



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

**CARLOS LUIS SÁNCHEZ FONSECA**

**RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS E DINÂMICA DE CARBONO EM  
PLANTAS DE DOIS MORFOTIPOS DE *Paubrasilia echinata* SOB  
DÉFICIT HÍDRICO SEGUIDO DE REIDRATAÇÃO**

**VITÓRIA - ES**

**2021**

**CARLOS LUIS SÁNCHEZ FONSECA**

**RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS E DINÂMICA DE CARBONO EM PLANTAS DE  
DOIS MORFOTIPOS DE *Paubrasilia echinata* SOB DÉFICIT HÍDRICO SEGUIDO  
DE REIDRATAÇÃO**

Tese 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 para obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol

**VITÓRIA - ES**

**2021**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

S211r Sánchez Fonseca, Carlos Luis, 1978-  
Respostas fotossintéticas e dinâmica de carbono em plantas de  
dois morfotipos de paubrasilia echinata sob déficit hídrico  
seguido de reidratação / Carlos Luis Sánchez Fonseca. - 2021.  
128 f. : il.

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

1. Trocas gasosas. 2. Fluorescência da clorofila *a*. 3.  
Carboidratos. 4. Polímeros de parede celular. 5. Déficit hídrico.  
6. Paubrasil. I Cuzzuol, Geraldo Rogério Faustini. II.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

---

Carlos Luis Sánchez Fonseca

**“RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS E DINÂMICA DE CARBONO EM PLANTAS  
DE DOIS MORFOTIPOS DE *Paubrasilia echinata* SOB DÉFICIT HÍDRICO  
SEGUIDO DE REIDRATAÇÃO”**

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 Doutor em Biologia Vegetal.

Aprovada em 20 de setembro de 2021.

Comissão Examinadora:

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

**Profª Drª Diolina Moura Silva (UFES)**  
Examinadora Interna

**Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte (UFES)**  
Examinador Interno

**Prof. Dr. José Eduardo Macedo Pezzopane (UFES)**  
Examinador Externo

**Profª Drª Moemy Gomes de Moraes (UFG)**  
Examinadora Externa

Documento assinado digitalmente



MOEMY GOMES DE MORAES  
Data: 23/09/2021 07:31:10-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

### PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
GERALDO ROGERIO FAUSTINI CUZZUOL - SIAPE 1173398  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 21/09/2021 às 08:02

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/270604?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

### PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
DIOLINA MOURA SILVA - SIAPE 294671  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 21/09/2021 às 08:52

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/270645?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

### PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
PAULO CEZAR CAVATTE - SIAPE 1770353  
Departamento de Biologia - DB/CCENS  
Em 21/09/2021 às 09:45

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/270708?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
JOSE EDUARDO MACEDO PEZZOPANE - SIAPE 1172926  
Departamento de Ciências Florestais e da Madeira - DCFM/CCAÉ  
Em 21/09/2021 às 15:00

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/271125?tipoArquivo=O>

*“Tudo posso naquele que me fortalece”  
(Fp 4:13)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, abençoar, me dar tranquilidade e forças para seguir em frente com os meus objetivos, e não desanimar com as dificuldades.

A meus pais, Carlos e Norma, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de esperança; sempre repetindo palavras essenciais e de incentivo, com amor, crença e compreensão. Eles infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

A minha família! É para ela todo o meu esforço. Especialmente, agradeço a minha amada esposa Guadalupe. O tempo todo ao meu lado, incondicionalmente, com o seu apoio em cada umas das decisões propostas para conseguir novas conquistas. Sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grato por seu permanente companheirismo, amor e carinho brindado em cada momento de nossas vidas, junto a nossos filhos. Aos meus filhos Joel, Andy e Matías, os quais amo incondicionalmente e que fazem parte desta realização como uma família sempre unida. A toda a minha família no Equador e Espanha, meus irmãos e sobrinhos, por estarem de perto apoiando e torcendo por mim, apesar da distância.

A meu professor e orientador Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol, pelos ensinamentos nos desafios da pesquisa. Obrigado professor pelos conselhos, a oportunidade e confiança depositada. A sua orientação e acompanhamento significativo, foram fundamentais na execução e conclusão desta pesquisa;

Aos professores da banca pelos importantes direcionamentos e essenciais contribuições para aperfeiçoar o projeto;

A Professora Dra. Moemy Gomes de Moraes do Laboratório de Fisiologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Goiás, pela parceria para realizar algumas análises do projeto, e pelo seu excelente aporte para esta concretização.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), pela dedicação e ensinamentos transmitidos; e a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pela infraestrutura disponibilizada;

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas e Laboratório de Fotossíntese do Departamento de Ciências Biológicas da UFES.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Programa Alianças para Educação e Capacitação da Organização dos Estados Americanos (PAEC-OEA-GCUB), cujos apoio financeiro foi fundamental para que eu e outros estrangeiros tivessem oportunidade de estudar e se capacitar nas melhores universidades do Brasil.

Aos meus colegas e amigos do laboratório pelo apoio e amizade. A Débora, Romário, Fernanda, Maria Cecília, Felipe, Jeová, Fabiano e todos os meus amigos que de uma ou outra forma fizeram parte dessa grande jornada de pesquisa.

E por último, mas não menos importante, expresso também meu agradecimento a todos os colegas e amigos que conheci, por citar alguns: Gildevan, Ícaro, Ronald, Yusiara, Enrique, Yuliam, a família de Eduardo e Patrícia, Ângela, Georgynio, Samy, Dona Vera, Dezliscette, minha conterrânea Mayra, e todos com quem compartilhei momentos inesquecíveis; e fizeram minha estadia no Brasil acolhedora e tranquila para me concentrar, facilitando a conclusão dos estudos e da pesquisa com sucesso.

A conclusão da tese é um esforço pessoal e familiar, que sem a colaboração das pessoas e instituições que, de uma forma ou outra me auxiliaram, não teria sido possível. Estou muito feliz e agradecido por ter conseguido alcançar este objetivo.

*A todos, os meus sinceros e gratos agradecimentos!*

## RESUMO

De acordo com relatórios do IPCC, perturbações ambientais decorrentes das mudanças climáticas são previstas para o território brasileiro sob domínio da Mata Atlântica. No Nordeste, há projeção de aquecimento e seca prolongada. Esse panorama climático pode comprometer os processos fisiológicos, crescimento e a sobrevivência de espécies nativas da Mata Atlântica, incluindo a espécie símbolo do país, *Paubrasilia echinata*. Buscando levantar informações sobre as estratégias fisiológicas dessa espécie frente à seca, esse estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar as respostas fotossintéticas e a dinâmica da alocação do carbono em dois morfotipos da espécie, sendo um tolerante a sombra (morfotipo pequeno) e outro tolerante ao sol (morfotipo médio). Na primeira etapa do estudo, foi avaliado o potencial hídrico, extravasamento de eletrólitos, trocas gasosas e fluorescência transiente da clorofila *a* das plantas dos dois morfotipos de *P. echinata* sob suspensão de água seguido de reidratação. Na segunda etapa, foi analisado a dinâmica da alocação do carbono não estrutural: açúcares e amido, e estrutural, polímeros de parede celular: celulose, hemiceluloses e lignina. Registrou-se que o morfotipo tolerante ao sol, bem adaptado a ambientes mais secos e quentes, quando submetido a déficit hídrico apresenta declínio menos pronunciado do potencial hídrico foliar, parâmetros da fotossíntese e da fluorescência. Diferentemente do morfotipo tolerante à sombra que apresentou menor tolerância nas mesmas condições do tratamento. A maior resistência do morfotipo tolerante a sol à seca foi atribuída à sua maior capacidade em acumular açúcares e lignificação de seus tecidos. Assim, os hábitos dos morfotipos refletiram nas suas estratégias fisiológicas para ajustar a alocação dos carboidratos na tolerância à seca. Concluímos que, se a seca prevista pelas mudanças climáticas nas regiões de domínio da Mata Atlântica se instalarem nas próximas décadas, possivelmente a população natural de morfotipo tolerante à sombra possa sofrer redução, devido a sua menor tolerância ao déficit hídrico em relação ao morfotipo tolerante ao sol.

**Palavras-chave:** Trocas gasosas • Fluorescência da clorofila *a* • Carboidratos • Polímeros de parede celular • Déficit hídrico

## ABSTRACT

According to IPCC reports, environmental disturbances resulting from climate change are predicted for the Brazilian region under the Atlantic Rainforest domain. In Brazilian Northeast, warming and prolonged drought are projected. This climate scenario can compromise the plant physiological processes, growth, and survival of native species of the Atlantic Forest, including the country's symbol species, *Paubrasilia echinata*. Seeking to gather information about the physiological strategies of this species facing drought, we carried out this study in order to characterize the photosynthetic responses and the dynamics of carbon allocation in two morphotypes of the species, one is shade-tolerant (small leaf morphotype) and the other sun-tolerant (medium leaf morphotype). In the first stage of the study, the water potential, electrolyte leakage, gas exchange and transient chlorophyll a fluorescence of plants of the two morphotypes of *P. echinata* were evaluated under water suspension followed by rehydration. In the second step, the dynamics of the allocation of non-structural carbon: sugars and starch, and structural, cell wall polymers: cellulose, hemicelluloses and lignin were analyzed. It was recorded that the sun-tolerant morphotype, well adapted to drier and warmer environments, when subjected to water deficit presents a less pronounced decline in leaf water potential, photosynthesis and fluorescence parameters. Differently, the shade-tolerant morphotype showed less tolerance under the same treatments. The greater resistance of the sun-tolerant morphotype to drought was attributed to its greater capacity to accumulate sugars and lignification of its tissues. Thus, the habits of the morphotypes reflected in their physiological strategies to adjust the allocation of carbohydrates in drought tolerance. Concluding that, if the drought of climate change in the Atlantic Forest domain regions settles in the next decades, possibly the natural population of shade-tolerant morphotype may suffer reduction, due to its lower tolerance to water deficit in relation to the sun-tolerant morphotype.

**Keywords:** Gas exchanges • Fluorescence of chlorophyll a • Carbohydrates • Cell wall polymers • Water deficit

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de <i>Paubrasilia echinata</i> , segregados em ocorrências naturais da espécie e registros de plantações cultivadas em outros Biomas brasileiros .....	26
Figura 2. Morfotipos de <i>Paubrasilia echinata</i> : morfotipo pequeno (A); morfotipo médio (B); morfotipo grande (C); os três morfotipos (D); Distribuição geográfica natural do morfotipo pequeno (círculos amarelos), morfotipo médio (círculos azuis) e morfotipo grande (círculo vermelho), adaptado .....	27
Figura 3: Polímeros constituintes do amido.....	31
Figura 4: Principais carboidratos solúveis de plantas superiores .....	33
Figura 5: Oligossacarídeos que normalmente são transcolados em plantas. ....	34
Figura 6: Principais açúcares álcoois presentes em tecidos vegetais .....	35
Figura 7: Rota de biossíntese de alditóis e ciclitóis em plantas .....	36
Figura 8: Composição da parede celular vegetal .....	37
Figura 9: Estrutura da celulose e a unidade de repetição da celobiose .....	38
Figura 10: Estruturas parciais das principais hemiceluloses .....	40
Figura 11: Monômeros de açúcares encontrados em paredes celulares vegetais....	41
Figura 12: Estruturas parciais das pectinas mais comuns .....	42
Figura 13: Principais monolignóis precursores da lignina .....	43
Figura 14: Processo de lignificação em células vegetais .....	44
<b>Capítulo 1</b> - Respostas fotossintéticas em morfotipos de <i>Paubrasilia echinata</i> tolerante ao sol e tolerante à sombra sob seca seguido de reidratação...51	
Figura 1. Umidade relativa do ar (UR%) e temperatura média, máxima e mínima (T °C) nas estufas onde foi conduzido o experimento. As medidas foram realizadas no período de 27/07 a 18/09 de 2018. Setas indicam os pontos de avaliação fisiológica das plantas. S = dias de suspensão hídrica e R = dias após a reidratação. ....	57
Figura 2: Potencial hídrico da antemanhã ( $\Psi_{wp}$ ) de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro	

padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey ( $P < 0.5\%$ )..... 62

Figura 3: Extravasamento de eletrólitos (*EE*) de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey ( $P < 0.5\%$ )..... 63

Figura 4: (A) Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  - *A*, (B) carbono interno - *C<sub>i</sub>*, (C) condutância estomática - *g<sub>s</sub>*, (D) eficiência da carboxilação -  $A/C_i$ , (E) transpiração - *E*, (F) eficiência do uso da água -  $A/E$  de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey ( $P < 0.5\%$ ). ..... 65

Figura 5: Correlação entre a condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) e potencial hídrico da antemanhã ( $\Psi_{wp}$ ) de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey ( $P < 0.5\%$ ). ..... 66

Figura 6: (A) Intensidade da fluorescência transiente da clorofila a (B) Fluorescência variável relativa -  $VOP = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$ , (C) Diferença cinética entre os pontos OP [ $\Delta VOP = (VOP(\text{Tratamento}) - VOP(\text{Controle}))$ ], (D) banda L [ $\Delta VOK = VOK(\text{Tratamento}) - VOK(\text{Controle})$ ], (E) banda K [ $\Delta VOJ = VOJ(\text{Tratamento}) - VOJ(\text{Controle})$ ], (F) Fase VIP expresso como [ $\Delta VIP = VIP(\text{tratamento}) - VIP(\text{controle})$ ], de folhas adaptadas ao escuro das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata*, no 17º dia de suspensão hídrica e 36º de reidratação em relação ao dia zero dos controles de cada morfotipo. Escala de tempo logarítmica (n=10). ..... 68

Figura 7: Análise multivariada de componente principal (PCA) das variáveis relativas a cada parâmetro do teste JIP em folhas de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). (A) distribuição das variáveis agrupadas por tempo de análise, (B)

Demonstração da representatividade de cada variável. Significado dos parâmetros fotoquímicos descritos na Tabela 1..... 69

Figura 8: Parâmetros derivados do Teste JIP dos transientes de fluorescência da clorofila *a*, de folhas adaptadas no escuro de plantas juvenis dos morfotipos pequeno (A) e médio (B) de *P. echinata*, no 17º dia de suspensão hídrica e 36º de reidratação. Todos os parâmetros foram normalizados em relação aos valores do dia zero dos controles (0% = 1.0). (\*) difere estatisticamente entre os tratamentos pelo teste Tukey ( $\alpha=0.05$ )..... 71

**Capítulo 2** – Dinâmica de carboidratos estruturais, não estruturais e lignina em plantas juvenis de dois morfotipos de *Paubrasilia echinata* sob déficit hídrico seguido de reidratação ..... 87

Figura 1: Potencial hídrico da antemãhã ( $\Psi_{wp}$ ) de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey ( $P<0.5\%$ )..... 101

Figura 2: Teores de glicose, frutose e sacarose de folha, caule e raiz de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* do controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Scott-Knott ( $P<0.5\%$ )..... 102

Figura 3: Teores de myo-inositol, rafinose e açúcares solúveis de folha, caule e raiz de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estadística entre os tratamentos e controle pelo teste de Scott-Knott ( $P<0.5\%$ )..... 104

Figura 4: Teores de amido, carboidratos não estruturais totais (*siglas em inglês* NSC<sub>T</sub>) e razão açúcares solúveis-NSC<sub>T</sub> (AS:NSC<sub>T</sub>) de folha, caule e raiz de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Scott-Knott ( $P<0.5\%$ )..... 105

Figura 5: Teores de hemicelulose, celulose e lignina de folha, caule e raiz de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0.5\%$ ).....	107
Figura 6: Variação relativa dos efeitos da seca e reidratação em relação aos controles na planta inteira dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> .....	109
Figura 7: Análise multivariada de componente principal-PCA (A,C,E) e correlação de Pearson (B,D,F) das variáveis relativas aos carboidratos não estruturais e polímeros da parede celular em folhas, caule e raízes de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). .....	110
Figura 8: Efeito da seca no decréscimo do $\Psi_{wp}$ folhar e sua correlação com as concentrações dos carboidratos não estruturais e polímeros de parede celular de folhas em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> tratadas com suspensão hídrica (seca).....	112
Figura 9: Efeito da seca no decréscimo das concentrações do amido no caule e sua correlação com a sacarose e os açúcares redutores (glicose e frutose) de caule em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> tratadas com suspensão hídrica (seca). .....	113
Figura 10: Correlação entre as concentrações de lignina com hemicelulose e celulose no caule em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> tratadas com suspensão hídrica (seca).....	113
Figura 11: Efeito da seca no decréscimo das concentrações de amido na raiz e sua correlação com a sacarose e os açúcares redutores (glicose e frutose) de raiz em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> tratadas com suspensão hídrica (seca). .....	114
Figura 12: Correlação entre as concentrações de lignina com hemicelulose e celulose na raiz em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de <i>P. echinata</i> tratadas com suspensão hídrica (seca).....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Capítulo 1</b> - Respostas fotossintéticas em morfotipos de <i>Paubrasilia echinata</i> tolerante ao sol e tolerante à sombra sob seca seguido de reidratação...51	
Tabela 1: Siglas, fórmulas e explanação dos parâmetros do teste JIP usados neste trabalho. ....	60
<b>Capítulo 2</b> – Dinâmica de carboidratos estruturais, não estruturais e lignina em plantas juvenis de dois morfotipos de <i>Paubrasilia echinata</i> sob déficit hídrico seguido de reidratação .....	87
Tabela 1: Lista de soluções utilizadas na sequência de lavagens para extração de lignina. Número de lavagens, volume (mL) e soluções. ....	99

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL .....	21
2.	OBJETIVO GERAL.....	24
3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
4.1	Aspectos descritivos e morfológicos de <i>Paubrasilia echinata</i> .....	25
4.2	Seca e fotossíntese.....	28
4.3	Papel dos carboidratos não estruturais na tolerância a seca .....	30
4.4	Relação dos polímeros da parede celular com o déficit hídrico .....	36
4.5	Referências bibliográfica.....	45
CAPITULO 1 – Respostas fotossintéticas em morfotipos de <i>Paubrasilia echinata</i> tolerante ao sol e tolerante à sombra sob seca seguido de reidratação... 51		
	RESUMO.....	51
1.	INTRODUÇÃO.....	53
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
2.1	Material vegetal .....	56
2.2	Delineamento experimental.....	57
2.3	Potencial da água na folha ( $\Psi_{wp}$ ) .....	58
2.4	Extravasamento de eletrólitos .....	58
2.5	Trocas gasosas .....	59
2.6	Fluorescência transiente (OJIP).....	59
2.7	Análise estatística.....	61
3.	RESULTADOS.....	61
3.1	Potencial hídrico .....	61
3.2	Extravasamento de eletrólitos .....	62
3.3	Trocas gasosas .....	63
3.4	Fluorescência transiente da clorofila a.....	66
4.	DISCUSSÃO .....	72
5.	CONCLUSÕES.....	79
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81

CAPITULO 2 – Dinâmica de carboidratos estruturais, não estruturais e lignina em plantas juvenis de dois morfotipos de <i>Paubrasilia echinata</i> sob déficit hídrico seguido de reidratação .....		87
	RESUMO.....	87
1.	INTRODUÇÃO.....	88
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	92
2.1	Material vegetal .....	92
2.2	Delineamento experimental.....	94
2.3	Potencial da água na folha ( $\Psi_{wp}$ ) .....	94
2.4	Carboidratos não estruturais .....	95
2.4.1	<i>Açúcares solúveis por HPAEC-PAD</i> .....	95
2.4.2	<i>Amido</i> .....	96
2.5	Polímeros de parede celular.....	97
2.5.1	<i>Celulose</i> .....	97
2.5.2	<i>Hemicelulose</i> .....	97
2.5.3	<i>Lignina</i> .....	99
2.6	Análise estatística.....	100
3.	RESULTADOS.....	100
3.1	Potencial hídrico .....	100
3.2	Carboidratos não estruturais .....	101
3.3	Polímeros de parede celular.....	106
3.4	Variações relativa dos efeitos, análises de PCA e correlações.....	108
4.	DISCUSSÃO .....	115
5.	CONCLUSÕES.....	122
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	124

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo da história da Terra, as alterações climáticas vêm causando profundo impacto nos recursos hídricos e florestais, na biodiversidade e na agricultura. Estudos climáticos indicam que as atuais concentrações atmosféricas globais de CO<sub>2</sub>, superiores a 400 ppm, aumentaram aproximadamente 43% em relação ao nível pré-industrial, estimado em 280 ppm na década de 1750 (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas-IPCC, 2014). Caso as emissões de gases do efeito estufa continuem a crescer, a temperatura da atmosfera do planeta poderá aumentar em até 4 °C até o final deste século (2071-2100).

Embora, aparentemente, essa elevação seja pequena, ela pode provocar eventos climáticos extremos. Dentre eles, a intensificação de secas e ondas de calor em algumas regiões, e maior frequência de chuvas ou frio em outras, abalando o funcionamento de ecossistemas terrestres e a biodiversidade vegetal (IPCC, 2018). No Brasil, existem projeções preocupantes para a região Nordeste da Mata Atlântica com redução de chuvas em 30-35% e elevação de temperatura de 3-4°C (Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas-PBMC, 2014).

A Mata Atlântica é considerada um dos 35 pontos *hotspots* da biodiversidade do mundo e um dos três pontos críticos da biodiversidade mais ameaçados e vulneráveis às mudanças climáticas (MITTERMEIER et al., 2005; BÉLLARD et al., 2014). Nesse bioma, a sobrevivência de suas espécies pode ser comprometida pela seca e o estresse térmico considerados os fatores ambientais mais limitantes da produtividade vegetal (FAHAD et al., 2017). Os cenários futuros mostraram tendência de perda de biodiversidade e mudanças na composição das comunidades florestais (CHOAT et al., 2012; ESSER et al., 2019), exceto para as espécies capazes de se adaptarem à seca e calor (ROSALES et al., 2012).

A capacidade das plantas em se adaptarem a diferentes ambientes está direta ou indiretamente associada à sua plasticidade morfofisiológica e bioquímica (ANJUM et al., 2011). Cabe ressaltar que, espécies com maior plasticidade fenotípica têm maior chance de sobreviver às variações intensas do ambiente (VALLADARES et al., 2014).

Em resposta a redução na disponibilidade de água, as plantas apresentam estratégias para superar o período de estresse. As respostas das plantas ao estresse

hídrico envolvem, normalmente, estratégias para evitar e/ou tolerar o déficit hídrico, podendo variar em nível interespecífico e até intraespecífico (CHAVES, 2002). Respostas em nível morfológico, fisiológico e bioquímico permitem a planta evitar e/ou tolerar o estresse, contribuindo para sua sobrevivência (SHAIK & RAMAKRISHNA, 2014; LAMAQUI et al., 2018). Plantas tolerantes a fatores estressantes desenvolveram estratégias para manter o crescimento sob baixa disponibilidade de água. No entanto, mesmo em plantas tolerantes à seca, o déficit hídrico pode afetar diversos processos fisiológicos, incluindo a fotossíntese com reflexo negativo no crescimento vegetal (WANG et al., 2016).

O déficit hídrico leva a fotoinibição das plantas, devido ao excesso de energia luminosa a ser absorvida, resultando em danos oxidativo nos complexos fotoquímicos, diminuindo a transferência de elétrons e declínio na assimilação de CO<sub>2</sub> (YI *et al.*, 2018). Sob seca, os fotossistemas FSI e FSII podem ser danificados, comprometendo a fotossíntese devido à inibição da produção de ATP (FLEXAS et al., 2006; PILON et al., 2018). Portanto, o déficit hídrico afeta o sistema fotossintético, limitando a assimilação de carbono, refletindo na acumulação, transporte e distribuição do carbono fotoassimilado (LAMAQUI et al., 2018; PILON et al., 2018).

A maior parte do carbono fotoassimilado é utilizado na respiração celular, sendo o excedente estocado na forma de carbono estrutural e temporariamente em não estrutural (MARTINEZ-VILALTA et al., 2016). Além de fonte energética, as moléculas ricas em carbono não estrutural (açúcares solúveis e amido) também estão envolvidas em reações de proteção contra ao estresse, especialmente o déficit hídrico (COUÉE et al., 2006).

Os açúcares solúveis (mono-, di- e trissacarídeos e oligossacarídeos) e o amido representam a maior fração de carbono não estrutural. O carbono estrutural é estocado na parede celular na forma de polímeros de carbono (celulose e hemicelulose) e de substâncias fenólicas como a lignina (BUCKERIDGE et al., 2008). A presença e deposição de lignina pode ser um componente chave da resposta da planta às variações ambientais intensas (VANHOLME et al., 2010; HAMANN, 2012).

Considerando a importância do carbono fotoassimilado para o metabolismo e crescimento vegetal, prever como os reservatórios de carbono de espécies florestais responderão às mudanças climáticas futuras, particularmente a seca, requer a compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de tolerância às condições

inibidoras do crescimento (CHOAT et al., 2012). Principalmente, em espécies da Mata Atlântica com hábitos ecológicos divergentes quanto a tolerância à exposição ao sol.

Uma arbórea tropical com esse perfil taxonômico e ecológico, é o pau-brasil [*Paubrasilia echinata* (Lam) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis], nativa da Mata Atlântica (LIMA, 2013). A espécie possui três morfotipos que diferem entre si quanto a ao tamanho da folha: pequeno, médio e grande (JUCHUM et al., 2008) e hábito ecológico em relação a intensidade da irradiância na fase inicial de crescimento (GAGNON et al., 2016; GAMA, 2017). O morfotipo pequeno é tolerante à sombra enquanto os morfotipos médio e grande são tolerantes ao sol (GAMA et al. 2020). Essa distinção ecológica intraespecífica dos morfotipos de *P. echinata* é singular em florestas tropicais úmidas, e torna-se bastante atraente para este tipo de pesquisas, por eliminar as divergências taxonômicas.

Destacamos que as projeções futuras para o clima indicam mudanças e reduções nos regimes de precipitação para a região Nordeste sob domínio da Mata Atlântica, com potenciais impactos na distribuição natural de *P. echinata* e na produção de florestas plantadas dessa espécie. Estudos indicam tendência de deslocamento da espécie para as terras altas do Sudeste brasileiro, e a perda de suas populações em diversas áreas ao longo da costa brasileira. Se as áreas protegidas de *P. echinata* persistirão no futuro é incerto (ESSER, SARAIVA & JARENKOW, 2019).

Considerando que plantas tolerantes ao pleno sol habitam ambientes menos úmidos em relação as plantas tolerantes a sombra (ROSSATO; KOLB, 2010), hipotetizamos que plantas dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* apresentem estratégias diferenciadas de tolerância ao déficit hídrico. Plantas do morfotipo tolerante ao sol devem exibir maior tolerância a simulação de seca, danos menos acentuados no processo da fotossíntese e maior capacidade de ajustes da alocação de carbono em relação às plantas do morfotipo tolerante à sombra. Na fase de simulação de chuva, espera-se que os dois morfotipos recuperem a capacidade fotossintética e ajustes do carbono não estrutural e estrutural. Mas com maior celeridade no morfotipo tolerante ao sol. Os resultados gerados servirão de subsídios na tomada de ações estratégicas para o manejo, conservação e recuperação da espécie.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas fotossintéticas e alocação de carbono não estrutural e estrutural em plantas dos morfotipos pequeno (tolerante a sombra) e médio (tolerante ao pleno sol) de *P. echinata* sob déficit hídrico severo seguido de reidratação.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o potencial hídrico ( $\psi_{wp}$ ) e extravasamento de eletrólitos (*EE*), bem como suas relações com as trocas gasosas em plantas dos morfotipos de *P. echinata* tolerante a sombra e tolerante ao pleno sol em resposta ao déficit hídrico seguido de reidratação.
- Avaliar as trocas gasosas e o desempenho da fluorescência transiente da clorofila *a* em plantas dos dois morfotipos de *P. echinata* na condição ambiental descrita anteriormente.
- Quantificar os teores dos polímeros da parede celular (celulose, hemicelulose e ligninas) em folhas, raiz e caule das plantas dos morfotipos de *P. echinata* tolerante a sombra e ao pleno sol sob déficit hídrico seguido de reidratação.
- Dosar os teores dos carboidratos não estruturais (açúcares solúveis e amido) nos órgãos vegetativos das plantas dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* sob simulação de seca seguida de chuva.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Aspectos descritivos e morfológicos de *Paubrasilia echinata*

O “pau-brasil” originalmente descrito como *Caesalpinia echinata* em 1785 por Lamarck, foi reclassificada no gênero *Paubrasilia* por Gagnon *et al.* (2016) em estudo filogenético baseado em marcadores ribossômicos e nuclear. O epíteto específico *echinata* se manteve, sendo seu nome atual *Paubrasilia echinata* (Lam) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis.

*P. echinata*, popularmente denominada pau-brasil, é uma espécie de importância econômica, ambiental e cultural, com significativo valor histórico para o país. São mais de 500 anos de exploração e extração da madeira para o mercado de corante só vindo a cessar sua exploração extrativista meados de 1800. Depois disso, a sua madeira passou a ser utilizada para confecção de arcos para instrumentos de corda de elevada qualidade e de reconhecimento internacional (LIMA, 2020; FRANCO & YOJO, 2008).

A espécie amplamente distribuída naturalmente na costa brasileira no período colonial, se restringiu na atualidade a pequenas populações naturais entre os estados Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro, com status de conservação *Em Perigo* (EN) (CNCFlora, 2012; LIMA, 2020). Seus principais habitats são: restinga alta em solo arenoso bem drenado, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila ou floresta pluvial (GAGNON *et al.*, 2016; LIMA, 2020). É típica da Mata Atlântica, bioma considerado um dos 35 *hotspots* da biodiversidade do mundo e um dos três pontos críticos da biodiversidade mais ameaçados e vulneráveis às mudanças climáticas (MYERS *et al.*, 2000; MITTERMEIER *et al.*, 2005; BÉLLARD *et al.*, 2014). Atualmente, é plantado em várias regiões do Brasil (Figura 1) para fins paisagísticos e de florestamento (ESSER, SARAIVA & JARENKOW, 2019).

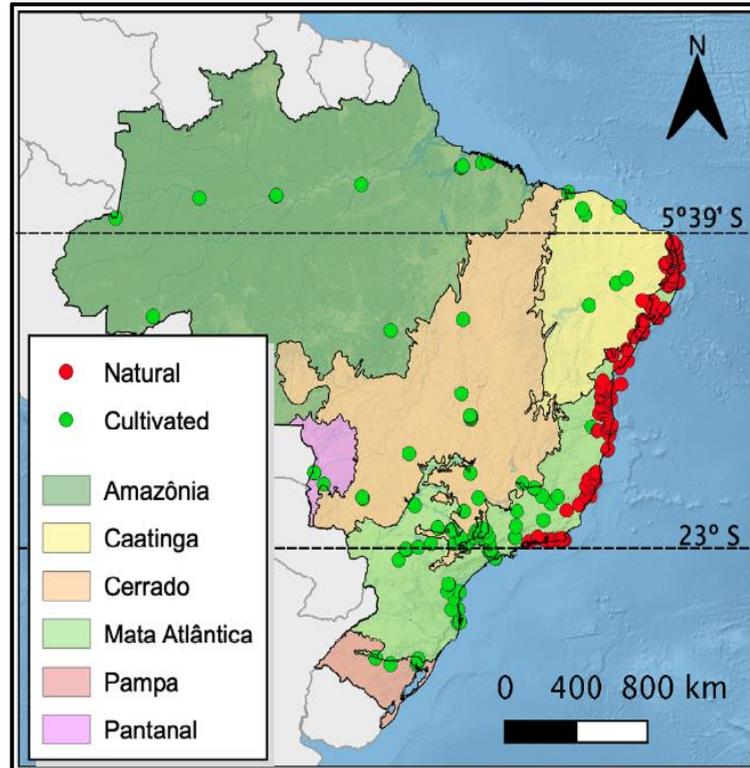


Figura 1. Distribuição de *Paubrasilia echinata*, segregados em ocorrências naturais da espécie e registros de plantações cultivadas em outros Biomas brasileiros (ESSER, SARAIVA & JARENKOW, 2019).

O pau brasil é uma árvore de porte médio alcançando entre 5-15 m de altura e 15-40 cm de diâmetro máximo de caule. Seu tronco é recoberto por acúleos e casca externa de coloração de marrom escuro a pardo-acinzentado. Apresenta uma copa densa constituída de folhas bipinadas, com inflorescências amarelo-ouro e uma mancha vermelho-púrpura numa das pétalas, sendo uma planta semidecídua (AGUIAR *et al.*, 2005; MEJIA & BUITRÓN, 2008). São reconhecidas populações com diferenças morfológicas quanto ao número, tamanho e forma dos folíolos, bem como no tamanho das flores. Atualmente, estão sendo realizados estudos para subsidiar a decisão de segregação de táxons específicos ou, até, em novas espécies dentro do gênero *Paubrasilia* (CNCFlora, 2012; GAGNON *et al.*, 2016; LIMA, 2020).

O grupo mais comum, chamado popularmente de “arruda” ou morfotipo folha pequena, apresenta os menores foliólulos (5-10 folíolos e 12-21 foliólulos) e área foliólular unitária (AFU) de 0,87 cm<sup>2</sup> em plantas jovens, com o cerne de coloração alaranjada, sendo encontrado em muitas localidades ao longo da costa brasileira (Figura 2). O segundo difere pouco do primeiro, apresentando foliólulos um pouco maiores (3-5 folíolos e 3-8 foliólulos) e AFU de 1,00 cm<sup>2</sup>, com cerne de coloração

laranja avermelhado, chamado popularmente de “café” ou morfotipo folha média. Deste último morfotipo são conhecidos apenas representantes no Rio de Janeiro, Espírito Santo e interior-sul da Bahia. O terceiro, chamado popularmente “laranja” ou morfotipo folha grande, apresenta foliólulos muito grandes e cerne vermelho escuro, sendo encontrado, até o momento, em apenas uma localidade no sul da Bahia (JUCHUM *et al.*, 2008; WERNER, 2009).

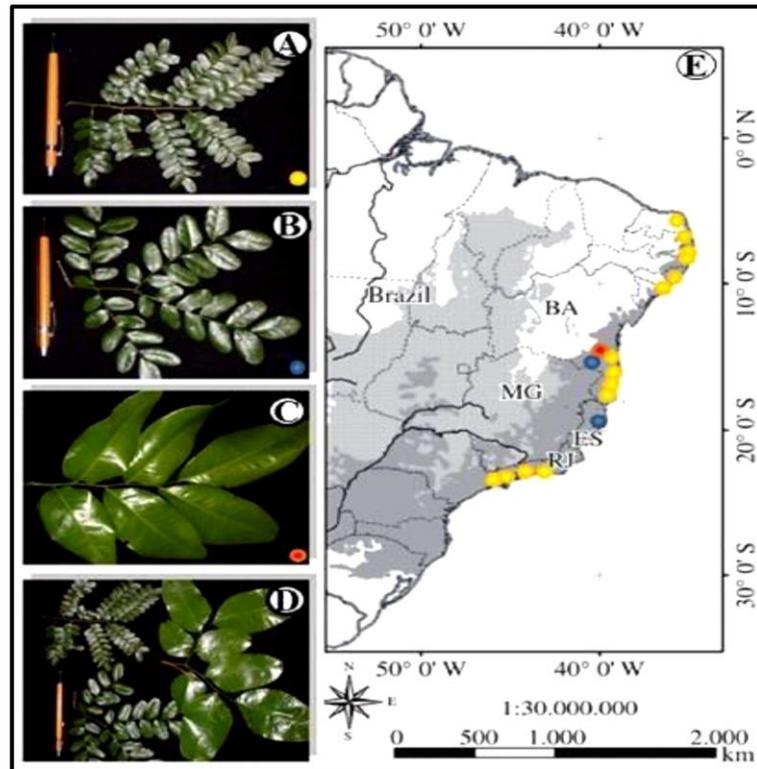


Figura 2. Morfotipos de *Paubrasilia echinata*: morfotipo pequeno (A); morfotipo médio (B); morfotipo grande (C); os três morfotipos (D); Distribuição geográfica natural do morfotipo pequeno (círculos amarelos), morfotipo médio (círculos azuis) e morfotipo grande (círculo vermelho), adaptado (JUCHUM, 2008; NEMÉSIO, 2013).

*P. echinata* pode ser classificada como espécie heliófila ou tolerante ao sombreamento moderado (esciófila) (AGUIAR *et al.*, 2005; MEJIA & BUITRÓN, 2008), semi-heliófila, ou classificada como clímax. Segundo Lima (1992), Lorenzi (2002) e Baroni (2005) a classificam como heliófila. Num estudo sob gradiente de radiação, Mengarda *et al.* (2012) classificaram o morfotipo pequeno como semi-heliófilo ou intermediário. Em contrapartida, Gama *et al.* (2020) classificaram o morfotipo pequeno como ombrófilo. Os mesmos autores classificaram o morfotipo médio como heliófilo, devido à elevada eficiência fotossintética e atividade antioxidante em pleno sol (Gama *et al.* 2019, 2020).

O pau-brasil possui crescimento lento e madeira com densidade média a alta. É cultivada como espécie paisagística em reflorestamento e restauração ecológica. Requer ciclos longos de 40 a 50 anos para atingir pelo menos 30 cm de diâmetro na altura do peito (DAP). Em populações plantadas, sua mortalidade é elevada chegando a 63% de perda em plantações jovens (< 5 anos) (ROLIM *et al.*, 2019).

Nas últimas duas décadas, diversas pesquisas foram realizadas sobre a ecofisiologia de *P. echinata*, compreendendo o seu comportamento em relação à intensidade e qualidade da irradiância (MENGARDA *et al.*, 2009, Mengarda *et al.* 2012, Galvão, 2018, Gama *et al.* 2019, 2020). Mais recentemente, outros aspectos microclimáticos como déficit de pressão de vapor (DPV) e temperatura na alocação do carbono fotoassimilado foi abordado em morfotipos de *P. echinata* (GASPARINI, 2019). Porém, quanto ao estresse hídrico, há uma grande lacuna de conhecimento sobre o efeito dessa condição ambiental nos processos fotossintéticos e na dinâmica do carbono não estrutural e estrutural em plantas dos morfotipos *P. echinata*.

#### **4.2 Seca e fotossíntese**

As plantas estão constantemente expostas às variações ambientais e sujeitas a períodos de estresses (ZARGAR *et al.*, 2017). A seca tem aumentado sua ocorrência e gravidade com as mudanças climáticas (LAMAQUI *et al.*, 2018), e é considerada o fator ambiental mais limitante do crescimento e produtividade das plantas, sendo uma ameaça real ao manejo sustentável (ZARGAR *et al.*, 2017; LAMAQUI *et al.*, 2018).

As plantas desenvolvem certos mecanismos ativados sob circunstâncias desfavoráveis ao metabolismo e crescimento (ZARGAR *et al.*, 2017). A seca desencadeia uma ampla variedade de respostas em níveis morfológico, fisiológico e bioquímico, permitindo que evitem e/ou tolerem tal condição adversa. Presume-se que existe uma ampla gama de sensibilidades nas respostas fisiológicas associadas ao estresse hídrico em nível interespecífico e intraespecífica nos diferentes ecossistemas (GRAY *et al.*, 2016). Ao menor estresse por seca, o rendimento fotossintético pode ser afetado reduzindo a produtividade vegetal.

