) em dois momentos do desenvolvimento inicial de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. var. stilb. Para tanto, as plantas foram crescidas em quatro cenários ambientais diferentes, nos quais interagem a concentração atmosférica de CO₂ e a temperatura ambiente. O conteúdo de carboidratos foi determinado em folhas completamente expandidas, raízes e caules.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.

3.3.1 Condições experimentais e do material vegetal.

Os experimentos iniciaram-se em outono, desde marco até junho de 2008 e 2009. Foram utilizadas câmaras de topo aberto, localizadas dentro da casa de vegetação do departamento de Botânica da Universidade de São Paulo (S23°33'912, W043°43'870) (ver descrição no capítulo 1).

As sementes de *Hymenaea courbaril* L. var stilb. procedentes da Estação Experimental de Casa Branca (SP, Brasil), foram escarificadas e plantadas em vermiculita úmida. Uma vez que fora evidente a protrusão da radícula (germinação) foram trasladadas individualmente aos vasos com capacidade 6L, com substrato areia: vermiculita (2:3). Aos 26 dias após o plantio (dap), as plântulas com eófilos desenvolvidos, mas ainda fechados, foram trasladadas a cada um dos tratamentos, a seguir: eCO₂-aT: elevado CO₂, temperatura ambiente; eCO₂-eT: elevado CO₂, temperatura elevada; aCO₂-aT: CO₂ ambiente, temperatura ambiente e aCO₂-eT: CO₂ ambiente, temperatura elevada.

As determinações de carboidratos foram feitas para comparar seu conteúdo e comportamento em ciclo diários, em dois momentos do crescimento inicial:

- a. Aos 68 dap na fase linear de crescimento durante um ciclo diário (24 horas), sendo que se coletaram as amostras a cada 4 horas em sete pontos (8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 4h e 8 horas do dia seguinte) e
- b. Aos 95 dap durante um ciclo diurno (12 horas), uma vez o crescimento atinge a estabilidade, quando se coletaram as amostras a cada 4 horas em quatro pontos (8h, 12h, 16h e 20 h).

3.3.2 Desenho experimental.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, seguido do esquema fatorial 2 x 2 (concentrações de CO₂ x regimes de temperatura), completando 4 tratamentos, com 35 repetições cada, considerando cada planta como uma unidade experimental e uma réplica por tratamento. As plantas de cada tratamento cresceram numa CTA. Do material obtido para quantificar biomassa, foram tomadas as amostras para a dosagem de carboidratos não estruturais.

Com a ajuda de diagramas do tipo box-plot, foram retirados os valores extremos (fora de tendência). Com os dados obtidos foram determinadas as análise de variância, considerando-se a fase de desenvolvimento, concentração de CO₂ e temperatura como

efeitos fixos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As transformações foram usadas para homogeneizar a variância quando necessárias (dados de carboidratos não estruturais), utilizando-se a transformação logarítmica e raiz quadrada.

Os valores transformados foram submetidos a análise de variância, considerando fase de desenvolvimento, órgão, horário, concentração de CO_2 e temperatura como efeitos fixos.

Os testes *a posteriori* foram realizados usando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$) nos que usou-se a mesma letra para identificar tratamentos sem diferença significativa, ou letras diferentes para identificar tratamentos com diferenças significativas.

As análises foram realizadas usando o software SSPS Statistics, 17.1. Na análise os fatores avaliados foram a fase de desenvolvimento, a concentração de CO_2 e o regime de temperatura, e as variáveis dependentes foram as concentrações de Sac, Fru, Glc e Amido ($\mu\text{g.mg MS}^{-1}$).

Análise de componentes principais (ACP). Considerando a natureza contínua das variáveis, os parâmetros de interesse foram estudados por uma análise de componentes principais. Foi decidido analisar separadamente os dados dos 68 dap e dos 95 dap, por serem considerados análise em dois momentos diferentes do desenvolvimento inicial. Os grupos de dados analisados foram:

Fase de desenvolvimento (68 dap e 95 dap) x Órgão (folha, raiz e caule) x Carboidratos (Sac, Glc, Fru e Amido)

Os dados originais foram centralizados e padronizados, proporcionando uma matriz de correlação. As amostras respectivas foram relacionadas com grupos dos tratamentos (a: $\text{aCO}_2\text{-aT}$; ae: $\text{aCO}_2\text{-eT}$; e: $\text{eCO}_2\text{-eT}$; ea: $\text{eCO}_2\text{-aT}$).

Para explorar a relação entre os eixos principais e os centróides (média dos postos) foram confeccionados gráficos bi-plots de distancia.

As correlações entre os principais fatores determinados pelo processamento e os escores individuais, gerados pelo ACP foram interpretados seguindo a análise proposta por COHEN (1988): 1) valores positivos de 1.00 a 0.50 e negativos de -1.00 a -0.50 foram consideradas correlações grandes (g); 2) valores positivos de 0.49 a 0.30 e negativos de -0,49 a -0.30 foram consideradas correlações medianos (m) e 3) valores positivos de 0.29 a 0.10 e negativos de -0,29 a -0.10 foram consideradas correlações pequenas (p).

Para as análises de carboidratos não estruturais (Sac, Glc, Fru, Amido) os resultados da ACP incluíram a distribuição dos horários (sete horários aos 68 dap e 4 horários aos 95

dap) assim, a progressão no tempo foi representada ligando-se os pontos amostrais nos biplots cartesianos. Cada momento da fase de desenvolvimento (os 68 dap e os 95 dap) foi analisado separadamente também neste caso.

3.3.3 Parâmetros avaliados.

De cada tratamento avaliado, foram sorteadas ao acaso 3 plântulas para coletas destrutivas de biomassa separando-as em raiz, caule e folha completamente expandida, Os materiais coletados foram congelados em nitrogênio líquido e conservados a -20°C até serem liofilizados e posteriormente triturados em moinho de facas. Destes materiais foram pesados 10 mg de massa seca de cada material, com três repetições de cada amostra, dos quais foi feita uma extração alcoólica exaustiva com etanol 80%, seguida de extração de clorofila com clorofórmio (apenas em folha e caule). Foram conservados o sobrenadante e o precipitado.

3.3.3.1 Dosagem de carboidratos não estruturais (CNE): açúcares solúveis.

Para as análises de carboidratos solúveis (Sac, Glc e Fru) e amido, foram pesados 10 mg de material vegetal (raiz, caule, folhas), foi feita extração alcoólica exaustiva, segundo DEBOIS (1956), usando-se 1500 µL de etanol 80 % (v/v), por 20 minutos em banho-maria a 80 °C, por 5 vezes, totalizando 7,5 mL. Após centrifugação (13200 rpm, 3 minutos), o precipitado foi assentado. O sobrenadante foi seco em centrífuga concentradora a vácuo (*speed-vac.*) e dispersos em 1 mL de água Milli-Q. As folhas ainda tiveram os pigmentos retirados com 500 µL de clorofórmio. Esta água resuspendida foi mantida em eppendorf a -20°C, até a determinação da concentração de Sac, Glc e Fru por cromatografia líquida de Desempenho com Detector de Pulso Amperométrico (HPAEC/PAD DX-500, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), em coluna de troca iônica CarboPack PA-1, com os eluentes NaOH 200mM ao 50% e água Milli-Q 50% em fluxo contínuo de 1,0 mL min⁻¹. A concentração de cada um dos açúcares foi calculada em relação a cromatogramas padrão de concentrações conhecidas de cada um destes carboidratos (50, 100 e 200 µM, Figura 20A) (TONINI *et al.*, 2010). As áreas de cada pico foram corrigidas de acordo com a sensibilidade do detector para cada açúcar. O software Chromileon® fez a iteração dos dados ao utilizar como referência o tempo de retenção dos padrões e a integração da área e a altura dos seus picos (Figura 20B). As concentrações dos

açúcares nas amostras são determinadas a partir das concentrações encontradas no volume injetado (10 µL).

Figura 20 a. Exemplo de cromatograma de padrão de sacarose, glicose, e frutose (Sac, Glc, Fru) b. Exemplo de cromatograma de amostra de folha de *Hymenaea courbaril* L. aos 68 dap

3.3.3.2 Dosagem de carboidratos não estruturais (CNE): Dosagem de amido.

O precipitado restante junto à extração alcoólica foi seco à temperatura ambiente. Para a determinação da concentração de amido foi usada extração enzimática e quantificação colorimétrica descrita por AMARAL *et al* (2007). Nos precipitados foram adicionados 500 µL de α -amilase termoestável (120U.mL⁻¹) da bactéria *Bacillus licheniformis* (MEGAZYME) diluída em tampão MOPS pH 6,5 10 mM. As amostras foram incubadas a 75 °C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 1 mL de enzima. Após resfriamento até 50 °C, adicionou-se 500 µL de amiloglucosidase (30U.mL⁻¹) do fungo *Aspergillus niger* (MEGAZYME) diluída em tampão acetato de sódio pH 4,5 100 mM e as amostras foram incubadas por 30 minutos. Este procedimento foi repetido novamente, totalizando 2mL de enzima. Posteriormente, alíquotas de extrato foram incubadas com solução do kit GODPOD (Glicose PAP Liquiform/CENTERLAB), contendo as enzimas glucose oxidase e peroxidase e os reagentes 4-aminoantipirina e fenol, a 30 °C, por 15 minutos. O teor de glucose liberado foi determinado em leitor de microplacas de Elisa, a 490 nm. A glucose liberada foi calculada e ajustada (-10 %) para a massa de glucose ligada que está presente no amido.

Os resultados das concentrações de açúcares são apresentados usando diferentes abordagens:

- a. Apresentando o ciclo diário de produção de carboidratos, comparando em gráficos o comportamento dos açúcares (Sac, Glc, Fru, Amido) x tratamentos x fases de crescimento (68 dap e 95 dap) x órgão (folhas fonte, raiz, caule);
- b. Estudo da produção líquida de carboidratos não estruturais em cada tratamento: Para identificar o que acontece detalhadamente em cada tratamento, foram desenhados gráficos de produção líquida de carboidratos, diurna e noturna, para cada órgão em cada tratamento. A produção líquida é obtida a partir da subtração da maior produção de um carboidrato em cada período (diurno e noturno), menos (-) a menor produção do mesmo carboidrato nesse mesmo período. A produção líquida é expressada nas mesmas unidades que as concentrações (μg de carboidrato mg^{-1} de massa seca).
- c. Outra abordagem dos resultados foi feita utilizando análise por componentes principais (ACP).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Análise de produção de carboidratos não estruturais

A análise de variância que considerou todos os dados (fase de desenvolvimento, órgão, horário, concentração de CO₂ e temperatura) mostrou que existem diferenças significativas na produção de carboidratos com todos os efeitos fixos estudados (dados não apresentados). Assim, foi estabelecida outra abordagem na que os dados foram comparados separadamente por fase de desenvolvimento (68dap e 95dap) e por órgão (folha, raiz e caule) (apêndices 6 e 7), considerando que existem diferenças no conteúdo de carboidratos em todos os órgãos e nas duas fases de crescimento estudadas.

