

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

VINÍCIUS NOVO GAMA

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE TRÊS
MORFOTIPOS DE *Paubrasilia echinata* LAM. EM RESPOSTA À LUZ

VITÓRIA-ES
2017

Vinícius Novo Gama

Caracterização morfofisiológica e bioquímica de três morfotipos de *Paubrasilia
echinata* Lam. em resposta à luz

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.

Vitória, 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

G184c Gama, Vinícius Novo, 1988-
Caracterização morfofisiológica e bioquímica de três
morfotipos de *Paubrasilia echinata* Lam. em resposta à luz /
Vinícius Novo Gama. – 2017.
113 f. : il.

Orientador: Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Química Vegetal. 2. Plantas – Efeito da luz. 3. Morfologia
vegetal. 4. Fisiologia vegetal. 5. Pau-brasil. 6. Radiação
ultravioleta. I. Cuzzuol, Geraldo Rogério Faustini. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

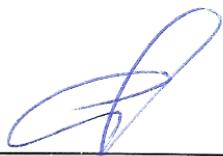
Vinícius Novo Gama

“Caracterização morfofisiológica e bioquímica de três morfotipos de Paubrasilia echinata Lam. expostos a condições de irradiância”

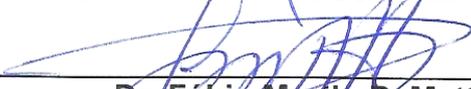
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Biologia Vegetal.

Aprovada em 03 de março de 2017.

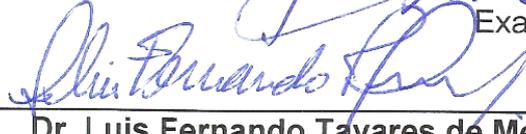
Comissão Examinadora:



Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol (UFES)
Orientador e Presidente da Comissão



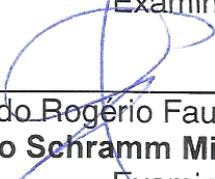
Dr. Fábio Murilo DaMatta (UFES)
Examinador interno



Dr. Luis Fernando Tavares de Menezes (UFES)
Examinador interno



Dr. José Eduardo Marcelo Pezzopane (UFES)
Examinador externo



Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol
Por **Dr. Marcelo Schramm Mielke (UESC)**
Examinador externo

*Aos meus pais, irmão, namorada,
familiares e amigos, que tornaram
possível a realização deste trabalho,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Esta tese representa não só o meu trabalho neste manuscrito, é um marco em minha vida de mais de uma década estudando os vegetais e cada vez mais me surpreendendo com eles. Nunca me senti tão bem acolhido e entusiasmado com esta ciência, por isso, gostaria de agradecer de antemão à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), mais especificamente ao setor Botânica, pela estrutura e acolhimento por todos estes anos de aprendizado científico.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal e ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, coordenados pelo meu maior tutor e amigo, professor Geraldo Rogério F. Cuzzuol. Obrigado professor pelos conselhos e oportunidade de realizar ciência, e mais ainda, pela digníssima orientação nestes seis anos de pós-graduação!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (Fapes) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo essencial apoio financeiro ao longo desses quatro anos.

A Deus.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional. Especialmente meu pai, Ernani, minha mãe Diva Beatriz, e meu irmão, Rodrigo. Obrigado! Certamente, sem vocês não teria conseguido chegar até aqui. À Karen, minha namorada, e futura esposa, pelo apoio moral e por estar comigo nos melhores e piores momentos.

Aos meus amigos e parceiros de ciência Leonardo, Tatiane e Dayana. Sem esquecer o pessoal do GEMUT, Ian, Lili, Lívia, Fran... Aos meus amigos, principalmente Fabrício e Giovanna, irmãos que Deus colocou em minha vida! Obrigado amigos!

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos profissionais da UFES, professores, gestores e coordenadores pelo essencial aprendizado e imprescindível apoio administrativo.

*“O cientista não é o homem que
fornece as verdadeiras respostas; é
quem faz as verdadeiras perguntas”.*

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

Relatos contraditórios quanto às respostas funcionais do pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.) em diferentes condições de luz, podem ter relação com variações genéticas, que refletem nas divergências morfofisiológicas entre populações dessa espécie. Este fato dificulta uma melhor escolha dos variantes dessa espécie para propagação e manutenção de mudas, bem como, reintrodução *ex situ* à floresta atlântica brasileira. Com o intuito de fornecer informações mais precisas para a conservação e promoção de manejos florestais mais adequados com *P. echinata*, o trabalho buscou caracterizar as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de três morfotipos de pau-brasil: o pequeno (SV – *small variant*), médio (MV – *medium variant*) e grande (LV – *large variant*), em relação à luz. Em um primeiro trabalho realizaram-se medidas de crescimento, trocas gasosas, teores de compostos fenólicos, atividade de enzimas antioxidantes (CAT, APX, POD e PPO) e concentração de auxinas totais dos três morfotipos sob 100% e 15% de luz. Registrou-se que o metabolismo secundário, o processo antioxidativo, os parâmetros da fotossíntese e crescimento apontam o LV e o MV como variações morfológicas com tendências para plantas heliófilas. Diferentemente do SV que se apresentou tendente à umbrófila. Essas diferentes respostas dos morfotipos de pau-brasil sob alta incidência de luz, instigaram o desenvolvimento de um segundo trabalho, que buscou avaliar os efeitos da suplementação da radiação UV-B incidente a um morfotipo heliófilo, o MV e um umbrófilo, o SV. Para isso, realizaram-se medidas de crescimento, fotossíntese, teores de compostos de absorção do UV, carboidratos estruturais e não estruturais, bem como quantificação de teores de peróxido de hidrogênio e malonaldeído (MDA). O efeito da UV-B mostrou-se positivo no MV, uma vez que melhorou sua eficiência fotoquímica e otimizou suas trocas gasosas e crescimento. A incidência de UV-B proporcionou respostas aclimatativas em MV que se apresentou com alto grau de tolerância a essa radiação. Este fato pode ser explicado pelo comportamento heliófilo deste morfotipo, com tolerância a ambientes com prevalência de alta irradiância e ricos em UV. Por outro lado,

a incidência da radiação estimulou efeitos fotoinibitórios no SV, que apresentou menor crescimento, menor taxa fotossintética e alta respiração. O aumento dos teores de peróxido de hidrogênio estimularam danos oxidativos em SV traduzidos visivelmente em áreas cloróticas foliares que evoluíram para necrose e abscisão foliar. Partindo de relatos de trabalhos florísticos já publicados quanto à incidência natural dos morfotipos de *P. echinata*, observa-se que o SV pode ser encontrado, predominantemente, em matas umbrófilas densas ou matas de tabuleiro com alto sombreamento; enquanto o MV e o LV podem ser encontrados em regiões com prevalência de matas mais abertas, com mais clareiras e maior irradiância. Conclui-se que as diferenças exibidas pelos três morfotipos de pau-brasil quanto à luz contrastante e à exposição da radiação ultravioleta-B (UV-B) apresentadas neste trabalho, parecem refletir as condições preponderantes de seus centros de origem. Neste sentido, sugere-se a utilização do SV, com características umbrófilas, para recuperação de áreas de mata atlântica mais densa, com prevalência em regiões pluviais e litorâneas úmidas. Já quanto ao MV e ao LV, recomenda-se seus plantios em matas estacionais decíduas e semidecíduas da floresta atlântica, com prevalência de clareiras e altas irradiâncias.

Palavras-chave: Bioquímica vegetal • luminosidade • morfofisiologia vegetal • pau-brasil • ultravioleta-B.

ABSTRACT

The contradictory reports about the functional Responses of brazilwood (*Paubrasilia echinata* Lam.) in different light conditions, may be relation with genetic variations, which reflect on morphophysiological divergences among populations of this species. This fact makes it difficult to choose the variants of this species to propagation and maintenance of seedlings, as well as its *ex situ* reintroduction to the Brazilian Atlantic Forest. With the purpose of provide precise information about the conservation and promotion of the most appropriate forest management with *P. echinata*, the study sought to characterize the morphophysiological and biochemical responses of three brazilwood morphotypes: small variant (SV), medium variant (MV) and large variant (LV) in relation to light. In a first work, growth, gas exchange, phenolic compound content, antioxidant enzyme activity (CAT, APX, POD and PPO) and total auxin concentration of the three morphotypes were performed under 100% and 15% light. It was observed that secondary metabolism, antioxidative process, photosynthesis and growth parameters indicate LV and MV as morphological variations with tendencies for heliophilous plants. Differently from SV, which presented umbrophilous tendencies. These different responses of brazilwood morphotypes under high incidence of light, instigated the development of a second work, Which sought to evaluate the effects of supplementation of UV-B incident radiation on a heliophilous morphotype, MV, and umbrophilous, SV. For this, measurements of growth, photosynthesis, contents of UV absorption compounds, structural and non-structural carbohydrates, as well as quantification of hydrogen peroxide (H₂O₂) and malonaldehyde (MDA) contents were performed. The effect of UV-B was positive in MV, as it improved its photochemical efficiency and optimized its gas exchange and growth. The incidence of UV-B Provided acclimative responses in MV that presented with a high degree of tolerance to this radiation. This fact can be explained by the heliophilic behavior of this morphotype, with tolerance to environments with high UV irradiance prevalence. On the other hand, the incidence of radiation stimulated photoinhibitory effects in SV, which

presented lower growth, lower photosynthetic rate and high respiration. The increase of the hydrogen peroxide contents stimulated oxidative damages in SV visibly translated as foliar chlorotic areas that evolved to foliar necrosis and abscission. Based on floristics works reports already published about the natural incidence of the *P. echinata* morphotypes, it is observed that SV can be found in dense umbrophilous forests or high-shaded forest; while MV and LV can be found in regions with more open forest, with more clearings and greater irradiance. It is concluded that the differences between the three morphotypes of brazilwood in reference to the contrasting light and the exposure of ultraviolet-B (UV-B) radiation presented in this study seem to reflect the prevailing conditions of their centers of origin. Thus, it is suggested the use of SV, with umbrophilous characteristics, for the recovery of the Atlantic forest dense areas, with prevalence in wet and coastal regions. In contrast, it is recommended the plantation of MV and LV in the Atlantic forest deciduous and semideciduous seasonal areas, with prevalence of clearings and high irradiances.

Keywords: Plant biochemistry • luminosity • plant morphophysiology • brazilwood • ultraviolet-B

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Morfotipos de *Paubrasilia echinata*: A – morfotipo pequeno, *small variant* (SV); B – morfotipo médio, *medium variant* (MV); C – morfotipo grande, *large variant* (LV); D – Os três morfotipos; E – Distribuição geográfica natural dos morfotipos de paubrasil SV (círculos amarelos), MV (círculos azuis) e LV (círculo vermelho). Adaptado de Juchum, 2007 e Nemésio (2013).25
- CAPÍTULO 1 - Caracterização de atributos morfofisiológicos e antioxidativos de três morfotipos de *Paubrasilia echinata* (Lam.) expostos ao pleno sol e à sombra.....26
- Figura 1 - Aspecto visual de crescimento com destaque para a altura de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol (100% RFA = $\pm 1.800-2.000 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$). Barra vertical = 10 cm.61
- Figura 2 - Percentual alocado de biomassa em plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. Morfotipo pequeno= SV – *small variant*, médio= MV – *medium variant* e grande LV – *large variant*; RMF= razão de massa foliar; RMC= razão de massa caulinar; RMR= razão massa radicular. Valores médios de cinco repetições.63
- Figura 3 - Capacidade antioxidante (ABTS) (A); proteínas totais (B); atividade das enzimas catalase (CAT) (C), peroxidase do guaiacol (POD) (D), polifenoloxidase (PPO) (E) peroxidase do ascorbato (APX) (F); teores de malonaldeído (MDA) (G) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (H) de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. Morfotipo pequeno = SV – *small variant*, médio = MV – *medium variant* e grande = LV – *large variant*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5). Valores de $p \leq 0,0001$ para todas as médias apresentadas, indicando interação estatística entre os fatores Morfotipo X Irradiância pela análise de variância.....65
- Figura 4 - Concentrações de clorofila *a* (A), *b* (B) e totais (C), bem como suas razões *a:b* (D) e totais:carotenoides (F); atividade da fenilalanina amônio liase (PAL) (E); conteúdo de carotenoides (G); compostos fenólicos totais expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) (H), antocianinas (I) e flavonoides (J) de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. Morfotipo pequeno = SV – *small variant*, médio = MV – *medium variant* e grande = LV – *large variant*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5). Valor de $p \leq 0,0005$ para todas as médias apresentadas, indicando interação estatística entre os fatores Morfotipo X Irradiância pela análise de variância.66
- Figura 5 - Perfil químico de plantas jovens de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. O espectrograma superior (A) representa os compostos encontrados nas folhas dos três morfotipos (morfotipo pequeno = SV – *small variant*, médio = MV – *medium variant* e grande = LV – *large variant*) no pleno sol. O espectrograma inferior (B) representa os compostos encontrados nas folhas dos três morfotipos no sombreamento.

Caixas de coloração cinza indicam compostos cumáricos e caixas de coloração vermelha indicam compostos flavonoides. Apesar de serem analisados separadamente, os espectrogramas estão apresentados em dois devido os três morfotipos, em mesma condição de irradiância, exibirem mesmo perfil para todos os compostos químicos analisados.67

Figura 6 - Conteúdo de ácido indol acético (AIA) e ácido indol butírico (AIB) de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. (morfotipo pequeno = SV – *small variant*, médio = MV – *medium variant* e grande = LV – *large variant*). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5). Valores de $p \leq 0,0001$ para todas as médias apresentadas, indicando interação estatística entre os fatores Morfotipo X Irradiância pela análise de variância.....68

CAPÍTULO 2 - Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de dois morfotipos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidos à radiação ultravioleta-B69

Figura 1 - Desdobramento da interação estatística (Morfotipo X UV-B) das variáveis de crescimento apresentadas nas tabelas 1 e 2: altura (A), área foliar específica (AFE - B), massa seca da raiz (MSR - C) e massa seca total (MST - D) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=10). .99

Figura 2 - Visual de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas a radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Barra vertical = 1 cm.100

Figura 3 - Percentual alocado de biomassa seca radicular (RMR), caulinar (RMC) e foliar (RMF) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas a radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Os valores são médias percentuais (n=10).101

Figura 4 - Efeitos da radiação UV-B em plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. Morfotipo médio = MV – *medium variant* (esquerda) e pequeno = SV – *small variant* (direita). As setas apontam folhas jovens em expansão com alterações visuais provocadas pela radiação UV-B. Barra horizontal = 1 cm.....102

Figura 5 - Desdobramento da interação estatística (Morfotipo X UV-B) das variáveis de carboidratos estruturais apresentadas na tabela 5: conteúdo de celulose em raiz (A) e folha (B); bem como o conteúdo de hemicelulose em raiz (C), caule (D) e folha (E) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5).104

Figura 6 - Desdobramento da interação estatística (Morfotipo X UV-B) das variáveis de pigmentos apresentadas na tabela 3: concentrações de carotenoides (A), fenóis (B) e flavonoides (C); bem como os espectros de absorção do UV do extrato etanólico foliar de SV (D) e MV (E) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5)..... 106

Figura 7 - Desdobramento da interação estatística (Morfotipo X UV-B) das variáveis apresentadas na tabela 4: Capacidade antioxidante (ABTS) (A), teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B) e malonaldeído (MDA) (C) em extratos foliares; bem como as concentrações totais de sacarose foliar (D) e caulinar (E), e açúcares totais solúveis foliares (F) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Morfotipo pequeno= SV – *small variant* e médio= MV – *medium variant*. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5)..... 110

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Caracterização de atributos morfofisiológicos e antioxidativos de três morfotipos de *Paubrasilia echinata* (Lam.) expostos ao pleno sol e à sombra.....26

Tabela 1 - Parâmetros de crescimento de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento: altura, diâmetro do caule (DC), massa foliar específica (MFE), razão da massa radicular e parte aérea (R:PA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), área foliar total (AFT), número de folhas (NF), número de folíolos (NFF), teor de água foliar (TAF), taxa de crescimento relativo (TCR) e taxa assimilatória líquida (TAL). *Small variant* (SV) = morfotipo pequeno, *Medium variant* (MV) = morfotipo médio e *Large variant* (LV) = morfotipo grande.⁽¹⁾ 62

Tabela 2 - Assimilação de CO₂ (A), capacidade fotossintética máxima (A_{max}), taxa de respiração no escuro (R_d), transpiração (E), carbono interno (Ci), condutância estomática (gs), eficiência do uso da água (A/E), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca do uso de água (A/g_s), índice de desempenho fotoquímico (PI_{TOTAL}) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_M) de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. *Small variant* (SV) = morfotipo pequeno, *Medium variant* (MV) = morfotipo médio e *Large variant* (LV) = morfotipo grande.⁽¹⁾ 64

CAPÍTULO 2 - Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de dois morfotipos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidos à radiação ultravioleta-B 69

Tabela 1 - Parâmetros de crescimento de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-): altura, diâmetro do caule (DC), área foliar específica (AFE), razão da massa radicular e parte aérea (R:PA), área foliolar unitária (AFU), área foliar total (AFT), número de folhas (NF), número de folíolos (NFF), número de foliólulos (NFFF). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾..... 97

Tabela 2 - Parâmetros de crescimento de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-): massa seca foliar (MSF), massa seca caulinar (MSC), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST), razão de massa foliar (RMF), razão de massa caulinar (RMC), razão de massa radicular (RMR) e razão de área foliar (RAF). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾..... 98

Tabela 3 - Conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina em raiz, caule e folha de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾..... 103

Tabela 4 - Concentrações de antocianinas, flavonoides, fenóis, carotenoides, clorofila *a* (Chl. *a*), clorofila *b* (Chl. *b*) e totais (Chl. Totais); bem como as razões clorofilas totais: carotenoides e clorofila *a:b* de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾..... 105

Tabela 5 - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), capacidade fotossintética máxima (A_{max}), taxa de respiração no escuro (R_d), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), transpiração (E), eficiência instantânea de uso da água (A/E), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (F_V'/F_M'), coeficiente de extinção fotoquímico (q_P) e coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾. 107

Tabela 6 - Desdobramento da interação estatística (Morfotipo X UV-B) das variáveis de fotossíntese apresentadas na tabela 6: assimilação líquida de CO₂ (A), capacidade fotossintética máxima (A_{max}), taxa de respiração no escuro (R_d), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), transpiração (E), eficiência instantânea de uso da água (A/E), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (F_V'/F_M'), coeficiente de extinção fotoquímico (q_P) e coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. *Small variant* (SV) = morfotipo pequeno e *Medium variant* (MV) = morfotipo médio. Os valores são médias e as barras ± erro padrão (n=5). 108

Tabela 7 - Capacidade antioxidante (ABTS), teores peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA) em extratos foliares; bem como as concentrações totais de sacarose foliar e caulinar, e açúcares totais solúveis foliares de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾. 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A = taxa de assimilação líquida de CO_2

A_{max} = capacidade fotossintética máxima

A/E = eficiência instantânea do uso da água

A/g_s = eficiência intrínseca do uso da água

AFE = área foliar específica

AFT = área foliar total

AFU = área foliar unitária

AIA = ácido indol acético

AIB = ácido indol butírico

APX = peroxidase do ascorbato

Carot = carotenoides totais

CAT = catalase

Chl a e b = clorofilas a e b

Chl/Carot = razão clorofila total/carotenoides

Chl a /Chl b = razão clorofila a / clorofila b

C_i = concentração intercelular de CO_2

DC = diâmetro do caule

E = taxa de transpiração

EAG = equivalentes de ácido gálico

ERO'S = espécies reativas de oxigênio

FSI = fotossistema I

FSII = fotossistema II

F_V/F_M = rendimento quântico máximo do fotossistema II

F_V'/F_M' = eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII

g_s = condutância estomática

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

LV = *large variant* = morfotipo grande

MDA = malonaldeído

MFE = massa foliar específica

MSC = massa seca caular

MSF = massa seca foliar

MSPA = massa seca da parte aérea

MSR = massa seca radicular

MST = massa seca total

MV = *medium variant* = morfotipo médio

NF = número de folhas

NFF = número de folíolos

NFFF = número de foliólulos

NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímico

PAL = FAL = fenilalanina amônio liase

PI_{TOTAL} - índice de desempenho fotoquímico total

POD = peroxidase

PPO = polifenoloxidase

Q_A = quinona a

q_L = coeficiente de extinção fotoquímico

R:PA = razão da massa seca radicular/massa seca da parte aérea

RAF = razão de área foliar

R_d = taxa de respiração no escuro

RFA = radiação fotossinteticamente ativa

RMC = razão de massa caular

RMF = razão de massa foliar

RMR = razão de massa radicular

SV = *small variant* = morfotipo pequeno

TAL = taxa assimilatória líquida

TCR = taxa de crescimento relativo

UV-B = radiação ultravioleta B

X_g = força centrífuga relativa

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL	21
II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 1 - Caracterização de atributos morfofisiológicos e antioxidativos de três morfotipos de <i>Paubrasilia echinata</i> (Lam.) expostos ao pleno sol e à sombra.....	26
Resumo	26
1. Introdução.....	27
2. Materiais e Métodos	30
2.1. Área de estudo e instalação do experimento.....	30
2.2. Análise de crescimento.....	30
2.3. Fluorescência da clorofila a	31
2.4. Trocas gasosas.....	31
2.5. Antioxidantes e proteínas totais	32
2.6. Atividade da fenilalanina amônio liase (PAL, EC 4.3.1.5).....	34
2.7. Extração e quantificação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e malonaldeído (MDA).....	34
2.8. Compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, clorofilas e carotenoides totais	35
2.9. Análise de espectrometria de massas (ESI(-)FT-ICR).....	36
2.10. Determinação dos teores de ácido indol acético (AIA) e ácido indol butírico (AIB).....	37
2.11. Análises estatísticas.....	38
3. Resultados.....	38
3.1. Análise de crescimento.....	38
3.2. Fluorescência da clorofila a e trocas gasosas.....	39
3.3. Antioxidantes, proteínas totais, e teores de MDA e H ₂ O ₂	40
3.4. Concentrações de clorofilas, atividade da PAL, carotenoides, flavonoides e fenóis totais.....	41
3.5. Análise de espectrometria de massas (ESI(-)FT-ICR).....	42
3.6. Teores de ácido indol acético (AIA) e ácido indol butírico (AIB).....	43
4. Discussão.....	43
5. Conclusões.....	50
6. Referências bibliográficas	51
CAPÍTULO 2 - Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de dois morfotipos de <i>Paubrasilia echinata</i> Lam. submetidos à radiação ultravioleta-B	69
Resumo	69

1. Introdução.....	70
2. Materiais e Métodos	72
2. 1. <i>Material vegetal e condições de crescimento</i>	72
2. 2. <i>Análise de crescimento</i>	73
2. 3. <i>Teores de polímeros de parede celular</i>	74
2. 4. <i>Espectro de absorção da UV, pigmentos cloroplastídicos, fenóis totais, antocianinas e flavonoides</i>	77
2. 5. <i>Análise da fluorescência da clorofila a</i>	78
2. 6. <i>Trocas gasosas</i>	78
2. 7. <i>Capacidade antioxidante, teores de H₂O₂ e MDA</i>	79
2. 8. <i>Teores de açúcares solúveis totais e sacarose</i>	80
2. 9. <i>Análises estatísticas</i>	81
3. Resultados.....	81
3. 1. <i>Análise de crescimento</i>	81
3. 2. <i>Teores de polímeros de parede celular</i>	82
3. 3. <i>Pigmentos cloroplastídicos, antocianinas, flavonoides e fenóis totais</i>	83
3. 4. <i>Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência</i>	83
3. 5. <i>Capacidade antioxidante, teores de H₂O₂ e MDA e carboidratos solúveis</i>	84
4. Discussão.....	85
5. Referências	89
III. CONCLUSÕES	111

I. INTRODUÇÃO GERAL

Recentemente, o pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.) sofreu importante reformulação taxonômica, adquirindo um novo gênero, *Paubrasilia* (Gagnon et al., 2016). Os mencionados autores justificam essa mudança devido, primeiramente, às variações genéticas entre populações de pau-brasil encontradas por toda a costa brasileira (Cardoso et al., 1998 e 2005; Lira et al., 2003), bem como à ampla variedade morfológica existente neste táxon (Juchum et al., 2008). Gagnon et al. (2016) relatam ainda que, futuramente, esses morfotipos ou variantes morfológicas possam ser classificados em táxons subespecíficos ou até em novas espécies dentro do gênero *Paubrasilia*.

Até o momento, três morfotipos de *P. echinata* foram documentados: o primeiro, o mais comum, apresenta comparativamente os menores foliólulos e o cerne de coloração alaranjada, sendo encontrado em muitas localidades ao longo da costa do Brasil. O segundo difere pouco do primeiro, apresentando, contudo, foliólulos médios e cerne com coloração laranja-avermelhada. Desse morfotipo são conhecidos apenas representantes no Rio de Janeiro, Espírito Santo e interior-sul da Bahia. O terceiro morfotipo, por sua vez, apresenta foliólulos grandes e cerne vermelho-escuro, sendo encontrado naturalmente, hoje, apenas em uma localidade específica na Bahia, o Vale do Rio Pardo (Figura 1) (Juchum et al, 2008).

Além das divergências genéticas e morfológicas, esses morfotipos aparentam se diferenciar funcionalmente sob diferentes níveis de luz, demonstrando capacidades aclimatativas desiguais, principalmente entre alta e baixa luminosidade. Um dos morfotipos de *P. echinata*, o SV, foi estudado por Mengarda et al. (2009, 2012), que o classificaram como semi-heliófilo ou intermediário perante gradiente de luz. Os resultados desses trabalhos demonstraram queimaduras marginais dos foliólulos, inibição das trocas gasosas e deficiência no uso da água para o SV em alta irradiância (Mengarda et al. 2009). Além disso, foram obtidos outros resultados como o decréscimo no teor de pigmentos cloroplastídicos e o aumento da fluorescência da clorofila *a* nessas mesmas condições (Mengarda et al. 2012).

Esses sintomas de fotodanos no SV foram acompanhados pelo aumento da concentração dos carboidratos solúveis glicose, frutose, sacarose e rafinose (Mengarda et al. 2012), associados ao metabolismo antioxidativo, inibindo por exemplo, a síntese de ROS (Couéé et al., 2006; Terashima et al. 2006). Em contrapartida, Gama (2013), estudando o morfotipo médio – *medium variant* (MV) – de pau-brasil, concluiu forte comportamento heliófilo devido à elevada eficiência fotossintética e à atividade antioxidante, situações que refletiram em uma maior concentração de açúcares solúveis e em um maior crescimento nas plantas expostas a pleno sol, em comparação com a condição de sombreamento.

Os relatos contraditórios quanto ao comportamento ecofisiológico do pau-brasil, em resposta a luz, por autores como: Lima (1992) e Lorenzi (2002) que a classificam como planta heliófila; Aguiar et al. (2011) e (Zaidan et al., 2008) que justificam a necessidade de sombreamento moderado para o desenvolvimento inicial de mudas de *P. echinata*; bem como os resultados já comentados de Gama (2013) e Mengarda et al. (2009 e 2012), podem ter relação com esses morfotipos, bem como divergências genéticas entre populações.

Diante dessa dificuldade na classificação quanto ao habito ecológico do pau-brasil e, considerando que a luminosidade ambiental é um dos fatores de maior relevância no crescimento vegetal e está intimamente associada à sucessão florestal (Cuzzuol e Milanez, 2012), torna-se necessário um estudo de caráter conclusivo a respeito da adaptação funcional dos morfotipos de pau-brasil à luz. Esses futuros resultados são essencialmente importantes na conservação genética de populações e na promoção de manejos florestais mais adequados com *P. echinata*. Logo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de três morfotipos de *Paubrasilia echinata* Lam. em relação à irradiância.