Respostas específicas à seca variam entre os órgãos vegetais das plantas. Em um sentido amplo, o estresse hídrico faz com que as plantas invistam recursos no sistema radicular em detrimento dos órgãos da parte aérea. A seca causa declínio da atividade fotossintética e limita a assimilação de carbono nas plantas. No entanto, tem

sido discutido se a fotossíntese é inibida principalmente por fatores estomáticos ou não estomáticos (PILON *et al.*, 2018; LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2019).

Limitações não estomáticas podem ocorrer em situações de estresse hídrico associado a eficiência no transporte de água no xilema (VARELA, 2010), com reflexo na inibição da transpiração ( $E$ ). Outras limitações não estomáticas podem afetar a fotossíntese como mudanças na síntese de clorofila, mudanças funcionais dos cloroplastos e alterações nos processos de acumulação, transporte e distribuição de assimilados (ANJUM *et al.*, 2011; LAMAQUI *et al.*, 2018).

Fatores estomáticos compreendem as limitações estomáticas e mesofílicas. O processo de fechamento dos estômatos regulado pelo hormônio Ácido Abscísico inicia quando o mesofilo começa a sofrer desidratação. A limitação mesofílica é considerada uma das principais causas da inibição da assimilação do  $\text{CO}_2$  (MARTINS *et al.*, 2011). Sob déficit hídrico leve a moderado, a fotossíntese diminui devido ao decréscimo da pressão de turgescência, fechamento dos estômatos e redução da concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) no cloroplasto. Sob estresse hídrico moderado ou severo, os fotossistemas I e II (FSI e FSII) são afetados, com comprometimento na produção de ATP e atividade de Rubisco (FLEXAS *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2018).

Como a assimilação de  $\text{CO}_2$  é um grande sumidouro de energia luminosa absorvida, o estresse por seca pode levar a fotoinibição e danos oxidativos, devido ao excesso de energia luminosa a ser absorvida, resultando na diminuição do transporte de elétrons entre os complexos fotoquímicos conhecidos como fotossistemas FSI e FSII em virtude da degradação de proteínas e liberação de íons de magnésio e cálcio ligadas às proteínas (LAMAQUI *et al.*, 2018; YI *et al.*, 2018).

Os fotossistemas sobre déficit hídrico podem sofrer fotoinibição dinâmica e/ou crônica, sendo mais afetado o FSII (YI *et al.*, 2018). Na fotoinibição dinâmica a eficiência quântica decresce, em direção a dissipação de calor. Tal decréscimo é temporário e totalmente reversível. Na fotoinibição crônica se danifica o sistema fotossintético e diminui prolongadamente a eficiência quântica máxima. O local principal do dano de fotoinibição é a proteína D1 que faz parte do centro de reação do PSII. Esta proteína é facilmente danificada através do excesso de luz e então deve ser removida da membrana e substituída por uma cópia recentemente sintetizada (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009; LAMAQUI *et al.*, 2018; YI *et al.*, 2018).

A redução no transporte de elétrons pode provocar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's). A produção de superóxido ( $O_2^-$ ) pode dar origem à formação subsequente de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que por sua vez, pode reagir com os centros de redução do FSI constituídos de ferro-enxofre e gerar radicais hidroxila (HO) causadores de fotodanos no FSI (YI *et al.*, 2018). Porém, em algumas espécies, o transporte de elétrons cíclicos (TEC) possivelmente compensem a perda da capacidade de redução do FSI (WANG *et al.*, 2016). A dissipação de energia não fotoquímica regulada por luz, pode ser aumentada pelo TEC sob estresse hídrico. A ativação do TEC pode ser uma resposta fotoprotetora comum a vários fatores de estresse, impedindo a formação de ERO's em plantas submetidas déficit hídrico (ZHANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2016).

#### **4.3 Papel dos carboidratos não estruturais na tolerância a seca**

As plantas adquirem carbono por meio da fotossíntese e usam a maior parte dele como substrato para o metabolismo e crescimento. As reservas de carbono (C) da planta refletem o balanço de carbono entre a fotossíntese (ganho de carbono) e a respiração (uso de carbono) (DIETZE *et al.* 2014). Uma fração menor de carbono é retida na forma de compostos de carboidratos não estruturais (*sigla em inglês* NSC: açúcares solúveis e amido) que desempenha importante papel na tolerância das plantas a ambientes limitantes ao crescimento (MARTINEZ-VILALTA, 2016). Carboidratos não estruturais são importantes para as plantas em condições de estresse, podendo influenciar a disponibilidade de C para o crescimento, dependendo da estratégia de vida da espécie (DIETZE *et al.*, 2014).

Os NSC cumprem papéis funcionais distintos, incluindo transporte e armazenamento de fotoassimilados, metabolismo energético e proteção contra a restrição hídrica ao agirem como osmorreguladores (HARTMANN; TRUMBORE, 2016; SOUZA *et al.*, 2005). As oscilações dos NSC nas espécies vegetais refletem a sua dinâmica entre assimilação de C, crescimento e estresse em diferentes escalas de tempo ou por sazonalidade ambiental (VILALTA *et al.*, 2016).

Em situação de déficit hídrico, a concentração de carboidratos não estruturais pode ser alterada nos tecidos das plantas, onde atuam como um sinal metabólico ao estresse hídrico (HOCH, 2003) demonstrando sua relação com a resistência à seca (MARTINEZ-VILALTA *et al.*, 2016). Algumas espécies tolerantes à seca podem

aumentar os NSC visando ajustar o potencial hídrico e manter a pressão osmótica. No entanto, a seca severa pode causar disfunção fisiológica nas plantas, levando ao esgotamento dos NSC armazenados (HE et al., 2020)

O amido e os açúcares solúveis: sacarose, glicose e frutose, constituem mais de 80% do NSC em árvores (HOCH et al. 2003). O amido, por ser um composto insolúvel, é a reserva de carboidrato mais abundante nas plantas (TAIZ et al., 2017), sendo um composto de armazenamento, considerado transitório nas folhas ou de reserva de longo tempo nos órgãos drenos. É constituído por polímeros de glicose organizado em uma estrutura semicristalina tridimensional dando origem a um grânulo. A síntese de amido é realizada nos plastídios através da ação das enzimas amido sintetase (TRETHERWAY & SMITH, 2000). A vantagem do amido sobre os outros carboidratos é por ele ser osmoticamente inativo, permitindo que as plantas o acumulem em grandes quantidades (HARTMANN; TRUMBORE, 2016).

O amido pode ser quimicamente fracionado em dois tipos de polímeros (Figura 3): amilopectina e amilose. A amilopectina, maior componente do amido nas folhas, é uma macromolécula com estrutura ramificada, responsável pelo arranjo granular. A amilose corresponde à menor fração dos grãos de amido, com estrutura linear formada por resíduos de glicose, e sintetizada dentro da matriz da amilopectina (SOUZA et al., 2005).

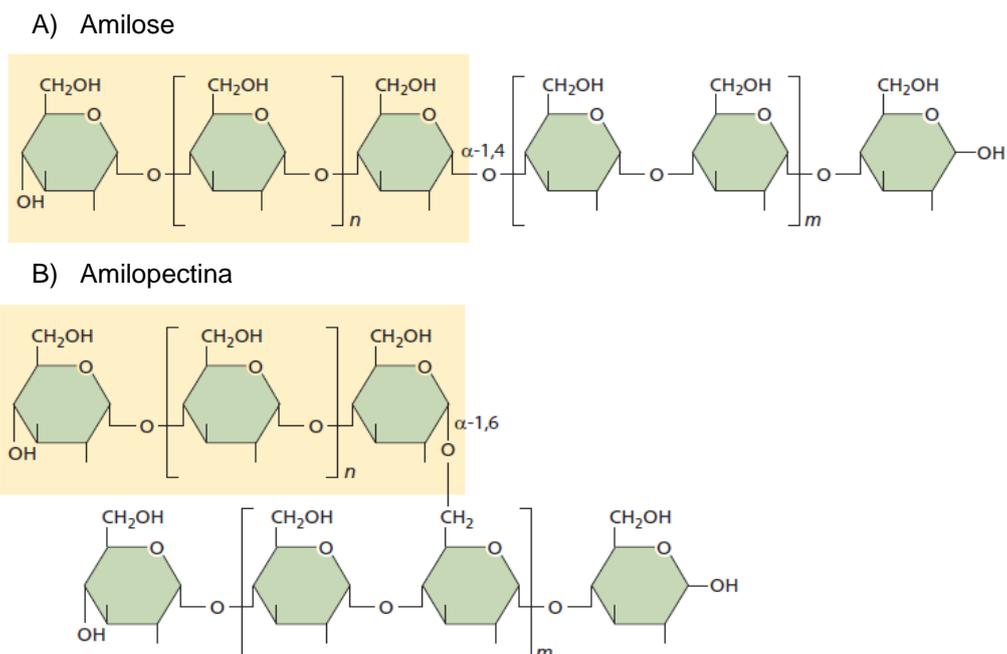


Figura 3: Polímeros constituintes do amido (SOUZA et al., 2005).

De acordo com sua função, o amido se divide em dois tipos: de reserva e transitório. O amido de reserva é acumulado em órgãos perenes e de dispersão, localizado em plastídios denominados amiloplastos. O amido transitório é sintetizado nos cloroplastos como resultado do excesso de carbono assimilado. A taxa de acúmulo de amido e a magnitude da variação no ciclo claro/escuro do dia variam de forma considerável. No período noturno, o amido transitório é quebrado em substratos que serão utilizados na síntese de sacarose. A sacarose fornecerá energia para as células fotossintetizantes e, após transporte, para as não fotossintetizantes (SMITH e STITT, 2007).

Uma proporção significativa do “pool” de amido pode sofrer depleção e contribuir para a sobrevivência das plantas em condições estressantes (MARTINEZ-VILALTA et al. 2016). As plantas remobilizam sua reserva de amido como parte da estratégia metabólica de mitigar o estresse abiótico (THALMANN; SANTELIA, 2017). Os açúcares solúveis (AS) liberados na hidrólise do amido realizam uma gama de funções visando a manutenção do crescimento e demandas energéticas para a respiração e defesa (MARTINEZ-VILALTA et al., 2016). Os AS estão envolvidos na sinalização de mudança ambiental (GIBSON, 2005), manutenção do turgor (HUMMEL et al., 2010), transporte do floema (SAVAGE et al., 2016) e, possivelmente, no reparo do xilema (SECCHI; ZWIENIECKI, 2011). Os AS podem ser reconhecidos como sinalizadores de estresse ou ainda serem alterados a partir da necessidade da planta de se aclimatar a uma nova condição ambiental (SMEEKENS, 2000).

A sacarose é um dissacarídeo composto de frutose e glicose (Figura 4). Devido a sua característica não redutora é menos susceptível à hidrólise. Possui um importante papel como açúcar de transporte (de curta e longa distância) entre os tecidos fonte-dreno nas plantas, sendo utilizada imediatamente no crescimento e na rota de transporte para reserva energética (LAMBERS et al., 2008; PIERRE et al., 2010). Outros açúcares como rafinose e estaquiose também são normalmente translocados (Figura 5) (TAIZ et al., 2017).

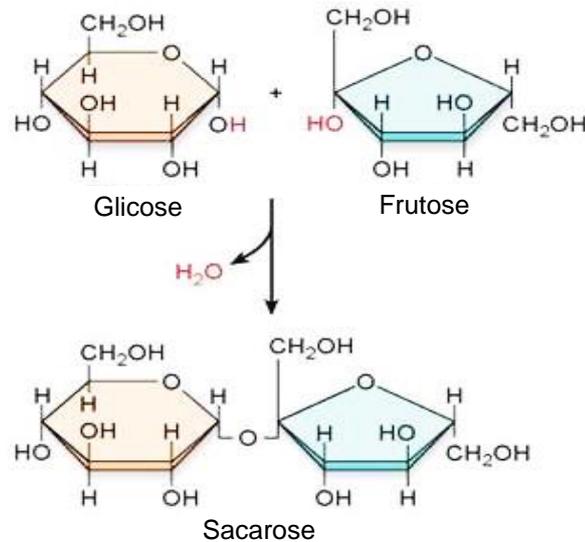


Figura 4: Principais carboidratos solúveis de plantas superiores

O desmembramento da sacarose em seus constituintes fornece precursores para síntese de celulose e hemiceluloses (NOVAES et al. 2010). A degradação de sacarose pode ocorrer pela ação de duas enzimas: sacarose sintase e invertase. A sacarose sintase catalisa a degradação reversível da sacarose gerando NDP-glucose e frutose e as invertases que catalisam a hidrólise irreversível da sacarose gerando glucose e frutose (MOLLE, 2009). A glicose e frutose ocorrem em todas as plantas vasculares. São unidades bases para a síntese de oligo- e polissacarídeos. Esses monômeros derivam da hidrólise de seus ésteres fosfato, como também podem ser hidrolisados da sacarose, amido e frutanos (SOUZA et al., 2005).

Outros açúcares em menor concentração como os oligossacarídeos derivados de rafinose e açúcares álcoois (os ciclitóis e alditóis) também podem ser encontrados em plantas. A rafinose é um trissacarídeo e forma uma série homóloga, da qual a estaquiase é o tetrassacarídeo. Esses dois oligossacarídeos podem estar presentes no transporte via floema em algumas espécies arbóreas (HARTMANN; TRUMBORE, 2016; VERNON et al. 1993). Estruturalmente, a rafinose, a estaquiase e a verbascose contêm sacarose ligada a uma, duas ou três moléculas de galactose, respectivamente (Figura 5) (TAIZ et al., 2017).

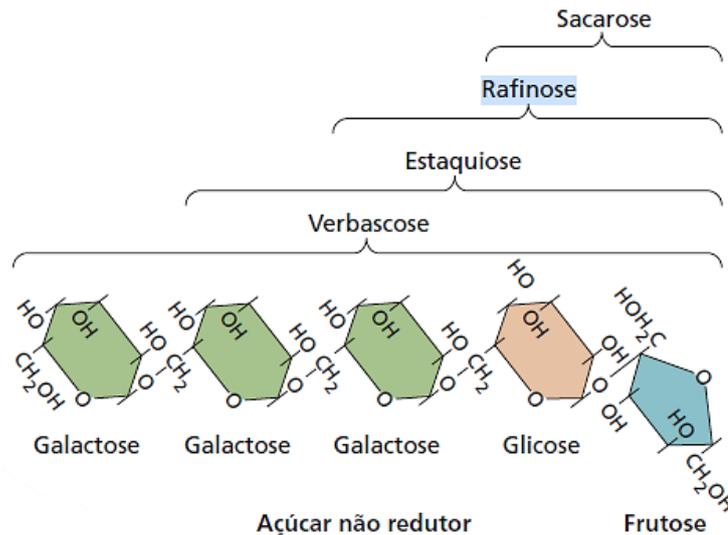


Figura 5: Oligossacarídeos que normalmente são transcolados em plantas (TAIZ et al., 2017).

A rafinose é de ampla ocorrência em vegetais superiores, sendo encontrada principalmente em folhas, caules e órgãos de reserva. A concentração de rafinose em folhas é muito baixa. Mesmo assim, em algumas espécies é translocada para órgãos dreno onde podem se acumular em elevadas concentrações nos tecidos de reserva (SOUZA et al., 2005). Oligossacarídeos da série da rafinose (RFO: *Raffinose Family oligosaccharides*) podem ser acumulados em resposta à desidratação e atuam como osmorreguladores celulares durante a seca, sugerindo o envolvimento de rafinose na aquisição de tolerância à dessecação, isto, muito estudado em sementes (TAJI et al., 2002; SUGUIYAMA et al., 2014).

Os açúcares álcoois (Figura 6), também chamados de polióis, álcoois poliídricos ou poliálcoois, se apresentam em duas formas: acíclicas (alditóis) e cíclicas (ciclitóis) (DUMSCHOTT et al., 2017). Os alditóis como o manitol e sorbitol, são os mais comuns, tendo como precursor a frutose-6P. Os ciclitóis como o *mio*-inositol, são sintetizados a partir de D-glicose-6P (Figura 7). A maioria dos ciclitóis são produzidos a partir do *mio*-inositol sendo um dos mais comuns o pinitol (1-D-3-O-methyl chiro-inositol) (SZABADOS, et al., 2011). O *mio*-inositol também forma a base para os fosfatos de inositol, ascorbato, oligossacarídeos da série rafinose e biossíntese de fosfolípidios (SZABADOS, et al., 2011; DUMSCHOTT et al., 2017).

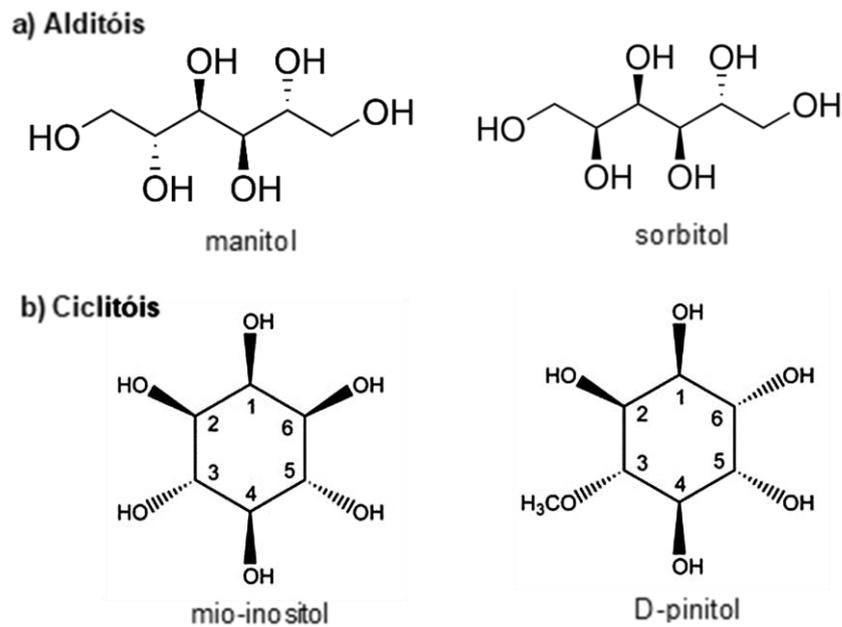


Figura 6: Principais açúcares álcoois presentes em tecidos vegetais (DUMSCHOTT et al., 2017)

Em geral, os polióis se acumulam no citosol (Figura 7). São metabólitos de baixo peso molecular encontrados em vários tecidos e órgãos vegetais, incluindo a madeira. Atuam como osmólitos minimizando os efeitos nocivos do estresse hídrico e salinidade (CHAVES E OLIVEIRA, 2004). O acúmulo de polióis foi detectado em várias espécies sob estresse hídrico (SZABADOS, et al., 2011). Atribui-se aos osmólitos a função de ajuste osmótico e proteção de macromoléculas (como as enzimas), tanto pela estabilização das membranas quanto pela eliminação de ERO's produzidas durante a seca (VERNON et al. 1993; CHAVEZ, 2004; SZABADOS, et al., 2011).

Os ciclitóis são altamente solúveis, não reativos e metabolicamente inertes. Essas qualidades permitem que eles sejam acumulados em altas concentrações sem interferir nas estruturas celulares e no metabolismo. Altas concentrações de pinitol e de ononitol são encontradas em várias espécies de plantas tolerantes ao estresse abiótico (VERNON et al. 1993; CHAVEZ, 2004).

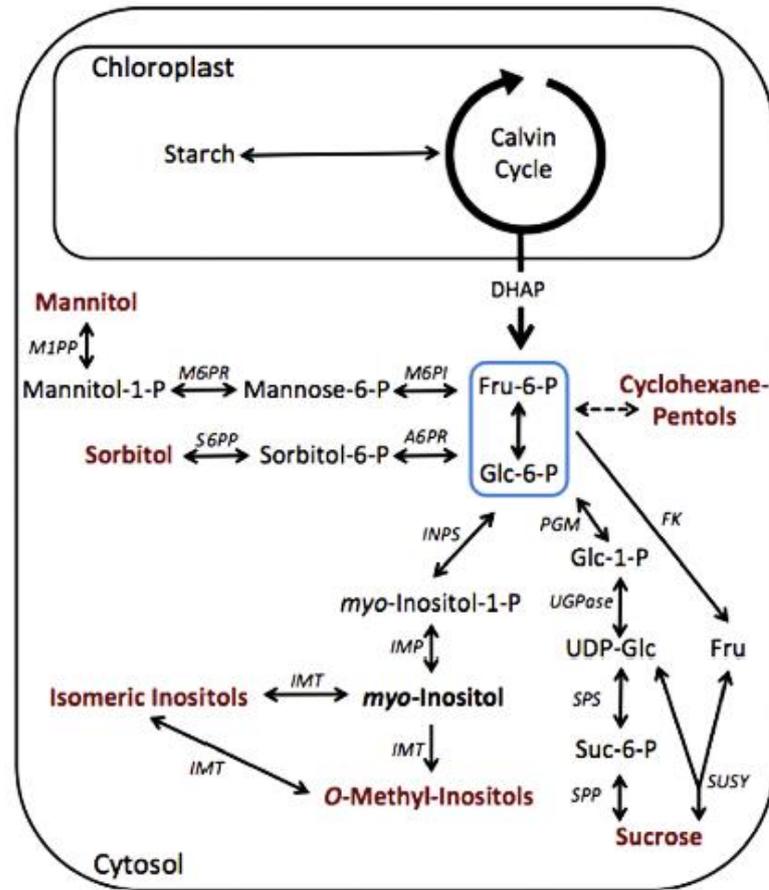


Figura 7: Rota de biossíntese de alditóis e ciclitóis em plantas (DUMSCHOTT et al., 2017).

#### 4.4 Relação dos polímeros da parede celular com o déficit hídrico

Na tolerância vegetal, o ajustamento da parede celular sob condições de estresse hídrico é um fenômeno importante, compreendendo mecanismos complexos, com diferenças interespecíficas e até entre os órgãos vegetais (HAMANN, 2012). As paredes das células vegetais são redes poliméricas dinâmicas que conferem estabilidade estrutural às células, proteção contra estresse biótico e abiótico, permeabilidade e funções regulatórias durante o crescimento (BERGLUND et al., 2020).

A parede celular determina o tamanho e a forma das células por meio do controle mecânico da expansão celular. Os polímeros estruturais são os principais constituintes da parede celular vegetal (~90%), particionados em celulose (35–50%), hemiceluloses (15–35%), lignina (15–35%) e pectinas (<10%) (CARPITA; MCCANN, 2000; WILDHAGEN et al. 2018). Os polissacarídeos estruturais (celulose e hemicelulose) compreendem longas cadeias compostas por moléculas de açúcares

ligadas covalentemente em variadas posições, podendo apresentar ramificações de diversos comprimentos (CARPITA; MCCANN, 2000).

São observados dois tipos de parede celular vegetal: a primária e a secundária (Figura 8), diferindo entre si nas composições químicas e de acordo com as fases do desenvolvimento celular. A parede celular primária está localizada externamente à membrana plasmática e é sintetizada durante o crescimento celular. É composta por microfibrilas de celulose interligadas por hemiceluloses, pectinas e proteínas estruturais. As paredes celulares primárias devem mostrar desempenho biomecânico elástico e plástico para suportar a pressão e permitir a extensão celular (BERGLUND et al., 2020; KELLY et al., 2021).

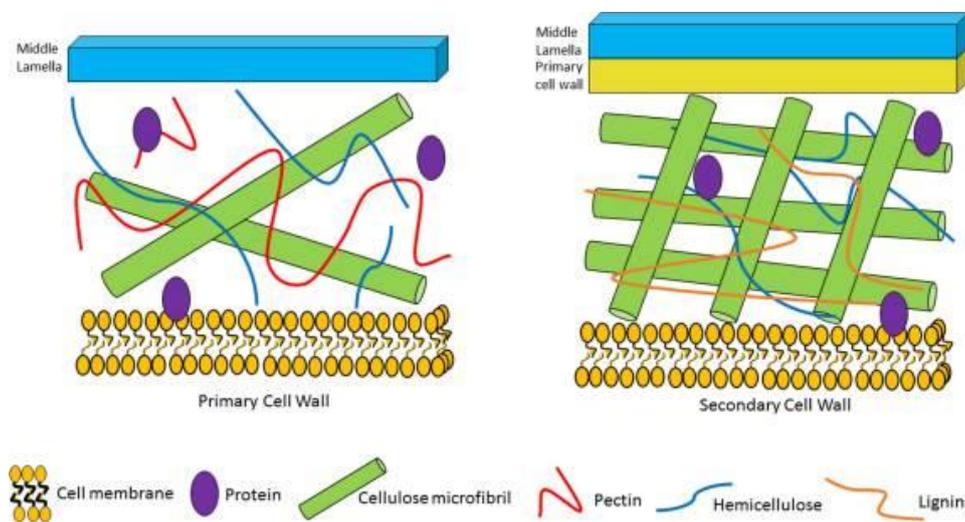


Figura 8: Composição da parede celular vegetal (KELLY et al., 2021).

A parede celular secundária está localizada entre a parede celular primária e a membrana plasmática. Se diferencia da parede primária por apresentar uma estrutura com múltiplas lamelas, com maior conteúdo de microfibrilas de celulose orientadas em uma matriz de hemiceluloses e lignina, proporcionando resistência à compressão e tração, tenacidade e rigidez (BERGLUND et al., 2020).

Segundo Moore (2008), o déficit de água reduz as pontes de hidrogênio com o meio aquoso e amplia as interações entre os polissacarídeos, alterando as propriedades biofísicas da parede celular e diminuindo o crescimento vegetal. A baixa pressão de turgor influenciada por estresse hídrico pode levar a redução ou cessação do crescimento, diminuindo a extensibilidade e expansão da parede celular (LE GALL et al., 2015). Porém, mínima atenção tem sido dada para as mudanças na composição da parede celular de plantas que sofreram estresse hídrico (MOORE et al., 2008).

A celulose representa cerca de 30% da massa seca de paredes celulares primárias. Em parede secundária esse valor pode chegar até 60% (MEENTS, 2018). Devido à relativa resistência às mudanças químicas, baixa solubilidade e considerável resistência à tração, a celulose tem ampla gama de aplicações industriais (CHOONG et al., 2016). Celulose é composta por cadeias de unidades lineares simples (1->4)- $\beta$ -D-glicose (Glc), associadas por múltiplas ligações de hidrogênio para formar microfibrilas (Figura 9) (HÖFTE; VOXEUR, 2017).

A capacidade da celulose em formar pontes de hidrogênio desempenham um papel importante no empacotamento desse polímero. Os monômeros de glicose individuais de celulose são frequentemente referidos como unidades de anidroglicose (AGU) na celobiose (Figura 9). Em uma extremidade do polímero, o carbono anomérico está envolvido em uma ligação glicosídica (fim não redutor). Na outra extremidade do polímero, o carbono anomérico está livre para se converter em uma estrutura de aldeído (fim redutor). Essa polaridade química da cadeia de celulose é importante quando se trata de suas diferentes estruturas cristalinas (OLSSON; WESTMAN, 2013).

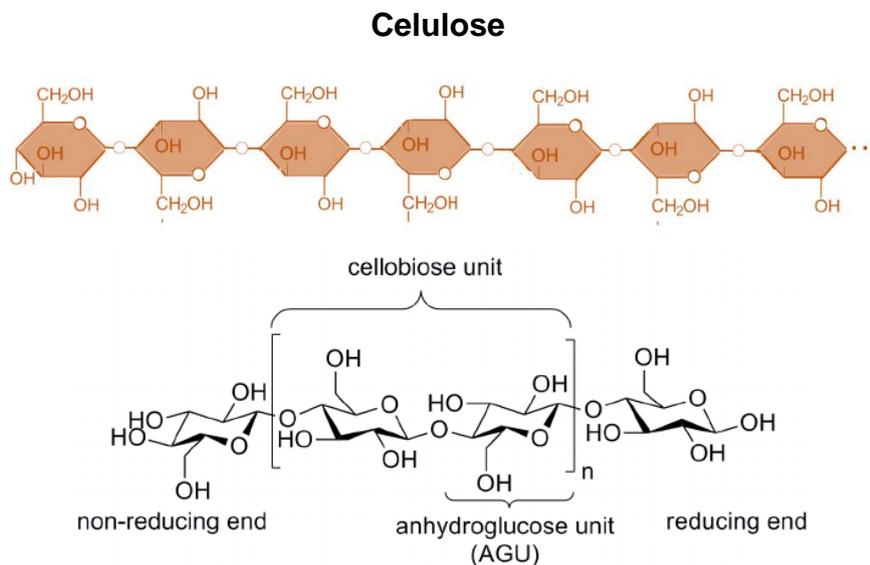


Figura 9: Estrutura da celulose e a unidade de repetição da celobiose (OLSSON; WESTMAN, 2013; HÖFTE; VOXEUR, 2017).

A celulose quando hidrolisada por ácidos ou enzimas, produz monômeros de glicose. A linearidade da molécula, juntamente com a disposição antiparalela de duas cadeias de celulose, facilita a formação de inúmeras pontes de hidrogênio entre as hidroxilas das moléculas de glicose, impedindo fortemente a hidratação do

polissacarídeo. Além disso, participa da sinalização e do reconhecimento entre células, armazena compostos de reserva e moléculas reguladoras que controlam variados processos fisiológicos celulares e mecanismos de proteção contra microrganismos (BUCKERIDGE et al., 2008).

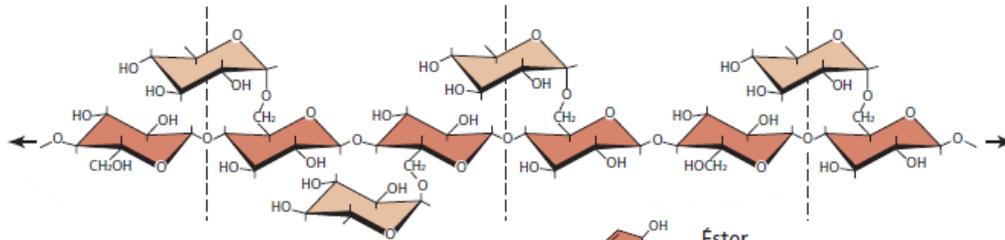
Segundo Le Gall et al. (2015), a biossíntese de celulose em algumas espécies pode ser reduzida em resposta ao déficit hídrico. A redução da força tensil da parede celular pode estar associada à substancial redução de celulose. Portanto, a diminuição da expansão celular por estresse osmótico pode estar ligada às mudanças na composição química da parede celular (IRAKI, 1989). No entanto, o aumento da síntese de celulose pode fornecer integridade à parede celular e manter a pressão de turgidez celular, permitindo o crescimento das células sob potenciais hídricos baixos (RICARDI et al., 2014). Em estudo com algodão sob estresse hídrico, observou-se aumento na expressão da sacarose sintase e do gene UDP-glicose pirofosforilase, sugerindo biossíntese de celulose sob tais condições limitantes ao crescimento (CHENG et al., 2014).

As hemiceluloses são tipicamente heterogêneas em termos de composição e ramificação do açúcar. As hemiceluloses são sintetizadas no complexo de Golgi e constituem 10-40% da parede celular secundária (MEENTS, 2018). A heterogeneidade molecular das hemiceluloses é fundamental na modulação das interações com microfibrilas de celulose e a ocorrência de ligações covalentes com a lignina (BERGLUND et al., 2020).

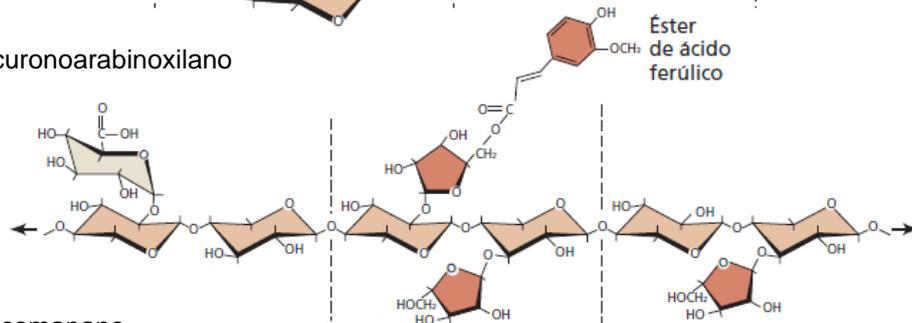
As hemiceluloses (Figura 10) são uma família de biopolímeros complexos que compartilham com a celulose uma estrutura  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4), compreendendo monômeros de açúcares neutros (glicose, xilose e manose, e ácido urônico) (Figura 11), quimicamente modificada por acetilação (HÖFTE; VOXEUR, 2017; BERGLUND et al., 2020). A hemicelulose dominante nas paredes celulares primárias da maioria das plantas terrestres é o xiloglucano. Paredes secundárias de tecidos lenhosos contêm pouco xiloglucano ou pectina. Em vez disso, os polissacarídeos da matriz são principalmente xilanos e glucomananos. Em lenhos de gimnospermas, a maioria das hemiceluloses são glucomananos, com menores quantidades de arabinoxilano (TAIZ et al., 2017).

## Hemicelulose

### A) Xiloglucano



### B) Glucuronoarabinoxilano



### C) Glucomanano

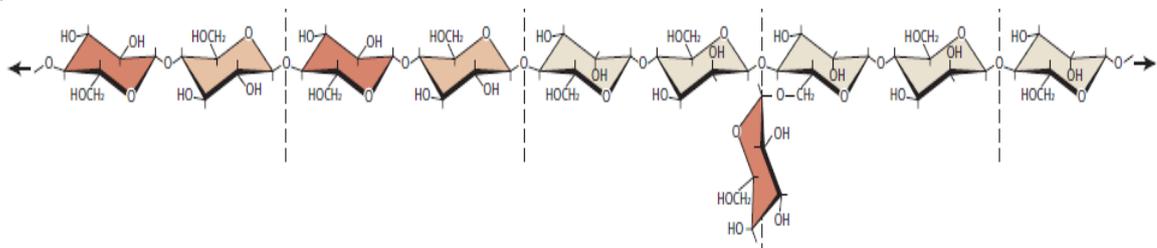


Figura 10: Estruturas parciais das principais hemiceluloses (TAIZ et al., 2017).

As hemiceluloses do tipo xilano (glucuronoarabinoxilano) unem-se por ligações cruzadas com as microfibrilas de celulose e lignina, originando o complexo lignina-carboidratos (LAWOKO et al., 2006). As hemiceluloses da madeira exibem contribuições biomecânicas distintas e podem estar relacionados à estrutura molecular distinta das xilanas e mananas da madeira, e a os efeitos agregativos entre as fibrilas revestidas com hemicelulose. As glucomananas podem aumentar o módulo de elasticidade na compressão enquanto as xilanas podem contribuir para um aumento significativo no alongamento de ruptura sob tensão da madeira (BERGLUND et al., 2020).

Uma característica comum de algumas espécies vegetais sob déficit hídrico é a biossíntese aumentada de xiloglucanos em raízes, indicando um papel das hemiceluloses na manutenção do crescimento e melhora na tolerância à seca (LE GALL et al., 2015). Entre as funções atribuídas às hemiceluloses encontram-se o equilíbrio das forças de tensão sofrida pelas paredes e o controle do crescimento celular (BUCKERIDGE et al., 2008). Além disso, regulam a agregação das

microfibrilas de celulose (BERGLUND et al., 2020), podendo ser remobilizadas, funcionando como reserva energética (SCHÄDEL et al., 2010).

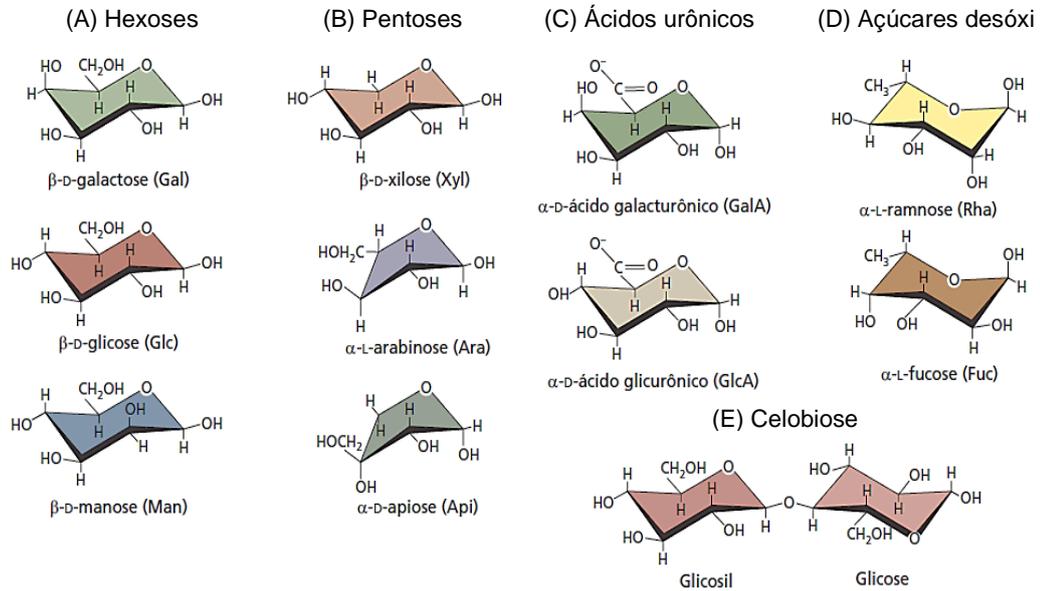


Figura 11: Monômeros de açúcares encontrados em paredes celulares vegetais (TAIZ et al., 2017).

Os polissacarídeos ácidos altamente hidratados denominados pectinas estão embebidos nas microfibrilas de celulose e hemiceluloses, porém não estando ligadas covalentemente a elas. Sua principal função é a determinação da porosidade da parede, alterações de carga que modulam o pH e o balanço de íons (CARPITA; MCCANN, 2000). Portanto, as pectinas demonstraram desempenhar um papel fundamental na modulação da estrutura da parede celular em resposta ao estresse hídrico. Em particular, homogalacturonano (HG), que provavelmente é um elemento chave no controle da rigidez e do estado de hidratação da matriz péctica, sendo determinante na tolerância durante o estresse hídrico seca (LE GALL et al., 2015).

O homogalacturonano é constituído de ligações (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-ácido galacturônico (Figura 12), com unidades de ramnose que podem interromper a cadeia, dando origem a longas ramificações com galactanos e arabinanos (BUCKERIDGE et al., 2008; TAIZ et al., 2017). O ramnogalacturonano é um domínio péctico muito grande, com uma cadeia principal alternando galacturônico e (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-ramnose. As cadeias laterais estão ligadas à ramnose e são compostas principalmente de arabinanos, galactanos e arabinogalactanos (TAIZ et al., 2017).

