UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Avaliação de aspectos fisiológicos e bioquímicos da interferência da radiação e aquecimento sob perspectiva futura, em quatro espécies arbóreas tropicais”

Daiane Franciele Francisco Sertorio

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: BIOLOGIA COMPARADA.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Avaliação de aspectos fisiológicos e bioquímicos da interferência da radiação e aquecimento sob perspectiva futura, em quatro espécies arbóreas tropicais”

Daiane Franciele Francisco Sertorio
Orientador: Carlos Alberto Martinez y Huaman

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área: BIOLOGIA COMPARADA

RIBEIRÃO PRETO - SP
2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Sertório, Daiane Franciele Francisco

Avaliação de aspectos fisiológicos e bioquímicos da interferência da radiação e aquecimento sob perspectiva futura, em quatro espécies arbóreas tropicais. Ribeirão Preto, 2013

130 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Martinez, Carlos Alberto y Huaman.

1. Estresse abiótico 2. Fluorescência da clorofila *a*. 3. Enzimas antioxidantes. 4. Temperatura elevada. 5. Radiação intensa.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Teresinha e José
meu irmão Jason
e meu amado Jonas.
Por fazerem a palavra amor fazer sentido.*

AGRADECIMENTOS

Ao único Deus onipotente, onisciente e onipresente, por permitir que estudemos e conheçamos as obras de suas mãos.

Agradeço ao Prof. Carlos Alberto Martinez pela oportunidade da realização deste trabalho, pela confiança, paciência e auxílio prestados.

À todos os amigos do laboratório, Andressa, Daniele, Fernanda, Laís, Letícia, Lucas, Maria Isabel, Maria Teresa e Matheus, cujos conselhos, sugestões e apoio foram determinantes para que fosse possível, concretizar este trabalho. Pelas conversas durante as tardes e a troca de experiências, fizeram de tudo principalmente mais agradável.

Agradeço em especial a Daniele e Hilda pela paciência e atenção ao dividirem seus conhecimentos e em inúmeros momentos sua contribuição e apoio foram imprescindíveis.

Agradeço especialmente à minha família pelo apoio e carinho, aos meus pais Teresinha e José pelo amor, ao meu irmão Jason pela amizade e ao meu marido Jonas pela paciência e amor incondicionais, sem os quais eu não seria a mesma, nem faria nada do que fiz.

Aos amigos -praticamente pais- Ricardo e Janete, por serem tão companheiros e nos transmitir além de seus conhecimentos seu grande amor.

Ao Joel pelo imenso auxílio no plantio e cuidados com as plantas e especialmente pela amizade.

À Profa. Elenice Varanda e Ricardo Barosela pelo espaço cedido do laboratório para uso da capela quando necessário e uso do espectrofotômetro quando o nosso nos deixou na mão.

À Profa. Simone pelas valiosas sugestões no relatório do Programa.

Aos professores Rodrigo, Rosa e João Atílio pelas valiosas contribuições realizadas no momento da qualificação.

À Profa. Rosa Furriel meu especial agradecimento pela atenção incondicional e auxílio com as análises bioquímicas.

À Vera e Renata por toda paciência e atenção durante esses dois anos resolvendo todas as dúvidas e problemas possíveis.

À Elisangela Ap. da Silva Lizzi, pela valiosa contribuição com o SAS e seus comandos, sem você eu não sei o que seria das 3 way ANOVA.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada e à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida durante o mestrado.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, o meu muito Obrigada!

“Folha alguma da floresta, nem humilde haste de erva é sem utilidade.

Toda árvore, arbusto e folha exalam aquele elemento de vida

sem o qual nenhum homem ou animal poderia existir;

animal e homem servem, por sua vez, à vida da folha, do arbusto e da árvore.

As flores exalam sua fragrância e desdobram sua beleza em bênção ao mundo.

O Sol derrama sua luz para alegrar a mil mundos.

O próprio oceano, a origem de todas as nossas fontes,

recebe as correntes de toda a Terra,

mas recebe para dar.

Os vapores que sobem de sua superfície caem em chuviros

para regar a terra a fim de que ela produza e floresça”

Ellen G. White

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABSTRACT

RESUMO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
	2.1 Floresta mesófila semidecídua e reflorestamento	24
	2.2 Mudanças climáticas	25
	2.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	26
	2.4 Estresse abiótico	28
	2.4.1 Estresse luminoso	30
	2.4.2 Estresse térmico.....	34
	2.4.3 Formação de espécies reativas de oxigênio e defesa antioxidante	37
3	HIPÓTESE	41
4	OBJETIVOS	43
5	MATERIAL E MÉTODOS	45
	5.1 Material Vegetal	46
	5.1.1 Descrição do material vegetal	46
	5.2 Tratamentos	51
	5.3 Avaliações	53

5.3.1	Crescimento e avaliações morfológicas	53
5.3.2	Quantificação de pigmentos fotossintéticos	55
5.3.1	Monitoramento dos parâmetros micrometeorológicos	56
5.3.2	Monitoramento da fluorescência da clorofila <i>a</i>	57
5.3.3	% Fotoinibição Diurna	57
5.3.4	Temperatura foliar	58
5.3.5	Quantificação de Peróxido de Hidrogênio	59
5.3.6	Quantificação de danos celulares	59
5.4	Extração e análise de enzimas antioxidantes e danos celulares.....	60
5.4.1	Extração	60
5.4.2	Quantificação de proteínas	61
5.4.3	Quantificação de Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	62
5.4.4	Quantificação de Catalase (CAT; EC 1.11.1.11)	63
5.4.5	Quantificação de Ascorbato Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)	63
5.4.6	Quantificação de Glutathione Redutase (GR, EC 1.6.2).....	64
5.4.7	Quantificação de Guaiacol Peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7)	65
5.4.8	Deteção <i>in situ</i> de radicais livres e de morte celular	66
5.5	Análise dos dados	69
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
6.1	Análises Morfológicas de Crescimento.....	72
6.1.1	Massa seca	72
6.1.2	Partição de biomassa	76
6.1.3	Área Foliar e Área Foliar Específica (AFE)	78
6.1.4	Incremento de crescimento (DAS, Comprimento e Número de Folhas).....	81
6.2	Análises Fisiológicas	84

6.2.1	Pigmentos fotossintéticos	84
6.2.2	Monitoramento micrometeorológico e fluorescência da clorofila <i>a</i>	88
6.2.3	Fotoinibição diurna: redução da eficiência quântica máxima do PSII	93
6.2.4	Temperatura Foliar	94
6.3	Análises Bioquímicas	97
6.3.1	Quantificação de MDA.....	97
	Com os dados de quantificação de MDA mostrados na Tabela 6 verificamos que nos tratamentos de radiação intensa (100%RTA e 100%RTE) foram apresentadas as maiores concentrações, o que mostra que neste tratamento houve maior peroxidação lipídica e maiores danos às membranas celulares.....	97
6.3.2	Quantificação de H ₂ O ₂	98
6.3.3	Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes	98
6.3.1	Detecção <i>in situ</i> de radicais livre e morte celular	110
7	CONCLUSÕES.....	114
8	REFERÊNCIAS	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

20%RTA	Tratamento com 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente
20%RTE	Tratamento com 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C
100%RTA	Tratamento com radiação e temperatura ambiente
100%RTE	Tratamento com radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C
A 480	Absorbância a 480 nm
A 645	Absorbância a 645 nm
A 663	Absorbância a 663 nm
Ac	<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>
AF	Área foliar (dm ²)
AFE	Área foliar específica (dm ² g ⁻¹)
AOX	Ascorbato oxidase
Ap	<i>Aspidosperma polyneuron</i>
APX	Ascorbato peroxidase
ATP	Adenosina trifosfato
<i>Carot/Chl</i>	Razão carotenóides/clorofila total
Carot.	Carotenóides (μmol g ⁻¹)
CAT	Catalase
Ce	<i>Cariniana estrellensis</i>
<i>Chl a</i>	Clorofila <i>a</i> (μmol g ⁻¹)
<i>Chl a/Chl b</i>	Razão clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i>

<i>Chl b</i>	Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
<i>Chl total</i>	Clorofila total
Cl	<i>Cariniana legalis</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidina
DAS	Diâmetro a altura do solo (mm)
DTNB	Ácido ditiobis nitrobenzóico
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
F ₀	Fluorescência inicial
FFFA	Fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
F _m	Fluorescência máxima
F _v	Fluorescência variável (F_m-F₀)
F _v /F ₀	Fluorescência variável/Fluorescência inicial
F _v /F _m	Eficiência quântica máxima do fotossistema II
GPX	Guaiacol peroxidase
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione dissulfeto/oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
MDA	Malondialdeído

MSC	Massa seca de caules
MSF	Massa seca de folhas
MSR	Massa seca de raízes
MSR/MSA	Massa seca de raízes/massa seca aérea
MST	Massa seca total
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
NBT	Nitro blue tetrazolium
N-P-K	Adubo nitrogênio/fósforo/potássio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$\text{O}_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
O_2	Oxigênio molecular
$\text{OH}^{\cdot}$	Radical hidroxila
PS I	Fotossistema I
PS II	Fotossistema II
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Reactive Oxygen Species (Espécies reativas de oxigênio)
Rubisco	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
UR	Umidade relativa do ar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mudas de *Aspidosperma cylindrocarpon* (A); *Aspidosperma polyneuron* (B); *Cariniana estrellensis* (C) e *Cariniana legalis*(D).....50

Figura 2- (A) Tratamento 1 – 100% de radiação e temperatura ambiente (100%RTA); (B) Tratamento 2 – 100% de radiação e temperatura elevada em 2°C (100%RTE); (C) 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente (20%RTA); (D) Tratamento 4 – 20% da radiação e temperatura elevada em 2°C (20%RTE).52

Figura 3- Barra Quântica modelo LI-250A (LI-COR, USA)56

Figura 4- Fluorômetro portátil modelo OS-20P (Opti-Sciences, USA) utilizado para medições de fluorescência da clorofila a57

Figura 1 - Esquema de sistema luminoso (lâmpadas de xenônio/tungstênio) de fotoinibição induzida.67

Figura 6. Massa seca (g) de plantas de *Aspidosperma cylindrocarpon*, *Aspidosperma polyneuron*, *Cariniana estrellensis* e *Cariniana legalis*, crescidas em ambiente ensolarado ou sombreado com ou sem aquecimento. Onde 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (n=6), para cada tratamento..74

Figura 7. Partição de biomassa de plantas de *Aspidosperma cylindrocarpon*, *Aspidosperma polyneuron*, *Cariniana estrellensis* e *Cariniana legalis*, crescidas em ambiente ensolarado e sombreado com e sem aquecimento. Onde 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente promovida por sombreamento com sombrite e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente promovida por sombreamento com sombrite e temperatura

elevada em 2°C. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (n=6), para cada componente da planta.	76
Figura 8- Avaliação da eficiência quântica máxima do PSII em <i>A. cylindrocarpon</i> e <i>A. polyneuron</i> .aos 18, 150 e 300 dias de exposição aos tratamentos	90
Figura 9- Avaliação da eficiência quântica máxima do PSII em <i>C. estrellensis</i> e <i>C. legalis</i> aos 18, 150 e 300 dias de exposição aos tratamentos.	91
Figura 10 – Percentual de fotoinibição diurna em Ac (<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>), Ap (<i>Aspidosperma polyneuron</i>), Ce (<i>Cariniana estrellensis</i>) e Cl (<i>Cariniana legalis</i>)sob tratamentos de radiação e temperatura: 100%RTA(radiação e temperatura ambiente), 100%RTE (radiação ambiente e temperatura elevada em 2 °C), 20%RTA (20%da radiação ambiente e temperatura ambiente) e 20%RTE (20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C).....	96
Figura 2– Atividade específica (U mg ⁻¹ proteína) de superóxido dismutase (SOD) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação (100% e 20%)e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie.....	105
Figura 12 – Atividade específica (U mg ⁻¹ proteína) de Catalase (CAT) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação(100% e 20%)e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie.....	106
Figura 13 – Atividade específica (U mg ⁻¹ proteína) de Ascorbato Peroxidase (APX) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação(100% e 20%)e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie.....	107
Figura 14 – Atividade específica (U mg ⁻¹ proteína) de Glutathione Redutase (GR) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação(100% e 20%)e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie.....	108

Figura 15 – Atividade específica (U mg⁻¹ proteína) de Peroxidases não específicas avaliadas com guaiacol como substrato (GPX) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação(100% e 20%)e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie10

Figura 3 – Fotografia de detecção in situ de O₂·⁻, H₂O₂ e morte celular em *Aspidosperma cylindrocarpon* e *A. polyneuron* (a,f – controle negativo)(b, g- controle positivo de H₂O₂)(C, h- detecção de H₂O₂)(d, i – detecção de O₂·⁻) (e, j – detecção de morte celular).....112

Figura 17- Fotografia de detecção in situ de O₂·⁻, H₂O₂ e morte celular em *Aspidosperma cylindrocarpon* e *A. polyneuron* (a,f – controle negativo)(b, g- controle positivo de H₂O₂)(c, h- detecção de H₂O₂)(d, i – detecção de O₂·⁻) (e, j – detecção de morte celular).113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Massa seca de raízes, caule, folhas e total (em g) de quatro espécies arbóreas nativas da floresta mesófila semidecídua crescidas em ambiente ensolarado ou sombreado com ou sem aquecimento. Onde 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (n=6), para cada tratamento.	75
Tabela 2- Parâmetros de crescimento, Área foliar (dm ²) AFE (dm ²) e número de folhas em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.	79
Tabela 3- Parâmetros de crescimento, Incremento de DAS (diâmetro do caule na altura do solo (mm), Incremento do comprimento (cm) e Incremento do número de folhas 300 dias após o início dos tratamentos em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.....	82
Tabela 4- Pigmentos fotossintéticos, Clorofila <i>a</i> (<i>Chl a</i>); Clorofila <i>b</i> (<i>Chl b</i>); Clorofila total (<i>Chl total</i>) e carotenóides quantificados 300 dias após o início dos tratamentos em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.	85
Tabela 5- Pigmentos foliares, razão carotenóides/clorofila total, razão clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i> e razão clorofila total por carotenóides 300 dias após o início dos tratamentos em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua	

crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.....	87
Tabela 6- Quantificação de H ₂ O ₂ e MDA em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.....	103
Tabela 7- Fluorescência (razão Fv/Fm) antes e após exposição de folhas de sombra à sistema de fotoinibição induzida (1800 μmol m ⁻² s ⁻¹ de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos) por 3 horas e percentual de fotoinibição (% fotoinibição)	111

ABSTRACT

In the last 100 years the average global temperature increased by 0.6°C and it might increase in a fast rate reaching up to 2°C. However, little is known about how plants might respond to the climate change because there is not enough information about the physiological alterations plants might suffer due to increased temperature. We evaluated morphological, physiological and biochemical alterations under the effects of two light/temperature conditions and its interactions in four different plant species of the Semideciduous Mesophytic Forest: *Aspidosperma cylindrocarpon* and *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae); *Cariniana estrellensis* and *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). All plants suffered the following treatments: 100% radiation and environment temperature (100%RTA), 100% radiation and environment temperature +2°C (100%RTE), 20% radiation (shade) and environment temperature (20%RTA), and 20% radiation (shade) and environment temperature +2°C (20%RTE). *Aspidosperma polyneuron* was shown to be the most sensible specie to high radiation, followed by *C. legalis*, both threatened with extinction. Morphological parameters confirmed the theory that chronically photo-inhibited plants keep growing, but at lower rates. Biochemical findings also confirmed our physiological data showing increased fragility of the secondary species to high radiation and heating.

Key words: 1. Abiotic stress 2. Chlorophyll *a* fluorescence. 3. Antioxidant enzymes. 4. High temperature. 5. High light.

RESUMO

Nos últimos 100 anos, a temperatura média global aumentou aproximadamente 0,6°C e deverá continuar a subir a uma taxa rápida podendo atingir 2°C. No entanto, não se sabe como as plantas responderão a essa mudança climática, pois existem poucas informações sobre as respostas fisiológicas das plantas a incrementos de temperatura. Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos de duas condições luminosas e duas condições de temperatura (com interação entre eles), em perspectiva futura, sobre o comportamento morfológico, fisiológico e bioquímico de quatro espécies da Floresta Mesófila Semidecídua: *Aspidosperma cylindrocarpon* e *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae); *Cariniana estrellensis* e *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: 100% de radiação e temperatura ambiente (100%RTA), 100% de radiação e temperatura elevada em +2°C (100%RTE), 20% de radiação (por sombreamento) e temperatura ambiente (20%RTA), e 20% de radiação e temperatura elevada em +2°C (20%RTE). *Aspidosperma polyneuron* apresentou-se como a espécie mais sensível a radiação intensa, seguida de *C. legalis* ambas já ameaçadas de extinção. Os parâmetros morfológicos confirmam a teoria de que plantas cronicamente fotoinibidas continuam crescendo, porém, em menores taxas. Os dados bioquímicos reforçam os fisiológicos mostrando fragilidade das espécies secundárias à radiação intensa e os efeitos principalmente negativos do aquecimento aplicado.

Palavras chave: 1. Estresse abiótico 2. Fluorescência da clorofila *a*. 3. Enzimas antioxidantes. 4. Temperatura elevada. 5. Radiação intensa.

1 INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A Terra está sujeita a várias pressões humanas que incluem: aumento da demanda por recursos; exploração seletiva e destruição de espécies; uso e mudança na cobertura do solo; taxa acelerada de deposição antropogênica de nitrogênio; poluição do solo, do ar e da água; introdução de espécies exóticas; desvio da água para ecossistemas intensivamente manejados e sistemas urbanos; fragmentação ou unificação de paisagens; urbanização e industrialização. É difícil quantificar os impactos das mudanças climáticas por si só, dadas as múltiplas e interativas pressões atuando nos ecossistemas da Terra (IPCC, 2002).

Crescentes concentrações de gases com efeito estufa deverão ter impactos significativos sobre o clima mundial em uma escala temporal de décadas a séculos. Evidências encontradas em estudos de monitoramento de longo prazo sugerem que o clima das últimas décadas é anômalo em comparação à variação do clima passado e que as recentes tendências climáticas e atmosféricas já estão afetando a fisiologia, distribuição e fenologia de algumas espécies (Dale, 1997, Bonell, 1998, Hansell et al., 1998, Adams; Wall, 2000, Fay et al., 2000, Loehle, 2000, Abu-Asab et al., 2001, Bonotto, 2001, Dale et al., 2001).