II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar FFA, Kanashiro S, Tavares AR, Nascimento TDR, Rocco FM (2011) Crescimento de mudas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), submetidas a cinco níveis de sombreamento. *Revista Ceres* 58(6): 871-875
- Cardoso MA, Provan J, Powell W, Ferreira PCG, De Oliveira DE (1998) High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Molecular Ecology* 7:601–608
- Cardoso SRS, Provan J, Lira CDF, Pereira LDOR, Ferreira PCG, Cardoso MA (2005) High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. *Biodiversity and Conservation* 14(5): 1047–1057
- Cuzzuol GRF and Milanez CRD (2012) Morphological and Physiological Adjustments in Juvenile Tropical Trees Under Constrastaing Sunlight Irradiance. In: Mohammad Mahdi Najafpour. (Org.). *Photosynthesis - Fundamental Aspects*. Rijeka: InTech - Open Access Publisher 1:501- 518
- Gama VN (2013) Análises morfofisiológicas de plantas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) cultivadas em ambientes lumínicos distintos. Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo
- Gagnon E, Bruneau A, Hughes CE, Queiroz LP, Lewis GP (2016) A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group (Leguminosae). *PhytoKeys* 71: 1–160
- Juchum FS, Costa MA, Amorim AM, Corrêa RX (2008) Phylogenetic relationships among morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (Caesalpinioideae: Leguminosae) evidenced by trnL intron sequences. *Naturwissenschaften* 95:1085–1091
- Lima HC (1992) Aspectos botânicos do pau-brasil. In: Cunha MW, Lima HC (1992) *Viagem à terra do pau-brasil*. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, p. 23-38

- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA, Provan J (2003) Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology* 12(12): 3219–3225
- Lorenzi H (2002) Árvores brasileiras. 4 ed, v. 1. Nova Odessa: Plantarum
- Mengarda LHG, Milanez CRD, Silva DM, Aguilar MAG, Cuzzuol GRF (2012) Morphological and physiological adjustments of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.) to direct solar radiation. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24(3):161-172
- Mengarda LHG, Souza RLF, Campostrini E, Reis FO, Vendrame WA, Cuzzuol RRF (2009) Light as an indicator of ecological succession in brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 21:55-64
- Terashima IYT, Hanba Y, Tazoe P, Yano S (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany* 57:343-354
- Zaidan LBP (2008) Crescimento e propagação de plantas de pau-brasil. In: Figueiredo-Ribeiro RCL, Barbedo CJ, Alves ES, Domingos M, Braga MR (2008) Pau-Brasil da semente à madeira. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, p. 58-66

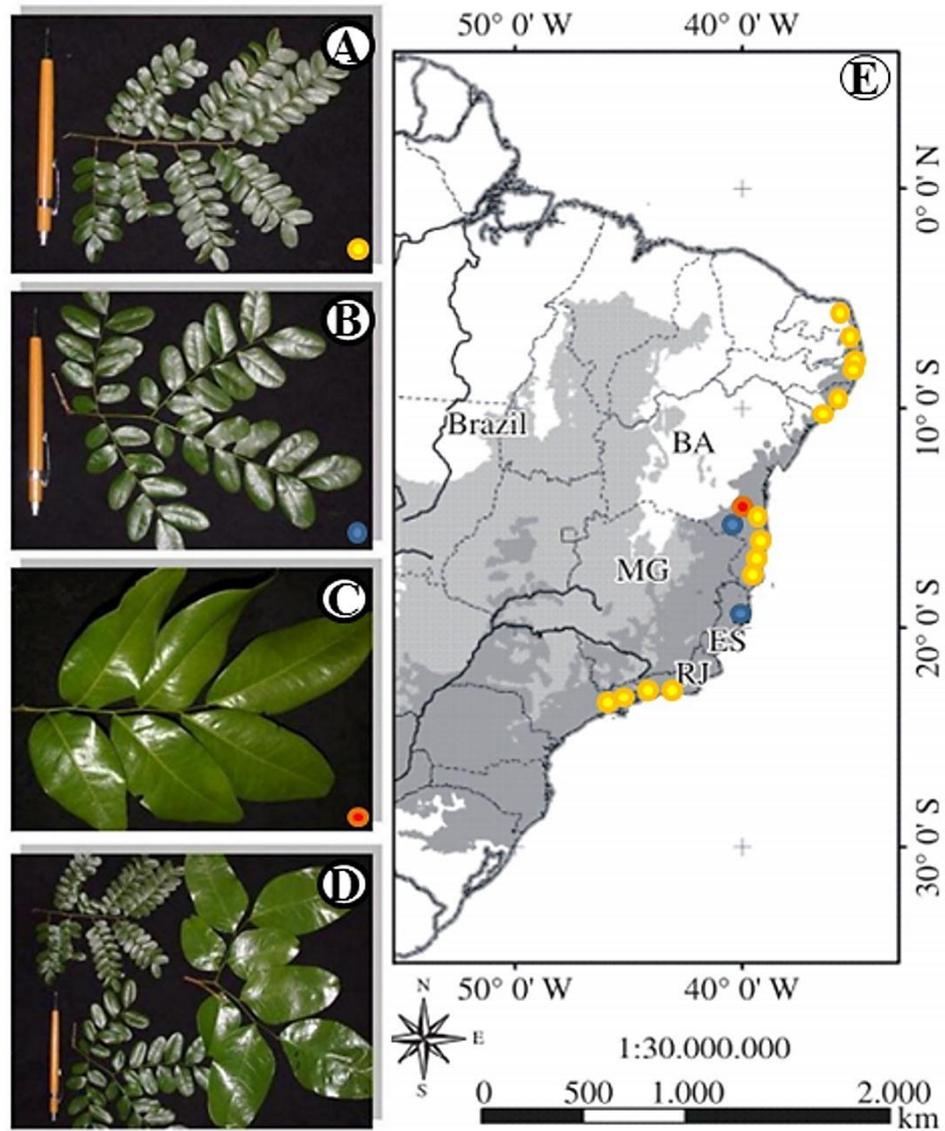


Figura 1 - Morfotipos de *Paubrasilia echinata*: A – morfotipo pequeno, *small variant* (SV); B – morfotipo médio, *medium variant* (MV); C – morfotipo grande, *large variant* (LV); D – Os três morfotipos; E – Distribuição geográfica natural dos morfotipos de pau-brasil SV (círculos amarelos), MV (círculos azuis) e LV (círculo vermelho). Adaptado de Juchum, 2007 e Nemésio (2013).

CAPÍTULO 1 - Caracterização de atributos morfofisiológicos e antioxidativos de três morfotipos de *Paubrasilia echinata* (Lam.) expostos ao pleno sol e à sombra.

Vinícius Novo Gama, Hildegardo Seibert França, Leonardo Valandro Zanetti, Tatiane Aparecida Zorzal, Fabiano Caprini Volponi, Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol¹

⁽¹⁾Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil. E-mail: viniciusnovogama@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas morfofisiológicas e antioxidativas de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* Lam. sob 100%(pleno sol) e 15% (sombra) de luz. Os variantes morfológicos utilizados foram: o pequeno (SV – *small variant*), o médio (MV – *medium variant*) e o grande (LV – *large variant*), todos com três anos de idade. Após 300 dias de tratamento, realizaram-se medidas de crescimento, trocas gasosas, teores de compostos fenólicos, atividade de enzimas antioxidantes (CAT, APX, POD e PPO) e auxinas totais. Com relação aos variantes médio e grande, registrou-se que tanto os mecanismos antioxidantes enzimáticos quanto os não enzimáticos demonstraram-se bastante eficientes em pleno sol. Igualmente, as fases fotoquímica e bioquímica apresentaram-se funcionalmente eficientes e sem sinais de fotodanos, corroborando com expressivo crescimento de LV e MV em pleno sol. Por outro lado, o maior potencial antioxidativo não foi suficiente para impedir efeitos negativos causados pelo sombreamento nos morfotipos MV e LV, verificados a partir de três elementos analisados: baixo teor de auxinas; superiores valores de ERO's (espécies reativas de oxigênio) e menor desempenho fotossintético. Estes refletiram numa menor taxa de crescimento em MV e LV em baixa irradiância, diferentemente de SV na mesma condição de luminosidade. O metabolismo secundário, o processo antioxidativo, os parâmetros da fotossíntese e crescimento apontam LV e MV como variações morfológicas com tendências para plantas heliófilas. O morfotipo SV se apresentou tendente à umbrófila. As considerações e os resultados encontrados demonstram-se

imprescindíveis, juntamente com novos estudos, para melhor conservação e manejo desta espécie em programas de recuperação da Floresta Atlântica.

Palavras-chave: auxinas, pau-brasil, antioxidantes, fotossíntese, pleno sol, sombreamento.

1. INTRODUÇÃO

O uso de arbóreas nativas tropicais em reflorestamentos está em evidência, mas essa atividade depende de dados sobre o comportamento das espécies em relação à luz. Tais informações são de grande importância na definição do posicionamento da sucessão e do manejo adequado de mudas de espécies nativas, imprescindíveis na regeneração artificial e manejo de florestas (Kitajima 1996; Campos e Uchida 2002; Almeida et al. 2004; Duz et al. 2004). Portanto, estudos ecofisiológicos podem gerar importantes informações para conservação e reintrodução de espécies ameaçadas como o pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.).

De ampla distribuição na costa brasileira nos primeiros séculos da colonização (Lima, 1992), o pau-brasil atualmente se restringe a pequenas populações naturais entre o Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte (Lima, 2002; Rocha e Simabukuro 2008). De sua madeira são confeccionados instrumentos musicais de corda de qualidade singular, certificada pela sua ressonância, densidade, durabilidade e beleza (Pierce, 2002).

Mesmo sendo relativamente bem estudada em nível taxonômico, fitoquímico e propagação, pouco se sabe sobre a ecofisiologia do pau-brasil, especialmente sobre seu desempenho em resposta à luminosidade. Para Budowski (1965), trata-se de uma espécie clímax (umbrófila), enquanto Lima (1992), Lorenzi (2002) e Baroni (2005) a classificam como heliófila. Para Mengarda et al. (2009, 2012), essa espécie tem características semi-heliófilas, em virtude do maior crescimento, capacidade fotossintética e eficiência no uso da água em 50% de radiância fotossinteticamente ativa (RFA).

As informações conflitantes quanto ao hábito ecológico de *P. echinata* podem ter relação com as variações morfológicas da espécie. Três morfotipos têm sido documentados por Juchum et al. (2008). O primeiro deles, mais comum, apresenta foliólulos menores e o

cerne de coloração alaranjada, sendo encontrado na costa brasileira entre os estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte (morfotipo pequeno – *small variant, SV*). O segundo morfotipo difere do primeiro por apresentar foliólulos ligeiramente maiores e cerne laranja avermelhado (morfotipo médio – *medium variant, MV*). Populações naturais desse segundo morfotipo ocorrem no Rio de Janeiro, no Espírito Santo e no sul da Bahia. O terceiro morfotipo, por sua vez, não apresenta foliólulos, apenas pinas compostas com grandes folíolos e cerne vermelho-escuro, sendo encontrado naturalmente apenas na Bahia (morfotipo grande – *large variant, LV*).

Com a difusão recente dessas informações, constatou-se que as plantas de hábito semi-heliófilo descritas por Mengarda et al. (2009; 2012) são do morfotipo pequeno, conforme análise das fotos apresentadas nos trabalhos desses autores. Provavelmente, as descrições de heliófila (Lima 1992; Lorenzi 2002; Baroni 2005) ou umbrófila (Budowski 1965) tenham relação com os outros morfotipos. Dados já divulgados relatam forte hábito heliófilo do morfotipo médio plantado em zona de tabuleiro da Mata Atlântica, ES (Gama 2013).

A divergência no comportamento ecofisiológico dos três morfotipos de *P. echinata* sugere profundas diferenças nos metabolismos primário e secundário em resposta à disponibilidade de luz. O morfotipo pequeno, sensível à intensa irradiância, apresentou queimaduras marginais dos foliólulos, inibição das trocas gasosas, menor eficiência no uso da água (Mengarda et al. 2009), decréscimo no teor de pigmentos cloroplastídicos e aumento da fluorescência da clorofila *a* em pleno sol. Essas respostas podem diagnosticar fotodanos e foram acompanhados pelo aumento significativo dos metabolismos secundário e oxidativo (Mengarda et al. 2012).

O aumento do metabolismo oxidativo pode ser interpretado por desequilíbrios fotossintéticos como a baixa taxa de assimilação de carbono (*A*), que acarreta baixa utilização do poder redutor gerado na fase fotoquímica e sobrerredução da cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto e, nessa condição, elétrons podem reduzir o oxigênio molecular,

levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO'S) (*e.g.*, peróxido de hidrogênio), potencialmente capazes de causar peroxidação de lipídios (Liu et al., 2016). Além disso, a peroxidação de lipídios de membrana pode ser estimada pelo acúmulo de malonaldeído (MDA) resultante da decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e resultar na perda de compartimentalização celular (Asada, 1999). Logo, o potencial de tolerância demonstrado pelas espécies de plantas contra o dano oxidativo dependerá da eficiência com que mobilizam as defesas antioxidantes, sendo elas, tanto enzimáticas (*e.g.*, catalases e peroxidases) como não enzimática (*e.g.*, compostos fenólicos) (Brandão et al., 2017).

Estudos relacionados ao controle do estresse oxidativo em espécies de diferentes grupos na sucessão florestal demonstram que espécies umbrófilas possuem menor potencial antioxidativo do que as heliófilas, apresentando menores atividades de enzimas antioxidantes e maiores teores de ERO's, quando submetidas à alta irradiância. Esse fato corrobora informações de que as umbrófilas são, de fato, menos tolerantes à elevada irradiância e, portanto, mais suscetíveis aos fotodanos (Favaretto et al. 2011). Lu et al. (2014) relatam a ligação de sequências gênicas (KUA1), que codificam peroxidases, na sinalização e interrupção do crescimento vegetal. Esse controle no crescimento é realizado pela ligação direta das peroxidases na oxidação de hormônios de crescimento, como as auxinas.

Provavelmente, essa divergência entre os morfotipos de *P. echinata* quanto ao hábito ecológico pode ser explicada por uma provável variação no potencial antioxidativo entre os mesmos, culminando em diferenças no crescimento, em resposta à luz. Logo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas morfofisiológicas e antioxidativas de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata*, sob 100% (pleno sol) e 15% (sombreamento) de luz.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e instalação do experimento

O experimento foi conduzido na área experimental do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (20°18'52''S e 40°19'06''O) em Vitória, ES. Plantas com três anos de idade cultivadas, previamente em sombrite (40% de irradiância) foram fornecidas pelo Instituto Verde Brasil (20°21'50"S e 40°39'35" O), Domingos Martins, ES. Os morfotipos utilizados foram: o pequeno (SV – *small variant*), o médio (MV – *medium variant*) e o grande (LV – *large variant*) de pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam. Leguminosae Caesalpinioideae). As plantas foram transplantadas para vasos plásticos de 12L contendo solo de floresta de tabuleiro, mantidas sob telado de sombrite com 15% de irradiância ($\pm 270\text{-}300 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) e aclimatadas por 21 dias nessas condições.

Encerrado o período de aclimação, um lote de plantas permaneceu na mesma condição descrita anteriormente (sombreamento – 15% de irradiância) e um outro lote foi transferido para pleno sol ou 100% de irradiância ($\pm 1.800\text{-}2.000 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ RFA). O experimento foi mantido entre maio de 2013 a março 2014 (300 dias), em que o clima variou durante o experimento, porém, sem condições extremas. Umidade relativa, precipitação e temperatura, apresentaram médias de 80%, 113,5 mm, 24°C, respectivamente (Incaper, 2014). A radiação foi medida diariamente com radiômetro (Sky Instruments Ltda, Richmond, Canadá) ao longo de todo experimento, em dias sem nuvens. A irrigação foi realizada, procurando-se manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo e, mensalmente, as plantas eram casualizadas entre os respectivos tratamentos.

2.2. Análise de crescimento

Aos 0 e 300 dias, foram medidas a altura das plantas, diâmetro do caule, número de folhas e folíolos, massas seca da raiz, caule e folhas e área foliar. Para a obtenção de massa seca, o material vegetal foi acondicionado em estufa 60°C até a obtenção de massa constante, que

ocorreu aos 05 dias. A área foliar foi feita em um scanner de geração de imagens (Area Meter, LI-COR 3100, Nebraska, EUA).

A partir dos dados obtidos foram calculados a massa foliar específica (MFE= massa seca foliar total/área foliar total), área foliar total (AFT), taxa assimilatória líquida [$TAL = (\ln A_2 - \ln A_1 / A_2 - A_1) \times (M_2 - M_1 / T_2 - T_1)$], taxa de crescimento relativo [$TCR = (\ln M_2 - \ln M_1) / (T_2 - T_1)$], razão de área foliar (RAF = AF/MST), razão raiz:parte aérea (R:PA), razão de massa foliar (RMF = MF/MST), razão de massa caulinar (RMC = MC/MST), razão de massa radicular (RMR = MR/MST) e teor de água foliar (massa fresca foliar – massa seca foliar), segundo Hunt (1982), em que, A_1 = área foliar total inicial; A_2 = área foliar total final; M_1 = massa inicial; M_2 = massa final; T_1 = tempo inicial; T_2 = tempo final; Ln = Log natural; MF = massa foliar, MC = massa caulinar, MR = massa radicular, AF = área foliar, TAF = teor de água foliar e MST = massa seca total.

2.3. *Fluorescência da clorofila a*

A emissão da fluorescência transiente OJIP foi medida com um fluorômetro portátil (Pocket PEA, Hanstech, King's Lynn, Norfolk, UK), no período entre 07:00 e 09:00h em folhas do terceiro nó previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos. Induziu-se a fluorescência nas folhas por pulso saturante de luz vermelha de $3.500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As definições e equações do teste JIP utilizadas seguiram a proposta de Strasser et al. (2004), sendo escolhidos os seguintes parâmetros: rendimento quântico do fotossistema II - FSII (F_V/F_M) e índice de desempenho fotoquímico total (PI_{TOTAL}).

2.4. *Trocas gasosas*

As medições de trocas gasosas foram feitas nas mesmas folhas utilizadas para a análise da fluorescência, entre 08:00 e 10:00h, utilizando-se um analisador de gases a infravermelho portátil (IRGA), modelo LI 6400 (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA), em irradiância de $500 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (próximo do ponto de saturação comum entre os tratamentos).

Foram avaliadas variáveis como: Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração (E), condutância estomática (g_s) e concentração intercelular de CO₂ (C_i). A partir dessas variáveis, foram calculadas a eficiência do uso da água (A/E) e a eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s). A capacidade fotossintética máxima (A_{max}) e a taxa de respiração no escuro (R_d) foram deduzidas a partir das curvas fotossintéticas em resposta à luz (A/PAR), obtidas a partir de níveis de luz (de 0 a 1500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a 27°C. As curvas foram normalizadas ajustando os dados a uma hipérbole retangular modificada, conforme Lobo et al. (2013). O modelo foi ajustado aos dados usando a análise de regressão não linear (mínimo de diferença quadrática) usando a ferramenta Microsoft Solver do Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA).

2.5. *Antioxidantes e proteínas totais*

Folhas do terceiro nó foram utilizadas para a extração das enzimas antioxidantes, 200 mg do tecido foliar foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), EDTA-Na₂ 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). As extrações foram realizadas em almofariz e pistilo para maceração com nitrogênio líquido. Centrifugou-se o homogeneizado a 12000 x g durante 15 min, a 4 °C (Parida et al., 2004). Utilizou-se o sobrenadante resultante para os ensaios das atividades da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (POD) e polifenoloxidase (PPO).

A atividade da catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) foi determinada conforme metodologia descrita por Havir e Mchale (1989), com modificações. A mistura de reação (2,15 mL) consistiu de tampão fosfato-Na (pH 7,0) 100 mM e H₂O₂ 20 mM. A reação teve início a partir da adição de 50 μL de extrato enzimático. A atividade foi determinada por monitoramento da velocidade inicial de desaparecimento de H₂O₂, a 240 nm, durante 30 s, a 28°C. O coeficiente de extinção de H₂O₂ considerado foi de 36 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981).

Determinou-se a atividade da peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) nos termos da metodologia descrita por Nakano & Asada (1981), com modificações. A mistura de reação

para a APX (2,5 mL) conteve tampão fosfato-Na (pH 7,0) 100 mM, ácido ascórbico 10 mM e H_2O_2 2 mM. A reação iniciou-se com a adição de 30 μL de extrato de enzima. A oxidação de H_2O_2 dependente de ácido ascórbico foi mensurada seguindo o decréscimo da absorbância em 285 nm, durante 3 min a 28 °C. O coeficiente de extinção de H_2O_2 considerado foi de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981).

A atividade da peroxidase do guaiacol (POD; EC 1.11.1.7) foi analisada conforme Cakmak et al. (1993), com modificações. O meio de reação (2,15 mL) constitui de tampão fosfato-Na (pH 7,0) 100mM, guaiacol 20 mM, peróxido de hidrogênio 20 mM; a reação foi iniciada com 50 μL de extrato enzimático. O aumento da absorbância devido à oxidação do guaiacol foi medido em 470 nm, depois de 2 min de reação, a 28 °C. O coeficiente de extinção de H_2O_2 considerado foi de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da polifenoloxidase (PPO; EC 1.30.3.1) foi estimada de acordo com Cañal et al. (1988), com modificações. A mistura de reação (2,2 mL) consistiu de tampão fosfato-Na (pH 6,8) 0,2 M, catecol 0,2 M, e a reação iniciada com 20 μL de extrato enzimático. O aumento da absorbância foi medida em 420 nm, depois de 2 min de reação, a 28 °C. A atividade total da enzima foi expressa por aumento da absorbância por minuto por massa seca.

O teor de proteínas totais foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976), a partir do mesmo extrato aquoso utilizado para as análises enzimáticas, tendo a albumina sérica bovina como padrão. A determinação foi realizada pela adição de 2,5 mL do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,05 mL da amostra; 10 min após a adição do reagente, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Determinou-se a capacidade antioxidante total pelo método ABTS (radical catiônico $\text{ABTS}^{+\cdot}$) que mensura o potencial antioxidativo não enzimático da amostra, utilizando-se metodologia proposta por Lako et al. (2007). O radical catiônico $\text{ABTS}^{+\cdot}$ foi produzido a partir da reação de 7 mM 2,20-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) sal diamônio (ABTS) e 2,45 mM de persulfato de potássio. Em seguida, realizou-se uma diluição para 1L

com água destilada e o conteúdo transferido para um frasco de vidro âmbar a 25 °C, durante 24 h. As leituras foram feitas com 10 mL de solução de ABTS e 5 µL de extrato etanólico (mesmo utilizado nas análises de pigmentos), em 734 nm, utilizando-se espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis. Para o cálculo da capacidade antioxidante total, utilizou-se a calibração pela curva padrão de equivalentes de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico).

2.6. Atividade da fenilalanina amônio liase (PAL, EC 4.3.1.5)

A atividade da PAL foi determinada pela formação de ácido cinâmico, a 290 nm (Cahill e McComb 1992). A reação compreendeu 25 µL de extrato enzimático (o mesmo utilizado nos protocolos das enzimas antioxidantes), 975 µL de tampão borato (67 mM - pH 8,8), 500 µL L-fenilalanina (33 mM) e 1000 µL de água destilada. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 104 mM cm⁻¹ e a mistura foi incubada a 30°C, por 1 h e imediatamente cessou-se a reação pela adição de 33 µL de HCl 6 N.

2.7. Extração e quantificação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA)

Os extratos para análise dos teores de H₂O₂ e MDA foram produzidos a partir de 250 mg de tecido foliar macerado em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP, homogeneizados em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados a 10.000 g por 10 min, a 4°C. O teor de H₂O₂ foi determinado pelo método de Alexieva *et al.* (2001). O meio de reação consistiu de 0,5 mL do sobrenadante do extrato, 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e 2 mL de 1 M de iodeto de potássio (KI). A reação desenvolveu-se por 1 h, no escuro, e a absorbância lida em 390 nm. A concentração de H₂O₂ foi calculada através de uma curva padrão.

O teor de malonaldeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, foi utilizado para determinar o nível de dano nas membranas, seguindo a metodologia de Buege e Aust (1978), em reação com ácido tiobarbitúrico. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de

reação (0,5% (m/v) de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se a 95 °C, por 30 min. Em seguida, paralisou-se a reação por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram realizadas em 535 nm e 600 nm. O teor de MDA foi calculado a partir do coeficiente de extinção de 155 mM cm⁻¹ aplicando a fórmula: teor de MDA (ηM) = [(A₅₃₅-A₆₀₀)/1,56] x 105 (Buege e Aust, 1978).

2.8. Compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, clorofilas e carotenoides totais

Os extratos para as determinações dos compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, clorofilas e carotenoides totais foram obtidos a partir de 0,04 g de massa fresca foliar em homogeneização com etanol 80% (Lichtenthaler e Buschmann, 2001). O homogeneizado foi incubado durante 24 h, a 4°C, no escuro seguido de centrifugação a 1450g, durante 20 min a 4°C, para a separação do sobrenadante que foi mantido em refrigeração a 4°C no escuro.

A determinação de compostos fenólicos foi feita usando reagente de *Folin-Ciocalteu*, segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Adicionaram-se a 50 µL de extrato etanólico 1250 µL de água ultrapura e 200 µL de reagente *Folin-Ciocalteu*, em agitação, durante 4 min. Em seguida foi adicionado 1 mL de Na₂CO₃ 15% e a mistura foi incubada a 25 °C, por 2 h e a absorbância medida em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis) a 760 nm.

Estimou-se o teor de antocianinas das folhas de acordo com o método de Beggs e Wellmann (1994), com modificações. A reação no escuro foi realizada durante 24 h, a 4 °C, com 1,5 mL de extrato etanólico em HCl a 1 %. As absorbâncias foram lidas em 535 nm e o teor de antocianina foi expresso por grama de massa seca utilizada.

O teor de flavonoides foi estimado pelo método de Flint et al. (1985), com modificações. A reação colorimétrica foi realizada a partir da mistura de 500 µL de extrato etanólico, 100 µL cloreto de alumínio, 100 µL de acetato de potássio 1M e 4300 µL de água destilada. O volume final foi homogeneizado em 25 °C por 30 min e a leitura em 428 nm. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso em absorbância por grama de massa seca.

Determinaram-se os valores de clorofilas e carotenoides totais a partir de 100 μL de extrato etanólico, completados os volumes das alíquotas para 3 mL na cubeta em leitura espectrofotométrica. Os comprimentos de onda foram obtidos segundo as equações de Lichtenthaler e Buschmann (2001): Clorofila $a = (13,36.A_{664}) - (5,19.A_{648})$; Clorofila $b = (27,43.A_{648}) - (8,12 . A_{664})$; Clorofila_{Total} = Clorofila a + Clorofila b ; Carotenoides = $(1000.A_{470}) - (2,13.\text{clorofila } a) - (97,64.\text{clorofila } b)/209$. Em que A_{470} = absorbância a 470nm; A_{664} = absorbância a 664nm; A_{648} = absorbância a 648nm. Os resultados foram apresentados em mg por grama de massa seca.

2.9. Análise de espectrometria de massas (ESI(-)FT-ICR)

O material, proveniente das folhas do terceiro nó apical, foram submetidas à secagem em estufa, com circulação de ar, a 40 °C, por aproximadamente cinco dias, sendo posteriormente pulverizado, utilizando-se de um moinho de bola (Modelo TE-350, TECNAL, São Paulo, Brasil). Submeteu-se o pulverizado a uma extração com álcool etílico 70% por maceração a oito dias, a 25 °C, e, após a eliminação do solvente por intermédio de evaporador rotativo (Quimis[®], Q344B1, Diadema, Brasil - 35 rpm e 40 °C), obtendo-se, então, o extrato bruto etanólico. Ao final, colocou-se o extrato bruto em vidro âmbar, que permaneceu em geladeira até o momento da realização do protocolo experimental.