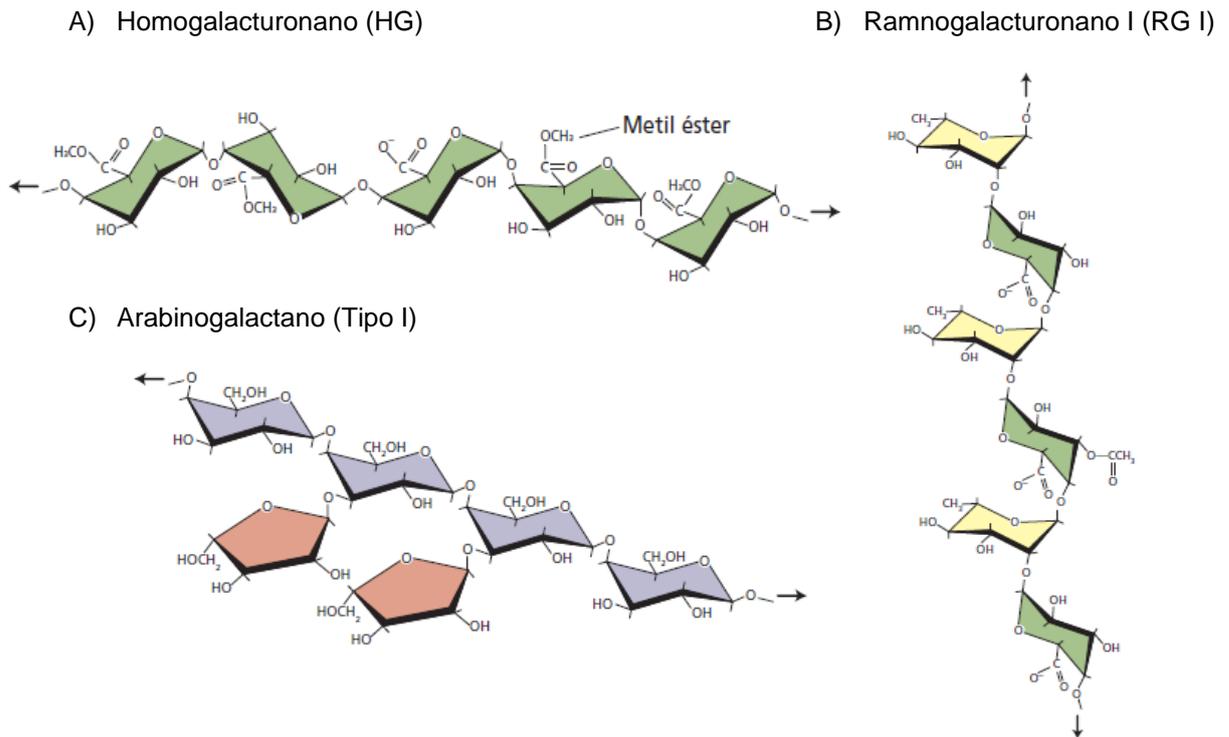


Figura 12: Estruturas parciais das pectinas mais comuns (TAIZ et al., 2017).

A lignina é encontrada nas paredes celulares de diversos tipos de tecidos de sustentação e vasculares. O sistema condutor de água (xilema), constituído por fibras, traqueídes e elementos de vaso que possuem paredes secundárias espessadas, reforçadas e impermeáveis pela presença da lignina. A lignina é depositada, sobretudo, no espessamento da parede secundária, mas também pode ocorrer na parede primária e lamela média, em contato com a celulose e hemicelulose (TAIZ et al., 2017).

Durante a formação da parede celular secundária, os monolignóis precursores da lignina, são secretados no espaço da parede celular e reticulados aleatoriamente por meio de polimerização oxidativa (LE GALL et al., 2015). A composição da lignina varia entre as espécies, dentro da espécie e também na mesma planta, pois há variações de célula para célula de acordo com a localização da parede celular, conforme a fase de desenvolvimento (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

As ligninas vegetais são compostas por três tipos de núcleos aromáticos ou unidades - guaiacil (G), siringil (S) e *p*-hidroxifenol (H) (Figura 13). Na maioria das espécies, a lignina é uma mistura das três unidades. Porém, isso pode variar no desenvolvimento das espécies. E podem ser classificadas como G-ligninas (de madeiras macias), GS-ligninas (de madeiras duras), GSH-ligninas (de gramíneas) ou GH-ligninas (de madeira de compressão) (TAIZ et al., 2017; AGARWAL, 2019).

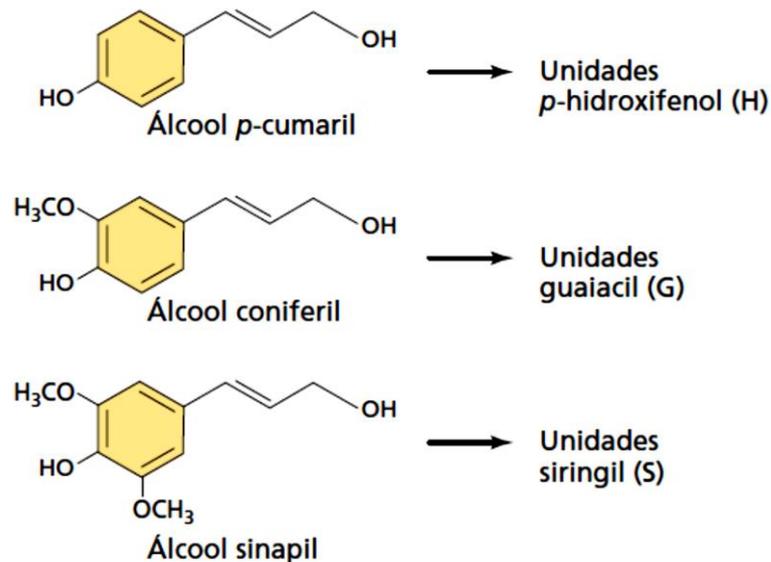


Figura 13: Principais monolignóis precusores da lignina (TAIZ et al., 2017).

As unidades da lignina são derivadas de três monolignóis (álcoois: *p*-cumaril, coniferil e sinapil) que são sintetizados através da via de fenilpropanoides no citoplasma da célula (Figura 14). Os monolignóis são oxidados a radicais por peroxidases depois que elas passam por reações de acoplamento radical puramente químico para gerar os polímeros de lignina, num processo denominado de lignificação (SIMON et al., 2018). A lignificação, proporciona rigidez e hidrofobicidade, evitando o inchaço das paredes secundárias da água, fundamental para as necessidades de condução de água nos tecidos vasculares (BERGLUND et al., 2020).

Moura et al. (2010) sugere que estresses abióticos como baixas temperaturas e deficiência hídrica, podem ser determinantes no aumento da concentração de lignina. Portanto, o processo de lignificação reforça a resistência e rigidez das paredes celulares, destacando-se como um componente chave da resposta da planta à seca (LE GALL et al., 2015).

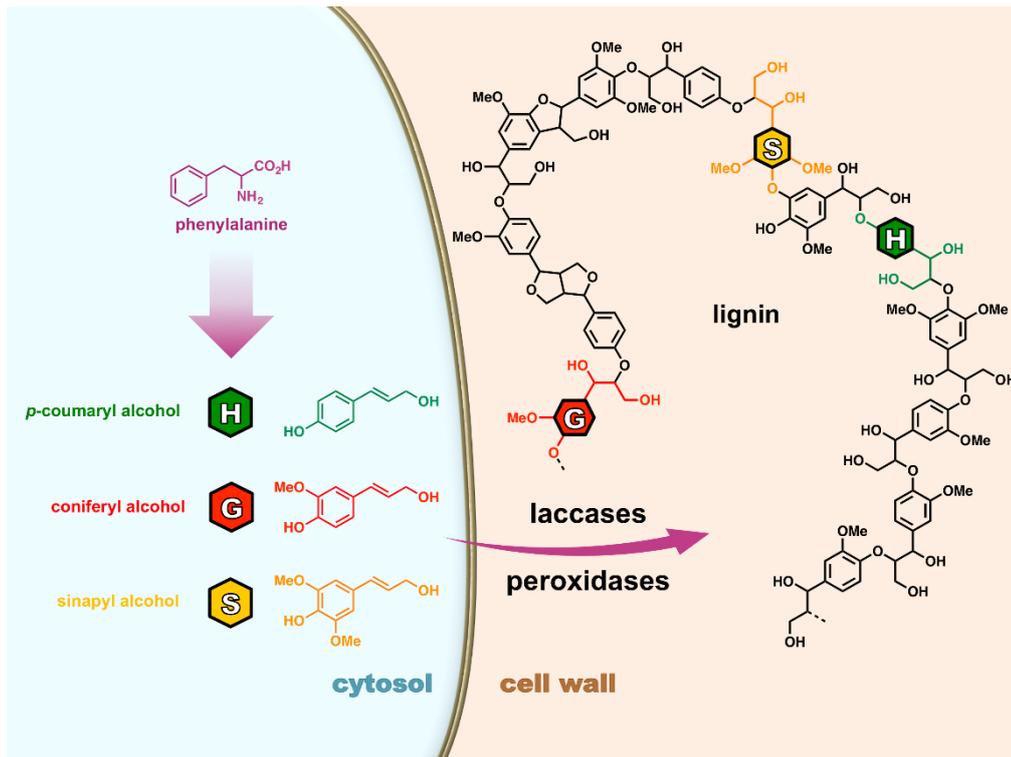


Figura 14: Processo de lignificação em células vegetais (SIMON et al., 2018).

#### 4.5 Referências bibliográfica

- AGARWAL U. P. Analysis of Cellulose and Lignocellulose Materials by Raman Spectroscopy: A Review of the Current Status. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(9). 2019.
- AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; TAVARES, A. R.; PINTO, M. M.; STANCATO, G. C.; AGUIAR, J.; DO-NASCIMENTO, T. D. R. Germinação de sementes e formação de mudas de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil): Efeito de sombreamento. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.29, n.6, p.871-875, 2005.
- ANJUM, S.A.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M.F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, vol. 6(9), pp. 2026-2032, 2011.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 7, p. 463-472, 2009.
- ARENQUE, B.C.; GRANDIS, A.; POCIUS, O.; DE SOUZA, A.P.; BUCKERIDGE, M.S. Responses of *Senna reticulata*, a legume tree from the Amazonian floodplains, to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration and waterlogging. *Trees, Structure and Function*, v. 28, n. 4, p. 1021-1034, 2014.
- BALDUCCI L., DESLAURIERS A., GIOVANNELLI A., BEAULIEU M., DELZON S., ROSSI S., RATHGEBER C.B.K. How do drought and warming influence survival and wood traits of *Picea mariana* saplings. *J. Exp. Bot.* 2015.
- BÉLLARD C.; LECLERC C.; LEROY B.; BAKKENES M.; VELOZ S.; THUILLER W.; COURCHAMP F. Vulnerability of biodiversity hotspots to global change. *Global Ecology & Biogeography*, vol 23: 1376–1386, 2014.
- BERGLUND, J., MIKKELSEN, D., FLANAGAN, B. M., DHITAL, S., GAUNITZ, S., HENRIKSSON, G., LINDSTRÖM, M. E., YAKUBOV, G. E., GIDLEY, M. J., & VILAPLANA, F. Wood hemicelluloses exert distinct biomechanical contributions to cellulose fibrillar networks. *Nature communications*, 11(1). 2020.
- BUCKERIDGE, M. S.; CAVALARI, A. A.; SILVA, G. B. Parede Celular. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 165-181. 2008.
- CARPITA, N; MCCANN, M. Cell wall. In: *Biochemistry & molecular biology of plants* (eds.) B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. American Society of Plant Physiologists. p. 52-108. 2000.
- CHAVES, M.M., PEREIRA, J.S., MAROCO, J., RODRIGUES, M.L., RICARDO, C.P.P., OSÓRIO, M.L., CARVALHO, I., FARIA, T., PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. *Photosynthesis and growth*. *Annals of Botany*, vol. 89, p. 907-916, 2002.
- CNCFlora. *Caesalpinia echinata* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Caesalpinia\\_echinata](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Caesalpinia_echinata)>. Acesso em 05 novembro, 2019.
- CHOONG, F. X., BÄCK, M., STEINER, S. E., MELICAN, K., NILSSON, K. P., EDLUND, U., & RICHTER-DAHLFORS, A. Nondestructive, real-time determination and visualization of cellulose, hemicellulose and lignin by luminescent oligothiophenes. *Scientific reports*. 2016.

- CHOAT, B., JANSEN, S., BRODRIBB, T. et al. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491, 752–755, 2012.
- DIETZE, M. C., A. SALA, M. S. CARBONE, C. I. CZIMCZIK, J. A. MANTOOTH, A. D. RICHARDSON, AND R. VARGAS. Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology* 65:667–687. 2014.
- DUMSCHOTT, K.; ICHTER, A.; LOESCHER, W.; MERCHANT, A. Post photosynthetic carbon partitioning to sugar alcohols and consequences for plant growth. *Phytochemistry*, 144: 243-252, 2017.
- ESSER, L; SARAIVA, D; JARENKOW, J. Future uncertainties for the distribution and conservation of *Paubrasilia echinata* under climate change. *Acta Botanica Brasílica* - 33(4): 770-776, 2019.
- FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; HENKLE, M.; MARTÍNEZ-CAÑELLAS, S.; MEDRANO, H. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist*, vol.172(1), pp.73-82, 2006.
- FRANCO, N. & YOJO, T. Propriedades físicas, mecânicas e acústicas da madeira de Pau-brasil. In: R.C.L.F. Ribeiro, C.J. Barbedo, E.S. Alves, M. Domingos & M.R. Braga (orgs.). Pau-brasil, da semente à madeira conhecer para conservar. Instituto de Botânica, São Paulo, pp146-157, 2008.
- GALVÃO, E.K.S. Condições climáticas e comportamento ecofisiológico de espécies florestais. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2018.
- GAMA, V.N. Caracterização morfofisiológica e bioquímica de três morfotipos de *Paubrasilia echinata* Lam. Exposta a condições de irradiância. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.
- GAGNON, E.; BRUNEAU, A.; HUGHES, C.E.; QUEIROZ, L.P.; LEWIS, G.P. A new generic system for the pantropical Caesalpinia group (Leguminosae). *PhytoKeys*, v.71, p.1–160, 2016.
- GASPARINI, X.S.D. Alocação de carbono e resposta oxidante em dois morfotipos de *Paubrasilia echinata* submetidos a diferentes condições de déficit de pressão de vapor e temperatura. Teses (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.
- GRAY, S. B.; DERMODY, O.; KLEIN, S. P.; LOCKE, A. M.; MCGRATH, J. M.; PAUL, R. E.; ROSENTHAL, D.M; RUIZ-VERA, U.M; SIEBERS, M.H; STRELLNER, R.; AINSWORTH, A.E.; BERNACCHI, C.J; LONG, S.P.; ORT, D.R; LEAKEY, A.D.B. Intensifying drought eliminates the expected benefits of elevated carbon dioxide for soybean. *Nature Plants*, Vol.2(9), 2016.
- HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, 2012.
- HARTMANN, H. AND TRUMBORE, S. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytol*, 211: 386-403 2016.

HE, W, LIU, H, QI, Y, LIU, F, ZHU, X. Patterns in nonstructural carbohydrate contents at the tree organ level in response to drought duration. *Glob Change Biol.* 2020.

HOCH, G., RICHTER, A. & KÖRNER, CH. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment* 26: 1067-1081. 2003.

HÖFTE, H.; A. VOXEUR, A. Plant cell walls. *Curr. Biol.*, 27 (17), 2017.

IPCC - Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas. Summary for policymakers, in *Climate Change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. In Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Eds. C. B. Field, V. R. Barros, D. J. Dokken, K. J. Mach, M. D. Mastrandrea, T. E. Bilir, et al. (Cambridge; New York, NY: Cambridge University Press), 1–32, 2014.

IPCC - Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas. Aquecimento global de 1,5 ° C. Um relatório especial do IPCC sobre os impactos do aquecimento global de 1,5 ° C. Sumário para Formuladores de Políticas. Eds. Masson-Delmotte V, Zhai P, Pörtner HO, Roberts D, Skea J, Shukla PR, et al. Tradução: Mariane Arantes Rocha de Oliveira, 2018.

IRAKI, N. M. et al. Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. *Plant Physiology*, v. 91, p. 48-53, 1989.

KELLY, SM, MUNOZ-MUNOZ, J., & VAN SINDEREN, D. Plant Glycan Metabolism by Bifidobacteria. *Frontiers in microbiology.* 2021.

LAMAOU, M.; JEMO, M.; DATLA, R.; BEKKAOU, F. Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. *Frontiers in chemistry.* Vol.6, pp.26, 2018.

LAMBERS, H.; CHAPIM III, F. S.; PONS, T. L. *Plant physiological ecology.* 2 ed. Berlin: Springer, 2008.

LAWOKO, M., HENRIKSSON, G., GELLERSTEDT, G. Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods. *Holzforschung*, v. 60, n. 2, p. 156-161, 2006.

LE GALL, H., PHILIPPE, F., DOMON, J. M., GILLET, F., PELLOUX, J., & RAYON, C. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants (Basel, Switzerland)*, 4(1), 112–166. 2015.

LIMA HC. Paubrasília. In: *Flora do Brasil 2020 em construção.* Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020.

MACEDO, T.M.; BARROS, C.F.; DE LIMA, H.C.; BRANDES, A.F.N.; DA COSTA, W.S.; COSTA, C.G.; ROIG, F. Climate signals in tree rings of Paubrasília echinata (Leguminosae-Caesalpinioidea) from the Atlantic Forest of Brazil. *Trees - Structure and Function*, 2019.

MARTINS, S. V.; SOUZA, M. N. Cultivo do palmito-juçara (*Euterpe edulis* Mart.): Produção de palmito e restauração florestal. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 107 P. 2011.

- MARTINEZ-VILALTA, J., SALA, A., ASENSIO, D., GALIANO, L., HOCH, G., PALACIO, S., PIPER, F., FRANCISCO, L. Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: A global synthesis. *Ecological Monographs*. 86. 10.1002/ecm.1231. 2016.
- MEENTS, M. J., WATANABE, Y., & SAMUELS, A. L. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. *Annals of botany*, 121(6). 2018.
- MEJÍA, E.; BUITRÓN, X. Brazilwood (*Caesalpinia echinata*) in Brazil. NDF Workshop Case Studies, p. 1-10, 2008.
- MENGARDA, L. H. G.; MILANEZ, C. R. D.; SILVA, D. M.; AGUILAR, M. A. G.; CUZZUOL G. R. F. Morphological and physiological adjustments of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.) to direct solar radiation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. v. 24. n.3, 2012.
- MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R. & HOFFMAN, M. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. *Conservation International*, Washington. 392p. 2005.
- MOLLE, F.R.D.; BRANDÃO, A.D.; TINÉ, M.A.S. Variação ao longo do dia da atividade de enzimas do catabolismo de sacarose em plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. *Brazilian Journal of Botany*. 2009.
- MORAIS, S., DO NASCIMENTO E., DE MELO, D. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. *Revista Árvore*. 2005.
- MOORE, J. P. et al. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum*, v. 134, n. 2, p. 237-245, 2008.
- NOVAES, E.; KIRST, M.; CHIANG, V.; WINTER-SEDEROFF, H.; SEDEROFF, R. Lignin and biomass: A negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiol*, v 154, p 555-561, 2010.
- OLSSON, CARINA & WESTMAN, GUNNAR. Direct Dissolution of Cellulose: Background, Means and Applications. In book: *Cellulose - Fundamental aspects*, pp.143-177. 2013.
- PBMC - Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. Capítulo 9: Mudanças ambientais de curto e longo prazo: projeções, reversibilidade e atribuição. In: *Base científica das mudanças climáticas. Contribuição do Grupo de Trabalho 1 do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas ao Primeiro Relatório da Avaliação Nacional sobre Mudanças Climáticas* [Ambrizzi, T., Araujo, M. (eds.)]. COPPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 464 pp. 2014.
- PIERRE, C.S.; TRETOWAN, R.; REYNOLDS, M. Stem solidness and its relationship to water-soluble carbohydrates: association with wheat yield under water deficit. *Functional Plant Biology*, v 37, n 1, p 166–174, 2010.
- PILON, CRISTIANE; SNIDER, JOHN L; SOBOLEV, VICTOR; CHASTAIN, DARYL R; SORENSEN, RONALD B; MEEKS, CALVIN D; MASSA, ALICIA N; WALK, TRAVIS; SINGH, BHUPINDER; EARL, HUGH J. Assessing stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation under progressive drought in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Plant Physiology* 231: 124–134. 2018.

- PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono de plantas cultivadas e o aumento de CO<sub>2</sub> e de O<sub>3</sub> atmosférico: situação e previsões. *Bragantia*, Campinas, v. 70, n. 1, p.1-12. 2011.
- RICARDI M.M., GONZALEZ R.M., ZHONG S., DOMINGUEZ P.G., DUFFY T., TURJANSKI P.G., SALTER J.D. ALLEVA K., CARRARI F., GIOVANNONI J.J. Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor. *BMC Plant Biol.* 2014.
- ROLIM, Samir G. et al. Growth and wood properties of tree species in silvicultural trials in the north of Espírito Santo. In: *Silviculture and wood properties of native species of the Atlantic Forest of Brazil*. Samir G. Rolim & Daniel Piotto (Editors). Belo Horizonte - Rupestre, 2019.
- ROSALES, M.A.; OCAMPO, E.; RODRIGUEZ-VALENTIN, R.; OLVERA-CARRILLO, Y.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; COVARRUBIAS, A.A. Physiological analysis of commonbean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars uncovers characteristics related to terminaldrought. *Plant physiology and Biochemistry*, vol. 56, p. 24–34, 2012.
- ROSSATO, D.R.; KOLB, R.M. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, n. 3, p. 605-612, 2010.
- SHÄDEL, C.; BLÖCHL, A.; RICHTER, A.; HOCH, G. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, p. 1-8, 2010.
- SHARMA, D.K.; FERNÁNDEZ, J.O.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C.O. & ANDERSEN, S.B. Genotypic response of detached leaves versus intact plants for chlorophyll fluorescence parameters under high temperature stress in wheat. *Journal of Plant Physiology*, vol.171, p.576-586, 2014.
- SIMON, C., SPRIET, C., HAWKINS, S., & LION, C. Visualizing Lignification Dynamics in Plants with Click Chemistry: Dual Labeling is BLISS!. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2018.
- SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 51, p. 49-81, 2000.
- SOUZA, A.; MORAES, M.G.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Gramíneas do cerrado:carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. *Acta Botanica Brasilica*, v. 19, n. 1, p. 81-90, 2005.
- SUGUIYAMA, V.F.; SILVA, E.A.; MEIRELLES, S.T.; CENTENO, D.C. & BRAGA, M.R. Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–13. 2014.
- SZABADOS, L., KOVÁCS, H., ZILBERSTEIN, A., BOUCHEREAU, A. Plants in extreme environments. *Adv. Bot. Res.* 105–150, 2011.
- TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, Michigan, v. 29, p. 417-426, 2002.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888, 2017.
- THALMANN, Mathias; SANTELIA, Diana. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist*, v.214, p.943-951, 2017.
- TRETHERWAY, R. & SMITH, A. M. Starch metabolism in leaves. In: Leegood, R. C.; Sharkey, T. & von Caemmerer, S. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. p. 205-231. 2000.
- VALLADARES, F; MATESANZ, S; GUILHAUMON, F; ARAÚJO, M.B; BALAGUER, L; BENITO-GARZÓN, M; CORNWELL, W; GIANOLI, E; KLEUNEN, M; NAYA, D.E; NICOTRA, A.B; POORTER, H; ZAVALA, MIGUEL A. The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters*, Vol.17(11), pp.1351-1364, 2014.
- VERNON, D.M., TARCZYNSKI, M.C., JENSEN, R.G. & BOHNERT, J. Cyclitol production in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 4: 199-205. 1993.
- WANG, Y.; XU, C.; WU, M. & CHEN, G. Characterization of photosynthetic performance during reproductive stage in high-yield hybrid rice LYPJ exposed to drought stress probed by chlorophyll a fluorescence transient. *Plant Growth Regulation*, vol.81, p. 489-499, 2016.
- WERNER, E. T. Calogênese de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam-fabaceae) in-vitro visando a obtenção de um banco de germoplasma. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.
- WILDHAGEN, H., et al. Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*. *Tree physiology*, 38(3). 2018.
- YI, XIAO-PING; ZHANG, YA-LI; YAO, HE-SHENG; HAN, JI-MEI; CHOW, WAH SOON; FAN, DA-YONG; ZHANG, WANG-FENG. Changes in activities of both photosystems and the regulatory effect of cyclic electron flow in field-grown cotton (*Gossypium hirsutum* L) under water deficit. *Journal of Plant Physiology* 220 (2018) 74–82. 2018.
- ZARGAR, S. M., GUPTA, N., NAZIR, M., MAHAJAN, R., MALIK, F. A., SOFI, N. R., SHIKARI, A.B., SALGOTRA, R. K. Drought impact on photosynthesis: molecular perspective. *Plant Gene* 11: 154–159, 2017.
- ZHANG, Y. L., Y. Y. HU, H. H. LUO, W. S. CHOW, ZHANG, W. F. Two distinct strategies of cotton and soybean differing in leaf movement to perform photosynthesis under drought in the field. *Funct. Plant Biol.* 38, p. 567– 575, 2011.

## **CAPITULO 1 – Respostas fotossintéticas em morfotipos de *Paubrasilia echinata* tolerante ao sol e tolerante à sombra sob seca seguido de reidratação**

Sánchez, F.C.L<sup>1</sup>, Venâncio, F.C.D<sup>1</sup>, Pezzopane, J.E.M<sup>2</sup>, Cuzzuol, G.R.F<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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: carlos\_sanche70@hotmail.com.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro-ES, Brazil.

### **RESUMO**

A seca é o fator ambiental mais limitante da fotossíntese. Existem projeções de redução de chuvas no bioma da Mata Atlântica brasileira entre 30 e 35% para a região Nordeste. Contudo, pouco se sabe, sendo de grande interesse conhecer como as plantas tolerantes ao sol e tolerantes à sombra desse bioma responderam à seca. Como modelo nesse estudo, dois morfotipos com hábitos ecológicos diferentes de *P. echinata* foram utilizados. O morfotipo folha pequena é tolerante à sombra e o morfotipo folha média é tolerante ao sol na fase inicial do crescimento. Plantas juvenis dos morfotipos foram submetidas à simulação de seca, com suspensão da irrigação, seguido de simulação de chuva, reidratação. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 2 x 2. Fator A dois morfotipos (médio e pequeno), e Fator B dois regimes hídricos (plantas controle e tratadas: suspensão de água - 17 dias e reidratação - 36 dias). Foram realizadas análises do potencial hídrico folhar, extravasamento de eletrólitos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*. Todas as medidas foram entre 8:00 e 10:00 horas em folhas do terceiro nó e totalmente expandida. Sob seca, o morfotipo tolerante à sombra mostrou maior declínio dos valores da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), transpiração (*E*), condutância estomática (*gs*) e eficiência do uso da água (*A/E*) em relação ao morfotipo tolerante ao sol. A diminuição das taxas fotossintéticas nos dois morfotipos estiveram associadas às alterações na fluorescência da clorofila *a*. Decréscimos de rendimento quântico no lado aceptor do fotossistema I ( $\phi Ro$ ) e aumento na dissipação de energia ( $Di0/RC$ ) foram associados à baixa transferência de elétrons do complexo de evolução de oxigênio (CEO), com inibição da reoxidação da Quinona A (*Q<sub>A</sub>*), derivando a reduções de eventos fotoquímicos no lado aceitador do fotossistema II (FSII). Isto induziu um menor aproveitamento da energia luminosa para a fotoquímica nos dois

morfotipos, porém, de forma mais acentuada no tolerante à sombra. Na fase de reidratação, as plantas expostas a seca dos dois morfotipos apresentaram progressiva recuperação da maioria dos parâmetros de troca gasosa e fluorescência da clorofila *a*, igualando os valores dos seus controles após os 36 dias de reidratação. No entanto, a condutância estomática, o índice de desempenho da atividade funcional do FSII (PIABS) e o índice de desempenho fotoquímico total (PITOTAL) continuaram inferiores aos de seus controles, sendo mais acentuado no morfotipo tolerante à sombra. Os resultados indicam que o morfotipo tolerante ao sol apresenta melhor ajuste nos mecanismos fotossintéticos de tolerância à seca do que o morfotipo tolerante à sombra.

**Palavras-chave:** Trocas gasosas • Fluorescência da clorofila *a* • Eficiência fotossintética • Disponibilidade hídrica • Tolerância à seca.

## 1. INTRODUÇÃO

Previsões nas mudanças climáticas indicam aumento da intensidade de secas e ondas de calor em algumas regiões, trazendo impactos no funcionamento dos ecossistemas terrestres e na biodiversidade vegetal (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas-IPCC, 2018). A seca é considerada o fator ambiental que mais limita o crescimento, a produtividade das plantas devido seus danos nos diversos processos fisiológicos (GRAY *et al.*, 2016; LAMAOU *et al.*, 2018).

As projeções de mudanças climáticas para o Nordeste do bioma Mata Atlântica brasileira, estimam aquecimento intenso, causado por elevação de 3-4°C e diminuição de 30-35% de chuvas, até o final do presente século (Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas-PBMC, 2014). A Mata Atlântica, poderia apresentar dificuldades e limitações na sobrevivência de suas espécies em condições de seca. Prever como as espécies desse bioma, responderão às mudanças climáticas futuras, incluindo a seca, depende da nossa compreensão nos mecanismos fisiológicos e fotossintéticos (CHOAT *et al.*, 2012). Isso é particularmente importante em florestas tropicais consideradas *hotspots* da biodiversidade do mundo (BÉLLARD *et al.*, 2014).

Esse tipo de florestas possui alta produtividade primária vegetal e elevada atividade fotossintética, com espécies tolerantes ao sol e tolerantes a sombra que desempenham forte dreno do carbono global (GRACE *et al.*, 2014). No entanto, em se tratando de investigações sobre os efeitos do déficit hídrico na fotossíntese, pouco se sabe sobre suas relações com as espécies tolerantes ao pleno sol e tolerantes a sombra. Isso se torna ainda mais importante em cenários possíveis de mudanças climáticas envolvendo eventos extremos como secas e alagamentos.

Sabe-se que, plantas cultivadas em pleno sol investem mais em raízes para capturar água e nutrientes para sustentar as altas taxas de transpiração. Plantas cultivadas à sombra majoritariamente investem em folhas finas como órgão fotossintetizante, para aumentar a captura de luz. Porém, isso ocorre às custas da aquisição de raízes, podendo tornar as plantas tolerantes à sombra mais sensíveis à seca (AMISSAH *et al.*, 2015; OSNAS, 2018). As espécies tolerantes ao sol se distinguem das tolerantes a sombra por apresentarem maior fotossíntese, metabolismo, velocidade de crescimento e menor área foliar específica (POORTER, *et al.*, 2010).

No entanto, as plantas podem desenvolver estratégias adaptativas e/ou expressar sua plasticidade fenotípica (VALLADARES *et al.*, 2014) em níveis morfológico, fisiológico e bioquímico, com o propósito de evitar ou tolerar a seca, visando sua sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis ao crescimento (ZARGAR *et al.*, 2017; LAMAOU *et al.*, 2018). A sensibilidade das plantas em determinado processo fisiológico ao déficit hídrico é, em grande parte, um reflexo da estratégia da planta em lidar com o nível de disponibilidade de água no solo e no potencial hídrico das células do mesófilo (TAIZ *et al.*, 2017).

O potencial hídrico foliar reflete uma combinação de fatores como demanda de água nas folhas, água disponível no solo, condutividade hidráulica e regulação estomática (VICENTE; YUSTE, 2014). A forma convencional de detectar o déficit hídrico em plantas consiste em estimar o *status* hídrico, medindo o potencial da água nas folhas da antemanhã ( $\Psi_{wp}$ ) (VICENTE; YUSTE, 2014). Uma outra forma de detectar o déficit hídrico, é investigando a perda da integridade da membrana celular através do extravasamento celular de íons como o  $K^+$ . Isso é feito medindo a condutividade eletrolítica do tecido foliar embebido em água pura (HATSUGAI; KATAGIRI, 2018). O aumento da fluidez das membranas, leva a uma fuga de eletrólitos desde os compartimentos celulares para o meio extracelular (LANGARO, 2014).

O déficit hídrico, afeta ainda, o sistema fotossintético limitando a assimilação de carbono (PILON *et al.*, 2018). As limitações fotossintéticas podem ser causadas por fatores estomáticos ou não estomáticos. Para esses últimos incluem a redução da área foliar, senescência foliar, modificações nos cloroplastos com redução na síntese de clorofila, alterações na acumulação, transporte e distribuição de fotoassimilados (ANJUM *et al.*, 2011; LAMAOU *et al.*, 2018).

Sob estresse hídrico leve a moderado, a fotossíntese diminui devido a redução da turgescência e concentração intercelular de carbono ( $C_i$ ). A diminuição da condutância estomática ( $g_s$ ) e condutância do mesófilo ( $g_m$ ) também limitam a carboxilação (FLEXAS *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2018). Sob estresse hídrico moderado ou severo, os fotossistemas I e II (FSI e FSII) podem ser abalados, comprometendo a fotossíntese por inibição da produção de ATP, atividade da Rubisco (FLEXAS *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2018) e degradação desta e de outras proteínas (LAMAOU *et al.*, 2018).

O déficit hídrico pode provocar alterações na fluorescência da clorofila a, devido à inibição ou fotodanos nos fotossistemas FSI e FII por excesso de energia luminosa a ser absorvida, provocando diminuição da transferência de elétrons entre os complexos fotoquímicos e declínio na assimilação de CO<sub>2</sub>. Alguns elétrons podem ser transferidos para o oxigênio molecular através da reação de Mehler, provocando a formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO's) como o superóxido (O<sup>2-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por sua vez, pode reagir com os centros de redução do FSI constituídos de ferro-enxofre e gerar radicais hidroxila (HO) que podem causar fotodanos ao FSI (YI *et al.*, 2018). Contudo, sob condições de estresse hídrico, aumento do transporte na cadeia de elétrons nos fotossistemas pode ocorrer como medida de fotoproteção (ZHANG *et al.*, 2011; SNIDER *et al.*, 2013).

Considerando as previsões de redução das precipitações para a região nordeste com perspectivas de alcançar a região sudeste, nos deparamos com uma questão muito importante. Como as plantas de sombra e de sol da Mata Atlântica responderão a seca severa seguido de um período de chuvas? Para responder essa questão, a escolha de plantas com baixa divergência taxonômica, mas diferenciando-se quanto ao hábito ecológico, torna-se bastante atraente e apropriada. Uma arbórea tropical com esse perfil taxonômico e ecológico, é o pau-brasil [*Paubrasilia echinata* (Lam) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis], nativa da Mata Atlântica e árvore símbolo do Brasil por sua alta importância ecológica e econômica (LIMA, 2013). De sua madeira são confeccionados arcos para instrumentos de corda, de elevada qualidade (FRANCO & YOJO, 2008).

A espécie possui três morfotipos divergentes quanto ao tamanho da folha e hábito ecológico em relação a luminosidade. O morfotipo folha pequena é tolerante à sombra enquanto os morfotipos folha média e folha grande são tolerantes ao sol (GAMA, 2017). Essa distinção ecológica intraespecífica dos morfotipos de *P. echinata* é singular em florestas tropicais úmidas, e ideais para investigações sobre a influência de fatores ambientais em plantas tolerantes a sombra e tolerantes ao pleno sol, por eliminar as divergências taxonômicas.

Considerando que plantas tolerantes ao pleno sol habitam ambientes menos úmidos em relação as plantas tolerantes a sombra (ROSSATO e KOLB, 2010), hipotetizamos que plantas do morfotipo médio de *P. echinata* sejam mais tolerantes a simulação de seca severa, e recupere suas respostas fotossintéticas mais

rapidamente após a simulação de chuva. Isso deverá ser evidenciado com um decréscimo menos acentuado das trocas gasosas e menor fluorescência da clorofila *a* das plantas do morfotipo médio durante a seca e na rápida recuperação dessas variáveis na fase de reidratação, em relação as plantas do morfotipo pequeno. Para testar essa hipótese, conduzimos o presente estudo com o objetivo de avaliar os efeitos da seca seguido de reidratação no potencial hídrico, no extravasamento de eletrólitos, nas trocas gasosas e na eficiência fotoquímica da clorofila *a* em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido na área experimental do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo em Vitória, ES (20°18'52"S e 40°19'06"W). Plantas dos morfotipos pequeno e médio *Paubrasilia echinata* (Lam) Gagnon, H.C.Lima & G.P. Lewis foram produzidas de forma seminal no viveiro da Reserva Natural Vale em Sooretama-ES (19°09'04"S e 40°04'36"W). Sementes coletadas de matrizes da Reserva Natural Vale foram semeadas em sacos plásticos (2.5 L) contendo como substrato solo argila:arenoso (2:1), sob condições ambientais naturais de temperatura média anual de 24±2 °C, fotoperíodo de 10±1h, umidade relativa de 70±15% e radiância fotossinteticamente ativa (PAR) de 1.000±150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionado por tela de nylon preta Sombrite®. As plantas foram irrigadas diariamente com água corrente por aspersão eletrônica. Plantas com um ano de idade (70 plantas por morfotipo) medindo 22±4 cm de altura foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 8L, contendo como substrato uma mistura de solo comercial Forth e areia na proporção (2:1). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação sob condições ambientais naturais de temperatura média de 25±2 °C, fotoperíodo natural de 11±1h e PAR de 1.000±150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  determinado em espectrorradiômetro (Spectrum Technologies, Inc., Illinois, EUA). As plantas foram irrigadas diariamente com água da torneira até capacidade de campo, sempre quando necessário. Após 25 dias de cultivo nessas condições, foi aplicada uma única 200 mL da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) em meia força iônica por planta, visando o aumento do vigor das mudas.

Após os dois meses de cultivo nas condições acima, as plantas foram transferidas para estufas (6,0 m de comprimento x 1,5 m de profundidade x 2,0 m de altura) revestidas por filme plástico de polietileno de 150 micra. No interior dessas estufas registramos temperatura média de  $29\pm 3$  °C, fotoperíodo natural de  $11\pm 1$ h e  $1.200\pm 50$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR, determinados em um dia sem nuvens às 9:00 horas da manhã. As plantas foram irrigadas diariamente com água da torneira. Após quatro meses de aclimatação nessas condições, plantas dos dois morfotipos medindo  $35\pm 4$  cm de altura e contendo  $5\pm 1$  folhas, foram divididas em dois lotes: plantas controle (sempre irrigadas) e plantas tratadas (suspensão de água seguido de reidratação). A umidade relativa e temperatura (média, máxima e mínima) foram medidas em Termo-higrômetro Digital (TH-02 Impac.com.br) e apresentados na (Fig. 1).

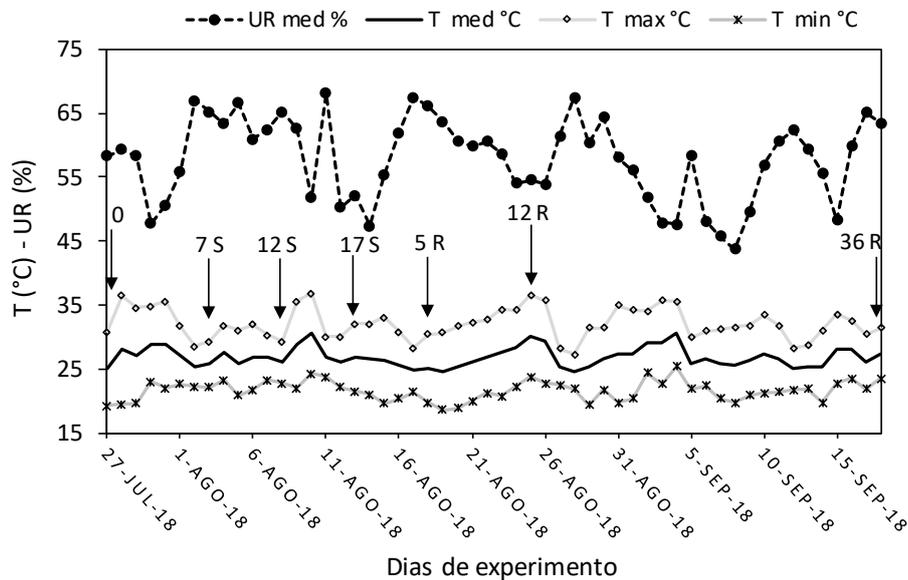


Figura 1. Umidade relativa do ar (UR%) e temperatura média, máxima e mínima (T °C) nas estufas onde foi conduzido o experimento. As medidas foram realizadas no período de 27/07 a 18/09 de 2018. Setas indicam os pontos de avaliação fisiológica das plantas. S = dias de suspensão hídrica e R = dias após a reidratação.

