

FELLIP JANUÁRIO PINHEIRO LACERDA

**PAPEL DA HIPOXIA E DO MANGANÊS NA TOLERÂNCIA DIFERENCIAL
DE CLONES DE EUCALIPTO À SECA DE PONTEIRO DO VALE DO RIO
DOCE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L131p
2013

Lacerda, Fellip Januário Pinheiro, 1983-

Papel da hipoxia e do manganês na tolerância diferencial de clones de eucalipto à Seca de Ponteiro do Vale do Rio Doce / Fellip Januário Pinheiro Lacerda. – Viçosa, MG, 2013. ix, 43 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Roberto Ferreira de Novais.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 36-43

1. Física do solo. 2. Eucalipto. 3. Hipoxia. 4. Manganês. 5. Solos - Compactação. 6. Estrutura do solo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Solos. Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. II. Título.


CDD 22. ed. 631.43

FELLIP JANUÁRIO PINHEIRO LACERDA

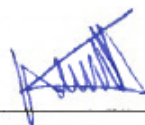
**PAPEL DA HIPOXIA E DO MANGANÊS NA TOLERÂNCIA DIFERENCIAL
DE CLONES DE EUCALIPTO À SECA DE PONTEIRO DO VALE DO RIO
DOCE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de junho de 2013



Wagner Luiz Araújo
(Coorientador)



Edson Marcio Mattiello



Ecila Mercês de Albuquerque Villani



Roberto Ferreira de Novais
(Orientador)

À minha família, pelo incentivo e confiança

Aos meus pais, irmãos pela ajuda, amor e exemplo de vida

Aos amigos, pelos grandes momentos compartilhados

À minha namorada Adrieli, pelo amor, incentivo e companheirismo

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Solos pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo;

À Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA) pelo auxílio financeiro;

Ao Prof. Roberto Ferreira de Novais pelos ensinamentos, sugestões e conselhos que muito contribuíram para a realização deste trabalho e, principalmente, para minha formação acadêmica, profissional e pessoal;

Ao Prof. Ivo Ribeiro da Silva pela competência em gerenciar este estudo, com excelentes sugestões, ensinamentos, críticas e, principalmente, pela confiança nesse tempo de trabalho. Agradeço, também, pela oportunidade, incentivos e conselhos em momentos decisivos de minha vida acadêmica e profissional;

Ao Prof. Edgar Picoli pelos ensinamentos, ajuda e sugestões para a realização deste estudo;

Ao Prof. Wagner Araújo pelos conselhos e sugestões que muito contribuíram para o andamento deste trabalho;

Ao Departamento de Pesquisa da CENIBRA, em especial, ao Dr. Fernando Palha Leite pela disponibilidade de recursos para o andamento deste projeto e, ao Dr. Guilherme Luiz de Jesus pela amizade, sugestões e ajuda para a confecção deste estudo;

À Amapá Florestal e Celulose S.A (AMCEL), em especial, ao Dr. Antonio Carlos Rosa, pela confiança, amizade e, principalmente, por acreditar que eu fosse capaz de conciliar as obrigações diárias de trabalho com a vida acadêmica;

Aos amigos de Graduação e Pós - Graduação Rafael Teixeira e Leonardo Corrêa, pela amizade, convívio e parceria construída nesses anos em Viçosa;

Aos estagiários Maria e Matheus pela ajuda e bons momentos de trabalho que realizamos juntos;

A todos os amigos que fizeram parte de minha história no laboratório Isótopos Estáveis e Solos Florestais, em especial, João Milagres, Fabrício Gebrim, Fernanda Schulthais, Rafael Teixeira e Rodrigo Nogueira;

Aos professores do Departamento de Solos que contribuíram para a minha formação acadêmica;

A todos que participaram desta jornada de trabalho.

BIOGRAFIA

FELLIP JANUÁRIO PINHEIRO LACERDA, filho de Raimundo Lacerda e Maria da Glória Pinheiro Lacerda, nasceu em 6 de setembro de 1983, em Ubá, Estado de Minas Gerais.

Em janeiro de 2006 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2011.

Em agosto de 2011 iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, na Universidade Federal de Viçosa, sob Orientação do Professor Roberto Ferreira de Novais.

CONTEÚDO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO.....	1
Hipoxia	2
Manganês.....	4
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Experimento I: Efeito de hipoxia e de concentrações crescentes de Mn.....	7
Experimento II: Efeito de hipoxia no sistema radicular e na parte aérea	8
Experimento III: Efeito de hipoxia e toxidez de Mn	9
Análises estatísticas	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
Experimento I: Efeito de hipoxia e de concentrações crescentes de Mn.....	10
Matéria seca de componentes das plantas	10
Teor de Mn	12
Experimento II: Efeito de hipoxia no sistema radicular e na parte aérea	15
Matéria seca e crescimento radicular.....	15
Teores de nutrientes.....	19
Formação de aerênquima.....	22
Trocias gasosas	24
Experimento III: Efeito de hipoxia e toxidez de Mn.....	26
Matéria seca de componentes de plantas	26
Crescimento radicular.....	28
Síntese de etileno	30
Toxidez de Mn.....	31
Teor de nutriente.....	34
CONCLUSÕES	35
LITERATURA CITADA.....	36

RESUMO

LACERDA, Fellip Januário Pinheiro. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2013. **Papel da hipoxia e do manganês na tolerância diferencial de clones de eucalipto à Seca de Ponteiro do Vale do Rio Doce.** Orientador: Roberto Ferreira de Novais. Coorientadores: Ivo Ribeiro da Silva e Wagner Luiz Araújo.

A Seca de Ponteiro de Eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD) é um distúrbio fisiológico que se caracteriza por necroses amarronzadas na inserção de ramos secundários e pecíolos, culminando com intensa desfolha e, em casos mais extremos, com a morte de plantas. Esse problema vem apresentando estreita correlação com ambiente de hipoxia (baixo potencial redox) e excesso de Mn no lençol freático. Assim, este trabalho teve como objetivo compreender os mecanismos envolvidos na tolerância diferencial de clones de eucalipto à SPEVRD e sua relação com a hipoxia e o excesso de Mn. Para isso, três experimentos foram conduzidos. Experimento I: Os tratamentos foram conduzidos em um esquema fatorial $2 \times 2 \times 5$ sendo: dois clones – um sensível (1213) e outro tolerante (2719) à SPEVRD; duas concentrações de O_2 em solução – normal (8 mg L^{-1} de O_2) e hipoxia (1 mg L^{-1} de O_2), e cinco concentrações de Mn ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) – 0; 5; 10; 30 e 90 mg L^{-1} . Ao fim da condução do experimento, cada planta foi separada em folhas velhas (maduras), novas, caule e raiz, e secas em estufa. Estas amostras foram moídas e submetidas à digestão nítrico-perclórica para a determinação do teor de Mn. Experimento II: Os tratamentos consistiram em um esquema fatorial 2×4 , sendo: dois clones – um sensível (1213) e outro tolerante (2719) e quatro concentrações de O_2 em solução nutritiva – 1; 4; 6 e 8 mg L^{-1} de O_2 . O comprimento do sistema radicular e parte aérea foram medidos aos 0 e 21 dias de condução do experimento. Ao final de 14 dias, alguns atributos fisiológicos foram avaliados: fotossíntese, condutância estomática, transpiração e concentração interna de CO_2 . Em seguida, foram tomadas amostras do ápice de raiz para análises anatômicas. Ao final do experimento, as plantas foram colhidas e separadas em folhas velhas, novas, caule e raiz e secas em estufa. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão para determinação dos teores de macro e micronutrientes. Experimento III: Os tratamentos consistiram em um esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, sendo os dois clones de eucalipto – 1213 (sensível) e 2719 (tolerante); duas concentrações de O_2 – normal (8 mg L^{-1}) e hipoxia (6 mg L^{-1}), e duas concentrações de Mn – 30 e 300 mg L^{-1} . O comprimento do sistema radicular foi medido nos tempos 0, 2, 5, 10, 15, 18 e aos 27 dias de condução do experimento. O ganho em altura da parte aérea e ao longo do