As análise de variância aos 68 dap em folhas (Apêndice 6) mostraram que o as eCO₂ e o regime de temperatura geraram diferenças significativas no conteúdo de todos os carboidratos avaliados, exceto de Glc com CO₂ e de Fru com temperatura. Nas raízes foram encontradas diferenças em Glc e amido, correlacionadas às eT. No caule, as eCO₂ apresentaram diferenças com o conteúdo de amido e de Fru, e a temperatura esta correlacionada com as mudanças horárias em todos os carboidratos.

Aos 95 dap, as concentrações de CO₂ geram diferenças significativas em todos os carboidratos avaliados em folhas e caule, excetuando Sac neste último. As elevadas temperaturas alteraram o nível de carboidratos principalmente no caule (Apêndice 7).

3.4.2 Análise do ciclo diário de produção de carboidratos não estruturais em plantas de *Hymenaea courbaril* L.

Nesta seção será descrito o comportamento de cada um dos carboidratos de interesse (Sac, Glc, Fru, Amido) em cada um dos tratamentos estudados e em cada órgão (folhas fonte, raiz, caule). A produção de carboidratos será descrita no ciclo diário (24 horas) aos 68 dap e no ciclo diurno (12 horas) aos 95 dap.

a. Ciclo diário de produção de carboidratos não estruturais (CNE) em *folhas fonte*.

O ciclo diário de carboidratos não estruturais em folhas fonte, em todos os tratamentos, mostrou que aos 68 dap, é produzido mais amido seguido por Sac, dos açúcares solúveis. Aos 95dap diminuem os níveis destes carboidratos, más mantêm o padrão de maior conteúdo de amido, seguido por sacarose (Figura 21).

Durante o dia, os níveis de Sac aumentam e diminuem a noite para suprir, presumivelmente o fornecimento de carboidratos destinados à exportação. A produção de Sac não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos.

A síntese de amido (Figura 21) inicia nas primeiras horas do dia, e a noite vai diminuindo lentamente, especialmente nos tratamentos com CO₂ ambiente. Foi observado em ambos dos períodos avaliados, uma diferença significativa de amido nos tratamentos com eCO₂ desde as 16 h, com aumento de 74% (aT) e num 34%(eT) com respeito ao tratamento controle, diferenças mantidas em alguns horários do ciclo noturno (68dap). O tratamento com eCO₂-aT foi aquele com menor degradação noturna de amido.

Os níveis de hexoses, especialmente os de Glc, são constantes em ambos dos períodos avaliados e à noite podem estar correlacionados também à degradação noturna de amido e sacarose.

Às 16 horas dos 68 dap é possível observar um aumento de Glc nos tratamentos com aCO₂ que está correlacionada à diminuição do conteúdo de amido. Este comportamento é inverso nos tratamentos com eCO₂, já que nesse mesmo horário diminuiram os níveis de Glc e aumentou o conteúdo de amido, tanto aos 68 dap como aos 95 dap. Os tratamentos com eT apresentaram um aumento em Glc em 20 horas. Sobre os níveis de Fru em folhas, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, especialmente em todos os horários dos 95 dap, sem poder se estabelecer um padrão de comportamento.

b. Ciclo diário de produção de carboidratos não estruturais em *raiz*.

No ciclo diurno das raízes, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os tratamentos, exceto em alguns horários (Figura 22).

A produção de amido aumentou ligeiramente dos 68 para os 95 dap, estando esse órgão aliado à Sac os carboidratos com maiores níveis em ambos os períodos.

Dos carboidratos solúveis, os maiores níveis apresentam-se aos 68 dap do que aos 95 dap. Os carboidratos com menores níveis foram Glc e Fru, sendo que no de Glc houve diminuição ao redor de 50% dos 68 para os 95 dap, em alguns horários (Figura 22).

No tratamento eCO₂-eT aos 68 dap foi observado relativo baixo conteúdo e diminuição de Glc por volta das 20 horas., como é apresentado na Figura 22.

c. Ciclo diário de produção de carboidratos não estruturais em *caule*.

O conteúdo de amido oscila sincronicamente em todos os tratamentos ao longo do ciclo diário (Figura 23), sendo que aos 68 dap o horário de maior produção é às 16 horas

(entre 530 e 648 μg de amido.mg de massa seca). Este amido começa a diminuir às 20 horas, especialmente no tratamento $\text{aCO}_2\text{-eT}$ e logo depois às 24 horas também no tratamento $\text{eCO}_2\text{-eT}$, sendo estes os tratamentos com maior crescimento (ver capítulo 1). Nas plântulas de jatobá, a partição de amido no caule é presumivelmente para armazenamento e mobilização de reservas especialmente na fase linear de crescimento. Aos 68dap os níveis de amido encontrados no caule são de 10X os encontrados na raiz e de 3X os encontrados nas folhas (Figuras 21, 22 e 23).

Os níveis de Sac acompanham o desempenho do amido, aumentando durante o dia e diminuindo à noite, com o qual se pode inferir à translocação, desde as folhas ao caule, e à noite desde o caule aos órgãos dreno. Sobre as hexoses avaliadas, elas diminuíram dos 68 para os 95 dap em nível. Assim, como foi apresentado na raiz, às 20 horas pode ser observado um aumento do nível de Glc nos tratamentos com eT.

3.4.3 Estudo da produção líquida de carboidratos não estruturais (CNE) em plantas de *Hymenaea courbaril* L., em cada tratamento.

Para descrever o comportamento da produção e o uso dos carboidratos em cada um dos tratamentos, foi calculada a produção líquida de carboidratos para cada órgão aos 68 dap e aos 95 dap, durante o dia e à noite (Figuras 24 a 26). O balanço diurno desta análise é representado em forma gráfica nas Figuras 27 a 29.

Foi evidenciada uma alteração do conteúdo de carboidratos não estruturais em plântulas de jatobá, produto da fase de crescimento e das diferentes condições ambientais providas aos tratamentos. Foi observado um diferencial nos açúcares solúveis prevalentes em cada um dos órgãos estudados. Nas folhas foi encontrado maior conteúdo de Sac e de Glc e Sac em raízes e caule.

O balanço de produção líquida de carboidratos solúveis nas folhas é apresentado na Figura 24. Foi observada maior produção diurna de Sac aos 68 dap nos tratamentos com eT. O balanço líquido diurno de Sac do dia para a noite teve diminuição em seu conteúdo em todos os tratamentos, especialmente no tratamento $\text{eCO}_2\text{-aT}$, no qual o balanço líquido de Sac à noite foi o menor. Por outro lado, nos tratamentos com eT o conteúdo diurno de Sac foi maior em 41% no tratamento $\text{eCO}_2\text{-eT}$ e em 49% no tratamento $\text{aCO}_2\text{-eT}$ (Tabela 1). Comparando-se o balanço líquido diurno de Sac nas folhas dos 68 para os 95 dap, foi

Figura 21: Ciclo diário de produção de carboidratos não estruturais (Sac, Glc, Fru, Amido, $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MS}$) em **folhas** completamente expandidas de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. nos tratamentos estudados aos 68 dap (esq) e aos 95 dap (der), (média $\pm$ EP). * diferenças significativas, Test de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 22 Ciclo diário de produção de carboidratos não estruturais (Sac, Glc, Fru, Amido, $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MS}$) em **raiz** de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. nos tratamentos estudados aos 68 dap (esq) e aos 95 dap (der), (média $\pm$ EP). * diferenças significativas, Test de Tukey (P<0,05)

Figura 23 Ciclo diário de produção de carboidratos não estruturais (Sac, Glc, Fru, Amido, $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MS}$) em **caule** de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. nos tratamentos estudados aos 68 dap (esq) e aos 95 dap (der), (média $\pm$ EP). * diferenças significativas, Test de Tukey ($P < 0,05$)

observada diminuição em todos os tratamentos, sendo que aqueles com eCO₂ tiveram redução maior, de 76% em eCO₂-aT e de 68 % em eCO₂-eT. Os maiores níveis de amido nas folhas (Figura 25) estão nos tratamentos com eCO₂, os quais diminuem à noite, como a Sac. A menor produção líquida de amido em folhas aos 95 dap encontra-se no tratamento aCO₂-eT.

Os gráficos de produção líquida de carboidratos na raiz e no caule podem ser observados nos apêndices 8 e 9, respectivamente. Nas raízes, o balanço líquido de Sac foi maior durante o período diurno nos tratamentos com aT aos 68 dap e nos tratamentos com aCO₂ aos 95 dap. Foi observado que o tratamento eCO₂-aT teve uma diminuição do balanço líquido de Sac e de Glc do dia para a noite, entretanto, nos outros tratamentos houve aumento. No caule o balanço líquido de Sac e Glc foi maior aos 68 dap do que aos 95 dap. Foi observado que o tratamento eCO₂-aT apresentou diminuição do balanço líquido de Sac e de Glc do dia para a noite, entretanto, nos outros tratamentos houve aumento. No caule dos tratamentos com eCO₂ aos 68 dap houve maior conteúdo dos carboidratos, em comparação aos outros tratamentos.

O tratamento eCO₂-aT (Figura 26) apresentou aos 68 dap os menores níveis noturnos de Sac em folhas, com um pequeno acréscimo para os 95 dap. Também foi observado nesse órgão menor produção das hexoses e alto conteúdo de amido.

Na Figura 27 pode se observar o padrão de partição de carboidratos entre os diferentes órgãos das plântulas controle aos 68 dap e aos 95 dap. Nos primeiros 68 dap, o tratamento controle possui no caule valores intermediários de amido, baixo conteúdo de Sac e Glc. Nas folhas houve valores baixos de amido aos 68 dap, que aumentaram para os 95 dap, porém os níveis de Sac se mantiveram constantes. O conteúdo de Glc diminuiu nas raízes dos 68 para os 95 dap, no entanto o conteúdo de amido e de Sac mantivesse constante.