## 2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro combinações de tratamentos: morfotipo pequeno controle, morfotipo médio controle, morfotipo pequeno tratado e morfotipo médio tratado. O esquema: (1) plantas controle: um grupo de 70 plantas, sendo 35 do morfotipo pequeno e 35 do morfotipo médio, foram irrigadas continuamente com água corrente até capacidade de campo; e (2) plantas tratadas: outro grupo com as mesmas quantidades de plantas que o

controle, foram sujeitas a déficit hídrico imposto pela suspensão de água, seguido de um período de reidratação (irrigadas até capacidade de campo). Total de plantas, 140 unidades dos dois morfotipos. Cinco repetições por tratamento foram usadas e uma única planta por vaso foi considerada como uma repetição. O tempo máximo de suspensão hídrica das plantas tratadas ocorreu ao 17º dia quando o potencial hídrico foliar antemanhã ( $\Psi_{wp}$ ) chegou próximo de -3 MPa. Em seguida, as plantas sob seca foram reidratadas diariamente com água corrente até capacidade de campo, por 36 dias quando a assimilação do CO<sub>2</sub> das plantas reidratadas se aproximaram das plantas controle.

As avaliações das trocas gasosas, potencial de água e extravasamento de eletrólitos das folhas foram realizadas aos 0, 7, 12 e 17 dias de suspensão de água (simulação de seca) e aos 5, 12 e 36 dias após a reidratação (simulação de chuva). A fluorescência da clorofila *a*, foi avaliada nos dias máximos de cada tratamento, isto é, no 17º dia de suspensão hídrica e no 36º de reidratação.

### **2.3 Potencial da água na folha ( $\Psi_{wp}$ )**

O  $\Psi_{wp}$  foi determinado na antemanhã, entre 4:00 e 5:00 horas da manhã, utilizando uma bomba de pressão tipo Scholander (SCHOLANDER *et al.*, 1965) PMS Instrument, modelo 600, USA. O procedimento foi realizado na 2ª ou 3ª folha completamente expandida e sadia, a partir do ápice do eixo ortotrópico. Após a secção da folha, imediatamente o pecíolo foi inserido na câmara da bomba de pressão. A pressão foi aplicada até a exsudação da gotícula da seiva na superfície seccionada do pecíolo da folha, quando se registrou a leitura da pressão (TURNER, 1981). Após a medição, o mesmo material fresco foi utilizado para análises do extravasamento de eletrólitos.

### **2.4 Extravasamento de eletrólitos**

Para avaliar a estabilidade das membranas citoplasmáticas das folhas das plantas sob suspensão hídrica e reidratação, foi adotada a técnica do extravasamento de eletrólitos, conforme a metodologia descrita por Bajji *et al.* (2001), utilizando as mesmas folhas da medição do  $\Psi_{wp}$ . Foram retirados 5 discos foliares por planta de 0.5 cm de diâmetro do foliólulo da parte média, com o auxílio de um perfurador metálico de cobre. Imediatamente após o corte, os discos foram lavados três vezes em água deionizada para a eliminação do conteúdo das células rompidas durante o corte e de

outros eletrólitos aderidos às folhas. Os discos foliares foram enxugados em papel absorvente e os 5 discos por planta foram transferidos para tubos de vidro contendo 20 mL de água ultrapura e mantidos por 6h sob agitação constante em temperatura ambiente  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Posteriormente, foi medida a condutividade elétrica inicial do meio com os discos ( $C_1$ ) e da água pura ou branco (B1) com o auxílio do condutivímetro portátil (Sanxin, modelo SX723, China). Em seguida, os tubos com os discos foram transferidos para estufa a  $90^\circ\text{C}$  por 2h, e após resfriamento, foram medidas a condutividade elétrica máxima do meio com os discos ( $C_2$ ) e da água pura ou branco (B2). O extravasamento de eletrólitos foi calculado na fórmula  $[(C_1-B_1) / (C_2-B_2)] * 100$  (BAJJI *et al.*, 2001).

## **2.5 Trocas gasosas**

Em cada ponto amostral da suspensão hídrica e reidratação, foram realizadas as medidas das trocas gasosas num analisador de gás por infravermelho-IRGA (Modelo LCpro-SD) entre 8:00 e 10:00 horas, em folhas do terceiro nó e totalmente expandida de 5 plantas por morfotipo do controle e tratado, escolhidas aleatoriamente. A condição microclimática da câmara de medição da fotossíntese foi ajustada para  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ ,  $27^\circ\text{C}$  e irradiância de  $750 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , definida anteriormente por curvas de intensidade de luz construídas em 12 níveis de irradiância solar (0 a  $1.500 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) com duração de 60 s em cada nível de luz. As seguintes variáveis foram avaliadas: assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ;  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ;  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $C_i$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$ ). A partir dessas variáveis, foram calculadas a eficiência instantânea da carboxilação ( $A/C_i$ ) e a eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ), de acordo com Machado *et al.* (2005).

## **2.6 Fluorescência transiente (OJIP)**

Para as análises da fluorescência transiente da clorofila *a* utilizou-se um fluorômetro portátil, modelo Handy-PEA (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas entre 7:00 e 9:00h para evitar os efeitos inibitórios das altas temperaturas e luminosidades sobre as reações fotossintéticas. As medidas foram feitas nas mesmas folhas utilizadas para as trocas gasosas. Para tornar o sistema coletor de luz totalmente receptivo, foi necessário a oxidação completa dos centros de reação. Isso foi possível com a aclimação das folhas no escuro, durante

40 minutos (momento em que todos os centros de reações dos fotossistemas estavam totalmente oxidados). Após a aclimação ao escuro, as folhas foram expostas a um pico de luz vermelha de  $3.000 \mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As intensidades de fluorescência foram registradas entre  $20 \mu\text{s}$  e  $1 \text{s}$ , onde:  $20 \mu\text{s}$  é a fluorescência inicial ( $F_0$ ) e  $\pm 300 \text{ms}$  a fluorescência máxima ( $F_m$ ). A partir das intensidades de fluorescência foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER *et al.*, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1: Siglas, fórmulas e explanação dos parâmetros do teste JIP usados neste trabalho.

<b>Sigla</b>	<b>Equações ou similares</b>	<b>Significado</b>
$F_0$	$F_{20\mu\text{s}}$ ou $F_{50\mu\text{s}}$	Fluorescência inicial (aos $20 \mu\text{s}$ ).
$F_M$	$F_P$	Fluorescência máxima, quando todos os centros de reação do fotossistema II (FSII) estão fechados e a QA reduzida (QA-).
$V_J$	$(F_J - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável na fase J da curva OJIP.
$V_I$	$(F_I - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável na fase I da curva OJIP.
ABS/RC	$M_0 (1/V_J) (1/\phi P_0)$	Fluxo de absorção (das clorofilas da antena) por centro de reação. Também é uma medida do tamanho aparente da antena do FSII.
DI <sub>0</sub> /RC	ABS/RC - TR <sub>0</sub> /RC	Fluxo de energia dissipada, por centro de reação.
TR <sub>0</sub> /RC	$M_0 (1/V_J)$	Fluxo de energia capturada (levando à redução da Quinona A) por centro de reação.
ET <sub>0</sub> /RC	$M_0 (1/V_J) \psi_0 = (M_0/V_J) \psi_0$ $= (M_0/V_J) (1 - V_J)$	Fluxo de transporte de elétrons (após a redução da Quinona) por centro de reação.
RE <sub>0</sub> /RC	$M_0 (1/V_J) \psi E_0 \delta R_0 =$ $(RE_0/ET_0) (ET_0/RC)$	Fluxo de elétrons redutores dos receptores finais de elétrons do FSI por centro de reação.
$\phi P_0$	$F_V/F_M = TR_0/ABS$	Rendimento quântico máximo das reações de óxido-redução ocorridas no FSII. Rendimento quântico máximo do FSII.
$\psi E_0$	$ET_0/TR_0$	Eficiência com que um elétron se move na cadeia de transporte de elétrons após a redução da Quinona A.
$\phi E_0$	$ET_0/ABS$	Rendimento quântico do transporte de elétrons
$\delta R_0$	$RE_0/ET_0$	Eficiência com que um elétron dos carregadores de elétrons do intersistema é transferido para reduzir receptores de elétrons do lado receptor do FSI.
$\phi R_0$	$RE_0/ABS$	Rendimento quântico da redução de receptores finais de elétron do lado receptores do FSI
$PI_{ABS}$	$(RC/ABS) (\phi P_0/(1-\phi P_0))$ $(\psi E_0/(1-\psi E_0))$	Índice de Performance (potencial) da conservação de energia de fótons absorvidos pelo FSII para a redução dos receptores de elétrons do intersistema. Índice de desempenho potencial do FSII.
$PI_{TOTAL}$	$PI_{ABS} (\delta R_0/(1-\delta R_0))$	Índice de Performance (potencial) para a conservação de energia dos fótons absorvidos pelo FSII para a redução dos receptores finais do FSI. Índice de desempenho fotoquímico total.

Para avaliar o comportamento polifásico das curvas OJIP os dados de fluorescência foram normalizados em relação aos dados do controle de cada morfotipo no tempo zero dos tratamentos, por apresentar curva mais definida e permitir a visualização com clareza as diferenças das fases O-J, J-I e I-P entre os tratamentos (TSIMILLI-MICHAEL, 2008). A fluorescência da clorofila *a* foi determinada nos dias de máxima exposição a seca (17º dia de suspensão hídrica) e de chuva (36º dia de reidratação), para identificar presença de curvas positivas nas bandas.

### **2.7 Análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro combinações de tratamentos: morfotipo pequeno controle, morfotipo médio controle, morfotipo pequeno tratado e morfotipo médio tratado, com cinco repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância, ANOVA (com procedimento de medidas repetidas no tempo) respeitando os supostos de normalidade e homocedasticidade. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao um nível de 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ). Análise de regressão foi realizada para examinar a relação entre  $gs \times \Psi_w$ , e sua significância foi testada usando o teste de  $F$  ( $P \leq 0,05$ ). Os procedimentos estatísticos foram realizados em softwares *R* estatístico v. 3.6.1 e o *InfoStat* (Versão 2018, Grupo InfoStat, FCA, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina). Para o ANOVA utilizou-se o pacote do *R* “agricolae” (Statistical Procedures for Agricultural Research), versão 1.3-3. Adicionalmente foi aplicada estatística multivariada mediante a Análise de Componentes Principais (PCA) para os parâmetros do teste OJIP, com o pacote do *R* “factoextra”.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Potencial hídrico**

As plantas controles dos dois morfotipos apresentaram valores iguais de  $\Psi_{wp}$  próximo a - 0,25 MPa mantendo-se assim durante todo o experimento (Fig. 2). Aos 7 dias de seca, o  $\Psi_{wp}$  do morfotipo pequeno declinou diferenciando-se do morfotipo médio e do controle. O  $\Psi_{wp}$  dos dois morfotipos declinaram acentuadamente no 12º dia, sendo que morfotipo pequeno apresentou valores mais negativos. No 17º dia, o  $\Psi_{wp}$  dos dois morfotipos se igualaram alcançando o valor mais baixo de - 3,0 MPa.

Após 5 dias de reidratação, os valores do  $\Psi_{wp}$  dos dois morfotipos aumentaram rapidamente, mas ficando abaixo do controle e sem diferenças entre os dois morfotipos. Aos 12 dias de reidratação, os valores do  $\Psi_{wp}$  dos dois morfotipos se igualam ao do controle e assim permaneceram até o 36º dia.

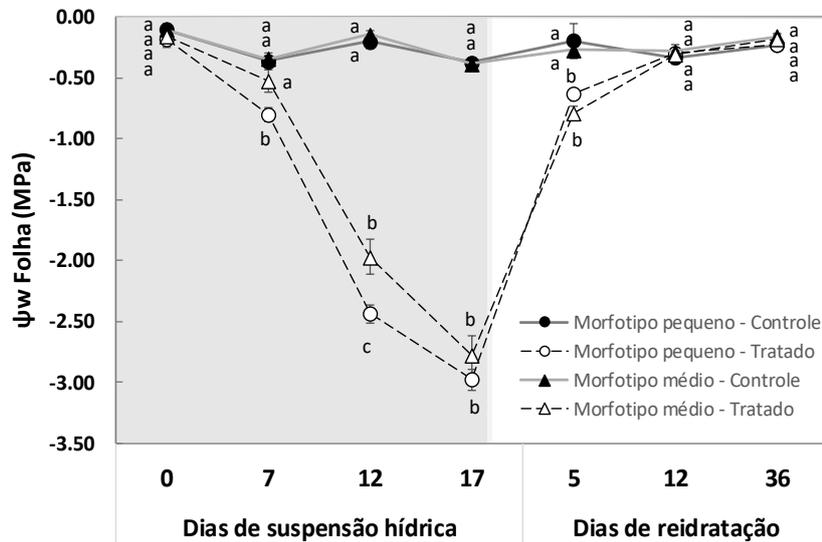


Figura 2: Potencial hídrico da antemanhã ( $\Psi_{wp}$ ) de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey (P<0.5%).

### 3.2 Extravasamento de eletrólitos

O controle dos dois morfotipos apresentaram valores semelhantes em torno de 9-10% de extravasamento de eletrólitos (*EE*) ao longo do experimento (Fig. 3). Sob seca, e independentemente do morfotipo, ocorreu súbito aumento do conteúdo de *EE* aos 12º dia e continua a aumentar até o 17º dia quando se dá o máximo estresse hídrico. Nesses dois dias, o conteúdo de *EE* dos dois morfotipos não diferiram entre si, mas sim do controle. Na fase de reidratação, os valores de *EE* dos dois morfotipos diminuíram rapidamente no 5º dia, igualando-se entre si, mas ainda maior em relação aos controles. A partir do 12º dia reidratados, o conteúdo de *EE* dos dois morfotipos continuam a declinar sem diferenciar-se dos seus controles, até o fechamento do tratamento.

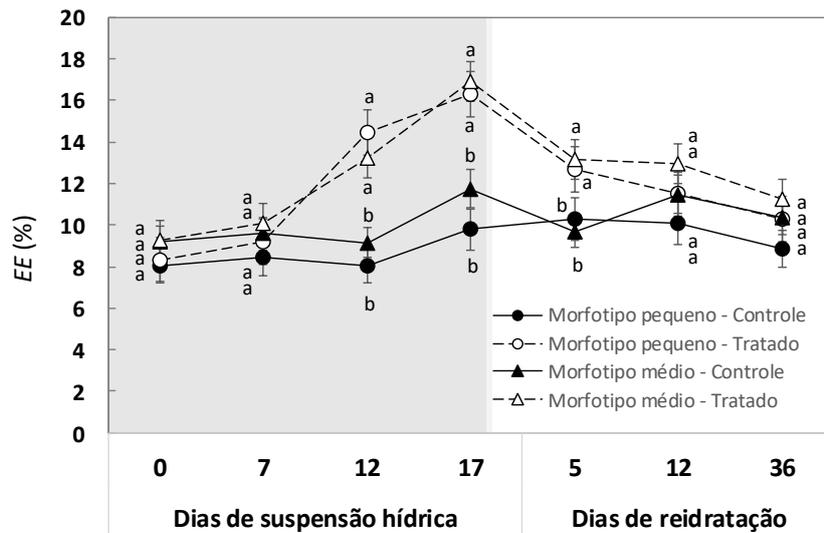


Figura 3: Extravasamento de eletrólitos ( $EE$ ) de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média ( $n=5$ ). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey ( $P<0.5\%$ ).

### 3.3 Trocas gasosas

As taxas de assimilação do  $CO_2$  ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ) das plantas tratadas e controle seguiram um padrão de respostas semelhantes ao potencial hídrico (Fig. 4). O controle dos dois morfotipos apresentaram valores de  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  semelhantes, com média de  $4 \mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ;  $80 \text{ mmol } H_2O \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1.7 \text{ mmol } H_2O \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente, ao longo do experimento (Fig.4a,c,e). Independentemente do morfotipo, as diminuições em  $\Psi_{wp}$  nas plantas estressadas causaram decréscimos acentuados em  $A$  e  $g_s$ , particularmente aos 12 e 17 dias de seca, em que ambas as variáveis foram reduzidas em cerca de 80% em relação às respectivas plantas controle, com o morfotipo pequeno mostrando valores mais baixos em relação ao morfotipo médio (Fig.4a,c).

Na fase de reidratação, os valores de  $A$  e  $g_s$  das plantas tratadas dos dois morfotipos começam a aumentar de forma expressiva aos 5 dias, mas diferindo do controle. A partir do dia 12  $A$  e  $g_s$  recuperaram lentamente nos dois morfotipos tratados, embora aos 36 dias os valores permaneceram inferiores aos controles. Porém,  $g_s$  do morfotipo pequeno continuou inferior em relação ao morfotipo médio tratado (Fig. 4c).

A suspensão hídrica reduziu os valores de  $E$  nos dois morfotipos em relação aos seus controles. No 7º dia, os valores de  $E$  dos dois morfotipos continuam a decrescer, e de forma mais acentuada no morfotipo pequeno. No 17º dia a  $E$  alcança valores muito baixos e sem diferença entre os morfotipos em média de  $0.3 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Na fase de reidratação, os valores de  $E$  aumentam expressivamente aos 5 dias e sem diferença entre os morfotipos, porém, inferiores ao controle. Esse comportamento se repete no 17º dia. A  $E$  dos dois morfotipos reidratados continuam a subir até o 36º dia quando seus valores se igualam aos seus controles (Fig. 4e).

A magnitude das mudanças em  $A$  e  $E$  durante o período de seca influenciou diminuições na eficiência do uso da água ( $A/E$ ) particularmente no morfotipo pequeno, que apresentou valores de  $A/E$  mais baixos que o morfotipo médio no dia 17 de máximo estresse hídrico. No entanto, o morfotipo pequeno surpreendeu com valores de maior eficiência do uso da água em comparação ao morfotipo médio.  $A/E$  do morfotipo pequeno se iguala ao seu controle no 12º dia até o fechamento do tratamento (Fig. 4f).

A concentração de carbono interno ( $C_i$ ) do controle dos dois morfotipos mostraram valores médios e constantes de  $210 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  ao longo do experimento. A seca elevou a  $C_i$  do morfotipo pequeno aos 7 e 12 dias em relação ao controle e ao morfotipo médio. A  $C_i$  desse último morfotipo aumentou somente aos 12 dias. Aos 5 dias da fase de reidratação, a  $C_i$  dos dois morfotipos declinou não mostrando diferenças entre os morfotipos, mas sim em relação ao controle. Aos 12 aos 36 dias de reidratação, a  $C_i$  dos dois morfotipos reidratados continuam a decrescer igualando-se aos seus controles nesses dois dias amostrais (Fig. 4b).

A eficiência da carboxilação ( $A/C_i$ ) dos controles dos dois morfotipos mostraram uma constância ao longo do experimento, apresentando valores médio de  $0.020 [(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})(\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1})^{-1}]$  (Fig. 4d). Sob seca, a  $A/C_i$  dos dois morfotipos começam a declinar aos 5 dias, porém de forma mais acentuada no morfotipo pequeno. Nesse dia amostral, a  $A/C_i$  do morfotipo médio não diferiu de seu controle. No 7º e 12º dia de suspensão hídrica a  $A/C_i$  continua a decrescer nos dois morfotipos. Porém, com o morfotipo pequeno mostrando valores menores ao do morfotipo médio, e desses dois diferentes de seus controles. Na fase de reidratação a  $A/C_i$  dos dois morfotipos começa a se recuperar a partir do 5º dia e continua a aumentar até o 36º

dia, mas não alcançado os valores dos controles (Fig. 4d). Nessa fase de reidratação, a  $A/C_i$  dos dois morfotipos não se diferenciaram entre si.

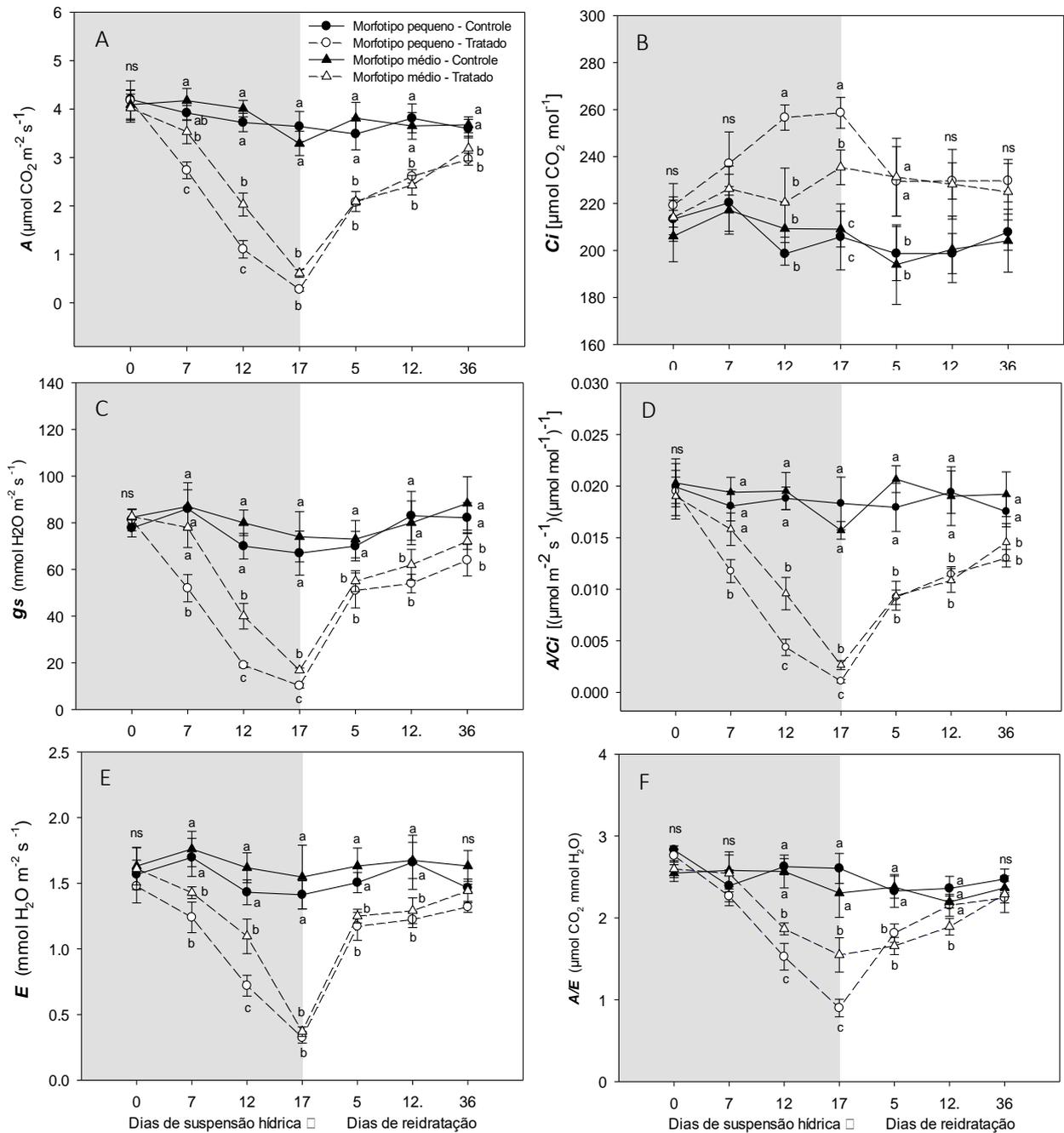


Figura 4: (A) Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> - A, (B) carbono interno -  $C_i$ , (C) condutância estomática -  $g_s$ , (D) eficiência da carboxilação -  $A/C_i$ , (E) transpiração - E, (F) eficiência do uso da água -  $A/E$  de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey (P<0.5%).

A sensibilidade da  $g_s$  dos dois morfotipos à seca é confirmada pela correlação positiva entre  $g_s \times \Psi_{wp}$  (Fig. 5). Independente do morfotipo, se estabeleceu uma interação significativa entre  $g_s$  e  $\Psi_{wp}$ , com uma diminuição curvilínea, mostrando que decréscimos em  $\Psi_{wp}$  implica em diminuição da  $g_s$ .

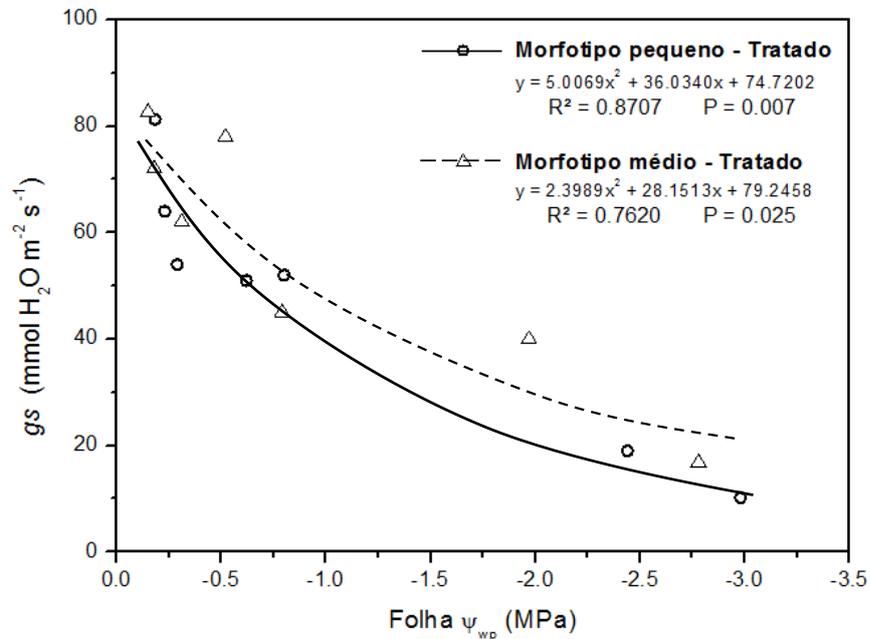


Figura 5: Correlação entre a condutância estomática ( $g_s$ ) e potencial hídrico da antemanhã ( $\Psi_{wp}$ ) de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média ( $n=5$ ). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey ( $P<0.5\%$ ).

### 3.4 Fluorescência transiente da clorofila a

A figura 6a apresenta as curvas OJIP da fluorescência transiente da clorofila a, dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no final dos períodos de suspensão hídrica (17º dia) e de reidratação (36º dia). Uma variação polifásica característica foi demonstrada nas curvas com os sinais de aumento da intensidade da fluorescência desde um nível O ( $F_0$ ) até um nível máximo ( $F_m$ ). Níveis intermediários J e I bem definidos dos controles e fase de reidratação demonstram que as plantas dos dois morfotipos encontraam-se fotossinteticamente ativas. No dia de máximo estresse por seca, observou-se uma redução das fases FJ, FI e FP para os dois morfotipos comparativamente com o controle e dia de reidratação (Fig. 6a). A fluorescência variável, indica que os dois morfotipos apresentaram aumentos de intensidade em todas as fases da curva OJIP, em relação às curvas controle, tanto sob estresse

hídrico quanto no período de reidratação (Figura 6b). Entretanto, as curvas com amplitudes mais positivas na curva OJIP do período de seca, evidenciam menor capacidade em reduzir fotoquimicamente a Quinona A ( $Q_A$ ) e transferir elétrons para o lado aceptor do FSI (Fig. 6a e 6b).

As curvas se normalizaram com os controles de cada morfotipo e foram analisadas por meio das diferenças cinéticas ( $\Delta V$ ) observadas em cada tratamento. Assim, apresentaram-se curvas com amplitudes positivas entre as fases O-P [ $\Delta V_{OP} = V_{OP}(\text{tratamento}) - V_{OP}(\text{controle})$ ] dos dois morfotipos, tanto no dia 17 de suspensão hídrico, quanto no dia 36° de reidratação (Fig. 6c). A maior amplitude de curvas positivas foi obtida no período da seca, com o morfotipo médio apresentando valores 0,20 e o morfotipo pequeno, próximo a 0,27, diminuindo essa diferença no decorrer da reidratação. Porém, ainda maiores do que os controles (Fig. 6c).

As diferenças cinéticas entre as fases OK para encontrar a banda L e OJ para banda K, foram expressos como [ $\Delta V_{OK} = V_{OK}(\text{Tratamento}) - V_{OK}(\text{Controle})$ ] e [ $\Delta V_{OJ} = V_{OJ}(\text{Tratamento}) - V_{OJ}(\text{Controle})$ ]. Os resultados mostraram curvas positivas nos dois tratamentos, para os dois morfotipos (Fig. 6d). Sob estresse hídrico os valores da banda L dos dois morfotipos aumentaram em média de 7% em relação ao controle, evidenciando desconectividade entre as subunidades do FSII. No 36° dia de reidratação, os valores da banda L mostraram tendência de declínio nos dois morfotipos. Porém, de forma mais acentuado no morfotipo médio, com valores aproximando do controle (Fig. 6d).

A banda K positiva sugere inativação dos complexos de evolução do oxigênio (CEO), com os valores máximos da banda K sob estresse hídrico (17° dia) aumentando 6% e 8% para morfotipo médio e pequeno, respectivamente, em relação ao controle. Na fase de reidratação (36° dia) apresentou-se uma diminuição dos valores da banda K sendo próximos de 0.04 em relação ao controle dos dois morfotipos (Fig. 6e).

A normalização de VIP expressa como a diferença cinética [ $\Delta VIP = V_{IP}(\text{tratamento}) - V_{IP}(\text{controle})$ ] foi representada em uma escala logarítmica entre 30 e 300 ms. Se apresentam valores da amplitude de curvas mais negativa no morfotipo pequeno com (-0,05 e -0.15) aos 17° dia de seca e 36° dia de reidratação, respectivamente. A diferença do morfotipo médio que apresentou valores igual ao controle aos 17° dias de seca e curva negativa menos acentuada (-0.05) no dia 36° de reidratação (Fig. 6f).

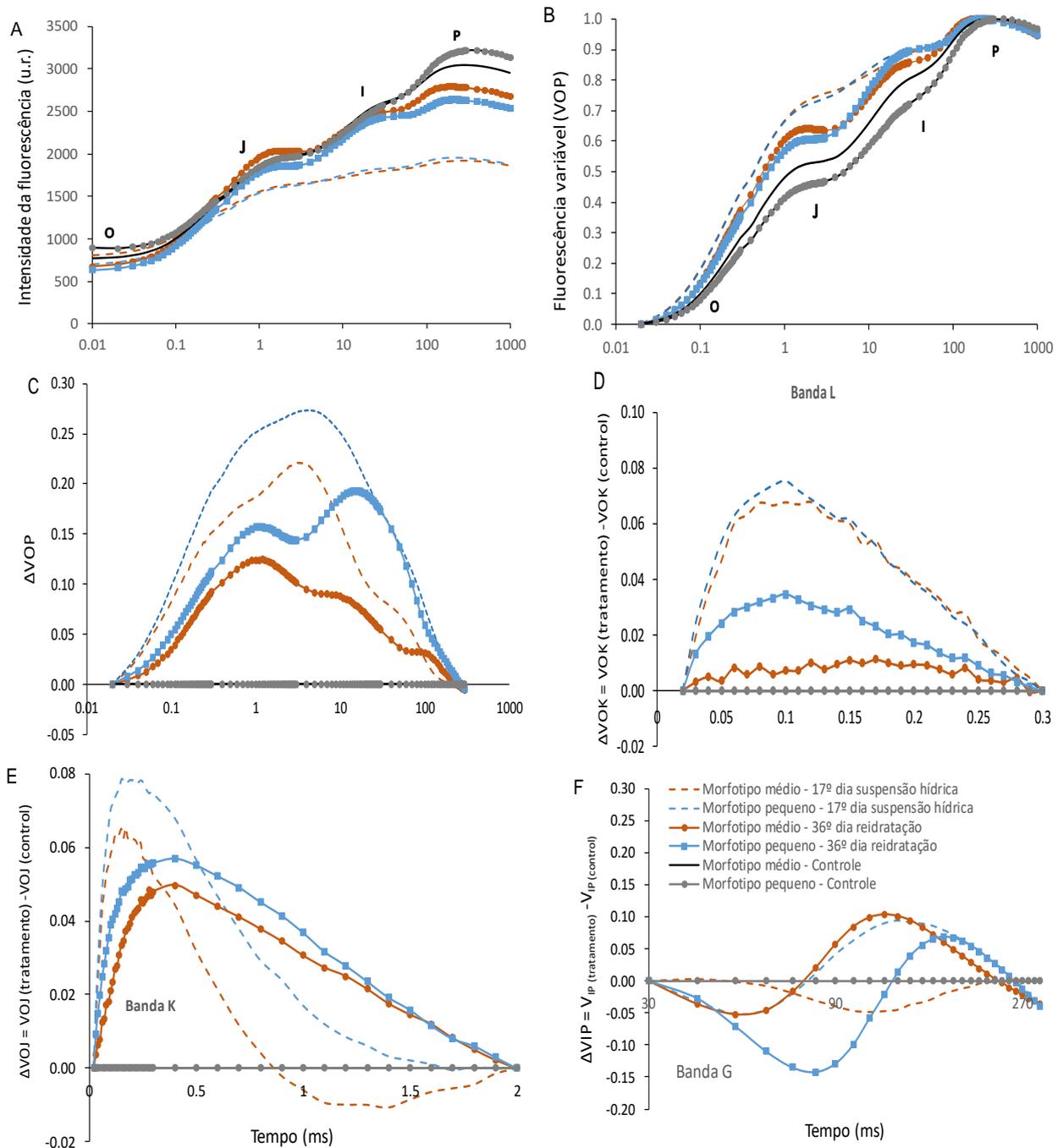


Figura 6: (A) Intensidade da fluorescência transiente da clorofila a (B) Fluorescência variável relativa -  $VOP = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$ , (C) Diferença cinética entre os pontos OP [ $\Delta VOP = (VOP(\text{Tratamento}) - VOP(\text{Controle}))$ ], (D) banda L [ $\Delta VOK = VOK(\text{Tratamento}) - VOK(\text{Controle})$ ], (E) banda K [ $\Delta VOJ = VOJ(\text{Tratamento}) - VOJ(\text{Controle})$ ], (F) Fase VIP expresso como [ $\Delta VIP = VIP(\text{tratamento}) - VIP(\text{control})$ ], de folhas adaptadas ao escuro das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata*, no 17º dia de suspensão hídrica e 36º de reidratação em relação ao dia zero dos controles de cada morfotipo. Escala de tempo logarítmica (n=10).

A partir das intensidades da fluorescência transiente da clorofila *a*, foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (Fig. 7 e 8). Esses parâmetros fornecem informações estruturais e funcionais dos FSII e FSI, e permitem quantificar o desempenho dos componentes da cadeia transportadora de elétrons. Para definir quais parâmetros fotoquímicos (Tabela 1) melhor explicaram as diferenças e semelhanças entre as condições analisadas, os dados foram submetidos à análise de componente principal (PCA). Esse tipo de estatística multivariada permitiu distinguir os pontos avaliados de seca e reidratação (Fig. 7). Quanto mais próximos os pontos, maiores as semelhanças entre eles e quanto mais distantes, maiores as diferenças.

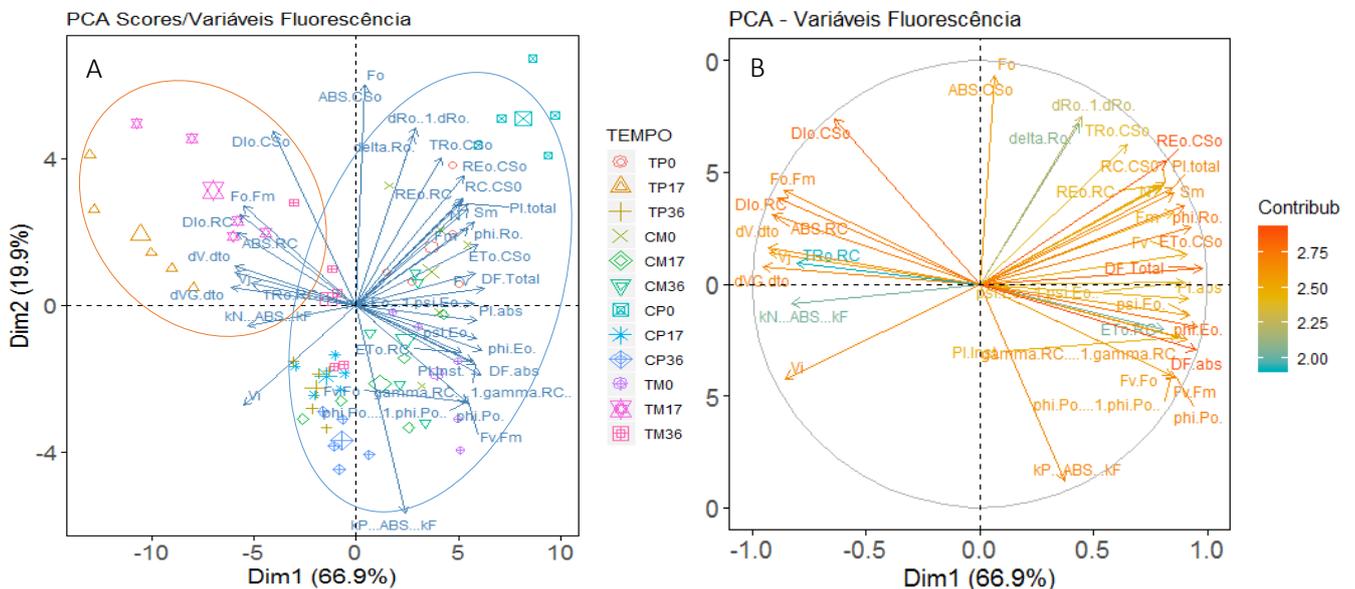


Figura 7: Análise multivariada de componente principal (PCA) das variáveis relativas a cada parâmetro do teste JIP em folhas de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). (A) distribuição das variáveis agrupadas por tempo de análise, (B) Demonstração da representatividade de cada variável. Significado dos parâmetros fotoquímicos descritos na Tabela 1.

Observou-se que a proporção de variância dos componentes do PCA (Dim1) e (Dim2) apresentam um 66.9% e 19.9% respectivamente (Figura 7). Com uma proporção acumulativa entre as duas componentes de 86.9%, demonstrando representatividade na correlação das variáveis e no agrupamento dos tempos avaliados. As variáveis dos parâmetros fotoquímicos quando analisadas por PCA, com os tratamentos com suspensão hídrica e reidratação dos dois morfotipos, apresentam agrupamento dos pontos de máximo estresse hídrico dia 17 para os dois

morfotipos (círculo laranja) (Fig. 7a). Esses pontos são explicados pela maior contribuição e correlação com as variáveis de dissipação de energia ( $DI_0$ ) e energia de absorção por centro de reação (ABS/RC). Apresentando correlação negativa com os fluxos de elétrons transferidos, os rendimentos quânticos e índices de performance (PI) (Fig. 7b).