Os extratos etanólicos foliares foram solubilizados em 1 mL de metanol. Aproximadamente 10 μL do extrato produzido foi diluído novamente em 1 mL de solução de acetonitrila e água basificada com NH_4OH . A solução resultante foi analisada por Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier – Ionização por Electrospray (ESI(-) FT-ICR MS) para determinação de algumas compatividades químicas, nesse caso, flavonídes e compostos cumáricos. As soluções foram analisadas por infusão direta a taxa de fluxo de 5 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ para a fonte de *electrospray* no modo negativo de aquisição de íons (ESI(-) e adquiridos em uma região de m/z 200 a 1000. As condições da fonte de ESI(-) foram: pressão de gás nebulizador de 1,0 bar, voltagem

capilar de 3,2 kV e temperatura do capilar de 250 °C. O tempo de acumulação de íons foi de $5 \cdot 10^{-4}$ s, sendo que cada espectro foi adquirido pela acumulação de 32 *scans* com um domínio de tempo de 4 *mega-point*. Todos os espectros de FT-ICR MS foram externamente calibrados utilizando-se de solução de NaTFA (*m/z* de 200 a 1200). O poder de resolução de aproximadamente 500 000 a *m/z* de 428 e exatidão de massa menor do que 1 ppm fornecem fórmulas moleculares inequívocas para íons moleculares monocarregados. Os espectros de FT-ICR MS foram adquiridos e analisados no *software Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O grau de instauração para cada molécula foi determinado a partir do seu valor de DBE (*double bond equivalent*), equação: $DBE = c - h/2 + n/2 + 1$; onde c, h, e n correspondem aos números de carbono, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente, na fórmula mínima determinada a partir dos dados de FT-ICR MS.

2.10. Determinação dos teores de ácido indol acético (AIA) e ácido indol butírico (AIB)

Amostras de 4 g de tecido foliar fresco foram maceradas em 15 mL de metanol P.A. contendo 1,5 mL de HCl 1M e o homogeneizado foi mantido no escuro, a 4 °C, por 12 h (Guo et al., 2010). Em seguida, os extratos foram centrifugados a $4.324 \times g$ por 15 min. Os sobrenadantes foram reduzidos para 3 mL em capela com fluxo de banho de gelo.

O ácido indol butírico (IBA) foi extraído em mistura de 1 mL do extrato, 1 mL 4-(dimetilamina) benzaldeído (PDAB, *Ehrlich reagent*, Sigma-Aldrich) 1% e 0,45 mL de HCl 36 % por 40 min, a 25 °C, e a leitura de suas absorvâncias foram realizadas em 583 nm. Subsequentemente, as misturas foram aquecidas em banho-maria a 70 °C, por 150 min, e, novamente, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 583 nm para determinação das absorvâncias do AIA. Realizaram-se curvas padrão de AIA e AIB (Sigma-Aldrich) para a expressão dos resultados em µg de auxinas por grama de massa seca foliar.

2.11. Análises estatísticas

As análises foram executadas a partir de cinco repetições por tratamento utilizando-se o programa InfoStat (www.infostat.com, Grupo InfoStat, FCA, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina) para análise de distribuição de normalidade com o teste de Shapiro–Wilk e para análise de variância dos fatoriais. Submeteram-se os dados à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O efeito significativo da interação estatística foi indicado por asterisco (*) nas figuras e tabelas apresentadas.

3. RESULTADOS

3.1. Análise de crescimento

Observaram-se diferenças expressivas para os três morfotipos de *P. echinata* com relação ao crescimento em resposta à luz. O morfotipo LV apresentou maior altura após o tratamento ao pleno sol, seguido decrescentemente por MV e SV (Figura 1 e Tabela 1); ao passo que, no sombreamento, o crescimento em altura do LV foi 50% em relação ao tratamento ao sol. Valores semelhantes foram constatados para o MV, que apresentou 40% maior altura em pleno sol. Já o SV não apresentou diferenças estatísticas no crescimento em altura para as duas condições de luminosidade. O diâmetro caulinar (DC) foi superior a pleno sol em relação ao sombreamento para os três morfotipos, sendo o LV com maior contraste entre os tratamentos, apresentando DC 50% superior ao pleno sol. O morfotipo MV também apresentou considerável variação, com 40% maior DC no tratamento a pleno sol (Tabela 1).

Constatou-se que a massa seca total (MST), seguiu proporção decrescente: $LV > MV > SV$ a pleno sol. No sombreamento, não houve diferença estatística para MST entre os morfotipos. Observou-se, também, maior massa seca da parte aérea (MSPA) do morfotipo SV na sombra em relação ao MV e ao LV. A pleno sol, o LV e o MV apresentaram maior MSPA do que quando submetidos ao sombreamento, contudo, o SV não diferiu sua MSPA entre diferentes tratamentos de luz. O SV apresentou maior valor de área foliar total (AFT) no

sombreamento, contrariamente, LV apresentou maior valor de AFT ao pleno sol. Nesse sentido, houve um aumento de crescimento da parte aérea tanto em massa quanto em área foliar para o LV ao pleno sol, contudo, o morfotipo SV investiu seu crescimento no ambiente sombreamento, em área foliar total (AFT) (Tabela 1).

As taxas de crescimento relativo (TCR) foram maiores para o MV e o LV no pleno sol, no entanto, observaram-se esses mesmos morfotipos com a menor TCR na sombra. Já o SV não diferiu entre pleno sol e sombra, mas apresentou maior TCR entre os morfotipos no sombreamento. Com relação à taxa de assimilação líquida de carbono (TAL), esta seguiu os mesmos padrões de valores para a TCR, tendo o MV e o LV com maiores taxas no pleno sol e o SV maior taxa na sombra. Foi possível analisar que as taxas TCR e TAL do MV e do LV no pleno sol foram semelhantes às taxas do SV na sombra, fato que pôde ser confirmado ao se analisar o crescimento em massa (MST) dos respectivos indivíduos (Tabela 1).

LV e MV apresentaram maior conteúdo de água foliar (TAF) no pleno sol, diferente do SV que não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Os parâmetros: número de folhas (NF), número de folíolos (NFF) e razão da massa seca da parte aérea e radicular (R:PA), não diferiram significativamente entre os tratamentos (Tabela 1).

Quanto à alocação da biomassa, os três morfotipos apresentaram resultados semelhantes entre tratamentos, observado em todos, maior razão de massa foliar (RMF) sob sombreamento e maior razão de massa radicular (RMR) a pleno sol. A razão de massa caulinar não variou em nenhum tratamento. Para o LV à sombra, seu valor de RMF foi superior quando comparado ao do MV e do SV na mesma condição (Figura 2).

3.2. *Fluorescência da clorofila a e trocas gasosas*

Com relação aos parâmetros relativos do processo fotoquímico da fotossíntese, o morfotipo SV apresentou maior rendimento quântico do fotossistema II – FSII (F_v/F_m), bem como maior PI_{TOTAL} (índice de desempenho fotoquímico de todo aparato fotossintético – FS I e II) ao sombreamento. Entretanto, ao pleno sol, o LV foi superior ao MV e ao SV, com valores 50%

maiores para o PI_{TOTAL} . Além disso, o MV foi maior entre os três morfotipos no pleno sol no que se refere ao rendimento do FS II (Tabela 2).

Houve variações intra e intermorfotípicas significativas para todos os parâmetros de trocas gasosas. Observaram-se maiores taxas de assimilação líquida de carbono (A) em LV e MV ao pleno sol, tiveram valores superiores a 50% de A em relação aos das plantas sob sombreamento; Em contraste, A foi 30% maior em SV à sombra em relação à condição de pleno sol; Com relação às variáveis E , C_i e g_s , o SV apresentou valores intermediários, independentemente da condição luminosa, ao contrário de LV e MV, que alcançaram resultados elevados em pleno sol e menores sob sombreamento. O SV, exposto à sombra, mostrou maior eficiência do uso da água (A/E e A/g_s).

3.3. Antioxidantes, proteínas totais, e teores de MDA e H_2O_2

O teste realizado para aferir a capacidade antioxidante total das amostras (ABTS) demonstrou que os três morfotipos possuem menor capacidade antioxidante no sombreamento. Além disso, o LV apresentou maior capacidade antioxidante em pleno sol em relação ao SV e ao MV (Figura 3 - A).

Maiores teores de proteínas totais foram encontrados no MV no sombreamento, seguido do LV, na mesma condição de luz, e do SV no pleno sol. O morfotipo grande exposto a pleno sol apresentou a menor concentração de proteínas totais (Figura 3 - A).

Embora não tenha sido observado um padrão de variação consistente entre as plantas para as quatro enzimas antioxidantes (CAT, POD, PPO e APX), de modo geral, percebe-se uma tendência de maior atividade das enzimas antioxidantes para o LV e o MV à sombra (Figura 2). Porém, a atividade da CAT foi significativamente superior para o SV e o MV no pleno sol, ao contrário do LV que não apresentou diferenças estatísticas (Figura 2 - C). Em relação à atividade da POD, constatou-se maior atividade nos morfotipos MV e LV sob sombreamento, apresentando atividades três vezes superiores no SV nesta mesma condição de

irradiância. Em contrapartida, no pleno sol, o MV e o LV apresentaram menores atividades da POD em relação ao SV (Figura 3 - D).

A maior atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) foi observada nas plantas sombreadas para os três morfotipos, com destaque para o LV que apresentou valor três vezes maior em relação ao pleno sol. Em resposta à alta luminosidade, os três morfotipos não diferiram significativamente quanto à atividade da PPO (Figura 3 - E), observou-se a menor atividade da peroxidase do ascorbato (APX) no LV sob sombreamento em relação ao SV e ao MV. Para a APX, SV apresentou os maiores valores tanto no sombreamento quanto no pleno sol entre todos os tratamentos (Figura 3 - F).

Em geral, observou-se tendência de maiores concentrações de MDA e H_2O_2 nas plantas do MV e do LV sob sombreamento em relação às de pleno sol (Figura 2 - G e H). Contrariamente, para o SV, os teores de H_2O_2 e MDA apresentaram-se maiores em pleno sol (Figura 3 - H).

3.4. *Concentrações de clorofilas, atividade da PAL, carotenoides, flavonoides e fenóis totais*

O LV e MV exibiram maiores teores de clorofilas *a* e totais nas folhas sombreadas em relação aos daquelas expostas ao pleno sol, com diferença mais expressiva no LV. Essas diferenças não foram observadas em SV, que apresentou maiores concentrações de clorofilas *a* e totais em pleno sol (Figura 4 - A e C). Quanto à concentração de clorofila *b*, o LV apresentou maior valor entre todos os tratamentos. Nesse mesmo morfotipo, à sombra, sua concentração de clorofila *b* foi similar ao SV. Vale acrescentar que, contrariamente ao LV e o MV, o SV apresentou maior teor de clorofila *b* no sombreamento (Figura 4 - B). Para as razões entre clorofilas *a* e *b* (Clor. *a/b*) e clorofilas totais e carotenoides (Clor. totais/Carot.), os resultados foram semelhantes nos três morfotipos: o LV e o MV apresentaram razões superiores nas plantas expostas ao sombreamento se comparadas com as em pleno sol; porém, o SV apresentou razões maiores no pleno sol (Figura 4 - D e F).

Para a atividade da fenilalanina amônio liase (PAL), os morfotipos médio e grande, expostos ao sombreamento, destacaram-se expressivamente dos demais tratamentos com valores próximos a 1 e 2 (unidades de absorvância de PAL por grama de amostra seca), respectivamente, contra 0,1 a 0,2 nas mesmas plantas ao pleno sol (proporções próximas a 8-10 vezes o valor de PAL). Para o morfotipo pequeno, apesar de não se ter demonstrado valores expressivos, apresentou maiores atividades de PAL ao pleno sol em relação a essas mesmas plantas em sombreamento (Figura 4 – E).

Os três morfotipos apresentaram maiores concentrações de flavonoides a pleno sol. LV e o MV exibiram teores três vezes maiores. Em SV a concentração foi duas vezes maior (Figura 4 – J). Com relação ao conteúdo de carotenoides, este foi maior no LV exposto a pleno sol, seguido do MV nessa mesma condição. No entanto, o SV apresentou valores maiores de carotenoides à sombra, os quais foram, inclusive, similares ao MV no pleno sol (Figura 4 – G). Por sua vez, a concentração de antocianinas variou entre os morfotipos de forma que, de maneira geral, o SV e o MV apresentaram os maiores teores ao pleno sol, enquanto o LV não apresentou diferenças significativas para as duas condições de irradiância (Figura 4 – I). O conteúdo de fenóis totais foi superior nas plantas em sombreamento para todos os morfotipos, com destaque decrescente de valores para LV > MV > SV. No pleno sol o teor de fenóis não diferiu entre os morfotipos (Figura 4 – H).

3.5. Análise de espectrometria de massas (ESI(-)FT-ICR)

A análise de espectrometria de massas revelou que os três morfotipos de *Paubrasilia echinata* são semelhantes quimicamente. Nas duas condições de irradiância SV, MV e LV apresentaram compostos flavonoides em suas folhas. Entretanto, sob sombreamento, os três morfotipos apresentaram compostos cumáricos não encontrados a pleno sol (Figura 5).

3.6. Teores de ácido indol acético (AIA) e ácido indol butírico (AIB)

As três variações morfológicas apresentaram maiores concentrações de AIA e AIB a pleno sol, com destaque para o LV e o MV em proporções quatro vezes maiores, em contraste com o SV, que apresentou uma variação nas duas condições de luz menos expressiva – com destaque para o conteúdo de AIB estatisticamente semelhante entre as duas condições. Com relação ao sombreamento, o conteúdo de auxinas do SV foi três vezes maior em relação ao LV e ao MV, apresentando valores próximos a 3 (AIA) e 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (AIB), contra valores que não ultrapassam 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de auxinas para o LV e o MV (Figura 6).

4. DISCUSSÃO

No caso dos morfotipos LV e MV em condição de pleno sol, observou-se crescimento favorável tanto em altura quanto em biomassa total após 300 dias de exposição. Atribui-se a essa expressiva diferença morfológica em relação ao SV às maiores taxas de crescimento (TCR) e de assimilação de carbono (TAL) do LV e o MV a alta luminosidade.

Estes resultados são corroborados por Mengarda et al. (2009; 2012) que, ao trabalhar com o SV, encontraram menor desenvolvimento desse morfotipo a pleno sol, com menor TAL e TCR, bem como altura e biomassa total. Gama (2013), analisando um lote do MV, em ambiente natural de Mata Atlântica de tabuleiro, encontrou, também, um contraste de crescimento para o morfotipo médio, apresentando altura e DC quatro vezes maiores a pleno sol em relação a um mesmo lote de indivíduos, com a mesma idade, plantados em sombreamento (15% RFA).

Barazetti (2013), ao trabalhar com os três morfotipos de pau-brasil, também encontrou maior crescimento do LV ao pleno sol e concluiu que o LV apresenta hábito heliófilo, contradizendo a informação de Budowski (1965) e Mengarda et al. (2009) que classificaram o pau-brasil como uma espécie clímax (umbrófila) e semi-heliófilas respectivamente. Para Juchum et al. (2008) as citadas informações conflitantes quanto a hábito ecológico do pau-

brasil podem ter relação com as diferenças moleculares e filogenéticas entre os três morfotipos desta espécie.

Vale ressaltar que o menor crescimento do LV e do MV à sombra, sugere possível relação com as baixas concentrações de auxinas, tanto AIA quanto AIB, em suas folhas. Em contrapartida, o SV nesta mesma condição, não apresentou esse declínio hormonal, o que favoreceu seu crescimento em baixa irradiância. Para Gong et al. (2014), o sombreamento causa diminuição da concentração de auxinas devido aos baixos níveis de irradiância na faixa do vermelho e vermelho extremo. Estas últimas, em baixos níveis, podem desencadear processos de bloqueio na sinalização de genes responsáveis na síntese de hormônios de crescimento, conferindo diminuição do crescimento dos vegetais em sombra em diversos trabalhos publicados (Gong et al. 2014; Kurepin et al. 2007; Cookson e Granier, 2006; Kozuka et al. 2005).

Para Kozuka et al. (2005), a expansão celular – e não a divisão celular – desempenha um papel importante no crescimento do limbo foliar em condições de sombra, proporcionando maiores extensões foliares em área. Esses autores afirmam ainda que a expansão celular necessita de um elevado teor hídrico nas folhas para proporcionar turgência celular. Essa ligação do maior conteúdo de água foliar e maior crescimento em área foliar apresentada por esses últimos autores não condiz com os resultados encontrados neste trabalho: o conteúdo de água nas folhas do SV exposto à sombra foi inferior em relação ao LV e ao MV, mas, mesmo assim, apresentou maior crescimento em área foliar total (AFT). Da mesma maneira, Mengarda et al. (2012) e Barazetti (2013) também encontraram resultados superiores em AFT para o SV sob sombreamento.

Os resultados quanto a repartição da biomassa seca encontrados neste trabalho revelaram aspectos interessantes quanto ao comportamento das variantes morfológicas de pau-brasil. Os resultados mostraram que o MV e o SV apresentam mesmo padrão de alocação da biomassa, independentemente da condição de luz. Entretanto, para o LV, ocorreu maior

incremento de massa nos tecidos foliares (RMF) a sombra, situação que pode ser explicada por uma maior plasticidade fenotípica. Valores similares de RMF foram encontrados por Lima et al. (2010), trabalhando com três espécies arbóreas nativas (*P. echinata* – com morfotipo não informado, *Cariniana legalis* e *Genipa americana*) sob sombreamento.

A maior MFE dos três morfotipos de *P. echinata* a pleno sol, pode ser interpretada como uma estratégia para evitar danos oxidativos ao aparato fotossintético, aumentando a resistência à penetração da irradiância (Rossato e Kolb, 2012). Sendo assim, esta estratégia fisiológica funcionou melhor para o LV e o MV, já que apresentaram os menores teores de H_2O_2 e MDA nos tecidos foliares e, também, melhor desempenho fotossintético: tanto fotoquímico (F_v/F_M) quanto bioquímico (assimilação de CO_2 – A). Atribuiu-se essa maior eficiência da fotossíntese do LV e MV a pleno sol à maior abertura estomática, que proporciona um maior influxo de CO_2 (C_i) e, por conseguinte, uma maior taxa de fotossíntese (A) (Marchese et al., 2008).

Mesmo apresentando maior perda de água através da transpiração (E) sob maior luminosidade, o LV e o MV demonstraram maior eficiência no uso da água (A/E), confirmando os dados de Siegert e Levia (2011). Os referidos autores encontraram alta capacidade de espécies pioneiras em tolerar altas irradiâncias, situações em que a disponibilidade de água é menor em comparação com o interior da floresta. Os menores resultados de A , C_i , g_s , A/E e A/g_s encontradas no SV ao pleno sol confirmam as características umbrófilas sugeridas por Mengarda et al. (2012), sendo um morfotipo com alta sensibilidade fotossintética à alta irradiância, sugerindo inibição da atividade da Rubisco ou fotodano (Thach et al., 2007).

A inibição da atividade da Rubisco seria explicada pelo aumento da temperatura foliar, (Law e Crafts-Brandner 1999), como observado em outras espécies tropicais quando expostas à alta luminosidade (Magalhães et al., 2009). No caso do fotodano, seria indicado pela maior dissipação de energia luminosa (menor PI_{TOTAL}) e menor concentração de pigmentos dos

complexos coletores de luz e fotoproteção (carotenoides e flavonoides) (Dias e Marengo, 2007).

É importante afirmar que na condição de sombra, as plantas tendem a sintetizar clorofila para aumentar a captura de irradiância e otimizar a fotoquímica da fotossíntese (Costa e Marengo, 2007). O aumento do teor de clorofila de LV e MV em baixa irradiância pode ser entendido como uma tentativa de aclimação e otimização da captação desse recurso limitado (Niinemets, 2010). Porém, esse aumento dos pigmentos não foi suficiente para o desempenho fotossintético de LV e MV em condições de sombra, que, finalmente, resultou em redução significativa na biomassa. Já para SV, os elevados teores de carotenoides e Clor. *b* na sombra atuaram como pigmentos alternativos na captação de energia em comprimentos de onda diferentes da clorofila *a*, como relatado por Scalon et al. (2002).

Silvestrini *et al.* (2007), ao estudarem o comportamento de nativas tropicais: uma heliófita (*Trema micrantha*) e outra umbrófito (*Hymenaea courbaril*), observaram que, sob baixa irradiância, o conteúdo de clorofila *b* e carotenoides foi maior na espécie umbrófito. Este resultado ocorreu em razão da necessidade de incrementar a capacidade de absorção de luz, em locais onde ela é limitante. Em contraste, a espécie heliófita apresentou maior teor de carotenoides e Clor. *b* no pleno sol (mesmos resultados para LV e MV), indicando que em ambas as arbóreas o *pool* de carotenoides atua de maneira diferente, sugerindo-se que na heliófita essas moléculas estejam mais relacionadas à fotoproteção.

Os melhores resultados em fotoproteção para os morfotipos grande e médio a pleno sol, também foram confirmados pela atividade das enzimas do processo antioxidativo. O LV e o MV em pleno sol apresentaram menor atividades da catalase (CAT), peroxidase do guaiacol (POD) e peroxidase do ascorbato (APX), bem como os menores teores de H₂O₂ e MDA em relação ao SV. Estudos relacionados à prevenção do estresse oxidativo em espécies de diferentes grupos na sucessão florestal revelam que, nas espécies heliófitas, o potencial antioxidativo é maior do que nas umbrófitas, confirmando que as heliófitas são, de fato, mais

tolerantes a níveis elevados de luz e, portanto, menos suscetíveis aos fotodanos (Guo *et al.* 2004; Favaretto *et al.* 2011).

Essas informações não condizem, em parte, com o que encontramos neste trabalho, já que o SV, no pleno sol, apresentou potencial enzimático e não-enzimático (método do ABTS) para o combate aos radicais livres (espécies reativas de oxigênio – ERO's), o que, porém, não foi suficiente para diminuir as concentrações de ERO's. De acordo com Favaretto *et al.* (2011) que analisaram estresse oxidativo em arbóreas de diferentes grupos sucessionais, o SV seria um morfotipo com potencial antioxidativo mais plástico e, portanto, apresentaria diferentes respostas às condições de luminosidade, incluindo a produção das ERO's.

O hábito heliófilo dos morfotipos grande e médio pode ser confirmado também pela maior atividade das enzimas antioxidantes POD e APX (para MV) e PPO e CAT (para o LV), bem como elevadas taxas de ERO'S (para ambos) no sombreamento. Essa característica antioxidante foi relatada por Favaretto *et al.* (2011), ao trabalhar em arbóreas pioneiras de florestas tropicais submetidas a 10% de irradiância.

Favaretto *et al.* (2011), relatam ainda que, além do seu envolvimento na neutralização dos ERO's, as peroxidases (CAT, POD e APX) também têm efeito antagônico na atividade das auxinas. Essas enzimas catalisam a oxidação dessa classe de fitormônios reconhecida como potente reguladora do crescimento e expansão celular (Sofa *et al.* 2004). Isso explicaria as baixas taxas de auxinas e superiores valores de peroxidases do LV e do MV, assim como menor crescimento no sombreamento. Baixas concentrações de auxinas em plantas sob sombreamento parece ser uma resposta comum (Kozuka *et al.* 2005; Cookson e Granier 2006; Kurepin *et al.* 2007; Gong *et al.* 2014), sugerindo o mencionado efeito regulatório de auxinas em razão das peroxidases ou, ainda, de outros fatores não elucidados. No mesmo sentido, Lu *et al.* (2014) relatam a ligação de sequências gênicas específicas (KOA1) que codificam peroxidases na sinalização e na interrupção do crescimento vegetal, seja por um estresse reconhecido, seja por regulação natural do crescimento, ao longo da ontogenia. Essa

ocorrência na expansão celular é realizada pela ligação direta das peroxidases no controle do peróxido de hidrogênio e potencial oxidativo às auxinas.

Ainda que na condição de sombreamento o LV e o MV tenham mostrado maiores atividades antioxidativas, o mecanismo enzimático não foi suficiente para neutralizar as ERO's que desestabilizaram a fase fotoquímica, culminando numa maior taxa de fluorescência (baixo PI_{TOTAL}) e numa baixa capacidade de fixação do carbono (Barazetti, 2013). Conseqüentemente, as moléculas redutoras (ATP e NADPH), em vez de serem utilizados na fixação do carbono, teriam sido desviados para a maior atividade da PAL sob sombreamento (Kuskoski et al. 2005, Favaretto et al. 2011), incluindo a síntese de compostos fenólicos (Karageorgou et al. 2002) em maior concentração no LV e no MV do pau-brasil. Os compostos fenólicos podem ter sido sintetizados para atuarem sinergicamente aos compostos antioxidantes acumulando nos tecidos foliares na tentativa de aumentar a defesa às condições ambientais adversas (Ducaiova et al., 2016).

A relação do metabolismo secundário na síntese de fenólicos em folhas de plantas submetidas a regimes de luminosidade é bem elucidada na literatura (Anasori e Asghari, 2008; Ramakrishna e Ravishankar, 2011). Miehe-Steier et al. (2015) observaram aumento dos compostos fenólicos – mais precisamente, compostos flavonoides – que aumentaram significativamente com alta luminosidade. Estes últimos resultados estão de acordo com os apresentados neste trabalho, já que o LV e o MV demonstraram superior conteúdo desses compostos ao pleno sol em relação ao SV. Os flavonoides possuem grande potencial de neutralização de ERO's, uma vez que esses pigmentos possuem estrutura química com alta capacidade redutora e, além disso, são formados no interior – ou na proximidade – de centros de geração de ERO'S em plantas em condição de estresse (Agati et al., 2012).

Estes mesmos autores, Agati et al. (2012), afirmam que os flavonoides se comportam como co-substratos para as peroxidases, auxiliando na redução de H_2O_2 , após o esgotamento da atividade das citadas enzimas (Fini et al., 2012; Pollastri e Tattini, 2011; Close e Mcarthur,

2002). Logo, o superior potencial antioxidativo do LV e do MV a pleno sol, em relação ao SV, seria atribuído, também, ao superior conteúdo de flavonoides em suas folhas, fato que contribuiu para a redução dos danos celulares e dos compostos enzimáticos e, conseqüentemente, atuando na regulação do crescimento dos morfotipos grande e médio ao pleno sol.

No presente artigo não se encontraram diferenças entre os morfotipos a pleno sol, em relação à acumulação de importantes flavonoides na relação com a irradiância: as antocianinas. Nesse sentido, os três morfotipos responderam ao aumento da irradiância com elevados teores de antocianinas. Entretanto, o LV no sombreamento apresentou valores iguais para estes compostos nas duas condições de irradiância, fato que demonstra um padrão incomum em relação à literatura. Chan et al. (2010) investigaram o efeito da irradiância em *Melastoma malabathricum* e observaram que a alta irradiância induziu a produção de antocianinas. Estes autores afirmam que as antocianinas possuem características de fotoproteção e configuram excelente pigmento para absorção do excesso de ultravioleta, geralmente aumentado na condição de extrema luminosidade como o pleno sol.

Vale ressaltar que, na condição de sombreamento, para os três morfotipos, destacou-se a presença de substâncias cumáricas (ou cumarinas). Diversos trabalhos ressaltam a síntese dos referidos compostos do metabolismo secundário, relacionando-os com fatores abióticos e bióticos, comprovando-se o seu envolvimento na defesa das plantas a inúmeras condições adversas: metais pesados (Eliasova et al., 2004), estresses bióticos (Repcak e Suvak 2013), nutrição mineral (Repcak et al., 2014), reguladores de crescimento (Kovacik et al., 2010; Repcak e Suvak, 2013) e luminosidade (Castro et al., 2006).