Nos últimos 100 anos, a temperatura média global aumentou aproximadamente 0,6°C e deverá continuar a subir a uma taxa acelerada. No Brasil, a temperatura média, nesse mesmo período, aumentou aproximadamente 0,75°C (von Randow et al., 2006). O incremento de temperatura é iminente, em previsões do IPCC, as mais otimistas sugerem

INTRODUÇÃO

que o aquecimento por volta do ano 2060 será de 2°C, enquanto outras menos otimistas preveem que este aquecimento acontecerá em duas ou até três décadas, podendo chegar a 5°C no final do século (Joshi et al., 2011). Não se sabe como as plantas responderão a essa mudança, pois existem poucas informações sobre as resposta fisiológicas das plantas a incrementos de temperatura (Root et al., 2003).

Uma das formas de minimizar os efeitos das mudanças climáticas é a implantação de reflorestamentos para recuperação de áreas degradadas e desmatadas, no entanto, para isto são necessárias mais informações ecofisiológicas sobre as espécies de interesse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Floresta mesófila semidecídua e reflorestamento

Grandes extensões territoriais de paisagens “naturais” sofreram transformações significativas, especialmente no último século. A Mata Atlântica de hoje se apresenta como um mosaico composto por poucas áreas relativamente extensas, principalmente nas regiões sul e sudeste (zonas núcleo de preservação de acordo com o Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica), e uma porção bem maior composta de áreas em diversos estágios de degradação. Neste quadro, os fragmentos florestais de diversos tamanhos e formas, assumem fundamental importância para a perenidade do bioma Mata Atlântica (Guatara et al., 1996).

Estes poucos remanescentes preservados da formação florestal característicos do interior paulista são, portanto, de grande valor ecológico e taxonômico, funcionando como uma coleção viva de espécies representativas da flora local e de sua diversidade genética, bem como banco de informações acerca da estrutura e do funcionamento desse tipo de ecossistema (Ortega; Engel, 1992).

Nos últimos anos, uma grande ênfase foi dada à preservação dos recursos naturais, por meio de programas de reflorestamento e de estudos ecofisiológicos de espécies nativas que podem ser potencialmente usadas em tais programas visando minimizar os problemas causados pelo indiscriminado desmatamento, porém, ainda cabe à humanidade reconhecer o valor intrínseco da biodiversidade e a necessidade

da manutenção das florestas existentes e recuperação das áreas degradadas, independente das necessidades e dos interesses humanos

2.2 Mudanças climáticas

A atividade humana tem modificado a superfície da Terra em uma escala muito grande, através de desmatamento, extração mineral, cultivos, irrigação, drenagem e inundações. Estas grandes alterações mudam a superfície de refletividade de ondas curtas e propriedades hidrológicas e térmicas da superfície da terra. Assim, substituindo a floresta com pastagens altera-se o equilíbrio da energia superficial e é aumentada a percentagem de energia radiante que ao entrar aquece o ar e reduz a evaporação, como muitos estudos têm mostrado (Von Randow et al., 2004).

O incremento do CO₂ atmosférico, gerado em grande parte pelas atividades humanas tem intensificado o efeito estufa, que resulta num aquecimento adicional da superfície e da atmosfera terrestre (Houghton et al., 2001).

Há determinadas zonas do globo e alguns ecossistemas mais vulneráveis a este fenômeno, entre eles podem ser citados os recifes de corais, região ártica e antártica, as províncias fitogeográficas de tundra, florestas boreais e regiões mediterrâneas (IPCC, 2007, Meehl, 2007).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Embora haja um grande esforço dos governos em preservar áreas tropicais, desmatamentos ilegais têm ocorrido em grandes áreas (Cerri et al., 2007). Atualmente, de acordo com publicações não oficiais, o Brasil ocupa a 4ª posição no ranking dos países que são os maiores emissores de GEE, devido, principalmente, às alterações no uso da terra - desmatamento e queimadas (Young et al., 2012).

Estas mudanças de ordem climáticas afetam diretamente as funções de organismos individuais, modificam populações, afetam estrutura e função de ecossistemas (decomposição, ciclagem de nutrientes, fluxo de água, composição de espécies e interações específicas) e distribuição de ecossistemas dentro da paisagem (IPCC, 2002).

2.3 Fluorescência da clorofila *a*

Quando uma folha da planta absorve luz, todo um complexo mecanismo começa a funcionar para a produção de açúcares, a este processo, chamamos fotossíntese. Durante a fotossíntese, somente parte da energia luminosa é transformada em energia química. Este processo começa na clorofila que absorve a luz e transfere a energia de excitação para o centro de reação para o trabalho quimicamente útil ou então a dissipa principalmente como calor ou emite a radiação novamente (com outras palavras emite fluorescência) (Strasser et al., 2000).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A luz é absorvida, sobretudo, pelos complexos-antena, os quais são compostos por clorofilas, carotenóides e proteínas, localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Os pigmentos-antena transferem a energia para um complexo clorofila-proteína especializado, conhecido como centro de reação (Horton e Ruban, 2004). As plantas possuem dois centros de reação localizados, respectivamente, nos fotossistema I (PSI) e fotossistema II (PSII) (Taiz; Zeiger, 2010).

Nos trópicos, a radiação no verão pode passar de $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA) no período do meio-dia. Dependendo da estrutura e da quantidade de cloroplastos, a folha absorve geralmente entre 60%-80% da radiação fotossinteticamente ativa, enquanto emite com mais intensidade a luz verde e transmite comprimentos de onda na faixa do vermelho próximo (Larcher, 2000; Taiz; Zeiger, 2010). Sob baixa intensidade luminosa (menor que $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), mais de 80% do quantum absorvido é usado na fotossíntese. Quando a intensidade luminosa aproxima-se de $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (cerca de metade do valor da luz solar), menos de 25% do quantum absorvido é usado e, sob luz solar plena, a utilização reduz para aproximadamente 10% (Long et al., 1994).

A fluorescência da clorofila fornece informações da resposta da planta ao ambiente e os mecanismos bioquímicos e biofísicos que determinam esta resposta. Como por exemplo, estudos com parâmetros ambientais (que podem causar estresse físico), como intensidade luminosa e temperatura, possibilitam a análise do sistema

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

em termos de viabilidade e resistência a estresse (Krause; Somersalo, 1989; Koroleva et al., 1994).

O uso de medições de fluorescência da clorofila *a* para examinar o desempenho fotossintético e estresse em plantas está difundido em estudos fisiológicos e ecofisiológicas. Isto aconteceu devido ao desenvolvimento de uma sólida compreensão das relações entre os parâmetros de fluorescência e transporte de elétrons in vivo e da disponibilidade comercial de fluorômetros portáteis fácil de usar e a preços acessíveis. Fluorescência pode ser uma ferramenta muito poderosa para estudar a performance fotossintética, especialmente quando combinada com outras medições não invasivas tais como a espectroscopia de absorção, as análises de gás e a termometria de infravermelho (Baker, 2008).

2.4 Estresse abiótico

Em condições naturais ou sob cultivo, as plantas estão frequentemente expostas a estresses ambientais abióticos, que exercem uma influência desvantajosa, afetando seu crescimento e produtividade, com alterações no metabolismo e na fisiologia do organismo (Bray et al., 2000; Taiz; Zeiger, 2010).

O estresse pode ser definido como um desvio significativo das condições ótimas para a vida e que induz respostas e mudanças em todos os níveis do

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

organismo, as quais são inicialmente reversíveis, mas podem tornar-se permanentes (Larcher, 2000). Após o reconhecimento do estresse pelas plantas, são emitidos sinais que resultam em alteração da expressão gênica nas células o que pode influenciar o metabolismo e o desenvolvimento de toda a planta (Bray et al., 2000).

O conceito de estresse está intimamente relacionado ao de tolerância ao estresse, que é a aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável. Se a tolerância aumenta como consequência de exposição anterior ao estresse, diz-se que a planta está aclimatada (Taiz; Zeiger, 2004).

Os organismos podem responder de formas diferentes a um fator estressante, dependendo de sua “norma de reação” geneticamente diferentes. Se uma planta está ou não sofrendo em uma determinada situação é uma questão que somente poder ser respondida tendo por referência o comportamento normal (Larcher, 2000).

Um número cada vez maior de evidências sugere que muitos dos estresses ambientais causam danos diretamente ou indiretamente através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir do sistema de transporte dos elétrons (Smirnoff, 1993; Bray et al., 2000).

2.4.1 Estresse luminoso

A luz age de forma isolada ou em conjunto no controle do desenvolvimento das plantas, interferindo no crescimento por meio do processo fotossintético e na diferenciação durante a morfogênese. O sucesso na adaptação de uma espécie em diferentes condições de radiação depende do ajuste de seu aparelho fotossintético, de modo a garantir maior eficiência na conversão da energia radiante em carboidratos e, conseqüentemente, maior crescimento (Dias-Filho, 1997, Campos; Uchida, 2002).

A luz difere de outros elementos climáticos na natureza pela amplitude e taxa de sua variação. Durante o dia, as plantas enfrentam muitas alterações na qualidade e quantidade da radiação recebida. Na natureza, as plantas apresentam diferentes respostas ao excesso de luz, que pode ser classificado entre prejudicial e não prejudicial, e estas respostas aparecem em escalas de tempo diferente (Osmond; Chow, 1988, Osmond, 1994).

Quantidades excessivas de FFFA e o aumento da absorção de radiação UV produzem uma situação de estresse causada pela radiação. Em ambos os casos estão envolvidos processos foto-energéticos. Quando variações de alta frequência ocorrem, ou quando as plantas não são capazes de se adaptar às condições de luz prevalecentes, pode haver um excesso de estimulação no aparelho fotossintético (Long et al., 1994) e quando esta energia absorvida é maior que a capacidade de utilização desta na fotossíntese, ocorre um sobrecarregamento que resulta uma baixa

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

utilização quântica (foto-oxidação) e baixo rendimento assimilatório (fotoinibição) (Larcher, 2000; Gonçalves et al., 2005; FREITAS et al., 2003) principalmente se outros fatores não se encontram em condições ótimas (Lambers et al., 2008).

Quando ocorre fotoinibição há alteração nas atividades do centro de reação do PSII e decréscimo na capacidade fotossintética máxima (Choudhury; Behera, 2001). O primeiro lugar afetado em situação de estresse luminoso é o centro de reação do PSII em que subunidades de proteína D são rapidamente quebradas, sendo assim o processo fotossintético interrompido e diminuída a eficiência do PSII (fotoinativação do PSII) que para proteção dissipa o fluxo energético através da emissão de fluorescência e, sobretudo na forma de calor (Larcher, 2000).

2.4.1.1 Fotoinibição

Vários termos têm sido usados para designar a redução da capacidade fotossintética induzida pela exposição de organismos, estruturas ou folhas a um excesso de luz visível. Alguns desses termos são: "fotoinibição" "foto-oxidação", "fotoinativação", "fotoinstabilidade", "solarização" e "reações fotodinâmica". Com a relevância que o estudo desse fenômeno adquiriu nos últimos 30 anos, o termo "fotoinibição" tem sido utilizado mais frequentemente (Powles, 1984, Krause, 1988).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fotoinibição tem sido definida como a inibição da fotossíntese causada por radiação excessiva, que pode danificar o aparelho fotossintético, causando a destruição dos pigmentos fotossintéticos (Powles, 1984). No entanto, recentemente, o termo fotoinibição foi também utilizado para definir uma redução lenta e reversível da eficiência fotossintética que depende da irradiação e conduz a uma perda parcial da capacidade para converter a energia radiante em massa e, conseqüentemente, em crescimento (Long et al., 1994, Krause et al., 1995, Laing et al., 1995, Alves et al., 2002).

Sendo possível classificar em dois tipos: fotoinibição dinâmica e fotoinibição crônica, a primeira ocorre com a maioria das plantas ao longo do dia devido a picos de radiação, por exemplo, no entanto a recomposição do aparelho fotossintético é realizada poucas horas depois, não havendo danos permanentes. A segunda, no entanto, tem a ver com a destruição dos pigmentos que ocorre por altas radiações, e outros estresses ambientais quando, no entanto, a recuperação da maquinaria fotossintética não é possível (Ösmond, 1994).

Na prática, as consequências da fotoinibição são: redução da eficiência quântica máxima do PSII (expressa pela razão F_v/F_m) em função da absorção de CO_2 e liberação de O_2 ; diminuição da convexidade da curva de resposta da fotossíntese à luz; atividade fotoquímica reduzida de PS II, e com a exposição prolongada à luz em excesso, diminuição da taxa fotossintética máxima (Boese; Huner, 1992; Long et al., 1994).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma exposição prolongada de plantas ou de organismos a radiação excessiva pode resultar na fotodestruição dos pigmentos fotossintéticos, uma vez que a destruição destes pigmentos depende de oxigénio e luz; este fenómeno é normalmente chamado foto-oxidação, e pode causar a morte da célula ou do organismo (Powles, 1984; Hendrey et al., 1987), pois a foto-oxidação pode danificar o aparelho fotossintético, devido à formação de ROS (Choudhury; Behera, 2001). Os carotenóides são responsáveis por dissipação de calor, assim, podem prevenir a foto-oxidação das clorofilas (Hendry; Price, 1993).

Na maioria dos casos, a foto-oxidação é um fenómeno secundário, ocorrendo após uma fase lenta durante o qual já existe uma diminuição da atividade fotossintética dependente da intensidade da luz e tempo de exposição, mas sem quaisquer alterações no pool de pigmentos (Powles, 1984; Long et al., 1994). Portanto, a fotoinibição da fotossíntese não aparece após a destruição de pigmentos, pelo contrário, o branqueamento das folhas ocorre quando certo grau de fotoinibição já ocorreu (Hendrey et al., 1987). A capacidade de lidar com fotoinibição varia entre diferentes espécies de plantas (Martinez; Maestri, 1995; Krause et al., 1995; Kitao et al., 2000). Assim, conhecendo a susceptibilidade à fotoinibição de uma espécie vegetal e sua capacidade de se adaptar a diferentes condições de luz torna-se relevante quando espécies de plantas têm de competir uns com os outros por espaço e recursos limitados (Krause et al., 2001).

Sabe-se que mudas de espécies secundárias que se desenvolveram no sub-bosque sombreado são mais vulneráveis à fotoinibição do que aquelas que se desenvolveram a pleno sol (Skillman et al., 2005; Gyimah; Nakao, 2007). Este fenómeno ocorre porque folhas de sombra têm uma elevada concentração de clorofila, uma maior capacidade de captura de luz devido ao tamanho maior da antena do fotossistema II (PSII) e taxas mais baixas de luz saturada de fotossíntese, devido a menores quantidades de enzimas fotossintéticas, tais como Rubisco (Osmond, 1994). Estas características tornam plantas cultivadas na sombra mais susceptíveis à seca, luz e estresse térmico em caso de uma exposição súbita de alta irradiância, como ocorre durante a formação de clareiras ou desmatamento (Lovelock et al., 1994).

2.4.2 Estresse térmico

A vida está inevitavelmente vinculada a certas condições de temperatura que facilitam o metabolismo. Considerando que as plantas são organismos cuja temperatura varia de acordo com a temperatura de seu ambiente imediato e uma vez que não podem se mover, elas têm de lidar com o que quer que o ambiente as ofereça (Morison; Morecroft, 2006), sendo assim a temperatura é um dos fatores que mais afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas (DiPaola, 1992; Paulsen, 1994).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quando elevada, a temperatura pode causar desajustes nos mecanismos fisiológicos. Para causar injúrias em árvores tropicais o limite máximo está estabelecido entre 45-55°C, no entanto a temperatura de folhas e flores com grande capacidade de troca de calor e baixa capacidade térmica rapidamente atingem temperatura do ar, o que as deixa em picos de temperatura por pouco tempo, mesmo porque durante somente um pequeno intervalo do dia a radiação solar gera temperaturas altas (Larcher 1973).

A integridade e funções de membranas biológicas são sensíveis a altas temperaturas que podem alternar as estruturas terciárias e quaternárias de proteínas estruturais das membranas, como também alterações na permeabilidade de membranas evidenciadas pelo aumento da perda de eletrólitos (Wahid et al., 2007). Numerosos componentes do aparato fotossintético apresentam instabilidade térmica, mas tem sido difícil determinar qual delas é o limitante da taxa sob estresse térmico. Há muito que se propõe que PSII é o componente mais sensível ao calor do aparelho fotossintético. A instabilidade térmica dos componentes fotossintéticos é secundária à insuficiência das células para manter a Ribulose 1-5 Bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) em condições ótimas. Sob condição de estresse térmico a atividade da Rubisco diminui como consequência da associação de catalisadores dos produtos no sítio ativo, e não simplesmente através da inativação da enzima induzida pela temperatura (Salvucci; Crafts-Brandner, 2004).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Acima das temperaturas ótimas, o equilíbrio entre a fixação de CO_2 e a liberação de CO_2 favorece a liberação de CO_2 , porque a afinidade de RuBP pelo CO_2 diminui, e porque a solubilidade do CO_2 na água diminui mais rapidamente do que a de oxigênio com o aumento das temperaturas (Wahid et al., 2007).

Plantas respondem a altas temperaturas de muitas maneiras diferentes e adaptação ou aclimatação a temperaturas elevadas ocorrem em escalas de tempo e níveis de organização diferentes em cada planta. A exposição à temperatura elevada pode ser crônica, como experimentado em habitats mais quentes, ou pode ser aguda, como resultado de extremos de temperaturas sazonais ou diárias (Larcher, 2000).

Estresse térmico (e, portanto, a tolerância ao calor) não são fenômenos únicos ou isolados, mas sim um conjunto variado de perturbações complexas da homeostase dos organismos. Nas células, o calor afeta uma ampla variedade de estruturas e funções. As temperaturas elevadas alteram as propriedades de lipídios, fazendo com que as membranas se tornem mais fluidas. Todas as proteínas têm uma faixa de temperatura ideal para a atividade, um aumento de temperatura altera a atividade enzimática levando a um desequilíbrio no metabolismo e, eventualmente, em alta temperatura as proteínas são desnaturadas. Danos da membrana e de proteínas levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e não podem ser eficientemente controladas através de antioxidantes em altas temperaturas, resultando em danos oxidativos induzidos pelo calor, além dos efeitos diretos do

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

aquecimento. Fisiologicamente, isso se traduz em redução da eficiência da fotossíntese, diminuição de assimilados e perda de ganho de carbono (Hall, 2001).