período experimental foi medida no início e ao final (27 dias) do experimento. Ao final do experimento, antes da colheita, foi quantificado o etileno emitido pelas plantas. Em seguida, as mudas foram colhidas e separadas em folhas maduras, novas, caule e raiz, e secas em estufa. Posteriormente, foram determinados os teores de macro e micronutrientes. A condição de hipoxia reduziu a matéria seca dos componentes da planta, o crescimento radicular e tamanho das plantas, sendo que a maioria destes atributos foi mais afetada para o clone 1213 (sensível). O crescimento radicular foi o melhor indicador da condição de estresse causado pela hipoxia, com seu crescimento inibido mais para o clone 1213; o Mn não influenciou esta modificação. A condição de hipoxia ocasionou a formação de aerênquima no sistema radicular e o incremento de etileno na parte aérea de ambos os clones, sendo que este foi mais intenso para o clone 1213 (sensível). O clone 2719 (tolerante) respondeu mais rapidamente à hipoxia do que o clone sensível (1213), reduzindo a abertura estomática e, conseqüentemente, a taxa fotossintética, transpiração e concentração interna de CO₂ a menores valores que o clone sensível (1213). Em condição de hipoxia e excesso de Mn, o clone sensível (1213) apresentou sintoma de toxidez de Mn como necroses amarronzadas e encarquilhamento de folhas novas, seguida pela perda de dominância apical. A deficiência de O₂ no sistema radicular foi o primeiro fator a predispor os clones a SPEVRD, diferentemente do excesso de Mn que parece atuar em longo prazo para a completa expressão dos sintomas de Seca de Ponteiro.

ABSTRACT

LACERDA, Fellip Januário Pinheiro. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2013. **Role of hypoxia and manganese in the differential tolerance of eucalyptus clones to shoot die-back in the Vale do Rio Doce.** Adviser: Roberto Ferreira de Novais. Co-advisers: Ivo Ribeiro da Silva and Wagner Luiz Araújo.

The physiological disorder shoot die-back of eucalyptus in the Vale do Rio Doce (SPEVRD) is characterized by brownish necrotic lesions at the point of insertion of secondary branches and petioles, resulting in intense defoliation and, in the most extreme cases, in plant death. Close correlations of this problem were observed with hypoxic environments (low redox potential) and excess Mn in groundwater. This study aimed to investigate the mechanisms involved in the differential tolerance of eucalyptus clones to SPEVRD and their relationship to hypoxia and excess Mn. Three experiments were conducted for this purpose: Experiment I - treatments arranged in a factorial 2 x 2 x 5 design, represented by two clones (1213 - SPEVRD-sensitive and 2719 - SPEVRD-tolerant); two O₂ concentrations in solution (normal - 8 mg L⁻¹ O₂ and hypoxic - 1 mg L⁻¹ O₂); and five Mn concentrations (0, 5, 10, 30, and 90 mg L⁻¹ MnCl₂ · 4H₂O). After the experiment, each plant was separated into old (mature) and new leaves, stem and roots, and oven-dried. These samples were ground and nitric/perchloric acid digested to determine Mn. Experiment II: The treatments consisted of a factorial 2 x 4 design, with: two clones - a sensitive (1213) and a tolerant (2719) and four O₂ concentrations in nutrient solution (1, 4, 6, and 8 mg L⁻¹ O₂). The root and shoot length were measured 0 and 21 days after the beginning of the experiment. After 14 days, some physiological properties were evaluated: photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, and internal CO₂ concentration. Then, samples were taken from the root apex for anatomical analyses. At the end of the experiment, the plants were harvested and separated into old and new leaves, stems, and roots and oven-dried. Subsequently, the samples were digested to determine the macro and micronutrient levels. Experiment III: The treatments were arranged in a factorial 2 x 2 x 2 design, with two eucalyptus clones - 1213 (sensitive) and 2719 (tolerant), two O₂ concentrations (normal - 8 mg L⁻¹ and hypoxic - 6 mg L⁻¹) and two Mn concentrations (30 and 300 mg L⁻¹). The length of the root system was measured 0, 2, 5, 10, 15, 18 and 27 days after the beginning of the experiment. The gain in shoot height and throughout the experimental period was measured at the beginning and the end (27 days) of the experiment. At the end of the experiment, before harvest, the ethylene emitted by plants was quantified. Then, the

seedlings were harvested and separated into old and young leaves, stems, and roots and oven-dried. We then determined the levels of macro and micronutrients. The hypoxic condition reduced the dry matter of the plant components, root growth and plant size. Most of these attributes were more affected in the sensitive clone 1213. Root growth was the best indicator of the stress caused by hypoxia; the growth of clone 1213 was most inhibited, while root growth inhibition was not influenced by Mn. The hypoxic condition caused the formation of aerenchyma in roots and increased ethylene in the shoots of both clones, mainly for the sensitive clone 1213. The tolerant clone 2719 responded faster to hypoxia than the sensitive clone (1213), reducing the stomatal opening and consequently the photosynthetic rate, transpiration and internal CO₂ concentration to lower values than of the sensitive clone 1213. Under hypoxic conditions and excess Mn, the sensitive clone (1213) showed symptoms of Mn toxicity, e.g., brownish necrosis and shriveling of young leaves, followed by loss of apical dominance. The O₂ deficiency in the root system is the first factor to predispose clones to SPEVRD, whereas Mn excess seems to have a long-term action until the eucalyptus die-back symptoms are fully expressed.

INTRODUÇÃO

O crescimento do setor florestal brasileiro vem direcionando o plantio de espécies florestais, especialmente do eucalipto, para regiões com classes de solos com limitações físicas e químicas, deixando as áreas de melhor qualidade para culturas agrícolas. Essas áreas com limitações ao crescimento do eucalipto vêm contribuindo, de maneira decisiva, para o aparecimento de distúrbios que antigamente não eram comuns.