O tratamento com menor conteúdo geral de carboidratos foi o tratamento aCO₂-eT, já que possui o menor conteúdo de amido em folhas, caule e de Glc em raiz. Aos 95 dap o tratamento só com eT apresentou menores valores de amido em caule e folhas e continua com taxa de produção de Sac relativamente elevada nas folhas.

Os tratamentos com eCO₂ apresentam os maiores conteúdos de amido no caule e nas folhas (especialmente no tratamento com eCO₂-aT) e de Sac (especialmente no tratamento com eCO₂-eT). Os níveis elevados Sac em folhas dos tratamentos com eT, especialmente aos 68 dap, podem denotar uma alta taxa de translocação do carboidrato

desde as folhas, o que pode se traduzir em maior crescimento geral da planta. Aos 95 dap os tratamentos com eCO₂ em folhas apresentam comparativamente maior conteúdo de amido e mantêm as taxas de Sac dos 68 dap. As raízes de todos os tratamentos mudam de padrão de partição, sendo maior para amido nos tratamentos com eCO₂ e para Sac nos tratamentos com aCO₂.

Tabela 14: Comparação (%) da produção líquida de Glc, Fru, Sac e Amido em folhas de *Hymenaea courbaril* L., aos 68 dap e 95dap, em cada um dos tratamentos, ao serem comparados com o controle,

	68 dap				95 dap			
eCO ₂ -aT	Glc (%)	Fru (%)	Sac (%)	Amido (%)	Glc (%)	Fru (%)	Sac (%)	Amido (%)
DIA	34,3	12,4	13,6	263,2	267,1	17,5	-68,1	-15,0
NOITE	-29,1	109,0	15,5	1217,0				
eCO ₂ -eT	Glc (%)	Fru (%)	Sac (%)	Amido (%)	Glc (%)	Fru (%)	Sac (%)	Amido (%)
DIA	-25,6	-60,9	41,1	161,8	71,7	-42,9	-47,5	21,0
NOITE	26,4	-3,9	-13,9	690,7				
aCO ₂ -eT	Glc (%)	Fru (%)	Sac (%)	Amido (%)	Glc (%)	Fru (%)	Sac (%)	Amido (%)
DIA	-52,1	-90,1	49,2	67,9	305,1	44,7	16,9	-60,5
NOITE	170,6	107,4	-46,0	408,8

Figura 24: Balanço líquido diurno e noturno de carboidratos solúveis ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) em folhas completamente expandidas de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. nos tratamentos estudados aos 68 dap (esq.) e aos 95 dap (der), (média). O balanço noturno aos 95 dap não foi determinado.

Figura 25: Balanço líquido diurno e noturno de amido ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MS}$) em folhas completamente expandidas, raiz e caule de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. nos tratamentos estudados aos 68 dap (esq.) e aos 95 dap (der), (média). O balanço noturno aos 95 dap não foi determinado.

Figura 26: Balanço líquido diurno e noturno de carboidratos solúveis ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) em folhas, raiz e caule de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. do tratamento eCO₂-aT (média). O balanço noturno aos 95 dap não foi determinado.

Sobre o comportamento diurno e noturno da razão síntese de amido/Sac em folhas das plantas dos diferentes tratamentos, foi calculado o balanço líquido da razão síntese de Amido/Sac (Figura 27), na qual se observa, durante a noite, a razão amido/Sac ser maior no tratamento eCO₂-aT e intermédia nos tratamentos eCO₂-eT e aCO₂-aT.

Figura 27: Balanço líquido da razão amido/Sac durante o dia e a noite aos 68 dap em folhas completamente expandidas de plantas de *Hymenaea courbaril* L., em cada um dos tratamentos avaliados.

SIMBOLOS	Glc	Amido	Sac
menor conteúdo
médio conteúdo
maior conteúdo

Plântula de jatobá

Partição dos carboidratos aos 68 dap

Partição dos carboidratos aos 95 dap

Figura 28: Diagrama plântula de jatobá (r: raiz, c: caule, e: eófilos, m1: metáfilo completamente expandido, m2: metáfilo jovem, ga: gema apical) (Esquerda). Padrão de conteúdo de carboidratos não estruturais (Sacarose, Glicose e Amido) em metáfilos, caule e raiz de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. do tratamento controle, aos 68 dap (centro) e aos 95 dap (Direita.).

Figura 29: Balanço líquido diurno de carboidratos não estruturais (Sacarose, Glicose e Amido) presentes em maior proporção em metáfilos, caule e raiz de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob diferente regime de concentrações de CO₂ e de temperatura, aos 68 dap.

Figura 30: Balanço líquido diurno de carboidratos não estruturais (Sacarose, Glicose e Amido) presentes em maior proporção em metáfilos, caule e raiz de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob diferente regime de concentrações de CO₂ e de temperatura, aos 95 dap.

A ACP aplicada à matriz de correlação entre as variáveis Sac (s), Glc (g), Fru (f) e amido (A) em folhas (Figura 31A, tabela no apêndice 10 A), aos 68 dap por amostra dos tratamentos eCO₂.aT (ea), eCO₂.eT(e), aCO₂.aT (a) e aCO₂.eT (ae) resultou num arranjo contendo 70% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 43% no primeiro eixo e 27 % no segundo eixo. A interpolação entre os dois primeiros eixos (Figura 31A) mostra maior contribuição das variações Fru e Glc no primeiro eixo e do amido no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra posicionamento ortogonal com a variável amido, em que não haveria efeito de um com ou outro.

Em outra matriz de dados foram compiladas as variáveis Sac (s), Glc (g), Fru (f) e Amido (A) em folhas (Figura 31C), aos 95 dap por amostra dos tratamentos eCO₂.aT (ea), eCO₂.eT(e), aCO₂.aT (a) e aCO₂.eT (ae) resultou no arranjo contendo 71% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 43% no primeiro eixo e 28 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Figura 31C, tabela no apêndice 10 B) mostra maior contribuição das variações Fru, Glc e amido no primeiro eixo e de Sac no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra posicionamento ortogonal com a variável Sac, em que as variáveis Glc, Fru e amido, sendo as primeiras correlacionadas negativamente com o eixo e a última positivamente.

Não houve uma segregação evidente dos tratamentos ao longo das variações nos dois primeiros eixos. Tal resultado pode indicar a necessidade de se explorar a contribuição de outros fatores com menor contribuição à variância total. O comportamento foi verificado também nas análise de componentes principais aplicadas às variáveis relacionadas a folhas, raiz e caule aos 68 dap e aos 95 dap. Sob tal consideração, a Figura 31B, apresenta a progressão no tempo das distribuições dos horários em ACP de folhas aos 68 dap. Cada cor representa a distribuição de um horário no biplot. Nesta outra abordagem, foi evidente que cada horário segue um padrão, independentemente do tratamento analisado. Porém, não foi evidente um comportamento comum entre os órgãos nem as datas de coletas.

Na ACP aplicada à matriz de dados contiveram-se as variáveis Sac (s), Glc (g), Fru (f) e Amido (A) em raízes aos 68 dap (Figura 32A, tabela no apêndice 10 C), por amostra dos tratamentos eCO₂.aT (ea), eCO₂.eT(e), aCO₂.aT (a) e aCO₂.eT (ae) resultou num arranjo contendo 69% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 45% no primeiro eixo e 24 % no segundo eixo.

Figura 31A: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (g: Glc, f: Fru, s: Sac, A: amido) em folhas aos 68 dap, e os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo.

Figura 31B: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (g: Glc, f: Fru, s: Sac, A amido) em folhas aos 68 dap e os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Linhas de cores amostram progressão no tempo das distribuições dos horários.

Figura 31C: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (g: Glc, f: Fru, s: Sac, A: amido) em folhas aos 95 dap e os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Linhas de cores amostram progressão no tempo das distribuições dos horários.

A composição dos dois primeiros eixos (Figura 32A) mostra maior contribuição das variações Fru e Glc no primeiro eixo e do amido no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra posicionamento ortogonal com a variável amido, pelo que não haveria efeito de um com ou outro.

Em outra matriz de dados contendo as variáveis Sac (s), Glc (g), Fru (f) e Amido (A) em raízes (Figura 32B, tabela no apêndice 10 D), aos 95 dap por amostra dos tratamentos eCO₂.aT (ea), eCO₂.eT(e), aCO₂.aT (a) e aCO₂.eT (ae) resultou no arranjo contendo 77% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 51% no primeiro eixo e 26 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos mostra maior contribuição das variações Fru e Glc no primeiro eixo e de amido no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra posicionamento ortogonal com a variável amido, em que não haveria efeito de um com ou outro.

Na ACP aplicada à matriz de dados contendo as variáveis Sac (s), Glc (g), Fru (f) e Amido (A) em caule aos 68 dap (Figura 33A, tabela no apêndice 10 E), por amostra dos tratamentos eCO₂.aT (ea), eCO₂.eT(e), aCO₂.aT (a) e aCO₂.eT (ae) resultou num arranjo contendo 76% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 48% no primeiro eixo e 28 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos (Figura 33A) mostra maior contribuição das variações Fru e Glc no primeiro eixo e do amido no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra um posicionamento ortogonal com a variável amido, pelo que não haveria efeito de um com ou outro.

Em outra matriz de dados contendo as variáveis Sac (s), Glc (g), Fru (f) e Amido (A) em caule (Figura 33B, tabela no apêndice 10 F), aos 95 dap por amostra dos tratamentos eCO₂.aT (ea), eCO₂.eT(e), aCO₂.aT (a) e aCO₂.eT (ae) resultou no arranjo contendo 93% da variância total nos dois primeiros eixos, sendo 68% no primeiro eixo e 25 % no segundo eixo. A composição dos dois primeiros eixos mostra maior contribuição das variações Sac, Fru e Glc no primeiro eixo e de amido no segundo eixo. A disposição das variáveis no primeiro eixo mostra posicionamento ortogonal com a variável amido, em que não haveria efeito de um com ou outro.

Figura 32A: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (g: Glc, f: Fru, s: Sac, A amido) em raízes aos 68 dap e os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Linhas de cores amostram progressão no tempo das distribuições dos horários.