É importante reconhecer que, no ambiente natural, as plantas são muitas vezes expostas ao calor em conjunto com outros tipos de estresse. Isto é especialmente verdadeiro com estresse térmico, luminoso e hídrico, que muitas vezes se sobrepõem. Uma resposta já clássica ao estresse térmico agudo é a produção de proteínas de choque térmico (HSPs - Heat shock proteins), que funcionam, pelo menos em parte, como chaperonas moleculares no controle celular de qualidade de proteínas (Boston et al., 1996). HSPs, no entanto, são apenas um componente da resposta a altas temperaturas.

2.4.3 Formação de espécies reativas de oxigênio e defesa antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ROS), sob condições fisiológicas normais, são continuamente produzidas nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos como subproduto de processos metabólicos aeróbicos, tais como respiração e fotossíntese (Asada et al., 1998).

A inibição do transporte de elétrons resultante de estresses ambientais pode resultar na produção de ROS, que se formam como consequência da redução do oxigênio sendo eles: o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), que são altamente reativos e tóxicos e podem causar danos celulares através da oxidação de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Portanto, a sua determinação, ainda que de forma indireta, constitui-se em um indicador de avaliação do grau do estresse oxidativo. A consequência direta do dano às membranas celulares pela peroxidação lipídica é o extravasamento do conteúdo celular para o meio que estiver envolvendo os tecidos danificados, quando o dano for suficiente para tanto (Asada, 1996, Krieger-Liskay, 2005).

Apesar dos possíveis danos que as espécies reativas de oxigênio podem causar, há agora evidências de que essas moléculas desempenham papéis no crescimento celular e que a regulação da produção de ROS especialmente é um importante fator controlador da forma da planta (Gapper; Dolan, 2006).

Alguns estudos sugerem que moléculas de ROS, ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), íons de cálcio e etileno também são potenciais sinalizadores associados com tolerância ao estresse térmico (Dat et al., 1998, Jiang; Huang, 2001, Larkindale; Knight, 2002). Estudos moleculares mostraram o envolvimento do oxigênio singleto na indução da expressão gênica em resposta ao estresse em plantas (Wagner et al., 2004, Danon et al., 2005), e que produtos da degradação das clorofilas podem agir como moléculas sinalizadoras (Krieger-Liskay, 2005), indicando que as interações entre moléculas e suas funções em condições de estresse são ainda pouco conhecidas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O sistema de defesa antioxidante que compreende enzimas e pequenas moléculas antioxidantes realiza a detoxificação de ROS. Deste modo o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer molécula que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (Halliwell; Gutteridge, 2007).

Os organismos aeróbicos apresentam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para proteger suas células dos efeitos tóxicos das ROS. As defesas enzimáticas incluem a atividade da catalase (CAT), da ascorbato peroxidase (APX), da superóxido dismutase (SOD) e da glutathione redutase (GR) (Foyer et al., 1994). Na cascata de detoxificação de ROS, as superóxido dismutases constituem a primeira defesa antioxidante, catalisando a dismutação dos radicais superóxido (Scandalios, 1993). O peróxido de hidrogênio gerado, por exemplo, pela dismutação do radical superóxido é posteriormente detoxificado pela ação de catalases presentes em abundância em glioxissomos, onde ela decompõe H_2O_2 formado durante a β -oxidação dos ácidos graxos (Smirnoff, 1993); e em peroxissomos (Holtman et al., 1994). A enzima CAT é suscetível à fotoinativação em condições de altas intensidades luminosas (Shang; Feierabend, 1999), e algumas evidências apontam que seu giro é muito rápido, particularmente em condições de estresse (Luna *et al.*, 2004). Outra importante rota de defesa antioxidante é o ciclo do ascorbato-glutathione, onde duas enzimas principais, ascorbato peroxidase e glutathione redutase, utilizando ascorbato e glutathione como substratos redutores, participam de uma série de reações que resultam na detoxificação de H_2O_2 (Noctor; Foyer, 1998).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Três classes distintas de SODs têm sido detectadas em plantas, e são classificadas de acordo com seu metal cofator, Mn, Fe ou Cu/Zn (Bowler et al., 1992), sendo encontradas em diferentes compartimentos celulares.

Processos oxidativos celulares e a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPX) geram o dissulfeto da glutathione ou glutathione oxidada (GSSG). Para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão entre glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é mantida em níveis muito altos. Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutathione reductase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular (Halliwell; Gutteridge, 2007).

3 HIPÓTESE

HIPÓTESE

Espécies do mesmo gênero e de mesma classificação sucessional apresentam diferenças em respostas aos tratamentos de temperatura (acrécimo de +2°C) e de interferência da radiação, em função de suas características específicas e capacidade de adaptação ao ambiente de crescimento, bem como aos efeitos combinados dos fatores ambientais sobre os processos fisiológicos e bioquímicos das plantas.

4 OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Realizar um estudo comparativo das respostas fisiológicas e bioquímicas de quatro espécies das famílias Apocynaceae e Lecythidaceae, sob condições de interação de temperatura (+2°C) e sombreamento.
- Detectar a suscetibilidade ou tolerância à fotoinibição através da fluorescência da clorofila *a* em amostras crescidas em condições de acordo com perspectivas de mudanças climáticas.
- Determinar a variação da concentração de pigmentos fotossintéticos: clorofilas e carotenóides por efeito dos tratamentos luminoso e térmico.
- Determinar a defesa antioxidante das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), Guaiacol peroxidase (GPX) e glutathione redutase (GR) por efeito dos tratamentos.
- Detectar a formação *in situ* de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio durante a fotoinibição induzida em sistema luminoso.
- Quantificar as concentrações de MDA e H₂O₂ das plantas avaliadas.
- Determinar parâmetros biométricos: crescimento das espécies sob tratamento luminoso e térmico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material Vegetal

Foram utilizadas no experimento mudas de quatro espécies arbóreas: *Aspidosperma cylindrocarpon* (Mull. Arg), *Aspidosperma polyneuron* (Mull. Arg), *Cariniana estrellensis* (Raddi. Kuntze) e *Cariniana legalis* (Mart. Kuntze). Todas foram preparadas a partir de sementes, cujo plantio foi realizado no Viveiro de Reflorestamento da Prefeitura do Campus da USP/RP. Para a realização dos experimentos estas mudas foram transferidas até a casa de vegetação do Viveiro da Botânica onde foi realizado plantio em vasos com 20 Kg de solo (latossolo vermelho distrófico) proveniente da área de reflorestamento da USP. Cada vaso recebeu 1g de N:P:K (4:14:8) por Kg de solo recomendado para espécies arbóreas utilizadas em reflorestamento.

5.1.1 Descrição do material vegetal

5.1.1.1 Família Apocynaceae

- *Aspidosperma cylindrocarpon* Mull. Arg.

Popularmente conhecida como peroba-poca a *Aspidosperma cylindrocarpon* (Figura 1.A) é uma espécie arbórea decídua, heliófita, característica de floresta

MATERIAL E MÉTODOS

semidecídua da bacia do Paraná situada sobre solos bem drenados e de média e baixa fertilidade. Apresenta dispersão irregular e descontínua, aumentando a frequência à medida que se caminha para o rio Paraná ou seus afluentes. Ocorre tanto no interior da floresta primária densa como em formações abertas secundárias. Produz anualmente moderada quantidade de sementes viáveis que são facilmente disseminadas pelo vento. Alcança até 16 metros altura e 70 cm de diâmetro do tronco. Apresenta folhas simples e glabras, sua madeira moderadamente pesada é empregada na construção civil e carpintaria. Por apresentar crescimento rápido e ser tolerante à insolação direta, é útil nos reflorestamentos heterogêneos de áreas degradadas (Lorenzi, 2002).

- *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg.

Popularmente conhecida como peroba-rosa a *Aspidosperma polyneuron* (Figura 1.B) é uma espécie arbórea perenifólia, esciófita, característica da floresta latifoliada decídua da Mata Pluvial Atlântica e da bacia do Paraná. Ocorre preferencialmente em solos profundos e férteis, exclusivamente no interior da floresta primária densa. Produz grande quantidade de sementes, apenas a cada 2-4 anos. Alcança 30 metros de altura com diâmetro do tronco de até 90 cm. Suas folhas são

simples, glabras e de pequena largura, não ultrapassando quatro centímetros. Além de seu desenvolvimento lento, tem sofrido intensa exploração e perda de habitat ao longo das últimas décadas. As subpopulações brasileiras estão em grande parte erodidas, o que levou à inclusão na red list do IUCN como espécie ameaçada de extinção. Além de seu desenvolvimento lento, tem sofrido intensa exploração e perda de habitat ao longo das últimas décadas. Hoje é de difícil localização e deixou de ser comercialmente viável para exploração de madeira (Lorenzi, 2002; IUCN 2012).

5.1.1.2 Família Lecythidaceae

- *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze

Popularmente conhecida como jequitibá-branco a *Cariniana estrellensis* (Figura 1.C) é uma espécie arbórea semidecídua no inverno, heliófita ou de luz difusa, característica da floresta clímax, que prefere solos húmidos e profundos (planta seletiva higrófita). Raramente ocorre no cerrado ou em terrenos secos. Chega a atingir 45 m de altura e 120 cm de diâmetro do tronco. Sua madeira é moderadamente pesada e por isso muito utilizada na fabricação de móveis, molduras e na construção civil, suas sementes são consumidas por macacos. A árvore possui qualidades

ornamentais, e devido ao seu grande porte é indicada para parques e grandes jardins (Lorenzi, 2002).

- *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze

Popularmente conhecida como jequitibá-rosa a *Cariniana legalis* (Figura 1.D) é tida como uma das gigantes da Mata Atlântica, com características de espécies secundárias tardias, não habita pastagens, sendo essencialmente da floresta, é uma espécie arbórea semidecídua, heliófita ou esciófita, característica da floresta latifoliada semidecídua que pode ultrapassar os 500 anos de idade (Sebbenn et al., 2000), com relatos de indivíduos com mais de 3000 anos (Magananini; Magnanini, 2002). Apresenta dispersão bastante irregular e descontínua, ocorrendo em alta densidade em determinadas áreas e faltando completamente em outras. Ocorre principalmente no interior da floresta primária densa, onde ocupa o dossel superior, entretanto tolera ambientes abertos, árvores de grande porte também permanecem em áreas agrícolas como plantações de café (Lorenzi, 2002). Populações frequentemente ocorrem em terras férteis o que causou considerável perda de habitat que levou a espécie a ser considerada vulnerável na red list do IUCN (IUCN, 2012). Apesar do número reduzido de exemplares em ocorrência natural,

MATERIAL E MÉTODOS

pouco tem sido feito para salvar a espécie da extinção, sendo que a conservação *in situ* tem sido realizada em estações ecológicas e reservas públicas (Sebbenn et al., 2000).

Figura 4. Mudanças de *Aspidosperma cylindrocarpon* (A); *Aspidosperma polyneuron* (B); *Cariniana estrellensis* (C) e *Cariniana legalis*(D).

5.2 Tratamentos

As quatro espécies foram submetidas a duas condições luminosas de crescimento e duas condições de temperatura, caracterizando assim os quatro tratamentos:

100%RTA- 100% de radiação e temperatura ambiente

100%RTE- 100% de radiação e temperatura elevada em 2°C

20%RTA- 20% de radiação e temperatura ambiente

20%RTE- 20% de radiação e temperatura elevada em 2°C

As casas de vegetação utilizadas (**Figura 2**) foram cobertas com plástico para padronizar a disponibilidade de água evitando a água das chuvas e as casas com 20% de radiação apresentavam interferência de 80% da radiação realizada por sombrite. Os tratamentos tiveram início em 07/08/2011 e foram encerrados em 30/05/2012 totalizando 10 meses de tratamento (300 dias).

Figura 5- (A) Tratamento 1 – 100% de radiação e temperatura ambiente (100%RTA); (B) Tratamento 2 – 100% de radiação e temperatura elevada em 2°C (100%RTE); (C) 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente (20%RTA); (D) Tratamento 4 – 20% da radiação e temperatura elevada em 2°C (20%RTE).

5.3 Avaliações

5.3.1 Crescimento e avaliações morfológicas

5.3.1.1 Incremento no comprimento, diâmetro do caule e número de folhas

As medições morfológicas e de crescimento foram realizadas mensalmente durante o período de 300 dias após o plantio. Como parâmetros foram avaliados o número de folhas, o incremento no diâmetro do caule e no comprimento das plantas.

O diâmetro do caule à altura do solo foi mensurado com paquímetro digital e o comprimento do caule das plantas foi avaliado com fita métrica desde a base do caule no nível do solo até a base da gema apical.

As avaliações de incremento no comprimento, no diâmetro do caule e no número de folhas foram realizadas pela subtração das medições realizadas ao final do período de exposição aos tratamentos (10 meses após o plantio) pelas medições iniciais (início de exposição aos tratamentos).

$$\text{Incremento} = \text{avaliação final} - \text{avaliação inicial}$$

5.3.1.2 Massa seca e partição de biomassa

Ao final do experimento as plantas foram cortadas e separadas em diferentes órgãos (folhas, caule e raiz). As raízes foram lavadas e todas as partes das plantas secaram em estufa à 70°C até atingir peso constante, todos os órgãos foram pesados em balança BEL engineering.

5.3.1.3 Área foliar e área foliar específica

O método utilizado foi o de pesagem dos discos foliares, com área conhecida, onde foram destacados discos foliares da porção basal, mediana e apical do limbo foliar. Através da área conhecida dos discos foliares destacado, do peso dos mesmos e do peso da folha, foi estimada a área foliar total (Beadle, 1993).

A área foliar específica (***AFE*** dm² g⁻¹) de cada planta utilizada foi calculada através da relação entre a área de 9 discos foliares e sua massa correspondente, sendo a relação inversa a massa foliar específica (***MFE***) (Beadle, 1993).

$$\textbf{\textit{AFE}} = \text{Área foliar/Massa seca (dm}^2 \text{ g}^{-1}\text{)}.$$

5.3.2 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

As concentrações de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e clorofila total, bem como o teor de carotenóides (Carot) foram determinados seguindo a metodologia descrita por Hendry e Price (1993), sendo utilizadas seis amostras por tratamento.

Para a quantificação de pigmentos, discos foliares de área e massa conhecidas foram removidos de folhas pré-selecionadas, que foram coletadas e imediatamente congeladas e mantidas em N₂ líquido até o momento da quantificação, quando foram macerados com N₂ líquido e homogeneizados em 10,0mL de acetona 80%. O homogenato foi transferido para microtubos e centrifugado a 4000rpm por 3 minutos a 25°C.

As absorbâncias do sobrenadante a 480, 645 e 663nm foram determinadas em espectrofotômetro (modelo Genesys 5.0 Spectronic, USA) e as concentrações de clorofila *a*, *b*, total, e carotenóides total foram calculadas através das equações:

$$\text{Chl } a (\mu\text{mol g}^{-1}) = \frac{(((12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})) \times V) \times 1,12}{M_s}$$

$$\text{Chl } b (\mu\text{mol g}^{-1}) = \frac{(((22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})) \times V) \times 1,10}{M_s}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{mol g}^{-1}): \text{Chl } a + \text{Chl } b$$

$$\text{Carot } (\mu\text{mol g}^{-1}) = \frac{(A480 + (0,114 \times A663) - (0,638 \times A645)) \times V}{112,5 \times \text{Ms(g)}}$$

Onde: V = volume do extrato de folhas (em mL),

Ms = massa seca dos discos foliares em mg,

Ms(g) = massa seca dos discos foliares em g.

5.3.1 Monitoramento dos parâmetros micrometeorológicos

As condições micro meteorológicas foram monitoradas juntamente com as medições de fluorescência, utilizando-se um higrotermômetro (para a umidade relativa do ar e temperatura ambiente), e um sensor quântico conectado a um medidor de radiação modelo LI-250A (LI-COR, USA), para a radiação ambiente em Fluxo de Fótons Fotossinteticamente Ativos (FFFA) (Figura 4). Todas estas avaliações foram realizadas no topo das mudas.

5.3.2 Monitoramento da fluorescência da clorofila *a*

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* F_0 (fluorescência inicial), F_m (fluorescência máxima), F_v (fluorescência variável = $F_m - F_0$) e a razão F_v/F_m foram medidos com o fluorômetro portátil modelo OS-30P (Opti-Sciences, USA). As avaliações foram realizadas mensalmente.

Neste experimento foram utilizadas seis plantas de cada espécie por tratamento e em cada planta foram avaliadas duas folhas completamente expandidas. Antes das medições, a área de medição permaneceu no escuro pelo período de 15 minutos para cessar o fluxo de elétrons. A indução da fluorescência foi realizada pela incidência de um pulso de luz saturante de $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 4- Fluorômetro portátil modelo OS-20P (Opti-Sciences, USA) utilizado para medições de fluorescência da clorofila *a*

5.3.3 % Fotoinibição Diurna

Os dados obtidos com o fluorômetro além de curvas diurnas de fluorescência foram usados para estimar a porcentagem de fotoinibição diurna que foi calculada segundo Cai et al (2005):

$$\% \text{ fotoinibição diurna} = 100 - [(Fv/Fm_{12:00}) / (Fv/Fm_{06:00}) \times 100]$$

Onde,

Fv/Fm 12:00 é a medição da razão **Fv/Fm** da fluorescência medida às 12:00 horas (ou horário de máxima radiação solar);

Fv/Fm 06:00 é a medição da razão **Fv/Fm** da fluorescência medida às 06:00 horas (horário de mínima radiação solar).

5.3.4 Temperatura foliar

A temperatura da superfície foliar foi mensurada com o auxílio do termômetro de infravermelho da TESTO, modelo 845 concomitantemente às medições de fluorescência o que gerou curvas de temperatura para cada espécie.

5.3.5 Quantificação de Peróxido de Hidrogênio

Para a quantificação de H_2O_2 foram utilizadas 100 mg de folha fresca para cada amostra. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%, centrifugadas à 12.000 G por 15 minutos a 4°C.

Foi adicionado a 0,5 mL do sobrenadante 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, 1 mL de iodeto de potássio (KI) 1M em tampão fosfato, a solução foi agitada e lida espectrofotometricamente à 390 nm segundo (Velikova et al., 2000).

5.3.6 Quantificação de danos celulares

Danos celulares, que indicam a ocorrência de estresse oxidativo, foram avaliados através do nível de peroxidação de lipídios de membrana nos tecidos foliares com medições do conteúdo de malondialdeído (MDA) determinado pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA), segundo método descrito por Dhindsa et al., (1981), com algumas modificações. Amostras (200mg) de folhas completamente expandidas foram maceradas com N_2 líquido e homogeneizadas em 5,0mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). O homogenato foi transferido para microtubos e

MATERIAL E MÉTODOS

centrifugado a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 500µL, a qual se adicionou 2,0mL de TCA (20%) contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. A mistura foi aquecida a 95°C por 30 minutos e resfriada em banho de gelo após esse tempo para interromper a reação. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos e a absorbância do sobrenadante a 532 e 600nm foi determinada em espectrofotômetro.