Nas regiões de baixada do Vale do Rio Doce observa-se, por décadas, a ocorrência da Seca de Ponteiro de Eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD) (Ferreira, 1989). Esse mal causa perdas significativas de produtividade de povoamentos. Apesar da condução de inúmeros estudos e de avanços conseguidos até o momento, a causa do problema é ainda desconhecida. Embora seus sintomas se expressem principalmente na região apical, eles diferem visualmente daqueles da seca de ponteiro causados pela deficiência de B e, ou, Ca observados em povoamentos de eucalipto na região do Cerrado. Apesar de ter sido constatada inicialmente no Vale do Rio Doce, a ocorrência de danos causados pela SPEVRD tem sido observada em povoamentos de eucalipto em outros Estados no Brasil, em especial em regiões com alta incidência de chuvas e com tipos de solos que predispõem ao surgimento de condições de hipoxia.

Nos estádios iniciais de ocorrência do problema são observadas necroses amarronzadas na inserção de ramos secundários e pecíolos, especialmente na região abaixo da emissão de novos ramos. As folhas tornam-se coriáceas e encarquilhadas. Essas lesões evoluem rapidamente levando à morte da parte apical do ramo, comprometendo o crescimento da planta. Em condições mais severas ocorre à desfolha completa, culminando com a morte do ápice da planta (Ferreira, 1989; Leite et al., 2013). Segundo esses autores, a intensidade dos sintomas, parece estar ligada à idade do eucalipto, uma vez que são expressos até o terceiro e, ou, quarto ano de plantio; após este período, esse distúrbio tem seus sintomas pouco expressos. Isto acontece, provavelmente, pelo aumento do índice de área foliar quando o plantio se torna mais velho, possibilitando maior demanda transpiracional pelas plantas. Desse modo, a condição de hipoxia pode ser minimizada pelo aumento de fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera, reduzindo o estresse das plantas. Na região de baixada do Vale do Rio Doce, a SPEVRD tem aparecimento esporádico e ocorre com maior intensidade após estações de verão muito chuvosas, como nos anos de 2002 e 2007. Os danos visuais atingem o máximo por volta do mês de abril-maio (fim do período chuvoso),

mas ocorre recuperação de crescimento no final do período seco (agosto-setembro) (Leite et al., 2013).

Embora não se conheçam as causas que levam à incidência ou predisposição das plantas de eucalipto à SPEVRD, observações de campo têm indicado que, em anos de maior precipitação pluvial, ocorre elevação do lençol freático nas áreas de baixada, chegando a menos de 0,4 m de profundidade. Dessa forma, esse longo período de saturação do solo, combinado com sua elevada densidade – o que dificulta ainda mais a difusão dos gases – pode levar a condições de hipoxia na região do sistema radicular. Esse ambiente redutor causa a solubilização de óxidos e hidróxidos de Fe e Mn, tornando estes nutrientes disponíveis em teores tóxicos (Khabaz-Saberi et al., 2006). Além da alteração na disponibilidade de nutrientes, a hipoxia pode alterar, drasticamente, o sistema radicular, refletindo em modificações fisiológicas e anatômicas. Assim, acredita-se que a hipoxia associada aos elevados teores de Mn são os principais contribuintes para a completa expressão de sintoma da SPEVRD.

Hipoxia

Considerada como a primeira alteração abiótica a predispor os clones de eucalipto, de forma diferenciada, à SPEVRD, a hipoxia pode culminar em alterações no metabolismo dessas plantas, acarretando modificações fisiológicas e anatômicas de modo a levar à sobrevivência em condição de déficit de O₂, sendo que, para o eucalipto, existem evidências da tolerância diferencial à hipoxia de algumas espécies (Clemens et al., 1978; Blake & Reid, 1981). A adaptação dessas plantas passa, basicamente, pelo ajuste de seu metabolismo à menor disponibilidade de energia ao sistema radicular, ocorrendo queda drástica na respiração devido à redução da concentração de O₂, possibilitando, assim, que o sistema radicular passe a realizar o processo de fermentação como auxílio na produção de ATP. Para compreender como as plantas respondem ao excesso de água e, conseqüentemente, à hipoxia, deve-se focar, inicialmente, no sistema radicular, pois as condições limitantes são percebidas pelas raízes para então manter uma rota de transdução de sinais que levem a alterações morfológicas e fisiológicas. Ou seja, o estresse hipóxico deve ser convertido em uma resposta bioquímica (Dat et al., 2004). A hipoxia na região do sistema radicular faz com que as raízes não consigam manter o metabolismo aeróbio requerido na absorção de nutrientes, por exemplo. Nessas condições, as plantas produzem sinais metabólicos em resposta à diminuição na concentração endógena de O₂. Assim, ocorre alterações na arquitetura, anatomia,

metabolismo e crescimento como estratégia de sobrevivência (Bailey-Serres & Voeselek, 2008). Como consequência da diminuição na concentração de O₂, há regulação negativa do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), principal mecanismo gerador de esqueletos de C para a síntese de compostos do metabolismo secundário das plantas, de onde vêm os hormônios vegetais, como descrito por Visser & Voeselek (2004). Na falta de O₂, ocorre paralisação do ciclo do ácido cítrico bem como da cadeia transportadora de elétrons. Mediante essa situação, a glicólise é paralisada, devido à não regeneração do NAD⁺, importante para atuação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que atua sobre a triose fosfatada (gliceraldeído-3-fosfato), produzindo 1,3-bifosfoglicerato e uma molécula de NADH. No entanto, as plantas e outros organismos podem superar esse problema realizando a fermentação que oferece outra rota alternativa para o metabolismo do piruvato, diferente da que ocorre, normalmente, em presença de O₂ na sua metabolização pelo ciclo de Krebs (Taiz & Zeiger, 2009). No entanto, esse metabolismo aeróbio resulta em estresse severo para as plantas, sendo (i) redução na formação de ATP, (ii) declínio de pH do citosol e (iii) acúmulo de metabólitos tóxicos são os principais causadores desse estresse (Marschner, 2012).

Segundo George et al. (2012), o sistema radicular de várias espécies tem seu crescimento limitado imediatamente após início da hipoxia, podendo, em alguns casos, chegar à morte e, em contra partida, a parte aérea continua a crescer. A limitação em longo prazo do crescimento da parte aérea torna-se possível pelo acúmulo de nutrientes antes do período de hipoxia e, quando prolongado, a hipoxia limita a absorção de nutriente, causando danos ao crescimento também à parte aérea da planta (Trought & Drew, 1980). De acordo com Board (2008), a perda de rendimento na cultura da soja, sob condição de hipoxia, pode ser explicada pela redução na absorção de N. Isto acontece pela regulação negativa do gene responsável pela produção da proteína transportadora de N (Kreuzwieser & Gessler, 2010). Para o milho, a redução da oxigenação na raiz resulta em baixos teores de N, P e K na parte aérea (Atwell & Steer, 1990).