Figura 32B: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (g: Glc, f: Fru, s: Sac, A amido) em raízes aos 95 dap, os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais (componente 1 e 2). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Linhas de cores amostram progressão no tempo das distribuições dos horários.

Figura 33A: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (g: Glc, f: Fru, s: Sac, A amido) em caule aos 68 dap e os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Linhas de cores amostram progressão no tempo das distribuições dos horários.

Figura 33B: Interpolação entre os dois primeiros eixos resultantes da ACP mostrando a relação entre as variáveis mensuradas (g: Glc, f: Fru, s: Sac, A amido) em caule aos 95 dap e os centróides para cada tratamento (a; ae; e; ee). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Linhas de cores amostram progressão no tempo das distribuições dos horários.

3.5 DISCUSSÃO

3.5.1 Desenvolvimento de plantas juvenis de jatobá.

Como foi evidenciado nos resultados supracitados, existe uma mudança na condição geral de carboidratos nas plantas juvenis de jatobá, a qual coincide com seu desenvolvimento, sendo que na fase linear de crescimento aos 68 dap existe maior conteúdo de carboidratos do que aos 95 dap, especialmente no que se refere ao Sac (carboidratos de translocação fonte-dreno) e amido (carboidrato de reserva). Como esta foi uma característica constante em todos os tratamentos, aqui é sugerido ser possível que aos 68 dap, as plântulas de jatobá acumulem como reservas, carboidratos formados como produto do catabolismo pós-germinação de XG ou da fotossíntese, que são usados na etapa final de crescimento da fase linear. As folhas das plantas de jatobá possuem enverdecimento tardio. Esta característica foi descrita como uma estratégia de proteção às intensidades altas de luz no sub-bosque, local de estabelecimento natural de plântulas de jatobá. Por essa condição, o sistema fotossintetizante de folhas de jatobá terminaria de se estabelecer depois da expansão total das folhas, razão que justificaria o acúmulo de amido no caule durante a fase de pós-germinação, como uma fonte de carboidratos suplementar para serem usados durante a autotrofia inicial.

3.5.2 Comparação da produção de carboidratos nos tratamentos e nos ciclos diários.

Mudanças no conteúdo de carboidratos em ciclos diários podem subministrar informações que nos possibilitariam compreender a partição de carboidratos numa fase vegetal determinada, que em ciclos maiores quando estes elementos desaparecem o ficariam disfarçados (WALTER *et al.* 2005).

No ciclo diário foi identificado que em folhas do tratamento controle às 16 horas se apresenta um pico de produção de Sac e Glc, mas não de amido. Já nos tratamentos com elevado CO₂, mantêm-se a elevada produção de Sac e Glc, aliado a um aumento de amido, comportamento independente do regime de temperatura aplicado. Este padrão pode ser interpretado como uma mudança de fase ou deslocamento de fase na produção de amido, como efeito das elevadas concentrações de CO₂. Este comportamento já tinha sido evidenciado com Glc em folhas jovens de *Populus* e de soja, (WALTER, 2005; ROGERS, 2006, respectivamente) e foi correlacionado com o horário de expansão foliar durante o ciclo diário. Folhas completamente expandidas e autótrofas destinariam seus fotoassimilados principalmente para exportar aos órgãos dreno em forma de Sac. N

apresente pesquisa, este aumento na síntese de amido nos tratamentos com eCO₂ no final do entardecer seria um indicador de excesso de fotoassimilados (triose-fosfato) no cloroplasto, ao não poderem ser intercambiados com o citosol para serem sintetizados em Sac. Este padrão foi observado em folhas fonte aos 68 dap e aos 95 dap, o que significa que esta resposta foi independente da disponibilidade de reservas cotiledonares. No ciclo diário, também foi observado que o conteúdo de Sac do tratamento com eCO₂-aT se mantém estável durante a noite.

O aumento no conteúdo de amido foliar é uma das respostas mais difundidas na alteração metabólica em plantas crescidas em elevadas concentrações de CO₂. Nesta pesquisa, os tratamentos com elevado CO₂ apresentaram sim um aumento significativo do conteúdo diurno de amido, que é degradado à noite, já desde os 68 dap. Diferentemente de outros trabalhos que reportam maior produção de amido constante ao longo de um ciclo diário (AINSWORTH, 2006; WALTERS, 2005; ROGERS, 2005), nos nossos experimentos os tratamentos com eCO₂ só apresentam diferenças significativas com os tratamentos com aCO₂, a partir das 16h do ciclo diário. Outros relatos informam que em horários de expansão foliar ou ao longo de estações crescimento não foram encontradas diferenças significativas na produção de amido entre os tratamentos com eCO₂ e os crescidos em aCO₂ (ROGERS, 2005). Os autores atribuem o diferencial nas respostas ao metabolismo da planta, sendo que quando este é alto não é evidente o acúmulo extra de amido nos tratamentos com eCO₂. É possível que, em jatobá, o acúmulo de amido em eCO₂-aT mas não tão intenso em eCO₂-eT esteja relacionado ao fato de que em eT o crescimento é estimulado e o carbono é direcionado para a síntese de parede celular ao invés de ser acumulado como amido. No presente trabalho, ficou claro que o caule serve como órgão de armazenamento transitório de reserva (amido) durante o período inicial de crescimento.

3.5.3 Comparação da produção de carboidratos nas fases de desenvolvimento.

Na presente pesquisa, foi evidenciado que as plântulas de jatobá aos 68 dap e aos 95 dap possuem maior conteúdo de amido e de Sac em todos os órgãos avaliados: Os maiores níveis de Glc foram observados em raízes e caule aos 68 dap.

Durante o dia, os níveis de Sac e amido aumentam graças à fotossíntese. À noite, sem produção de fotoassimilados, os níveis de amido diminuem para suprir a demanda de substrato que garanta os diferentes processos metabólicos na planta toda. Possivelmente, a

necessidade gerada pelo dreno de crescimento, especialmente aos 68dap, faz com que seja aumentada a síntese de sacarose em detrimento dos níveis de amido diurno, sendo que estes não sejam comparativamente representativos em folhas dos tratamentos em concentrações de CO₂ ambiente.

Os elevados níveis de Sac aos 68 dap, presumivelmente são produto da mobilização de carboidratos de reserva de parede celular das sementes (xiloglucano (XG)), tanto como produto da fotossíntese ativa. SANTOS e BUCKERIDGE (2004) ao descrever o processo de mobilização de XG, o correlacionam positivamente às eT. Assim, aos 68 dap a produção líquida de Sac é maior nos tratamentos com eT, aos 41% no eCO₂-eT e aos 49% no aCO₂-eT, em respeito do tratamento controle (Figura 25).

Aos 68 dap, as folhas completamente expandidas apresentam, dos açúcares solúveis, maior conteúdo de sacarose, o que sugere produção e exportação deste carboidrato das folhas para os órgãos dreno (caule e raízes). Aos 95 dap, como consequência da diminuição da força dreno de crescimento, o amido aumenta. Maiores taxas de sacarose trazem consigo maior presença de hexose fosfato, as quais atuariam como sinalizadores, mais do que a sacarose, ativando um sinal para inibir a fotossíntese (GOLDSCHMIDT *et al.*, 1992; VON SCHAEWEN *et al.*, 1990). MOORE *et al.* (1999) propuseram que o fluxo de hexose da hexoquinase envia um sinal ao núcleo, o que presumivelmente altera a transcrição de genes fotossintéticos. Em geral, pela sensação do açúcar, *sugar sensing*, a deficiência de carboidratos aumenta a expressão de genes promovendo a fotossíntese, a mobilização de reservas e os processos de exportação, enquanto o fornecimento abundante de carbono promove a expressão de genes de estocagem e utilização (KOCH, 1996; HALFORD E PAUL, 2003; ROMANOVA, 2005). As atividades dreno como crescimento e armazenamento são expressas quando há disponibilidade de carbono.

Nas raízes os níveis de Sac e amido são os menores encontrados no período de estudo. Entretanto, os altos níveis de Glc aos 68 dap coincidiriam com a maior alocação de biomassa neste órgão (capítulo 1). Porém, as raízes das plantas do tratamento com eCO₂-eT apresentaram os menores níveis de Glc ao longo do ciclo diário (Figura 22), o que coincide com o fato de que ocorreu neste tratamento a menor alocação de biomassa nas raízes.

A reação da sacarose-6-fosfato sintase foi identificada como o passo chave no controle da síntese de sacarose (HUBER & HUBER, 1996). O aumento dos níveis de sacarose-fosfato sintase (SPS), avaliado em plantas transgênicas, tem um impacto forte na

fotossíntese e no metabolismo de carboidratos, assim com o aumento de biomassa em várias espécies. Há uma expressão ótima de SPS que conduz a uma produção máxima, sendo que uma maior ou uma menor expressão, afetam a produção final. Plantas que super expressam a SPS apresentam maiores razões sacarose/amido nas folhas. Níveis elevados de hexose fosfato e níveis reduzidos de fosfato no citosol resultam em altas taxas de fotossíntese, e aumentam a síntese de sacarose. De modo inverso, a enzima é ineficiente quando o nível de hexose fosfato cai em resposta a menores taxas de fotossíntese, um processo que é acompanhado por um aumento no nível de fosfato no citosol (SHARKEY *et al.*, 2004).

Como já foi mencionado, no geral as plantas em eCO₂ não tomam a máxima vantagem desta condição. Tem sido hipotetizado que limitações na síntese de produtos finais e a sensação de açúcar, *sugar-sensing*, sejam mecanismos importantes para a regulação de respostas às eCO₂. A exportação diurna de hexose aumenta durante o dia e diminui durante à noite. A sensação da glicose pela hexoquinase depende da taxa à que a glicose é fosforilada, e não da quantidade de glicose presente na folha. A degradação de amido produzindo glicose e maltose é percebida pela hexokinase através da via da maltose para síntese de Sac. Assim, a planta consegue alterar a razão amido/Sac. Seguindo o fluxo de carboidratos através da hexokinase citosólica, uma maior ou menor exportação de carbono à noite pode gerar diferença no desempenho da planta (SHARKEY *et al.*, 2004).