Uma vez identificados na PCA os parâmetros fotoquímicos que apresentaram maior contribuição na explicação das condições analisadas, observou-se que sob simulação de seca ocorreu diminuição da fluorescência máxima ( $F_M$ ), aumento do fluxo de energia de absorção por centro de reação ativo (ABS/RC) e aumento da energia dissipada ( $DI_0/RC$ ) nos dois morfotipos. Os dois últimos parâmetros apresentaram maiores valores no morfotipo médio (Fig. 8a,b). O morfotipo pequeno mostrou declínio mais acentuado no fluxo de elétrons transferidos por centro de reação ativo ( $ET_0/RC$ ), causando danos na eficiência com que um éxciton capturado movimenta um elétron da  $Q_A^-$  para  $Q_B$  ( $\psi E_0$ ) (Fig. 8a). No morfotipo médio, embora o  $ET_0/RC$  não tenha se diferenciado do controle, esse resultado refletiu na leve diminuição da  $\psi E_0$  (Fig. 8b).

Sob seca, o rendimento quântico máximo ( $\phi P_0$ ) das reações de óxido-redução no FSII diminuiu levemente nos dois morfotipos. O rendimento quântico para a redução de receptores de elétrons no lado FSI ( $\phi R_0$ ) diminuiu no morfotipo médio e de forma mais acentuada no morfotipo pequeno sob seca. Isso devido a uma queda abrupta do fluxo de elétrons transferido por centro de reação ativo ao lado aceitador de FSI ( $RE_0/RC$ ) no morfotipo pequeno na seca. Essas respostas apresentadas pelo dois morfotipos sob seca refletiu em um decréscimo significativo no índice de desempenho da atividade funcional do FSII ( $PI_{ABS}$ ) e no índice de desempenho de toda cadeia de transporte de elétrons ( $PI_{TOTAL}$ ). Esse último parâmetro mostrou queda mais acentuada no morfotipo pequeno (Fig. 8).

No 36° dia de reidratação, o morfotipo médio apresentou valores superiores de ABS/RC e  $DI_0/RC$  em relação ao controle e ao morfotipo pequeno. No morfotipo médio, embora a maioria dos parâmetros mostraram falta de diferença com controle, os parâmetros  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  mostraram-se inferiores ao controle (Fig. 8b). O morfotipo pequeno no período de reidratação (36° dia) continuou com valores baixos de  $RE_0/RC$  e  $\phi R_0$ , refletindo em danos no  $PI_{TOTAL}$ . Os outros parâmetros do morfotipo pequeno se igualaram ao controle com leve melhoria no  $PI_{ABS}$  (Fig. 8a).

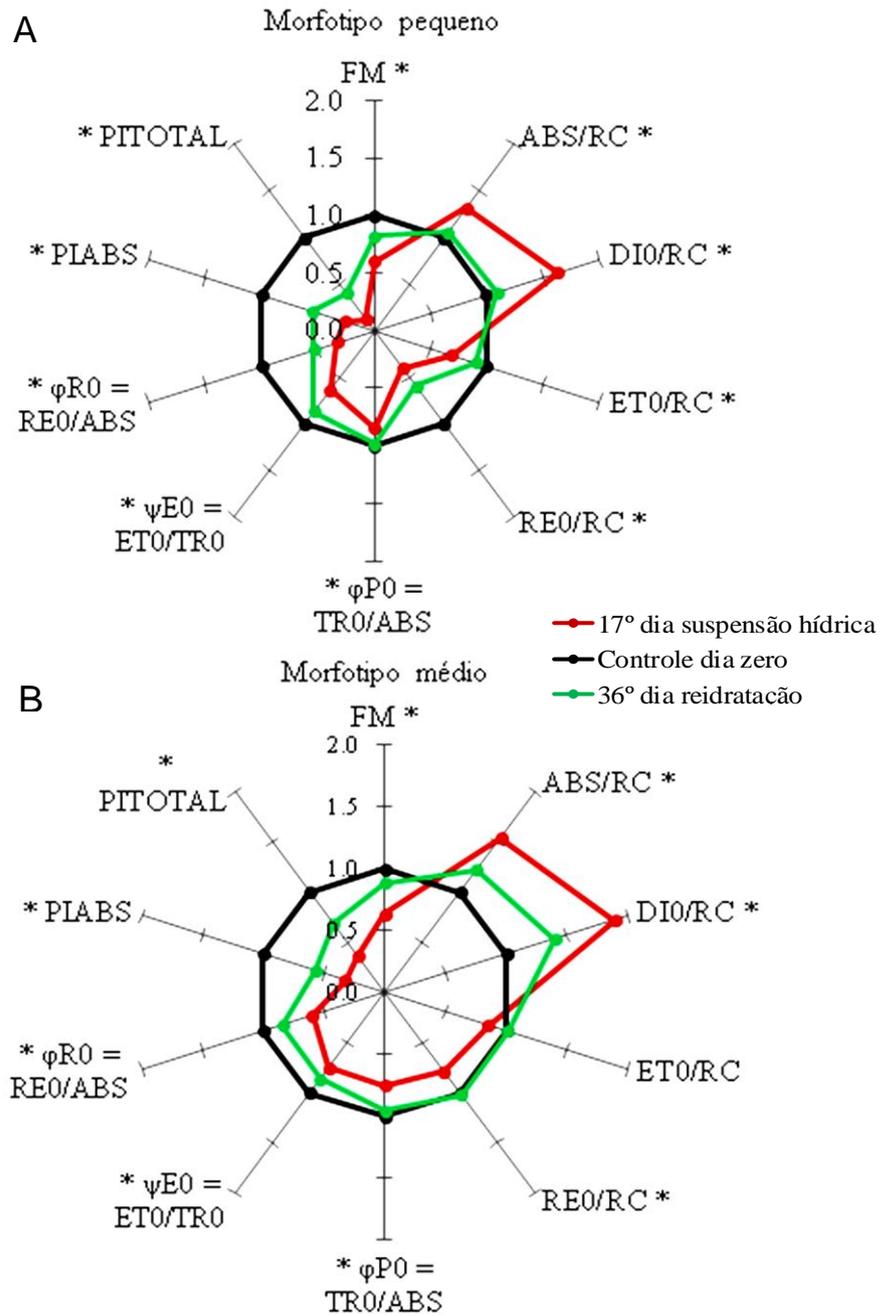


Figura 8: Parâmetros derivados do Teste JIP dos transientes de fluorescência da clorofila *a*, de folhas adaptadas no escuro de plantas juvenis dos morfotipos pequeno (A) e médio (B) de *P. echinata*, no 17° dia de suspensão hídrica e 36° de reidratação. Todos os parâmetros foram normalizados em relação aos valores do dia zero dos controles (0% = 1.0). (\*) difere estatisticamente entre os tratamentos pelo teste Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

O déficit hídrico afetou a fotossíntese dos dois morfotipos, e de forma mais intensa no morfotipo pequeno, validando a hipótese de que o morfotipo médio de *P. echinata* é mais tolerante a seca do que o morfotipo pequeno. Essa diferença intraespecífica, nas respostas fotossintéticas, parece ter relação com os hábitos ecológicos dos morfotipos de *P. echinata*. O morfotipo pequeno tolerante à sombra, por estar adaptado a ambiente mais úmido e fresco, parece ser mais sensível ao estresse hídrico como ficou constatado com o abrupto declínio das trocas gasosas e maior emissão da fluorescência da clorofila *a*. Por outro lado, o hábito heliófilo do morfotipo médio, bem adaptado a ambientes mais secos e quentes, refletiu no declínio menos acentuado de suas trocas gasosas e menores valores de intensidades na fluorescência da clorofila *a* quando submetido ao déficit hídrico.

Com a reidratação após a suspensão de água, os dois morfotipos mostraram diferenças na eficiência de recuperação das trocas gasosas e dos fotodanos na fluorescência da clorofila *a*. Alguns parâmetros das trocas gasosas (Figura 4) e da fluorescência (Figura 8) evidenciaram melhor recuperação dos danos do déficit hídrico em plantas do morfotipo médio. Esses resultados confirmam informações de que plantas tolerantes a sol e sombra respondem de forma diferenciada ao déficit hídrico permitindo que escapem e/ou se ajustem a condições ambientais desfavoráveis ao crescimento (LAMAOU *et al.*, 2018).

A intensificação do déficit hídrico pode provocar a desidratação do protoplasma (PELOSO *et al.*, 2017), causando distúrbios na estrutura das membranas celulares indicado pelo aumento de extravasamento de eletrólitos (HATSUGAI; KATAGIRI, 2018). Como constatado no presente estudo, a imposição do déficit hídrico causou redução no  $\Psi_{wp}$  foliar dos dois morfotipos de *P. echinata*. Porém, o morfotipo pequeno mostrou maior sensibilidade ao mostrar decréscimo mais rápido de  $\Psi_{wp}$  em relação ao morfotipo médio. Os valores de  $\Psi_{wp}$  próximo a -3,0 Mpa no 17º dia de máximo estresse de déficit hídrico, intensificou o *EE*, indicando quando o extravasamento dos eletrólitos no final do período de seca aumentou em 65% no morfotipo pequeno e 45% no morfotipo médio, em relação ao controle.

O declínio do potencial hídrico e o aumento do extravasamento de eletrólitos refletiu, inibindo as respostas das trocas gasosas e promovendo a fluorescência da

clorofila *a*. Resultados similares foram encontrados por Vinco (2016) num estudo com espécies heliófilas (tolerantes ao sol) *Cecropia hololeuca* e *Pachira aquatica* e espécies tolerantes a sombra *Triplaris americana* e *Cordia trichotoma*, o estresse causado pelo déficit hídrico elevou o *EE* em folhas dessas arbóreas da Mata Atlântica, na fase inicial de crescimento.

O rápido decréscimo da  $g_s$  dos dois morfotipos durante a suspensão hídrica, sugere uma resposta preventiva no sentido de controlar a perda de água dos tecidos foliares. A diminuição precoce da  $g_s$  e da *E* com o avanço do déficit hídrico no solo, permite a conservação da água no solo. Essa estratégia é manifestada por algumas plantas, no sentido de manter as atividades fisiológicas na normalidade, quando o déficit hídrico continua a aumentar (SINCLAIR *et al.*, 2018).

A sensibilidade da  $g_s$  à seca ficou evidenciada pela relação curvilínea positiva entre  $g_s \times \Psi_{wp}$ , nos dois morfotipos, mostrando a forte influência das relações hídricas no movimento dos estômatos. Isso sugere que diminuições da  $g_s$  provavelmente seria mediada pelo mecanismo de feedback hidráulico (Jones 1998 *apud* SILVA, 2017). Esse mecanismo consiste na síntese do fitohormônio ácido abscísico (ABA) pelas raízes em resposta à perda de água do solo, seguido de seu transporte pelo xilema até as folhas, onde promovem o fechamento dos estômatos. O ABA nas folhas, ativa os canais especializados de efluxo iônico de  $K^+$  na membrana plasmática das células-guarda dos estômatos, provocando o efluxo de ions  $K^+$  para as células subsidiárias, culminando no murchamento das células-guardas (ANJUM *et al.*, 2011; LAMAOU *et al.*, 2018). O fechamento dos estômatos sob restrição hídrica consiste numa estratégia de controlar a perda de água por transpiração. No entanto, o fechamento estomático acaba afetando a assimilação do  $CO_2$  pela folha, refletindo na inibição da fotossíntese (MARTINS *et al.*, 2011; LAMAOU *et al.*, 2018; YI *et al.*, 2018).

Os resultados do presente estudo mostraram que o déficit hídrico severo afetou a fotossíntese dos dois morfotipos, evidenciado pelo declínio das trocas gasosas, sobretudo, a assimilação de  $CO_2$ . Porém, de forma mais intensa no morfotipo tolerante a sombra. Isso pode ser devido as propriedades morfológicas de suas folhas incluindo maior área foliar específica (AFE) ou limbo mais fino característico de plantas tolerantes a sombra (TAIZ *et al.*, 2017). Gama (2017), num estudo com tratamentos a pleno sol e sombra nos mesmos morfotipos deste estudo, mostrou diferenças estatísticas de área foliar total (AFT) entre os morfotipos tolerantes a sol e sombra.

Em plantas tolerantes ao pleno sol ao exibirem menor AFE ou maior espessura do limbo foliar, podem apresentar maior eficiência do uso da água ( $A/E$ ) sob maior irradiância (ROSSATO e KOLB, 2010). Nesse aspecto, a  $A/E$  consiste em uma das variáveis fisiológicas importantes na resposta das plantas aos desequilíbrios osmóticos (LAMAOU *et al.*, 2018). De acordo Taiz *et al.* (2017), essa variável das trocas gasosas pode diminuir sob estresse hídrico, devido a diminuição da  $g_s$ , sendo um mecanismo de defesa que as plantas apresentam contra as perdas exageradas de água e eventual morte por dessecação. Sob estresse hídrico severo, a desidratação de células do mesófilo inibe a fotossíntese (TAIZ *et al.*, 2017). No entanto, o morfotipo médio apresentou-se como mais tolerante a seca, com valores maiores de  $A/E$  em relação ao morfotipo pequeno. Assim, plantas tolerantes a seca, com maior  $A/E$  podem apresentar melhor desempenho fotossintético sob déficit hídrico (SILVA *et al.*, 2017; PFLUG *et al.*, 2018).

Na fase de reidratação, a capacidade fotossintética dos dois morfotipos foram recuperadas de forma gradativa até se aproximar do controle. Não obstante com valores inferiores de  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  em cada ponto avaliado da reidratação, em relação a seu controle. Provavelmente, o tempo de reidratação, não foi suficiente para a completa recuperação dessas variáveis das trocas gasosas. De qualquer modo, espécies arbóreas submetidas ao estresse hídrico severo podem apresentar recuperação da taxa fotossintética ( $A$ ) entre 40 a 60% após a reidratação (SOUZA *et al.*, 2004; FLEXAS *et al.*, 2006). A recuperação da fotossíntese de plantas sob estresse, portanto, é um processo com variações interespecíficas e dependente da velocidade e do nível de recuperação do aparato fotossintético das espécies (FLEXAS *et al.*, 2006; TAIZ *et al.*, 2017).

Quanto à  $A/E$  na fase de reidratação, o morfotipo pequeno apresentou no 12º dia maior valor proporcionado pela menor  $E$  requerida para o resfriamento da superfície foliar. Esse resultado do morfotipo pequeno na reidratação pode ser atribuído a menor área foliar de seus folíolos (Gama, 2017) que deve exigir menor necessidade em perder água para resfriar a menor área de seus folíolos em relação ao morfotipo médio. Em plantas reidratadas, a transpiração representa a maneira mais eficaz do resfriamento foliar (CHAVES *et al.*, 2016).

As diminuições da  $A$  e  $g_s$  induziram aumento da  $C_i$  nos dois morfotipos sob déficit hídrico. Porém, de forma mais intensa no morfotipo pequeno. Isso pode ter

causado declínio nas concentrações de CO<sub>2</sub> no sítio ativo da Rubisco, com reduções nas taxas fotossintéticas (PELOSO *et al.*, 2017), sugerindo que sob seca, a fotossíntese nos dois morfotipos foi limitada também por fatores bioquímicos, além da queda da atividade fotoquímica e da limitação estomática já relatada. Sob déficit hídrico reduções das taxas fotossintéticas podem ocorrer devido à inibição de processos metabólicos específicos como, por exemplo, a fotofosforilação, a capacidade de regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) e redução de atividade da ribulose 1,5 bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) e de outras enzimas envolvidas no ciclo de Calvin (TAIZ *et al.*, 2017).

A fotossíntese é um dos principais drenos de elétrons nos cloroplastos, e as reduções nas taxas fotossintéticas mostradas no presente estudo dos dois morfotipos sob déficit hídrico, possivelmente ocasionou geração de ERO's causadoras de danos celulares tais como a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, o quê, em última instância, pode causar a morte do tecido vegetal (TAIZ *et al.*, 2017). Portanto, as plantas dos dois morfotipos sob seca tenderam a absorver uma quantidade de energia maior do que foram capazes de utilizar. Essas informações foram constatadas através das alterações na fluorescência da clorofila *a*, que podem mostrar a ausência ou a presença de danos no processo fotossintético (STRASSER *et al.*, 2010). O desequilíbrio energético gerado pelo estresse hídrico nos fotossistemas FSI e FSII, levou a diminuição da eficiência fotoquímica das plantas (Anjum *et al.* 2011).

Com o aumento da cinética de fluorescência da clorofila *a*, que mostra uma sequência de fases a partir do valor inicial ( $F_0$ ) até o valor máximo ( $P = F_m$ ) conhecidas como fases OJIP (CHEN *et al.*, 2016), pode-se constatar no presente estudo, que os dois morfotipos submetidos a suspensão hídrica seguido de reidratação, sofreram alterações na eficiência fotoquímica com consequências na queda da etapa bioquímica da fotossíntese, apresentando diferenças intraespecíficas.

A análise do  $\Delta VOP$  corresponde aos eventos fotoquímicos primários da fotossíntese do lado aceitador do FSII. Dessa forma, a maior amplitude positiva de  $\Delta VOP$  ocorreu no morfotipo pequeno, sugerindo sua menor atividade fotoquímica no lado aceitador do FSII sob seca. Provavelmente, as reações rotativas de oxirredução da  $Q_A$  nas etapas iniciais do processo fotoquímico não estavam ocorrendo de forma satisfatória, sendo então comprometidas pela seca onde deve ter instalado uma

desconectividade intersistêmica e menor capacidade de transferência de elétrons para o lado acceptor do FSI (STRASSER *et al.*, 2010).

Sob estresse hídrico os dois morfotipos apresentaram curvas com amplitudes positivas nas bandas L e K, sendo que o morfotipo médio tolerante ao sol apresentou os menores valores. A banda K, indica inativação dos centros de evolução de oxigênio (CEO), sugerindo redução da transferência de elétrons para P680 (YUSUF *et al.*, 2010). A banda L indica uma menor conectividade energética entre as unidades do FSII. Esses resultados sugerem que o morfotipo pequeno apresentou menor estabilidade do sistema e/ou redução de centros de reação ativos associados ao FSII (SHARMA *et al.*, 2014).

Os aspectos estruturais e funcionais do FSII são afetados por condições ambientais adversas, neste caso a seca. De acordo com Dos Santos *et al.* (2013), a susceptibilidade das espécies a seca é devida à degeneração da proteína D1 causado pelo fotodano. A recuperação dessa estrutura exige um contínuo gasto energético (KALAJI *et al.*, 2017). Dessa forma, o maior fotodano no morfotipo pequeno sob estresse hídrico severo pode ter acarretado degradação da proteína D1 e liberação de íons de magnésio e cálcio ligadas às proteínas dos fotossistemas (LAMAOU *et al.*, 2018; YI *et al.*, 2018). A proteína D1, parte do centro de reação do FSII, é facilmente danificada por excesso de luz, portanto, deve ser removida da membrana e sintetizada novamente (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009; LAMAOU *et al.*, 2018; YI *et al.*, 2018).

Na reidratação, os valores da banda K e L, mostraram tendência de decréscimo nos dois morfotipos comparados aos valores quando submetidos a seca. Porém, de forma mais acentuada no morfotipo médio, mesmo apresentando curvas mais positivas do que o controle. Este resultado denota que o morfotipo médio manteve melhor utilização da energia de excitação e maior estabilidade do sistema quando submetido à seca (STRASSER *et al.*, 2010). Além disso, segundo De Ronde *et al.* (2004), as amplitudes positivas da banda K também podem indicar ativação de algum mecanismo de defesa.

A fase IP reflete a dupla redução da plastocianina (PC)<sup>+</sup> e de P700<sup>+</sup> no FSI (SILVA *et al.*, 2011). A diferença cinética encontrada entre esses pontos evidencia a banda G, expressa como a diferença cinética  $\Delta VIP$ . Com essas informações e baseado nos resultados obtidos, sob suspensão hídrica os dois morfotipos não apresentaram curvas positivas. Entretanto, o morfotipo médio apresentou valores

similares aos do controle e curva negativa menos acentuada que o morfotipo pequeno na reidratação. Esses resultados sugerem que o morfotipo médio apresentou fotoproteção do FSI, possivelmente através do transporte de elétrons cíclicos (TEC).

O TEC provavelmente compense a perda da capacidade de redução do FSI, gerando ATP extra (WANG *et al.*, 2016). A ativação do TEC pode aumentar a dissipação de energia não fotoquímica e ser uma resposta fotoprotetora comum a vários fatores de estresse, impedindo a formação de ERO's em plantas submetidas déficit hídrico (ZHANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2016; BRAGA, 2018), e segundo nossos resultados, as plantas de sol provavelmente possuem maior fotoproteção do FSI do que as plantas de sombra. Não obstante, alguns elétrons não reduzem NADP+ para formar ATP e podem ser transferidos para o oxigênio molecular através da Reação de Mehler, resultando na formação de ERO's (YI *et al.*, 2018). Fato que se evidencia neste estudo, ao encontrar valores elevados de *EE* nos dois morfotipos no ponto de máximo estresse hídrico.

Por outro lado, os parâmetros do teste JIP confirmam os resultados das curvas de indução da fluorescência da clorofila *a* dos morfotipos sob seca, mostrando que os dois morfotipos apresentaram danos fotoinibitórios que afetaram tanto o Índice de desempenho do FSII ( $PI_{ABS}$ ) quanto o índice de desempenho de toda a cadeia de transporte de elétrons ( $PI_{TOTAL}$ ). O  $PI_{ABS}$  é o produto de três parâmetros do Teste JIP:  $\phi P_0$ ,  $\Psi E_0$  e  $\gamma RC$ . Um desbalanço em qualquer destes parâmetros pode ocasionar maior ou menor índice de desempenho do FSII. Dessa forma, sob seca, a eficiência das reações fotoquímicas após a redução de  $Q_A^-$  ( $\Psi E_0$ ) foi o parâmetro que mais contribuiu para que os dois morfotipos apresentassem redução na eficiência fotoquímica do FSII ( $PI_{ABS}$ ) e de forma mais acentuada no morfotipo pequeno. Porém, na reidratação os valores de  $\Psi E_0$  nos dois morfotipos igualaram aos seus controles. Resultados similares foram encontrados por Farias *et al.* (2017) trabalhando com *Mangifera indica* L., donde o  $\phi P_0$  e  $\Psi E_0$  evidenciaram alterações no desempenho fotossintético do FSII provocadas por alta temperatura, indicando alta sensibilidade desses parâmetros ao estresse térmico.

Segundo Stirbet *et al.* (2014), a partir das alterações do  $PI_{ABS}$  é possível classificar populações vegetais, com base em seus níveis de tolerância ao estresse ambiental, mostrando-se um bom indicador de vitalidade das plantas. Em nosso caso, os dois morfotipos apresentaram redução no  $PI_{ABS}$  e leve melhora no momento da

reidratação, corroborando os resultados das trocas gasosas com melhora gradativa das fotossínteses nos dois morfotipos. Além disso, danos no FSI são menos comuns do que no FSII (STRASSER *et al.*, 2010). Segundo Chen *et al.* (2016), o  $PI_{Total}$  mede o desempenho fotoquímico das plantas desde os fótons absorvidos pelo FSII até a redução dos aceptores finais do FSI e tem sido considerado o parâmetro mais sensível do teste JIP. Dessa forma, nossos resultados demonstram que sob seca o FSI dos dois morfotipos foram comprometidos, com maior intensidade no morfotipo pequeno, sendo sinal de que a eficiência das reações fotoquímicas da fotossíntese foi severamente afetada (CHEN *et al.*, 2016).

Os baixos valores do  $PI_{TOTAL}$  sob seca, foram influenciados pelos baixos valores do fluxo de elétrons transferido por centro de reação ativo ao lado aceitador de FSI ( $RE0/RC$ ) no morfotipo pequeno, sendo a sua diminuição mais leve no morfotipo médio. Outro parâmetro que afetou o  $PI_{TOTAL}$  foi o rendimento quântico para a redução de receptores de elétrons no lado FSI ( $\phi Ro$ ) dos dois morfotipos. No entanto, o morfotipo pequeno apresentou menor rendimento sob seca. Na fase de reidratação o morfotipo médio recuperou totalmente os parâmetros  $\phi Ro$  e  $RE0/RC$ . Mas não o  $PI_{TOTAL}$  que não atingiu os valores do controle. Os valores de  $\phi Ro$  e  $RE0/RC$  do morfotipo pequeno no período de reidratação permaneceram abaixo do controle.

Sob seca, o fluxo de energia de absorção por centro de reação ativo ( $ABS/RC$ ) e da energia dissipada ( $DI_0/RC$ ) aumentou nos dois morfotipos.  $ABS/RC$  indica que houve um incremento na proporção da quantidade de moléculas de clorofila *a* nos complexos de antenas emissoras de fluorescência da clorofila *a* e os centros de reação ativos (GOLTSEV *et al.*, 2016), nosso caso sem diferença entre os dois morfotipos sob seca. No período de reidratação segundo os valores de  $ABS/RC$ , a quantidade de clorofila *a* por centros de reação diminuiu nos dois morfotipos em relação ao controle. No entanto, se manteve mais alto no morfotipo médio. O parâmetro  $DI_0/RC$  indica que os dois morfotipos submetidos a seca dissiparam energia como calor, fluorescência ou transferência de energia para FSI (GOLTSEV *et al.*, 2016). Assim, o morfotipo médio no período de reidratação continuou dissipando mais energia total que o morfotipo pequeno, este último igualou os valores do controle. O  $DI_0/RC$  não pode ser caracterizado como dano, mas sim como um mecanismo de proteção que permite a dissipação do excesso de energia e a manutenção do FSI (GASPARINI, 2015). Farias *et al.* (2017) destacaram a importância do índice de

dissipação de energia ( $D_{i0}/RC$ ) para atenuar os danos nos fotossistemas por estresse térmico, por falta de resfriamento, evidenciando um mecanismo fotoprotetor à fotoinibição da fotossíntese, podendo ser considerado um potencial marcador fisiológico (KALAJI *et al.*, 2017).

## 5. CONCLUSÕES

As plantas dos dois morfotipos de *P. echinata* cultivadas sob déficit hídrico apresentaram redução de  $A$  associados a menores taxas de  $g_s$  e  $E$ , e aumento de  $C_i$ , indicando menos substrato para Rubisco e menor carboxilação. Também, constatamos aumento da fluorescência da clorofila  $a$ , indicando uma diminuição da taxa de transporte de elétrons e do aproveitamento da energia luminosa para a síntese de ATP e NADPH no aparato fotossintético, sendo o morfotipo pequeno mais comprometido no seu desempenho fotossintético. No período de reidratação, a capacidade fotossintética dos dois morfotipos se recuperou e de forma progressiva. Porém sem conseguir 100% da recuperação dos danos causados pelo déficit hídrico.

O aparelho fotossintético do morfotipo médio tolerante ao sol mostrou menores amplitudes das curvas positivas nas análises OJIP, e com maior fotoproteção através do transporte de elétrons cíclicos (TEC). Essa informação é confirmada pela maior dissipação de energia ( $D_{i0}/RC$ ), maior fluxo de elétrons transferido por centro de reação ativo ao lado aceitador de FSI ( $RE_0/RC$ ), maior redução de receptores de elétrons no lado FSI ( $\phi R_0$ ), com menores declínios do  $PI_{TOTAL}$  na seca e com aumento dessas variáveis na reidratação em comparação ao morfotipo pequeno. Esses resultados sugerem que o morfotipo médio possui maior fotoproteção do FSI em relação ao morfotipo pequeno quando expostos ao déficit hídrico. O morfotipo pequeno sob seca foi mais afetado nos parâmetros  $RE_0/RC$  e  $\phi R_0$  que influenciaram os danos no  $PI_{TOTAL}$ , com baixa recuperação no momento da reidratação.

Contudo, essas respostas fotossintéticas mostram diferenças intraespecíficas com o morfotipo médio detendo melhor performance das trocas gasosas e sofrendo menor dano no transporte de elétrons em relação ao morfotipo pequeno, sob simulação de seca. Se a seca das mudanças climáticas nas regiões de domínio da Mata Atlântica se instalarem nas próximas décadas, e considerando que o morfotipo pequeno é o que tem a distribuição mais ampla, possivelmente no estabelecimento

inicial a limitação da fotossíntese causada pela seca poderia levar à redução ou alteração na distribuição natural do morfotipo pequeno e por sua vez redução nas populações naturais de *Paubrasilia echinata*. Embora, no presente estudo, não se constatou mortalidade até o máximo de estresse hídrico imposto aos 17<sup>o</sup> dias.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANJUM, S.A.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M.F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, vol. 6(9), pp. 2026-2032, 2011.
- BAJJI, M.; KINET, J-M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell embrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, p. 1-10, 2001.
- BRAGA, PRISCILA DA CONCEIÇÃO DE SOUZA. Respostas morfofisiológicas durante o crescimento e produção em genótipos de crambe sob déficit hídrico. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.
- BELLARD, C., LECLERC, C., LEROY, B., BAKKENES, M., VELOZ, S., THUILLER, W. E COURCHAMP, F. Hotspots de biodiversidade e mudanças globais. *Global Ecology and Biogeography*, 23: 1376-1386, 2014.
- CHAVES, M.M.; COSTA, J.M.; ZARROUK, O.; PINHEIRO, C.; LOPES, C.M.; PEREIRA, J.S. Controlling stomatal aperture in semi-arid regions—The dilemma of saving water or being cool?, *Plant Science*, Volume 251, p. 54-64, 2016.
- CHEN, S.; YANG, J.; ZHANG, M.; STRASSER, R. J.; QIANG, S. Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP. *Environmental and Experimental Botany*, v. 122, p. 126-140, 2016.
- CHOAT, B., JANSEN, S., BRODRIBB, T. et al. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491, 752–755, 2012.
- DE RONDE, J.A.; CRESS, W.A.; KRUGER, G.H.J.; STRASSER, R.J. & VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis*P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, vol.161, p. 1211-1224, 2004.
- DOS SANTOS, C.M.; VERISSIMO, V.; FILHO, H.C.L.W.; FERREIRA, V.M.; CAVALCANTE, P.G.S.; ROLIM, E.V.; ENDRES, L. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi- arid areas subject to water stress. *Industrial Crop sand Products*. v.41, p.203- 213, 2013.
- FARIA-SILVA, L.; GALLON, C. Z.; PURGATTO, E.; SILVA, D.M. Photochemical metabolism and fruit quality of Ubá mango tree exposed to combined light and heat stress in the field. *Acta Physiologiae Plantarum*. V. 39, p.238, 2017.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; HENKLE, M.; MARTÍNEZ-CAÑELLAS, S.; MEDRANO, H. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist*, vol.172(1), pp.73-82, 2006.

FRANCO, N. & YOJO, T. Propriedades físicas, mecânicas e acústicas da madeira de Pau-brasil. In: R.C.L.F. Ribeiro, C.J. Barbedo, E.S. Alves, M. Domingos & M.R. Braga (orgs.). Pau-brasil, da semente à madeira conhecer para conservar. Instituto de Botânica, São Paulo, pp146-157, 2008.

GAMA, V.N. Caracterização morfofisiológica e bioquímica de três morfotipos de *Paubrasília echinata* Lam. Exposta a condições de irradiância. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

GASPARINI, X.S.S. Efeitos da radiação e da temperatura em cinco acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.): crescimento, fluorescência da clorofila a e floração. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

GOLTSEV VN, KALAJI HM, PAUNOV M, BAĞBA W, HORACZEK T, MOJSKI J, KOCIEL H, ALLAKHVERDIEV SI. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russ J Plant Physiol* 63: 869–893, 2016.

GRAY, S. B.; DERMODY, O.; KLEIN, S. P.; LOCKE, A. M.; MCGRATH, J. M.; PAUL, R. E.; ROSENTHAL, D.M; RUIZ-VERA, U.M; SIEBERS, M.H; STRELLNER, R.; AINSWORTH, A.E.; BERNACCHI, C.J; LONG, S.P.; ORT, D.R; LEAKEY, A.D.B. Intensifying drought eliminates the expected benefits of elevated carbon dioxide for soybean. *Nature Plants*, Vol.2(9), 2016.

GRACE, J., MITCHARD, E. & GLOOR, E. Perturbações no orçamento de carbono dos trópicos. *Glob. Mude Biol.* 20 , 3238-3255, 2014.

HATSUGAI, N. E KATAGIRI, F. Quantificação da Morte Celular por Ensaio de Fuga de Eletrólitos. *Bio-protocolo* 8 (5): e2758, 2018.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

IPCC - Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas. Summary for policymakers, in Climate Change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. In Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Eds. C. B. Field, V. R. Barros, D. J. Dokken, K.

J. Mach, M. D. Mastrandrea, T. E. Bilir, et al. (Cambridge; New York, NY: Cambridge University Press), 1–32, 2014.

IPCC - Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas. Aquecimento global de 1,5 ° C. Um relatório especial do IPCC sobre os impactos do aquecimento global de 1,5 ° C. Sumário para Formuladores de Políticas. Eds. Masson-Delmotte V, Zhai P, Pörtner HO, Roberts D, Skea J, Shukla PR, et al. Tradução: Mariane Arantes Rocha de Oliveira, 2018.

KALAJI, H.M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVACK, M.; SAMBORSKA, I. A.; CETNER, M. D.; LUKASIK, I.; GOLTSEV, V.; LADLE, R. J. Chlorophyll fluorescence as a tool for nutrient status identification in rapeseed plants. *Photosynthesis Research*. V,14, n.5 p.124-131, 2017.

LAMAOU, M.; JEMO, M.; DATLA, R.; BEKKAOU, F. Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. *Frontiers in chemistry*. Vol.6, pp.26, 2018.

LANGARO, A. C. Alterações fisiológicas na cultura do tomateiro devido à deriva simulada de herbicidas. *Revista Brasileira de Herbicidas*, Londrina, v. 13, n.1, p. 40-46. 2014.

LIMA, H. C. SOUZA, E. R. TOZZI, A. M. *et al.* Fabaceae/Leguminosae. In: Gustavo Martinelli; Miguel Avila Moraes. (Org.). Livro Vermelho da Flora do Brasil. 1ed.Rio de Janeiro: Andrea Jacobson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: CNCFlora, v. 1, p. 516-548, 2013.

MACHADO, E. C.; SCHMIDT, P. T., MEDINA, C. L.. Photosynthetic responses of three citrus species to environmental factors. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, p. 1161-1170, 2005.

PBMC - Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. Capítulo 9: Mudanças ambientais de curto e longo prazo: projeções, reversibilidade e atribuição. In: Base científica das mudanças climáticas. Contribuição do Grupo de Trabalho 1 do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas ao Primeiro Relatório da Avaliação Nacional sobre Mudanças Climáticas [Ambrizzi, T., Araujo, M. (eds)]. COPPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 464 pp. 2014.

PELOSO, A. F.; TATAGIBA, S. D.; REIS, E. F.; PEZZOPANE, J. E. M.; AMARAL, J. F. T. Limitações fotossintéticas em folhas de cafeeiro arábica promovidas pelo déficit hídrico. *Coffee Science*, Lavras, v. 12, n. 3, p. 389 – 399. 2017.

PFLUG, ELLEN E.; BUCHMANN, NINA; SIEGWOLF, ROLF T.W.; SCHAUB, MARCUS; RIGLING, ANDREAS; AREND, MATTHIAS. Resilient Leaf Physiological Response of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) to Summer Drought and Drought Release. *Front. Plant Sci.*, 19 February 2018.

PILON, CRISTIANE; SNIDER, JOHN L; SOBOLEV, VICTOR; CHASTAIN, DARYL R; SORENSEN, RONALD B; MEEKS, CALVIN D; MASSA, ALICIA N; WALK, TRAVIS; SINGH, BHUPINDER; EARL, HUGH J. Assessing stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation under progressive drought in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Plant Physiology* 231: 124–134. 2018.

POORTER, L.; MCDONALD, I.; ALARCÓN, A.; FICHTLER, E.; LICONA, J.; PEÑA-CLAROS, M.; STERCK, F.; VILLEGAS, Z.; SASS-KLAASEN, U. The importance of wood traits and hydraulic conductance for the performance and life history strategies of 42 rainforest tree species. *New Phytologist*, v. 185, p. 481-492, 2010.

REDILLAS, M.C.; STRASSER, R.J.; JEONG, J.S.; KIM, Y.S.; KIM, J.K. The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. *Plant Biotechnol Rep.*, vol. 5:169, 2011.

ROSSATO, D.R.; KOLB, R.M. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, n. 3, p. 605-612, 2010.

SCHOLANDER, PF; HAMMEL, HT; HEMINGSEN, EA; BRADSTREET, ED Pressão hidrostática e potenciais osmóticos em folhas de manguezais e algumas outras plantas. *Proceedings of National Academy Science*, v.51, p.119-125, 1965.

SEYFFARTH, J.A.S; RODRIGUES, V. Impactos da seca sobre a biodiversidade da Caatinga. *Parc. Estrat. Brasília-DF*, v. 22, n. 44, p. 41-62, 2017.

SHARMA, D.K.; FERNÁNDEZ, J.O.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C.O. & ANDERSEN, S.B. Genotypic response of detached leaves versus intact plants for chlorophyll fluorescence parameters under high temperature stress in wheat. *Journal of Plant Physiology*, vol.171, p.576-586, 2014.

SILVA, D.M.; DOS SANTOS, K.T.; DUARTE, M.M. Eficiência fotoquímica em folhas do mamoeiro (*CaricacarpaL.*) cv. golden durante o estágio reprodutivo e caracterização da ontogenia dos frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.33, n.4 p.1066-1073, 2011.

SILVA, P.A., COSME, V.S., RODRIGUES, K.C.B. et al. Drought tolerance in two oil palm hybrids as related to adjustments in carbon metabolism and vegetative growth. *Acta Physiol Plant*, 39: 58, 2017.

SINCLAIR, T.R.; SHEKOOFA, A.; ISLEIB, T.G.; BALOTA, M.; ZHANG, H. Identification of virginia-type peanut genotypes for water-deficit conditions based on early decrease in transpiration rate with soil drying. *Crop Science*, vol.58(6), pp.2607-2612, 2018.

- SNIDER, J. L., D. M. OOSTERHUIS, G. D. COLLINS, C. PILON, FITZSIMONS, T. R. Field-acclimated *Gossypium hirsutum* cultivars exhibit genotypic and seasonal differences in photosystem II thermostability. *J. Plant Physiol.* 170, p. 489– 496, 2013.
- SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGÔA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany*, v. 51, n. 1, p. 45–56, fev. 2004.
- STIRBET, A.; RIZNICHENKO, YU G.; RUBIN, A. B.; GOVINDJEE. Modeling Chlorophyll a Fluorescence Transient: Relation to Photosynthesis. *Biochemistry*. vol. 79, n. 4, 2014.
- STRASSER, R. J., TSIMILLI-MICHAEL, M., QIANG, S., GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenerg.* 1797, 1313–1326, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888, 2017.
- TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. In vivo assessment of stress impact on plants' vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of Mycorrhization on host plants. *Mycorrhiza*. v. 3, p. 679-703, 2008.
- TURNER, N.C. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil*, v.58, p.339-366, 1981.
- VALLADARES, F; MATESANZ, S; GUILHAUMON, F; ARAÚJO, M.B; BALAGUER, L; BENITO-GARZÓN, M; CORNWELL, W; GIANOLI, E; KLEUNEN, M; NAYA, D.E; NICOTRA, A.B; POORTER, H; ZAVALA, MIGUEL A. The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters*, Vol.17(11), pp.1351-1364, 2014.
- VICENTE, A.; YUSTE, J. Potenciales hídricos de hoja y de xilema respuesta como indicadores del estado hídrico del viñedo, en cv. Verdejo, sometido a diferentes regímenes hídricos en la D.O. Rueda. I Jornada del Grupo de Viticultura y Enología: Comunicaciones, Logroño, 19 y 20 de noviembre, 2014.
- VINCO, J.S. *Ecofisiologia de espécies nativas da Mata Atlântica submetidas a estresse hídrico*. Monografia de Engenharia Florestal - Ciências Florestais e da Madeira da Universidade Federal do Espírito Santo. 2016.