Cada molécula de MDA reage com duas de TBA em pH ácido e alta temperatura, formando um complexo de cor vermelha. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹cm⁻¹ (Heath; Packer, 1968).

5.4 Extração e análise de enzimas antioxidantes e danos celulares

5.4.1 Extração

Foram utilizadas folhas completamente expandidas para a preparação do extrato enzimático. Estas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (N₂). Para cada amostra 1 g de folhas sem a nervura principal foram maceradas em N₂ e homogeneizadas em 10 mL de 100mM tampão fosfato de potássio (pH 7,5)

MATERIAL E MÉTODOS

contendo 1mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4% PVP (p/v). O homogenato foi filtrado em gaze umedecida em tampão (2mL) e centrifugado à 17.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e aliquoteado em frações que foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da quantificação das enzimas e proteínas totais (Azevedo et., 1998).

5.4.2 Quantificação de proteínas

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado pelo método de Bradford (1976), com a dissolução de Comassie Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%, a essa solução foi adicionado 100 mL de ácido fosfórico 85% e foi adicionada à mistura água destilada até completar volume de 1L.

Para a construção de uma curva padrão foi utilizado albumina sérica bovina para construção de uma curva padrão.

O Comassie Brilliant Blue G-250, que reage principalmente a moléculas básicas (especialmente arginina) e aminoácidos aromáticos. O ensaio de Bradford tem sensibilidade entre 0,1 a 1 mg.mL⁻¹, acima destas quantidades as amostras devem ser diluídas.

O método é baseado na mudança imediata que ocorre quando a proteína se liga ao corante em solução ácida, observados espectrofotometricamente a 595 nm.

5.4.3 Quantificação de Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da enzima SOD foi determinada pelo método espectrofotométrico conforme descrito por Giannopolitis e Ries (1977) com algumas modificações. A solução de reação é composta de 3 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), com 2 mM de riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM de EDTA, 75 µM NBT e 50µL de extrato enzimático.

A reação foi realizada em tubos de ensaio a 25°C, dentro de uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. A reação teve início ligando-se a luz e após 15 min de iluminação, a reação foi paralisada, desligando-se a luz. Como controle, tubos com a mistura de reação foram mantidos no escuro. A produção fotoquímica da formazana azul a partir de NBT foi monitorada pelo incremento da absorbância a 560 nm e uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução de NBT em 50% (Beauchamp e Fridovich, 1971).

5.4.4 Quantificação de Catalase (CAT; EC 1.11.1.11)

A atividade total da catalase (CAT) foi determinada espectrofotometricamente pelo método de descrito por Azevedo et al., (1998). A solução de reação contendo 1,950 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e H₂O₂ 20 mM (112 µL de H₂O₂ 30% v para 50 mL de tampão) preparados imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato vegetal e a atividade da catalase foi determinada pela decomposição do H₂O₂ por meio do decréscimo da absorbância a 240 nm durante um minuto (25°C) contra um branco. Os resultados foram expressos em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína. O coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi 42,4 M⁻¹ cm⁻¹ determinado para nossas condições experimentais. O H₂O₂ é decomposto pela catalase de acordo com a reação química:

5.4.5 Quantificação de Ascorbato Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). Onde o meio reacional continha 2 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 7,0) com 0,1mM de EDTA, 1mM de H₂O₂ e 5 mM de ascorbato. Todos os

MATERIAL E MÉTODOS

reagentes foram preparados separadamente. O ascorbato altera o pH do tampão que deve ser corrigido para pH 7,0. O início da reação se deu pela adição de 100 μL de extrato enzimático e a atividade determinada espectrofotometricamente através do monitoramento da degradação do ascorbato em 290 nm durante um minuto à 25°C. A atividade expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Para os cálculos utilizou-se o coeficiente de extinção molar 3051,4 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ que foi determinado experimentalmente. A atividade da enzima Ascorbato Oxidase (AO; EC,1.10.3.3) foi também monitorada para correção da oxidação do ascorbato na ausência de H_2O_2 . Isto foi feito excluindo-se do meio de reação o H_2O_2 .

5.4.6 Quantificação de Glutathione Redutase (GR, EC 1.6.2)

A atividade da GR foi determinada em espectrofotômetro, como descrito por Azevedo et al., (1998) com algumas modificações. A mistura de reação consistia de 1,2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 500 μL de DTNB 1mM, 100 μL de GSSG 1 mM e 100 μL de NADPH 0,1mM. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL de extrato enzimático. A geração de TNB a partir do DTNB (reagente de Ellman) foi monitorada a 412 nm por 1 minuto (25°C). Os resultados foram expressos

MATERIAL E MÉTODOS

em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína utilizando para os cálculos o coeficiente de extinção molar de $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Anderson, 1985). A enzima glutathiona redutase catalisa a reação:

A reação com o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB (reagente de Ellman), é utilizada como método para monitorar a quantidade de glutathiona reduzida (GSH), avaliada pela absorbância do produto resultante da reação de GSH com DTNB que gera o ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzóico (TNB) de cor amarela:

5.4.7 Quantificação de Guaiacol Peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases não específicas presentes no extrato foi determinada segundo Zeraik et al., (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,5), 15 mM guaiacol 15 mM e 3 mM de H_2O_2 . Após a homogeneização dessa solução foi adicionado 50 μL de extrato enzimático.

A oxidação do guaiacol (a tetraguaiacol) foi medida através do aumento na absorbância a 470 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína utilizando para os cálculos o coeficiente de extinção molar de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Chance; Maehly, 1955). A enzima guaiacol peroxidase catalisa a reação:

5.4.8 Detecção *in situ* de radicais livres e de morte celular

Para a detecção *in situ* de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio e morte celular as folhas foram expostas ao sistema luminoso de fotoinibição induzida (**Figura 5**) por três horas com radiação de $1800 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA).

A detecção *in situ* de radicais livres e de morte celular foi realizada em folhas inteiras, com infiltração através do pecíolo.

Figura 7 - Esquema de sistema luminoso (lâmpadas de xenônio/tungstênio) de fotoinibição induzida.

5.4.8.1 Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A detecção *in situ* do radical superóxido foi realizada baseada no método histoquímico com cloreto azul de nitrotetrazólio (NBT) segundo Romero-Puertas et al., 2004.

Folhas jovens foram coletadas e mantidas sob tratamento de fotoinibição induzida, após três horas de exposição foram imersas em solução com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,4) contendo 0,1% NBT e infiltradas a vácuo por 5-10 minutos e iluminadas até o aparecimento de pontos escuros de formazana. Os pigmentos das folhas foram removidos pela imersão em etanol fervente por 3 horas, com adição

periódica de álcool. As folhas foram visualizadas em microscópio estereoscópio e as imagens fotografadas com câmera digital Sony modelo DSC-W90.

5.4.8.2 Peróxido de hidrogênio

A detecção *in situ* do peróxido de hidrogênio foi realizada com base na metodologia proposta por Thordal-Christensen et al., (1997), onde folhas jovens que foram submetidas ao sistema de fotoinibição induzida foram imersas em solução de tampão fosfato de potássio-HCl pH 3,8 contendo 1 mg ml⁻¹ de 3,3 diaminobenzidina (DAB). As amostras controle positivo foram incubadas em tampão MES com 20 mM de H₂O₂. O controle negativo foi realizado com a incubação das amostras em tampão MES.

Após infiltração a vácuo por 24 horas as folhas foram imersas em álcool fervente e foram mantidas ali até a remoção completa de pigmentos foliares.

5.4.8.3 Detecção in situ da morte celular

A detecção de morte celular seguiu o método histoquímico proposto por Faoro e Iriti (2005), onde em tampão MES 10mM (pH 6,5) foi adicionada Azul de Evans 0,025%. Os pecíolos das folhas tratadas sob radiação intensa por 3 horas foram imersos na solução com azul de Evans e incubados a vácuo por 24 horas. As amostras controle foram incubadas em tampão MES 10mM (pH 6,5) pelo mesmo período. Após o período de incubação as folhas foram fervidas em álcool até a remoção total dos pigmentos foliares.

5.5 Análise dos dados

Foi adotado delineamento experimental em blocos casualizados com parcelas subdivididas em fatorial (2x2x2) com três fatores e dois níveis de cada fator, considerando 2 espécies por gênero analisado: *Aspidosperma* – *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron*; *Cariniana*- *C. estrellensis* e *C. legalis*, 2 níveis de luz: 100% da radiação ambiente e 20% da radiação ambiente e 2 condições de temperatura: temperatura ambiente e temperatura elevada em 2°C. Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições.

MATERIAL E MÉTODOS

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), com contraste de médias avaliadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) e teste de F para avaliar interações entre os tratamentos. Todas as análises foram realizadas no software SAS versão 9.3 (SAS Institute).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análises Morfológicas de Crescimento

6.1.1 Massa seca

A análise de dados de massa seca total (MST) e dos órgãos das plantas avaliadas é apresentada na **tabela 1**, onde verificamos que a espécie *Cariniana estrellensis* apresentou os maiores valores deste parâmetro em todos os tratamentos, com maior MST em 100%RTE (152,06 g, com intervalo de confiança entre 121,6-182,5 g). Estatisticamente a maior influência de fator significativo é genético caracterizado pela espécie, não havendo neste caso interação entre os fatores radiação e temperatura. No entanto quando avaliamos somente a massa seca de folhas todos os fatores (radiação, temperatura e espécie) analisados para as espécies da família Lecythidaceae apresentam influência estatisticamente significativa sobre o acúmulo de biomassa desse órgão. Quando avaliamos caules e raízes, os fatores de maior influência sobre o acúmulo foram espécie e radiação respectivamente, havendo interação estatística significativa entre radiação x temperatura para massa seca do caule.

Os dados de massa seca total mostram também que a espécie *Aspidosperma cylindrocarpon* apresentou acúmulo de biomassa de forma homogênea em 100%RTA, 100%RTE e 20%RTE (67,7; 56,8 e 68,6 g respectivamente), tendo menor acúmulo em 20%RTA (30,3 g) onde a baixa radiação (**Figura 6**) pode ter sido o fator limitante

para o desenvolvimento da espécie, pois, praticamente toda a matéria orgânica acumulada numa planta durante seu crescimento tem origem no processo fotossintético de fixação de carbono atmosférico, e isto representa em torno de 95% de toda sua biomassa seca. Assim, qualquer fator ambiental que afetar a fotossíntese afetará também o crescimento e acúmulo de biomassa (Syvertsen; Lloyd, 1994).

Para *Aspidosperma polyneuron* em 100%RTA houve maior depósito de biomassa e o menor foi observado em 20%RTE (67,8 e 49,4 g respectivos), com interação estatisticamente significante entre os fatores radiação e temperatura. Sendo esta espécie a de menor acúmulo de biomassa entre as espécies avaliadas no período experimental.

Como as folhas são os órgãos fotossintetizantes é de se esperar que haja influência da radiação em sua biomassa, visto que maior quantidade de pigmentos antena é necessária à captação de luz em ambientes sombreados, consequentemente quanto menor a taxa fotossintética menor a fixação de carbono e acúmulo de biomassa.

Em relação aos tratamentos de sombra, foi possível observar a tendência maior acúmulo de biomassa em todas as espécies avaliadas (Figura 6) em 20%RTE. Essa tendência também foi observada para as Lecitidáceas em 100%RTE. Tendo efeito oposto sobre as espécies da família Apocynaceae avaliadas.

Figura 6. Massa seca (g) de plantas de *Aspidosperma cylindrocarpon*, *Aspidosperma polyneuron*, *Cariniana estrellensis* e *Cariniana legalis*, crescidas em ambiente ensolarado ou sombreado com ou sem aquecimento. Onde 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (n=6), para cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1- Massa seca de raízes, caule, folhas e total (em g) de quatro espécies arbóreas nativas da floresta mesófila semidecídua crescidas em ambiente ensolarado ou sombreado com ou sem aquecimento. Onde 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (n=6), para cada tratamento.

Tratamentos	Espécie	MSR (g)	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)
100%RTA	<i>A. cylindrocarpon</i>	26,04 $\pm$ 5,1 Aa α	21,22 $\pm$ 3,36 Aa α	20,5 $\pm$ 3,1 Aa α	67,75 $\pm$ 10,80 Aa α
	<i>A. polyneuron</i>	26,79 $\pm$ 3,3 Aa α	24,25 $\pm$ 3,65 Aa β	16,97 $\pm$ 3,0 Aa α	68,01 $\pm$ 9,66 Aa α
	<i>C. estrellensis</i>	64,45 $\pm$ 10,1 Aa α	31,61 $\pm$ 4,86 Aa α	11,18 $\pm$ 1,7 Aa α	107,24 $\pm$ 14,33 Aa α
	<i>C. legalis</i>	34,63 $\pm$ 13,8 Aa β	8,64 $\pm$ 3,51 Aa β	7,68 $\pm$ 3,1 Aa β	80,48 $\pm$ 28,67 Aa β
100%RTE	<i>A. cylindrocarpon</i>	20,78 $\pm$ 3,8 Ba α	17,47 $\pm$ 3,84 Ba α	18,51 $\pm$ 3,5 Aa α	56,75 $\pm$ 11,03 Ba α
	<i>A. polyneuron</i>	20,66 $\pm$ 2,6 Bb α	16,92 $\pm$ 1,94 Ba α	11,77 $\pm$ 1,4 Ba β	49,35 $\pm$ 1,09 Aa β
	<i>C. estrellensis</i>	87,68 $\pm$ 5,7 Ba α	48,12 $\pm$ 6,54 Ba α	16,27 $\pm$ 2,0 Ba α	152,06 $\pm$ 12,26 Aa α
	<i>C. legalis</i>	56,28 $\pm$ 12,5 Ba β	16,8 $\pm$ 4,30 Ba β	15,11 $\pm$ 2,5 Ba α	88,19 $\pm$ 18,65 Ba
20%RTA	<i>A. cylindrocarpon</i>	11,72 $\pm$ 0,7 Ab α	9,51 $\pm$ 2,16 Ab α	10,39 $\pm$ 1,3 Ab α	30,26 $\pm$ 4,34 Ab α
	<i>A. polyneuron</i>	8,90 $\pm$ 1,2 Aa α	11,48 $\pm$ 1,82 Ab α	8,27 $\pm$ 0,9 Ab α	27,63 $\pm$ 3,53 Ab α
	<i>C. estrellensis</i>	45,96 $\pm$ 4,0 Ab α	22,91 $\pm$ 2,58 Ab α	16,37 $\pm$ 2,1 Ab α	85,24 $\pm$ 7,97 Ab α
	<i>C. legalis</i>	31,92 $\pm$ 4,9 Aa β	13,67 $\pm$ 3,10 Ab β	12,56 $\pm$ 2,0 Ab β	56,42 $\pm$ 9,17 Aa β
20%RTE	<i>A. cylindrocarpon</i>	23,53 $\pm$ 3,2 Bb α	23,09 $\pm$ 1,90 Bb α	21,98 $\pm$ 2,1 Bb α	68,61 $\pm$ 6,47 Bb α
	<i>A. polyneuron</i>	15,42 $\pm$ 1,5 Bb β	20,52 $\pm$ 2,35 Bb α	13,45 $\pm$ 1,3 Ba β	49,39 $\pm$ 4,62 Ba α
	<i>C. estrellensis</i>	69,10 $\pm$ 15,7 Bb α	30,59 $\pm$ 3,97 Bb α	21,97 $\pm$ 3,2 Bb α	121,66 $\pm$ 20,78 Ab α
	<i>C. legalis</i>	45,12 $\pm$ 9,0 Bb β	16,44 $\pm$ 3,27 Aa β	14,52 $\pm$ 3,2 Aa β	76,07 $\pm$ 14,92 Bb α
Fonte de Variação ANOVA A. cylindrocarpon e A. polyneuron		F _E = 1,44 NS	F _E = 0,06 NS	F _E = 9,37 *	F _E = 0,41 NS
		F _R = 16,36 **	F _R = 3,87 NS	F _R = 4,89 *	F _R = 0,78 NS
		F _T = 0,65 NS	F _T = 2,21 NS	F _T = 2,51 NS	F _T = 0,00 NS
		F _{RXT} = 12,01 *	F _{RXT} = 18,89 **	F _{RXT} = 14,42 **	F _{RXT} = 4,22*
		F _{RXE} = 1,82 NS	F _{RXE} = 0,16 NS	F _{RXE} = 0,01 NS	F _{RXE} = 0,34 NS
		F _{EXT} = 0,52 NS	F _{EXT} = 1,10 NS	F _{EXT} = 2,70 NS	F _{EXT} = 0,06 NS
		F _{EXRXT} = 0,27 NS	F _{EXRXT} = 0,02 NS	F _{EXRXT} = 0,43 NS	F _{EXRXT} = 1,05 NS
Fonte de Variação ANOVA C. estrellensis e C. legalis		F _E = 11,62 *	F _E = 43,16 **	F _E = 4,95 *	F _E = 15,26 **
		F _R = 3,06 NS	F _R = 3,32 NS	F _R = 4,58 *	F _R = 2,23 NS
		F _T = 7,78 *	F _T = 8,82 *	F _T = 7,90 *	F _T = 0,63 NS
		F _{RXT} = 0,00 NS	F _{RXT} = 1,45 NS	F _{RXT} = 0,50 NS	F _{RXT} = 0,00 NS
		F _{RXE} = 0,64 NS	F _{RXE} = 6,82 *	F _{RXE} = 0,84 NS	F _{RXE} = 1,23 NS
		F _{EXT} = 0,16 NS	F _{EXT} = 1,26 NS	F _{EXT} = 0,04 NS	F _{EXT} = 0,03 NS
		F _{EXRXT} = 0,08 NS	F _{EXRXT} = 0,77 NS	F _{EXRXT} = 0,73 NS	F _{EXRXT} = 3,49 NS

Resultados de análise de variância (ANOVA) de três fatores com radiação (R), temperatura (T) e espécie (E) com interação para cada fator analisado. **: P<0,001; *: 0,05>P>0,001; NS: não há diferença significativa. Os dados apresentados são Média $\pm$ erro padrão (n=6). Onde maiúsculas= temperatura, minúsculas= radiação e grego= espécie.

6.1.2 Partição de biomassa

Observando a **Figura 7** é possível avaliar a partição de biomassa, cada gênero apresenta entre as espécies, padrões similares de acúmulo de biomassa independentemente do ambiente de desenvolvimento, com pequenas diferenças entre as espécies.