A razão amido/Sac em folhas do tratamento eCO₂-aT apresentou à noite os maiores valores (Figura 27), assim como o conteúdo noturno de Sac se manteve constante (Figura 21) no tratamento. Em condições de eCO₂, caso a planta exporte mais açúcares durante o dia (tratamentos com eT desta pesquisa), este excesso não será percebido pela hexoquinase. Mas se há aumento na exportação noturna, produto de aumento no acúmulo diurno de amido, a hexoquinase sente o excesso e as plantas terão redução em suas enzimas fotossintetizantes (SHARKEY *et al.*, 2004) o que conduz à aclimatação da fotossíntese. Considerando-se os resultados da presente pesquisa é possível que exista um alcance ótimo na razão amido/Sac noturna que não seja sentido pela hexoquinase, já que o menor balanço líquido noturno da razão amido/Sac se apresentou no tratamento controle e o maior no tratamento eCO₂-aT. Os valores intermediários se apresentaram nos tratamentos com maior crescimento que foram eCO₂-eT e aCO₂-eT (ver capítulo 1). Outro fator importante é que esses autores observaram que elevadas temperaturas, sempre que não sejam lesivas, favorecem redução na formação de amido, e por sua vez da razão amido/Sac.

Uma visão geral do metabolismo de carbono, especificamente de carboidratos não estruturais aos 68 dap e aos 95 dias de crescimento, pode ser observada nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

Assim, tomando como referencia o tratamento controle, as plântulas de jatobá num cenário com aCO₂-eT e sem limitação de recurso hídrico, apresentam uma produção maior de Sac nas folhas (Figura 29), que indica elevadas taxas de translocação de recursos, o que permite prever um maior crescimento. No entanto, este maior crescimento leva a uma notável redução de suas reservas de amido, nos dois períodos avaliados (Figura 28 e 29).

Plântulas de jatobá que crescem num cenário com elevadas concentrações de CO₂ (eCO₂-aT) apresentam maior conteúdo de amido e menor conteúdo de Sac na folha. O padrão manteve-se nos dois períodos, o que nos faz supor que o mecanismo de controle metabólico leve a maior acúmulo e pouca degradação de amido, e que simultaneamente gere a diminuição da produção e translocação de Sac das folhas para os órgãos dreno, e por sua vez, ao menor crescimento.

No último cenário avaliado, eCO₂-eT, o conteúdo de carboidratos das plântulas jatobá mantém o padrão do tratamento eCO₂-aT, com a diferença que existe um aumento no conteúdo de Sac em folhas. O conteúdo de sacarose na folha é determinado pelo balanço entre a razão das taxas de síntese, exportação a tecidos dreno e as taxas de respiração no escuro (ROMANOVA, 2005). O conteúdo de amido nas suas folhas pode sugerir um estímulo da via ADP-Glc. Por outro lado, o tratamento eCO₂-eT também apresentou crescimento maior, com o que se presume que a eT favorece a respiração mitocondrial, ao aumentar os drenos e ativar a via UDP-Glc, maior conteúdo de celulose em folhas (dados não apresentados), o que produziria mobilização maior dos carboidratos reserva, o que resultaria no maior crescimento, no alcance de temperatura observadas nesse experimento (Figura 31).

As análises de componentes principais evidenciaram a ausência de segregação explícita dos tratamentos ao longo das variações nos dois primeiros eixos, o que mostra a contribuição dos outros fatores de variância associada a outras contribuições de variáveis, as quais contribuem negativamente à variância total. Este comportamento foi observado aos 68 dap e aos 95 dap.

A progressão no tempo das distribuições dos horários em ACP dos órgãos em ambos dos períodos foi evidente porque cada horário seguiu um padrão,

independentemente do tratamento analisado. Porém, não foi evidente o comportamento comum entre os órgãos nem entre as datas de coletas.

Assim, na presente pesquisa, com maior taxa de translocação de Sac nesta fase, gerada pela maior força do dreno, faria com que as plântulas crescidas em eT satisfizessem a demanda do dreno de crescimento com elevado conteúdo de Sac em todos os órgãos, o que gerou maior crescimento destas plantas. As plântulas do tratamento com eCO₂-eT, além de contarem com maior produção e exportação de Sac, a atmosfera enriquecida com CO₂ faria com que o fluxo de carbono fosse maior e as plântulas conseguissem armazenar também mais amido em seus órgãos, ao serem comparadas com às plântulas crescidas no tratamento só com eT, cujas reservas de amido sempre foram as menores de todos os tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, ELIZABETH A, ROGERS, ALISTAIR, VODKIN, LILA O, WALTER, ACHIM AND SCHURR, ULRICH. 2006. The Effects of Elevated CO₂ Concentration on Soybean Gene Expression. An Analysis of Growing and Mature Leaves. *Plant Physiology* **142**: 135-147
- AMARAL, L., GASPAR, M., COSTA F., PAULA M., AIDAR, M. BUCKERIDGE, M., 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* **34** (4): 425-431
- BUCKERIDGE, M. S., AIDAR, M. P. M., MARTINEZ, C. SILVA, E. 2008. Respostas de plantas às mudanças climáticas globais. Em: Buckeridge, M. S. (Ed) *Biologia e Mudanças climáticas no Brasil*. Ed. Rima. São Carlos, pp. 295
- CASPAR, T. HUBER, S. C., SOMERVILLE, C., 1985. Alterations in growth, photosynthesis and respiration in starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L) deficient in chloroplasts phosphoglucomutase activity. *Plant Physiology* **79**: 11-17.
- CASPAR, T., LIN, T.-P., KAKEFUDA, G., BENBOW, L., PREISS, J., SOMMERSVILLE, C., 1991. Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiology* **95**: 1181 – 1188.
- COHEN J., 1988. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale: Erlbaum.
- DRAKE, B. G., GONZÁLEZ-MEIER, M. A., LONG S. P. 1997. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 609-639.
- DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. Smith, F., 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-355.
- FLUGGE, U. I., HAUSLER, R. E., LUDEWIG, F., FISCHER, K., 2003. Functional genomics of phosphate antiport systems of plastids. *Physiologia Plantarum* **118**: 475-482.

- GEIGER, D. R. , SHIEH, W.-j., YU, X.-M., 1995. Photosynthetic carbon metabolism and translocation in wild-type and starch efficient mutant *Nicotiana sylvestris* L. *Plant Physiology* **107** 507-514.
- GOLDSMITHDT E. E., HUBER, S. C., 1992. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* **99**: 1443-1448.
- HALFORD, N. G., PAUL, M. J., 2003. Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnology Journal* **1**: 381-398.
- HAMILTON, J. G., DERMODY, O., ALDEA, M. ZANGERL, A. R., ROGERS, A., BERENBAUM, M. , DELUCIA, E. H. 2005. Anthropogenic changes in tropospheric composition increase susceptibility of Soybean to insect herbivory. *Environment entomology* **34**: 479-485
- HUBER S. C., 1986. Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annual Review of Plant Biology* **37**:233-246.
- HUBER S. C., HUBER, J. L., 1996. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 431-444.
- KOCH, K. E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology* **47**: 509–540.
- LAMBERS, H. CHAPIN, F. PONS T. 2008. Plant Physiological Ecology. Springer Verlag. United States of America.
- LONG, S.P., AINSWORTH, E.A., ROGERS, A., ORT, D.R. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: Plants face the future. *Annual. Review of Plant Biology* **55**: 591-628.
- MAJEROWICS, N., 2008. Fotossíntese. Em: Kerbaux B., G. (Ed) Fisiologia Vegetal. Segunda Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp. 431.

- MERCIER, H., 2008. Auxinas. Em: Kerbaudy B., G. (Ed) Fisiologia Vegetal. Segunda Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp. 431.
- MOORE B. D., CHENG S.-H., RICE J. e SEEMANN J. R. 1998. Sucrose cycling, rubisco expression and prediction of photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Cell and Environment* **21**: 905-915.
- MOORE B. D., CHENG S.-H., SIMS, D. e SEEMANN J. R. 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell and Environment* **22**: 567-589.
- MOORE B. D, ZHOU L., ROLLAND F., HALL Q., CHENG W. H., *et al.* 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300** : 332–336.
- OACHEL, W. C., COWLESS, S. GRULKE, N., HASTINGS, S. J., LAWRENCE, B. *et al.* 1994. Transient nature of CO₂ fertilization in Arctic tundra. *Nature* **371**: 500-503.
- POORTER H., BERKEL Y., BAXTER R., HERTOOG J., DIJKSTRA P., GIFFORD R. M., GRIFFIN K. L., ROUMET C., ROY J. WONG S. C., 1997. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C-3 species. *Plant Cell and Environment* **20**: 472–482
- POORTER, H. NAGEL O., 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 595-607.
- SANTOS, H., BUCKERIDGE, M. S., 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany* **94**:819-830
- SAGE, R.F. 2002. How Terrestrial Organisms Sense, Signal, and Response to Carbon Dioxide? *Integrative and Comparative Biology* **42**: 469-480.

- SHARKEY, T. D., LAPORTE, M., LU. Y., WEISE, S., WEBER, A.P.M., 2004. Engineering plants for elevated CO₂: A relationship between starch degradation and sugar sensing. *Plant Biology* **6**: 280-288.
- STITT, M., 1990. Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Biology* **41**: 153-185.
- STITT, M., 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* **14**: 741-762.
- ROGERS, A., AINSWORTH, E., BERNACCI, C. J., GIBON, Y., STITT, M., LONG P, S., 2005. The response of plant carbohydrates to elevated CO₂, what have we learnt from FACE studies? In: Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global perspectives. A. van der Est and D. Bruce Eds. pp 968.
- ROGERS, A. AINSWORTH, E., KAMMANN, C., 2006. FACE Value: Perspectives on the future of free-air CO₂ enrichment studies. In: NOSBERGER J., LONG, S. P., NORBY R. J., STITT, M. HENDREY G. R. BLUM H. (Eds). *Ecological Studies* Vol. 187.
- ROLLAND, F., BAENA-GONZÁLEZ, E., SHEEN, J. 2006. Sugar sensing and signal in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-799.
- ROMANOVA, A. K. 2005. Physiological and biochemical aspects and molecular mechanisms of plant adaptation to the elevated concentration of atmospheric CO₂. *Russian Journal of Plant Physiology* **52**: 112–126.
- TANG, G.-Q. LUSCHER, M., STURM, A. 1999. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* **11**: 177-189.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. 2009. Fisiologia Vegetal. Quarta ed. Artmed. Portoalegre, pp. 848.
- TONINI, P.P., PURGATO, E., BUCKERIDGE, M.S. (2010) Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilisation of storage proteins and carbohydrates in

seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Annals of Botany*. doi:10.1093/aob/mcq159

VON SCHAEWEN A. STITT M., SCHMIDT R., SONNEWALD U., WILLMITZER L., 1990. Expression of yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco in *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth plant phenotype of transgenic tobacco plants. *Embo journal* **9**: 3033-3044.