WANG, Y.; XU, C.; WU, M. & CHEN, G. Characterization of photosynthetic performance during reproductive stage in high-yield hybrid rice LYPJ exposed to drought stress probed by chlorophyll a fluorescence transient. *Plant Growth Regulation*, vol.81, p. 489-499, 2016.

YI, XIAO-PING; ZHANG, YA-LI; YAO, HE-SHENG; HAN, JI-MEI; CHOW, WAH SOON; FAN, DA-YONG; ZHANG, WANG-FENG. Changes in activities of both photosystems and the regulatory effect of cyclic electron flow in field-grown cotton (*Gossypium hirsutum* L) under water deficit. *Journal of Plant Physiology* 220 (2018) 74–82. 2018.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE & SARIN, N.B. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherolmethyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.1797, p. 1428-1438. 2010.

ZHANG, Y. L., Y. Y. HU, H. H. LUO, W. S. CHOW, ZHANG, W. F. Two distinct strategies of cotton and soybean differing in leaf movement to perform photosynthesis under drought in the field. *Funct. Plant Biol.* 38, p. 567– 575, 2011.

ZARGAR, S. M., GUPTA, N., NAZIR, M., MAHAJAN, R., MALIK, F. A., SOFI, N. R., SHIKARI, A.B., SALGOTRA, R. K. Drought impact on photosynthesis: molecular perspective. *Plant Gene* 11: 154–159, 2017.

## **CAPITULO 2 – Dinâmica de carboidratos estruturais, não estruturais e lignina em plantas juvenis de dois morfotipos de *Paubrasilia echinata* sob déficit hídrico seguido de reidratação**

Sánchez, F.C.L<sup>1</sup>, Venâncio, F.C.D<sup>1</sup>, Pezzopane, J.E.M<sup>2</sup>, Moraes, M. G<sup>3</sup>. Cuzzuol, G.R.F<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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: carlos\_sanche70@hotmail.com.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro-ES, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia Goiânia, Goiás, Brasil

### **RESUMO**

As plantas possuem uma série de mecanismos fisiológicos e bioquímicos para minimizar o efeito da seca. É conhecido o ajuste da concentração de carboidratos não estruturais (açúcares e amido), mas sem levar em consideração o hábito com relação à luminosidade (espécies tolerantes sombra e tolerantes ao pleno sol). Como modelo de investigação utilizamos o morfotipo tolerante a sombra e o morfotipo tolerante ao pleno sol de *P. echinata*. Plantas juvenis dos morfotipos foram submetidas a simulação de seca, com suspensão de água, seguido de simulação de chuva, reidratação. Foi determinada a alocação de carboidrato estrutural, não estrutural e lignina em folhas, caule e raiz das plantas dos dois morfotipos. As dinâmicas nas concentrações de carbono durante o avanço do estresse hídrico aconteceram de forma diferenciada entre os morfotipos, e de acordo com o órgão vegetativo (folha, caule, raiz). O morfotipo tolerante à sombra apresentou respostas imediatas ao aumento do estresse hídrico elevando os teores de açúcares solúveis (mono-, di-, tri- e oligossacarídeos), hemiceluloses e lignina em todos os órgãos vegetativos, com maior depleção do amido nos órgãos aéreos (folha e caule) sobre seca severa. O morfotipo tolerante ao sol, sobre seca severa, também sofreu depleção do amido em todos os órgãos vegetativos, sendo mais intenso em raiz. Porém, aumentou os seus teores de açúcares solúveis na planta inteira, além de aumentar lignina e hemiceluloses com concentrações superiores que o morfotipo tolerante à sombra. Concluímos que os hábitos dos morfotipos refletiram nas suas estratégias fisiológicas para ajustar a alocação dos carboidratos na tolerância à seca.

**Palavras-chave:** Carboidratos • Polímeros de parede celular • Disponibilidade hídrica • Tolerância à seca.

## 1. INTRODUÇÃO

Os cenários de mudança climática preveem que a intensidade e frequência da seca aumentará ainda mais nas próximas décadas (IPCC, 2014). A seca é um dos fatores abióticos de maior impacto, devido ao efeito que desempenha no crescimento e desenvolvimento vegetal (GRAY *et al.*, 2016). Considerando as previsões de redução das precipitações para a região nordeste brasileira com perspectivas de alcançar a região sudeste (Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas-PBMC, 2014), presume-se que haverá uma ampla gama de sensibilidades de respostas fisiológicas ao estresse hídrico em nível interespecífico e intraespecífico em espécies da Mata Atlântica (GRAY *et al.*, 2016).

O desempenho das espécies sob seca pode ser influenciado pelo local onde as plantas crescem na floresta, seja no sub-bosque como espécies tolerantes à sombra ou tolerantes a pleno sol. A tolerância das plantas às variações na disponibilidade dos fatores ambientais limitantes determina, em parte, a composição e distribuição das espécies (AMISSAH *et al.*, 2015). Plantas que crescem na sombra normalmente investem em carbono acima do solo (folhas e caule) e geram folhas finas e maiores para otimizar a captura de luz. Plantas sob pleno sol alocam relativamente menos carbono em folhas e alocam mais em raízes no sentido de capturar mais água e nutrientes para atender as demandas das altas taxas de transpiração (AMISSAH *et al.*, 2015; OSNAS, 2018).

Entender como as plantas de sombra e de sol da Mata Atlântica responderão a seca severa seguida de um período de chuvas é um assunto de interesse ecofisiológico para o manejo florestal. O pau-brasil [*Paubrasilia echinata* (Lam) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis], nativa da Mata Atlântica (LIMA, 2013), é uma arbórea tropical que possui três morfotipos divergentes quanto ao tamanho da folha e hábito ecológico em relação à luminosidade. O morfotipo folha pequena é tolerante à sombra enquanto os morfotipos folha média e folha grande são tolerantes ao sol (GAMA, 2017). Essa distinção ecológica intraespecífica dos morfotipos de *P. echinata* é singular em florestas tropicais úmidas, e ideais para investigações de efeitos de fatores ambientais em plantas tolerantes a sombra e tolerantes ao pleno sol, por eliminar as divergências taxonômicas interespecíficas.

Sabe-se que, as plantas possuem uma série de mecanismos de escape dos efeitos nocivos da seca e são capazes de desenvolver estratégias adaptativas ou apresentar plasticidade fenotípica (VALLADARES *et al.*, 2014) em níveis morfológicos, fisiológico e bioquímico (LE GALL *et al.*, 2015). A mortalidade de espécies vulneráveis à seca pode ocorrer por deficiência hidráulica ou por limitações prolongadas na assimilação do carbono (JIN *et al.*, 2018). Algumas espécies podem entrar em extinção ou migrar para outras regiões do planeta com condições mais ótimas para seu desenvolvimento (VALLADARES *et al.*, 2014).

O impacto potencial da seca no balanço de carbono em plantas tem recebido grande atenção (MARTINEZ-VILALTA *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2020; SIGNORI-MÜLLER, 2021). A dinâmica dos carboidratos é sugerida como uma característica importante no ajuste do balanço de carbono (fotossíntese e respiração) em condições de seca. As plantas dependem tanto do carbono recém-assimilado quanto das reservas armazenadas de compostos ricos em carbono para o crescimento e outras funções fisiológicas, como respiração, regulação osmótica e defesa (MARTINEZ-VILALTA *et al.*, 2016).

A redução na assimilação de carbono em resposta à seca se deve ao fechamento estomático, que pode levar as plantas a um balanço de carbono negativo, que dependendo da duração do estresse hídrico, pode resultar em morte da planta. Um declínio prolongado nos teores de carboidratos pode afetar a sobrevivência das plantas em condições de seca (DIETZE *et al.*, 2014). Diante de uma seca severa, algumas espécies tolerantes podem limitar fortemente seu crescimento cambial. Isso sugere que reajustes e alocação dos carboidratos entre fonte-dreno estão ocorrendo em resposta à falta de água, e essa estratégia pode contribuir para o aumento da sobrevivência das árvores (CHUSTE *et al.*, 2020).

A alocação de carbono nas plantas ocorre principalmente na forma de carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) e não estruturais (açúcares solúveis e amido). A composição química dos carboidratos varia e a concentração desses compostos são diferentes entre espécies, órgãos, tecidos e células. Os carboidratos não estruturais podem variar ao longo do dia, e nas diferentes estações do ano, de acordo com as fases do desenvolvimento (SOUZA *et al.*, 2005). A biomassa lignocelulósica é composta por polissacarídeos estruturais (celulose, hemicelulose), incorporados a uma matriz constituída de pectina, proteínas estruturais e, dependendo

do tecido/órgão, de lignina (LE GALL et al., 2015). Os polímeros estruturais são os principais constituintes da parede celular vegetal (~90%), particionados em celulose (35–50%), hemiceluloses (15–35%), lignina (15–35%) e pectinas (<10%) (CARPITA; MCCANN, 2000; WILDHAGEN et al. 2018).

O polissacarídeo vegetal mais abundante é a celulose, e representa cerca de 30 % da massa seca de paredes primárias, e até 60 % de massa seca de paredes secundárias (MEENTS, 2018). A celulose quando hidrolisada por ácidos ou enzimas, produz monômeros de glicose. Esse polímero de glicose funciona como sinalizador, facilitando o reconhecimento entre células, armazena compostos de reserva e moléculas reguladoras que controlam variados processos fisiológicos celulares e mecanismos de proteção contra microrganismos (BUCKERIDGE et al., 2008).

As hemiceluloses consistem em uma família de polissacarídeos heterogêneos constituídas de estruturas moleculares complexas como as mananos e xilanos (BERGLUND et al., 2020). As hemiceluloses têm sido sugeridas com a função de atuar na ligação entre a lignina e os componentes da celulose e de regular a agregação das microfibrilas de celulose na parede celular (BERGLUND et al., 2020). Há indicações de que as hemiceluloses podem ser remobilizadas, funcionando como composto de reserva de carbono (SCHÄDEL et al., 2009).

A lignina proporciona rigidez e hidrofobicidade das paredes celulares secundárias, fundamental para as necessidades de condução de água nos tecidos vasculares das plantas (BERGLUND et al., 2020). Baixas temperaturas ou deficiência hídrica tem relação com a concentração de lignina (MOURA et al., 2010). Portanto, o processo de lignificação pode reforçar a resistência e rigidez das paredes celulares, podendo ser uma componente chave da resposta da planta a fatores de estresse ambiental como a seca (LE GALL et al., 2015).

Uma fração menor de carbono fotoassimilado é retida na forma de carboidratos não estruturais constituídos de amido e açúcares solúveis (DIETZE et al. 2014). Os carboidratos não estruturais (*sigla em inglês* NSC) desempenham papéis importantes na adaptação das plantas (MARTINEZ-VILALTA et al., 2016), e cumprem funções distintas, incluindo transporte, metabolismo energético e proteção contra à restrição hídrica, atuado ainda como osmorreguladores (HARTMANN; TRUMBORE, 2016; SOUZA et al., 2005). Os NSC são acumulados e armazenados para manter o

metabolismo da noite e nos períodos estressantes, principalmente quando a assimilação de carbono é insuficiente para atender a demanda (KOZLOWSKI, 1992).

O amido e os principais açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) constituem mais de 80% do NSC em árvores (HOCH et al. 2003). O amido, por ser um composto insolúvel, é a reserva de carboidrato mais abundante nas plantas (TAIZ et al., 2017), sendo um composto puramente de armazenamento para uso futuro, tanto para curto ou a longo prazo. Os açúcares solúveis realizam uma variedade de funções incluindo manutenção da respiração e defesa (MARTINEZ-VILALTA et al., 2016). Os açúcares solúveis estão envolvidos na sinalização ambiental (GIBSON, 2005), manutenção do turgor (HUMMEL et al., 2010), transporte do floema (SAVAGE et al., 2016) e, possivelmente, no reparo do xilema (SECCHI; ZWIENIECKI, 2011). A sacarose é composta por uma molécula de glicose e outra de frutose, e devido a sua natureza não redutora, apresenta uma ampla translocação no corpo da planta, e pode ser armazenado em vacúolos, até ser metabolizada quando necessário (LAMBERS, 2006).

Outros NSC podem ser encontrados em plantas em menores concentrações como a rafinose e seus oligossacarídeos e açúcares álcoois (os ciclitóis) (HARTMANN; TRUMBORE, 2016; VERNON et al. 1993). Esses oligossacarídeos podem atuar como compostos de reserva, além exercer a função de proteção contra a seca e o frio (TAJI et al., 2002). Os ciclitóis são altamente solúveis e acredita-se que podem atuar como estabilizadores de membranas, protegendo as macromoléculas de efeitos do déficit hídrico (VERNON et al. 1993).

Apesar do conhecimento das respostas das plantas ao déficit hídrico, muitos são os aspectos que requerem mais estudos, incluindo estratégias em resposta à desidratação e, conseqüentemente, a dinâmica na alocação dos carboidratos frente ao estresse hídrico. Muitas plantas empregam o mecanismo de ajuste osmótico como ponto chave para lidar com o estresse à seca, por meio da síntese/acúmulo em larga escala de solutos compatíveis, incluindo os carboidratos e proteínas de baixo peso molecular (MORADI et al., 2017).

Em situação de déficit hídrico, a concentração de carboidratos não estruturais pode ser alterada (HOCH, 2003), e as diferenças de concentrações estejam relacionadas possivelmente a resistência à seca em nível interespecífico (MARTINEZ-VILALTA et al., 2016). Algumas espécies tolerantes ao estresse ambiental podem

aumentar os teores de NCS para melhorar o potencial hídrico, e manter a pressão osmótica sob seca. No entanto, a seca severa pode causar disfunção fisiológica nas plantas, levando ao esgotamento dos NSC armazenados (HE et al., 2020).

As variações dos carboidratos são atribuídas às diferenças entre as espécies, e as condições ambientais e sazonais dentro dos locais onde as plantas se desenvolvem (MARTINEZ-VILALTA et al., 2016). Plantas que se desenvolvem em ambientes com condições de estresse hídrico, podem recorrer às vias metabólicas que minimizem os efeitos deletérios da seca, via biossíntese de compostos envolvidos em mecanismos de defesa e proteção celular (IRFAN et al., 2019). Em espécies arbóreas menos adaptadas ao déficit hídrico, não é observado maior ajuste no acúmulo de açúcares solúveis (SIGNORI-MÜLLER, 2021).

Considerando que plantas tolerantes ao pleno sol habitam ambientes menos úmidos em relação as plantas tolerantes a sombra (ROSSATO e KOLB, 2010), e que as concentrações dos carboidratos tendem a aumentar em plantas quando expostas a condições ambientais limitantes ao crescimento (MARTINEZ-VILALTA et al., 2016), espera-se que as concentrações de carboidratos não estruturais e carbono estrutural variem nos diferentes órgãos da planta (folha, caule, raiz) de acordo com os hábitos ecológicos de cada morfotipo quando expostas a condições de estresse hídrico.

Nesse sentido, hipotetizamos que plantas do morfotipo tolerante ao sol de *P. echinata* sob déficit hídrico severo exibam maior capacidade de aumento dos teores de lignina e hemicelulose em seus órgãos vegetativos, e acúmulo de carboidratos não estruturais em relação ao morfotipo tolerante à sombra. Na fase de reidratação, espera-se que o morfotipo tolerante ao sol seja capaz de apresentar maior capacidade de recuperação dos efeitos danosos da seca em relação ao morfotipo tolerante à sombra. Para testar essas hipóteses determinamos os teores dos polímeros de parede celular e dos NCS em folhas, caule e raiz em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* submetidas ao déficit hídrico, seguido de reidratação.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***2.1 Material vegetal***

O experimento foi conduzido na área experimental do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo em Vitória, ES (20°18'52"S e 40°19'06"W). Plantas dos morfotipos pequeno e médio *Paubrasilia*

*echinata* (Lam) Gagnon, H.C.Lima & G.P. Lewis foram produzidas de forma seminal no viveiro da Reserva Natural Vale em Sooretama-ES (19°09'04"S e 40°04'36"W). Sementes coletadas de matrizes da Reserva Natural Vale foram semeadas em sacos plásticos (2.5 L) contendo como substrato solo argila:arenoso (2:1) acomodados em condições ambientais naturais de temperatura média anual de  $24\pm 2$  °C, fotoperíodo de  $10\pm 1$ h, umidade relativa de  $70\pm 15\%$ , e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de  $1.000\pm 150$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionado por tela de nylon preta Sombrite®. As plantas foram irrigadas, diariamente, com água corrente por aspersão eletrônica.

Plantas com um ano de idade (70 plantas por morfotipo) medindo  $22\pm 4$  cm de altura foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 8L, contendo como substrato uma mistura de solo comercial Forth e areia na proporção (2:1). Em seguida, as plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura média de  $25\pm 2$  °C, fotoperíodo de  $8\pm 1$ h e PAR de  $1.000\pm 150$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  determinado em espectrorradiômetro (Spectrum Technologies, Inc., Illinois, EUA). As plantas foram irrigadas, diariamente, com água da torneira até capacidade de campo, sempre quando necessário. Após 25 dias de cultivo nessas condições, foi aplicada uma única dose de 200 mL da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) em meia força iônica por planta, visando o aumento do vigor das mudas.

Após dois meses de cultivo nas condições acima, as plantas foram transferidas para estufas (6,0 m de comprimento x 1,5 m de profundidade x 2,0 m de altura) revestidas de filme plástico de polietileno 150 micra. No interior dessas estufas registramos com Termo-higrômetro Digital (TH-02 Impac.com.br), dados médios de umidade relativa, temperatura (°C) e déficit de pressão de vapor (DPV) ao longo do experimento com 56%,  $29\pm 3$  °C e 1.72 DPV, respectivamente. Com fotoperíodo natural de  $11\pm 1$ h e  $1.200\pm 50$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR, determinados em um dia sem nuvens às 9:00 horas da manhã. As plantas foram irrigadas, diariamente, com água da torneira. Após dois meses de aclimação nessas condições, plantas dos dois morfotipos medindo  $35\pm 4$  cm de altura e contendo  $5\pm 1$  folhas, foram divididas em dois lotes: plantas controle (sempre irrigadas) e plantas tratadas (suspensão de água seguido de reidratação).

## **2.2 Delineamento experimental**

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro combinações de tratamentos: morfotipo pequeno controle, morfotipo médio controle, morfotipo pequeno tratado e morfotipo médio tratado. O esquema: (1) plantas controle: um grupo de 70 plantas, sendo 35 do morfotipo pequeno e 35 do morfotipo médio, foram irrigadas continuamente com água corrente até capacidade de campo; e (2) plantas tratadas: outro grupo com as mesmas quantidades de plantas que o controle, foram sujeitas a déficit hídrico imposto pela suspensão de água, seguido de um período de reidratação (irrigadas até capacidade de campo). Total de plantas, 140 unidades dos dois morfotipos. Cinco repetições por tratamento foram usadas e uma única planta por vaso foi considerada como uma repetição. O tempo máximo de suspensão hídrica das plantas tratadas ocorreu ao 17º dia quando o potencial hídrico foliar antemanhã ( $\Psi_{wp}$ ) chegou próximo de -3 MPa (ver item 2.3). Em seguida, as plantas sob seca foram reidratadas, diariamente, com água corrente até capacidade de campo, por 36 dias quando as últimas plantas do experimento foram retiradas para os análises respectivos.

As avaliações do potencial hídrico folhar e coleta das amostras de folhas, caule e raiz para análise de NSC e polímeros de parede celular, foram realizadas aos 0, 7, 12 e 17 dias de suspensão de água (simulação de seca) e aos 12 e 36 dias após a reidratação (simulação de chuva), entre 8:00 e 10:00 horas da manhã. Folhas foram coletadas do 2º ou 3º nó completamente expandida e sadia. O caule e raiz foi coletado completamente, mas para as análises foi utilizado as partes centrais desses órgãos.

## **2.3 Potencial da água na folha ( $\Psi_{wp}$ )**

Mesmo procedimento do capitulo anterior item 2.3. O  $\Psi_{wp}$  foi determinado na antemanhã, entre 4:00 e 5:00 horas da manhã, utilizando uma bomba de pressão tipo Scholander (SCHOLANDER *et al.*, 1965) PMS Instrument, modelo 600, USA. O procedimento foi realizado na 2ª ou 3ª folha completamente expandida e sadia, a partir do ápice do eixo ortotrópico. Após a secção da folha, imediatamente o pecíolo foi inserido na câmara da bomba de pressão. A pressão foi aplicada até a exsudação da gotícula da seiva na superfície seccionada do pecíolo da folha, quando se registrou a leitura da pressão (TURNER, 1981). Após a medição, as amostras foram transportadas imediatamente em caixa térmica contendo gelo para o Laboratório de

Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, onde foram armazenadas em ultrafreezer - 80 °C. Finalmente, as amostras congeladas em ultrafreezer foram liofilizadas e pulverizadas em moinho de bola (Modelo TE-350, TECNAL, São Paulo, Brasil) e acondicionadas em tubos plásticos em temperatura ambiente para análises de NSC e polímeros de parede celular.

## **2.4 Carboidratos não estruturais**

### *2.4.1 Açúcares solúveis por HPAEC-PAD*

Para a determinação do teor dos açúcares solúveis seguiu o protocolo proposto por Pollock (1986). Foram utilizados 30 mg do pó liofilizado (Balança Analítica AB204-S/FACT Mettler Toledo, Leicester, Inglaterra) em microtubos de 2 mL e submetidos a quatro extrações subsequentes com 1,5 mL de etanol 80% em banho-maria a  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos, seguido de centrifugação em 10.000 x g por 5 minutos (Eppendorf Microcentrifuge 5417R, Hamburgo, Alemanha). Repetida esta etapa por mais três vezes, os sobrenadantes da última extração foram concentrados em liofilizador e utilizados para determinação dos açúcares solúveis.

Os extratos liofilizados foram ressuspensos em 1 mL de água ultrapura (18,2 M $\Omega$ ), submetidos ao banho de ultrassom durante 20 minutos. Em seguida foram centrifugados a 12.850 x g durante 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  e aplicados em cromatógrafo de íons modelo ICS 5000 (Dionex) equipado com coluna CarboPac PA100 (4 x 250 mm). A eluição foi isocrática (1 mL.min<sup>-1</sup>) com hidróxido de sódio 100 mM com alto grau de pureza preparado em água ultrapura e filtrado em membrana de nitrato de celulose 0.45  $\mu\text{m}$ . A detecção foi feita por pulso amperométrico, utilizando as recomendações para carboidratos do fabricante.

Para a determinação dos açúcares, o tempo de retenção foi comparado ao de padrões autênticos eluídos nas mesmas condições analíticas e, quando necessário por co-cromatografia. A quantificação de açúcares foi realizada no software Chromeleon (v.6.8) pela curva de calibração feita pelo método do padrão externo utilizando padrões autênticos (Sigma). As leguminosas possuem diferentes tipos de ciclitóis, entretanto esses açúcares não são facilmente ionizáveis no meio alcalino do eluente. Foi detectado um pico que co-cromatografou com o padrão de myo-inositol,

então a quantificação foi considerada em equivalentes de myo-inositol. Os açúcares solúveis totais (AS) foram quantificados, sendo a soma de todos os açúcares solúveis identificados.

#### 2.4.2 Amido

A determinação do teor de amido seguiu o protocolo de Amaral et al. (2007). Foram pesadas 10 mg de material liofilizado de folha, caule e raiz. A remoção dos açúcares solúveis seguiu protocolo de Pollock (1986) e descrito no item 2.1.1 (preparação do extrato). Após a remoção dos açúcares solúveis, foi adicionado ao precipitado 0,5 mL ( $120 \text{ U mL}^{-1}$ ) de  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) termoestável de *Bacillus licheniformis* (cód. E-ANAAM, MEGAZYME, Irlanda), diluída em tampão MOPS 10 mM em pH 6,5. As amostras foram incubadas em  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos, repetindo este procedimento por mais de uma vez. As amostras foram resfriadas até  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e adicionado 0,5 mL de uma solução contendo  $30 \text{ U mL}^{-1}$  de amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME, Irlanda) em tampão acetato de sódio 100 mM em pH 4,5. As amostras foram incubadas em  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior dosagem do amido.

A dosagem do amido foi realizada pela quantificação de glicose liberada no processo de hidrólise do amido. Para tanto, foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  do extrato com 250  $\mu\text{L}$  do reagente Glicose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil), contendo as enzimas glicose-oxidase ( $\sim 11.000 \text{ U mL}^{-1}$ ) e peroxidase ( $\sim 700 \text{ U mL}^{-1}$ ),  $290 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. Nessa etapa, a glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio formado na reação reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina rosa cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose na amostra. Após incubação por 15 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , o teor de glicose foi determinado em espectrofotômetro acoplado a leitor de ELISA (Thermo Scientific Express Multiskan FC Microplate Photometer, Massachusetts, EUA) em comprimento de onda de 490 nm. Para a elaboração da curva padrão foi utilizada solução de glicose (SIGMA), nas concentrações de 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 mg/mL.

## **2.5 Polímeros de parede celular**

### **2.5.1 Celulose**

A determinação de celulose foi realizada de acordo com Brendel et al. (2000). Foram pesadas em tubos de vidro com tampa rosqueada, 100 mg de amostras pulverizadas. Adicionou-se 2 mL de ácido acético 80 % e 200 µL de ácido nítrico 69 % concentrado. Os tubos foram fechados e as amostras homogenizadas com cuidado, e levados ao banho-maria a 100 °C por 1 hora. Após resfriamento, as amostras foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL, previamente pesados. Em seguida foi adicionado 2,5 mL de etanol 99 %.

As amostras foram homogeneizadas em agitador, Vórtex, e centrifugadas a 2.500 x g por 5 minutos  $25 \pm 2$  °C e o sobrenadante descartado cuidadosamente. Em seguida, as amostras foram lavadas sequencialmente da seguinte forma: (1) 5 mL de etanol 99 % para remover os produtos degradados na extração; (2) 5 mL de água deionizada para remover os vestígios do ácido nítrico; (3) 5 mL de NaOH 17 %, permanecendo em repouso a  $25 \pm 2$  °C por 10 minutos; (4) 5 mL de água deionizada; (5) 2,2 mL de água deionizada e 600 µL de ácido acético. Foi, ainda, adicionado 2,2 mL de água deionizada para eliminação de material não celulósico ainda persistente e (6) 5 mL de água deionizada. Entre cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 2.500 x g por 5 minutos em  $25 \pm 2$  °C e os sobrenadantes descartados. As amostras foram secas em estufa a 50 °C por 48 horas e pesadas. Os resultados da concentração de celulose foram expressos em miligrama de celulose por grama de massa seca ( $\text{mg celulose g}^{-1}$  MS).

### **2.5.2 Hemicelulose**

A extração das hemiceluloses seguiu o protocolo de Shädel *et al.* (2010), com modificações. Foram pesadas 50 mg de amostra em microtubo eppendorf e adicionado 1,5 mL de etanol 80 %, para extração dos açúcares solúveis. Os tubos, foram acondicionados em banho maria 80 °C por 20 min. As amostras foram centrifugadas em 12.000 x g (mod. Z 326K, Hermle labortechnik) por 7 min a 10 °C e o sobrenadante descartado. Esta operação foi realizada quatro vezes para retirada total dos resíduos de açúcares solúveis presentes nas amostras. O precipitado foi seco em estufa a 50 °C durante 36 h.

Ao precipitado seco foram adicionados 1,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 90 % para extração do amido presente nas amostras e, mantido sob agitação em placa agitadora por 24 h em  $25 \pm 2$  °C. A agitação foi realizada com a adição de uma barra magnética (3x5mm) em cada tubo erpendoff. Após esse período, as amostras foram centrifugadas em 12.000 x g por 7 min a 5 °C e o sobrenadante descartado. Em seguida, o precipitado foi lavado com 1,5 mL de água deionizada por três vezes, centrifugado e descartado o sobrenadante para retirada total do DMSO. O precipitado foi transferido para estufa a 50 °C por 36 h.

Acrescentou-se ao precipitado seco 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 deionizada) para extração de resíduos solúveis em água e pectinas, e adicionou-se 25 µL de solução de sulfito de sódio (10 mg/10 mL) para extração de proteínas. As amostras foram submetidas ao banho-maria a 100 °C por 60 min sob agitação constante. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O precipitado desta etapa (celulose, hemicelulose e lignina) foi lavado, sequencialmente: duas vezes com 1,5 mL de água deionizada; uma vez com 1,5 mL de acetona 100 % e uma vez com 1,5 mL de água deionizada. O precipitado contendo a “fração total de parede celular” foi então transferido para estufa 50 °C durante 36 h e pesado.

Após secagem, foi adicionado ao precipitado 1,5 mL do detergente ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N e brometo de hexadeciltrimetilamônio ácido deoxicólico sal sódico 55 mmol) e homogeneizado. As misturas foram submetidas, novamente, ao banho-maria a 100 °C com agitação constante por 60 min, centrifugadas e o sobrenadante contendo hemicelulose foi descartado. O precipitado foi lavado em 1,5 mL de água deionizada por cinco vezes, centrifugado a 12.000 x g a 10 °C e descartado o sobrenadante cuidadosamente, para retirada total do detergente ácido. O precipitado contendo apenas a “fração de celulose e lignina” foi seco em estufa 50 °C durante 36 h seguido de pesagem. O cálculo para a determinação da concentração das hemiceluloses foi realizado pela diferença gravimétrica entre a “fração total da parede celular” e a “fração de celulose e lignina”. As concentrações de hemiceluloses foram calculadas em mg de hemicelulose por grama de massa seca ( $\text{mg g}^{-1}$  MS).

### 2.5.3 Lignina

A determinação de lignina foi realizada segundo Dos Santos et al. (2008). Foram pesados 150 mg de amostras pulverizadas em tubos falcon de 15 mL, foi homogeneizado e agitado em 10 mL de tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM em pH 7. O material foi centrifugado por 5 minutos a 3.500 x g e o sobrenadante descartado. A partir dessa etapa o precipitado passou por 12 lavagens com diferentes soluções (Tabela 1), seguindo sempre o mesmo procedimento: a solução foi adicionada, o material foi agitado em vórtex por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Tabela 2: Lista de soluções utilizadas na sequência de lavagens para extração de lignina. Número de lavagens, volume (mL) e soluções.

<b>Número de lavagens</b>	<b>Volumes (ml)</b>	<b>Soluções</b>
3	7	Tampão Fosfato 50 mM – pH 7,0
3	7	Triton® x – 100 (v/v) 1% - pH 7,0 (SIGMA)
2	7	Tampão NaCl – pH 7,0
2	7	Água destilada
2	7	Acetona 100%

Após a 12<sup>a</sup> lavagem, o precipitado foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas.

Esse material resultante é o que compreende a fração de parede celular livre de proteínas. Do precipitado seco, pesou-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 horas. Após esse tempo elas foram centrifugadas a 2.500 x g por 15 minutos e lavadas três vezes com água destilada. Adicionou-se 7 mL de NaOH 0,5 M e foram incubadas a 30 °C por 18 horas 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. O sobrenadante resultante foi unido ao anterior, acidificado com 1,8 mL de HCl e deixado a 4 °C por 12 horas sem agitar para precipitação. Após esse período, as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada, centrifugadas novamente em 2.500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e descartado o

sobrenadante. O precipitado obtido foi seco a 60 °C por 24 horas e ressuspenso em 15 mL NaOH 0,5 M.

As amostras que ultrapassaram o valor acima de 1,0 na leitura espectrofotométrica foram diluídas, nesse caso foi retirado 250 µL das amostras que ultrapassaram o valor acima citado e misturou-se com 2,5 mL de NaOH 0,5 M (proporção de 1:10). Como o precipitado foi inicialmente ressuspenso em 1,5 mL de NaOH, a diluição foi de cinco vezes. A determinação do conteúdo de lignina foi realizada através da leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. Foi utilizada a solução de lignina (SIGMA) para construção da curva padrão, nas concentrações de 0; 10; 20; 30; 40; 50; 100; 200 µg/µL.

## **2.6 Análise estatística**

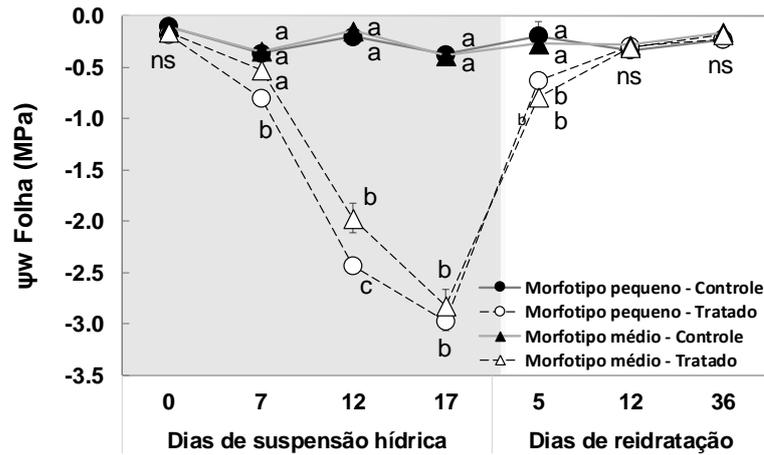
O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro combinações de tratamentos: morfotipo pequeno controle, morfotipo médio controle, morfotipo pequeno tratado e morfotipo médio tratado, com cinco repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância, ANOVA (com procedimento de medidas repetidas no tempo) respeitando os supostos de normalidade e homocedasticidade. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao um nível de 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ). Os procedimentos estatísticos foram realizados em softwares *R* estatístico v. 3.6.1 e o *InfoStat* (Versão 2018, Grupo InfoStat, FCA, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina). Para o ANOVA utilizou-se o pacote do R “agricolae” (Statistical Procedures for Agricultural Research), versão 1.3-3. Adicionalmente foi aplicada estatística multivariada mediante a Análise de Componentes Principais (PCA) e correlações de pearson analisando todas as variáveis nos três órgãos avaliados, com o pacote do R “ggplot2”.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Potencial hídrico**

As plantas controles dos dois morfotipos apresentaram valores similares de  $\Psi_{wp}$  próximo a - 0,25 MPa mantendo-se assim durante todo o experimento. Aos 7 dias de seca, o  $\Psi_{wp}$  do morfotipo pequeno declinou diferenciando-se do morfotipo médio e do controle. O  $\Psi_{wp}$  dos dois morfotipos declinaram acentuadamente no 12º dia, sendo

que morfotipo pequeno apresentou valores mais negativos (Fig. 1). No 17º dia, o  $\Psi_{wp}$  dos dois morfotipos se igualaram alcançando o valor mais baixo de - 3,0 Mpa (Fig. 1). Após 5 dias de reidratação, os valores do  $\Psi_{wp}$  dos dois morfotipos aumentaram rapidamente, mas ficando abaixo do controle e sem diferenças entre os dois morfotipos. Aos 12 dias de reidratação, os valores do  $\Psi_{wp}$  dos dois morfotipos se igualaram ao do controle e assim permaneceram até o 36º dia (Fig. 1).

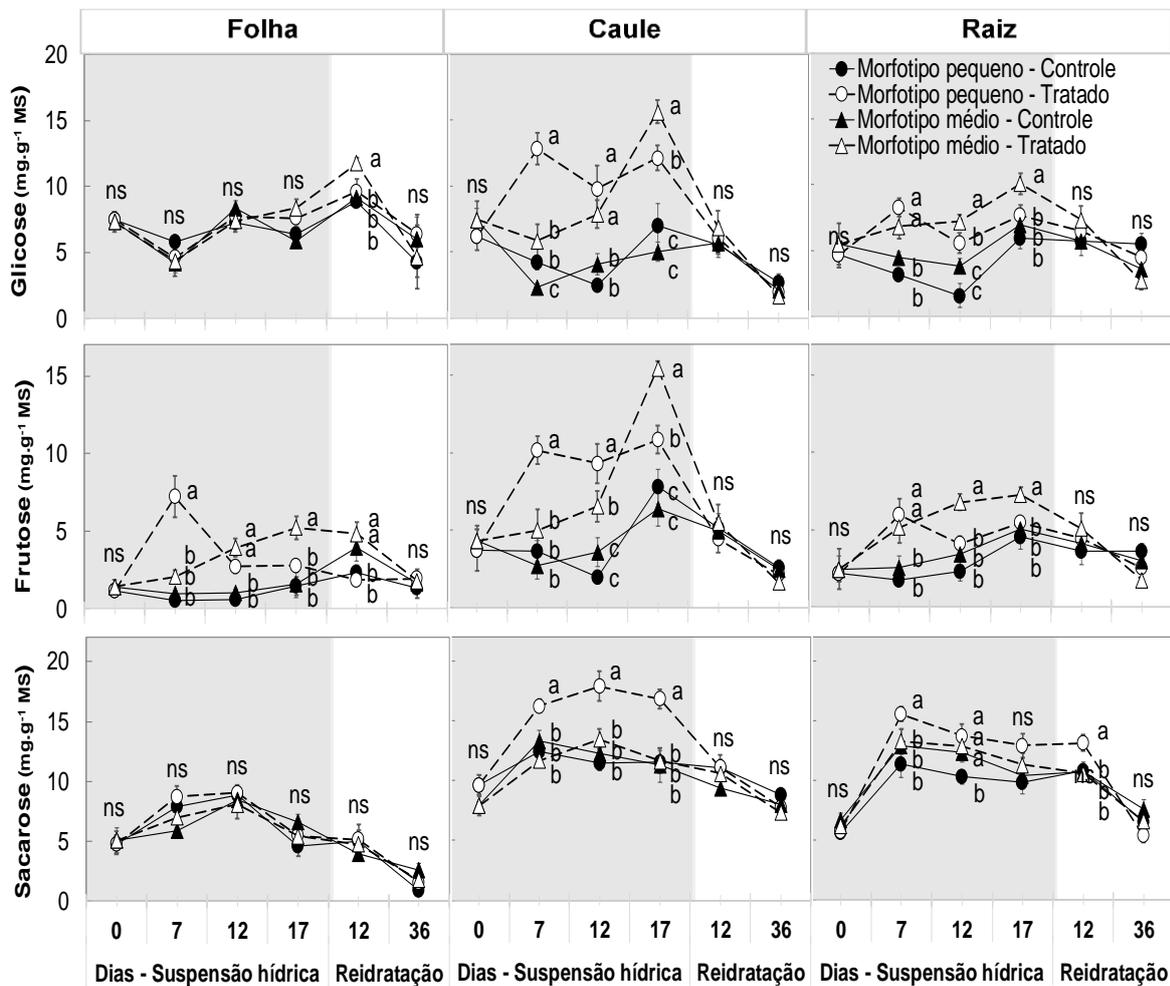


**Figura 9:** Potencial hídrico da antemanhã ( $\Psi_{wp}$ ) de folhas das plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* no controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey (P<0.5%).