Como exposto, as adaptações bioquímicas (redução do metabolismo, fermentação, etc) são alguns mecanismos que as plantas possuem para tolerar a baixa disponibilidade de O₂ no sistema radicular. No entanto, as adaptações morfológicas como formação de aerênquima e raízes adventícias, por exemplo, são, também, de extrema importância para a manutenção do metabolismo aeróbio (Magalhães et al.,

2009). Grande parte dessas alterações nas plantas submetidas a estresse hipóxico é mediada pelo etileno. Hinz et al. (2010) mencionam que pesquisas recentes consideram o etileno como regulador de sinal em respostas à inundação. Algumas das respostas via etileno à hipoxia foram identificadas em arroz e caracterizadas em *Arabidopsis* (Licausi et al., 2010). Uma dessas modificações mediadas pelo etileno é a formação de aerênquima (Schenck, 1890). O aerênquima contém canais interligados permitindo a difusão de gases, de modo a manter a respiração aeróbia e a oxigenação da rizosfera, estocando e distribuindo O₂ nos tecidos das plantas (Shannon et al., 1996; Colmer, 2003). A formação de aerênquima foi evidenciada em raízes do milho Saracura- BRS 4154, devido ao aumento na atividade da celulase (Kawase, 1972, 1974; Drew et al., 1989), sendo a produção destas enzimas induzida pelo aumento na concentração de etileno em condição de hipoxia. Van der Moezel et al. (1989), estudando *E. camaldulensis* após 11 semanas de alagamento, observaram formação de aerênquima no sistema radicular das plantas.

Em condição de estresse, tais como geada, inundação e estresse mecânico, por exemplo, a síntese de etileno é elevada (Taiz & Zeiger, 2006). Isto acontece devido à expressão de genes que regulam a síntese de etileno ser intensificada em condição de hipoxia (Van der Straeten et al., 1997; Peng et al., 2005; Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Clemens & Pearson (1977), estudando *E. robusta*, observaram que em raiz e ramos houve a duplicação na taxa de produção de etileno em seis dias de hipoxia, porém sem influência na produção desse hormônio pelas folhas. Segundo Taiz & Zeiger (2006), na cultura do tomateiro, a condição de encharcamento acentua a produção de etileno na parte aérea, culminado na epinastia das folhas. Segundo esses autores, o estresse hipóxico é percebido pelo sistema radicular e um sinal, o precursor do etileno, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), é produzido e exportado para a parte aérea via xilema, onde é convertido em etileno, desencadeando uma série de respostas na parte aérea da planta.

Manganês

O estudo dos teores elevados de Mn em povoamento de eucalipto em áreas de ocorrência da SPEVRD pode facilitar o entendimento da contribuição deste micronutriente para o aparecimento de tal distúrbio. Os teores foliares de Mn chegam a ser aproximadamente cinco vezes maiores no clone sensível (3.070 mg kg⁻¹) do que no clone mais tolerante (734 mg kg⁻¹) à SPEVRD (Leite et al., 2013). Teores muito

elevados de Mn no clone mais suscetível podem causar distúrbios metabólicos, tais como redução na respiração, distúrbio no metabolismo do N e da síntese de proteínas, e redução do conteúdo de clorofila e atividade fotossintética (El-Jaoual & Cox, 1998; Demirevska-Kepova et al., 2004; Dat et al., 2004). No entanto, não se sabe se esses teores de Mn no clone mais sensível à SPEVRD são suficientemente elevados para causar danos ao metabolismo e crescimento das plantas e, adicionalmente, se o excesso de Mn é causa ou apenas efeito de mecanismos de tolerância menos eficientes nos clones mais sensíveis à SPEVRD. De fato, a menor tolerância ao Mn pode resultar da menor restrição de sua absorção e, ou, translocação para a parte aérea, ou de sua ineficiente inativação dentro dos tecidos da planta. Lidon & Teixeira (2000) afirmam que, dependendo da espécie, o excesso de Mn pode ser acumulado no vacúolo, na parede celular e nos tilacóides, sugerindo, assim, maior tolerância a altos teores de Mn disponível em algumas espécies. Ainda, plantas submetidas à elevada intensidade luminosa ou elevada temperatura são mais predispostas à toxidez por Mn (El-Jaoual & Cox, 1998). Esses fatores são de grande importância em região de baixada, sujeita a alagamento, onde ocorre com maior frequência a SPEVRD. Nessas condições, as temperaturas mais elevadas são observadas ao longo de praticamente todos os meses do ano.

O Mn atua, principalmente, como co-fator enzimático, apresentando, também, participação na fase fotoquímica da fotossíntese, especificamente no complexo de evolução de O₂ (Malavolta et al., 1997), reação responsável pela fotólise da molécula de água. Para Zanão Júnior et al. (2010), a toxidez por Mn é mais severa na parte aérea, especificamente nos ramos novos, do que no sistema radicular, devido seu acúmulo em altos teores em folhas, deixando, assim, este compartimento da planta propenso a teores tóxicos de Mn. Isso corrobora com o observado à campo, em que clones mais sensíveis a SPEVRD acumulam maiores teores de Mn na parte aérea.

O sintoma comum de toxidez por Mn é característico em folhas, sendo que as folhas mais velhas apresentam manchas escuras com as bordas com aspecto clorótico e as mais novas tornam-se murchas com clorose interneval e ao longo da margem. (El-Jaoual & Cox, 1998). Horst & Marschner (1978) e Wu (1994) sugerem que manchas necróticas marrons são comuns em folhas, pecíolos e caules diagnosticando, assim, a toxidez por Mn. Essas manchas podem aumentar em número e tamanho, levando a folha ao escurecimento e à morte (Elamin & Wilcox, 1986a, b). Na cultura da macieira, em condição de deficiência de O₂, o sintoma caracteriza-se pela rachadura da casca do

tronco e galhos secundários (Ernani, 2009), semelhante, em parte, com sintoma da SPEVRD. Winterhalder (1963), estudando espécies nativas australianas como o *E. gummifera*, verificou que a toxidez por Mn foi evidenciada pela presença de folhas pequenas e com aspecto clorótico, sendo que, em alguns casos, apresentavam-se retorcidas (encarquilhadas) e, em casos extremos, com a morte do tecido apical.

De acordo com Zanão Júnior et al. (2010), as plantas geralmente apresentam teores foliares de Mn variados de acordo com a espécie. Teores de Mn de 30-500, 10-20 e 200-5300 mg kg⁻¹ são considerados normais, deficientes e tóxicos, respectivamente (Edwards & Asher, 1982; Clarkson, 1988). Essa variação quanto a teores de Mn em folhas depende da espécie, genótipo, condições ambientais (luz, pH, temperatura, umidade e fonte de N) e da interação nutricional de Mn com Ca, Mg, Fe, P, Mo e Si (El-Jaoual & Cox, 1998). Além disso, a toxidez por Mn pode ser acompanhada pela deficiência de Ca, Mg, Fe (Horst, 1988) e Zn (De Varennes et al., 2001), intensificando assim os distúrbios nas plantas.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo compreender os mecanismos envolvidos na tolerância diferencial de clones de eucalipto ao excesso de Mn e à hipoxia e sua relação com a SPEVRD.

MATERIAL E MÉTODOS

Três experimentos foram conduzidos no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa em câmara de crescimento. As mudas de eucalipto utilizadas, produzidas por mini-estaquia pelo viveiro da CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira S.A.), Belo Oriente - MG. Os clones empregados foram 1213 e 2719, sendo estes híbridos entre as espécies *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* (*Eucalyptus urograndis*). A opção por estes clones deve-se ao fato de observações de campo indicarem que o primeiro é mais susceptível à seca de ponteiro (Leite et al., 2013).