WALTER, A., CHRIST, M. BARRON-GAFFORD, G., GRIEVE K. A., MURTHY R., RASCHER, U., 2005. The effect of elevated CO₂ on dial leaf growth cycle, leaf carbohydrate content and canopy growth performance of *Populus deltoides*. *Global Change Biology* **11**, 1207–1219.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Nesta pesquisa foi evidenciado para *Hymenaea courbaril* que:

1. O crescimento é estimulado a mais por concentrações elevadas de gás carbônico e elevadas temperaturas em conjunto, que quando cada um destes fatores atua individualmente.
2. Nas plantas crescidas nos tratamentos sob elevada temperatura há um maior investimento em área foliar total.
3. As elevadas concentrações de gás carbônico quando acompanhadas de elevadas temperaturas anulam a amortização da mobilização de XG observada em condições de elevadas concentrações de CO₂, só.
4. Durante o processo de pós-germinação se apresentam dois padrões de desenvolvimento: crescimento linear e crescimento estabilizado, dependentes estes do fornecimento de carboidratos.
5. As plantas de jatobá acumulam principalmente amido como reserva transitória em folhas, caule e raízes.
6. O órgão principal de acúmulo de amido muda com a fase de crescimento da planta. Durante o período de pós-germinação as plantas acumulam grandes quantidades de amido no caule, o que junto à fotossíntese, permite o crescimento linear. Uma vez estas reservas se esgotam, o crescimento se estabiliza e passam a ser as folhas o órgão com maior acúmulo de amido.
7. Nas folhas é favorecida a partição para Sac (dos carboidratos solúveis), em plantas crescidas em condições de elevada temperatura, independentemente do regime de CO₂.

CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Hymenaea courbaril L., jatobá, espécie classificada como secundária tardia no processo de sucessão ecológica, é um importante modelo de estudo para conhecer as respostas de espécies do Neotrópico às mudanças de fatores ambientais.

Os principais resultados obtidos em cada um dos tratamentos – cenários estudados nesta pesquisa estão resumidos na figura 34.

Segundo as TCR, as plantas sob eCO₂ e eT foram as que mais cresceram. Em segunda ordem do crescimento encontram-se as plantas submetidas à eCO₂ e aT seguidas das submetidas à aCO₂ e eT. E por último estão as plantas do tratamento controle que cresceram menos. As diferenças de desenvolvimento entre os tratamentos foram estabelecidas na fase linear e mantidas pelo menos até os 240 dap, tempo total de acompanhamento desta pesquisa. Esta observação faz desta fase um período importante de estudo para identificar pormenorizadamente os processos metabólicos alterados pelas eCO₂ e a eT que aqui acontecem.

Assim, particularmente as plantas submetidas à eCO₂ e a eT cresceram mais rápido, o que é corroborado com uma sutil alteração do padrão de alocação de biomassa do tratamento, favorecida por plantas maiores.

É sabido que o conteúdo elevado de carboidratos não estruturais pode reduzir, além das enzimas fotossintéticas, o conteúdo de clorofilas. Aos 68 dap as folhas completamente expandidas de plantas crescidas sob eCO₂ e aT apresentam um 31% menos de conteúdo de Chls totais que as plantas do tratamento controle. Por sua vez, as folhas completamente expandidas de plantas crescidas sob eCO₂ e eT possuem aos 68 dap o mesmo conteúdo de clorofilas que as folhas das plantas crescidas sob eCO₂ e aT aos 95 dap. Neste estudo, também foi observado menor conteúdo de nitrogênio foliar total nas plantas crescidas sob eCO₂ e aT.

Graças às análises de componentes principais foi evidenciado que no tratamento eCO₂ e aT há diminuição do conteúdo de nitrogênio, correlacionado com menor conteúdo de clorofilas totais e baixa razão F_v/F_M, todos os indicadores de menor padrão no uso da luz.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, junto aos conhecimentos prévios sobre o metabolismo de carboidratos de *Hymenaea courbaril* L, fizeram evidente que as eCO₂ e a eT atuam de forma sinérgica favorecendo um aumento no metabolismo geral das plantas, um aumento na taxa de degradação de XG, aumento no investimento inicial em área foliar,

aumento na temperatura ótima de assimilação de CO₂, diminuição da razão amido/Sac à noite e um favorecimento da partição de fotoassimilados para Sac, o que se traduz em maior crescimento de suas plantas.

O desenvolvimento inicial de plantas de jatobá permitiu identificar duas fases de crescimento, que estão determinadas pelas suas fontes e reservas de carbono. Após a germinação e até ao redor dos 85 dap as plantas de jatobá apresentam padrão de crescimento linear, sustentado com os carboidratos, produtos da mobilização de XG de reserva das sementes, com os fotoassimilados produtos da autotrofia e finalmente com a grande quantidade de reservas de amido acumuladas no caule. Uma vez esgotadas as reservas caulinares, as taxas de crescimento das plantas juvenis de jatobá diminuem, dando lugar a uma fase de crescimento estabilizado.

Como é sabido, em jatobá a mobilização de XG de reserva é conduzida primeiramente às folhas em desenvolvimento e as elevadas temperaturas favorecem o processo de mobilização. A atmosfera enriquecida de CO₂ amortiza a mobilização de XG em plântulas de jatobá, porém as eT junto às eCO₂ parecem anular este efeito. Com esta pesquisa foi evidenciado que as eCO₂ e a eT se associam sinergicamente e favorecem o desenvolvimento de plantas juvenis de jatobá. Uma pequena diferença inicial no investimento em área foliar, representado em área foliar total e na fração folhas, se traduz numa maior taxa de assimilação que leva a um sucessivo aumento de massa e assim, a um crescimento mais rápido (lei dos juros compostos).

Em essência, nossa pesquisa indica que plantas de jatobá apresentam melhores respostas de desenvolvimento, quando submetidas à 760 ppm de concentração de CO₂ e a 3°C a mais na temperatura ambiente, em ausência de estresse hídrico. Isto nos permite inferir que o uso desta espécie em programas de reflorestamento mantém sua validade, considerando a sua capacidade de resposta positiva às condições preocupantes das atuais e previstas mudanças climáticas.

Figura 34: Resumo gráfico geral do desenvolvimento e das respostas às elevadas concentrações de CO₂ (eCO₂) e à elevada (eT) temperatura, simultânea e isoladamente, de *Hymenaea courbaril* L. Em cinza, descrição da mobilização de XG dos cotilédones (K) para os eófilos (E) em plântulas de jatobá (AIDAR *et al*, 2002; SANTOS e BUCKERIDGE, 2004b). Em cores, plantas juvenis de jatobá e suas respostas de crescimento, desenvolvimento e de partição de carboidratos não estruturais mais representativas aos 68 dap e aos 95 dap.

RESUMO

O enriquecimento da atmosfera com CO₂, produto principalmente das atividades humanas, e a consequente elevação na temperatura ambiente têm se revelado como importantes fatores que afetam a produtividade das plantas.

Hymenaea courbaril L. é uma espécie classificada como secundária tardia no processo de sucessão, de reconhecida importância ecológica por sua ampla distribuição ao longo das Américas. Esta árvore tem sido usada como planta modelo no estudo da mobilização de carboidratos de reserva de parede celular de cotilédones, no estudo das respostas de espécies do Neotrópico às elevadas concentrações de CO₂, entre outras pesquisas. É conhecido que em jatobá a mobilização de XG de reserva é conduzida primeiramente às folhas em desenvolvimento. Às elevadas temperaturas favorecem o processo de mobilização. Também é sabido que as elevadas concentrações de CO₂ diminuem a mobilização de XG dos cotilédones na fase de pós-germinação.

O enfoque deste trabalho foi direcionado ao estudo do desenvolvimento inicial de plantas de jatobá e à compreensão dos processos fisiológicos e do metabolismo de carbono envolvidos nas respostas de plantas juvenis às elevadas concentrações de CO₂ e à eT. Com esta pesquisa foi evidenciado que estes fatores se associam sinergicamente e favorecem o desenvolvimento de plantas juvenis de jatobá, acelerando o amadurecimento das folhas de enverdecimento tardio através de um maior e mais rápido acúmulo de clorofilas. Tal interação também parece anular a amortização da mobilização de XG e a aclimação da fotossíntese, promovidos pelas eCO₂.

No presente estudo também foi evidenciado que as elevadas concentrações de CO₂ favorecem as taxas de assimilação de CO₂ e à produção de carboidratos não estruturais, como amido. As elevadas temperaturas aceleram o metabolismo das plantas de jatobá, sendo que o aumento no metabolismo depende do conteúdo de carboidratos. As eT favorecem a síntese de Sac, diminuem a produção de amido, portanto, diminuem a razão Amido/Sac à noite. A estratégia metabólica de jatobá reduziria a sensação por parte da hexoquinase do fluxo de hexoses, com o que se atenuaria o abatimento da síntese de enzimas da fotossíntese (aclimação da fotossíntese).

O desenvolvimento inicial de plantas de jatobá permitiu identificar duas fases de crescimento, que estão determinadas pelas suas fontes e reservas de carbono. A primeira fase é de crescimento linear, e conta com os carboidratos produto da mobilização de XG, a

fotossíntese e um enorme armazenamento de amido no caule, este último usado possivelmente como fonte complementar de carbono para a planta até o completo amadurecimento do sistema fotossintetizante.

A segunda fase é de estabilização do crescimento, uma vez que são esgotadas as reservas de amido do caule. Neste ponto, a força do dreno de crescimento diminui e aumenta o acúmulo de amido nas folhas completamente expandidas.

Considerando-se as estratégias adaptativas de jatobá, em ausência de estresse hídrico, as condições ambientais de eCO₂ até 760ppm e eT até 3°C promovem o crescimento de plantas juvenis de *H. courbaril*.

ABSTRACT

The continuous rise in anthropogenic CO₂ concentration has the potential to lead to an approximate 3°C increase in temperature worldwide and these is thought as being important factors that affect the plants productivity and distribution.