### 3.2 Carboidratos não estruturais

O déficit hídrico afetou as concentrações dos carboidratos não estruturais de várias maneiras, evidenciando diferenças relevantes entre os morfotipos pequeno e médio. As respostas de glicose, frutose e sacarose apresentaram variações entre os morfotipos e entre os órgãos vegetativos. A glicose e sacarose em folha não apresentaram diferenças entre o tratamento e controle em todo o tempo amostral e nos dois morfotipos (Fig. 2). Folhas do morfotipo pequeno apresentaram aumento na concentração de frutose no 7º dia de seca e declínio a partir do 12º dia igualando-se ao controle. Já o morfotipo médio apresentou um incremento gradual de frutose foliar, ultrapassando os valores do morfotipo pequeno, alcançando valores máximos no 17º dia de seca (Fig. 2). De forma geral, na reidratação os teores dos carboidratos não estruturais (açúcares solúveis e amido) dos dois morfotipos se igualaram aos seus controles.

Caule e raiz dos dois morfotipos apresentaram maior responsividade à seca, elevando os teores de glicose e frutose. Esses órgãos do morfotipo pequeno acumularam mais glicose e frutose do que o morfotipo médio no 7º dia de seca. Porém, o morfotipo médio exibiu aumento gradativo das concentrações de glicose e frutose alcançando maiores valores no 17º dia de seca, e superior ao morfotipo pequeno. A sacarose de caule e raiz aumentou somente no morfotipo pequeno. No morfotipo médio os teores desse dissacarídeo não diferenciaram de seu controle (Fig. 2).

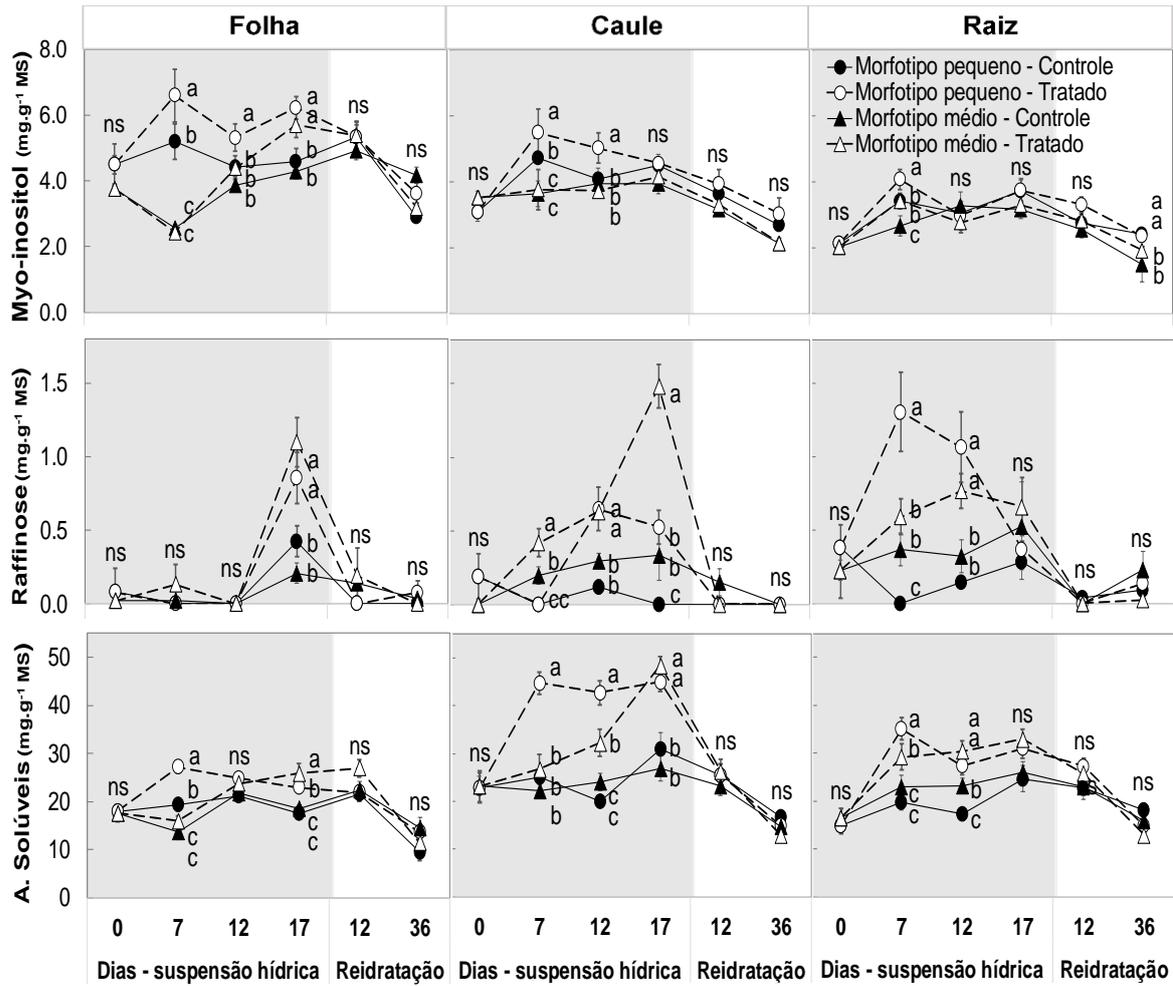


**Figura 10:** Teores de glicose, frutose e sacarose de folha, caule e raiz de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* do controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0.5\%$ ).

Concentrações de ciclitóis (em equivalentes de myo-inositol) e rafinose foram detectadas nos dois morfotipos sob simulação de seca (Fig. 3). O myo-inositol foliar apresentou maiores variações que do caule e raiz, nos dois morfotipos. No 7º dia, o myo-inositol aumentou em folha, caule e raiz do morfotipo pequeno, alcançando valores superiores ao do morfotipo médio com o avanço da seca. Já as concentrações de myo-inositol em caule e raiz do morfotipo pequeno decresceram a partir do 12º dia de seca igualando-se ao seu controle. O myo-inositol do morfotipo médio mostrou comportamento diferente. Em folhas, o teor desse açúcar aumentou no dia 17º enquanto em raiz esse resultado aparece precocemente no 7º dia de seca. Em caule do morfotipo médio as concentrações de myo-inositol não apresentaram variações em relação ao seu controle (Fig. 3).

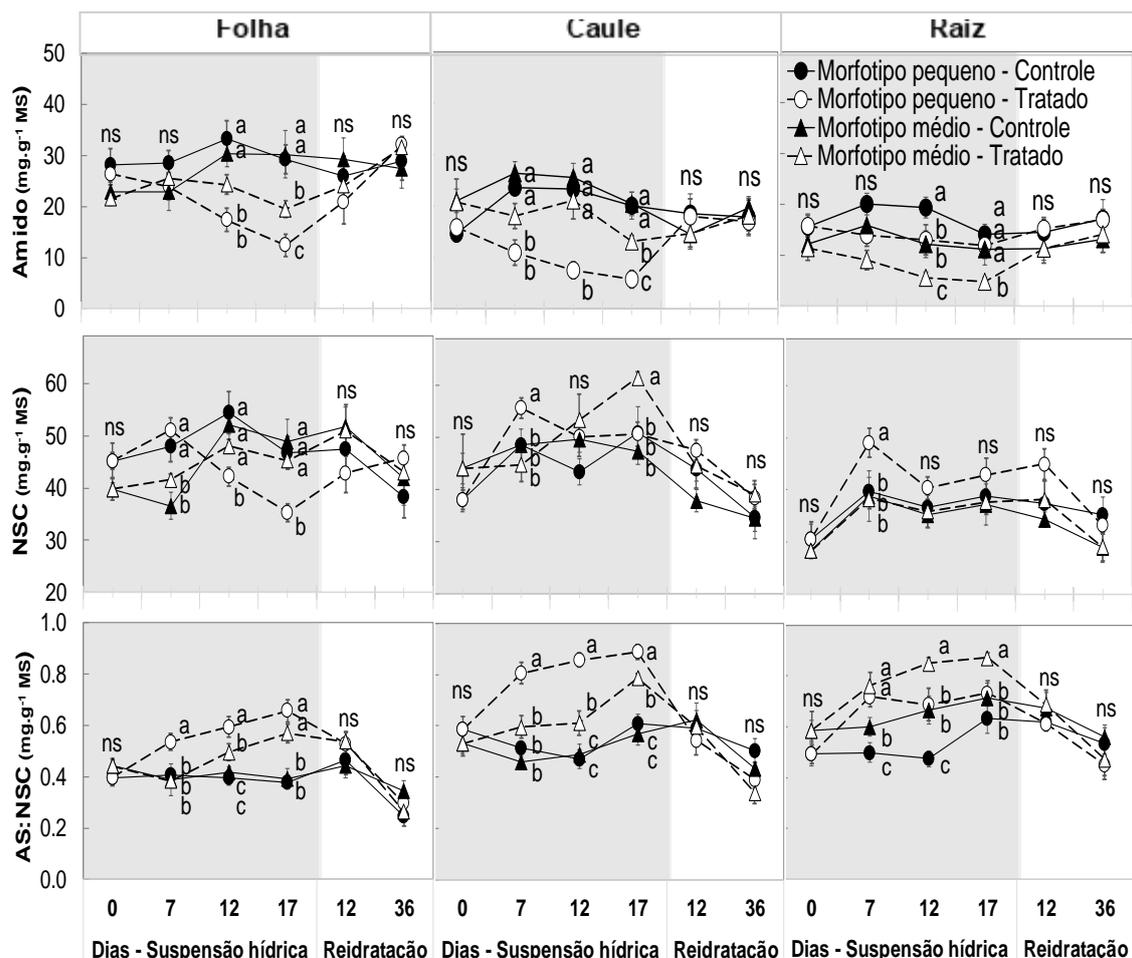
As concentrações de rafinose foliar aumentaram no dia máximo de seca (17º) nos dois morfotipos. Em caule e raiz, as concentrações de rafinose também aumentaram nos dois morfotipos sob seca. Porém, com valores mais expressivos no 17º dia de seca do morfotipo médio. Já em raiz ocorreu o contrário. O morfotipo pequeno apresentou concentrações de rafinose superiores e mais expressivas no 7º dia de seca e do morfotipo médio no 17º dia. Na fase de reidratação, as concentrações desse açúcar declinam nas plantas dos dois morfotipos sob seca igualando-se aos seus controles (Fig. 3).

Em geral, as concentrações dos açúcares solúveis totais (AS) dos dois morfotipos sob seca refletem os resultados dos mono-, di- trissacarídeos com maiores variações ocorrendo no caule, seguido de raiz e folhas. Nas folhas, o morfotipo pequeno apresentou aumento de AS 7º dia de seca seguido de decréscimo com o avanço da seca. Já o morfotipo médio apresentou aumento gradativo dos AS foliar alcançado valores máximos no 17º dia de seca e superior ao morfotipo pequeno (Fig. 3). Em caule, as concentrações dos AS no morfotipo pequeno aumentaram rapidamente no 7º dia de seca mantendo-se assim até o 17º dia. O morfotipo médio apresentou aumento gradual dos AS no caule, com valores máximos no dia 17º dia de seca. Em raiz as concentrações de AS dos dois morfotipos aumentaram no 7º e 12º dia de seca, seguido de declínio com o avanço da seca no 17º dia e sem diferença do controle, e assim permanecendo durante o período de reidratação (Fig. 3).



**Figura 11:** Teores de myo-inositol, rafinose e açúcares solúveis de folha, caule e raiz de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estadística entre os tratamentos e controle pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0.5\%$ ).

Em relação ao amido, o déficit hídrico causou decréscimos nas suas concentrações nos dois morfotipos, e de forma mais acentuada em folha e caule do morfotipo pequeno e em raiz do morfotipo médio (Fig. 4). Na folha, o decréscimo foi mais acentuado no 12º e 17º dia de seca e nos dois morfotipos. Folhas e caules do morfotipo pequeno apresentaram menores concentrações de amido no dia máximo de estresse hídrico (17º) em relação ao morfotipo médio (Fig. 4). Na raiz, os dois morfotipos também apresentaram decréscimos de amido aos 12º e 17ª dias de seca, sendo que o morfotipo médio apresentou os valores mais baixos (Fig. 4).



**Figura 12:** Teores de amido, carboidratos não estruturais totais (*siglas em inglês* NCS<sub>T</sub>) e razão açúcares solúveis-NCS<sub>T</sub> (AS:NCS<sub>T</sub>) de folha, caule e raiz de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=5). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Scott-Knott (P<0.5%).

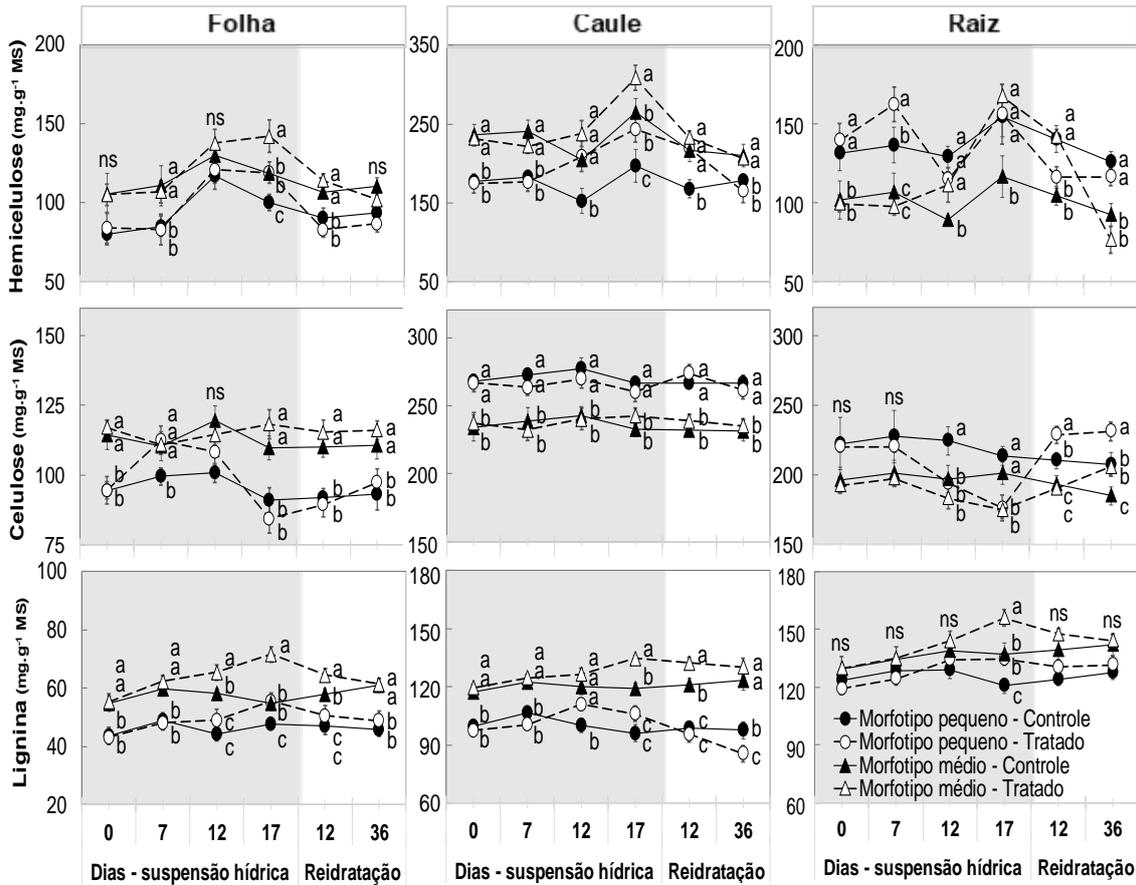
Os carboidratos não estruturais totais (NCS<sub>T</sub>) apresentaram maiores alterações em folha e caule. Em folhas do morfotipo pequeno, os NCS<sub>T</sub> apresentaram decréscimos acentuados no 12<sup>o</sup> dia de seca, exibindo concentrações mais baixas no 17<sup>o</sup> dia. O morfotipo médio não apresentou diferenças de NCS<sub>T</sub> em relação ao seu controle durante todo o tempo amostral. Em caule e raiz, o NCS<sub>T</sub> do morfotipo pequeno aumentou no 7<sup>o</sup> dia de seca alcançando valores superiores ao morfotipo médio tratado. Porém, com decréscimos gradativos nos dias seguintes e sem diferença de seu controle. A concentração do NCS<sub>T</sub> do caule do morfotipo médio apresentou incremento gradativo no 17<sup>o</sup> dia de seca. Em raiz as concentrações de NCS<sub>T</sub> do morfotipo médio não apresentaram diferenças de seu controle (Fig. 4).

O déficit hídrico causou aumento gradativo da razão de açúcares solúveis - NSC<sub>T</sub> (AS:NSC<sub>T</sub>) nas plantas tratadas do dois morfotipos. No morfotipo pequeno maiores razões foram observadas nos órgãos aéreos (folha e caule) sob simulação da seca. Em raiz, no 12º e 17º dia, o morfotipo médio apresentou as maiores razões AS:NSC<sub>T</sub>, e superior ao morfotipo pequeno e seu controle. De forma geral, na reidratação não se observou diferenças de AS:NSC<sub>T</sub> nos órgãos vegetativos dos dois morfotipos. (Fig. 4).

### ***3.3 Polímeros de parede celular***

Em relação aos polímeros de parede celular, a hemicelulose e lignina de folha, caule e raiz nos dois morfotipos foram incrementadas pelo déficit hídrico em relação a seus controles (Fig. 5). A hemicelulose e lignina foliar aumentou no dia máximo de estresse hídrico (17º seca) nos dois morfotipos. A seca estimulou o aumento das hemiceluloses e lignina caulinar do morfotipo pequeno no 12º dia. Ao 17º dia de seca, os dois morfotipos exibiram aumento de hemicelulose caulinar com o morfotipo médio apresentando valores superiores ao morfotipo pequeno.

Quanto a lignina, o caule do morfotipo médio mostrou aumento de sua concentração no 17º dia de seca enquanto o morfotipo pequeno apresentou diminuição desse composto. Na raiz, as hemiceluloses e ligninas no morfotipo médio apresentaram aumento gradual e superior ao seu controle no estresse hídrico mais intensificado (12º e 17 dia de seca). As hemiceluloses da raiz no morfotipo pequeno aumentaram somente ao início da seca (7º dia seca). O aumento da lignina desse órgão foi tardio (17º dia de seca). Na reidratação não se observou diferenças de hemicelulose e lignina entre os tratamentos (Fig. 5).



**Figura 13:** Teores de hemicelulose, celulose e lignina de folha, caule e raiz de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* controle e tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva). As barras verticais indicam o erro padrão da média ( $n=5$ ). Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos e controle pelo teste de Scott-Knott ( $P<0.5\%$ ).

Em relação à celulose, em folha diferenças foram observadas no 7º dia de seca no morfotipo pequeno. No avanço da seca, as concentrações da celulose do morfotipo pequeno em folha diminuíram igualando-se ao seu controle. O morfotipo médio não apresentou diferenças nos teores de celulose foliar em todos os tempos amostrais. Na reidratação, se observou diferenças nos teores de celulose foliar entre os morfotipos, mas não entre plantas tratadas e controles (Fig. 5). No caule, a seca não influenciou nas concentrações de celulose (Fig. 5).

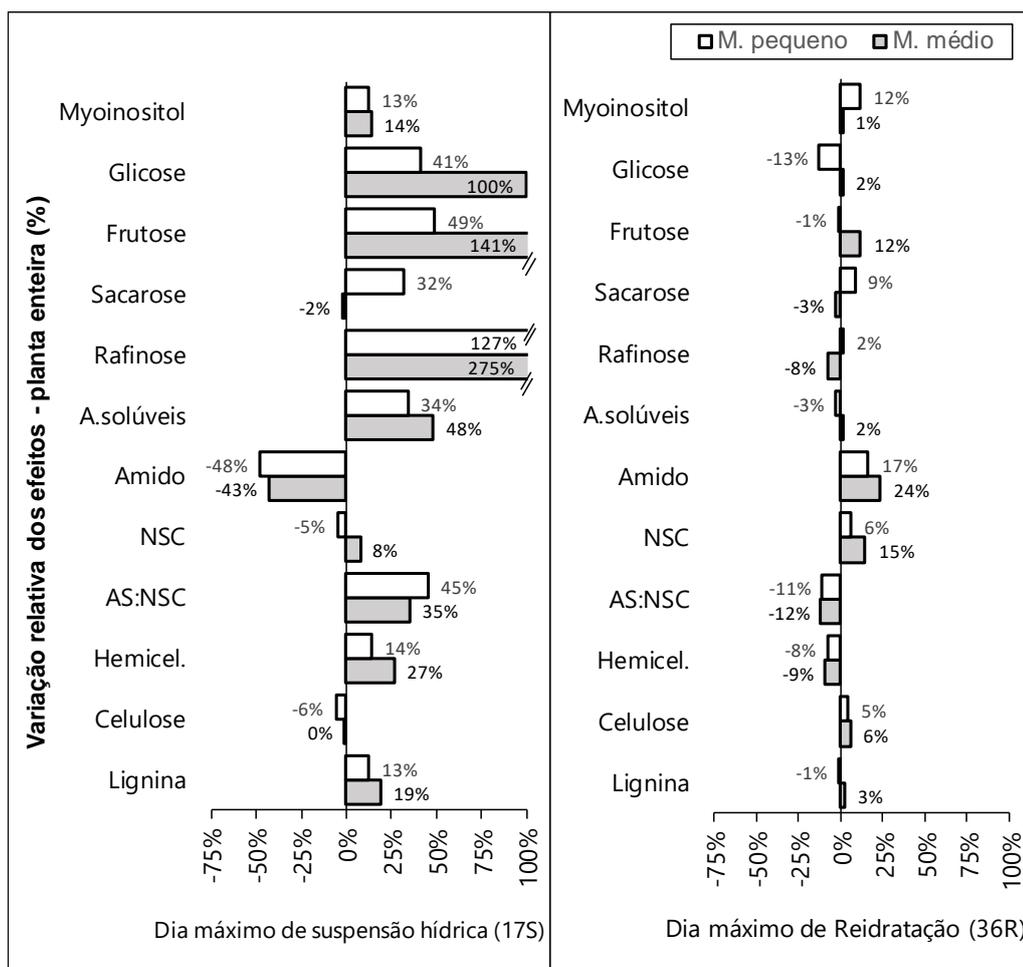
Na raiz, um decréscimo gradativo de celulose foi observado nos dois morfotipos, e de forma mais acentuada no morfotipo pequeno. O morfotipo pequeno apresentou declínio desse polímero no 12º e 17º dia de seca (Fig. 5). Na reidratação, ocorreu aumento rápido nas concentrações de celulose de raiz das plantas tratadas

do morfotipo pequeno, mantendo valores superiores ao seu controle. O morfotipo médio apresentou aumento gradativo da celulose na raiz alcançando valores superiores ao seu controle no 36º dia de reidratação (Fig. 5).

### ***3.4 Variações relativa dos efeitos, análises de PCA e correlações***

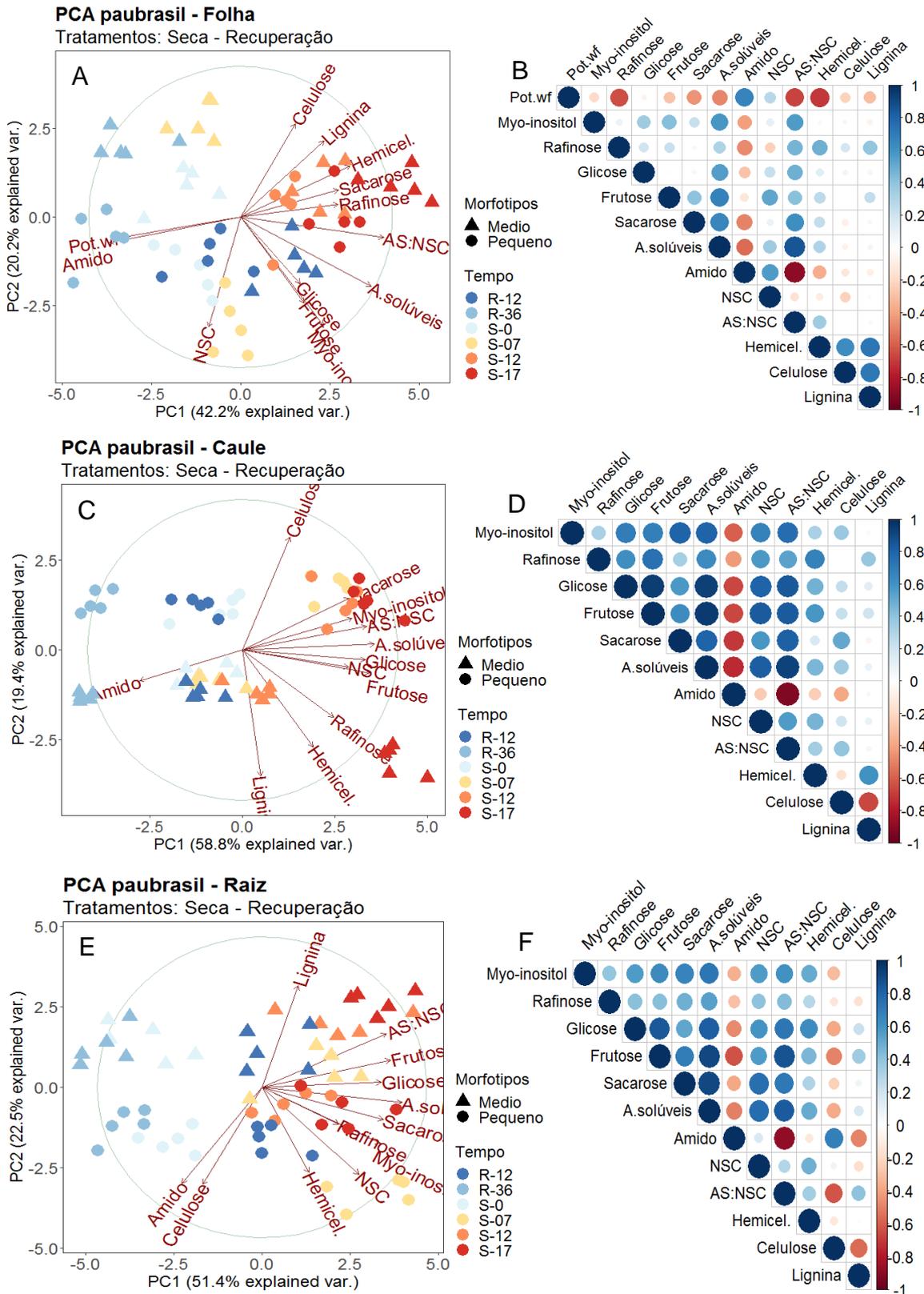
Para identificar o acúmulo ou decréscimos dos carboidratos não estruturais e polímeros estruturais na planta inteira com um todo, foram calculadas as variações relativas dos efeitos da seca e reidratação, considerando como base os controles de cada morfotipo (Fig. 6). Se evidenciou uma alta variação dos carboidratos dos dois morfotipos quando submetidos a seca severa. O morfotipo médio apresentou maiores incrementos duplicando as concentrações dos açúcares solúveis, principalmente de glicose, frutose e rafinose, acompanhado de menores decréscimo de amido em comparação do morfotipo pequeno. Contudo, o morfotipo pequeno apresentou razão AS:NSC 5% maior que o morfotipo médio (Fig. 6).

Em relação aos polímeros estruturais, o morfotipo médio apresentou maiores concentrações de hemicelulose e lignina na seca, sendo, respectivamente, 13% e 6% maiores que o morfotipo pequeno. Na reidratação se observou menores taxas de variação dos açúcares solúveis dos dois morfotipos. Porém, o morfotipo médio na reidratação apresentou acúmulo de carboidratos não estruturais totais (NSC<sub>T</sub>) e de amido, com 9% e 7% respectivamente superior que as concentrações do morfotipo pequeno. Os polímeros de parede celular apresentaram variações mínimas na fase de reidratação nos dois morfotipos (Fig. 6).



**Figura 14:** Variação relativa dos efeitos da seca e reidratação em relação aos controles na planta inteira dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata*.

Para definir quais variáveis dos carboidratos não estruturais e polímeros da parede celular explicam melhor as diferenças e semelhanças em cada órgão, os dados foram submetidos à análise de componente principal (PCA). Esse tipo de estatística multivariada junto com a correlação de Pearson permitiu distinguir correlações nos pontos avaliados de seca e reidratação entre as variáveis analisadas. Quanto mais próximos os pontos de cada morfotipo e mais próximos os pontos de cada variável, maiores as semelhanças entre eles, e quanto mais distantes, maiores as diferenças (Fig. 7).



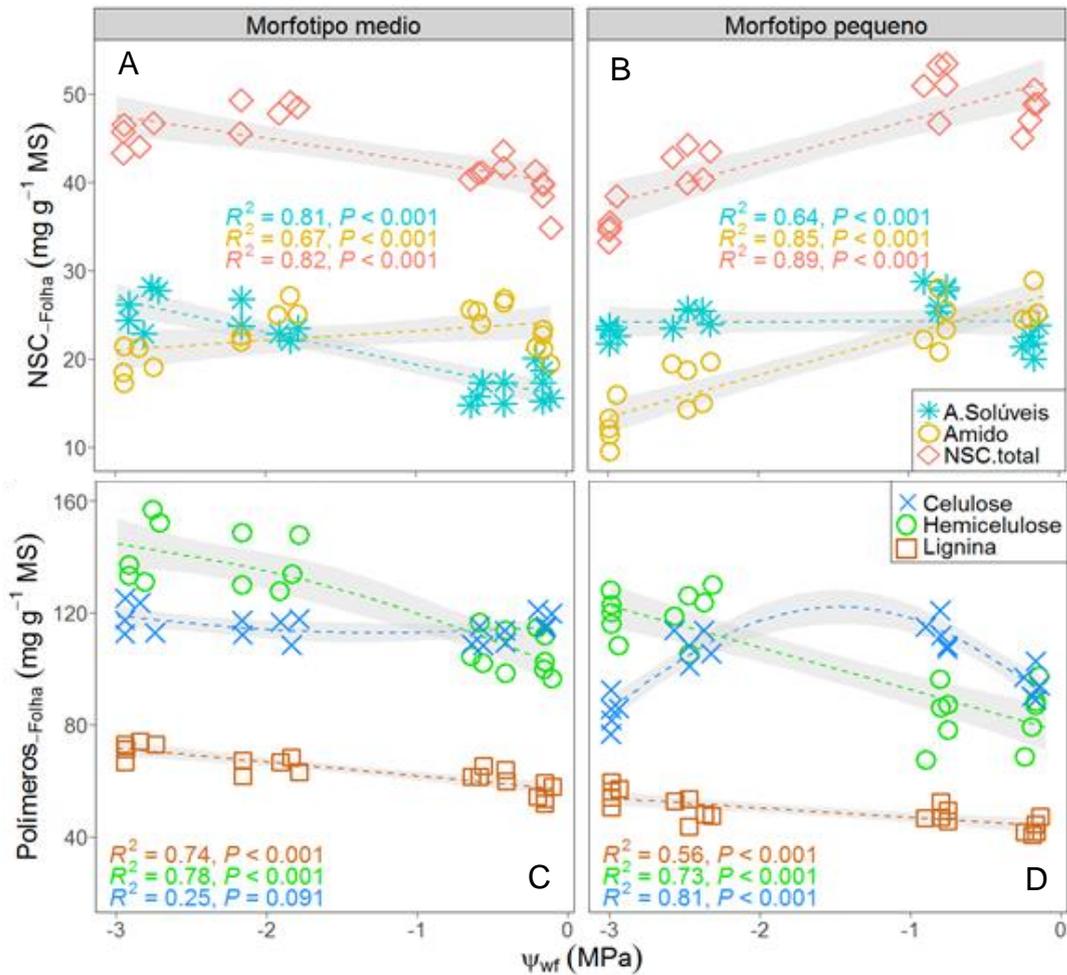
**Figura 15:** Análise multivariada de componente principal-PCA (A,C,E) e correlação de Pearson (B,D,F) das variáveis relativas aos carboidratos não estruturais e polímeros da parede celular em folhas, caule e raízes de plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* tratadas com suspensão hídrica (seca) seguida de reidratação (chuva).

Observou-se que a variância dos componentes (PC1 e PC2) apresentam uma proporção acumulativa entre as duas componentes de 62.4%, 78.2% e 73.9% em folha, caule e raiz, respectivamente, demonstrando representatividade na correlação das variáveis e no agrupamento dos tempos avaliados de seca e reidratação (Fig. 7). Em folhas, os dois morfotipos apresentaram agrupamentos correlacionados com os carboidratos e a lignina na fase de suspensão hídrica. No 7º dia de suspensão hídrica o morfotipo pequeno apresentou maior contribuição com os NSC<sub>T</sub>. Nos 12º e 17º dias de seca, os dois morfotipos no diferiram entre si no seu agrupamento, sendo explicado por os açúcares solúveis, AS:NSC, rafinose, hemicelulose e lignina. Essas variáveis em menção se correlacionam negativamente com o  $\Psi_{wp}$  foliar. Porém o  $\Psi_{wp}$  da folha se correlaciona positivamente com o amido. Na reidratação, o agrupamento dos dois morfotipos exibe pouca explicação das variáveis analisadas (Fig. 7A e 7B).

Em caule, os dois morfotipos apresentam agrupamentos diferenciados. O morfotipo pequeno em suspensão hídrica se correlaciona com a sacarose, myo-inositol e AS:NSC. Já o morfotipo médio correlaciona-se com rafinose, hemicelulose e lignina (Fig. 7C). Na raiz, o morfotipo médio sob seca apresentou agrupamento com os açúcares redutores (glicose e frutose), enquanto o morfotipo pequeno sob seca agrupou-se com rafinose e sacarose (Fig. 7E). Na reidratação, o agrupamento dos dois morfotipos exibe pouca explicação e ralação com as variáveis analisadas (Fig. 7A, 7C, 7E). Sob seca observou-se que o amido é correlacionado negativamente com os AS em caule e raiz. A lignina apresenta uma correlação positiva com a hemicelulose em caule e negativa com celulose em raiz dos dois morfotipos (Fig. 7D, 7F).

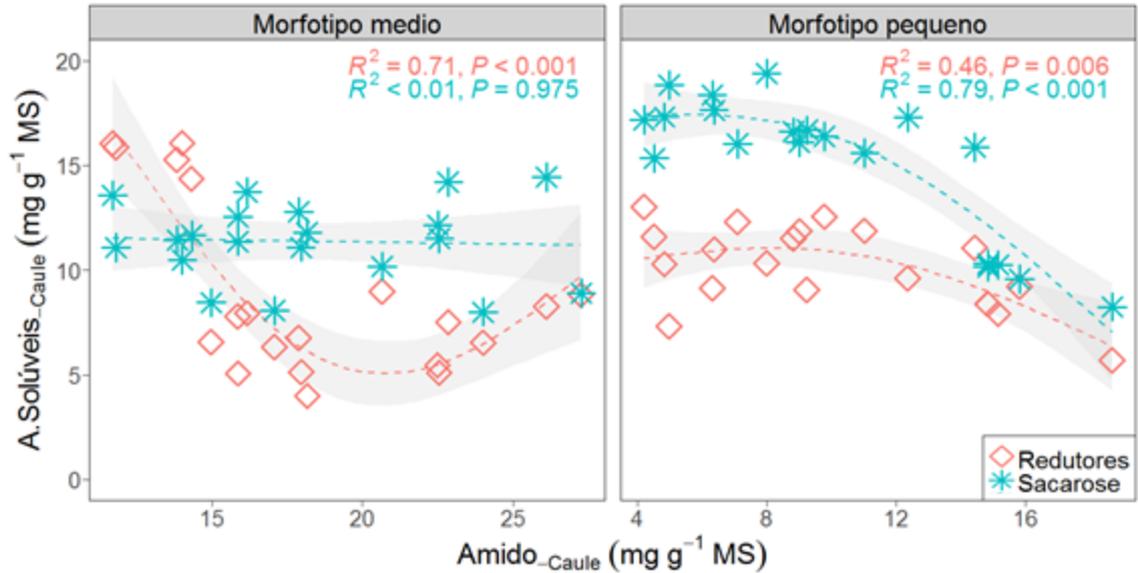
Uma vez identificados os agrupamentos dos morfotipos com as variáveis dos carboidratos e o polímero lignina, observou-se que os agrupamentos e correlações em geral são explicados na fase de seca nos dois morfotipos. No morfotipo médio sob seca observou-se correlações negativas fortes entre a diminuição do  $\Psi_{wp}$  foliar com os AS ( $r^2=0.81$ ) e NSC<sub>T</sub> ( $r^2=0.82$ ). Porém, a redução do  $\Psi_{wp}$  foliar com o amido apresentou uma correlação positiva fraca de  $r^2=0.67$  (Fig. 8A). Em contraste o morfotipo pequeno sob seca apresentou uma correlação positiva alta entre a diminuição do  $\Psi_{wp}$  foliar com o amido ( $r^2=0.85$ ) e NSC<sub>T</sub> ( $r^2=0.89$ ). E uma fraca correlação ( $r^2=0.64$ ) com os AS (Fig. 8B).

Em relação aos polímeros de parede celular, o morfotipo médio sob seca apresentou uma correlação negativa alta entre a diminuição do  $\Psi_{wp}$  foliar com a lignina ( $r^2=0.74$ ) e as hemiceluloses ( $r^2=0.78$ ) (Fig. 8C). O morfotipo pequeno mostrou correlação forte entre a diminuição do  $\Psi_{wp}$  foliar com as hemiceluloses ( $r^2=0.73$ ) e com a celulose ( $r^2=0.81$ ) (Fig. 8D).



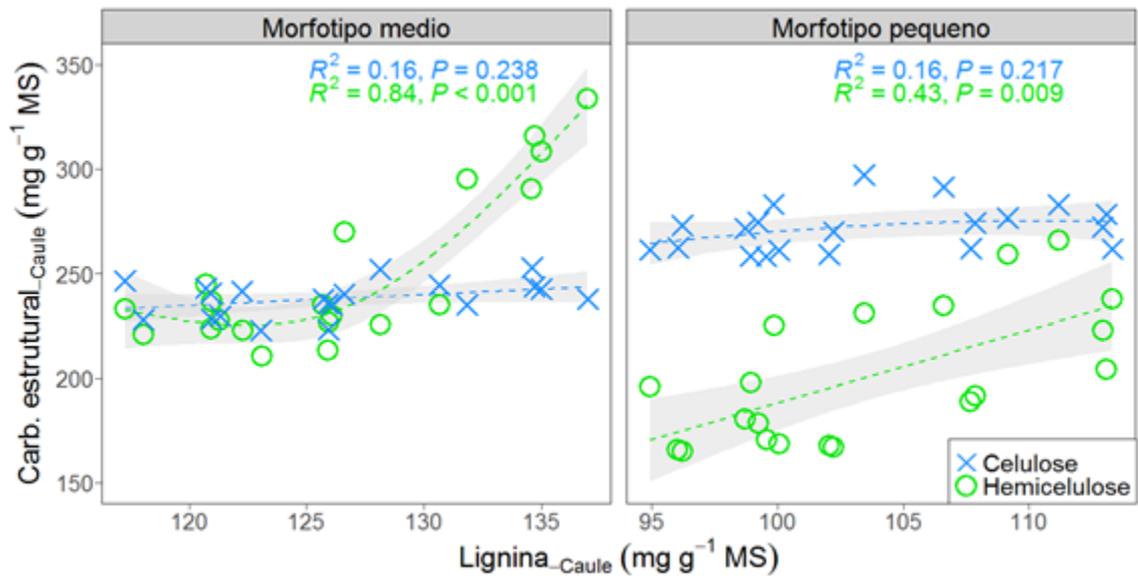
**Figura 16:** Efeito da seca no decréscimo do  $\Psi_{wp}$  foliar e sua correlação com as concentrações dos carboidratos não estruturais e polímeros de parede celular de folhas em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* tratadas com suspensão hídrica (seca).