Figura 7. Partição de biomassa de plantas de *Aspodosperma cylindrocarpon*, *Aspodosperma polyneuron*, *Cariniana estrellensis* e *Cariniana legalis*, crescidas em ambiente ensolarado e sombreado com e sem aquecimento. Onde 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente promovida por sombreamento com sombrite e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente promovida por sombreamento com sombrite e temperatura elevada em 2°C. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (n=6), para cada componente da planta.

Aspodosperma cylindrocarpon divide proporcionalmente o carbono assimilado entre raízes, caules e folhas. Do mesmo gênero, *Aspodosperma polyneuron* apresenta entre de 70% e 80% de sua biomassa dividida entre raízes e caule, com cerca de 20%

a 30% em massa para a região fotossintetizante. É a espécie do gênero avaliado com maior incremento de DAS em todos os tratamentos.

Entre as Lecitidáceas avaliadas, ambas apresentam a maior parte de sua massa alocada em suas raízes, cerca de 60%. *Cariniana estrellensis* cerca de 30% distribuído pelo caule e entre 10% e 20% em folhas, enquanto *Cariniana legalis* reparte os 40% restantes de biomassa de maneira homogênea entre caule e folhas.

O saldo no balanço de carbono promove o crescimento vegetal, mas a prioridade de alocação de fotoassimilados é condicionada pelo padrão da espécie (controle genético), idade (estágio de desenvolvimento) e condições de desenvolvimento (p. ex. características edáficas e de competição). Em povoamentos florestais, segundo Gonçalves et al., (2004), antes do fechamento de copas, a prioridade de alocação é para a expansão da área foliar e desenvolvimento do sistema radicular (principalmente raízes finas), ao passo que, depois que o auto-sombreamento impõe uma área foliar máxima, o acúmulo de nutrientes ocorre com mais intensidade no tronco.

Para os dados analisados o maior efeito foi causado pelo fator ambiental radiação, que para ambos os gêneros e partições (aérea e raízes) apresenta diferença estatística, no entanto foi possível verificar morfológicamente que o aspecto genético de cada espécie desempenha papel fundamental na alocação de biomassa. Esse acúmulo depende fundamentalmente da capacidade fotossintética de cada genótipo,

uma vez que o conteúdo de nutrientes minerais da maioria dos tecidos vegetais representa apenas 5% da biomassa seca produzida (HUTCHEON, 1976).

6.1.3 Área Foliar e Área Foliar Específica (AFE)

Os dados de área foliar (AF) e área foliar específica (AFE) estão apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Onde verificamos que os maiores índices de área foliar de todas as espécies foram encontrados sob os tratamentos de sombra, a maioria delas em 20%RTA onde havia 80% de bloqueio da radiação solar e temperatura ambiente. Em outras espécies, também foi observado maior incremento de área foliar em mudas mantidas sob sombreamento, como *Croton urucurana* (ALVARENGA et al., 2003) e *Eugenia uniflora* (Scalon et al., 2001).

Em ambientes sombreados as plantas comumente apresentam uma maior expansão foliar, pois o aumento de área foliar é um dos mecanismos utilizados pelas plantas para aumentar a superfície fotossintética, assegurando-se um rendimento fotossintético mais eficiente em baixa intensidade luminosa e,

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 2- Parâmetros de crescimento, Área foliar (dm²) AFE (dm²) e número de folhas em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.

Tratamentos	Espécie	Área Foliar dm ²	AFE	NF
100%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	72,58 ± 9,9 Aaα	4,16 ± 0,6 Aaα	31 ± 5 Aaα
	<i>A. polyneuron</i>	80,44 ± 13,9 Aaα	4,45 ± 0,2 Aaα	93 ± 15 Aaβ
	<i>C. estrellensis</i>	100,16 ± 22,4 Aaα	6,01 ± 0,3 Aaα	64 ± 9 Aaα
	<i>C. legalis</i>	68,13 ± 11,1 Aaβ	6,37 ± 0,4 Aaα	83 ± 9 Aaβ
100%RTE	<i>A. cylindrocarpon</i>	41,62 ± 11,7 Baα	3,77 ± 0,2 Baα	31 ± 3 Aaα
	<i>A. polyneuron</i>	75,38 ± 13,7 Aaβ	4,63 ± 0,1 Aaβ	81 ± 7 Baβ
	<i>C. estrellensis</i>	128,50 ± 23,4 Baα	6,83 ± 0,2 Baα	74 ± 5 Aaα
	<i>C. legalis</i>	32,11 ± 9,7 Baβ	5,55 ± 0,4 Baβ	140 ± 23 Baβ
20%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	91,25 ± 29,4 Aaα	5,37 ± 0,1 Abα	21 ± 2 Abα
	<i>A. polyneuron</i>	91,61 ± 19,3 Aaβ	6,25 ± 0,5 Abβ	68 ± 5 Abβ
	<i>C. estrellensis</i>	142,75 ± 35,9 Abα	9,10 ± 1,0 Abα	94 ± 12 Abα
	<i>C. legalis</i>	115,96 ± 21,1 Abβ	7,95 ± 0,6 Abβ	141 ± 25 Abβ
20%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	74,15 ± 13,3 Bbα	6,69 ± 0,4 Bbα	45 ± 4 Bbα
	<i>A. polyneuron</i>	92,6 ± 11,1 Abα	7,29 ± 0,3 Bbβ	108 ± 12 Bbβ
	<i>C. estrellensis</i>	246,16 ± 17,5 Baα	11,94 ± 0,7 Bbα	99 ± 15 Abα
	<i>C. legalis</i>	108,07 ± 29,2 Aaβ	9,1 ± 0,6 Bbβ	169 ± 42 Bbβ
Fonte de Variação Three Way ANOVA A. cylindrocarpon e A. polyneuron		F _E = 1,69 NS	F _E = 7,34 *	F _E = 54,06 **
		F _R = 2,94 NS	F _R = 79,08 **	F _R = 0,54 NS
		F _T = 0,18 NS	F _T = 7,09 *	F _T = 8,59 *
		F _{RxT} = 1,26 NS	F _{RxT} = 4,97 *	F _{RxT} = 12,26 *
		F _{RxE} = 0,24 NS	F _{RxE} = 0,11 NS	F _{RxE} = 1,32 NS
		F _{ExT} = 0,03 NS	F _{ExT} = 0,80 NS	F _{ExT} = 2,57 NS
		F _{ExRxT} = 0,90 NS	F _{ExRxT} = 0,10 NS	F _{ExRxT} = 0,91 NS
Fonte de Variação Three Way ANOVA C. estrellensis e C. legalis		F _E = 20,64 **	F _E = 9,22 *	F _E = 10,24 *
		F _R = 19,35 **	F _R = 68,17 **	F _R = 5,17 *
		F _T = 2,55 NS	F _T = 6,08 *	F _T = 2,54 *
		F _{RxT} = 1,85 NS	F _{RxT} = 6,11 *	F _{RxT} = 0,30 NS
		F _{RxE} = 0,32 NS	F _{RxE} = 3,59 NS	F _{RxE} = 0,26 NS
		F _{ExT} = 0,53 NS	F _{ExT} = 0,00 NS	F _{ExT} = 1,24 NS
		F _{ExRxT} = 7,40 *	F _{ExRxT} = 4,28 *	F _{ExRxT} = 0,15 NS

Resultados de análise de variância (ANOVA) de três fatores com radiação (R), temperatura (T) e espécie (E) com interação para cada fator analisado. **: P<0,001; *: 0,05>P>0,001; NS: não há diferença significativa. Os dados apresentados são média ± erro padrão (n=6).

consequentemente, compensando a baixa taxa fotossintética por unidade de área de folha, uma característica das folhas sombreadas (Jones; McLeod, 1990).

A área foliar específica (AFE) é utilizada como parâmetro que traduz a espessura da folha, assim, quanto maior a AFE mais delgada é a folha. Os valores de área foliar específica que consistem na razão área foliar/massa foliar apresentaram claramente um padrão entre cada família avaliada, com tendência de aumento em relação ao sombreamento. *Aspidosperma polyneuron* e *Cariniana estrellensis* apresentaram padrão semelhante de reação aos tratamentos e seus congêneres, tiveram reação oposta em relação aos tratamentos de sol. A espécie não pioneira *C. langsdorffii* avaliada por Soriani (2011) também apresentou maior AFE em ambiente sombreado.

Em todas as espécies avaliadas, os maiores valores foram encontrados em 20%RTE sendo as médias $\pm$ erro padrão: $91,25 \pm 29,4$; $91,61 \pm 19,3$; $246,16 \pm 17,51$ e $115,96 \pm 21,13$ (dm^2g^{-1}) respectivamente para *Aspidosperma cylindrocarpon* (20%RTA), *Aspidosperma polyneuron* (20 %RTA), *Cariniana estrellensis* (20%RTE) e *Cariniana legalis* (20%RTA), as análises de variância, no entanto, nos mostram que o fator temperatura apresenta significância estatística com $p \leq 0,5$ e que o fator radiação tem maior influência sobre este parâmetro apresentando $p \leq 0,001$, sendo também significativa a interação entre estes fatores. Com radiação intensa os maiores valores foram encontrados em 100%RTE.

A maior área foliar específica (AFE) nas plantas que cresceram na sombra (20%RTA e 20%RTE) seria um problema se estas fossem expostas a alta radiação, pois a superfície de evaporação maior nestas plantas pode aumentar ainda mais o estresse oxidativo. Aspectos da anatomia da folha são importantes para a tolerância à sombra, porque eles afetam fortemente o ganho de carbono, a perda de água e a dureza da folha (Hanba et al., 2002).

6.1.4 Incremento de crescimento (DAS, Comprimento e Número de Folhas)

As quatro espécies avaliadas neste experimento mostraram maior incremento de diâmetro do caule na altura do solo (DAS) nos tratamentos de radiação ambiental sem bloqueio, no entanto, as Apocinaceae (apresentaram seus maiores valores ($11,8 \pm 0,8$ e $13,8 \pm 1,1$ mm, respectivamente para *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron*) em 100%RTA e as Lecithidaceae em 100%RTE ($15,1 \pm 0,7$ e $10,4 \pm 1,9$ mm respectivamente para *C. estrellensis* e *C. legalis*). Para este parâmetro o fator de maior influência estatística foi radiação, seguido da interação entre radiação ambos com $p \leq 0,001$ e temperatura e por último com $p \leq 0,5$ o fator espécie (Tabela 3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3- Parâmetros de crescimento, Incremento de DAS (diâmetro do caule na altura do solo (mm), Incremento do comprimento (cm) e Incremento do número de folhas 300 dias após o início dos tratamentos em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.

Tratamento	Espécie	Incremento DAS	Incremento Comprimento	Incremento Folhas
100%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	11,8 ± 0,8 Aaα	47,5 ± 5,8 Aaα	25,33 ± 4,4 Aaα
	<i>A. polyneuron</i>	13,8 ± 1,1 Aaβ	38,1 ± 4,1 Aaβ	73,17 ± 16,2 Bbβ
	<i>C. estrellensis</i>	14,0 ± 1,5 Aaα	48,9 ± 8,9 Aaα	56,17 ± 8,6 Aaα
	<i>C. legalis</i>	6,5 ± 2,0 Aaβ	3,1 ± 1,3 Aaβ	63,00 ± 23,1 Aaβ
100%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	9,8 ± 1,4 Baα	43 ± 7,5 Aaα	23,83 ± 3,2 Aaα
	<i>A. polyneuron</i>	12,1 ± 0,4 Baβ	31,7 ± 3,2 Abβ	63,33 ± 7,7 Baβ
	<i>C. estrellensis</i>	15,1 ± 0,7 Aaα	64,0 ± 7,1 Baα	62,17 ± 4,6 Aaα
	<i>C. legalis</i>	10,4 ± 1,9 Baβ	28,8 ± 3,4 Bbβ	117,5 ± 23 Baβ
20%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	6,9 ± 0,3 Abα	42,58 ± 9,3 Aaα	13,67 ± 1,4 Abα
	<i>A. polyneuron</i>	8 ± 0,7 Abβ	47,9 ± 8,5 Aaα	50,83 ± 5,8 Abβ
	<i>C. estrellensis</i>	11,1 ± 0,7 Abα	65,0 ± 3,3 Abα	101,33 ± 26,5 Abα
	<i>C. legalis</i>	7,5 ± 1,0 Abβ	37,1 ± 5,2 Aaβ	116,67 ± 23,5 Abβ
20%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	9,7 ± 0,5 Baα	78,8 ± 6,4 Bbα	39,00 ± 3,9 Bbα
	<i>A. polyneuron</i>	10,3 ± 0,4 Bbβ	59,0 ± 8,2 Bbβ	91,17 ± 10,8 Bbβ
	<i>C. estrellensis</i>	11,9 ± 0,5 Abα	54,9 ± 8,3 Bbα	89,83 ± 13,8 Abα
	<i>C. legalis</i>	9,0 ± 0,8 Bbβ	38,6 ± 3,8 Bbβ	148,17 ± 39,6 Bbβ
Fonte de Variação ANOVA A. cylindrocarpon e A. polyneuron		F _E = 7,26 *	F _E = 3,21 NS	F _E = 11,96 *
		F _R = 32,96 **	F _R = 11,96 *	F _R = 3,44 NS
		F _T = 0,42 NS	F _T = 3,44 NS	F _T = 8,77 *
		F _{RxT} = 15,75 **	F _{RxT} = 8,77 *	F _{RxT} = 3,21 NS
		F _{RxE} = 1,62 NS	F _{RxE} = 0,10 NS	F _{RxE} = 0,10 NS
		F _{ExT} = 0,02 NS	F _{ExT} = 1,88 NS	F _{ExT} = 1,88 NS
		F _{ExRxT} = 0,10 NS	F _{ExRxT} = 1,41 NS	F _{ExRxT} = 1,41 NS
Fonte de Variação ANOVA C. estrellensis e C. legalis		F _E = 26,62 **	F _E = 47,86 **	F _E = 6,24 *
		F _R = 3,22 NS	F _R = 6,24 *	F _R = 1,96 NS
		F _T = 4,07 *	F _T = 1,96 NS	F _T = 5,85 *
		F _{RxT} = 0,58 NS	F _{RxT} = 5,85 *	F _{RxT} = 47,86 **
		F _{RxE} = 2,44 NS	F _{RxE} = 2,78 NS	F _{RxE} = 2,78 NS
		F _{ExT} = 0,94 NS	F _{ExT} = 0,65 NS	F _{ExT} = 0,65 NS
		F _{ExRxT} = 0,37 NS	F _{ExRxT} = 0,32 NS	F _{ExRxT} = 0,32 NS

Resultados de análise de variância (ANOVA) de três fatores com radiação (R), temperatura (T) e espécie (E) com interação para cada fator analisado **: P<0,001; *: 0,05>P>0,001; NS: não há diferença significativa. Os dados apresentados são média ± erro padrão (n=6).

Espécies que demandam luz, com seu grande potencial de taxa de crescimento, sofrem um tipo de resposta de inanição em sombra (Chazdon et al., 2001). Talvez isto explique o baixo incremento do diâmetro do caule nas espécies sob sombreamento, por não haver luz suficiente. O crescimento em diâmetro tem relação mais direta com a fotossíntese do que o crescimento do caule porque depende mais dos carboidratos acumulados e de um balanço favorável entre fotossíntese líquida e respiração (Atroch et al., 2001).

Quanto ao incremento de comprimento o fator de maior influência foi a radiação, os maiores valores foram encontrados em temperatura elevada e sombra ($78,8 \pm 6,4$; $59,0 \pm 8,2$ e $38,6 \pm 3,8$ cm para *A. cylindrocarpon*, *A. polyneuron* e *C. legalis*, respectivamente), apenas *C. estrellensis* apresentou maior incremento de comprimento sob 100%RTE ($65,0 \pm 3,4$ cm). A interação dos fatores radiação e temperatura também mostrou-se estatisticamente significativa.

O incremento do número de folhas foi avaliado e aos 300 dias de exposição aos tratamentos o que proporcionou melhor ambiente para as espécies avaliadas desenvolverem folhas foi 20%RTE, de forma semelhante ao parâmetro de comprimento, no entanto neste caso o fator de maior influência para o número de folhas é o fator genético caracterizado pela espécie. No entanto, apesar do fator genético, o incremento de folhas evidencia a taxa de crescimento das plantas que apresenta menor velocidade em ambientes de radiação intensa, o que confirma o

achado de que uma planta pode crescer quando cronicamente fotoinibida, no entanto em menor taxa (Öquist et al., 1992).

6.2 Análises Fisiológicas

6.2.1 Pigmentos fotossintéticos

De maneira simplificada os pigmentos fotossintéticos são responsáveis pela absorção e transformação de energia luminosa em energia química (Taiz; Zeiger, 2010). Ambas as clorofilas *a* e *b* são componentes das membranas dos cloroplastos e ocorrem na razão clorofila *a/b* de aproximadamente 3/1 (Lichtenthaler et al., 1981).

Os dados apresentados na **Tabela 4**, mostram que quase todas as espécies apresentam maiores concentrações de clorofila *a* nos tratamentos de sombra sendo os maiores índices em 20%RTA de *A. cylindrocarpon* ($3,76 \pm 0,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$), *A. polyneuron* ($3,96 \pm 0,7 \mu\text{mol.g}^{-1}$) e *C. estrellensis* ($4,03 \pm 0,8 \mu\text{mol. g}^{-1}$) *respectivamente*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4- Pigmentos fotossintéticos, Clorofila *a* (*Chl a*); Clorofila *b* (*Chl b*); Clorofila total (*Chl total*) e carotenóides quantificados 300 dias após o início dos tratamentos em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.