Ducaiova et al. (2016) relataram aumento da atividade da PAL em plantas sob estresse oxidativo, bem como evidenciaram o potencial antioxidante das cumarinas no controle dos radicais livres e, conseqüentemente, na redução dos danos celulares. Neste trabalho, não se apresentou a quantificação das cumarinas por grama de amostra, mas apenas dados

qualitativos que indicaram presença dessas substâncias nos três morfotipos em sombreamento. No entanto, é possível inferir uma maior predominância desses compostos fenólicos ao se analisar o valor da atividade da PAL, o qual se mostrou superior para o LV e o MV no sombreamento em relação ao SV, somados às concentrações de fenólicos totais, que também foram maiores para o LV e o MV.

Diante dos resultados supracitados, pode-se deduzir que a participação do metabolismo secundário no processo antioxidativo do LV e do MV, no sombreamento, é mais evidente; já que esses mesmos morfotipos apresentaram maiores concentrações de ERO'S, bem como maior potencial antioxidativo enzimático e não enzimático. Como já se mencionou, esse potencial antioxidativo do LV e o MV não foi suficiente para reduzir os radicais livres, e tampouco para minimizar o déficit no crescimento.

Um estudo demonstrou que as cumarinas são substâncias capazes de amenizar o estresse oxidativo, atuando como antioxidantes fenólicos e, também, substratos competidores na oxidação das auxinas pelas peroxidases (Tartoura et al., 2004). Essa relação química na proteção desses fitohormônios foi devidamente relatada por Fini et al. (2012) ao analisar flavonoides, e Tartoura et al. (2004) na análise de cumarinas. Portanto, a presença das cumarinas nas folhas dos três morfotipos estaria ligada a este comportamento na regulação das concentrações de auxinas, fato este que se demonstrou positivo apenas ao SV no sombreamento, que apresentou superiores concentrações destes hormônios e, conseqüentemente, maior crescimento nesta condição de baixa irradiância.

5. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados demonstram que os hábitos desses três morfotipos de *P. echinata*, no regime de irradiância contrastante, são divergentes. O metabolismo secundário, o processo antioxidativo e os parâmetros de crescimento apontam os morfotipos grande e médio como variações morfológicas com tendências para plantas heliófilas. Contudo, o morfotipo pequeno apresentou uma tendência para planta umbrófila.

Tanto os mecanismos antioxidantes – enzimáticos e não enzimáticos – do LV e do MV mostraram-se bastante eficientes a pleno sol. Da mesma forma, as fases fotoquímicas e de carboxilação funcionaram de maneira eficiente sem sinais de fotodanos, refletindo expressivo crescimento em alta irradiância. Por outro lado, esse maior potencial antioxidativo do LV e MV não foi suficiente para impedir os danos oxidativos no sombreamento indicados pelo baixo teor de auxinas, superiores valores de ERO'S e menor desempenho fotossintético, e consequentemente, uma menor taxa de crescimento.

Conclui-se, ainda, que as contradições quanto ao hábito ecológico de *P. echinata* parecem estar relacionadas às diferenças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas apresentadas no presente trabalho. Além disso, mais estudos moleculares precisam ser realizados em conjunto com os aqui apresentados, para se buscar, afinal, uma nova estruturação ecológica de *P. echinata* em seus possíveis táxons subespecíficos. Os referidos estudos, portanto, são imprescindíveis, juntamente com as análises ora apuradas, para uma melhor conservação e um melhor manejo desta importante espécie em programas de recuperação da Floresta Atlântica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agatia G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science* 196:67–76
- Alexieva V, Sergiev I, MApelli S, Karanov, E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environment* 24:1337–1344
- Almeida LP, Alvarenga AA, Castro EM, Zanela SM, Vieira CV (2004) Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoriana* Mez. submetida a níveis de radiação solar. *Ciência Rural* 34(1):83-88

- Anasori P, Asghari G (2008) Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. *Research in Pharmaceutical Sciences* 3:59-63
- Barazetti VM (2013) Respostas fisiológicas de plantas jovens variantes de pau-brasil a diferentes níveis de irradiância. Dissertação, Universidade Estadual de Santa Cruz
- Baroni AM (2005) Caracterização do sistema fotossintético em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação, Instituto de Botânica de São Paulo
- Beggs CJ, Wellmann E (1994) Photocontrol of flavonoid biosynthesis, in: Kendrick RE, Kronenberg GHM. (Eds.), *Photomorphogenesis in Plants*, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 733–751
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-259
- Budowski A (1965) Distribution of tropical rain forest species in the light of successional progress. *Turrialba* 15:40-42
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52: 302–310
- Cahill DM, McComb JA (1992) A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40:315–332
- Cakmak I, Strboe D, Marschner H (1993) Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany* 44:127-132

- Campos MAA, Uchida T (2002) Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37(3):281-288
- Cañal MJ, Tamés RS, Fernández B (1988) Peroxidase and polyphenoloxidase activities in *Cyperus esculentus* leaves following glyphosate applications. *Plant Physiology* 74:125-130
- Castro EM, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Malta MR, Cardoso MG, Silva FAM (2006) Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (Guaco) under different radiation levels and photoperiod. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25(3):387-92
- Chan LK, Koay SS, Boey PL, Bhatt A (2010) Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*. *Biological Research* 43:127-35
- Close DC, McArthur C (2002) Rethinking The role of many plant phenolics protection from photodamage, not herbivores? *Oikos* 99:166–172
- Cookson SJ, Granier C (2006) A dynamic analysis of the shade-induced plasticity in *Arabidopsis thaliana* rosette leaf development reveals new components of the shade-adaptative response. *Annals of Botany* 97: 443–452
- Costa GF, Marengo RA (2007) Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). *Acta Amazonica* 37: 229-234
- Dias DP, Marengo R (2007) Fotossíntese e fotoinibição em mogno e acariquara em função da luminosidade e temperatura foliar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(3):305–311
- Domingos M, Braga MR (2008) Pau-Brasil da semente à madeira. São Paulo: aInstituto de Botânica de São Paulo 102-113

- Ducaiova Z, Sajko M, Mihalicova S, Repcak M (2016) Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. *Plant Growth Regulation* 79:81–94
- Duz SR, Siminski A, Santos M, Paulilo MTS (2004) Crescimento inicial de três espécies de arbóreas da floresta atlântica em resposta a variação na quantidade de luz. *Revista Brasileira de Botânica* 27(3):587-596
- Eliasova A, Repcak M, Pastirova A (2004) Quantitative changes of secondary metabolites of *Matricaria chamomilla* by abiotic stress. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences* 59:543–548
- Favaretto VF, Martineza CA, Soriana HH, Furriel RPM (2011) Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environmental and Experimental Botany* 70:20–28
- Fini A, Guidi L, Ferrini F, Brunetti C, Di Ferdinando M, Biricolti S, Pollastri S, Calamai L, Tattini M (2012) Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in *Fraxinus ornus* leaves: an excess light stress affair? *Journal of Plant Physiology* 169:929–939
- Flint SD, Jordan PW, Caldwell MM (1985) Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field condition. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41:95–106
- Gama VN (2013) Análises morfofisiológicas de plantas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) cultivadas em ambientes lumínicos distintos. Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo
- Gong WZ, Qi PF, Du JB, Sun X, Wu XL, Song C, Liu WG, Wu YS, Yu XB, Yong TW, Wang XC, Yang F, Yan YH, Yang WY (2014) Transcriptome analysis of shade-induced inhibition on leaf size in relay intercropped soybean. *Plos One* 9(6): e98465

- Guo JM, Xin YY, Yin XB (2010) Selective Differentiation of Indoleacetic Acid and Indolebutyric Acid Using Colorimetric Recognition after Ehrlich Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:6556–6561
- Guo YP, Song LL, Xu K, Zhang LC (2004) Changes of energy distribution in reaction centers of *Citrus unshiu* leaf photosystem under different light intensities. *Chinese Journal of Applied Ecology* 15:2087-2090
- Havir E, Mchale NA (1989) A regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO₂. *Plant Physiology* 89(3):952-957
- Hunt R (1982) *Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis*. Edward Arnold Publishers, London, UK
- Juchum FS, Costa MA, Amorim AM, Corrêa RX (2008) Phylogenetic relationships among morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (Caesalpinioideae: Leguminosae) evidenced by trnL intron sequences. *Naturwissenschaften*. 95:1085–1091
- Karageorgou P, Levizou E, Manetas Y (2002) The influence of drought, shade and availability of mineral nutrients on exudate phenolics of *Dittrichia viscosa*. *Flora* 197:285–289
- Kitajima K (1996) Ecophysiology of tropical tree seedlings. In: Mulkey SS, Chazdon RL, Smith AP (eds) *Tropical forest plant ecophysiology*. Chapman e Hall, New York, 559-595
- Kovacik J, Klejdus B, Hedbavny J, Zon J (2010) Copper uptake is differentially modulated by phenylalanine ammonia-lyase inhibition in diploid and tetraploid chamomile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:10270–10276

- Kozuka T, Horiguchi G, Kim G-T, Ohgishi M, Sakai T (2005) The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. *Plant and Cell Physiology* 46: 213–223
- Kurepin LV, Emery RJN, Pharis RP, Reid DM (2007) Uncoupling light quality from light irradiance effects in *Helianthus annuus* shoots: putative roles for plant hormones in leaf and internode growth. *Journal of Experimental Botany* 58:2145–2157
- Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini Filho J, Fett R (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25(4):726-732
- Lako J, Trenerry VC, Wahlqvist M, Wattanapenpaiboon N, Sotheeswaran S, Premier R (2007) Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry* 101:1727–1741
- Law RD, Crafts-Brandner SJ (1999) Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology* 120: 173–182
- Lichtenthaler HK and Buschmann C (2001) 'Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy', in 'Current protocols in food analytical chemistry' pp. F4.3.1-F4.3.8. Wiley, New York.
- Lima MAO, Mielke MS, Lavinsky AO, França S, Almeida AF, Gomes FP (2010) Crescimento e plasticidade fenotípica de três espécies arbóreas com uso potencial em sistemas agroflorestais. *Scientia Forestalis* 38(87):527-534
- Lima HC (1992) Aspectos botânicos do pau-brasil. In: Cunha MW, Lima HC (Eds.). *Viagem à terra do pau-brasil*. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura 23-38

- Lima HC, Lewis GP, Bueno E (2002) Pau-Brasil. In: Bueno et al. (ed) Pau-brasil: uma biografia. Axis Mundi, São Paulo 39–76
- Liu S, Yang R, Ren B, Wang M and Ma M (2016) Differences in photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and antioxidant system between invasive *Alnus formosana* and its native congener in response to different irradiance levels. *Botany* 94: 1087–1101
- Lobo FA, Barros MP, Dalmagro HJ, Dalmolin ÂC, Pereira WE, Souza EC, Vourlitis GL and Rodríguez Ortíz CE (2013) Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel - a critical look at the models. *Photosynthetica* 51(3):445-456
- Lorenzi H (2002) Árvores brasileiras. 4 ed, v. 1. Nova Odessa: Plantarum
- Lu D, Wang T, Persson S, Mueller-Roeber B, Schippers JHM (2014) Transcriptional control of ROS homeostasis by KUODA1 regulates cell expansion during leaf development. *Nature Communications* 5:3767
- Magalhães NS, Marenco, RA, Mendes, KR (2009) Aclimação de mudas de acariquara à alta irradiância. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44(7):687–694
- Marchese JA, Mattana RS, Ming LC, Broetto F, Vendramini PF, Moraes RM (2008) Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] plants. *Photosynthetica* 46(4): 501-505
- Mengarda LHG, Milanez CRD, Silva DM, Aguilar MAG, Cuzzuol GRF (2012) Morphological and physiological adjustments of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.) to direct solar radiation. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24(3):161-172
- Mengarda LHG, Souza RLF, Campostrini E, Reis FO, Vendrame WA, Cuzzuol RRF (2009) Light as an indicator of ecological succession in brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 21:55-64

- Miehe-Steier A, Roscher C, Reichelt M, Gershenzon J, Unsicker SB (2015) Light and nutrient dependent responses in secondary metabolites of *Plantago lanceolata* offspring are due to phenotypic plasticity in experimental grasslands. *Plos One* 10(9): e0136073
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiology* 22:867-880
- Niinemets U (2010) A review of light interception in plant stands from leaf to canopy in different plant functional types and in species with varying shade tolerance. *Ecological Research* 25:693–714
- Parida AK, Das A, Mohanty BP (2004) Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *Journal of Plant Physiology* 161:531-542
- Pierce R (2002) The big issue. *The Strad* 8:840-843
- Pollastri S, Tattini M (2011) Flavonols: old compound for old roles. *Annals of Botany* 108:1225–1233
- Ramakrishna A, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11):1720-1731
- Repcak M, Palove-Balang P, Ducaiova Z, Sajko M, Bendek F (2014) High nitrogen supply affects the metabolism of *Matricaria chamomilla* leaves. *Plant Growth Regulation* 73:147–153
- Repcak M, Suvak M (2013) Methyl jasmonate and *Echinothrips americanus* regulate coumarin accumulation in leaves of *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Systematics and Ecology* 47:38–41
- Rocha YT, Simabukuro EA (2008) Estratégias de conservação in situ e ex situ do pau-brasil. In: Figueiredo-Ribeiro RCL, Barbedo CJ, Alves ES, Domingos M, Braga MR (2008)

Pau-Brasil da semente à madeira. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo 102-113.

Rossato DR, Kolb RM (2010) *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. *Acta Botanica Brasilica* 24(3): 605-612

Scalon SPQ, Mussury RM, Rigoni MR, Veraldo F (2002) Crescimento inicial de mudas de espécies florestais nativas sob diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore* 26(1):1-5

Siegert CM, Levia DF (2011) Stomatal conductance and transpiration of co-occurring seedlings with varying shade tolerance. *Trees* 25:1091–1102

Silvestrini M, Válio IFM, Mattos EA (2007) Photosynthesis and carbon gain under contrasting light levels in seedlings of a pioneer and a climax tree from a Brazilian Semideciduous Tropical Forest. *Revista Brasileira de Botânica* 30(3):463-474

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158

Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004) Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science* 166:293–302

Strasser A, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2004) Analysis of the fluorescence transient In: Papageorgiou, G. C.; Govindjee (eds.), *Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer: Dordrecht* 321-362

- Tartoura K, Rocha A, Youssef S (2004) Synergistic interaction between coumarin 1,2-benzopyrone and indole-3-butyric acid in stimulating adventitious root formation in *Vigna radiata* (L.) Wilczek cuttings: I. Endogenous free and conjugated IAA and basic isoperoxidases Plant Growth Regulation 42:253–262
- Terashima IYT, Hanba Y, Tazoe P, Yano S (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. Journal of Experimental Botany 57:343-354
- Thach LB, Shapcott A, Schmidt S, Critchley C (2007) The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. Photosynthesis Research 94:423-436

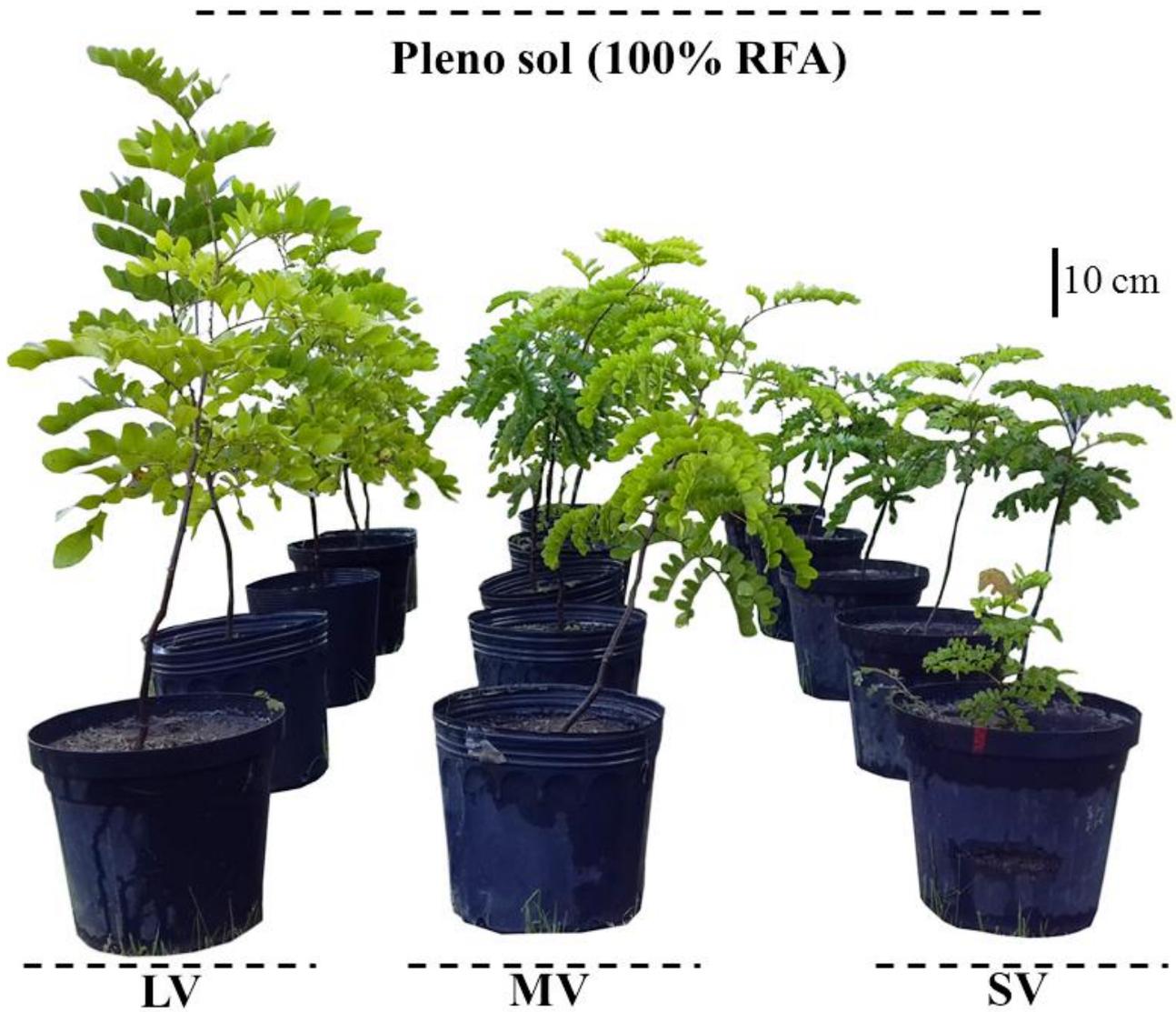


Figura 1 - Aspecto visual de crescimento com destaque para a altura de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol (100% RFA = $\pm 1.800-2.000 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$). Barra vertical = 10 cm.

Tabela 1 - Parâmetros de crescimento de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento: altura, diâmetro do caule (DC), massa foliar específica (MFE), razão da massa radicular e parte aérea (R:PA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), área foliar total (AFT), número de folhas (NF), número de folíolos (NFF), teor de água foliar (TAF), taxa de crescimento relativo (TCR) e taxa assimilatória líquida (TAL). *Small variant* (SV) = morfotipo pequeno, *Medium variant* (MV) = morfotipo médio e *Large variant* (LV) = morfotipo grande.⁽¹⁾

Morfofotipo	<i>Small Variant</i>		<i>Medium Variant</i>		<i>Large Variant</i>		Valores de <i>p</i>		
	Pleno sol	Sombra	Pleno sol	Sombra	Pleno sol	Sombra	Morfotipo	Irradiância	Morfotipo x Irradiância
Altura (cm)	43,7 ±3,2 Ac	50,8 ±4,7 Aa	65,7 ±2,6 Ab	39,4 ±1,5 Bb	84 ±4,7 Aa	36,76 ±4 Bb	0,0055	<0,0001	<0,0001*
DC (mm)	10,4 ±0,37 Ab	8,8 ±0,35 Ba	12,7 ±0,23 Aa	7,7 ±0,53 Ba	12,5 ±0,52 Aa	6,3 ±0,32 Bb	0,1136	<0,0001	<0,0001*
MFE (g cm ⁻²)	0,015 ±0,0 Aa	0,007 ±0,0 Bb	0,019 ±0,0 Aa	0,007 ±0,0 Bb	0,018 ±0,0 Aa	0,007 ±0,0 Bb	0,255	<0,0001	<0,0001*
R:PA (g g ⁻¹)	0,70 ±0,16 ^{ns}	0,33 ±0,04	0,80 ±0,11	0,26 ±0,02	0,59 ±0,16	0,17 ±0,01	0,2927	<0,0001*	0,7083
MSPA (g)	19,0 ±1,8 Ac	18,8 ±0,7 Aa	39,7 ±1,8 Ab	7,6 ±0,7 Bb	58,5 ±4 Aa	8,8 ±0,9 Bb	<0,0001	<0,0001	<0,0001*
MST (g)	31,8 ±2,46 Ac	22,1 ±2,08 Ac	72,1 ±7,25 Ab	14,5 ±3,14 Bc	91,9 ±8,45 Aa	12,7 ±3 Bc	0,0002	<0,0001	<0,0001*
AFT (cm ²)	826 ±197 Bb	1485 ±139 Aa	1130 ±67 Ab	1114 ±294 Ab	1956 ±211 Aa	1126 ±291 Bb	0,1183	0,726	0,0077*
NF	13 ±2 ^{ns}	9 ±2	13 ±2	8 ±2	15 ±2	8 ±1	0,4855	0,0912	0,4731
NFF	73 ±9 ^{ns}	71 ±13	86 ±7	46 ±12	73 ±7	35 ±8	0,1803	0,0024*	0,1065
TAF (g g ⁻¹)	0,52 ±0,0 Ab	1,03 ±0,0 Ab	0,39 ±0,0 Bb	1,21 ±0,0 Aa	0,51 ±0,0 Bb	1,32 ±0,0 Aa	<0,0001	<0,0001	<0,0001*
TCR (mg g ⁻¹ dia ⁻¹)	3,44 ±0,08 Ab	3,07 ±0,1 Ab	4,25 ±0,1 Aa	2,57 ±0,2 Bc	4,50 ±0,1 Aa	2,44 ±0,2 Bc	0,3099	<0,0001	<0,0001*
TAL (mg cm ⁻² dia ⁻¹)	0,009 ±0 Bb	0,051 ±0 Aa	0,056 ±0 Aa	0,015 ±0 Bb	0,056 ±0 Aa	0,013 ±0 Bb	0,0897	<0,0001	<0,0001*

⁽¹⁾Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfofotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Os valores são médias e as barras ± erro padrão (n=5).

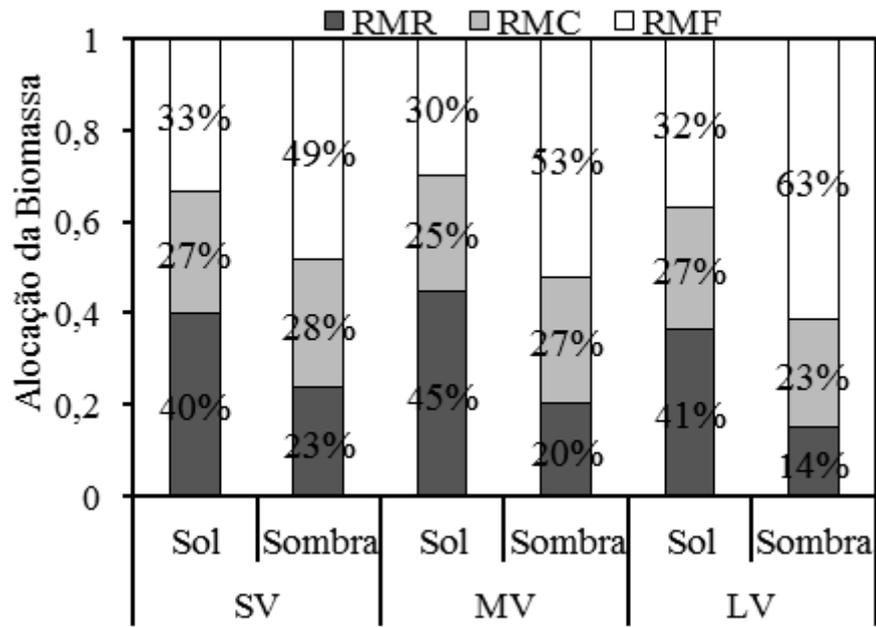


Figura 2 - Percentual alocado de biomassa em plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. Morfotipo pequeno= SV – *small variant*, médio= MV – *medium variant* e grande LV – *large variant*; RMF= razão de massa foliar; RMC= razão de massa caulinar; RMR= razão massa radicular. Valores médios de cinco repetições.

Tabela 2 - Assimilação de CO₂ (*A*), capacidade fotossintética máxima (*A*_{max}), taxa de respiração no escuro (*R*_d), transpiração (*E*), carbono interno (*C*_i), condutância estomática (*g*_s), eficiência do uso da água (*A/E*), eficiência instantânea de carboxilação (*A/C*_i), eficiência intrínseca do uso de água (*A/g*_s), índice de desempenho fotoquímico (*PI*_{TOTAL}) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (*F*_V/*F*_M) de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. *Small variant* (SV) = morfotipo pequeno, *Medium variant* (MV) = morfotipo médio e *Large variant* (LV) = morfotipo grande.⁽¹⁾

Morfotipo	<i>Small Variant</i>		<i>Medium Variant</i>		<i>Large Variant</i>		Valores de <i>p</i>		
	Pleno sol	Sombra	Pleno sol	Sombra	Pleno sol	Sombra	Morfotipo	Irradiância	Morfotipo x Irradiância
<i>A</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	1,8 ±0,1 Bb	2,5 ±0,1 Aa	3,8 ±0,5 Aa	1,5 ±0,2 Bb	4,3 ±0,3 Aa	1,3 ±0,2 Bb	0,06	<0,0001	<0,0001*
<i>A</i> _{max} (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	3,8 ±1,2 ^{ns}	5,8 ±1,5	5,9 ±1,3	3,9 ±1,6	6,7 ±1,2	3,3 ±1,6	0,8933	0,5893	0,7821
<i>R</i> _d (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	1,1 ±0,5 ^{ns}	0,4 ±0,2	0,8 ±0,5	0,6 ±0,3	0,8 ±0,4	0,7 ±0,3	0,3284	0,5768	0,3822
<i>E</i> (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,9 ±0,1 Ac	0,45 ±0,0 Bb	1,22 ±0,2 Ab	0,75 ±0,2 Ba	1,43 ±0,1 Aa	0,76 ±0,1 Bc	0,0004	0,039	<0,0001*
<i>C</i> _i (μmol CO ₂ mol Ar ⁻¹)	180 ±12 Bb	227 ±8 Aa	271 ±13 Aa	250 ±13 Ba	269 ±11 Aa	216 ±19 Bb	0,002	0,047	<0,0001*
<i>g</i> _s (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,05 ±0,0 Ab	0,01 ±0,0 Bb	0,06 ±0,0 Aa	0,03 ±0,0 Ba	0,07 ±0,0 Aa	0,04 ±0,0 Ba	0,0001	0,0001	<0,0001*
<i>A/E</i> (μmol CO ₂ mmol H ₂ O ⁻¹)	2,0 ±0,2 Bb	5,5 ±0,7 Aa	3,1 ±0,5 Aa	2,0 ±0,2 Bb	3,0 ±0,4 Aa	1,7 ±0,4 Bb	0,0032	0,2445	<0,0001*
<i>A/C</i> _i (mol ar m ⁻² s ⁻¹)	0,01 ±0,0 Ab	0,01 ±0,0 Aa	0,014 ±0,0 Aa	0,006 ±0,0 Bb	0,016 ±0,0 Aa	0,006 ±0,0 Bb	0,78	<0,0001	0,0004*
<i>A/g</i> _s (μmol CO ₂ mol H ₂ O ⁻¹)	37,2 ±4,2 Bb	167,5 ±12,8 Aa	62,8 ±16,9 Aa	49,9 ±5,0 Ab	59,4 ±8,9 Aa	34,5 ±7,1 Bc	<0,0001	<0,0001	<0,0001*
<i>PI</i> _{TOTAL}	0,6 ±0,2 Bb	3,5 ±0,1 Aa	0,6 ±0,7 Bb	1,1 ±0,1 Ab	1,4 ±0,1 Aa	0,4 ±0,0 Bc	<0,0001	<0,0001	<0,0001*
<i>F</i> _V / <i>F</i> _M	0,57 ±0,0 Bc	0,82 ±0,0 Aa	0,72 ±0,0 Ba	0,78 ±0,0 Aa	0,67 ±0,0 Ab	0,68 ±0,0 Ab	0,0033	<0,0001	<0,0001*

⁽¹⁾ Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (*p*<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Os valores são médias e as barras ± erro padrão (n=5).