Com 25-30 dias de idade as mudas foram trazidas da CENIBRA para casa de vegetação. Após cinco dias de aclimação nos tubetes originais, elas foram removidas do substrato, lavadas com água deionizada e transferidas para bandejas de 10 L contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) modificada, com metade da concentração da solução original e na ausência de Mn. As soluções foram continuamente aeradas e o pH mantido em 5,0 por adições de ácido ou base (NaOH,

HCl à $0,01 \text{ mol L}^{-1}$). As plantas permaneceram nas bandejas por cinco dias, em condições de casa de vegetação e, então, foram transferidas para câmara de crescimento.

Os clones foram mantidos em condições de iluminação controlada por lâmpadas halógenas ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), com fotoperíodo dia/noite de 12/12 h. A temperatura foi controlada em $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e a umidade relativa mantida em torno de 70 %.

Experimento I: Efeito de hipoxia e de concentrações crescentes de Mn

Neste experimento, mudas de eucalipto (clones 1213 e 2719) já aclimatadas à solução nutritiva, foram transferidas para a câmara de crescimento em recipientes plásticos de 3,4 L, onde permaneceram em solução nutritiva de Clark com metade da concentração da solução original, na ausência de Mn, por cinco dias e, após esse período, a aclimação foi em solução de Clark com concentração normal, exceto para Mn que continuou em sua ausência. Foi utilizada uma planta por recipiente.

Os tratamentos foram arrançados em um esquema fatorial $2 \times 2 \times 5$, consistindo de dois clones – um sensível (1213) e outro tolerante (2719) à SPEVRD; duas concentrações de O_2 em solução – normal (8 mg L^{-1} de O_2) e hipoxia (1 mg L^{-1} de O_2), e cinco concentrações de Mn ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) – 0, 5, 10, 30 e 90 mg L^{-1} . Os tratamentos foram dispostos em um delineamento em blocos casualizados com quatro repetições.

A solução nutritiva foi trocada semanalmente e o pH foi ajustado diariamente para 5,0. As plantas foram cultivadas nessas condições por um período de 25 dias. Para evitar o escurecimento e estimular o crescimento radicular foram aplicados $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al (Silva et al., 2004). O O_2 dissolvido, em cada tratamento, foi medido com oxímetro, sendo a leitura realizada quatro vezes ao dia. Nos tratamentos com hipoxia, a baixa concentração de O_2 foi mantida por meio de injeção contínua de N_2 (Air Products) na solução de Clark.

Ao fim da condução do experimento, aos 25 dias da transferência para a câmara de crescimento, cada planta foi separada em folhas velhas (maduras), novas, caule e raiz, lavadas três vezes em água deionizada, e secas em estufa ($65 \text{ }^\circ\text{C}$). Depois de secas, as amostras foram passadas em moinho tipo Wiley. As amostras foram submetidas à digestão nítrico-perclórica na proporção 4:1 v/v, segundo o método descrito por Malavolta et al. (1989) e, posteriormente, determinado o teor de Mn por espectrofotometria de absorção atômica.

Experimento II: Efeito de hipoxia no sistema radicular e na parte aérea

As mudas já aclimatadas à solução nutritiva foram transferidas para câmara de crescimento em recipientes de plástico de 3,4 L. As mesmas permaneceram em solução nutritiva de Clark com a concentração de 30 mg L⁻¹ de Mn (MnCl₂.4H₂O) definida com base no experimento I.

Os tratamentos consistiram de um esquema fatorial 2 x 4, sendo: dois clones, um sensível (1213) e outro tolerante (2719) à SPEVRD e quatro doses de O₂ dissolvido na solução nutritiva - 1, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ de O₂. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições. Os tratamentos com O₂ foram controlados pelo borbulhamento contínuo de N₂ na solução nutritiva, sendo o O₂ dissolvido, em cada tratamento, medido com oxímetro. Foram aplicados 100 µmol L⁻¹ de Al³⁺ para estimular o enraizamento das mudas (Silva et al., 2004).

O comprimento do sistema radicular e parte aérea foram medidos no início (0 dias) e ao final do experimento (21 dias após a transferência das mudas para a câmara de crescimento). Ao final de 14 dias, foram mensurados a fotossíntese, condutância estomática, transpiração, concentração interna de CO₂, sob luz saturante artificial (1400 µmol m⁻² s⁻¹) e concentração atmosférica de CO₂ controlada (390 µmol mol⁻¹), por meio de analisador de fotossíntese Li-Cor LI-6400XT, IRGA. As medições foram realizadas entre 7:00 e 11:00 h. Em seguida, na mesma data, para a verificação de possível modificação anatômica em tecidos radiculares, foram tomadas amostras de raízes. De cada raiz selecionada, um fragmento a partir do ápice com 4±0,5 cm (Melo et al., 2007), foi fixado em FAA 50 por 48 h e, posteriormente, armazenado em álcool 70 % para análise (Johansen, 1940). Nesses fragmentos de raízes foram feitos cortes transversais em micrótomo rotativo de avanço automático (*Leica RM 2125*). Os cortes foram então corados com azul de toluidina (Feder & O'Brien, 1968) e montadas em resina sintética *Permout*, sendo fotografadas com auxílio de um fotomicroscópio (*Olympus AX 70*), utilizando o programa *axion vision 4.8*. As análises quantitativas da anatomia de raiz foram mensuradas com auxílio do programa *Image Pro Plus*.

Em seguida, aos 21 dias, as plantas foram colhidas e separadas em folhas velhas, novas, caule e raiz e secas em estufa (65 °C). Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão nítrico-perclórica na proporção 4:1 v/v, segundo Malavolta et al. (1989). O P foi determinado pelo método do ácido ascórbico; K, por fotometria de

emissão de chama; e Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, e Cu por espectrofotometria de absorção atômica.

Experimento III: Efeito de hipoxia e toxidez de Mn

Após aclimação em solução nutritiva de Clark com metade da concentração da solução original e na ausência de Mn, em câmara de crescimento, foram aplicados os tratamentos. Esses consistiram de um esquema fatorial 2 x 2 x 2, sendo os dois clones de eucalipto – 1213 e 2719; duas concentrações de O₂ – normal (8 mg L⁻¹) e hipoxia (6 mg L⁻¹), e duas concentrações de Mn – 30 e 300 mg L⁻¹ (definidas com base nos resultados dos experimentos I e II). Durante o período experimental utilizou-se solução de Clark equivalente a uma concentração da solução original, a qual era trocada semanalmente. O ensaio foi conduzido com oito repetições em delineamento em blocos casualizados. Para manter o crescimento radicular foram aplicados 100 µmol L⁻¹ de Al³⁺ (Silva et al., 2004). O O₂ dissolvido em cada tratamento foi medido com oxímetro quatro vezes ao dia.