Tratamento	Espécie	<i>Chl a</i> (μmol/g)	<i>Chl b</i> (μmol/g)	<i>Chl total</i> (μmol/g)	Carot (μmol/g)
100%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	1,08 ± 0,6 Aaα	1,29 ± 0,9 Aaα	2,36 ± 1,5 Aaα	0,75 ± 0,2 Aaα
	<i>A. polyneuron</i>	1,33 ± 0,4 Aaα	1,39 ± 0,8 Aaα	2,72 ± 1,2 Aaα	0,65 ± 0,2 Aaα
	<i>C. estrellensis</i>	2,03 ± 0,6 Aaα	2,09 ± 1,2 Aaα	4,12 ± 0,5 Aaα	0,90 ± 0,2 Aaα
	<i>C. legalis</i>	2,11 ± 0,4 Aaα	2,22 ± 0,1 Aaα	4,32 ± 0,5 Aaα	0,97 ± 0,4 Aaα
100%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	1,38 ± 0,3 Aaα	1,57 ± 0,5 Aaα	2,95 ± 0,7 Aaα	0,74 ± 0,1 Aaα
	<i>A. polyneuron</i>	1,99 ± 0,3 Baβ	2,75 ± 0,5 Baβ	4,74 ± 0,7 Baβ	0,81 ± 0,1 Baα
	<i>C. estrellensis</i>	2,95 ± 0,5 Baα	3,58 ± 1,1 Baα	6,53 ± 1,2 Baα	0,93 ± 0,2 Aaα
	<i>C. legalis</i>	1,78 ± 0,4 Aaβ	2,26 ± 0,8 Aaβ	4,05 ± 0,7 Aaβ	0,74 ± 0,1 Aaα
20%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	3,76 ± 0,9 Abα	1,73 ± 0,6 Bbα	4,75 ± 1,1 Aaα	1,09 ± 0,3 Abα
	<i>A. polyneuron</i>	3,96 ± 0,7 Abβ	7,45 ± 2,7 Abβ	11,41 ± 2,5 Abβ	2,60 ± 0,7 Abβ
	<i>C. estrellensis</i>	5,47 ± 0,3 Abα	6,73 ± 0,6 Abα	8,85 ± 0,6 Abα	1,21 ± 0,2 Abα
	<i>C. legalis</i>	4,71 ± 0,5 Abα	3,75 ± 1,0 Abα	8,47 ± 0,5 Abα	1,45 ± 0,3 Abα
20%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	3,14 ± 0,5 Abα	3,58 ± 0,3 Bbα	6,33 ± 0,8 Abα	1,09 ± 0,2 Abα
	<i>A. polyneuron</i>	3,14 ± 0,6 Baα	3,31 ± 0,5 Aaα	6,45 ± 1,0 Baα	1,31 ± 0,2 Abα
	<i>C. estrellensis</i>	2,72 ± 0,9 Baα	4,58 ± 1,2 Bbα	6,13 ± 0,8 Abα	1,12 ± 0,4 Baα
	<i>C. legalis</i>	4,78 ± 0,8 Abβ	5,46 ± 1,0 Bbα	10,23 ± 1,0 Bbα	2,09 ± 0,5 Baβ
Fonte de Variação Three Way ANOVA A . cylindrocarpon e A. polyneuron		F _E = 3,78 NS	F _E = 0,00 NS	F _E = 3,11 NS	F _E = 0,00 NS
		F _R = 25,46 **	F _R = 0,26 NS	F _R = 22,01 **	F _R = 17,23 **
		F _T = 1,03 NS	F _T = 11,83 *	F _T = 0,13 NS	F _T = 0,17 NS
		F _{RxT} = 7,00 *	F _{RxT} = 2,00 NS	F _{RxT} = 3,49 NS	F _{RxT} = 0,00 NS
		F _{RxE} = 0,19 NS	F _{RxE} = 1,95 NS	F _{RxE} = 0,03 NS	F _{RxE} = 0,87 NS
		F _{ExT} = 0,47 NS	F _{ExT} = 0,34 NS	F _{ExT} = 0,08 NS	F _{ExT} = 0,22 NS
		F _{ExRxT} = 2,83 NS	F _{ExRxT} = 0,05 NS	F _{ExRxT} = 3,15 NS	F _{ExRxT} = 0,04 NS
Fonte de Variação Three Way ANOVA C. estrellensis e C. legalis		F _E = 0,00	F _E = 0,48 NS	F _E = 0,23 NS	F _E = 0,49 NS
		F _R = 22,25 **	F _R = 7,78 *	F _R = 13,11 **	F _R = 13,25 **
		F _T = 0,01 NS	F _T = 1,70 NS	F _T = 0,67 NS	F _T = 2,13 NS
		F _{RxT} = 0,54 NS	F _{RxT} = 0,16 NS	F _{RxT} = 0,00 NS	F _{RxT} = 3,22 NS
		F _{RxE} = 1,13 NS	F _{RxE} = 0,00 NS	F _{RxE} = 0,17 NS	F _{RxE} = 0,25 NS
		F _{ExT} = 0,02 NS	F _{ExT} = 0,07 NS	F _{ExT} = 0,06 NS	F _{ExT} = 0,57 NS
		F _{ExRxT} = 1,29 NS	F _{ExRxT} = 0,34 NS	F _{ExRxT} = 0,66 NS	F _{ExRxT} = 0,09 NS

Resultados de análise de variância (ANOVA) de três fatores com radiação (R), temperatura (T) e espécie (E) com interação para cada fator analisado. **: P≤0,001; *: 0,05≥P≥0,001; NS: não há diferença estatisticamente significativa. Os dados apresentados são média ± erro padrão (n=6).

A maior quantidade de clorofila presente nas plantas sob sombreamento é considerada um ajuste fisiológico que aumenta a eficiência da captura de luz. As mesmas espécies acima citadas também apresentam os maiores valores de Clorofila *b* em 20%RTA ($1,73 \pm 0,7$; $7,45 \pm 2,7$ e $4,01 \pm 1,2 \mu\text{mol.g}^{-1}$ respectivamente). *Cariniana legalis* foi a única espécie em que o maiores índice (Gonçalves et al., 2001; Kitao et al., 2000). A degradação das clorofilas sob radiação intensa ultrapassa a síntese dessa moléculas, por isso, uma concentração menor de clorofila é observada nestas condições. Devido a este fato, folhas sob condição de sombra em comparação com folhas sob condição de sol tendem a mostrar maiores concentrações de clorofilas por unidade de peso de folha (Boardman, 1977).

Pearcy e Yang (1998) afirmam que esta diferença ocorre principalmente porque há uma maior produção de clorofila sob condições de sombra. Em relação à dinâmica adaptativa-modulativa das plantas a diferentes condições luminosas, acredita-se que ocorra um balanço entre estes dois processos.

A razão carotenóides/clorofila apresentou-se maior conforme mostrado na tabela 6, nos tratamentos de sol, com os maiores valores em 100%RTA para todas as espécies avaliadas. Maiores valores da razão carotenóides/clorofila em espécies secundárias crescidas em ambiente de radiação intensa (Favaretto et al., 2011).

A razão carotenóides/clorofila total apresentada na **tabela 5** pode ser usada como um indicador potencial de dano foto-oxidativo causado por alta irradiação (Hendry; Price, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5- Pigmentos foliares, razão carotenóides/clorofila total, razão clorofila *a* /clorofila *b* e razão clorofila total por carotenóides 300 dias após o início dos tratamentos em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.

Tratamento	Espécie	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i> ($\mu\text{mol/g}$)	Carot/Chl total ($\mu\text{mol/g}$)
100%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	1,65 $\pm$ 0,4 Aa α	0,62 $\pm$ 0,1 Aa α
	<i>A. polyneuron</i>	1,27 $\pm$ 0,2 Aa α	0,30 $\pm$ 0,0 Aa β
	<i>C. estrellensis</i>	1,65 $\pm$ 0,4 Aa α	0,27 $\pm$ 0,0 Aa α
	<i>C. legalis</i>	2,05 $\pm$ 0,4 Aa β	0,32 $\pm$ 0,0 Aa β
100%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	1,28 $\pm$ 0,3 Ba α	0,31 $\pm$ 0,1 Ba α
	<i>A. polyneuron</i>	0,79 $\pm$ 0,1 Ba β	0,18 $\pm$ 0,0 Ba β
	<i>C. estrellensis</i>	1,34 $\pm$ 0,4 Aa α	0,18 $\pm$ 0,0 Ba α
	<i>C. legalis</i>	1,45 $\pm$ 0,5 Ba α	0,23 $\pm$ 0,0 Ba β
20%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	1,88 $\pm$ 0,4 Aa α	0,27 $\pm$ 0,0 Ab α
	<i>A. polyneuron</i>	1,41 $\pm$ 0,5 Ab β	0,22 $\pm$ 0,0 Ab α
	<i>C. estrellensis</i>	3,77 $\pm$ 0,5 Aa α	0,19 $\pm$ 0,0 Ab α
	<i>C. legalis</i>	2,17 $\pm$ 0,4 Aa α	0,20 $\pm$ 0,0 Ab α
20%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	0,83 $\pm$ 0,1 Bb α	0,18 $\pm$ 0,0 Ab α
	<i>A. polyneuron</i>	0,96 $\pm$ 0,2 Ba α	0,22 $\pm$ 0,0 Ab α
	<i>C. estrellensis</i>	1,06 $\pm$ 0,2 Bb α	0,20 $\pm$ 0,0 Bb α
	<i>C. legalis</i>	1,12 $\pm$ 0,3 Ba α	0,22 $\pm$ 0,0 Ba β
Fonte de Variação ANOVA A. cylindrocarpon e A. polyneuron		F _E = 0,00 NS	F _E = 8,31 *
		F _R = 0,26 NS	F _R = 10,28 *
		F _T = 11,83 *	F _T = 6,08 *
		F _{RxT} = 2,00 NS	F _{RxT} = 9,16 *
		F _{RxE} = 1,95 NS	F _{RxE} = 8,13 *
		F _{ExT} = 0,34 NS	F _{ExT} = 0,80 NS
		F _{ExRxT} = 0,05 NS	F _{ExRxT} = 0,22 NS
Fonte de Variação ANOVA C. estrellensis e C. legalis		F _E = 0,80 NS	F _E = 0,02 NS
		F _R = 1,25 NS	F _R = 0,48 NS
		F _T = 4,23 *	F _T = 0,58 NS
		F _{RxT} = 0,13 NS	F _{RxT} = 3,94 NS
		F _{RxE} = 0,00 NS	F _{RxE} = 1,79 NS
		F _{ExT} = 0,05 NS	F _{ExT} = 0,06 NS
		F _{ExRxT} = 0,11 NS	F _{ExRxT} = 0,10 NS

Resultados de análise de variância (ANOVA) de três fatores com radiação (R), temperatura (T) e espécie (E) com interação para cada fator analisado. **: P<0,001; *: 0,05>P>0,001; NS: não há diferença significativa. Os dados apresentados são média $\pm$ erro padrão (n=6).

6.2.2 Monitoramento micrometeorológico e fluorescência da clorofila *a*

O parâmetro F_v/F_m foi usado para estimar os efeitos do FFFA sobre a integridade do fotossistema II (PSII). A fotoinibição dinâmica, por inativação do PSII, funciona como um mecanismo de defesa, pois o aumento da dissipação não fotoquímica da energia em um momento em que a afluência de CO_2 é diminuída (devido ao fechamento estomático, nas horas de maior radiação e temperatura), pode evitar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e dano foto-oxidativo. Portanto, a inativação do PSII é uma estratégia eficiente, pois o fluxo de elétrons se interrompe em um momento em que as condições ambientais não são favoráveis para a assimilação do carbono (Critchley, 1998).

A fluorescência da clorofila *a* informa como o PSII está utilizando a energia absorvida pelas clorofilas e como ele está sendo danificado pelo excesso de luz (Maxwell; Johnson, 2000). A proporção de energia emitida na forma de fluorescência é baixa sob condições ótimas para a planta (Pereira et al., 2000), no entanto, como resultado de estresse, há um aumento na dissipação de calor e na emissão de fluorescência pelas folhas das plantas. Em geral, valores da razão F_v/F_m menores do que 0,7 pode significar que a planta está submetida a algum tipo de estresse (Bolhar-Nordenkamp; Öquist, 1993).

Avaliando os dados das **Figura Figura** , no início da exposição aos tratamentos (18 dias) as plantas apresentavam pequena variação em relação aos tratamentos e todas apresentavam pequena variação diurna da eficiência quântica

máxima do PSII (razão **Fv/Fm**) com exceção de *Cariniana legalis*, no entanto com menos de 20 dias de exposição aos tratamentos com radiação intensa já apresentava sinais de fotoinibição dinâmica, iniciando o dia com taxas de **Fv/Fm** menores que 0,7 indicando assim, uma alta emissão de fluorescência com incidência de queda da taxa durante o dia, ao final do dia a emissão de fluorescência apresentava-se menor com valores aceitáveis de **Fv/Fm** em 100%RTE, e valores abaixo de 0,7 em 100%RTA.

Aos 150 dias a espécie apresentava no início da manhã taxas de **Fv/Fm** de 0,75 e mesmo com uma flutuação diurna (negativa) durante o dia (0,53 às 12h), ao final da tarde os valores atingiam 0,68 em 100%RTA, e ao acompanhar até a manhã seguinte pudemos verificar que atingiu valor próximo de 0,70 e 0,76 às 6h) valores normais ao final da tarde, no entanto mostrando tendência a fotoinibição crônica.

Aos 300 dias de exposição à radiação intensa, *C. legalis* apesar de apresentar no início do dia valores bem próximos a 0,7 as plantas terminaram o dia fotoinibidas com nos dois tratamentos com radiação intensa com valores de **Fv/Fm** abaixo de 0,7 (100%RTA=0,669; 100%RTE= 0,655).

Comportamento similar foi observado em *C. estrellensis*, na avaliação intermediária: sem fotoinibição na primeira avaliação, na avaliação intermediária início da manhã sem fotoinibição com queda da taxa durante o dia abaixo de 0,7 e recuperação ao final do dia. No entanto sem recuperação no final da tarde.

Figura 8- Avaliação da eficiência quântica máxima do PSII em *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron* aos 18, 150 e 300 dias de exposição aos tratamentos.

Figura 9- Avaliação da eficiência quântica máxima do PSII em *C. estrellensis* e *C. legalis* aos 18, 150 e 300 dias de exposição aos tratamentos.

Entre as Apocináceas, no entanto, evidenciou-se maior fragilidade da espécie *A. polyneuron* em exposição à radiação solar, na primeira avaliação a diferença entre os tratamentos de sol (100%RTA e 100%RTE) e sombra (20%RTA e 20%RTE) já era bem pronunciado, não apresentando ainda fotoinibição. Na avaliação intermediária, a razão **Fv/Fm** iniciou e terminou o dia abaixo de 0,7, no dia seguinte a eficiência quântica do PSII não foi recuperada, apresentando ainda valores abaixo de 0,7 o que caracteriza fotoinibição crônica; na terceira avaliação as diferenças entre os tratamentos luminosos aumentaram ainda mais, podendo ser confirmada a fotoinibição crônica, que evidencia sua caracterização sucessional de espécie climática.

A não recuperação da razão **Fv/Fm** após a exposição à alta radiação é uma evidência da fotoinibição irreversível ou crônica severa, em que os PSII avariados ou sem a proteína D1, são permanentemente danificados (Critchley, 1998). Quando uma planta adaptada à sombra é exposta a alta radiação, ela aparentemente é incapaz de lidar com o estresse fotoinibitório, através de um ciclo de reparo rápido do fotossistema II. Em termos adaptativos, é energeticamente mais custoso manter um sistema de reparo sob baixas intensidades luminosas, portanto, a planta fica mais sensível a sofrer fotoinibição (Öquist et al., 1992).

Os baixos valores da razão **Fv/Fm** por exposição contínua à alta radiação, como ocorreu na espécie não pioneira *C. legalis*, nas plantas crescidas sob condição de sol, pode ser uma evidência de fotoinibição irreversível ou crônica severa, onde não há

recuperação total da eficiência fotoquímica máxima do PSII durante a noite (Krause et al, 1995). Nesta situação, os PSII avariados ou sem a proteína D1, são convertidos em PSII permanentemente danificados (Critchley, 1998).

Assim, a fotoinibição irreversível crônica é um problema muito mais sério para as plantas do que a fotoinibição dinâmica apenas, uma vez que os complexos do PSII danificados permanentemente não voltam a participar da fotossíntese (Hideg; Murata, 1997). No entanto, esses fotossistemas danificados podem contribuir com a dissipação termal de energia (Krause et al., 1995). Uma planta cronicamente fotoinibida pode crescer, porém em taxa menor, como verificado por Öquist et al., (1992).

As razões maiores de F_v/F_m nas condições de 100%RTE maiores quando comparadas a 100%RTA podem ser explicadas pelo aumento de tolerância à radiação causada pelo aquecimento.

6.2.3 Fotoinibição diurna: redução da eficiência quântica máxima do PSII

Os dados de fotoinibição diurna apresentados na **Figura** nos mostram que com o aumento do período de exposição aos tratamentos 100%RTA e 100%RTE a redução da eficiência quântica máxima do PSII (% fotoinibição) apresentou aumentos, evidenciando que as espécies secundárias avaliadas não apresentam mecanismos muito

eficientes para dissipar o excesso de energia luminosa absorvida. Visto que a maior sensibilidade de plantas de sombra a fotoinibição é geralmente atribuída a fatores tal como a grande quantidade de absorção de luz pelos complexos-antena de clorofila para o fotossistema II (PSII) e menores taxas de fotossíntese (Öquist et al., 1992)

Os maiores valores são atribuídos às espécies *A. polyneuron* (40%), *C. estrellensis* (29%) e *C. legalis* (29%) em 100%RTA e 100%RTE respectivamente. No entanto deve-se sempre ser levado em consideração que os valores de fotoinibição representam somente o quanto a razão **Fv/Fm** caiu, sem no entanto avaliar se essa queda representa fotoinibição. Por exemplo, se uma amostra apresenta queda de 0,850 a 0,720, ela não apresenta fotoinibição mesmo que o parâmetro de % de fotoinibição indique que ela sofreu 15 % de fotoinibição diurna, no entanto, os mesmos 15% podem ser apresentados por este método para uma amostra que teve queda da razão **Fv/Fm** de 0,700 para 0,550 o que realmente representa fotoinibição.

Assim, ao avaliar este parâmetro é sempre necessário avaliar em conjunto os valores da razão **Fv/Fm**.

6.2.4 Temperatura Foliar

As plantas normalmente apresentam flutuações na temperatura diurna, a

RESULTADOS E DISCUSSÃO

aquisição de termotolerância pode refletir de forma mais geral um mecanismo que contribui para a homeostase do metabolismo, numa base diária. Estima-se que a faixa térmica ótima para qualquer planta é de cerca de 10°C de amplitude. A exposição a temperaturas fora deste intervalo ótimo, embora não necessariamente letais, pode ser considerada estressante (Morison; Morecraf, 2006).

É possível verificar as mudanças da temperatura foliar em função do período de exposição das plantas aos tratamentos deste trabalho. De acordo com o período de exposição, quanto maior a exposição, maior a temperatura foliar. Em todas as espécies avaliadas. Tendo estas análises como principal fator de influência a temperatura seguida da interação entre radiação e temperatura.

Durante a fotoinibição há aumento da emissão de fluorescência e principalmente de calor, para proteger o PSII (Larcher, 2000). Isso foi evidenciado nos horários de maior fotoinibição e também de acordo com o tempo de exposição aos tratamentos.