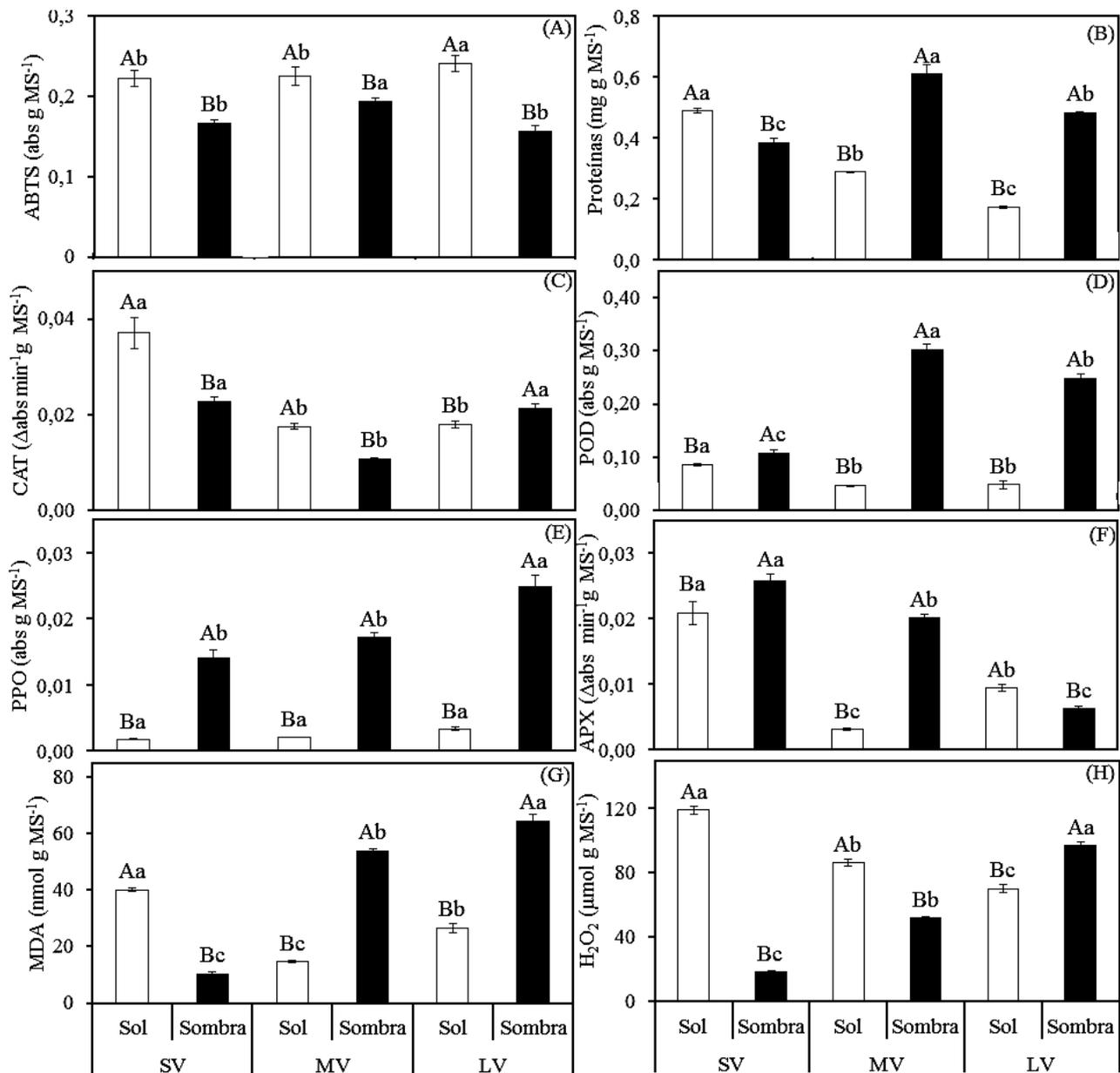


Figura 3 - Capacidade antioxidante (ABTS) (A); proteínas totais (B); atividade das enzimas catalase (CAT) (C), peroxidase do guaiacol (POD) (D), polifenoloxidase (PPO) (E) peroxidase do ascorbato (APX) (F); teores de malonaldeído (MDA) (G) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (H) de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. Morfotipo pequeno = SV – *small variant*, médio = MV – *medium variant* e grande = LV – *large variant*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão ($n=5$). Valores de $p \leq 0,0001$ para todas as médias apresentadas, indicando interação estatística entre os fatores Morfotipo X Irradiância pela análise de variância.

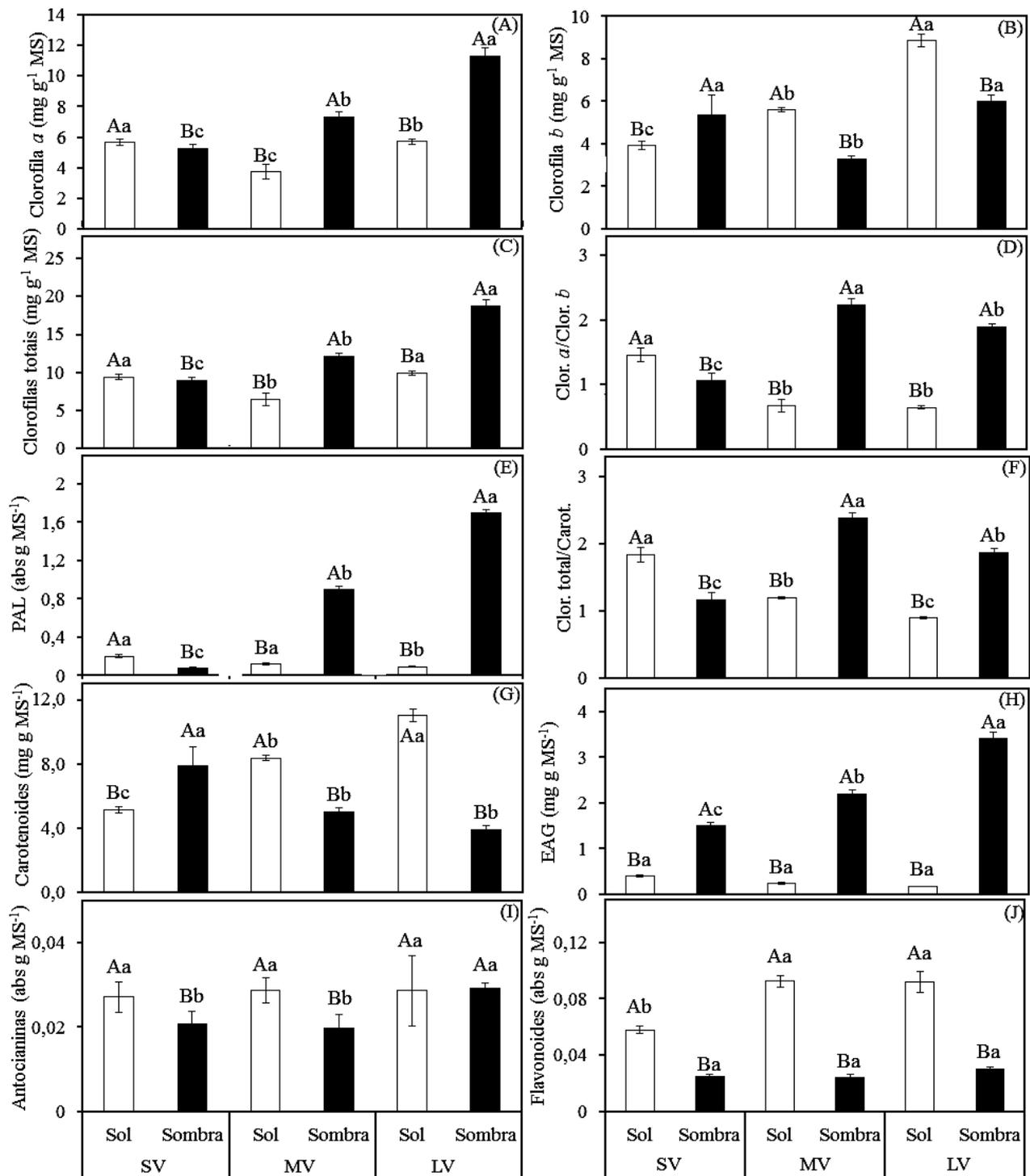


Figura 4 - Concentrações de clorofila *a* (A), *b* (B) e totais (C), bem como suas razões *a:b* (D) e totais:carotenoides (F); atividade da fenilalanina amônio liase (PAL) (E); conteúdo de carotenoides (G); compostos fenólicos totais expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) (H), antocianinas (I) e flavonoides (J) de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. Morfotipo pequeno = SV – *small variant*, médio = MV – *medium variant* e grande = LV – *large variant*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5). Valor de $p \leq 0,0005$ para todas as médias apresentadas, indicando interação estatística entre os fatores Morfotipo X Irradiância pela análise de variância.

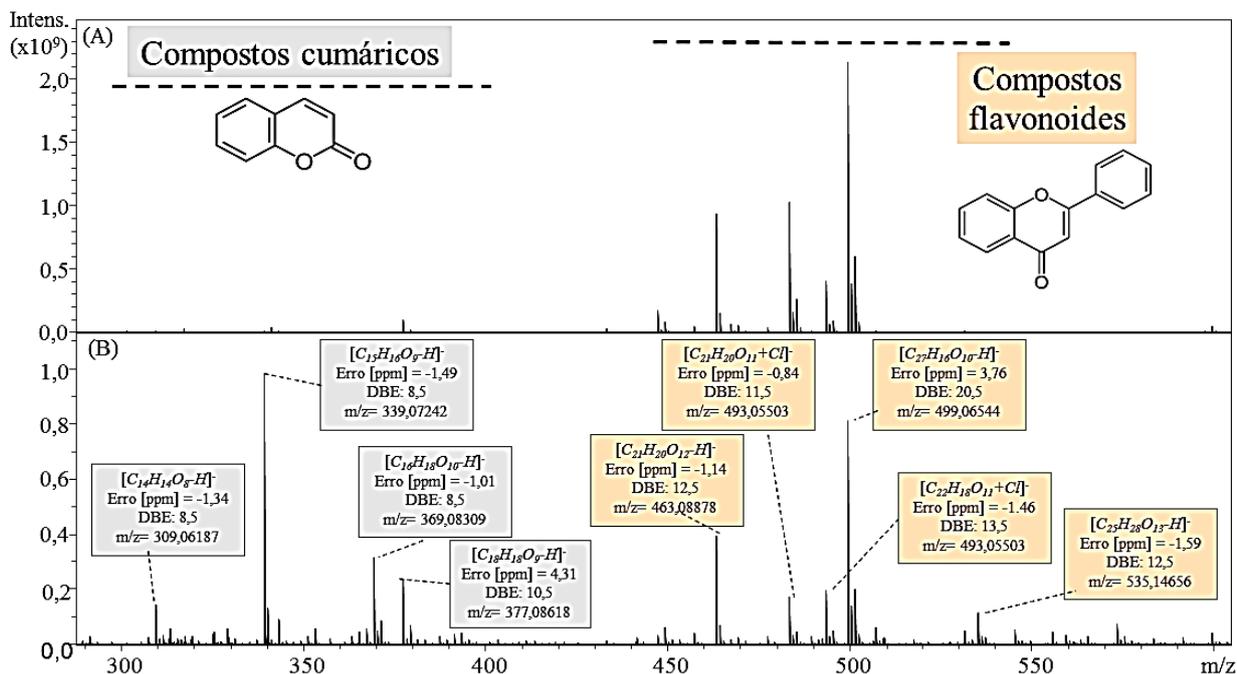


Figura 5 - Perfil químico de plantas jovens de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento.

O espectrograma superior (A) representa os compostos encontrados nas folhas dos três morfotipos (morfotipo pequeno = SV – *small variant*, médio = MV – *medium variant* e grande = LV – *large variant*) no pleno sol. O espectrograma inferior (B) representa os compostos encontrados nas folhas dos três morfotipos no sombreamento. Caixas de coloração cinza indicam compostos cumáricos e caixas de coloração vermelha indicam compostos flavonoides. Apesar de serem analisados separadamente, os espectrogramas estão apresentados em dois devido os três morfotipos, em mesma condição de irradiância, exibirem mesmo perfil para todos os compostos químicos analisados.

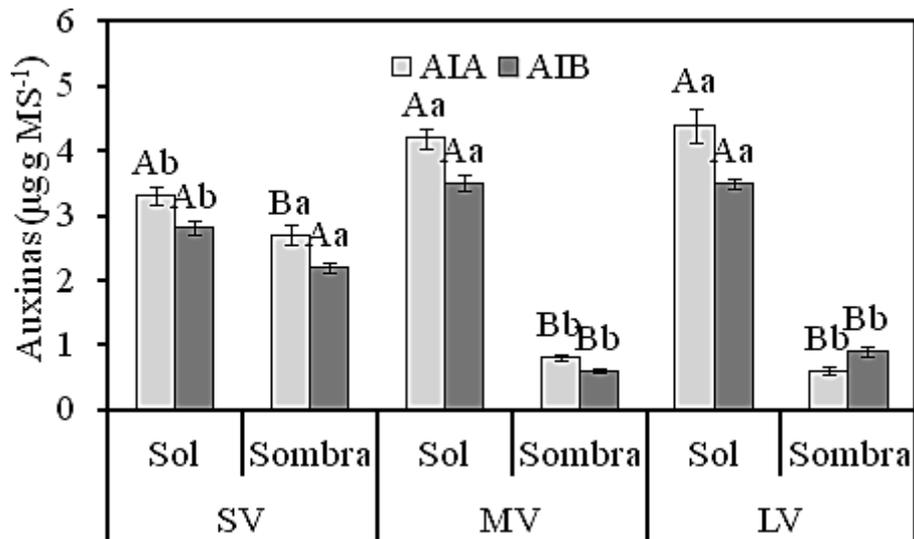


Figura 6 - Conteúdo de ácido indol acético (AIA) e ácido indol butírico (AIB) de plantas jovens de três variantes morfológicas de *Paubrasilia echinata* em pleno sol e sombreamento. (morfotipo pequeno = SV – *small variant*, médio = MV – *medium variant* e grande = LV – *large variant*). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5). Valores de $p \leq 0,0001$ para todas as médias apresentadas, indicando interação estatística entre os fatores Morfotipo X Irradiância pela análise de variância.

CAPÍTULO 2 - Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de dois morfotipos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidos à radiação ultravioleta-B

Vinícius Novo Gama, Leonardo Valandro Zanetti, Tatiane Aparecida Zorzal, Fabiano Caprini Volponi, Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol¹

⁽¹⁾Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil. E-mail: viniciusnovogama@gmail.com

RESUMO

Inúmeros trabalhos confirmam os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta-B (UV-B) sobre o crescimento e os processos fisiológicos e bioquímicos fundamentais de várias espécies de plantas. Entretanto, novos estudos têm demonstrado que algumas espécies apresentam sensibilidade variável à radiação UV-B, resultando em alguns casos em incremento de desenvolvimento. Sabe-se que existe divergência funcional entre os morfotipos do pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.) sob alta irradiância e que esse fato relacionar-se-ia a diferentes limitações adaptativas desses morfotipos à incidência de UV-B. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da radiação UV-B na morfologia, fisiologia e bioquímica de dois variantes morfológicos do pau-brasil: um heliófilo, morfotipo médio (MV), e um umbrófilo, morfotipo pequeno (SV). Para tanto, avaliaram-se o crescimento, fotossíntese, teores de compostos de absorção do UV, carboidratos estruturais e não estruturais, bem como teores de peróxido de hidrogênio e malonaldeído (MDA). O efeito da radiação UV-B mostrou-se positivo no MV, uma vez que melhorou sua eficiência fotoquímica e otimizou suas trocas gasosas e crescimento. A incidência de UV-B causou efeitos aclimatativos em MV que se apresentou com alto grau de tolerância a essa radiação. Este fato pôde ser explicado pelo comportamento heliófilo desse morfotipo com tolerância a ambientes com prevalência de alta irradiância ricos em UV. Por outro lado, a incidência da radiação estimulou efeitos fotoinibitórios no SV, que apresentou menor crescimento, menor taxa fotossintética e alta respiração. Este fato foi associado com maiores teores de peróxido de hidrogênio, estimulando danos oxidativos (MDA) traduzidos visivelmente em áreas cloróticas foliares que evoluíram para necrose e abscisão foliar.

Palavras-chave: Carboidratos solúveis e estruturais, estresse oxidativo, fotoinibição, pau-brasil

1. INTRODUÇÃO

A redução da camada de ozônio pode aumentar a incidência de radiação solar ultravioleta-B (UV-B) na superfície da Terra (Madronich et al. 1998). A UV-B é capaz de desencadear severos efeitos fisiológicos, bioquímicos e moleculares nos vegetais, incluindo a inibição da assimilação do CO₂ (Tripathi et al., 2016) e redução da altura da planta, área foliar e biomassa seca (Zancan et al., 2008). Além disso, a oxidação de proteínas, desestabilização de membranas e alteração nos mecanismos antioxidantes foram relatados por Singh et al. (2014) em *Vigna radiata* e em *Triticum aestivum* por Tripathi et al. (2016). Porém, algumas espécies, como *Simarouba glauca*, espécie nativa da América (Sarika e Gaikwad, 2016), e *Gossypium hirsutum* (Kakani et al., 2003), não foram afetadas pela UV-B devido a modificações morfoanatômicas e bioquímicas, como o aumento de espessura cuticular e teores de compostos fenólicos. Vale acrescentar ainda que algumas plantas como *Glycine max* (Yuan et al., 2002) e *Cucumis sativus* (Rybus-Zajac et al. 2014) apresentaram melhor desenvolvimento com a suplementação de UV-B em relação ao controle.

Na literatura, os resultados sobre os efeitos da UV-B nas plantas são inconsistentes em razão da alta diversidade, da plasticidade vegetal, bem como das diferentes doses de radiação suplementada (Kakani et al., 2003). Hideg et al. (2013) comentam que a tolerância de algumas plantas à UV-B é atribuída a vias de sinalização de estresse que inclui mecanismos moleculares e ativação de antioxidantes na neutralização de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Entretanto, os mesmos autores afirmam que outros mecanismos bioquímicos desconhecidos estariam envolvidos na tolerância das plantas à radiação UV-B.

Estudos com as espécies florestais *Eucalyptus globulus* e *Populus sp.* (Ren et al., 2007) em exposição a radiação UV-B, apontaram inibição do crescimento em altura, redução da área foliar total. Liu et al. (2005) observaram, ainda, aumento da espessura do limbo nessas mesmas espécies. *Abies faxoniana*, espécie importante para o reflorestamento da China, apresentou declínio da taxa

fotossintética máxima (A_{\max}), dos pigmentos fotossintéticos e na eficiência quântica máxima de FSII (F_v/F_M) quando exposta a $14,33 \text{ kJ m}^{-2}\text{d}^{-1}$ de UV-B (Yao e Liu, 2009). Os mesmos autores observaram aumento de compostos de absorção do UV (flavonoides e antocianinas) nas folhas, bem como aumento nos teores de malonaldeído (MDA) em *Picea asperata* sob radiação UV, indicando dano de membrana por ERO's. Krause et al. (2013), avaliando a tolerância de três espécies umbrófilas nativas do Brasil à UV-B (*Anacardium excelsum*, *Virola surinamensis* e *Calophyllum longifolium*), verificaram forte inibição da fotossíntese por essa radiação. Esses autores afirmam que espécies umbrófilas não possuem tolerância à UV-B em razão da ineficiência na dissipação de energia por complexos fotoprotetores dos fotossistemas.

Uma das mais importantes espécies nativas da Mata Atlântica, o pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.), tem significativo valor histórico para o país, sua madeira tem se destacado na manufatura de arcos para instrumentos de corda (Franco e Yojo, 2008). Apesar dessa importância comercial e cultural, o pau-brasil está ameaçado de extinção e sua reintrodução *ex situ* e conservação estão previstas na legislação brasileira (Lei nº 6.607/1978). Os escassos trabalhos com o pau-brasil, bem como as informações conflitantes quanto seu hábito ecológico (Mengarda et al. 2012; Gama 2013; Baroni 2015) e seus variantes morfológicos (Juchum et al. 2008) dificultam a classificação funcional dessa espécie e, conseqüentemente, o sucesso na sua reintrodução em ambiente natural.

Três tipos de variantes ou morfotipos de pau-brasil são descritos: o morfotipo pequeno (SV), mais comum, apresenta comparativamente os menores foliólulos e o cerne de coloração alaranjado, sendo encontrado em muitas localidades ao longo da costa brasileira. O médio (MV) difere do primeiro, apresentando foliólulos um pouco maiores e cerne com coloração laranja-avermelhada. Desse morfotipo são conhecidos representantes cultivados e de ocorrência natural nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e sul da Bahia (Juchum et al., 2008). O SV tem hábito semi-heliófilo segundo Mengarda et al. (2009). As plantas do SV, ao serem transferidas, da sombra ao pleno sol, apresentaram queimaduras foliares marginais, inibição das trocas gasosas e deficiência no uso da

água em alta irradiância (Mengarda et al. 2009). Decréscimo no teor de pigmentos cloroplásticos e o aumento da fluorescência da clorofila *a* também foram observadas nessas condições. Esses sintomas de fotodanos no SV foram acompanhados pelo aumento do teor dos carboidratos solúveis glicose, frutose, sacarose e rafinose (Mengarda et al. 2012), associados ao metabolismo antioxidativo, inibindo por exemplo, a síntese de ROS (Couéé et al., 2006; Terashima et al. 2006). Já o MV possui característica heliófila, com crescimento superior das plantas a pleno sol em relação ao daquelas crescidas em sombreamento natural (Gama, 2013). O autor atribuiu o maior crescimento e eficiência fotossintética do morfotipo médio a pleno sol à elevada atividade antioxidante de peroxidases (POD) e compostos não enzimáticos como açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) que funcionaram como sequestradores de radicais livres e amenizadores de danos celulares (Terashima et al. 2006).

Considerando que parte da irradiância solar incidente na superfície terrestre é UV-B (2-5%), é possível hipotetizar que essas divergências funcionais dos morfotipos de pau-brasil quanto à irradiância solar, devem-se à tolerância ou não das mencionadas plantas à radiação UV-B incidente. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da radiação UV-B na morfofisiologia e bioquímica desses morfotipos de *Paubrasilia echinata* Lam.: um heliófilo, morfotipo médio (MV) e um umbrófilo, morfotipo pequeno (SV). Os resultados deste trabalho reforçariam a necessidade de se estabelecer uma nova estruturação ecológica de *P. echinata* associada a seus possíveis táxons subespecíficos. As referidas informações são imprescindíveis para o eficiente manejo desta importante espécie em programas de recuperação da floresta Atlântica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de crescimento

No presente estudo foram utilizadas sementes de pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.) de dois morfotipos, pequeno – *small variant* (SV) – e médio – *medium variant* (MV) –, fornecidas pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), coletadas de mesma planta-mãe

(19°23'48" S 40°03'42" O) com intuito de se obterem indivíduos menos heterógenos de cada morfotipo. Germinaram-se as sementes em rolos de papel em água e, após três dias, selecionadas de acordo com o tamanho da radícula. Subsequentemente, as plântulas foram transferidas para tubetes de 290 mL com substrato comercial Forth® e adubadas a cada 15 dias com solução nutritiva de Hogland. Aos 30 dias de idade, plantas com mesmo padrão morfológico foram selecionadas e, conforme o tratamento, dispostas em delineamento experimental. As plantas foram irrigadas diariamente.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado e conduzido em câmara de crescimento (Shellab Modelo LI15, Oregon, EUA), com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionadas com quatro lâmpadas de luz branca de 32W (GE - F32T8/SP41/ECO), temperatura constante de 27 °C e umidade relativa de 60 %.

Após 15 dias de aclimação, iniciou-se a exposição à radiação UV-B com duas lâmpadas especiais (Sankyo Denki - G15T8E, Kanagawa, Japan) com emissão característica na faixa de 280–360 nm (pico em 306 nm, UV-B). As lâmpadas foram dispostas a 15 cm do ápice das plantas e periodicamente ajustadas para manter a mesma irradiância UVB, cuja medição foi realizada com medidor de UV (Spectrum Technologies, Illinois, USA) padronizando $10,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 15 minutos diários, durante 45 dias, emitindo, aproximadamente, $4,2 \text{ kJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ de UV.

2. 2. *Análise de crescimento*

Ao final do experimento, foram medidas a altura das plantas, diâmetro do caule, número de folhas, folíolos e foliólulos, massas fresca e seca da raiz, caule e folhas e área foliar. Para a obtenção de massa seca, o material vegetal foi acondicionado em estufa 60 °C, até a obtenção de massa constante. A área foliar foi realizada em scanner de geração de imagens (Area Meter, LI-COR 3100, Nebraska, EUA).

A partir dos dados obtidos foram calculadas a área foliar específica ($AFE = \text{área foliar total}/\text{massa seca foliar total}$), área foliar unitária ($AFU = \text{área foliar total}/\text{número de foliólulos}$), área foliar total (AFT), razão de área foliar ($RAF = AF/MST$), razão raiz: parte aérea (R: PA), razão de massa foliar ($RMF = MF/MST$), razão de massa caulinar ($RMC = MC/MST$), razão de massa radicular ($RMR = MR/MST$), segundo Hunt (1982), em que, MF = massa foliar, MC = massa caulinar, MR = massa radicular, AF = área foliar e MST = massa seca total.

2. 3. *Teores de polímeros de parede celular*

A determinação de celulose das amostras foi realizada de acordo com Brendel et al. (2000). Foram pesadas 100 mg de amostras pulverizadas em tubos de vidro com tampa rosqueada. Adicionaram-se 2 mL de ácido acético 80% e 200 μL de ácido nítrico 69% concentrado. Os tubos foram fechados, as amostras misturadas com cuidado e acondicionados em placa aquecedora por 1 h, a 100°C. Após esfriarem, as amostras foram transferidas para tubos falcon de 15 mL, previamente pesado. Logo em seguida, adicionaram-se 2,5 mL de etanol 99%.

As amostras, então, foram homogeneizadas em agitador vórtex, centrifugadas a 4.324 $\times g$ por 5 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado cuidadosamente. Em seguida, lavaram-se as amostras sequencialmente da seguinte forma: (1) 5 mL de etanol 99% para remover os produtos degradados na extração; (2) 5 mL de água desionizada para remover os vestígios do ácido nítrico; (3) 5 mL de NaOH 17% que ficou em repouso em temperatura ambiente por 10 min; (4) 5 mL de água desionizada; (5) 2,2 mL de água desionizada e 600 μL de ácido acético. Foram ainda adicionados mais 2,2 mL de água desionizada para retirada de material não celulósico ainda persistente e (6) 5 mL de água desionizada. Entre cada lavagem (1 a 6), as amostras foram centrifugadas a 4.324 $\times g$ por 5 min em temperatura ambiente e os sobrenadantes descartados. Por fim, as amostras foram secas em estufa a 50°C, por 48 h e pesadas para posterior determinação da concentração de celulose.