O comprimento do sistema radicular foi medido nos tempos 0, 2, 5, 10, 15, 18 e aos 27 dias de condução do experimento. A parte aérea foi mensurada somente nos tempos 0 e 27 dias. Ao final do experimento, antes da colheita, cada unidade experimental foi colocada dentro de uma campânula de vidro, isolada do meio externo. Cada planta permaneceu na campânula por 20 min, sob homogeneização da atmosfera com um mini circulador de ar. Após esse período foram retiradas amostras, em quatro replicatas por repetição, da atmosfera interna do recipiente para quantificação do etileno emitido pelas plantas. A dosagem do etileno foi realizada em cromatógrafo gasoso equipado com coluna Porapak Q e detector de ionização de chama.

Em seguida, aos 27 dias, as mudas foram colhidas, sendo as plantas separadas em folhas maduras, novas, caule e raiz, lavadas três vezes em água deionizada e secas em estufa (65 °C). Depois de secas, as amostras foram passadas em moinho tipo Wiley e posteriormente foram submetidas à digestão nítrico-perclórica na proporção 4:1 v/v, segundo o método descrito por Malavolta et al. (1989). O P foi determinado pelo método do ácido ascórbico, K, por fotometria de emissão de chama e Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, e Cu por espectrofotometria de absorção atômica.

Análises estatísticas

Os dados dos três experimentos referentes à produção de matéria seca das plantas, teor de Mn nos componentes da planta e concentração de etileno foram submetidos à análise de variância. Posteriormente, realizou-se o desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos e, por meio de regressões, no experimento I avaliaram-se o efeito das concentrações de Mn na produção de matéria seca vegetal, teor, crescimento da parte aérea e diâmetro basal do caule para os dois clones. No experimento II, após desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos, avaliou-se o efeito das concentrações de O₂ dissolvido em solução nutritiva na produção de matéria seca vegetal, no crescimento radicular, no teor de nutrientes, nos atributos fisiológicos e quantitativos anatômicos para os dois clones. No experimento III foi avaliado, por meio de regressão, o efeito da hipoxia e da concentração de Mn no crescimento radicular diário para ambos os clones, e por meio de testes de médias o mesmo efeito no crescimento da parte aérea, da altura, do diâmetro, da concentração de etileno e do crescimento radicular. Para a avaliação do efeito dos clones aplicou-se teste de identidade de modelos comparando as regressões. Foi adotado o nível de significância de até 10 %. Utilizou-se para o processamento dos dados o programa estatístico SAEG versão 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Efeito de hipoxia e de concentrações crescentes de Mn

Matéria seca dos componentes das plantas

Durante o período experimental, não foram observados sintomas visuais de deficiência nutricional induzida pelos tratamentos, mas o efeito no crescimento das raízes foi evidente. De maneira geral, ambos os clones apresentaram menor produção de matéria seca em condição de hipoxia (Figura 1), mostrando-se bastante sensíveis a esta condição. Certamente, o fator mais importante para que isto ocorra é a menor oferta de energia para o crescimento das plantas em condição de hipoxia. Nessas condições, as plantas reduzem o metabolismo, absorvendo e transportando menos nutrientes para a parte aérea (George et al., 2012), reduzindo também o transporte de água, hormônios e outros solutos via fluxo de massa (Jackson et al., 1996; Grichko & Glick, 2001). Tanto para matéria seca de raiz (Figura 1h), bem como para matéria seca de folha velha e nova

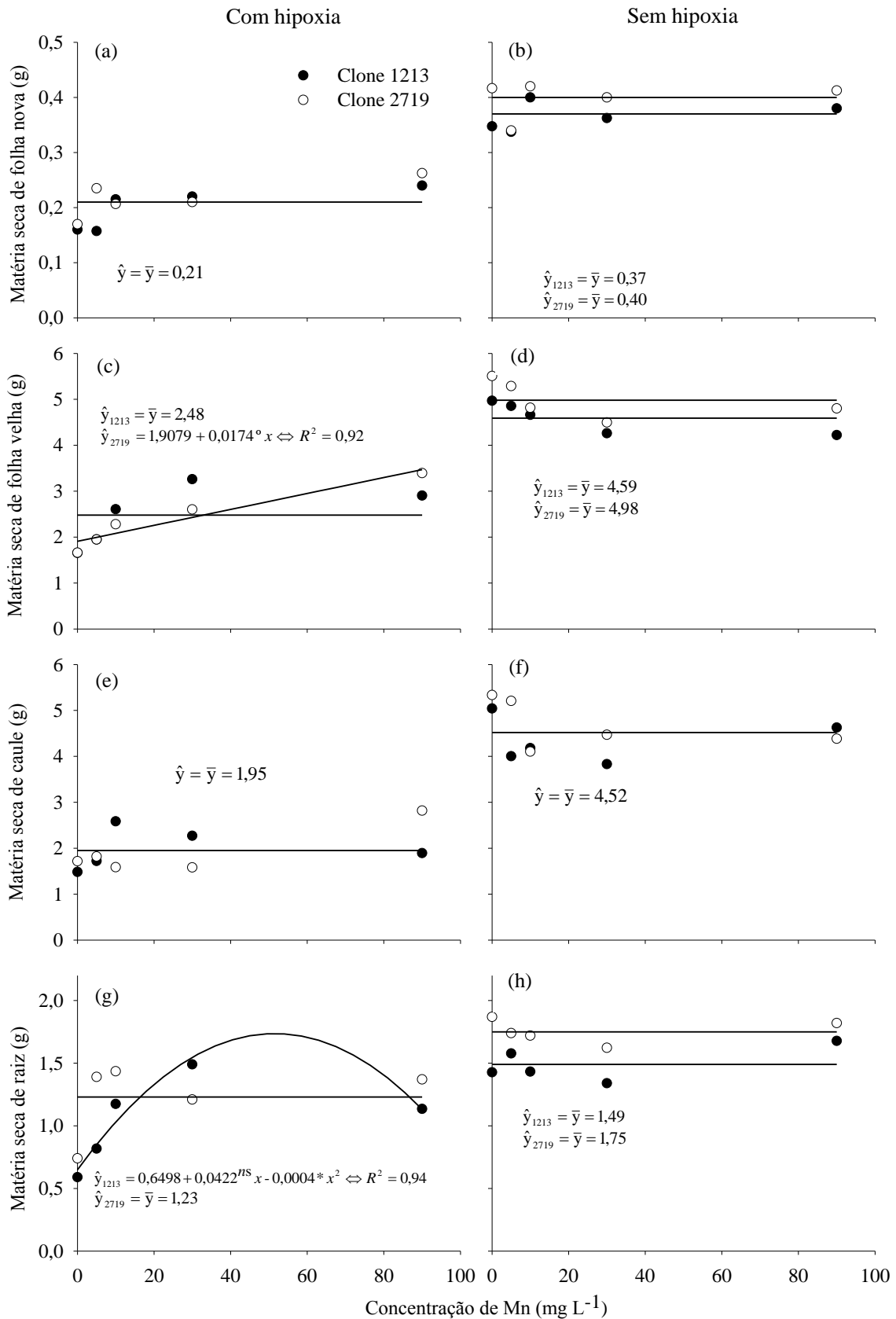


Figura 1. Produção de matéria seca de folha nova (a, b) e velha (c, d), caule (e, f) e de raiz (g, h) em mudas de eucalipto (clones 1213[®] e 2719[®] CENIBRA S.A.) influenciados pelas concentrações de Mn e O₂, aos 25 dias. ^{ns}, °, *: não significativo, significativo a 10 e 5 %, respectivamente, pelo teste F. A matéria seca de folha nova (a) e caule (e, f) não apresentou diferença entre clones a 10 % pelo teste F.