As plantas mostram sensibilidade diferencial à alta temperatura, dependendo da duração, gravidade e do desenvolvimento do estresse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 10 – Percentual de fotoinibição diurna em Ac (*Aspidosperma cylindrocarpon*), Ap (*Aspidosperma polyneuron*), Ce (*Cariniana estrellensis*) e Cl (*Cariniana legalis*) sob tratamentos de radiação e temperatura: 100%RTA (radiação e temperatura ambiente), 100%RTE (radiação ambiente e temperatura elevada em 2 °C), 20%RTA (20% da radiação ambiente e temperatura ambiente) e 20%RTE (20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C).

6.3 Análises Bioquímicas

6.3.1 Quantificação de MDA

A inibição do transporte de elétrons resultante de estresses ambientais pode resultar na produção de ROS, que se formam como consequência da redução do oxigênio sendo eles: o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$), que são altamente reativos e tóxicos e podem causar danos celulares através da oxidação de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Um dos metabólitos resultantes da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA).

Portanto, a sua determinação, ainda que de forma indireta, constitui-se em um indicador de avaliação do grau do estresse oxidativo. A consequência direta do dano às membranas celulares pela peroxidação lipídica é o extravasamento do conteúdo celular para o meio que estiver envolvendo os tecidos danificados, quando o dano for suficiente para tanto (ASADA, 1996, KRIEGER-LISKAY, 2005).

Com os dados de quantificação de MDA mostrados na **Tabela 6** verificamos que nos tratamentos de radiação intensa (100%RTA e 100%RTE) foram apresentadas as maiores concentrações, o que mostra que neste tratamento houve maior peroxidação lipídica e maiores danos às membranas celulares.

6.3.2 Quantificação de H₂O₂

A quantificação de H₂O₂ nos mostra que nos tratamentos com radiação intensa todas as espécies apresentam maior quantidade de peróxido provavelmente por maior produção e também uma menor eliminação dessas ROS. *Aspidosperma cylindrocarpon* além de mostrar sensibilidade nos tratamentos de radiação mostrou-se também sensível a 20% RTE, mostrando que mesmo um aumento pequeno de temperatura pode dobrar a quantidade de H₂O₂ na folha em comparação com uma folha de sombra e temperatura ambiente. O que mostra que a exposição a altas temperaturas fora do intervalo ótimo, embora não necessariamente letais, podem ser consideradas estressantes. Os atuais limites máximos de temperatura para as espécies de clima temperado está entre 40°C e 55°C, dependendo da duração da exposição ao fator estressante (Klueva et al., 2001)

6.3.3 Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes

O sistema antioxidante é fundamentalmente importante para proteger o aparato fotossintético da destruição foto-oxidativa (Polle, 1997). Plantas expostas a estresse foto-

oxidativo geralmente respondem com proteção antioxidante aumentada (Foyer et al., 1994).

A **Figura 11** nos mostra os dados obtidos das amostras submetidas aos tratamentos de radiação e temperatura. Favaretto et al., (2011) observou aumento da atividade da SOD em plantas que cresceram sob sol pleno, comparadas com plantas que cresceram na sombra e maior atividade em espécies pioneiras em geral, comparadas com não pioneiras.

A utilização da energia fotossintética em espécies sucessionais tardias é menor do que em espécies pioneiras, assume-se então que uma maior proteção antioxidante pode ser necessária para compensar maior estresse oxidativo mediado pela luz (Hansen et al., 2002). Enzimas como a catalase e a superóxido dismutase têm sua atividade aumentada durante determinados tipos de estresses ambientais (Parida et al., 2004, Blödner et al., 2005). Atividade de SOD tem sido correlacionada com condições ambientais adversas como seca, geada e injúria patogênica, entre outras (Monk et al., 1989). Neste trabalho para a espécie *A. cylindrocarpon* foi verificado aumento da atividade específica de SOD em tratamentos com radiação intensa (**Figura 11**), e quando comparados os tratamentos de sombra, o que apresentava temperatura elevada apresentou maior atividade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa maior atividade em plantas submetidas a tratamentos com aquecimento (100%RTE e 20%RTE) pode ser verificado entre todas as espécies, com exceção à *A. polyneuron*.

Folhas aclimatadas à alta intensidade de luz mostraram maior atividade de SOD do que folhas aclimatadas à sombra (Polle, 1997, Hansen et al., 2002; García-Plazaola et al., 1999). O que indica que *A. cylindrocarpon* apresenta maior tolerância à luz. Além disto, espécies pioneiras de florestas tropicais são bem conhecidas por ter capacidade muito maior de assimilação fotossintética do que espécies tolerantes sombra (Kitajima, 1994; Poorter, 1999).

Uma vez que a ação da SOD resulta na formação de H_2O_2 , ela está também intimamente associada com a atividade da CAT, APX e outras peroxidases, mantendo, portanto a interação com estas outras enzimas, para garantir um balanço altamente otimizado, de forma a reduzir o risco de danos oxidativos. O H_2O_2 produzido pela SOD é degradado pela CAT principalmente nos peroxissomos (Scandalios 1990, Azevedo et al., 1998). A diminuição nas atividades de SOD e CAT pode ser vista como um enfraquecimento nos mecanismos de dissipação de ERO das plantas (Zhang e Kirkham, 1994).

A Erro! Fonte de referência não encontrada. mostra os dados obtidos de atividade específica da catalase (CAT), onde não foi detectada atividade desta enzima *A. cylindrocarpon* nos tratamentos de sol e sombra com aquecimento não apresentou

RESULTADOS E DISCUSSÃO

atividade de CAT, no entanto, para 100%RTA e 100%RTE apresenta altas atividades de APX e GPX. Em 20%RTA e 20%RTE apresentam pequenas quantidades de GPX, e CAT somente em 20%RTA, o tratamento onde houve menor interferência no desenvolvimento.

A. polyneuron apresentou grandes quantidades de APX e GR em 100%RTA, com alta concentração de APX em 100%RTE e intermediária de CAT e GPX. Nos tratamentos de sombra (20%RTA e 20%RTE), a atividade de GPX, CAT e GR apresentou-se menor que nos tratamentos de sombra, tendo em 20%RTE taxas pouco maiores que em 20%RTA das mesmas enzimas.

Segundo Foyer et al., (1994), a CAT está ausente no cloroplasto e a degradação do H_2O_2 nos cloroplastos é feita pela APX associada à membrana dos tilacóides. A APX e a CAT pertencem a duas diferentes classes de enzimas de dissipação do H_2O_2 devido as suas diferentes afinidades, com a APX tendo o K_m na gama μM e a CAT na gama mM . Portanto enquanto a APX seria responsável pela modulação refinada das ROS para sinalização, a CAT seria responsável pela remoção do excesso de ROS gerado durante o estresse (Mittler, 2002), entretanto, deve-se considerar o papel da APX no combate ao estresse oxidativo gerado em compartimentos que não possuem a CAT, como os cloroplastos. O H_2O_2 produzido pela SOD é degradado pela CAT principalmente nos peroxissomos (Scandalios, 1997, Azevedo et al., 1998).

Fotoinativação do PSII e da catalase representam sintomas gerais de sensibilidade das folhas à luz. Também foi postulado que a inativação de CAT pode

RESULTADOS E DISCUSSÃO

também ser mediada por eventos foto-oxidativos iniciados através de absorção de luz pela clorofila nos cloroplastos (Feierabend e Kemmerich, 1983, Scandalios, 1997).

Para manter um nível constante de CAT sob luz, esta perda deve ser continuamente compensada por uma adequada síntese concomitante da enzima. No entanto, quando a degradação sob luz excede à capacidade para reparar ou quando a síntese é prejudicada por condições de estresse (Feierabend et al., 1992), uma perda aparente de CAT é observada (Hertwig et al., 1992).

A fotoinativação da CAT geralmente é paralela à ocorrência de fotoinibição do PSII, como indicado pelo declínio em Fv (Feierabend et al., 1992). A CAT não é uma enzima resistente. Ela é susceptível para fotoinativação e degradação (Feierabend e Engel, 1986; Feierabend et al., 1992; Streb et al., 1993). O decréscimo da atividade da CAT pode indicar inativação da enzima. Sob irradiação, a inativação da CAT ocorre permanentemente e é mediada através da absorção da luz pela enzima que esta grudada no grupo heme (Feierabend e Kemmerich, 1983; Feierabend e Engel, 1986).

Feierabend et al., 1992 tem também demonstrado que sobre condição de estresse, a inativação de CAT está ligada ao acúmulo de H₂O₂. O que pode explicar a ausência de catalase nos tratamentos de sol e aquecimento da espécie *A. cylindrocarpon*, as baixas taxas em *A. polyneuron*, e os valores menores nas Lecitidáceas em tratamentos de sol em relação aos de sombra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 6- Quantificação de H₂O₂ e MDA em quatro espécies arbóreas nativas da Floresta Mesófila Semidecídua crescidas em 100%RTA= 100% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 100%RTE= 100% da radiação ambiente com temperatura elevada em 2°C; 20%RTA= 20% da radiação ambiente e temperatura ambiente; 20%RTE= 20% da radiação ambiente e temperatura elevada em 2°C.

Tratamentos	Espécies	H ₂ O ₂ nmol/ g massa fresca	Conteúdo de MDA (nmol/ g massa fresca)
100%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	823,32 ± 51,13 Aαα	102,74 ± 14,97 Aαα
	<i>A. polyneuron</i>	487,25 ± 114,77 Aαβ	92,42 ± 13,29 Aαα
	<i>C. estrellensis</i>	424,26 ± 60,69 Aαα	131,35 ± 31,35 Aαα
	<i>C. legalis</i>	606,35 ± 27,52 Aαα	145,56 ± 33,05 Aαβ
100%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	606,50 ± 103,07 Baα	111,61 ± 10,80 Aαα
	<i>A. polyneuron</i>	391,44 ± 87,19 Baβ	85,32 ± 11,80 Aαβ
	<i>C. estrellensis</i>	502,19 ± 74,59 Baα	106,77 ± 6,24 Baα
	<i>C. legalis</i>	459,12 ± 27,21 Bbα	139,84 ± 24,42 Baα
20%RTA	<i>A.cylindrocarpon</i>	381,63 ± 38,53 Abα	54,84 ± 6,78 Abα
	<i>A. polyneuron</i>	291,53 ± 91,40 Abβ	83,60 ± 13,37 Aαβ
	<i>C. estrellensis</i>	289,63 ± 82,85 Abα	103,26 ± 15,11 Aαα
	<i>C. legalis</i>	148,40 ± 21,00 Aαβ	60,89 ± 8,18 Abβ
20%RTE	<i>A.cylindrocarpon</i>	622,18 ± 102,62 Baα	73,25 ± 11,13 Bbα
	<i>A. polyneuron</i>	199,09 ± 22,25 Bbβ	56,01 ± 13,14 Bbβ
	<i>C. estrellensis</i>	237,18 ± 26,23 Bbα	138,31 ± 46,76 Bbα
	<i>C. legalis</i>	209,78 ± 18,51 Bbα	63,37 ± 28,17 Bbα
ANOVA three way <i>A. cylindrocarpon</i> e <i>A. polyneuron</i>		F _E = 20,64 **	F _E = 0,53 NS
		F _R = 12,08 **	F _R = 13,14 **
		F _T = 0,49 NS	F _T = 0,05 NS
		F _{RxT} = 3,87 NS	F _{RxT} = 0,10 NS
		F _{ExR} = 0,03 NS	F _{ExR} = 1,97 NS
		F _{ExT} = 0,82 NS	F _{ExT} = 3,26 NS
		F _{ExRxT} = 3,76 NS	F _{ExRxT} = 0,77 NS
ANOVA three way <i>C. estrellensis</i> e <i>C. legalis</i>		F _E = 0,05 **	F _E = 0,82 **
		F _R = 64,22 **	F _R = 4,16 *
		F _T = 0,19 NS	F _T = 0,01 NS
		F _{RxT} = 0,32 NS	F _{RxT} = 0,77 NS
		F _{ExR} = 4,96 *	F _{ExR} = 4,52 *
		F _{ExT} = 0,65 NS	F _{ExT} = 0,03 NS
		F _{ExRxT} = 6,02 NS	F _{ExRxT} = 0,44 NS

Resultados de análise de variância (ANOVA) de três fatores com radiação (R), temperatura (T) e espécie (E) com interação para cada fator analisado. **: P<0,001; *: 0,05>P>0,001; NS: não há diferença significativa. Os dados apresentados são média ± erro padrão (n=6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em mudas de árvore *Norway spruce*, expostas ao sol, apresentaram menor atividade de CAT do que mudas na sombra e quando mudas de sombra foram transferidas para sol houve diminuição na atividade de CAT (Schittenhelm et al., 1994).

Estudos diurnos com *Fagus sylvatica* revelaram que mudanças de curto tempo em sistemas antioxidantes foliares mostraram maior correlação com a temperatura do que a com luz, apontando também para temperatura como um importante fator modulador dos antioxidantes (Peltzer; Polle 2001). Efeitos da luz e temperatura sobre sistemas antioxidantes foram elucidados em experimentos com *F. sylvatica* jovens sob diferentes temperaturas (10 e 35°C). Atividades de SOD, APX, e glutathione redutase diminuíram significativamente para altas temperaturas em luz e escuro, enquanto defesas não enzimáticas aumentaram (Peltzer et al., 2002). Fato também observado para a atividade de APX e GPX em *A. cylindrocarpon*, *C. estrellensis* e *C. legalis*.

A fotorrespiração foi identificada como a principal origem de H₂O₂ em tabaco exposto a alta intensidade de luz. Como CAT pode ser sensível à luz e sofre fotoinativação, com sua subsequente degradação, pode ocorrer que o H₂O₂ escape de ser destruído e se mova para o citosol (Feierabend et al., 1992; Hertwig et al., 1992). Em adição para o acúmulo de H₂O₂, Karpinski et al., (1999) sugeriu que mudanças redox em transporte de elétrons através da quinona B ou plastoquinona em cloroplasto podem ser essenciais para indução de cAPX sobre alta intensidade de luz.

Figura 9– Atividade específica (U mg⁻¹ proteína) de superóxido dismutase (SOD) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação (100% e 20%) e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie.

Figura 12 – Atividade específica (U mg⁻¹ proteína) de Catalase (CAT) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação (100% e 20%) e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas=radiação, letras gregas=espécie.

Figura 13 – Atividade específica (U mg⁻¹ proteína) de Ascorbato Peroxidase (APX) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação (100% e 20%) e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie.

Figura 14 – Atividade específica (U mg⁻¹ proteína) de Glutathione Redutase (GR) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação(100% e 20%)e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie.

Figura 15 – Atividade específica (U mg⁻¹ proteína) de Peroxidases não específicas avaliadas com guaiacol como substrato (GPX) nas quatro espécies estudadas, sob tratamentos de radiação (100% e 20%) e temperatura (ambiente e elevada em 2°C). Letras maiúsculas=Temperatura, letras minúsculas= radiação, letras gregas=espécie.

Miyake e Asada (1996), relatam que uma das propriedades características das isoformas de chlAPX é a inativação rápida quando o nível de ascorbato é muito baixo para a operação do ciclo catalítico das isoenzimas de APX. Tem sido sugerido que o nível de ascorbato em cloroplastos afeta a estabilidade das isoformas de APX sobre condições estresse oxidativo. Isoenzimas de APX (assim como chlAPX) podem ser inativadas por estresse foto- oxidativo em folhas de espinafre (Mano et al., 2001).

6.3.1 Detecção *in situ* de radicais livre e morte celular

Uma vez que nem sempre as injúrias ocasionadas pelo acúmulo de ROS são visíveis, técnicas de detecção *in situ* de radical superóxido e peróxido de hidrogênio e de morte celular foram utilizadas a fim de avaliar visivelmente o estresse oxidativo em plantas.

A detecção *in situ* de espécies reativas de oxigênio foi realizada de forma qualitativa, sendo possível observar que todas as espécies mostraram-se sensíveis à mudança repentina da sombra para radiação intensa, esses dados qualitativos de detecção *in situ* de H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e morte celular foram confirmados pela medição de emissão de fluorescência (razão **Fv/Fm**) e % de fotoinibição conforme **Tabela 7**.

 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 7- Fluorescência (razão **Fv/Fm**) antes e após exposição de folhas de sombra à sistema de fotoinibição induzida ($1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos) por 3 horas e percentual de fotoinibição (% fotoinibição)

Espécies	Sombra	3 horas exposição	% fotoinibição
<i>A. cylindrocarpon</i>	$0,781 \pm 0,01$ Aa	$0,528 \pm 0,04$ Ba	$32,64 \pm 5,5$
<i>A. polyneuron</i>	$0,729 \pm 0,01$ Ab	$0,534 \pm 0,02$ Ba	$23,3 \pm 3,9$
<i>C. estrellensis</i>	$0,729 \pm 0,01$ Aa	$0,502 \pm 0,02$ Aa	$31,52 \pm 3,4$
<i>C. legalis</i>	$0,760 \pm 0,01$ Aa	$0,539 \pm 0,03$ Ab	$29,01 \pm 4,3$

Figura 16 – Fotografia de detecção *in situ* de O₂^{•-}, H₂O₂ e morte celular em *Aspidosperma cylindrocarpon* e *A. polyneuron* (a, f – controle negativo) (b, g – controle positivo de H₂O₂) (c, h – detecção de H₂O₂) (d, i – detecção de O₂^{•-}) (e, j – detecção de morte celular).

Figura 107- Fotografia de detecção *in situ* de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e morte celular em *Aspidosperma cylindrocarpon* e *A. polyneuron* (a,f – controle negativo)(b, g- controle positivo de H_2O_2)(c, h- detecção de H_2O_2)(d, i – detecção de $O_2^{\cdot-}$) (e, j – detecção de morte celular).

7 CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. A interação dos fatores radiação e temperatura avaliados mostrou-se estatisticamente significativa, com grande influência em praticamente todos os parâmetros avaliados.

2. O fator de maior influência avaliado foi a radiação, visto que todas as espécies analisadas mostraram-se susceptíveis à radiação elevada. Fato que pode agregar informações a caracterização sucessional já existente das espécies.

3. Apesar de todas apresentarem susceptibilidade cada família avaliada apresentou entre as duas espécies estudadas uma que apresenta maior diferença entre os tratamentos de sol (100%RTA e 100%RTE) e sombra (20%RTA e 20%RTE), sendo elas *Aspidosperma polyneuron* e *Cariniana legalis*, ambas consideradas espécies com risco de extinção. A redução dos valores da razão F_v/F_m associados à alta radiação comprovam a suscetibilidade dessas espécie a sofrer fotoinibição quando crescida em ambientes não sombreados.