A metodologia utilizada para a determinação de hemicelulose foi de Shädel et al. (2010), com modificações. Para cada 50 mg de massa seca das amostras pulverizadas, adicionou-se 1,5 mL de

etanol 80% em microtubos de 2 mL, para retirada dos açúcares solúveis. Os tubos devidamente vedados com pregadores específicos para microtubos foram levados ao banho-maria a $\pm 80^{\circ}\text{C}$, por 20 min. Centrifugaram-se as amostras em $18.227 \times g$ por 5 min, a 5°C , e o sobrenadante descartado cuidadosamente. Essa operação foi repetida por mais três vezes para retirada total dos resíduos de açúcares solúveis ainda presentes nas amostras.

O precipitado foi seco em estufa a 50°C , durante 24 h e, então, pesado. Após esse período, as amostras foram centrifugadas em $18.227 \times g$ por 5 min, a 5°C , e o sobrenadante descartado. Em seguida, lavou-se o precipitado em 1,5 mL de água destilada por três vezes, centrifugado e descartado o sobrenadante para retirada total do DMSO presente nas amostras até que o pH atingisse o valor entre 6-7, aferido com fitas de pH. Logo em seguida, transferiu-se o precipitado para estufa a 50°C , por 24 h e, então, realizou-se a pesagem no dia seguinte. Acrescentou-se ao precipitado anterior o quantitativo de 1,5 mL do detergente neutro (tetraborato de sódio decahidratado 18 mmol, ácido etilenodiaminotetracético 66 mmol, sulfato de sódio dodecil 10,4 mmol, fosfato de sódio dibásico 32 mmol e água destilada) para extração de resíduos solúveis em água e pectinas e adicionaram-se 25 μL de solução de sulfito de sódio (10 mg/10 mL) para extração de proteínas.

As amostras foram transferidas para banho-maria a $\pm 100^{\circ}\text{C}$, por 60 min, sob agitação em placa magnética. Depois as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado dessa etapa (celulose, hemicelulose e lignina) separado sequencialmente da seguinte forma: (1) duas vezes com 1,5 mL de água desionizada quente; (2) uma vez com 1,5 mL de acetona 100% e; (3) uma vez com 1,5 mL de água desionizada. O precipitado (fração total de parede celular) foi, então, transferido novamente para estufa a 50°C , durante 24 h e pesado. Em seguida, foi adicionado ao referido precipitado 1,5 mL do detergente ácido (H_2SO_4 1N e brometo de hexadeciltrimetilamônio ácido deoxicólico sal sódico 55 mmol) e homogeneizado.

Após serem transferidas novamente para banho-maria a $\pm 100^{\circ}\text{C}$, por 60 min, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante contendo hemiceluloses foi descartado. O precipitado foi

lavado em 1,5 mL de água desionizada por pelo menos cinco vezes, centrifugado e descartado o sobrenadante para retirada total do detergente ácido presentes nas amostras. Por fim, o precipitado (fração de celulose e lignina) foi seco em estufa a 50°C, durante 24 h e pesado posteriormente. O cálculo para a determinação da concentração das hemicelulose presentes nas amostras foi realizado pela diferença gravimétrica entre a fração total da parede celular e a fração de celulose e lignina.

A determinação de lignina foi feita segundo Dos Santos et al. (2008). Foram pesados 150 mg de amostras pulverizadas em tubos de vidro e homogeneizado em 10 mL de tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM em pH 7. As amostras foram transferidas para tubos falcon de 15 mL e o material foi centrifugado por 10 min a 2.616 ^xg e o sobrenadante descartado. A partir dessa etapa, o precipitado passou por 12 lavagens (3 vezes com Tampão Fosfato 50 mM pH 7,0; 3 vezes com Triton® x – 100 (v/v) pH 7,0; 2 vezes com Tampão NaCl pH 7,0; 2 vezes com água destilada e 2 vezes com acetona 100% com diferentes soluções, seguindo sempre o mesmo procedimento: a solução de 7 mL foi adicionada, o material foi agitado em vórtex por 5 min e o sobrenadante foi descartado.

Após a 12^a lavagem, o precipitado foi seco em estufa a 60°C, por 24 h. Esse material resultante é o que compreende a fração de parede celular livre de proteínas. Do precipitado seco, pesaram-se 50 mg em tubos de 15 mL, adicionou-se 1,2 mL de ácido tioglicólico e 6 mL de HCl 2 M. As amostras foram incubadas a 95°C, por 4 h. Após esse tempo, as mencionadas amostras foram centrifugadas por 15 min e lavadas três vezes com água destilada. Adicionaram-se 7 mL de NaOH 0,5 M, incubando-se a 30°C, por 18 h, sob agitação constante em agitador magnético. Depois, as amostras foram centrifugadas e reservou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 3 mL de NaOH 0,5 M e centrifugado em seguida. Uniu-se o sobrenadante resultante ao anterior, acidificado com 1,8 mL de HCl e deixado a 4°C, por 12 h sem agitar, para precipitação. Após esse período, as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada, centrifugadas novamente em 2.616 ^xg por 10 min em temperatura ambiente e descartado o sobrenadante. O precipitado obtido foi seco a 60°C, por 24 h e ressuspenso em 15 mL NaOH 0,5

M. A leitura da absorvância da lignina foi realizada em 280 nm. Utilizou-se a solução de lignina (SIGMA) para construção da curva padrão nas concentrações de 0; 10; 20; 30; 40; 50; 100; 200; 300; 400 e 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2. 4. *Espectro de absorção da UV, pigmentos cloroplastídicos, fenóis totais, antocianinas e flavonoides*

Os extratos para as determinações dos pigmentos cloroplastídicos, compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides foram realizados a partir de 0,04 g de tecido foliar fresco em homogeneização com etanol 95%. O homogeneizado foi incubado durante 24 h, a 4°C, no escuro. Em seguida, realizou-se a centrifugação do extrato etanólico a 1450g durante 20 min para a separação do sobrenadante, que foi mantido em refrigeração a 4°C, no escuro. Esse sobrenadante final foi lido em modo *scanning* em espectrofotômetro para a obtenção dos espectros de absorção da UV nos comprimentos de 280 a 400 nm.

Determinaram-se os valores de clorofilas e carotenoides totais a partir de 100 μL de extrato etanólico, completados os volumes das alíquotas para 3 mL na cubeta em leitura espectrofotométrica. Os comprimentos de onda foram obtidos segundo as equações de Lichtenthaler e Buschmann (2001): Clorofila *a* = $(13,36.A_{664}) - (5,19.A_{648})$; Clorofila *b* = $(27,43.A_{648}) - (8,12 . A_{664})$; Clorofila_{Total} = Clorofila *a* + Clorofila *b*; Carotenoides = $(1000.A_{470}) - (2,13.\text{clorofila } a) - (97,64.\text{clorofila } b)/209$. Onde: A_{470} = absorvância a 470nm; A_{664} = absorvância a 664nm; A_{648} = absorvância a 648nm. Os resultados foram apresentados em mg por grama de massa seca.

Os compostos fenólicos nos extratos foram determinados utilizando-se o reagente de *Folin-Ciocalteu*, segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Foram adicionados 50 μL de extrato etanólico, 1250 μL de água ultrapura, 200 μL de reagente *Folin-Ciocalteu* em agitação. Depois de 4 min, foi adicionado 1 mL de Na_2CO_3 15 %. Em seguida a mistura permaneceu por 2 h a 25 °C. O conteúdo de fenóis totais foi expresso em absorvância por grama de massa seca utilizada ($A_{760}/\text{g MS}$).

Estimou-se o teor de antocianinas nas folhas de acordo com o método de Beggs e Wellmann (1994), com modificações. A reação no escuro foi realizada durante 24 h, a 4 °C, com 1,5 mL de extrato etanólico em HCl a 1%. As leituras foram realizadas em 535 nm. O conteúdo de antocianina foi lido em absorbância por grama de massa seca utilizada (A_{535}/g MS).

O teor de flavonoides foi estimado pelo método de Flint *et al.* (1985), com modificações. A reação colorimétrica foi constituída de 500 μ L de extrato etanólico, 100 μ L cloreto de alumínio, 100 μ L de acetato de potássio 1M e 4300 μ L de água destilada. O volume final foi homogeneizado em 25 °C por 30 min e a leitura realizada em 428 nm. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso em absorbância por grama de massa seca utilizada (A_{428}/g MS).

2. 5. *Análise da fluorescência da clorofila a*

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se do fluorômetro integrado à câmara de um analisador de gases a infravermelho (Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA). Após serem adaptados ao escuro, por 30 min, tecidos foliares do segundo nó foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de $6000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida (F_M). Procedeu-se, ainda, à estimação da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_V'/F_M'), dos coeficientes de extinção fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ), conforme descrito em DaMatta *et al.* (2002) e em Lima *et al.* (2002).

2. 6. *Trocas gasosas*

As medições de trocas gasosas foram realizadas nas mesmas folhas utilizadas na análise da fluorescência, por meio de um analisador de gás infravermelho (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA) acoplado com fonte de luz vermelha/azul (LI-6400-02B LED). O sistema foi mantido sob irradiância constante de $300 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (definido através da curva de luz), $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}\text{ar}$ e temperatura de 27°C, sendo obtidos os dados de taxa de assimilação líquida de CO_2 (A),

condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i) e transpiração (E). Determinou-se a eficiência instantânea de uso da água por intermédio da razão A/E . A capacidade fotossintética máxima (A_{\max}) e a taxa de respiração no escuro (R_d) foram deduzidas com base nas curvas fotossintéticas de resposta à luz (A/PAR) plotadas em onze passos, de 0 a 1500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 27°C. As curvas foram normalizadas ajustando os dados a uma hipérbole retangular modificada, modelo proposto por Lobo et al. (2013). O modelo foi ajustado aos dados, usando-se a análise de regressão não linear (mínimo de diferença quadrática) a partir da ferramenta Microsoft Solver do Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA).

2. 7. Capacidade antioxidante, teores de H₂O₂ e MDA

Determinou-se a capacidade antioxidante total (Método ABTS), que mensura o potencial antioxidativo não enzimático da amostra, utilizando-se metodologia proposta por Lako et al. (2007). O radical catiônico ABTS^{•+} foi produzido a partir da reação de 7 mM 2,20-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) sal diamônio (ABTS) e 2,45 mM de persulfato de potássio. Em seguida, realizou-se uma diluição com água destilada e o conteúdo transferido para um frasco de vidro âmbar à temperatura ambiente, durante 24 h. As leituras foram feitas com 10 mL de solução de ABTS e 5 μL de amostra etanólica (95%) foliar a 734 nm, utilizando-se um espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis). Para o cálculo da capacidade antioxidante total, utilizou-se a calibração pela curva padrão de equivalentes de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico).

As determinações dos teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de malonaldeído (MDA) foram aferidas por meio do sobrenadante obtido de acordo com Alexieva et al. (2001). Amostras contendo 250 mg de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP, homogeneizados em 5 mL de tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados, a 10.000 g por 10 min, a 4°C. O meio de reação, para a análise de H₂O₂, consistiu-se de 0,5 mL do sobrenadante do extrato, 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), e 2 mL de 1 M de iodeto de

potássio (KI). A reação desenvolveu-se por 1 h, no escuro, e a absorbância medida a 390 nm. A concentração de H₂O₂ foi calculada através de uma curva padrão.

Utilizou-se o teor de malonaldeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, para determinar o nível de dano nas membranas. O método utilizado baseou-se na metodologia de Buege e Aust (1978), a partir da reação com ácido tiobarbitúrico. Alíquotas do mesmo sobrenadante empregado para o cálculo da concentração de H₂O₂ foram adicionadas ao meio de reação (0,5% (m/v) de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA), incubando-se a 95 °C, por 30 min. Em seguida, paralisou-se a reação por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. Calculou-se o teor de MDA a partir do coeficiente de extinção de 155 mM cm⁻¹, usando-se a seguinte fórmula: teor de MDA (ηM) = [(A₅₃₅-A₆₀₀)/1,56].105.

2. 8. *Teores de açúcares solúveis totais e sacarose*

A quantificação de açúcares solúveis totais foliares seguiu o método fenol-sulfúrico conforme Dubois et al. (1956). Para isso, utilizou-se alíquota de 50 µL de extrato etanólico 95% (o mesmo utilizado nas análises de pigmentos e fenóis), acrescentou-se 450 µL de água desionizada, 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico PA. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), a 490 nm.

Para a dosagem do teor de sacarose foliar e caulinar foi utilizado o método de antrona, porém, degradando-se os carboidratos redutores mediante a ação do hidróxido de potássio, como descrito por Riazi et al. (1985). Para isso, utilizou-se alíquota de 50 µL de extrato etanólico 95% (o mesmo utilizado nas análises de pigmentos e fenóis), acrescentou-se 200 µL de água desionizada, 100 µL de solução de KOH 5,4 N e 3,0 mL de solução de antrona. Todas as soluções foram fervidas por 10 min, após o acréscimo da solução de KOH e, posteriormente, fervidas por mais 5 min, após adição da solução de antrona. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), a 620 nm.

2. 9. *Análises estatísticas*

Os dados foram testados utilizando o software estatístico InfoStat (Versão 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina) para análise de distribuição de normalidade com o teste de Shapiro–Wilk e para análise de variância dos fatoriais Morfotipo x UV-B. Quando detectada a interação significativa entre fatores, foi realizado o desdobramento da interação e a comparação das médias pelo teste de Tukey, com auxílio do software estatístico Assistat (versão 7.7 beta Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brazil). Diferenças significativas foram identificadas considerando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3. 1. *Análise de crescimento*

Os resultados quanto ao crescimento evidenciaram diferenças relevantes entre os morfotipos pequeno (SV) e médio (MV) expostos à ultravioleta-B (UV-B) (Figura 1 e 2). Pode-se observar que, apesar da não interação entre os fatores Morfotipo X UV-B, o SV e o MV se diferem morfológicamente quanto aos valores de massa caulinar e foliar: o SV apresentou maior diâmetro (DC), massa seca de caule (MSC), bem como a razão dessa massa pela massa total (RMC). Em contrapartida, o MV apresentou maior número de folíolos por planta (NFF), razão de massa foliar (RMF) e razão de área foliar (RAF) (Tabela 1 e 2).

Comparadas às plantas-controle, as plantas MV sob UV-B exibiram maiores altura (± 12 cm) e área foliar específica ($\pm 1,2$ cm² mg⁻¹) (Figura 1 e 2). Em contrapartida, o morfotipo pequeno (SV) apresentou menor altura ao UV-B e AFE sem diferenças estatísticas. Além disso, analisando os dois morfotipos expostos à UV-B, o MV apresentou altura 50% maior, bem como maior massa seca total (MST) e massa seca radicular (MSR) (Figura 1).

Quanto ao percentual de biomassa seca radicular, o MV apresentou maior valor, independentemente da exposição à UV-B ou não (69 - 77%), em relação ao SV (40 - 34%). Entretanto, o SV alocou boa parte da sua massa seca na porção caulinar (57 - 62%), já o MV

apresentou massa seca na porção caulinar de 27 % sob UV-B e 20 % sem radiação. Com relação à massa alocada de folhas, pouco diferiu essa variável entre os morfotipos estudados. Vale ressaltar que o SV apresentou maior massa seca radicular (6 % maior) e menor caulinar (5 % menor) quando exposto à UV-B. Por outro lado, o MV sob UV-B apresentou proporção de massa radicular menor (8 % menor) e aumento de 7 % do caule em relação ao controle (Figura 3).

As folhas de pau-brasil de ambos os morfotipos sob radiação UV-B, com mais evidência no SV, mostraram alterações visuais (Figura 4), tais como: bronzeamento, manchas necróticas, enrugamento e distorção foliar. Além disso, observou-se perda de folíolos recém-emergidos, especialmente para as plantas SV, as quais se mostraram mais suscetíveis à radiação (dados não apresentados).

3. 2. *Teores de polímeros de parede celular*

Os teores de celulose na raiz e folha apresentaram interação entre os fatores Morfotipo X UV-B ($p < 0,0001$). Porém, no caule não houve interação ($p = 0,7341$) (Tabela 3). Analisando o desdobramento apresentado na figura 3 – A e B, MV apresentou menor concentração de celulose na raiz sem a exposição à UV-B ($\pm 50\%$) em relação aos demais tratamentos. Contrariamente, a não exposição do MV à radiação UV-B(UV-), estimulou a concentração de celulose na folha em relação à aquelas tratadas com UV-B(UV+) e ao SV nos dois tratamentos (Figura 5).

Com relação aos conteúdos de hemicelulose, houve interação estatística para todos os órgãos analisados (Tabela 3), com maiores concentrações de hemicelulose radicular em SV em relação ao MV. Analisando o fator UV-B, o SV apresentou menor valor de hemicelulose na raiz quando exposto à UV-B. Contudo, observou-se o oposto para o MV, o que apresentou maior valor em relação ao controle (Figura 5C). O teor desse polímero foi menor no caule dos dois morfotipos expostos ao UV-B. Soma-se, ainda, o fato de que o MV apresentou maiores concentrações de hemicelulose caulinar para ambas as condições de radiação (Figura 5D). O teor de hemicelulose na folha foi expressivamente superior no MV na ausência de UV-B, apresentando valor três vezes

superior em relação aos das mesmas plantas expostas à UV-B. Para o SV, a presença da radiação aumentou a concentração de hemicelulose foliar. Em contrapartida, o MV obteve menor concentração quando comparado ao controle (Figura 5E). Os valores de lignina para todos os órgãos analisados não responderam aos tratamentos, porém, ao analisar apenas o fator Morfotipo, nota-se que o SV apresentou maiores conteúdos de lignina em todos os órgãos analisados (Tabela 3).

3. 3. *Pigmentos cloroplastídicos, antocianinas, flavonoides e fenóis totais*

As concentrações de clorofilas *a*, *b* e totais, bem como suas razões e, antocianinas não apresentaram interação com os tratamentos (Tabela 4). Os teores de carotenoides e flavonoides foram maiores em ambos morfotipos sob UV-B, com destaque para o MV que apresentou maiores concentrações desses pigmentos, independentemente da condição de radiação em relação ao SV (Figura 6A e C). Já para o conteúdo de fenóis totais, o SV mostrou menor concentração sob UV-B, diferente do MV que apresentou maiores teores de fenóis nas plantas submetidas ao UV-B (Figura 6B).

As folhas de ambos os morfotipos sob UV-B exibiram espectros de absorção mais elevados em relação às mesmas plantas sem exposição ao UV-B. Vale ressaltar ainda que o MV apresentou maiores absorções entre os comprimentos de 280-300 nm, independentemente da radiação em relação ao SV (Figura 6D e E).

3. 4. *Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência*

Tanto os parâmetros de trocas gasosas quanto os de fluorescência apresentaram interação com os tratamentos, com valores de *p* entre 0,0314 e < 0,0001 (Tabela 5). A taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), assim como a taxa fotossintética máxima (*A*_{max}), foram maiores nas plantas morfotipo médio (MV) sob influência do UV-B. Contrariamente, o SV apresentou menores valores desses parâmetros na mesma condição. Vale acrescentar que o MV, independentemente da condição de radiação, apresentou maiores valores de *A* e *A*_{max} em relação ao SV. A taxa respiratória no escuro (*R*_d) e a condutância estomática (*g*_s) foram maiores nas plantas sob UV-B em ambos os morfotipos:

140 % para o SV e 60 % para o MV, bem como 20 % para o SV e 40 % para o MV, respectivamente (Tabela 6).

Com relação à concentração intercelular de CO_2 (C_i), o SV apresentou maiores valores independentemente do tipo de irradiância. Além disso, as plantas sob UV-B exibiram menores valores de C_i para ambos os morfotipos. A taxa transpiratória (E) do SV não variou estatisticamente entre as condições de radiação. Entretanto, essa taxa apresentou maior valor em MV sob radiação e em relação aos tratamentos em SV. Já para a eficiência do uso da água (A/E), o SV e o MV apresentaram menores valores sob UV-B, porém, o MV obteve maior valor de A/E sob UV-B em relação ao SV nessa mesma condição (Tabela 6).

A respeito dos parâmetros de fluorescência, o SV sob UV-B apresentou menor eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (F_V'/F_M') e também menor coeficiente de extinção fotoquímico (q_P) em relação ao controle e ao MV nas duas condições de radiação. Quanto ao coeficiente não-fotoquímico (NPQ), as plantas submetidas à radiação UV-B apresentaram maiores valores, com destaque para o MV que, nessa mesma condição, exibiu valor de NPQ maior que o SV. Além disso, sob radiação, o MV apresentou NPQ 133 % maior contra 66 % no SV (Tabela 6).

3. 5. *Capacidade antioxidante, teores de H_2O_2 e MDA e carboidratos solúveis*

Tanto os valores da capacidade antioxidante (ABTS), os teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o malonaldeído (MDA), quanto os teores de sacarose e açúcares totais responderam aos tratamentos, com valores de p entre 0,0479 e 0,0014 (Tabela 7). O desdobramento da interação Morfotipo x UV-B permitiu-se visualizar que a capacidade antioxidante (ABTS) em ambos os morfotipos analisados foi superior nas plantas expostas à UV-B. Além disso, os teores de H_2O_2 e MDA também seguiram a mesma diferença em relação ao controle. Nota-se, porém, que o SV apresentou maiores teores desses compostos à UV-B em relação ao MV (Figura 7).

Com relação às concentrações de sacarose na folha, o tratamento com UV-B influenciou na sua redução para ambos os morfotipos, com destaque para o MV, com maior redução: aproximadamente 40% em relação ao controle. Para esse mesmo carboidrato no caule, as plantas submetidas à radiação UV-B apresentaram maiores concentrações de sacarose, tendo o MV maiores valores em relação ao SV para as duas condições de radiação. A concentração de açúcares solúveis totais (ATS) na folha não variou no SV com a suplementação ou não de UV-B, porém, no MV apresentou maior valor em UV-B em relação ao controle (Figura 7).

4. DISCUSSÃO

As diferenças quanto aos parâmetros de crescimento sugerem capacidades adaptativas divergentes para os dois morfotipos quanto à exposição da radiação ultravioleta-B. Os maiores valores em altura e massa seca total nas plantas do MV à UV-B não condizem com a maioria dos resultados relatados na literatura com arbóreas (Liu et al., 2005; Ren et al., 2007), mas podem ser explicados pelos superiores resultados dessas mesmas plantas quanto aos parâmetros de fotossíntese. Sugere-se, também, que o maior conteúdo de pigmentos fotoprotetores, como flavonoides e carotenoides, apresentados pelo MV sob radiação, possa estar relacionado com as maiores quantidades de substâncias fenólicas, que atuam como filtros à radiação ultravioleta, mitigando os efeitos danosos sobre os pigmentos cloroplásticos e outras estruturas celulares (Schen et al., 2010). Esse aumento na fotoproteção dos complexos coletores de luz dos fotossistemas contribuiu para um melhor aproveitamento de luz incidida nas folhas do MV à UV-B, ajudando no desempenho fotoquímico, conferido pelo *quenching* fotoquímico (*qP*), e, provavelmente, na produção de moléculas redutoras para as reações de fixação e redução de CO₂ (Baker, 2008).

Comparativamente ao SV, o MV submetido à UV-B, teve melhor desempenho fotossintético. Apresenta maior superfície transpirante (AFE), que está associado ao maior percentual de biomassa alocado à raízes que supre as perdas transpiratórias, MV deve, provavelmente, apresentar capacidade maior de absorção de água por volume de solo. Esse comportamento, em conjunto com as maiores taxas de *A*, explicaria o maior acúmulo de biomassa do MV à UV-B (DaMatta, 2004).

Krause et al. (2013), avaliando a tolerância de três espécies umbrófilas nativas do Brasil à UV-B, verificaram forte inibição da fotossíntese pela radiação. Esses autores afirmam que espécies umbrófilas, como o SV - classificado por Mengarda et al. (2012) –, não possuem tolerância à UV-B por ineficiência na dissipação de energia por complexos fotoprotetores dos fotossistemas, fato este que se pode observar pelas menores concentrações de flavonoides, carotenoides e fenóis totais no SV à UV-B. Apesar de essas mesmas plantas apresentarem uma maior condutância estomática (g_s) em relação ao controle, elas obtiveram menor capacidade fotossintética máxima (A_{max}). Cavatte et al. (2012) afirmam que A_{max} é determinada pela concentração saturante de CO_2 e, portanto, independe de efeitos estomáticos. Nesse sentido, pode-se concluir que a redução nas taxas fotossintéticas do SV sob radiação seria determinada, em grande extensão, por menor eficiência carboxilativa ou por maior resistência à difusão de CO_2 , desde as cavidades subestomáticas até os cloroplastos (DaMatta e Rena, 2002). Estes resultados confirmam as características umbrófilas do SV sugeridas por Mengarda *et al.* (2012), sendo um morfotipo com alta sensibilidade fotossintética à UV-B, sugerindo inibição da atividade da rubisco ou fotodano (Thach et al., 2007).

Vale ressaltar que o SV apresentou redução na eficiência de captura de energia por complexos coletores do FSII (valores inferiores a 0,5) acompanhados de superiores valores de peróxido de hidrogênio e malonaldeído (MDA). Estes dados indicam que houve fotoinibição da fotossíntese pela UV-B no SV (Singh et al., 2014). Isso sugere que a despeito dos baixos valores de A apresentados pelo SV à UV-B, rotas alternativas, como a fotorrespiração e a reação de Mehler, devem ter papel de destaque para consumir o ATP e NADPH excedente gerados na fase fotoquímica da fotossíntese (Asada, 1999). Provavelmente, o MV possui uma maior capacidade fotossintética de aclimatação à UV-B do que o SV, que apresentou potencialmente menor ocorrência de danos celulares (Lima et al., 2002). Nesse contexto, cumpre ressaltar que as reduções no desempenho fotoquímico do SV sob UV-B, acompanhadas por baixa assimilação de carbono e crescimento, bem como incremento nas EROS, seja reflexo de um sistema antioxidante menos eficiente que o MV sob UV-B. Vale acrescentar que a maior extensão de danos celulares

apresentadas pelo SV à UV-B pode estar relacionada com a maior desfolha, enrugamento e distorção foliar desse morfotipo em relação ao MV nessa mesma condição.

Alterações nos padrões morfológicos foliares podem estar ligadas a alterações nos padrões de estrutura e composição da parede celular (Yamasaki et al., 2007). O aumento nos teores de lignina, principalmente nas folhas de ambos os morfotipos sob UV-B, pode ser explicado pela natureza fenólica fotoprotetora dessa substância, que se acumula na parede celular e em espaços intercelulares, amenizando os efeitos estressantes da radiação às células (Zagoskina et al. 2003). Estes resultados condizem com os encontrados por Hilal et al. (2004), trabalhando com pepineiro. Pontin et al. (2010) esclarecem que a UV-B ativa conjuntos gênicos para síntese da fenilalanina amônio liase (PAL), enzima-chave na síntese de lignina e outras substâncias fenólicas importantes na proteção da radiação. Como já foi esclarecido, outras substâncias fenólicas como flavonoides e, também, carotenoides, superiores no MV sob UV-B, conferiram maior tolerância dessas plantas à radiação em relação ao SV em mesma condição. Pontin et al. (2010) afirmam ainda que a UV-B ativa outros conjuntos gênicos que inibem a síntese de expansinas da parede celular, diminuindo a elasticidade da parede celular e, conseqüentemente, reduzindo o crescimento das células. Esse efeito parece ser mais evidente nas plantas do SV sob UV-B, já que apresentaram menor AFE e alterações morfológicas foliares mais evidentes em comparação com o MV (Yokawa et al., 2014).

Vale acrescentar que os maiores conteúdos de ligninas apresentados pelo SV, na comparação com todos os órgãos analisados em relação ao MV, sugerem características funcionais distintas entre os morfotipos (Harding et al., 2009). Novaes et al. (2010) sugerem que altos teores de lignina são característicos de plantas com crescimento mais lento e aspecto umbrófilo, conferindo maior longevidade e densidade foliar. De acordo com Poorter e Bongers (2006), folhas com maior concentração de ligninas resultam de células densamente empacotadas, levando à limitação de difusão do CO₂ dentro da folha e, conseqüentemente, proporcionando menores taxas fotossintéticas. Como constatado no SV sob influência do UV-B onde a assimilação líquida de carbono foi menor em relação ao controle.