Hymenaea courbaril L., jatobá, is a late-successional species that is recognized by its ecological importance and by their distribution from central America to the south of Brazil. This plant species has been used as a model for the studies of cell wall storage carbohydrates mobilization, as well as for the studies of Neotropic species responses to enrichment CO₂ atmosphere. It is known that XG mobilization products are driven primarily to expanding leaves. Elevated temperatures promote this mobilization process.

In the present work, the initial development of seedlings of *Hymenaea courbaril* was investigated in order to understand aspects of physiological behavior and carbon metabolism under elevated CO₂ concentrations (eCO₂) and/or elevated temperature (eT, +3°C). The results showed that the eCO₂ and eT, when associated, actively improved *H. courbaril* L. young plants development, promoting the maturation of its delayed greening leaves with a higher and a faster chlorophyll accumulation. Such interaction seems to block the reduction of XG mobilization and the photosynthesis acclimation, previously observed to be promoted by the elevated CO₂ atmosphere.

It was observed that eCO₂ increases net assimilation CO₂ rates and the non structural carbohydrates production, like starch. Elevated temperatures improved the metabolism in general and this seems to depend on the carbohydrates status. Elevated temperatures enhanced the sucrose synthesis, diminished the starch production, and the starch/sucrose ratio during the night. The metabolic features observed for *Hymenaea courbaril* are likely to be associated the sugar sensing mechanism, which reduces the photosynthetic enzymes synthesis reduction (photosynthesis acclimation).

The jatoba's initial development showed two phases determined by its storage compounds in the cotyledons. The first is a linear growth period during which XG mobilization, photosynthesis and a high starch level is stored in the stem, the latter possibly used as a supplementary carbon source until photosynthesis is fully established.

The second phase is growth stabilization, once the stem starch reserves are utilized. At that point, the growth sink forces diminish and consequently an increased concentration of starch is observed in the completed expanded leaves.

Considering those strategies, without water stress, the conditions of elevated CO₂ and elevated temperature promote growth of young *H. courbaril* plants.

APÊNDICES

Apêndice 1: CONDIÇÕES AMBIENTAIS DO CRESCIMENTO

Tabela A Temperaturas mínima, máxima e média dentro das CTA com temperatura ambiente (aT) e com temperatura elevada (eT), durante o período de crescimento das plantas de *Hymenaea courbaril* –jatobá, no ano 2008.

T (°C)	Abril e Maio		Junho		Julho		Agosto		Setembro		Outubro		Novembro	
	aT	eT	aT	eT	aT	eT	aT	eT	aT	eT	aT	eT	aT	eT
Temperatura mínima noturna (°C)	18	21	9	11	9	11	12	15	12	15	12	15	14	17
Temperatura máxima diurna (°C)	33	38	30	33	30	34	38	41	42	45	42	45	43	46
Temperatura média em 24 horas (°C)	26,1	29,2	17,1	20,4	17	18,6	20,3	23,5	20,5	24	23	26	23,7	26,9

Tabela B Umidade relativa mínima, máxima e média dentro das CTA com temperatura ambiente (aT) e com temperatura elevada (eT), durante o período de crescimento das plantas de *Hymenaea courbaril* –jatobá, no ano 2008.

U. R (%)	Abril		Julho		Novembro	
	aT	eT	aT	eT	aT	eT
Umidade relativa mínima (diurna)	18	19	39	32	30	21
Umidade relativa máxima (noturna)	95	83	92	87	92	78
Umidade relativa média	60,6	50,1	76,4	67,3	70,52	57,6

Tabela C Temperaturas mínima, máxima e média dentro das CTA com temperatura ambiente (aT) e com temperatura elevada (eT), no período de crescimento das plantas de *Hymenaea courbaril* –jatobá, durante outono de 2009.

T (°C)	Abril e Maio		Junho		Julho	
CTA	aT	eT	aT	eT	aT	eT
Temperatura mínima noturna (°C)	13,2	16	11	14,1	16,2	19
Temperatura máxima diurna (°C)	34,9	38	33	36	31,4	34
Temperatura média em 24 horas (°C)	22,3	25,9	20,4	23,2	22,1	25

Tabela D Umidade relativa mínima, máxima e média dentro das CTA com temperatura ambiente (aT) e com temperatura elevada (eT), no período de crescimento das plantas de *Hymenaea courbaril* –jatobá, durante outono de 2009.

U. R (%)	Abril e Maio		Junho		Julho	
CTA	aT	eT	aT	eT	aT	eT
Umidade relativa mínima (diurna)	40	30	36,1	32	46,3	35,3
Umidade relativa máxima (noturna)	85	75	87,2	80	89,2	82,9
Umidade relativa média	70,3	58	71,5	62,2	77	65,5

Apêndice 2: Descrição do padrão de crescimento de plantas juvenis de jatobá, usando como referente o comportamento da A. área foliar total e B. número de folhas, durante 240 dias após o plantio sob os tratamentos eCO₂-aT, eCO₂-eT, aCO₂-aT (tratamento controle) e aCO₂-eT, do experimento realizado em 2008. A seta vermelha indica o padrão de crescimento.

A. Área foliar total

B. Números de folhas

Apêndice 3

Figura 1: Curvas de luz de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. representativas de cada tratamento sob A. eCO₂-aT, B. eCO₂-eT, C. aCO₂-aT (tratamento controle) e D. aCO₂-eT aos 68 dap

A

B

C.

D.

Figura 2: Curvas de luz de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. representativas de cada tratamento sob A. eCO₂-aT, B. eCO₂-eT, C. aCO₂-aT (tratamento controle) e D. aCO₂-eT aos 95 dap

A

B

C.

D.

Apêndice 4: Resumo de ANOVA dos resultados de crescimento e alocação de biomassa de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob atmosfera enriquecida de CO₂ e elevada temperatura aos 68 e aos 95 dap; significancia indicada por * P ≤ 0,15, ** P ≤ 0,050 e *** P ≤ 0,001; ns não significante

	dap		[CO ₂]		Temp		dapx[CO ₂]		dapxTemp		[CO ₂]xTemp		dap x [CO ₂] x Temp	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Altura	2,73	0,106 **	3,97	0,053 *	12,44	0,001 ***	0,14	0,71 *	0,07	ns	4,89	0,033 **	0,31	n.s
Área foliar	6,99	0,012 *	15,27	0,000 ***	9,67	0,003 **	0,46	n.s	3,11	0,086 *	0,24	n.s	3,06	0,088 *
Biomassa	84,58	0,000 ***	26,12	0,000 ***	3,93	0,05 *	11,38	0,002 **	0,06	n.s	0,78	n.s	0,75	n.s
R:PA	21,97	0,000 ***	0,01	n.s	0,01	n.s	0,00	n.s	0,20	n.s	0,38	n.s	5,69	0,022 **
FF	82,34	0,000 ***	0,71	n.s	4,41	0,042**	0,73	n.s	13,21	0,001 ***	0,63	n.s	5,87	0,020 **
FC	15,65	0,000 ***	0,55	n.s	4,50	0,040**	0,03	n.s	3,12	0,085 *	1,75	n.s	0,05	n.s
FR	74,66	0,000 ***	0,02	n.s	0,18	n.s	3,72	0,06 *	9,63	0,004 **	0,01	n.s	10,21	0,003 **
C/N folhas	0,03	n.s	15,10	0,001 ***	12,11	0,003**	0,04	n.s	1,38	n.s	0,67	n.s	0,89	n.s
N folhas	0,64	n.s	17,02	0,000 ***	10,02	0,006 **	0,10	n.s	0,32	n.s	0,00	n.s	1,34	n.s

Apêndice 5: Resumo de ANOVA dos resultados de respostas fotossintéticas à luz, de trocas gasosas, eficiência quântica do fotossistema II e conteúdo de pigmentos na primeira folha completamente expandida de plantas juvenis de *Hymenaea courbaril* L. crescidas sob atmosfera enriquecida de CO₂ e elevada temperatura aos 68 e aos 95 dap; F e significancia indicada por * P ≤ 0,15, ** P ≤ 0,050 e *** P ≤ 0,001; ns não significante

	dap		[CO ₂]		Temp		dapx[CO ₂]		dapxTemp		[CO ₂]xTemp		dapx[CO ₂]xTemp	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Amax	3,17	0,094 *	144,84	<0,001 ***	4,27	0,055 *	1,836	ns	1,19	ns	,001	ns	3,40	0,084 *
A _i	0,07	ns	97,06	<0,001 ***	0,18	ns	1,543	ns	0,58	ns	,355	ns	0,38	ns
Re	41,90	<0,001 ***	1,70	ns	61,58	<0,001 ***	,274	ns	26,84	<0,001 ***	3,920	0,065 *	21,03	< 0,001 ***
QY	4,92	0,041**	30,77	<0,001 ***	0,00	ns	1,231	ns	0,00	ns	1,231	ns	11,08	0,004 **
PCL	37,75	<0,001 ***	10,55	0,005 **	42,68	<0,001 ***	,174	ns	25,83	<0,001 ***	,146	ns	5,97	0,027 **
PSL	0,44	ns	22,28	<0,001 ***	6,31	0,023 **	1,211	ns	0,24	ns	2,542	0,130*	0,00	ns
A _i	0,48	ns	12,51	0,003 **	4,92	0,04 **	2,71	0,119 *	3,64	0,07 *	2,11	ns	1,57	ns
gs	6,12	0,02 **	30,56	<0,001 ***	3,58	0,076 *	0,19	ns	3,05	0,10 *	2,56	0,129*	0,34	ns
ci	0,23	ns	66,72	<0,001 ***	0,30	ns	0,05	ns	0,29	ns	0,16	ns	0,41	ns
ci/ca	2,997	0,102 *	1,352	ns	,150	ns	,113	ns	,081	ns	,001	ns	,150	ns
E	45,761	<0,001 ***	51,12	<0,001 ***	77,227	<0,001 ***	5,047	0,039**	30,509	<0,001 ***	2,073	ns	2,485	0,13*
vpd	21,98	<0,001 ***	3,87	0,066 *	55,41	<0,001 ***	0,00	ns	1,49	ns	4,29	0,054 **	2,86	0,11*
EiUA	2,95	0,105 *	32,41	<0,001 ***	0,11	ns	0,03	ns	0,91	ns	0,07	ns	1,52	ns
EUA	10,12	0,006 **	49,45	<0,001 ***	24,10	<0,001 ***	0,00	ns	0,49	ns	13,76	0,001***	0,62	ns
Fv/Fm	0,04	ns	0,84	ns	15,30	<0,001 ***	,042	ns	7,51	0,015 **	2,481	ns	0,35	ns
Chla+b	32,778	<0,001 ***	0,16	ns	4,603	0,04 **	,022	ns	,607	ns	13,769	<0,001 ***	,031	ns

Apêndice 6: Análise estatístico de conteúdo de carboidratos não estruturais Sac, Glc, Fru e Amido. Modelo misto aperfeiçoado para comparar todas as repetições, considerando horários, concentrações de CO₂ (CO₂) e regime de temperatura (temp) como fatores fixos aos 68 dap. Cada órgão foi analisado independentemente. Os resultados de significancia (F, P) são indicados com * P ≤ 0,15, ** P ≤ 0,05 and *** P ≤ 0,001; ns não significativo.