4. Essa susceptibilidade pode ser evidenciada pelos parâmetros bioquímicos (enzimas antioxidantes, MDA, H_2O_2) e fisiológicos (fluorescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos, percentual de fotoinibição diurna e temperatura foliar), no entanto os morfológicos sugerem que o sombreamento em 20%RTA pode ser o fator limitante para o crescimento das espécies avaliadas.

5. 5. Com base nestes resultados sugere-se que ao utilizar estas espécies não pioneiras, especialmente *Aspidosperma polyneuron* e *Cariniana legalis* em projetos de

CONCLUSÕES

reflorestamento, as plantas sejam estabelecidas em ambientes protegidos da alta luminosidade, medidas que aumentariam a eficiência fotossintética desta espécie, bem como o seu sucesso durante o estabelecimento.

6. O incremento de 2°C de temperatura associado à radiação intensa causam estresse fisiológico nas espécies avaliadas.

8 REFERÊNCIAS

 REFERÊNCIAS

- Abu-Asab, M.S., et al., (2001). Earlier plant flowering in spring as a response to global warming in the Washington, DC, area. . Biodiversity and Conservation.
- Adams, G.A.; Wall, D.H. (2000). Biodiversity above and below the surface of soils and sediments: Linkages and implications for global change. . Bioscience.
- Alvarenga, A.A. et al., (2003). Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. in southeastern Brazil. *Revista Árvore*, v.27, n.1.
- Alves, P., et al. (2002). The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. *The Botanical Review* 68(2).
- Anderson, M. (1985). Tissue glutathione: C.R.C. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton, Florida.
- Asada, K. (1996). Radical production and scavenging in chloroplasts. In: Baker N.R. Photosynthesis and the Environment. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Asada, K., et al. (1998). Molecular mechanism for relaxation of and protection from light stress. In K Satoh, N Murata, Eds, *Estresse Response of Photosynthetic Organisms*. Elsevier, Amsterdam, p. 37–52. *Estresse Response of Photosynthetic Organisms*. N. M. K Satoh, eds, Amsterdam, Elsevier.
- Atroch E.M.A.C., S. A. M., Alvarenga A.A., Castro E.M. (2001). Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas a diferentes condições de sombreamento. *Ciência Agrotécnica* (25).
- Azevedo R.A. et al., (1998). Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104.

REFERÊNCIAS

- Baker, N.R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. Annual Review of Plant Biology 59(1).
- Beadle, C.L. (1993). Growth analysis. Photosynthesis and production in a changing environment: a field and Laboratory manual. D.O.S. Hall, J.M.O.; Olhàrnordenkampf, H.R.; Leegood, R.C.; Long, S.P. (eds.). London, Chapman.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44(1).
- Blödner, C., et al. (2005). Freezing tolerance in two *Norway spruce* (*Picea abies* [L.] Karst.) progenies is physiologically correlated with drought tolerance. Journal of Plant Physiology 162(5).
- Boardman, N. K. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 28.
- Bolhàr-Nordenkampf, H.R., Öquist, G.O. (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. – In: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkampf, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (ed.): Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A Field and Laboratory Manual. Chapman & Hall, London – Glasgow – New York – Tokyo – Melbourne – Madras.
- Bonell, M. (1998). Possible impacts of climate variability and change on tropical forest hydrology. Climatic Change, 215-272.
- Bonotto, S. (2001). Aspects of pollution on the coastal ecosystems of the Mediterranean Sea. Aquatic Conservation: Marine & Freshwater Ecosystems.
- Boston RS et al., (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. Plant Molecular Biology 32.
- Bowler, C., et al. (1992). Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43(1).

 REFERÊNCIAS

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2).
- Bray, E. A., et al. (2000). Response to abiotic stresses. *Biochemistry and Biology of Plants* G. W. Buchanam B., Jones R., eds., American Society of Plant Physiologists 3.
- Campos, M. A. A. e T. Uchida (2002). Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (37).
- Cerri, C. C. e C. E. P. Cerri (2007). Agricultura e aquecimento global. *B. Inf. SBCS* (23).
- Chance, B. and A. C. Maehley (1955). Assay of catalase and peroxidases". *Methods in Enzymology* (11).
- Chazdon RL et al., (2009). The Potential for Species Conservation in Tropical Secondary Forests. *Conservation Biology*.
- Choudhury, N. K. and R. K. Behera (2001). Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents". *Photosynthetica* (39).
- Critchley, C. (1998). Photoinhibition. *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. A. S. E. RAGHAVENDRA. Cambridge, Cambridge University Press.
- Dale, V. H. 1997. The relationship between land-use change and climate change. *Ecological Applications*.
- Dale, V. H., et al. 2001. Climate change and forest disturbances. *Bioscience*.
- Danon, A., et al. (2005). Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana* *The Plant Journal* (41).
- Dat, J. F., et al. (1998). Parallel Changes in H₂O₂ and Catalase during Thermotolerance Induced by Salicylic Acid or Heat Acclimation in Mustard Seedlings. *Plant Physiology* 116 (4).

REFERÊNCIAS

- Dhindsa RS, et al. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Botany* (32).
- DiPaola, J. (1992). Physiological responses of turfgrasses to heat stress. *Turfgrass*. R. C. DV Waddington, RC Shearman, eds. Madison, WI: Agronomy Society of America.
- Dias-Filho, M. B. (1997). Physiological response of *Solanum crinitum* Lam. to contrasting forest light intensity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (v. 32, n.8).
- Faoro, F.; M. Iriti (2005). Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* 49(4).
- Favaretto, V. F., et al. (2011). Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environmental and Experimental Botany* 70(1).
- Fay, P. A., et al., (2000). Altering rainfall timing and quantity in a mesic grassland ecosystem: Design and performance of rainfall manipulation shelters. . *Ecosystems*, 3.
- Feierabend, J.; P. Kemmerich (1983). Mode of interference of chlorosis-inducing herbicides with peroxisomal enzyme activities. *Physiologia Plantarum* 57(3).
- Feierabend, J., et al. (1992). Photoinactivation of Catalase Occurs under Both High- and Low-Temperature Stress Conditions and Accompanies Photoinhibition of Photosystem II. *Plant Physiology* 100(3).
- Feierabend, J. and S. Engel (1986). Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 251.
- Foyer, C. H., et al. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17.
- Freitas, R. B., et al. (2003). Influência de diferentes níveis de sombreamento no comportamento fisiológico de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia* 27(4).

 REFERÊNCIAS

- Garcia-Plazaola J.I., et al.(1999). Role of photoprotective systems of holm-oak (*Quercus ilex*) in the adaptation to winter conditions. *J Plant Physiol* 155.
- Gapper, C.; L. Dolan (2006). Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species. *Plant Physiology* 141(2).
- García-Plazaola, J. I., et al. (1999). Role of Photoprotective Systems of Holm-Oak (*Quercus ilex*) in the Adaptation to Winter Conditions. *Journal of Plant Physiology* 155(4–5).
- Giannopolitis, C. N.; S. K. Ries (1977). Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol.* 59(2).
- Gonçalves C.J.F., et al. (2001). Concentration of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of Mahogany and Tonka bean under two light environments. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13.
- Gonçalves, J.F.C., et al. (2005). Growth, photosynthesis and stress indicators in young rosewood plant (*Aniba rosaeodora* Ducke) under different light intensities". *Brazilian Journal Plant Physiology* 17(3).
- Guatura, I.S., et al. (1996). Questão fundiária: roteiro para a solução dos problemas fundiários nas áreas protegidas da Mata Atlântica. Roteiro para a conservação de sua biodiversidade.
- Gyimah, R.; T. Nakao (2007). Early growth and photosynthetic responses to light in seedlings of three tropical species differing in successional strategies". *New Forests* 33(217-236).
- Hall, A.E. (2001). *Crop Responses to Environment*. Florida, CRC Press LLC, Boca Raton.
- Halliwell, B.; J. Gutteridge (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York, Oxford University Press.
- Hanba Y.T., et al. (2002). The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand". *Plant, Cell and Environment* 25.
- Hansen, U. et al. (2002). Variation of pigment composition and antioxidative systems along the canopy light gradient in a mixed beech/oak forest: a

 REFERÊNCIAS

- comparative study on deciduous tree species differing in shade tolerance. *Trees - Structure and Function* 16(4).
- Hansell, R. I. C. et al., (1998). Atmospheric change and biodiversity in the arctic. *Environmental Monitoring & Assessment*, 49.
- Havaux, M.; F. Tardy (1996). Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II in vivo: possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta* 198(3).
- Heath, R.L. and L. Packer (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125.
- Hendrey, G.A.F., et al. (1987). The degradation of chlorophyll A biological enigma". *New Phytol.* 107.
- Hendry, G.A.F.; Price, A.H. (1993). Estresse indicators: chlorophylls and carotenoids. In: *Methods in comparative plant ecology*. . G. A. F. HENDRY, GRIME, J.P. (Eds.) London, Chapman e Hall.
- Hertwig B., et al. (1992). Light dependency of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions". *Plant Physiology* 100.
- Hideg, É.; Murata, N. (1997). The irreversible photoinhibition of the photosystem II complex in leaves of *Vicia faba* under strong light. *Plant Science* 130.
- Holtman, W.L., et al. (1994). β -Oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. *Plant Science*, 99.
- Horton, P.; A. Ruban (2004). Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56(411).
- Hutcheon, W.N. (1976). Light interception by the canopy and leaf area index (LAI). Annual Report 1973-1974. G. TAFO, COCOA RESEARCH INSTITUTE.
- Houghton, J.T. et al., (2001). Climate Change 2001: The Scientific Basis: Contributions of Working Group I to the Third Assessment Report of the

 REFERÊNCIAS

- Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press.
- IPCC (2002). Climate change and biodiversity. W. R. I. P. o. C. Change. Technical Paper V: 86.
- IPCC (2007). Climate change 2007. Climate change impacts, adaptation and vulnerability. Working Group II. Geneva, Suíça, IPCC.
- IUCN (2012). Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica, November 1996) 1998. *Cariniana legalis*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. . Retrieved Downloaded on 14 January 2012.
- (IUCN (2012) Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica, November 1996) 1998. *Aspidosperma polyneuron*". In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **14 January 2012**.
- Jiang, Y. and Huang B. (2001). Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. Journal of Experimental Botany 52(355).
- Jones, R.H. and McLeod, K.W. (1990). Growth and photosynthetic responses to a range of light environments in Chinese follow tree and Carolina ash seedlings. Forest Science 36(4).
- Joshi, M. et al., 2011. Projections of when temperature change will exceed 2°C above pre-industrial levels - Nature Clim. Change 8.
- Karpinski, S., et al. (1999). Systemic Signaling and Acclimation in Response to Excess Excitation Energy in Arabidopsis. Science 284(5414).
- Kitajima, K. (1994). Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. Oecologia 98(3-4).
- Kitao, M.; et al. (2000). Susceptibility to photoinhibition of three deciduous broadleaf tree species with different successional traits raised under various light regimes. Plant, Cell & Environment 23(1).

REFERÊNCIAS

- Klueva, N.Y., et al. (2001). Mechanisms of thermotolerance in crops. In A. S. Basra Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress. Binghamton, New York, Food Products Press.
- Koroleva O.Y., Bruggemann W. Krause GH (1994). Photoinhibition, xanthophyll cycle and in vivo chlorophyll fluorescence quenching of chilling-tolerant *Oxyria digyna* and chilling sensitive *Zea mays*. *Physiol Plant* 92.
- Krause, G.H. (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum* 74 (3).
- Krause, G.H., et al. (1995). High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. *Planta* 197(4).
- Krause, G.H., et al. (2001). Acclimation of tropical tree seedlings to excessive light in simulated tree-fall gaps. *Plant, Cell & Environment* 24(12).
- Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56(411).
- Laing, W., et al. (1995). Photoinhibition of Photosynthesis Causes a Reduction in Vegetative Growth Rates of Dwarf Bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants. *Functional Plant Biology* 22(4).
- Lambers, H., et al. (2008). *Plant Physiological Ecology*, Springer Science Business Media, LLC.
- Larcher, W. (2000). *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos, SP, Rima.
- Larkindale, J.; M. R. Knight (2002). Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in *Arabidopsis* Involves Calcium, Abscissic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid. *Plant Physiology* 128(2).
- Lichtenthaler, H.K., et al. (1981). Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research* 2(2).
- Loehle, C. 2000. Forest ecotone response to climate change: sensitivity to temperature response functional forms. *Canadian Journal of Forest Research*, 30.
- Long, S.P., et al. (1994). Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45(1).

 REFERÊNCIAS

- Lorenzi, H. (2002). *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Lovelock, C.E., et al. (1994). Photoinhibition and recovery in tropical plant species: response to disturbance. *Oecologia* 97(3).
- Luna, C. M., et al. (2005). Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany* 56(411).
- Magnanini, A.; Magnanini, C. (2002). Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica- Árvores gigantescas da terra e as maiores assinaladas no Brasil.
- Mano, J.I., et al. (2001). Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1504(2–3).
- Martinez, C.A. and M. Maestri (1995). Photoinhibition of photosynthesis in Andean potato species differing in frost resistance. *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. P.O. Mathis. Amsterdam: K., Iwer Academic Publishers IV.
- Maxwell, K. and G.N. Johnson (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345).
- Meehl, G.A., et al. (2007). Global climate projections, in *Climate Change 2007: The Scientific Basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, U. K., Cambridge Univ. Press.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* 7 (9).
- Miyake, C.; Asada, K. (1996). Inactivation Mechanism of Ascorbate Peroxidase at Low Concentrations of Ascorbate; Hydrogen Peroxide Decomposes Compound I of Ascorbate Peroxidase. *Plant and Cell Physiology* 37(4).
- Monk, L.S., et al. (1989). Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum* 76(3).

 REFERÊNCIAS

- Morison, J.I.L.; Morecroft M.D. (2006). Plant Growth and Climate Change: 213.
- Nakano, Y.; Asada, K.(1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22(5).
- Noctor, G.; Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49(1).
- Öquist, G., et al., (1992). Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. Planta 188(3).
- Ortega, V.R.; Engel, V.L. (1992). Conservação da biodiversidade de remanescentes de Mata Atlântica na região de Botucatu, SP. Revista do Instituto Florestal 4.
- Ösmond, C. B. (1994). What is Photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field. N. R. a. J. R. B. E. Baker. Lancaster, BIOS Scientific Publishers.
- Parida, A. K., et al., (2004). Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*. Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. Journal of Plant Physiology 161(5).
- Paulsen, G. M., (1994). High temperature responses of crop plants. Physiology and Determination of Crop Yield. J. B. KJ Boote, TR Sinclair, GM Paulsen, eds. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- Pearcy, R. W.; W. Yang (1998). The functional morphology of light capture and carbon gain in the Redwood forest understorey plant *Adenocaulon bicolor* Hook. Functional Ecology 12.
- Peltzer, D.; A. Polle (2001). Diurnal fluctuations of antioxidative systems in leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*): Responses to light and temperature. Physiologia Plantarum 111(2).

REFERÊNCIAS

- Peltzer, D., et al. (2002). Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40(2).
- Pereira, W.E.; et al., (2000). Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. *Journal of Plant Physiology*, v.157.
- Polle, A. (1997). Defense against photo-oxidative damage in plants. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios JG. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Poorter, L. (1999). Growth Responses of 15 Rain-Forest Tree Species to a Light Gradient: The Relative Importance of Morphological and Physiological Traits. *Functional Ecology* 13(3).
- Powles, S.B. (1984). Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible Light. *Annual Review of Plant Physiology* 35(1).
- Root, T. L., et al., (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421.
- Romero-Puertas, M.C., et al. (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 in pea leaves. *Plant, Cell & Environment* 27(9).
- Salvucci, M.E.; Crafts-Brandner, S.J. (2004). Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology* 134(4).
- Scalon, S.P.Q., et al. (2001). Germinação e crescimentos de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23.
- Scandalios, J.G. (1993). Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol.* 101.
- Scandalios, J.G., et al. (1997). Catalases in Plants: Gene Structure, Properties, Regulation, and Expression.

REFERÊNCIAS

- Schittenhelm, J., et al. (1994). Photoinactivation of catalase in needles of Norway spruce. *Physiologia Plantarum* 90(3).
- Sebbenn, A.M., et al. (2000). Sistemas de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: Implicações para conservação e melhoramento genético. *Scientia Florestalis* 58.
- Shang, W.; J. Feierabend (1999). Dependence of catalase photoinactivation in rye leaves on light intensity and quality and characterization of a chloroplast-mediated inactivation in red light. *Photosynthesis Research* 59(2-3).
- Skillman, J.B., et al. (2005). Growth irradiance effects on photosynthesis and growth in two co-occurring shade-tolerant neotropical perennials of contrasting photosynthetic pathways. *American Journal of Botany* 92(11).
- Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125(1).
- Somersalo, S; Krause, G.H. (1990). Reversible photoinhibition of unhardened and cold-acclimated spinach leaves at chilling temperatures. *Planta* 180(2).
- Soriani, H (2011). Respostas fisiológicas e bioquímicas de três espécies de leguminosas arbóreas submetidas a déficit hídrico progressivo e alta radiação. Tese de Doutorado.
- Strasser, R.J., et al. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. M.P. Yunus, U.; Mohanly, P. (Eds.). London, Taylor and Francis.
- Streb, P., et al. (1993). Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiologia Plantarum* 88 (4).

 REFERÊNCIAS

- Syvertsen, J.P. and Lloyd, J. (1994). Citrus. Handbook of environmental physiology of fruits crops: subtropical and tropical crops. A. P. e. (Schaeffer B. Boca Raton, CRC Press. 2.
- Taiz, L. and E. Zeiger (2010). Plant Physiology, Sinauer.
- Thordal-Christensen, H., et al. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. The Plant Journal 11(6).
- Velikova, V., et al. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. Plant Science (151).
- von Randow, C., et al. (2004). Comparative measurements and seasonal variations in energy and carbon exchange over forest and pasture in South West Amazonia". Theor. Appl. Climatol.
- Wagner, D., et al. (2004). The Genetic Basis of Singlet Oxygen Induced Stress Responses of Arabidopsis thaliana. Science 306 (5699).
- Wahid, A., et al. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. Environmental and Experimental Botany 61(3).
- Young, J. N., Rickaby, et al., (2012). Adaptive signals in algal Rubisco reveal a history of ancient atmospheric carbon dioxide. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 367.
- Zhang J, Kirkham M.B. (1994) Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidases in wheat leaves. Plant Cell Physiol. 35.
- Zeraik, A. E., et al. (2008). Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. Química Nova 31.