Em caule, o morfotipo médio apresentou alta correlação negativa ( $r^2=0.71$ ) entre o amido e os açúcares redutores (glicose e frutose). Não houve correlação entre amido e sacarose no caule do morfotipo médio. O morfotipo pequeno apresentou alta correlação negativa ( $r^2=0.79$ ) entre o amido e a sacarose, e uma fraca correlação ( $r^2=0.46$ ) entre amido com os açúcares redutores (Fig. 9).



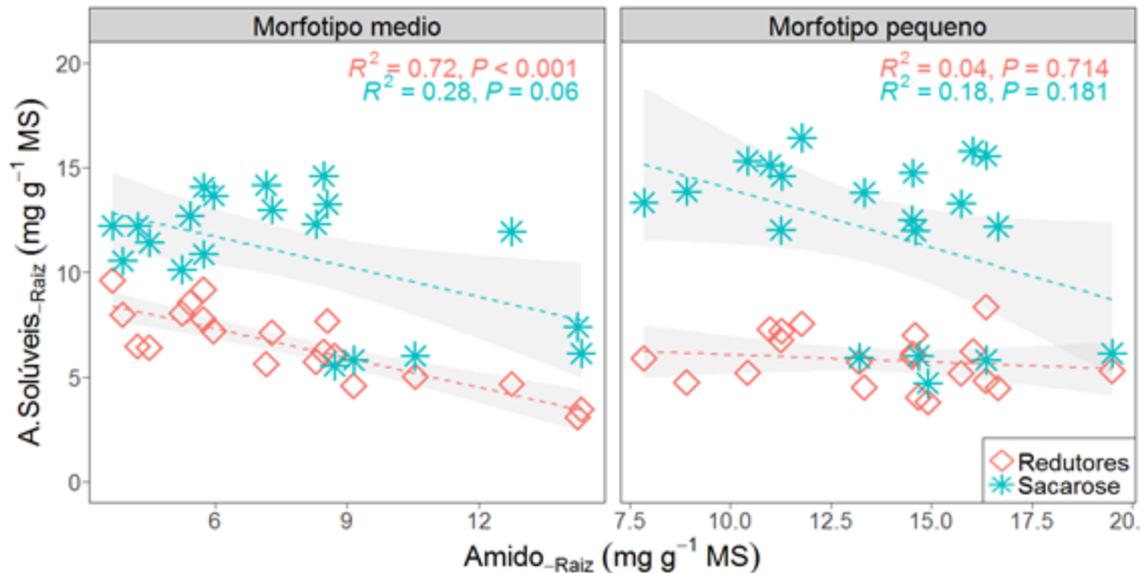
**Figura 17:** Efeito da seca no decréscimo das concentrações do amido no caule e sua correlação com a sacarose e os açúcares redutores (glicose e frutose) de caule em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* tratadas com suspensão hídrica (seca).

Em relação aos polímeros de parede celular no caule das plantas sob seca observou-se correlações positivas entre a lignina e a hemicelulose nos dois morfotipos, sendo uma correlação forte ( $r^2=0.84$ ) para o morfotipo médio e uma fraca ( $r^2=0.43$ ) para o morfotipo pequeno. Não se observou correlação entre lignina e celulose no caule de ambos os morfotipos (Fig. 10).



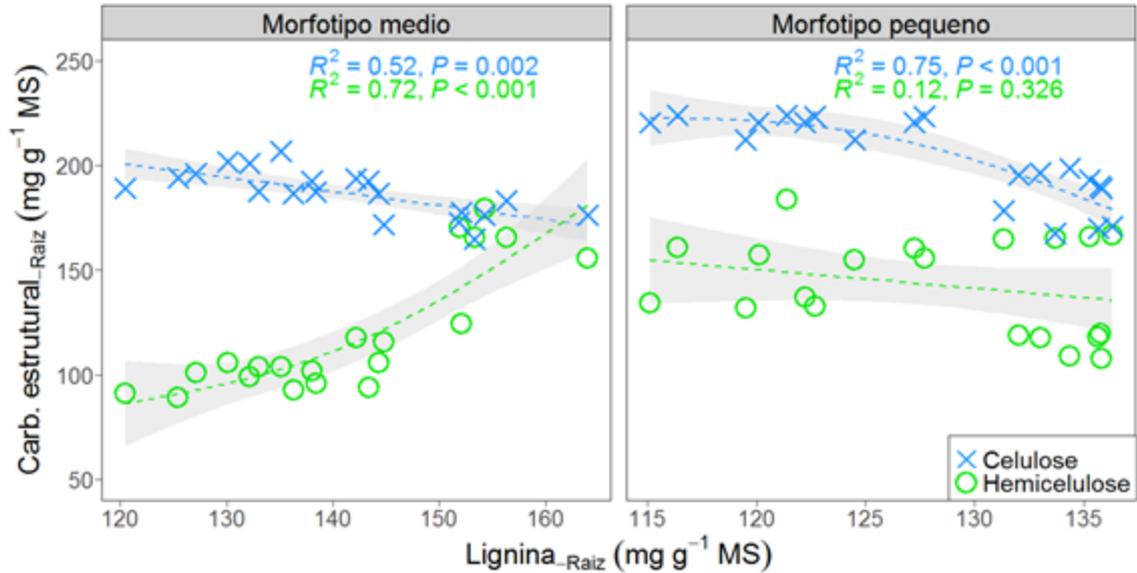
**Figura 18:** Correlação entre as concentrações de lignina com hemicelulose e celulose no caule em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* tratadas com suspensão hídrica (seca).

Em raiz sob seca, o morfotipo médio apresentou alta correlação negativa ( $r^2=0.72$ ) entre o amido e os açúcares redutores (glicose e frutose), sem apresentar correlação amido-sacarose. Na raiz do morfotipo pequeno sob seca não foram observadas correlações entre o amido com os açúcares redutores e sacarose (Fig. 11).



**Figura 19:** Efeito da seca no decréscimo das concentrações de amido na raiz e sua correlação com a sacarose e os açúcares redutores (glicose e frutose) de raiz em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* tratadas com suspensão hídrica (seca).

Com respeito aos polímeros de parede celular na raiz sob seca, o morfotipo médio apresentou correlação positiva forte ( $r^2=0.72$ ) entre a lignina e a hemicelulose, e entre lignina e celulose uma correlação negativa fraca ( $r^2=0.52$ ). O morfotipo pequeno apresentou correlação negativa forte ( $r^2=0.75$ ) entre lignina e celulose. Entre lignina e hemicelulose da raiz do morfotipo pequeno não se observou correlação (Fig. 12).



**Figura 20:** Correlação entre as concentrações de lignina com hemicelulose e celulose na raiz em plantas juvenis dos morfotipos pequeno e médio de *P. echinata* tratadas com suspensão hídrica (seca).

#### 4. DISCUSSÃO

A simulação do déficit hídrico reduziu o  $\Psi_{wp}$  foliar nos dois morfotipos de *P. echinata*. No entanto, o morfotipo pequeno mostrou maior sensibilidade ao mostrar decréscimo mais rápido de  $\Psi_{wp}$  em relação ao morfotipo médio. Ambos os morfotipos apresentaram valores de  $\Psi_{wp}$  próximo a -3,0 MPa no 17º dia de seca, sendo considerado um estresse hídrico severo. Sabe-se que a sensibilidade de determinados processos fisiológicos ao déficit hídrico é, em grande parte, um reflexo da estratégia da planta em lidar com a disponibilidade de água no solo e o potencial hídrico das células do mesófilo. Destacando que o estresse hídrico moderado é aquele em que o  $\Psi_w$  está entre -0.8 e -2.0 MP, e o estresse hídrico severo aquele com  $\Psi_w < -2.0$  MPa em plantas mesófitas (TAIZ et al., 2017).

Concomitantemente com a diminuição do  $\Psi_{wp}$  foliar, as plantas dos dois morfotipos de *P. echinata* sob déficit hídrico apresentaram respostas diferenciadas, aumentando ou diminuindo os reservatórios de carbono não estrutural e os polímeros das paredes celulares de acordo com o tempo de exposição ao tratamento. As dinâmicas nas concentrações de carbono com o avanço do estresse hídrico variaram de acordo com o órgão vegetativo (folha, caule, raiz) mostrando relação com os hábitos ecológicos das plantas dos morfotipos. Já na fase de reidratação, as plantas

tratadas dos dois morfotipos ajustaram as concentrações de carboidratos não estruturais e de polímeros de paredes celulares (exceto celulose) igualando-se aos seus controles. Esses resultados confirmam informações de que em algumas espécies tropicais os teores dos NSC<sub>T</sub> e de suas frações se ajustam de forma dinâmica entre órgãos vegetativos, especialmente em épocas de menor precipitação (Martinez-Vilalta et al., 2016).

De maneira geral, para o morfotipo médio (tolerante ao sol) bem adaptado a ambientes mais secos e quentes, os teores de AS aumentaram e foram os determinantes para o aumento dos NSC<sub>T</sub> sob seca severa. Da mesma forma, aumentou a lignificação e teores de hemiceluloses em folha, caule e raiz. Assim, o morfotipo pequeno tolerante a sombra adaptado a ambiente mais úmido e fresco, para lidar com o déficit hídrico, apresentou respostas mais imediatas, ou seja, em menor tempo de exposição, sendo seca moderada em comparação ao morfotipo médio. Isso confirma a existência de características funcionais em nível intraespecífico (HARDING et al., 2009). Apesar de o morfotipo pequeno ter apresentado incrementos dos AS, hemiceluloses e lignina, seus valores ficaram abaixo do morfotipo médio em seca severa.

A seca induziu, em ambos os morfotipos, depleção de amido. Em folha e caule, a diminuição do amido foi mais acentuada nas plantas do morfotipo pequeno. Efeito contrário foi observado na raiz com as plantas do morfotipo médio mostrando concentrações de amido inferiores ao do morfotipo pequeno. Esses resultados condizem com os relatos de Signori-Müller et al. (2021) de que amido em folhas de plantas tropicais podem diminuir em até 81% na estação seca. Em *Eucalyptus obliqua*, os estoques de amido esgotaram em raízes e caule no estresse hídrico do verão (SMITH et al., 2018). Uma proporção significativa do “pool” de amido pode representar armazenamento funcional para sua utilização imediata (DIETZE et al., 2014) pois a depleção do amido contribui para a sobrevivência das plantas em condições estressantes (MARTINEZ-VILALTA et al. 2016).

A depleção do amido nos órgãos vegetativos dos dois morfotipos pode estar relacionada à diminuição do transporte de assimilados do órgão fonte (folha) para os órgãos drenos (caule e raiz) sob déficit hídrico. O estoque de amido nos diferentes órgãos, sugere maior eficiência no requerimento da glicose sem provocar alterações nas condições hídricas das células (HARTMANN; TRUMBORE, 2016). As plantas

remobilizam sua reserva de amido para liberar energia, açúcares e metabólitos para mitigar o estresse abiótico (THALMANN; SANTELIA, 2017). Neste caso, nos dois morfotipos de *P. echinata*, a depleção do amido contribuiu no aumento de AS sugerindo uma possível função de osmorregulação, proteção e reparação dos tecidos que sofreram danos pela seca, evitando a mortalidade por falta de carbono (JIN et al., 2018). O aumento das concentrações dos AS nos dois morfotipos quando expostos a déficit hídrico foi evidenciado com maior intensidade no caule. Maiores concentrações de AS podem simplesmente ser mantidas acima dos limites mínimos para evitar o comprometimento do funcionamento metabólico ou morte celular (MARTINEZ-VILALTA et al. 2016).

As razões AS:NSC<sub>T</sub> foram incrementadas nas plantas tratadas dos dois morfotipos. No entanto, o morfotipo pequeno apresentou maior razão AS:NSC<sub>T</sub> em folha e caule, enquanto o morfotipo médio em raiz. O acúmulo de AS nas raízes em resposta a baixa disponibilidade hídrica contribui para possível osmorregulação e eficiência do sistema radicular para a absorção de água e nutrientes (DURAND et al., 2016). Os nossos resultados concordam com o mostrado por Signori-Müller et al., (2021) de que a razão de AS:NSC<sub>T</sub> nas folhas aumenta expressivamente em plantas tropicais sob seca, implicando em um papel importante do AS na mediação do estresse hídrico. Porém, ajustes da razão de AS:NSC<sub>T</sub> foliar não foram observados em espécies arbóreas menos adaptadas ao déficit hídrico, mesmo em condições de seca severa (SIGNORI-MÜLLER, 2021).

O aumento de myo-inositol em folha e caule nas plantas dos dois morfotipos sob seca, e de forma mais acentuada no morfotipo pequeno confirma informações de que altas concentrações de ciclitóis/myo-inositol são encontradas em plantas tolerantes a estresse osmótico (VERNON et al. 1993). Os ciclitóis têm sido estudados principalmente, por estarem relacionados à tolerância à desidratação, podendo estar presentes nos diferentes órgãos vegetativos, e estar envolvidos em processos de osmorregulação, bem como na osmoproteção de macromoléculas e membranas (MERCHANT et al., 2010; AL-SUOD et al., 2017; LAHUTA et al., 2018; SOUDEN et al., 2020). Acumulação de açúcares e ciclitols podem contribuir na resistência à embolia do xilema e facilitar o enchimento de vasos do xilema embolizados após restaurando a irrigação como no caso do *Eucalypto camaldulensis* (SOUDEN et al., 2020).

Sob seca, detectamos aumentos de rafinose nas plantas dos dois morfotipos, sendo maiores no morfotipo médio. A biossíntese de rafinose inicia-se a partir da formação de galactinol, catalisando a transferência de UDP-D-galactose para mio-inositol. Oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) são considerados metabólitos que auxiliam a planta a tolerar condições de estresse (PETERBAUER E RICHTER, 2001). Plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas ao estresse hídrico e salino desencadeiam a expressão do gene galactinol sintase, e acumularam altos níveis de rafinose (TAJI et al. 2002).

Nas folhas das plantas tratadas com seca dos dois morfotipos não se observaram aumentos de sacarose e glicose quando comparadas com seus controles. Possivelmente, houve remobilização desses fotoassimilados do órgão fonte (folhas) para os órgãos dreno (caule e raiz), para processos de osmoregulação e proteção das membranas celulares, ou para requerimentos de fontes de energia para manutenção do metabolismo. Resultados semelhantes foram relatados por Gasparini (2019). Para esse autor, menor concentração de sacarose foliar e maior concentração de sacarose radicular foram observados nos mesmos morfotipos de pau-brasil sob alta temperatura e baixa umidade associados ao déficit hídrico. Esses açúcares podem estimular o desenvolvimento das raízes sob estresse hídrico (DURAND et al., 2016).

As maiores concentrações de sacarose em caule e raiz em plantas do morfotipo pequeno sob seca, pode ser um indicativo da maior remobilização da sacarose para os órgãos dreno, ou resultado da depleção do amido nesses órgãos (Figuras 2 e 4). As variações das concentrações dos açúcares redutores (glicose e frutose) também podem ser interpretadas como indicativo da depleção do amido e não da quebra de sacarose. Isto, pode ser explicado a que possivelmente o morfotipo pequeno apresentou menor atividade enzimática das invertases e, conseqüentemente, menor intensidade na quebra das moléculas de sacarose nos órgãos dreno. Já no morfotipo médio, a falta de diferença de sacarose com seu controle nos três órgãos vegetativos sugere uma quebra da sacarose nas folhas e depleção do amido sob seca, refletindo no aumento de frutose e glicose. Invertases que catalisam a quebra da sacarose em glicose e frutose, podem ser ativadas para suprir necessidades metabólicas no controle de osmorregulação em condições estressantes (RYBUS-ZAJAC et al., 2014).

O aumento de glicose e frutose nos dois morfotipos, e de forma mais acentuada no morfotipo médio sob seca severa, pode ser resultado da maior atividade de outras

vias metabólicas de açúcares como a via das pentoses fosfato. Esta via metabólica fornece eritrose 4-fosfato para a via de compostos fenólicos (HILAL et al., 2004). Em condições de estresse hídrico as plantas podem recorrer a vias metabólicas que minimizam os efeitos deletérios da seca através da biossíntese de compostos fenólicos. A rota das pentoses fosfato com o seu intermediário eritrose-4-fosfato produz ácido chiquímico que leva à formação de lignina e fenólicos secundários variados como flavonóides e taninos. Esses compostos estão envolvidos em mecanismos de defesa contra estresse biótico e abiótico, minimizando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (TAIZ et al., 2017; IRFAN et al., 2019).

Nos dois morfotipos, o estresse hídrico induziu alterações na estrutura da parede celular. Sabe-se que as plantas expostas ao déficit hídrico podem apresentar alterações morfológicas como resultado de modificações na parede celular da planta (LE GALL *et al.*, 2015). Na tolerância vegetal às condições de estresse abiótico, o ajustamento da parede celular é um fenômeno importante (HAMANN, 2012). Portanto, os mecanismos de tolerância parecem ser complexos e as respostas ao estresse relacionadas à parede celular podem variar entre espécies e órgãos vegetais (SASIDHARAN; VOESENEK; PIERIK, 2011).

A celulose em folha do morfotipo pequeno aumentou no início da seca e na medida que o estresse hídrico avançou sua concentração sofreu redução atingindo valores inferiores ao controle. O morfotipo médio não apresentou alterações de celulose na folha. As menores concentrações de glicose e sacarose na folha das plantas estressadas do morfotipo pequeno poderia ser explicada em que esses compostos possivelmente foram utilizados para maior síntese de celulose na fase de seca moderada. Segundo Novaes et al., (2010), a quebra de sacarose gera os precursores da biossíntese de celulose e hemicelulose.

No caule, a seca não alterou a celulose em plantas dos dois morfotipos. Já em raiz, decréscimos na quantidade desse polissacarídeo foram observados, e de forma mais acentuada no morfotipo pequeno. A biossíntese de celulose pode ser alterada em resposta ao déficit hídrico (LE GALL *et al.*, 2015). Na reidratação, observou-se incremento nas concentrações de celulose de raiz das plantas tratadas dos dois morfotipos, e de forma mais acentuada no morfotipo pequeno, mantendo valores superiores ao seu controle. Isso sugere que o metabolismo e o desenvolvimento retornaram após a reidratação, com maior alocação de carbono estrutural associada

à manutenção da integridade da parede celular e pressão de turgescência (BUCKERIDGE et al., 2008), além de priorizar o crescimento da raiz, órgão provedor de água para as partes aéreas da planta.

Por outro lado, as hemiceluloses e lignina nos dois morfotipos aumentaram sob déficit hídrico. Porém, as hemiceluloses do morfotipo médio apresentaram valores superiores ao morfotipo pequeno em folha e caule. Esse resultado pode ser explicado pelos maiores teores de AS nos dois morfotipos sob seca. Isso parece ter proporcionado maior incremento de carbono disponível nas plantas sob déficit hídrico e, conseqüentemente, maior síntese de hemiceluloses (HARDING et al., 2009).

Os menores teores de sacarose em plantas do morfotipo médio poderia ter favorecido a síntese de hemiceluloses, uma vez que a quebra de sacarose provê precursores para a síntese de hemicelulose (NOVAES et al., 2010). As hemiceluloses estão envolvidas na proteção à seca. Em alguns casos, o aumento de xiloglucanos proporciona maior resistência ao estresse hídrico e salino (CHO et al., 2006). Os xiloglucanos estão envolvidas na reestruturação da parede celular e na deposição da parede secundária (BOURQUIN et al., 2002), confirmando seu papel no enrijecimento da parede celular (YANG et al., 2006). De fato, plantas mutantes de *A. thaliana* com deficiência de xiloglucanos apresentaram paredes celulares mais fracas (CAVALIER et al., 2008).

A lignina seguiu padrão similar das hemiceluloses, apresentando maiores concentrações nas plantas do morfotipo médio em comparação ao morfotipo pequeno sob seca. Isso sugere que possivelmente o morfotipo médio teve maior atividade nas rotas das pentoses fosfato, minimizando os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (ERO's). Sabe-se que a seca estimula o aumento das ERO's o envolvidas nas ligações entre os componentes da parede celular e no seu enrijecimento (O'BRIEN et al., 2012). A peroxidase, catalisa ligações cruzadas entre grupos fenólicos servindo de base para a formação da lignina (TAIZ et al., 2017), o que pode ter ocorrido no morfotipo médio. Em estudo com *Saccharum spp.*, o déficit hídrico aumentou em aproximadamente 60% o teor de lignina no xilema secundário das plantas desse gênero (MAZZAFERA et al., 2015). Maior concentração de lignina sugere enrijecimento e proteção de vasos condutores xilemáticos, podendo otimizar o fluxo de água e nutrientes, característica típica de espécies heliófilas (ZANNE et al., 2010).

Não obstante, um aumento das ERO's pode, também, causar degradação na parede celular (SHOPFER, 2001). Segundo Moore (2008), a deficiência hídrica afeta as ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos de parede celular, alterando suas propriedades biofísicas e, conseqüentemente, o crescimento vegetal. Assim, as paredes celulares de alguns tecidos poderiam ter sido enrijecidas, enquanto as paredes celulares de tecidos com função primária no crescimento passam por afrouxamento (FAN, 2006).

O caule e raiz do morfotipo médio apresentaram correlação positiva forte entre lignina e hemicelulose, confirmando as correlações fortes entre lignina e os carboidratos estruturais (hemicelulose e celulose). No morfotipo pequeno ocorreu correlação negativa entre lignina e celulose na raiz. As hemiceluloses estão intimamente correlacionadas à lignina atuando como fases de cimentação da celulose, por proporcionar ligações cruzadas entre as microfibrilas de celulose e as ligninas, originando o complexo lignina-carboidratos (LAWOKO et al., 2006; ANSELL; MWAIKAMBO, 2009).

Assim, lignina e hemicelulose apresentam-se como covariáveis na explicação e/ou indicativo de níveis diferenciados de proteção para minimizar os efeitos deletérios da seca. Possivelmente, melhorando as necessidades de condução da água nos tecidos vasculares dos dois morfotipos. A lignina proporciona, ainda, rigidez e hidrofobicidade, fundamental para as necessidades de condução de água nos tecidos vasculares (BERGLUND et al., 2020). Portanto, a lignificação pode reforçar a resistência e rigidez das paredes celulares, podendo ser uma componente chave da resposta da planta ao estresse ambiental como a seca (LE GALL et al., 2015).

Por sua vez, o aumento nas concentrações de hemicelulose poderia contribuir para tornar a rede celulose-hemicelulose mais rígida, e juntamente com a lignina, diminuir a capacidade de expansão da parede celular como medida de proteção em condições de restrição hídrica. Tecidos que cessam o crescimento aumentam o enrijecimento da parede celular como uma resposta protetora ao estresse (FAN, 2006). O enrijecimento da parede celular como resultado das associações entre os polímeros estruturais dificulta sua solubilização, enquanto o afrouxamento apresenta efeito oposto (LEUCCI et al., 2008). Em contrapartida, o enrijecimento da parede celular pode afetar o crescimento sob seca. Como o descrito por Amano (2007), o pau-brasil pode apresentar inatividade cambial dependendo da região de distribuição,

embora com duração diferente, principalmente relacionada à baixa disponibilidade hídrica no solo.

## 5. CONCLUSÕES

Sob seca, o morfotipo tolerante à sombra apresentou respostas mais imediatas, alterando os NSC e polímeros de parede celular em comparação ao morfotipo tolerante ao sol. Com o avanço da seca, o morfotipo tolerante ao sol apresentou incremento nas concentrações dos AS, hemiceluloses e ligninas, acompanhado de depleção do amido. Porém, menos intenso em relação ao morfotipo pequeno. A depleção de amido nos dois morfotipos sob déficit deve ter contribuído para a demanda de açúcares para os ajustes de osmorregulação, proteção e possível reparação dos tecidos vegetais. Os órgãos mais sensíveis as variações de açúcares solúveis (glicose, frutose, sacarose, myo-inositol e rafinose) e de amido em resposta a seca foram caule e raiz, independentemente do morfotipo.

O morfotipo tolerante à sombra apresentou aumento dos AS sob seca moderada, possivelmente para manter a regulação osmótica. Porém, a seca severa nesse morfotipo exigiu maior quebra de amido. Os AS acumulados durante a seca devem ter sido utilizados na manutenção celular, refletindo na diminuição dos NSC<sub>T</sub>. O morfotipo tolerante ao sol apresentou aumento dos AS e os NSC<sub>T</sub> sob seca como parte de sua estratégia de regulação de sua pressão osmótica. Além disso, também apresentou maiores concentrações dos açúcares redutores sob seca, em relação ao morfotipo tolerante à sombra. Esse fato poderia estar correlacionado com a maior afinidade do morfotipo tolerante ao sol com as vias metabólicas antioxidantes, como as pentoses fosfato precursora da biossíntese de compostos envolvidos em mecanismos de defesa contra estresse hídrico, como a lignina.

O aumento de lignina e hemicelulose nos dois morfotipos apresentam-se como covariantes no enrijecimento das paredes celulares e segurança hídrica xilemática, no sentido de conferir proteção contra os efeitos deletérios da seca. Porém, o morfotipo tolerante ao sol exibiu maior capacidade de ajustes fisiológicos contra a seca severa. As respostas dos polímeros da parede celular integrado com as altas correlações entre NSC<sub>T</sub>, açúcares redutores e AS acompanhados de decréscimo de amido, indicam níveis de tolerância diferenciadas entre os morfotipos frente a seca severa.

Assim, os hábitos dos morfotipos refletiram nas suas estratégias fisiológicas para ajustar a alocação dos carboidratos na tolerância à seca. Concluimos que, se a seca das mudanças climáticas nas regiões de domínio da Mata Atlântica se instalarem nas próximas décadas, e considerando que o morfotipo pequeno é o que tem a distribuição mais ampla, possivelmente no estabelecimento inicial a população natural deste morfotipo tolerante à sombra possa sofrer redução ou alteração na sua distribuição, devido a sua menor tolerância ao déficit hídrico em relação ao morfotipo tolerante ao sol. E por sua vez redução nas populações naturais de *Paubrasilia echinata*. Embora, no presente estudo, não se constatou mortalidade até o máximo de estresse hídrico imposto aos 17<sup>o</sup> dias.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SUOD, H, RATIU, I-A, LIGOR, M, LIGOR, T, BUSZEWSKI, B. Determination of sugars and cyclitols isolated from various morphological parts of *Medicago sativa* L. *J Sep Sci*, 2017.
- AMANO, Erika. Pau-brasil, madeira e casca: formação, desenvolvimento e estrutura. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Anatomia Vegetal) – Instituto de Biociências da USP, São Paulo, 2007.
- AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, v. 34, p. 425-431, 2007.
- AMISSAH L, MOHREN GMJ, KYEREH B, POORTER L. The Effects of Drought and Shade on the Performance, Morphology and Physiology of Ghanaian Tree Species. *PLOS ONE* 10(4). 2015.
- ANSELL, M.P. & MWAIKAMBO, L. The structure of cotton and other plant fibers. *Handbook of Textile Fibre Structure*. 2. 62-94, 2009.
- BRENDEL, O.; LOSETTA, P.P.M.G.; STEWART, D. A rapid and simple method to isolate pure alpha cellulose. *Phytochemistry Annal*, v. 11, p. 7-10, 2000.
- BERGLUND, J., MIKKELSEN, D., FLANAGAN, B. M., DHITAL, S., GAUNITZ, S., HENRIKSSON, G., LINDSTRÖM, M. E., YAKUBOV, G. E., GIDLEY, M. J., & VILAPLANA, F. Wood hemicelluloses exert distinct biomechanical contributions to cellulose fibrillar networks. *Nature communications*, 11(1). 2020.
- BUCKERIDGE, M. S.; CAVALARI, A. A.; SILVA, G. B. Parede Celular. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 165-181. 2008.
- CARPITA, N; MCCANN, M. Cell wall. In: *Biochemistry & molecular biology of plants* (eds.) B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. American Society of Plant Physiologists. p. 52-108. 2000.
- CHUSTE, PA., MAILLARD, P., BRÉDA, N. et al. Sacrificing growth and maintaining a dynamic carbohydrate storage are key processes for promoting beech survival under prolonged drought conditions. *Trees* 34, 381–394, 2020.
- CHO, S. et al. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *FEBS Letters*, v. 580, n. 13, p. 3136-3144, 2006.
- DIETZE, C.M.; SALA, A.; CARBONE, M.S.; CZIMCZIK, C.I.; MANTOOTH, J.A.; RICHARDSON, A.D.; VARGAS, R. Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 65, p. 667-687, 2014.
- DOS SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.; NAKAMURA, C.V.; MOURÃO, K.S.M. MANGOLIN, C.A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, p. 1230-1241, 2008.
- DURAND, Mickaël; PORCHERON, Benoît; HENNION, Nils; MAUROUSSET, Laurence; LEMOINE, Rémi; POURTAU, Nathalie. Water Deficit Enhances C Export to the Roots in *Arabidopsis thaliana* Plants

with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots. *Plant Physiology*, v. 170, p. 1460-1479, 2016.

FAN, L. Progressive Inhibition by Water Deficit of Cell Wall Extensibility and Growth along the Elongation Zone of Maize Roots Is Related to Increased Lignin Metabolism and Progressive Stelar Accumulation of Wall Phenolics. *Plant Physiology*, v. 140, n. 2, p. 603-612, 2006.

GAMA, V.N. Caracterização morfofisiológica e bioquímica de três morfotipos de *Paubrasilia echinata* Lam. Exposta a condições de irradiância. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

GASPARINI, X.S.D. Alocação de carbono e resposta oxidante em dois morfotipos de *Paubrasilia echinata* submetidos a diferentes condições de déficit de pressão de vapor e temperatura. Teses (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.

GIBSON, S.I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, n. 1, p. 93-102, 2005.

GRAY, S. B.; DERMODY, O.; KLEIN, S. P.; LOCKE, A. M.; MCGRATH, J. M.; PAUL, R. E.; ROSENTHAL, D.M; RUIZ-VERA, U.M; SIEBERS, M.H; STRELLNER, R.; AINSWORTH, A.E.; BERNACCHI, C.J; LONG, S.P.; ORT, D.R; LEAKEY, A.D.B. Intensifying drought eliminates the expected benefits of elevated carbon dioxide for soybean. *Nature Plants*, Vol.2(9), 2016.

HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, 2012.

HARDING, S.A.; JARVIE, M.M.; LINDROTH, R.L.; TSAI, C.J. A comparative analysis of phenylpropanoid metabolism, N utilization and carbon partitioning in fast- and slow- growing *Populus* hybrid clones. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 12, p. 3443–3452, 2009.

HARTMANN, H.; TRUMBORE, S. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees- from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist*, v. 211, n. 2, p. 386-403, 2016.

HILAL, M., PARRADO, M.F., ROSA, M., GALLARDO, M., ORCE, L., MASSA, E.M., GONZÁLEZ, J.A., PRADO, F.E. Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiations. *Photochem. Photobiol*, v.79, p.205–210, 2004.

HE, W, LIU, H, QI, Y, LIU, F, ZHU, X. Patterns in nonstructural carbohydrate contents at the tree organ level in response to drought duration. *Glob Change Biol*. 2020.

HOCH, G., RICHTER, A. & KÖRNER, CH. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment* 26: 1067-1081. 2003.

HUMMEL, I.; et al. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbono usage: na integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression. *Analysis. Plant Physiology*, v. 154, p. 357-372, 2010.

IRFAN, M.; DAR, M.; RAGHIB, F.; AHMAD, B.; RAINA, A.; KHAN, F.; AND NAUSHIN, F. Chapter 9 - Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: an overview. *Plant Signaling Molecules*. Woodhead Publishing, 2019.

JIN, Y.; LI, J.; LIU, C.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; SHA, L.; WANG, Z.; SONG, Q.; LIN, Y.; ZHOU, R.; CHEN, A.; LI, P.; FEI, X. & GRACE, J. Carbohydrate dynamics of three dominant species in a Chinese savanna under precipitation exclusion, *Tree Physiology*, Volume 38, Issue 9, 2018.

KLEIN, T.; HOCH, G. Tree carbon allocation dynamics determined using a carbon mass balance approach. *New Phytologist*, v. 205, p. 147-159, 2015.

LAHUTA, L.B., SZABLIŃSKA, J., CIAK, M. *et al.* The occurrence and accumulation of D-pinitol in fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). *Acta Physiol Plant* 40, 155, 2018.

LAMBERS, H.; CHAPIM III, F. S.; PONS, T. L. *Plant physiological ecology*. 2 ed. Berlin: Springer, 2008.

LAWOKO, M., HENRIKSSON, G., GELLERSTEDT, G. Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods. *Holzforschung*, v. 60, n. 2, p. 156-161, 2006.

LE GALL, H., PHILIPPE, F., DOMON, J. M., GILLET, F., PELLOUX, J., & RAYON, C. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants (Basel, Switzerland)*, 4(1), 112–166. 2015.

LEUCCI, M. *et al.* Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. *Journal of Plant Physiology*, v. 165, n. 11, p. 1168-1180, 2008.

LIMA, H. C. SOUZA, E. R. TOZZI, A. M. *et al.* Fabaceae/Leguminosae. In: Gustavo Martinelli; Miguel Avila Moraes. (Org.). *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. 1ed. Rio de Janeiro: Andrea Jacobson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: CNCFlora, v. 1, p. 516-548, 2013.

MARTINEZ-VILALTA, J., SALA, A., ASENSIO, D., GALIANO, L., HOCH, G., PALACIO, S., PIPER, F., FRANCISCO, L. Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: A global synthesis. *Ecological Monographs*. 86. 10.1002/ecm.1231. 2016.

MAZZAFERA, P.; SANTOS, A.B.; BOTTCHER, A.; KIYOTA, E.; MAYER, J.L.S.; VICENTINI, R.; BRITO, M.S.; CRESTE, S.; LANDELL, M.G.A. Water stress alters lignin content and related gene expression. In two sugarcane genotypes. *Journal of Agricultural and food chemistry*, v. 63, p. 4708–4720, 2015.

MEENTS, M. J., WATANABE, Y., & SAMUELS, A. L. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. *Annals of botany*, 121(6). 2018.

MERCHANT, A., ARNDT, S.K., ROWELL, D.M. *et al.* Mudanças sazonais em carboidratos, cliditols e relações hídricas de 3 espécies de eucalipto cultivadas em campo a partir de taxonomia contrastante em um local comum. *Ann. Sci, o que está por?* 67, 104, 2010.

MOORE, J. P. *et al.* Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum*, v. 134, n. 2, p. 237-245, 2008.

MORADI, P., FORD-LLOYD, B., PRITCHARD, J. Metabolomic approach reveals the biochemical mechanisms underlying drought stress tolerance in thyme, *Analytical Biochemistry*, Volume 527, 2017.

MOURA, J.C.M.S.; BONINE, C.A.V.; DE OLIVEIRA, J.F.V; DORNELAS, M.C.; MAZZAFERA, P. Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. *J. Integr. Plant Biol.*, v 52, pg 360– 376, 2010.

NOVAES, E.; KIRST, M.; CHIANG, V.; WINTER-SEDEROFF, H.; SEDEROFF, R. Lignin and biomass: A negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiol*, v 154, p 555-561, 2010.

O'BRIEN, J. A. et al. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 2012.

PETERBAUER, T. & RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197. 2001.

POLLOCK, C. J. Tansley review no. 5 fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist*, v. 104, n. 1, p. 1-24, 1986.

ROSSATO, D.R.; KOLB, R.M. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. *Acta Botanica Brasílica*, v. 24, n. 3, p. 605-612, 2010.

RYBUS-ZAJAC, M.; KUBI, J.; BOCIANOWSKI, J. UV-B radiation does not limit carbohydrate level and carbohydrate metabolism in cucumber leaves. *Communications in biometry and crop Science*, v 9, p 3-14, 2014.

SASIDHARAN, R.; VOESENEK, L. A. C. J.; PIERIK, R. Cell Wall Modifying Proteins Mediate Plant Acclimatization to Biotic and Abiotic Stresses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 30, n. 6, p. 548-562, 2011.

SAVAGE JA, CLEARWATER MJ, HAINES DF, KLEIN T, MENCUCCINI M, SEVANTO S, TURGEON R, ZHANG C. Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? *Plant Cell Environ* 39:709–725, 2016.

SCHÄDEL, C.; BLÖCHL, A.; RICHTER, A.; HOCH, G. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, n. 1, p. 1-8, 2010.

SCHOLANDER, PF; HAMMEL, HT; HEMINGSEN, EA; BRADSTREET, ED Pressão hidrostática e potenciais osmóticos em folhas de manguezais e algumas outras plantas. *Proceedings of National Academy Science*, v.51, p.119-125, 1965.

SECCHI, F.; ZWIENIECKI, M.A. Sensing embolism in xylem vessels: the role os sucrose asa trigger for refilling. *Plant, Cell & Environment*, v. 34, n. 3, p. 514-524, 2011.

SHOPFER, P. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*, v. 28, p. 679-688, 2001.

SILVA, C.A. Análise da composição da madeira de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil): subsídios para o entendimento de sua estrutura e resistência a organismos xilófagos. Tese apresentada ao

Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular. 2007.

SIGNORI-MÜLLER, C., OLIVEIRA, R.S., BARROS, F.D.V. *et al.* Non-structural carbohydrates mediate seasonal water stress across Amazon forests. *Nat Commun* 12, 2310, 2021.

SMITH, M. G.; MILLER, R. E.; ARNDT, S. K.; KASEL, S. BENNETT, L. T. Distribuição da árvore inteira e variação temporal de carboidratos não estruturais em árvores perenes de folha larga, *Fisiologia da árvore*, Volume 38, Edição 4, abril de 2018.

SOUDEN, S., ENNAJEH, M., OULEDALI, S. *et al.* Water relations, photosynthesis, xylem embolism and accumulation of carbohydrates and cyclitols in two Eucalyptus species (*E. camaldulensis* and *E. torquata*) subjected to dehydration–rehydration cycle. *Trees* 34, 1439–1452, 2020.

SOUZA, A.; MORAES, M.G.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. *Acta Botanica Brasílica*, v. 19, n. 1, p. 81-90, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888, 2017.

TAJI, T., OHSUMI, C., IUCHI, S., SEKI, M., KASUGA, M., KOBAYASHI, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v. 29, p. 417-426, 2002.

THALMANN, Mathias; SANTELIA, Diana. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist*, v.214, p.943-951, 2017.

TURNER, N.C. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil*, v.58, p.339-366, 1981.

VALLADARES, F; MATESANZ, S; GUILHAUMON, F; ARAÚJO, M.B; BALAGUER, L; BENITO-GARZÓN, M; CORNWELL, W; GIANOLI, E; KLEUNEN, M; NAYA, D.E; NICOTRA, A.B; POORTER, H; ZAVALA, MIGUEL A. The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters*, Vol.17(11), pp.1351-1364, 2014.

VERNON, D.M., TARCZYNSKI, M.C., JENSEN, R.G. & BOHNERT, J. Cyclitol production in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 4: 199-205. 1993.

WILDHAGEN, H., *et al.* Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*. *Tree physiology*, 38(3). 2018.

ZANNE, AE; WESTOBY, M; FALSTER, DS; ACKERLY, DD; LOARIE, SR; ARNOLD, SEJ; COOMES, DA. Angiosperm wood structure: Global patterns in vessel anatomy and their relation to wood density and potential conductivity. *Am J Bot*, v. 97, n.2, p.207-215, 2010.