(Figura 1b e 1d), sob condição normal de oxigenação, o clone 2719 (tolerante) mostrou-se superior, sendo que apenas para matéria seca de caule não foi constatada diferença entre clones. Porém, nessa condição ambos os clones não foram alterados pelas concentrações de Mn. O mesmo não foi observado em condição de hipoxia. A matéria seca de folha velha (Figura 1c) do clone tolerante (2719) respondeu linear e positivamente ao incremento de Mn em solução, sendo observado para o sistema radicular do clone 1213 resposta quadrática ao Mn. Da mesma forma, as concentrações de Mn não influenciaram o acúmulo de matéria seca de caule e de folha nova sob condição de hipoxia e também não foi observada diferença entre clones.

A ausência de diferenças quanto à redução de matéria seca quando os clones são expostos ao excesso de Mn evidencia que são necessárias concentrações superiores às estudadas, uma vez que um dos primeiros sintomas de toxidez de Mn é a redução na produção de matéria seca ou de qualquer outro fator de crescimento. Zabini et al.(2007), avaliando a tolerância ao excesso de Mn em progênies de cafeeiro arábica (*Coffea arabica* L.), observaram que elas comportavam-se de maneira diferente, apresentando ou não redução de crescimento, evidenciando, assim, o suposto efeito tóxico do Mn. Segundo Marschner (1995), este efeito tóxico pode ser induzido pela deficiência de outros nutrientes, como de Fe e Mg pela inibição da absorção ou competição em nível celular, e pela deficiência de Ca pelo efeito indireto no seu transporte para as folhas novas.

O efeito da hipoxia acentuada foi drástico, ocorrendo o intenso escurecimento do sistema radicular nas plantas (Figura 2C e 2D). A longo prazo, a altura da parte aérea de ambos os clones foi reduzido em condição de hipoxia (Figura 2A e 2B). Um fato interessante é a observação de que mesmo sob condições de oxigenação normal, o sistema radicular do clone 1213 (sensível) parecia se adaptar-se a hipoxia mais desfavoravelmente que aquele do clone 2719 (tolerante).

Teor de Mn

Os teores de Mn nas folhas novas e velhas, no caule e raízes de ambos os clones, sob condição de hipoxia ou não, aumentaram com os incrementos da concentração de Mn em solução nutritiva (Figura 3).

A despeito da ausência de sintomas visuais de deficiência, teores foliares de Mn tão baixos quanto 59 mg kg^{-1} foram observados nas folhas novas quando na ausência de suprimento deste nutriente. Apesar das diferenças na eficiência de absorção de Mn entre

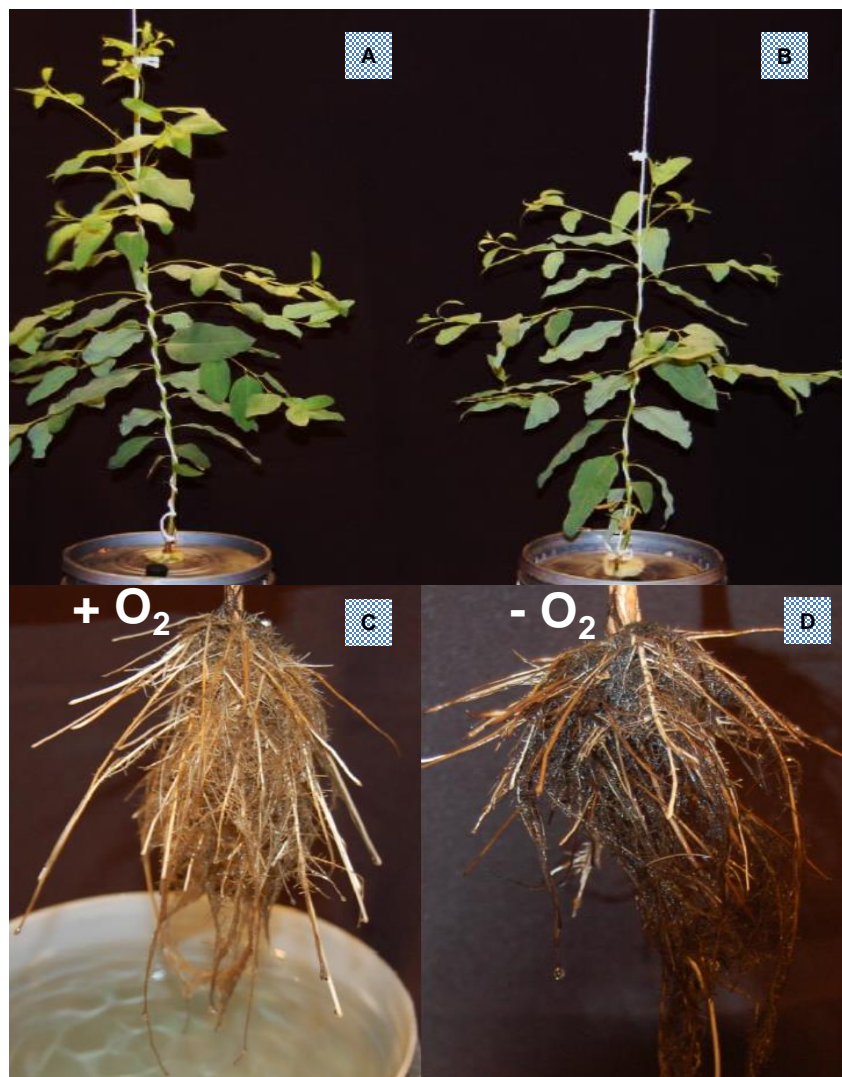


Figura 2. Detalhe da parte aérea e do sistema radicular do clone sensível (1213) à SPEVRD submetido à condição normal de oxigenação (+ O₂) (A e C) e à hipoxia acentuada (- O₂) (B e D).

clones, os teores de Mn considerados deficientes são semelhantes, variando entre 10 e 20 mg kg⁻¹, como observados por certos autores (Edwards & Asher, 1982; Clarkson, 1988) em folhas completamente expandidas, independente de espécie, cultivar e ambiente (Broadley et al., 2012). Por outro lado, teores maiores que 8.000 mg kg⁻¹ foram observados nas folhas velhas na condição de hipoxia e concentração mais alta de Mn (Figura 3c), para ambos os clones, bem como para o clone 1213 (sensível) em condição de oxigenação normal (Figura 3d). Esses valores estão bem acima do nível crítico foliar que é de 400-500 mg kg⁻¹ de Mn para eucalipto (Winterhalder, 1963; Gonçalves et al., 1996). Na cultura da soja, Fageria (2001) observou sintoma de toxidez por Mn para teor foliar de 720 mg kg⁻¹ de Mn, sendo que a toxidez por Mn pode ocorrer em raízes logo após ter sido observada em folhas (Foy, 1976; Foy et al., 1978).