A maior capacidade fotossintética do MV em relação ao SV sob UV-B aumentou a mobilização de fotoassimilados do órgão-fonte (folhas) para o órgão-dreno (caule), como se pôde observar pelos maiores teores de sacarose caulinar. Esse maior aporte de carbono conferiu maior teor de hemiceluloses em tecidos caulinares do MV sob UV-B em relação ao SV, sugerindo maior amadurecimento de vasos condutores do xilema. Tais características otimizam o fluxo de água e nutrientes e são típicas de espécies heliófilas (Zanne et al., 2010). Provavelmente, a maior eficiência no transporte de água permitiu um maior fluxo xilemático dos tecidos caulinares para os foliares, o que, conseqüentemente, proporcionou aumento na transpiração e na taxa fotossintética, no ganho de carbono e no crescimento do MV sob radiação (Poorter et al., 2010). Destacamos que os maiores teores de sacarose na folha do SV em relação ao MV sob UV-B propiciaram maior incremento de carbono neste órgão e, assim, maiores sínteses de hemicelulose (Harding et al., 2009).

As menores concentrações de sacarose foliar para os dois morfotipos sob UV-B em relação ao controle não condizem com os resultados de Rybus-Zajac et al. (2014), trabalhando com pepineiro e Newsham et al. (2001) com aveia. Os referidos autores encontraram aumento desse dímero nas plantas submetidas à radiação. Todavia, Li et al. (2010), trabalhando com trigo e Zhao et al. (2004) com algodão, encontraram baixos níveis de sacarose nas plantas sob UV-B e esclarecem que, por ser um carboidrato altamente móvel nos vegetais, suas concentrações são inconsistentes de espécie para espécie, dependendo da tolerância ou não à radiação. Rybus-Zajac et al. (2014) acrescentam ainda que sacarases e invertases, que catalisam a quebra da sacarose em monômeros de glicose e frutose, podem ser ativadas para suprir necessidades metabólicas de controle da homeostase e ormorregulação em condições de estresse. Esse fato pode ter acontecido com o MV, já que apresentou aumento dos níveis de carboidratos totais solúveis foliares em relação ao controle. Já para o SV, na mesma condição, os níveis de sacarose reduziram em relação ao controle provavelmente para suprir a síntese de polímeros com a hemicelulose foliar (Novaes et al., 2010) e as necessidades energéticas exigidas pela superior taxa respiratória (R_d) encontrada por estas plantas sob UV-B (Farrar, 1989).

Em conclusão, o efeito da radiação UV-B nas condições adotadas neste estudo mostrou-se vantajoso para o morfotipo médio (MV), uma vez que melhorou a eficiência fotoquímica, manteve a taxa fotossintética e otimizou seu crescimento. A incidência de UV-B causou efeitos adaptativos em MV que se apresentou com alto grau de tolerância a essa radiação. Esse fato pode ser explicado pelo comportamento heliófilo desse morfotipo com tolerância a ambientes com prevalência de alta irradiância ricos em UV (Gama, 2014), ao contrário do SV, que foi classificado como planta umbrófila por Mengarda et al. (2009 e 2012). A suplementação da radiação parece ter estimulado efeitos fotoinibitórios no SV, que apresentou menor crescimento, menores taxas fotossintéticas e alta respiração, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (H_2O_2), potencialmente capazes de causar peroxidação de lipídios (MDA) (Lima et al., 2002) e desnaturação de proteínas (Asada, 1999). Como consequência final, o SV sob UV-B apresentou danos oxidativos (MDA) que traduziram nas folhas pelo aparecimento de áreas cloróticas que evoluíram para necrose e abscisão foliar, fato facilmente observado pela maior incidência de quedas foliares, manchas necróticas e alterações de enrugamento e distorção foliar.

5. REFERÊNCIAS

- Alexieva V, Sergiev I, MApelli S, Karanov, E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ* 24:1337-1344
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639
- Baker B (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Ann Rev Plant Biol* 59:89-113
- Baroni AM (2005) Caracterização do sistema fotossintético em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo

- Beggs CJ, Wellmann E (1994) Photocontrol of flavonoid biosynthesis, in: Kendrick RE, Kronenberg GHM. (Eds.), *Photomorphogenesis in Plants*, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands 733-751
- Brendel O, Losetta PPMG, Stewart D (200) A rapid and simple method to isolate pure alpha cellulose. *Phytochem Annal* 17:7-10
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzimology* 52: 302-310
- Cavatte PC, Oliveira AAG, Morais LE, Martins SCV, Sanglard LMVP, DaMatta FM (2012) Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiol plantarum* 144:111-122
- Cechin I, Rocha VDJ, Fumis TDF (2012) Sensitivity of yellow passion fruit to ultravioleta-B radiation. *Pesq agropec* 1422-1427
- Couéé I, Sulmon C, Gouesbet G, Amrani AE (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57:449-459.
- DaMatta FM (2004) Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Braz J Plant Physiol* 16:1-6
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME (2002). Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *J Plant Physiol* 159: 975-981
- DaMatta FM, Rena AB (2001). Tolerância do café à seca. In: Zambolim L (Ed.). *Tecnologias de Produção de Café com Qualidade*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. p. 65-100.
- DaMatta FM, Rena AB (2002). Relações hídricas no cafeeiro. In: Encarnação RO, Afonso Jr PC, Rufino JLS (Eds.). *I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil: Palestras*. Brasília, EMBRAPA Café. p.9- 44.

- Dos Santos WD, Ferrarese ML, Nakamura CV, Mourão KSM, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O (2008) Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid: the possible mode of action. *J Chem Ecol* 34:1230-1241
- Dubois M, Giles KA, Hamilton JK (1956) Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. *Anal Chem* 28(3):350-356
- Farrar JF (1989) The carbon balance of fast-growing and slow-growing species. Pp. 241-245. In: Lambers, H (Ed.), Causes and consequence of variation in growth rate and productivity of higher plants. Vol. 1. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Flint SD, Jordan PW, Caldwell MM (1985) Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field condition. *J Photochem Photobiol B Biology* 41:95-106
- Franco N, Ioyo T (2008) Propriedades físicas, mecânicas e acústicas da madeira do pau-brasil. In: Figueiredo-Ribeiro RCL, Barbedo CJ, Alves ES, Domingos M, Braga MR (eds), Pau-Brasil, da Semente à Madeira, pp. 145- 158. Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil
- Gama VN (2013) Análises morfofisiológicas de plantas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) cultivadas em ambientes lumínicos distintos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo
- Harding SA, Jarvie MM, Lindroth RL, Tsai CJ (2009) A comparative analysis of phenylpropanoid metabolism, N utilization, and carbon partitioning in fast- and slow-growing *Populus* hybrid clones. *J Exp Bot* 60:3443-3452
- Hideg E, Jansen MAK, Strid Å (2013) UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci* 18, 107-115
- Hilal M, Parrado MF, Rosa M, Gallardo M, Orce L, Massa ED, González JÁ, Prado FE (2004) Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiation. *Photochem Photobiol* 79:205-210

- Hunt R (1982) Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold Publishers, London, UK
- Jermyn MA (1956) A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. Nature 177:38-39
- Juchum FS, Costa MA, Amorim AM, Corrêa RX (2008) Phylogenetic relationships among morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (Caesalpinioideae: Leguminosae) evidenced by trnL intron sequences. Naturwissenschaften 95:1085-1091
- Kakani VG, Reddy KR, Zhao D, Mohammed AR (2003) Effects of ultraviolet-B radiation on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology and anatomy. Ann Bot 91:817-826
- Krause GH, Grube E, Virgo A and Winter K (2003) Sudden exposure to solar UV-B radiation reduces net CO₂ uptake and photosystem I efficiency in shade-acclimated tropical tree seedlings. Plant Physiol 131:745-752
- Lako J, Trenerry VC, Wahlqvist M, Wattanapenpaiboon N, Sotheeswaran S, Premier R (2007) Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. Food Chem 101:1727-1741
- Li Y, Lilian H, Zu Y (2010) Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in endogenous hormones and photosynthetic characteristics of 10 wheat cultivars grown under field conditions. S Afr J Bot 76:493-498
- Lichtenthaler HK and Buschmann C (2001) 'Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy', in 'Current protocols in food analytical chemistry' pp. F4.3.1-F4.3.8. Wiley, New York.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. Environ Exp Bot 47: 239-247

- Liu L-X, Xu SM, Woo KC (2005) Solar UV-B radiation on growth, photosynthesis and the xanthophyll cycle in tropical acacias and eucalyptus. *Environ Exp Bot* 54:121-130
- Lobo FA, Barros MP, Dalmagro HJ, Dalmolin ÂC, Pereira WE, Souza EC, Vourlitis GL and Rodríguez Ortíz CE (2013) Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel - a critical look at the models. *Photosynthetica* 51(3):445-456
- Madronich S, McKenzie RL, Bjorn LO, Caldwell MM (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photochem Photobiol B* 46:5-19
- Mengarda LHG, Milanez CRD, Silva DM, Aguilar MAG, Cuzzuol GRF (2012) Morphological and physiological adjustments of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.) to direct solar radiation. *Braz J Plant Physiol* 24(3):161-172
- Mengarda LHG, Souza RLF, Campostrini E, Reis FO, Vendrame WA, Cuzzuol RRF (2009) Light as an indicator of ecological succession in brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Braz J Plant Physiol* 21:55-64
- Newsham KK, Splatt P, Coward PA, Greenslade PD, McLeod AR, Anderson JM (2001) Negligible influence of elevated UV-B radiation on leaf litter quality of *Quercus robur*. *Soil Biol Biochem* 33, 659-665
- Novaes E, Kirst M, Chiang V, Winter-Sederoff H, Sederoff R (2010) Lignin and biomass: A negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiol* 154:555-561
- Pontin MA, Piccoli PN, Francisco R, Bottini R, Martinez-Zapater JM, Lijavetzky D (2010) Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. *BMC Plant Biol* 10:224-237
- Poorter L and Bongers F (2006) Leaf traits are good predictors of plant performance across rain forest species. *Ecology* 87(7):1733-1743

- Poorter L, McDonald I, Alarcón A, Fichtler E, Licona J, Peña-Claros M, Sterck F, Villegas Z, Sass-Klaassen U (2010) The importance of wood traits and hydraulic conductance for the performance and life history strategies of 42 rainforest tree species. *New Phytol* 185:481-492
- Ravindran KC, Indrajith P, Pratheesh PV, Sanjiviraja K, Balakrishnan V (2010) Effect of ultraviolet-B radiation on biochemical and antioxidant defence system in *Indigofera tinctoria* L. seedlings. *Int J Eng Sci Technol* 2, 226-232
- Ren J, Dai W, Xuan Z, Yao Y, Korpelainen H, Li C (2007) The effect of drought and enhanced UV-B radiation on the growth and physiological traits of two contrasting poplar species. *Forest Ecol Manage* 239:112-119
- Riazi A, Matsuda K, Arslan A (1985) Water-stress induced changes in concentrations of proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. *J Exp Botany* 36(11):1716-1725
- Ros J, Tevini M (1995) Interaction of UV-radiation and IAA during growth of seedlings and hypocotyl segments of sunflower. *J Plant Physiol* 146:295-302
- Rybus-Zajc M, Kubi J, Bocianowski J (2014) UV-B radiation does not limit carbohydrate level and carbohydrate metabolism in cucumber leaves. *Communications in biometry and crop science* 9(1): 3-14
- Sarika PS and Gaikwad DK (2016) UVB Tolerance mechanisms in medicinally important plant *Simarouba glauca*: epicuticular wax and lipid peroxidation. *Indian J Appl Res* 6(9): 185-187
- Shädel C, Blöchl A, Richter A, Hoch G (2010) Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. *Plant Physiol Bioch* 48:1-8
- Shen X, Zhou Y, Duan L, Li Z, Eneji E, Li J (2010) Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. *J Plant Physiol* 167:1248-1252

- Singh VP, Kumar J, Singh S, Prasad SM (2014) Dimethoate modifies enhanced UV-B effects on growth, photosynthesis and oxidative stress in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: Implication of salicylic acid. *Pestic Biochem Physiol* 116: 13-23
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16:144-158
- Terashima IYT, Hanba Y, Tazoe P, Yano S (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *J Exp Bot* 57:343-354
- Thach LB, Shapcott A, Schmidt S, Critchley C (2007) The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. *Photosynth Res* 94:423-436
- Tripathi DK, Singh S, Singh VP, Prasad SM, Dubey NK, Chauhan DK (2016) Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol Biochem* 1-12
- Yamasaki S, Noguchi N, Mimaki K (2007) Continuous UV-B irradiation induces morphological changes and the accumulation of polyphenolic compounds on the surface of cucumber cotyledons. *J Radiat Res* 48:443-454
- Yao X and Liu Q (2009) The effects of enhanced ultraviolet-B and nitrogen supply on growth, photosynthesis and nutrient status of *Abies faxoniana* seedlings. *Acta Physiol Plant* 31:523-529
- Yokawa K, Baluška F (2014) Pectins, ROS homeostasis and UV-B responses in plant roots. *Phytochemistry* 112:80-83
- Yuan L, Yanqun Z, Jianjun C, Haiyan C (2002) Intraspecific responses in crop growth and yield of 20 soybean cultivars to enhanced ultraviolet-B radiation under field conditions. *F Crop Res* 78:1-8

- Zagoskina NV, Dubravina GA, Alyavina AK, Goncharuk EA (2003) Effect of ultraviolet (UV-B) radiation on the formation and localization of phenolic compounds in tea plant callus cultures. *Russ J Plant Phys* 50:270-275
- Zancan S, Suglia I, La Rocca N, Ghisi R (2008) Effects of UV-B radiation on antioxidant parameters of iron-deficient barley plants. *Environ Exp Bot* 63:71-79
- Zanne AE, Westoby M, Falster DS, Ackerly DD, Loarie SR, Arnold SEJ, Coomes DA (2010) Angiosperm wood structure: Global patterns in vessel anatomy and their relation to wood density and potential conductivity. *Am J Bot* 97(2):207-215
- Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Mohammed AR, Read JJ, Gao W (2004) Leaf and canopy photosynthetic characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum*) under elevated CO₂ concentration and UV-B radiation. *J Plant Physiol* 161:581-590

Tabela 1 - Parâmetros de crescimento de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-): altura, diâmetro do caule (DC), área foliar específica (AFE), razão da massa radicular e parte aérea (R:PA), área foliolar unitária (AFU), área foliar total (AFT), número de folhas (NF), número de folíolos (NFF), número de foliólulos (NFFF). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾.

	Altura (cm)	DC (mm)	AFE (cm ² g ⁻¹)	R:PA (g g ⁻¹)	AFU (cm ²)	AFT (cm ²)	NF	NFF	NFFF
Morfotipo (M)									
SV	8,49 ±0,35	3,34 ±0,09*	960 ±93	1,35 ±0,10	0,87 ±0,03	64,72 ±6,2	5,22 ±0,19	8,94 ±0,49*	73,67 ±6,41
MV	10,74 ±0,31	2,45 ±0,12	834 ±28	1,33 ±0,08	1,00 ±0,11	61,28 ±4,8	5,56 ±0,12	12,00 ±0,77	64,33 ±3,24
UV-B									
UV+	9,12 ±0,36	3,07 ±0,16*	806 ±42	1,30 ±0,08	0,95 ±0,04	56,56 ±3,8	5,1 ±0,19*	9,11 ±0,52*	59,5 ±3,25*
UV-	9,11 ±0,56	2,72 ±0,13	988 ±34	1,37 ±0,09	0,92 ±0,11	69,44 ±6,4	5,6 ±0,12	11,83 ±0,79	78,5 ±5,74
Valores de p									
Morfotipo	<0,0001*	<0,0001*	0,1664	0,8743	0,2779	0,6602	0,1312	0,0005*	0,1611
UV-B	0,9901	0,0182*	0,0483*	0,5981	0,7860	0,1066	0,0470*	0,0015*	0,0064*
M x UV-B	0,0280*	0,6334	0,0469*	0,5325	0,6953	0,6808	0,3094	0,1891	0,3545

⁽¹⁾O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=10).

Tabela 2 - Parâmetros de crescimento de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-): massa seca foliar (MSF), massa seca caulinar (MSC), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST), razão de massa foliar (RMF), razão de massa caulinar (RMC), razão de massa radicular (RMR) e razão de área foliar (RAF). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾.

	MSF (g)	MSC (g)	MSR (g)	MST (g)	RMF (g g ⁻¹)	RMC (g g ⁻¹)	RMR (g g ⁻¹)	RAF (cm ² g ⁻¹)
Morfotipo (M)								
SV	0,03 ±0,0	0,33 ±0,02*	0,26 ±0,03	0,61 ±0,04	0,03 ±0,00*	0,40 ±0,02*	0,56 ±0,02	81,18 ±7,91*
MV	0,03 ±0,0	0,13 ±0,01	0,45 ±0,02	1,12 ±0,03	0,08 ±0,01	0,36 ±0,01	0,56 ±0,01	178,06 ±18,38
UVB								
UVB+	0,03 ±0,0	0,24 ±0,03	0,34 ±0,03	0,91 ±0,05	0,05 ±0,01	0,39 ±0,02	0,56 ±0,02	106,60 ±11,45*
UVB-	0,03 ±0,0	0,22 ±0,03	0,33 ±0,04	0,85 ±0,07	0,06 ±0,01	0,37 ±0,01	0,57 ±0,02	152,65 ±21,97
Valores de p								
Morfotipo	0,5713	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0475*	0,9549	<0,0001*
UVB	0,3864	0,3806	0,7888	0,4901	0,4295	0,4216	0,6226	0,0171*
M x UVB	0,8614	0,3806	0,0441*	0,0497*	0,2112	0,5828	0,3511	0,1426

⁽¹⁾O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=10).

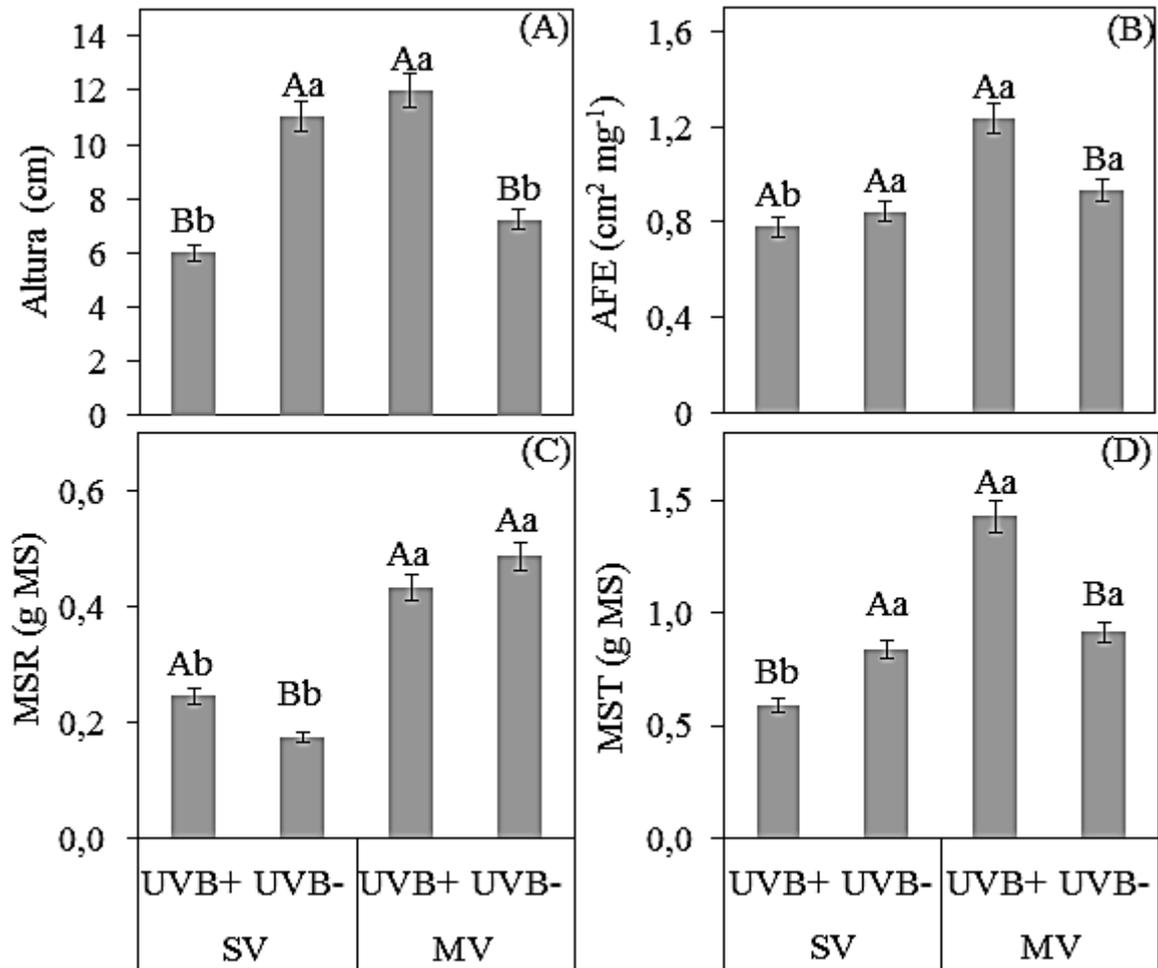


Figura 1 - Desdobramento da interação estatística (Morfotipo X UV-B) das variáveis de crescimento apresentadas nas tabelas 1 e 2: altura (A), área foliar específica (AFE - B), massa seca da raiz (MSR - C) e massa seca total (MST - D) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=10).

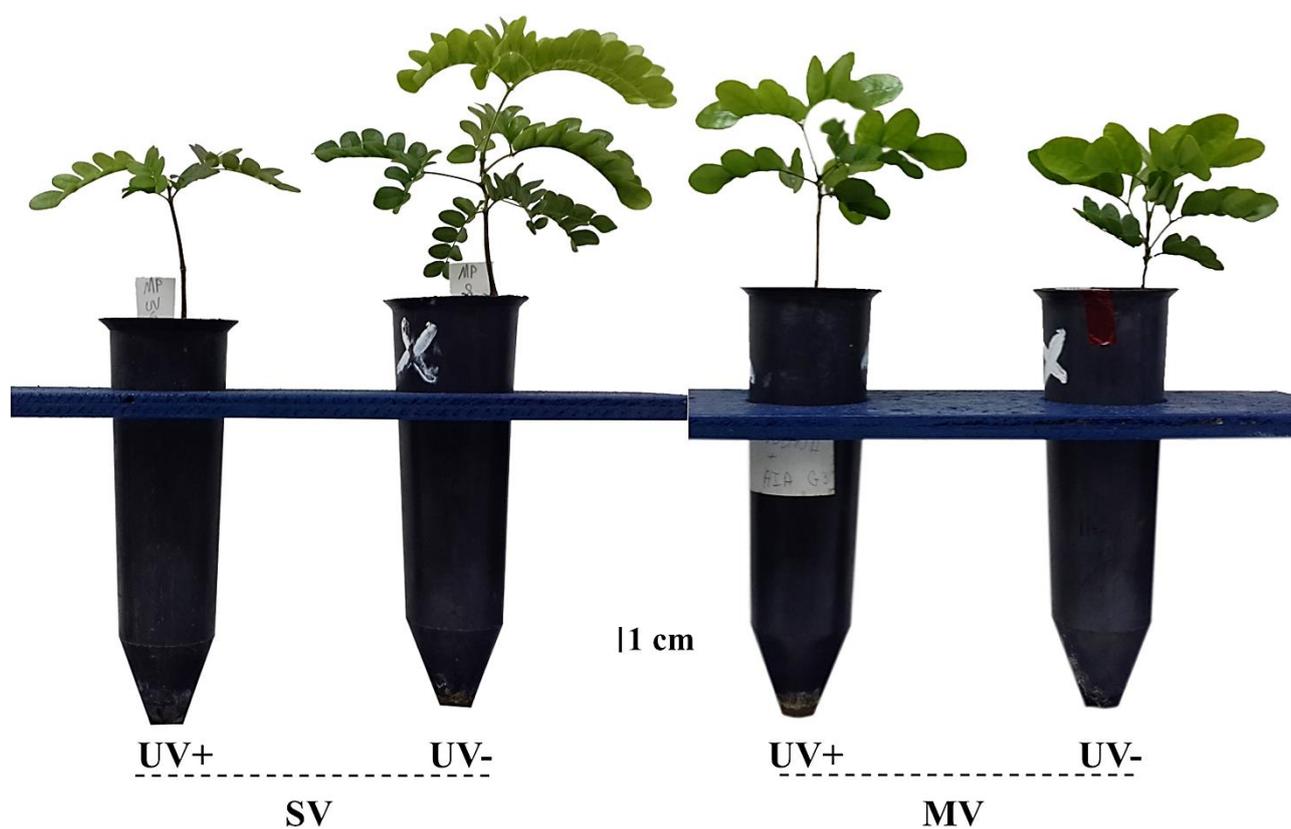


Figura 2 - Visual de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas a radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Barra vertical = 1 cm.

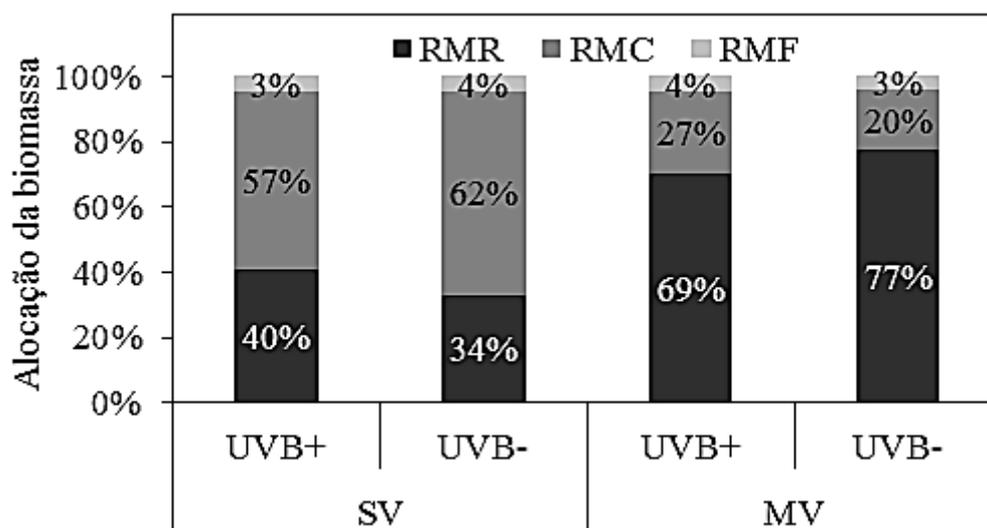


Figura 3 - Percentual alocado de biomassa seca radicular (RMR), caulinar (RMC) e foliar (RMF) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas a radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Os valores são médias percentuais (n=10).