FOLHA	SAC		GLC		FRU		AMIDO	
	F	sig	F	sig	F	sig	F	sig
horário	10,80	0,00***	8,03	0,00***	19,95	0,00***	5,24	0,00***
CO ₂	5,79	0,02**	1,32	ns	7,05	0,01**	30,55	0,00***
temp	4,21	0,04**	0,37	ns	0,28	ns	14,12	0,00***
horário * CO ₂	0,72	ns	1,50	ns	3,35	0,01**	4,97	0,00***
horário * temp	0,97	ns	2,94	0,01**	10,02	0,00***	2,09	0,07*
CO ₂ * temp	1,07	ns	0,68	ns	6,11	0,02**	2,26	0,14*
horário * CO ₂ * temp	0,34	ns	0,78	ns	2,03	0,08*	2,90	0,02**
RAIZ	SAC		GLC		FRU		AMIDO	
	F	sig	F	sig	F	sig	F	sig
horário	8,18	0,00***	2,71	0,02**	3,17	0,01**	3,55	0,00***
CO ₂	0,07	ns	6,36	0,01**	0,62	ns	0,97	ns
temp	0,34	ns	4,42	0,04**	1,88	ns	8,50	0,01**
horário * CO ₂	1,22	ns	1,99	0,08*	1,03	ns	0,56	ns
horário * temp	2,96	0,01**	1,92	0,09*	1,26	ns	1,34	ns
CO ₂ * temp	0,40	ns	0,59	ns	3,20	0,08*	2,13	0,15*
horário * CO ₂ * temp	1,22	ns	5,11	0,00***	4,59	0,00***	2,57	0,03**

CAULE	SAC		GLC		FRU		AMIDO	
	F	sig	F	sig	F	sig	F	sig
horário	5,79	0,00***	3,09	0,01**	1,30	ns	21,15	0,00***
CO ₂	0,00	ns	0,31	ns	1,40	ns	0,47	ns
temp	3,66	0,06*	0,01	ns	0,04	ns	14,85	0,00***
horário * CO ₂	1,56	ns	0,77	ns	2,62	0,03**	3,50	0,01**
horário * temp	0,86	ns	1,74	0,13*	1,23	ns	2,54	0,03**
CO ₂ * temp	1,21	ns	0,03	ns	0,42	ns	5,67	0,02**
horário * CO ₂ *	1,66	0,15*	1,39	ns	1,34	ns	2,00	0,08*
temp								

Apêndice 7: Análise estatístico de conteúdo de carboidratos não estruturais Sac, Glc, Fru e Amido. Modelo misto aperfeiçoado para comparar todas as repetições, considerando horários, concentrações de CO₂ (CO₂) e regime de temperatura (temp) como fatores fixos aos 95 dap. Cada órgão foi analisado independentemente. Os resultados de significancia (F, P) são indicados com * P ≤ 0,15, ** P ≤ 0,05 e *** P ≤ 0,001; ns não significativo

FOLHA	SAC		GLC		FRU		AMIDO	
	F	sig	F	sig	F	sig	F	sig
horário	11,46	0,00***	4,33	0,01**	57,38	0,00***	6,16	0,00***
CO ₂	4,48	0,04**	3,07	0,09*	228,65	0,00***	12,55	0,00***
temp	12,04	0,00***	2,58	0,12*	0,65	ns	7,74	0,01**
horário * CO ₂	2,86	0,05**	1,33	ns	30,90	0,00***	3,85	0,02**
horário * temp	3,83	0,02**	4,17	0,01**	100,03	0,00***	0,71	ns
CO ₂ * temp	0,02	ns	1,60	ns	157,79	0,00***	0,06	ns
horário * CO ₂ * temp	0,38	ns	1,42	ns	0,31	ns	0,11	ns
RAIZ	SAC		GLC		FRU		AMIDO	
	F	sig	F	sig	F	sig	F	sig
horário	5,10	0,01**	1,62	ns	4,35	0,01**	2,48	0,08*
CO ₂	1,16	ns	1,30	ns	0,92	ns	0,08	ns
temp	2,61	0,12*	4,91	0,03**	0,12	ns	1,72	ns
horário * CO ₂	4,93	0,01**	1,40	ns	1,91	0,15*	3,65	0,02**
horário * temp	2,25	0,10*	1,46	ns	0,81	ns	1,83	ns
CO ₂ * temp	0,04	ns	0,00	ns	0,12	ns	13,91	0,00***
horário * CO ₂ * temp	2,35	0,09*	1,31	ns	0,99	ns	1,73	ns
CAULE	SAC		GLC		FRU		AMIDO	
	F	sig	F	sig	F	sig	F	sig
horário	1,93	0,14*	6,14	0,00***	14,24	0,00***	0,81	ns
CO ₂	0,53	ns	3,68	0,06*	9,32	0,00***	59,03	0,00***
temp	5,41	0,03**	17,22	0,00***	22,20	0,00***	2,83	0,10*
horário * CO ₂	1,46	ns	4,85	0,01**	14,91	0,00***	2,18	0,11*
horário * temp	0,71	ns	3,32	0,03**	8,77	0,00***	0,80	ns
CO ₂ * temp	11,22	0,00***	0,38	ns	1,20	ns	0,90	ns
horário * CO ₂ * temp	0,47	ns	6,30	0,00***	5,24	0,00***	0,65	ns

Apêndice 8: Balanço líquido de produção carboidratos solúveis ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MS}$) em **raízes** de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. nos tratamentos estudados aos 68 dap (esq) e aos 95 dap (der), (média). O balanço noturno aos 95 dap não foi determinado.

Apêndice 9: Balanço líquido de produção carboidratos solúveis ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MS}$) em **caule** de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. nos tratamentos estudados aos 68 dap (esq) e aos 95 dap (der), (média). O balanço noturno aos 95 dap não foi determinado.

Apêndice 10

A. Valores das correlações entre as quatro variáveis analisadas Frutose (f), Amido (A); Sacarose (s) e glicose (G) em folhas, aos (A) 68 dap e (B) 95 dap, calculadas conjuntamente para todos os tratamentos, interpretados seguindo a análise proposta por COHEN (1988) (ver materiais e métodos). $P(<0,05)$.

A. 68 dap	A	s	g
f	0,1030	0,1928	0,5667
A		0,1623	-0,0288
s			0,2263
g			

B. 95 dap	A	s	g
f	-0,4093	0,1535	0,2546
a		0,2337	-0,3493
s			-0,1314
g			

B. Proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 e PC2,) gerados pelo análise de componentes principais dos parâmetros Frutose (f), Amido (A); Sacarose (s) e glicose (G) em folhas, aos 68 dap (A) e aos 95 dap (B). Valores dos coeficientes calculados para cada das variáveis inclusas na análise.

Componentes		
A. 68 dap	Primeiro	Segundo
f	0,6377	-0,1677
A	0,1603	0,8317
s	0,4104	0,4238
g	0,6319	-0,3170

Componentes		
B. 95 dap	Primeiro	Segundo
f	-0,5193	0,5216
A	0,6337	0,0944
s	0,1974	0,8439
g	-0,5383	-0,0827

C. Valores das correlações entre as quatro variáveis analisadas Frutose (f), Amido (A); Sacarose (s) e glicose (G) em raízes, aos (A) 68 dap e (B) 95 dap, calculadas conjuntamente para todos os tratamentos, interpretados seguindo a análise proposta por COHEN (1988) (ver materiais e métodos). $P(<0,05)$.

A. 68 dap	A	s	g
f	-0,0399	0,1105	0,6889
A		-0,0416	-0,2419
s			0,1525
g			

B. 95 dap	A	s	g
f	-0,0029	0,3735	0,6494
A		-0,0153	0,2122
s			0,4980
g			

D. Proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 e PC2,) gerados pelo análise de componentes principais dos parâmetros Frutose (f), Amido (A); Sacarose (s) e glicose (G) em raízes, aos 68 dap (A) e aos 95 dap (B). Valores dos coeficientes calculados para cada das variáveis inclusas na análise.

Componentes		
A. 68 dap	Primeiro	Segundo
f	0,6423	0,2935
A	-0,2543	0,9415
s	0,2353	0,1648
g	0,6837	0,0177

Componentes		
B.95 dap	Primeiro	Segundo
f	0,5763	-0,1414
A	0,1196	0,9583
s	0,5078	-0,2164
g	0,6291	0,1221

E. Valores das correlações entre as quatro variáveis analisadas Frutose (f), Amido (A); Sacarose (s) e glicose (G) em caule, aos (A) 68 dap e (B) 95 dap, calculadas conjuntamente para todos os tratamentos, interpretados seguindo a análise proposta por COHEN (1988) (ver materiais e métodos). $P(<0,05)$.

A. 68 dap	A	s	g
f	-0,2250	0,2182	0,6750
A		0,1041	-0,1833
s			0,3906
g			

B. 95 dap	A	s	g
f	0,1672	0,9047	0,8064
A		0,0874	0,0743
s			0,8456
g			

F. Proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 e PC2,) gerados pelo análise de componentes principais dos parâmetros Frutose (f), Amido (A); Sacarose (s) e glicose (G) em caule, aos 68 dap (A) e aos 95 dap (B). Valores dos coeficientes calculados para cada das variáveis incluídas na análise.

Componentes		
A. 68 dap	Primeiro	Segundo
f	0,6131	-0,1347
A	-0,2310	0,7797
s	0,3875	0,6101
g	0,6485	0,0405

Componentes		
B. 95 dap	Primeiro	Segundo
f	0,5780	0,0043
A	0,1096	0,9904
s	0,5830	-0,0892
g	0,5604	-0,1053