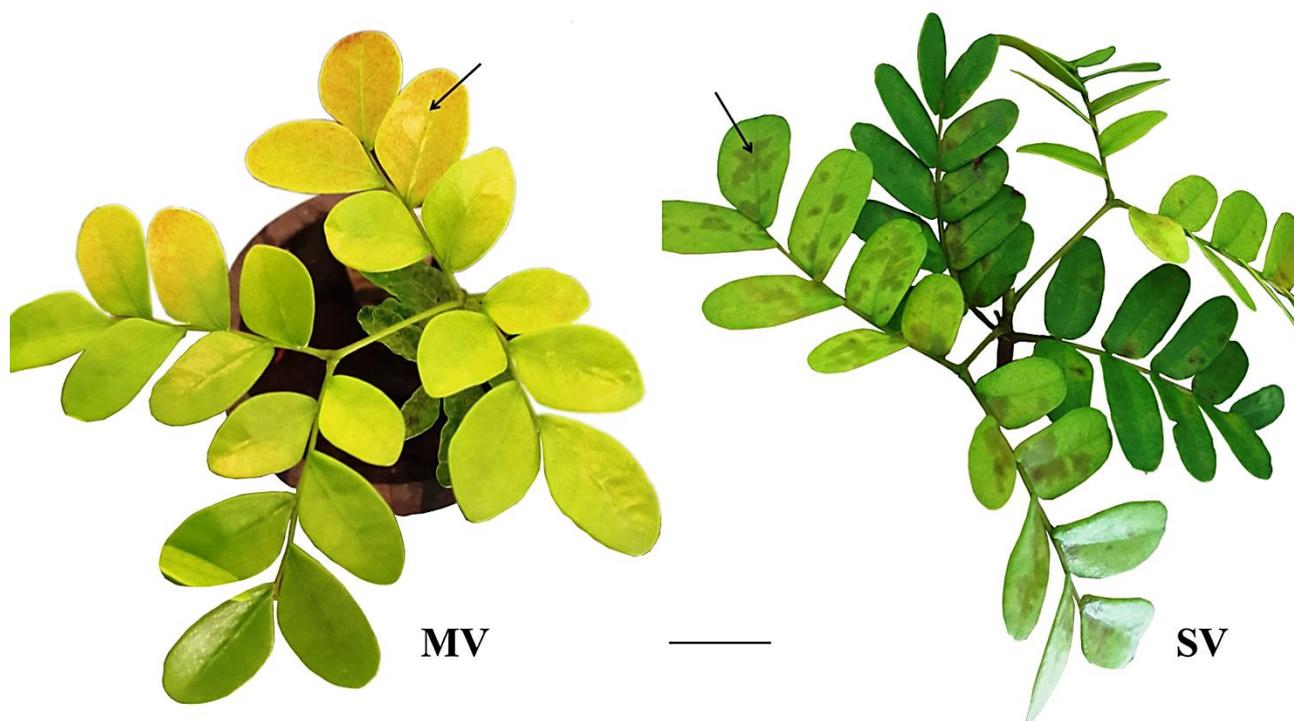


Figura 4 - Efeitos da radiação UV-B em plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. Morfotipo médio = MV – *medium variant* (esquerda) e pequeno = SV – *small variant* (direita). As setas apontam folhas jovens em expansão com alterações visuais provocadas pela radiação UV-B. Barra horizontal = 1 cm.

Tabela 3 - Conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina em raiz, caule e folha de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾.

	-----Celulose (mg g ⁻¹ MS) -----			-----Hemicelulose (mg g ⁻¹ MS) -----			-----Lignina (mg g ⁻¹ MS) -----		
	Raiz	Caule	Folha	Raiz	Caule	Folha	Raiz	Caule	Folha
Morfotipo (M)									
SV	240 ±6,2	310 ±7,0*	199 ±5,5	93,6 ±1,17	152,8 ±3,60	69,3 ±2,63	55,2 ±1,78*	60,1 ±0,63*	70,3 ±0,95*
MV	180 ±2,5	240 ±8,4	279 ±4,8	39,9 ±0,79	214,7 ±31,64	78,1 ±3,73	37,9 ±1,95	50,2 ±0,96	49,8 ±0,95
UVB									
UVB+	240 ±12,9	280±3,6	160 ±7,9	64,9 ±6,13	139,1 ±7,43	64,4 ±1,42	52,4 ±2,49*	54,5 ±1,61	68,6 ±3,08*
UVB-	180 ±2,4	280±6,8	310 ±7,1	68,5 ±9,29	227,9 ±21,98	83,16 ±1,98	40,7 ±2,83	55,7 ±1,76	57,5 ±3,18
Valores de p									
Morfotipo	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
UVB	0,0001*	0,8650	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,3107	<0,0001*
M x UVB	<0,0001*	0,7341	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0384*	0,2614	0,6773	0,5805

⁽¹⁾O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

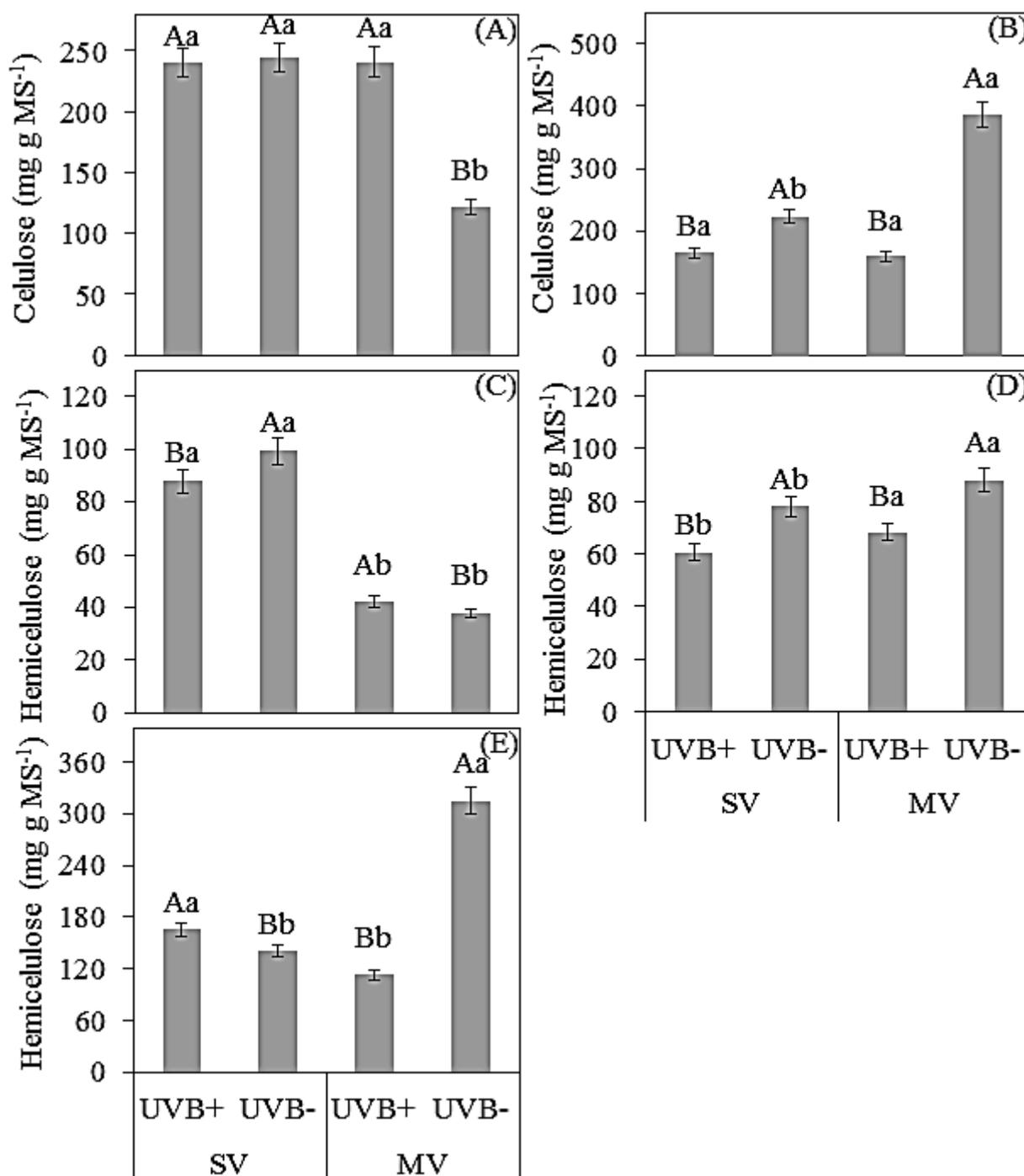


Figura 5 - Desdobramento da interação estatística (Morfofoto X UV-B) das variáveis de carboidratos estruturais apresentadas na tabela 5: conteúdo de celulose em raiz (A) e folha (B); bem como o conteúdo de hemicelulose em raiz (C), caule (D) e folha (E) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfofoto, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Morfofoto pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5).

Tabela 4 - Concentrações de antocianinas, flavonoides, fenóis, carotenoides, clorofila *a* (Chl. *a*), clorofila *b* (Chl. *b*) e totais (Chl. Totais); bem como as razões clorofilas totais: carotenoides e clorofila *a*:*b* de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾.

	Antocianinas ------(absorbância g ⁻¹ MS)-----	Flavonoides	Fenóis	Carotenoides	Chl. <i>a</i>	Chl. <i>b</i>	Chl. Totais	Chl./Carot.	Chl. <i>a</i> /Chl. <i>b</i>
	------(mg g ⁻¹ MS)-----								
Morfotipo (M)									
SV	0,60 ±0,04*	0,67 ±0,08	0,27 ±0,05	0,56 ±0,10	3,15 ±0,34*	1,01 ±0,09*	4,16 ±0,40*	4,87 ±0,20	3,13 ±0,23
MV	0,43 ±0,02	0,90 ±0,05	0,35 ±0,04	0,89 ±0,05	2,41 ±0,17	0,69 ±0,05	3,10 ±0,21	4,48 ±0,05	3,56 ±0,11
UVB									
UVB+	0,51 ±0,04	0,88 ±0,08	0,35 ±0,04	0,78 ±0,08	2,71 ±0,27	0,87 ±0,09	3,59 ±0,34	4,66 ±0,20	3,23 ±0,23
UVB-	0,53 ±0,05	0,59 ±0,08	0,27 ±0,05	0,59 ±0,09	2,85 ±0,3	0,82 ±0,08	3,67 ±0,38	4,69 ±0,09	3,46 ±0,14
Valores de <i>p</i>									
Morfotipo	0,0010*	0,0099*	0,1574	0,0635	0,0425*	0,0020*	0,0161*	0,0949	0,1221
UVB	0,7497	0,3535	0,1348	0,0233*	0,6912	0,5723	0,8328	0,8690	0,4075
M x UVB	0,8895	0,0451*	0,0147*	0,0437*	0,9559	0,5274	0,9244	0,5434	0,6613

⁽¹⁾O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

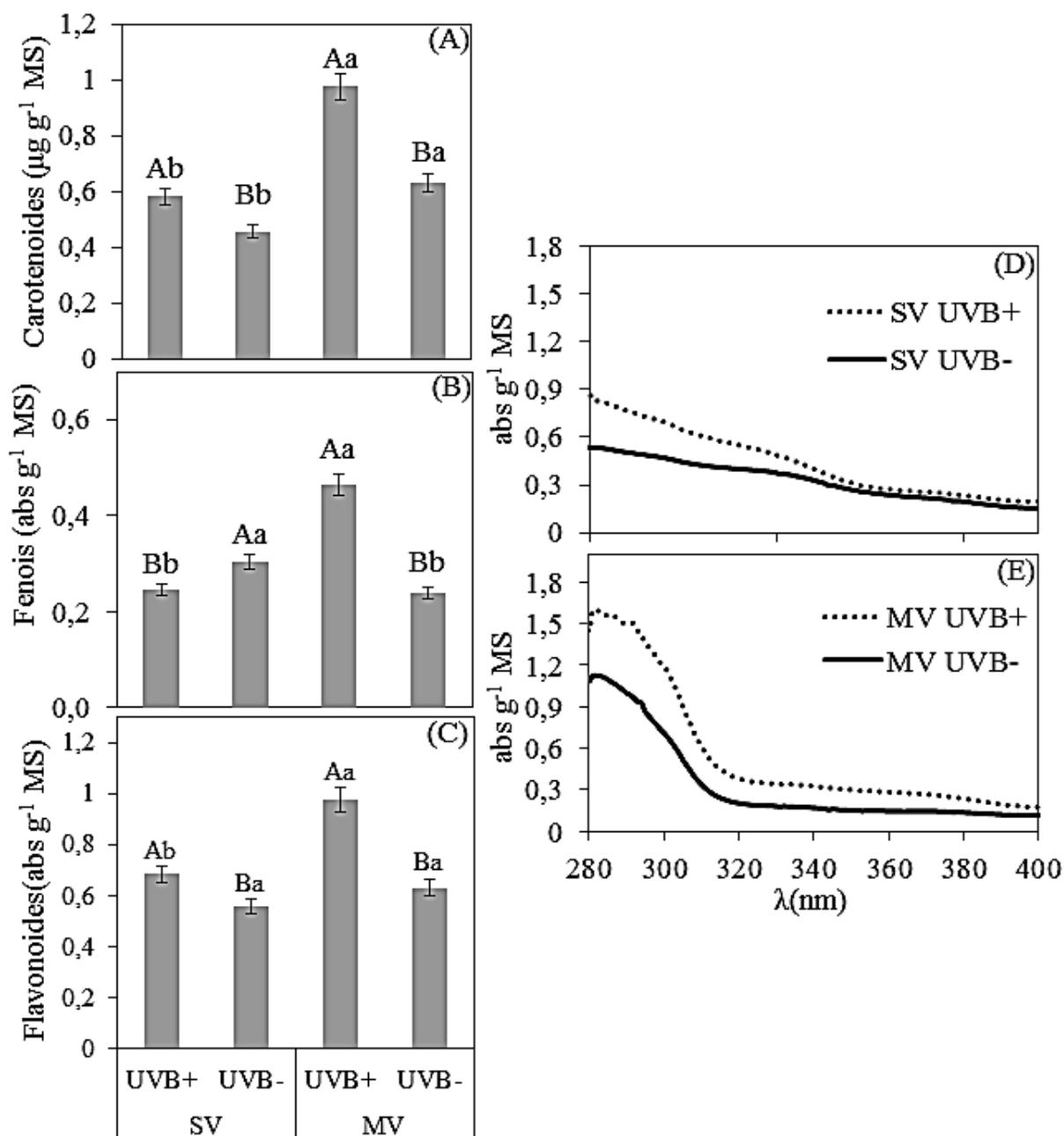


Figura 6 - Desdobramento da interação estatística (Morfofoto X UV-B) das variáveis de pigmentos apresentadas na tabela 3: concentrações de carotenoides (A), fenóis (B) e flavonoides (C); bem como os espectros de absorção do UV do extrato etanólico foliar de SV (D) e MV (E) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfofoto, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Morfofoto pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão ($n=5$).

Tabela 5 - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), capacidade fotossintética máxima (*A*_{max}), taxa de respiração no escuro (*R*_d), condutância estomática (*g*_s), concentração intercelular de CO₂ (*C*_i), transpiração (*E*), eficiência instantânea de uso da água (*A/E*), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (*F*_v'/*F*_M'), coeficiente de extinção fotoquímico (*q*_P) e coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾.

	<i>A</i> -----($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)-----	<i>A</i> _{max}	<i>R</i> _d	<i>g</i> _s ($\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	<i>C</i> _i ($\mu\text{mol CO}_2$ $\text{mol}^{-1} \text{ ar}$)	<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	<i>A/E</i> (mmol CO_2 $\text{mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)	<i>F</i> _v '/ <i>F</i> _M '	<i>q</i> _P	NPQ
Morfotipo (M)										
SV	2,0 ±0,1	2,3 ±0,2	0,8 ±0,0	0,06 ±0,0	253 ±10,1	0,92 ±0,0	2,2 ±0,1	0,5 ±0,0	0,7 ±0,0	0,4 ±0,0
MV	4,1 ±0,1	5,6 ±0,5	0,6 ±0,1	0,08 ±0,0	201 ±6,8	1,73 ±0,0	2,5 ±0,0	0,7 ±0,0	0,8 ±0,0	0,5 ±0,0
UVB										
UVB+	3,0 ±0,2	4,1 ±0,6	1,2 ±0,2	0,08 ±0,0	188 ±6,9	1,6 ±0,1	1,8 ±0,0	0,6 ±0,0	0,6 ±0,0	0,6 ±0,0
UVB-	3,1 ±0,3	3,8 ±0,2	0,5 ±0,0	0,05 ±0,0	265 ±8,6	1,1 ±0,1	2,9 ±0,2	0,7 ±0,0	0,9 ±0,0	0,3 ±0,0
Valores de <i>p</i>										
Morfotipo	0,0024*	0,0002*	0,1904	0,0765	0,0089*	0,0027*	0,6923	<0,0001*	0,3199	0,8835
UVB	0,7899	0,0034*	0,0043*	0,0012*	0,0009*	0,0002*	0,0005*	0,7233	0,0007*	<0,0001*
M x UVB	0,0314*	0,0077*	0,0039*	0,0023*	0,0004*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0331*

⁽¹⁾O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

Tabela 6 - Desdobramento da interação estatística (Morfotipo X UV-B) das variáveis de fotossíntese apresentadas na tabela 6: assimilação líquida de CO₂ (*A*), capacidade fotossintética máxima (*A*_{max}), taxa de respiração no escuro (*R*_d), condutância estomática (*g*_s), concentração intercelular de CO₂ (*C*_i), transpiração (*E*), eficiência instantânea de uso da água (*A/E*), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (*F*_V'/*F*_M'), coeficiente de extinção fotoquímico (*q*_P) e coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (*p*<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. *Small variant* (SV) = morfotipo pequeno e *Medium variant* (MV) = morfotipo médio. Os valores são médias e as barras ± erro padrão (n=5).

Morfotipo	<i>Small Variant</i>		<i>Medium Variant</i>	
	UVB+	UVB-	UVB+	UVB-
<i>A</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	1,5 ±0,1 Bb	2,5 ±0,1 Ab	4,5 ±0,2 Aa	3,8 ±0,5 Ba
<i>A</i> _{max} (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	1,8 ±0,1 Bb	2,9 ±0,1 Ab	6,5 ±0,1 Aa	4,8 ±0,3 Ba
<i>R</i> _d (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	1,2 ±0,1 Aa	0,5 ±0,1 Ba	0,8 ±0,1 Ab	0,5 ±0,1 Ba
<i>g</i> _s (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,07 ±0,0 Ab	0,05 ±0,0 Ba	0,1 ±0,0 Aa	0,06 ±0,0 Ba
<i>C</i> _i (μmol CO ₂ mol ar ⁻¹)	227 ±5 Ba	280 ±17 Aa	150 ±11 Bb	251 ±10 Ab
<i>E</i> (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,95 ±0,0 Ab	0,9 ±0,1 Ab	2,25 ±0,2 Aa	1,22 ±0,2 Ba
<i>A/E</i> (μmol CO ₂ mmol H ₂ O ⁻¹)	1,6 ±0,1 Bb	2,8 ±0,1 Aa	2,0 ±0,5 Ba	3,1 ±0,3 Aa
<i>F</i> _V '/ <i>F</i> _M '	0,4 ±0,0 Bb	0,7 ±0,0 Aa	0,8 ±0,0 Aa	0,7 ±0,0 Aa
<i>q</i> _P	0,5 ±0,0 Bb	0,9 ±0,0 Aa	0,8 ±0,0 Aa	0,9 ±0,0 Aa
NPQ	0,5 ±0,0 Ab	0,3 ±0,0 Ba	0,7 ±0,0 Aa	0,3 ±0,0 Ba

Tabela 7 - Capacidade antioxidante (ABTS), teores peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA) em extratos foliares; bem como as concentrações totais de sacarose foliar e caulinar, e açúcares totais solúveis foliares de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Morfotipo pequeno = SV – *small variant* e médio = MV – *medium variant*⁽¹⁾.

	ABTS (mM Trolox g ⁻¹ MS)	H₂O₂ (μmol g MS ⁻¹)	MDA (nmol g MS ⁻¹)	Sacarose folha ------(mg g MS ⁻¹)-----	Sacarose caule	Açúcares totais (mg glicose g MS ⁻¹)
Morfotipo (M)						
SV	297,2 ±15	67 ±5,3	33 ±5,5	2,07 ±0,17	32 ±2,2	25,01 ±1,63
MV	278,9 ±12	77 ±4,9	35 ±4,8	1,86 ±0,21	49 ±3,8	19,78 ±1,73
UVB						
UVB+	399 ±11	130 ±7,5	55 ±7,9	1,43 ±0,13	51 ±5,7	24,73 ±1,42
UVB-	227 ±12	44 ±5,8	35 ±7,1	2,5 ±0,07	32 ±2,7	20,16 ±1,98
Valores de p						
Morfotipo	0,211	0,1099	0,1574	0,1601	0,0029*	0,0246*
UVB	0,0001*	0,0005*	0,0048*	<0,0001*	0,0051*	0,1263
M x UVB	0,0095*	0,0051*	0,0017*	0,0068*	0,0014*	0,0479*

⁽¹⁾O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste F). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

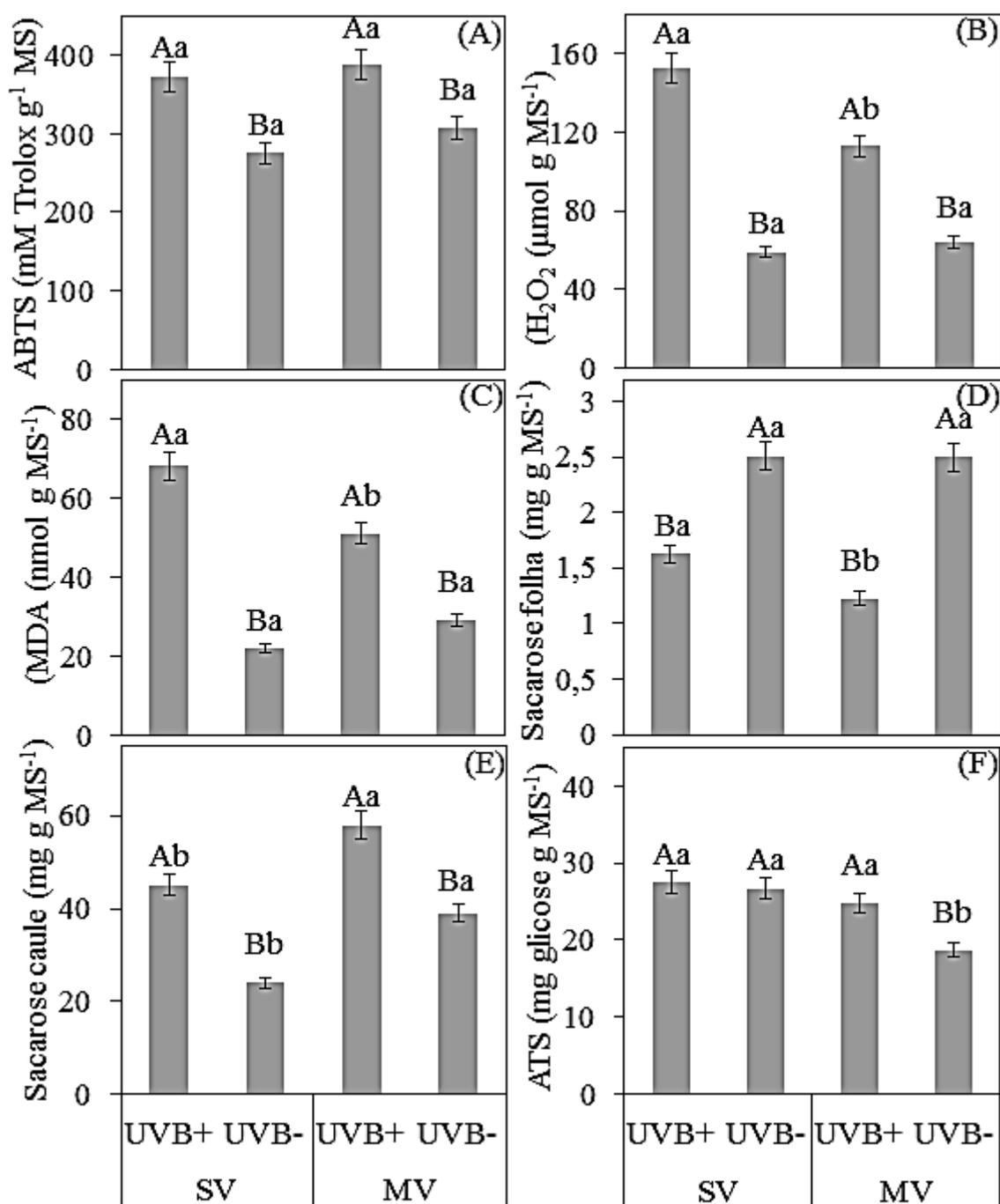


Figura 7 - Desdobramento da interação estatística (Morfolotipo X UV-B) das variáveis apresentadas na tabela 4: Capacidade antioxidante (ABTS) (A), teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B) e malonaldeído (MDA) (C) em extratos foliares; bem como as concentrações totais de sacarose foliar (D) e caulinar (E), e açúcares totais solúveis foliares (F) de plantas jovens de dois variantes morfológicos de *Paubrasilia echinata* Lam. submetidas à radiação UV-B (UV+) ou não (UV-). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro do fator Morfolotipo, e letras minúsculas o mesmo tratamento entre os fatores principais. Morfolotipo pequeno= SV – *small variant* e médio= MV – *medium variant*. Os valores são médias e as barras \pm erro padrão (n=5).

III. CONCLUSÕES

As diferenças exibidas pelos três morfotipos de pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.) quanto à irradiância contrastante e à exposição da radiação ultravioleta-B (UV-B) apresentadas neste trabalho parecem refletir as condições preponderantes de seus centros de origem.

O pau-brasil é uma planta nativa do litoral brasileiro, seu habitat natural estendia-se por terras da Mata Atlântica pluvial, no trecho compreendido entre o Cabo de São Roque, no Rio Grande do Norte, até o município de Cabo Frio, no Rio de Janeiro. Porém, sua ocorrência pode se estender por florestas estacionais semidecíduais, com preferência pelo clima árido e solos secos em relação às matas ombrófilas densas.

O morfotipo mais comum, *small variant* (SV) ou folha-de-arruda, é encontrado com maior frequência e maior distribuição geográfica por toda a costa brasileira, do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Norte, principalmente em matas ombrófilas densas ou matas de tabuleiro. Assim, os positivos resultados obtidos pelo SV em sombreamento intenso podem ser explicados pela origem deste variante morfológico de pau-brasil em florestas pluviais com elevado grau de sombreamento, umidade e baixas temperaturas de sub-bosque.

Neste sentido, considerando que o principal recurso para a determinação do comportamento das espécies florestais na dinâmica de sucessão é a luminosidade, o SV ao longo do seu histórico evolutivo conferiu adaptações que visam a aumentar a absorção de luz por compostos acessórios na maquinaria fotossintética, bem como adaptações na alocação de biomassa na parte aérea, intensificando a área foliar e maximizando a captação da baixa irradiância incidente no sub-bosque da mata. Vale lembrar que a baixa taxa de crescimento e de assimilação líquida de carbono apresentada por este morfotipo reflete um crescimento mais lento e gradual, normalmente associado a plantas de ambientes sombreados.

Já o segundo morfotipo, *medium variant* (MV) ou folha-de-café, são conhecidos representantes de ocorrência natural nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e sudeste da

Bahia. E o terceiro morfotipo, *large variant* (LV) ou folha-de-laranja, apresenta-se, naturalmente, apenas em uma localidade, no Vale do Rio Pardo sudeste da Bahia. Nestas regiões, prevalecem áreas de matas mais abertas, com mais clareiras, chamadas de matas estacionais ou semi-estacionais. Logo, o forte mecanismo antioxidante, preservando o acelerado aparato fotossintético e fluxo transpiratório do MV e LV, conferiu elevado grau heliófilo em relação ao SV. Esses positivos resultados sob alta irradiância do MV e o LV, bem como a forte adaptação do MV sob UV-B, são associados aos locais de origem evolutiva desses variantes com intensa irradiância, prevalecendo maiores temperaturas e radiações, e menor umidade.

Essas informações são importantes para o reflorestamento com espécies nativas tropicais. Os resultados aqui apresentados indicam a utilização do SV, com características umbrófilas, para recuperação de áreas de Mata Atlântica mais densa, com prevalência em regiões pluviais e litorâneas úmidas. Já o MV e o LV, recomenda-se seus plantios em matas estacionais decíduas e semidecíduas da floresta atlântica, com prevalência de clareiras e altas irradiâncias.