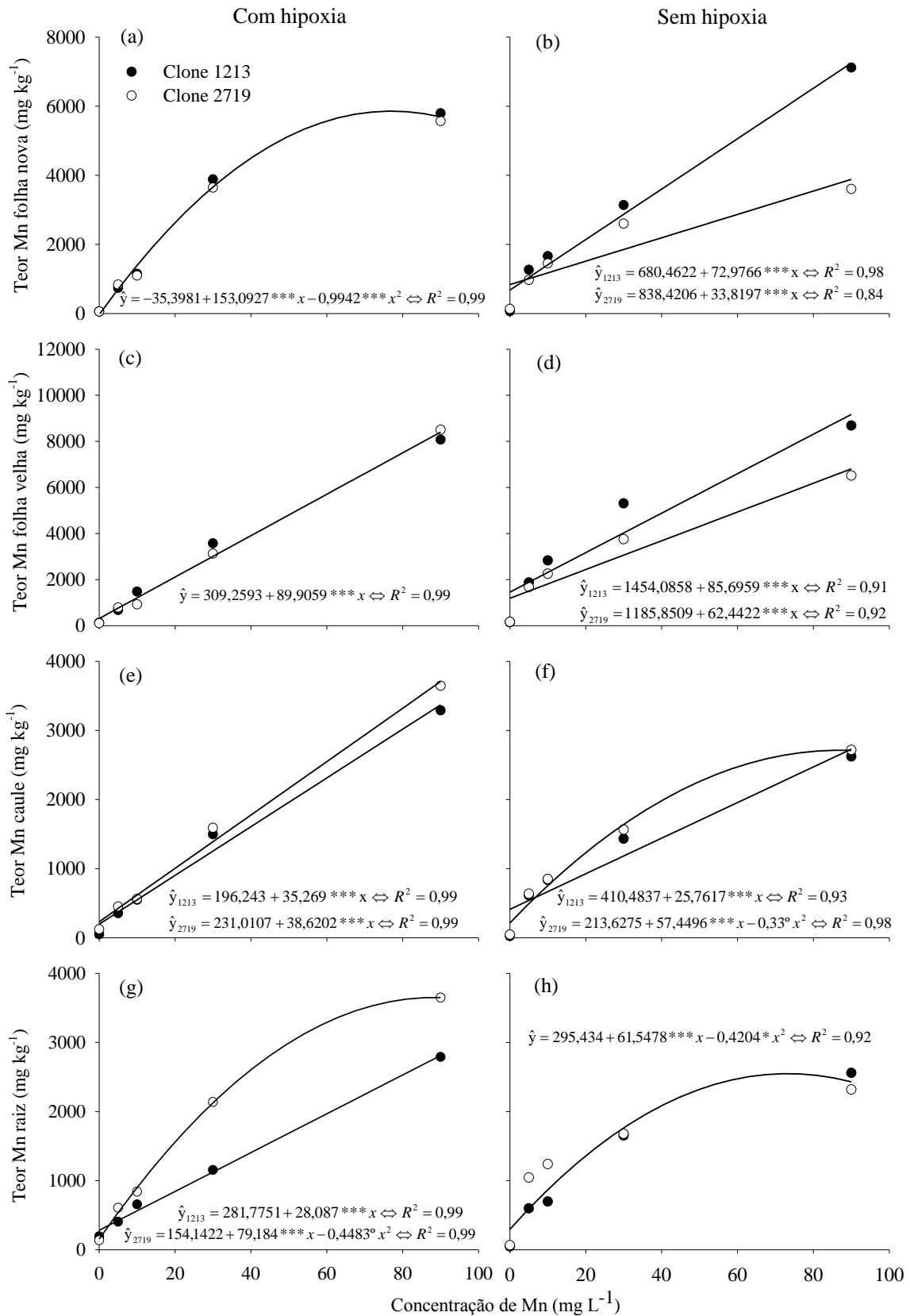


Figura 3. Teores de Mn em folhas novas (a, b) e velhas (c, d), caule (e, f) e raiz (g, h) em mudas de eucalipto (clones 1213[®] e 2719[®] CENIBRA S.A.) influenciados pelas concentrações de Mn e O₂, aos 25 dias. °, *, ***: significativo a 10, 5 e 0,1 %, respectivamente, pelo teste F. Teste de identidade de modelos a 10 % exemplifica em (a), (c) e (h) modelo estimado de acúmulo de Mn similares para ambos os clones.

Algumas espécies de eucalipto comportam-se de maneira diferente quanto ao excesso de Mn. O *E. gummifera* é altamente sensível ao excesso de Mn no solo, enquanto o *E. saligna* é capaz de absorver grandes quantidades deste micronutriente sem mostrar sintomas de toxidez (Winterhalder, 1963).

Apesar dos altos teores de Mn encontrados nos clones, o sintoma característico de toxidez não foi evidenciado como descrito por Winterhalder (1963) em eucalipto e sugerido por Horst & Marschner (1978) e Wu (1994). Tal fato pode ser explicado pelo tempo de exposição aos tratamentos a que os clones foram submetidos, apenas 25 dias, e, ou, pela concentração máxima de Mn (90 mg L^{-1}) não ter sido suficiente para a expressão dos sintomas de toxidez por Mn. Além disso, o excesso de Mn pode acumular-se em vacúolo (Foy et al., 1978; McCain & Markley, 1989; Marschner, 1995), parede celular (Menon & Yatazawa, 1984), tilacóides (Lidon & Teixeira, 2000) e complexo de Golgi (Hughes & Williams, 1988), sugerindo que mesmo com elevados teores, este nutriente pode estar inativado na planta, minimizando os efeitos negativos para seu crescimento e desenvolvimento.

Observou-se diferença entre os clones em relação aos teores de Mn foliares apenas na condição de oxigenação normal, sendo que o clone sensível à SPEVRD (1213) apresentou teores mais elevados (Figura 3b e 3d). Na condição de hipoxia, ficou evidente, maior acúmulo de Mn no clone 2719 (tolerante) nas raízes (Figura 3g) e no caule (Figura 3e). Assim, esperar-se-iam menores teores foliares de Mn neste clone (menor translocação desse micronutriente) podendo este ser um mecanismo de adaptação. Porém, este fato não foi observado. Uma possível causa pode estar relacionada com a intensa oxidação e redução de atividade metabólica das raízes, uma vez que em condição de hipoxia esse compartimento da planta foi o primeiro a ser alterado negativamente (Figura 2D). Além disso, a intensidade da hipoxia aplicada pode ter sido muito severa.

Experimento II: Efeito de hipoxia no sistema radicular e na parte aérea

Matéria seca e crescimento radicular

Com exceção de matéria seca de folha nova, todos os indicadores de crescimento foram sensíveis à condição de déficit de O_2 , apresentando redução já em condição de ligeira deficiência de O_2 (6 mg L^{-1}) (Figura 4). Situação similar foi observada para *E.*

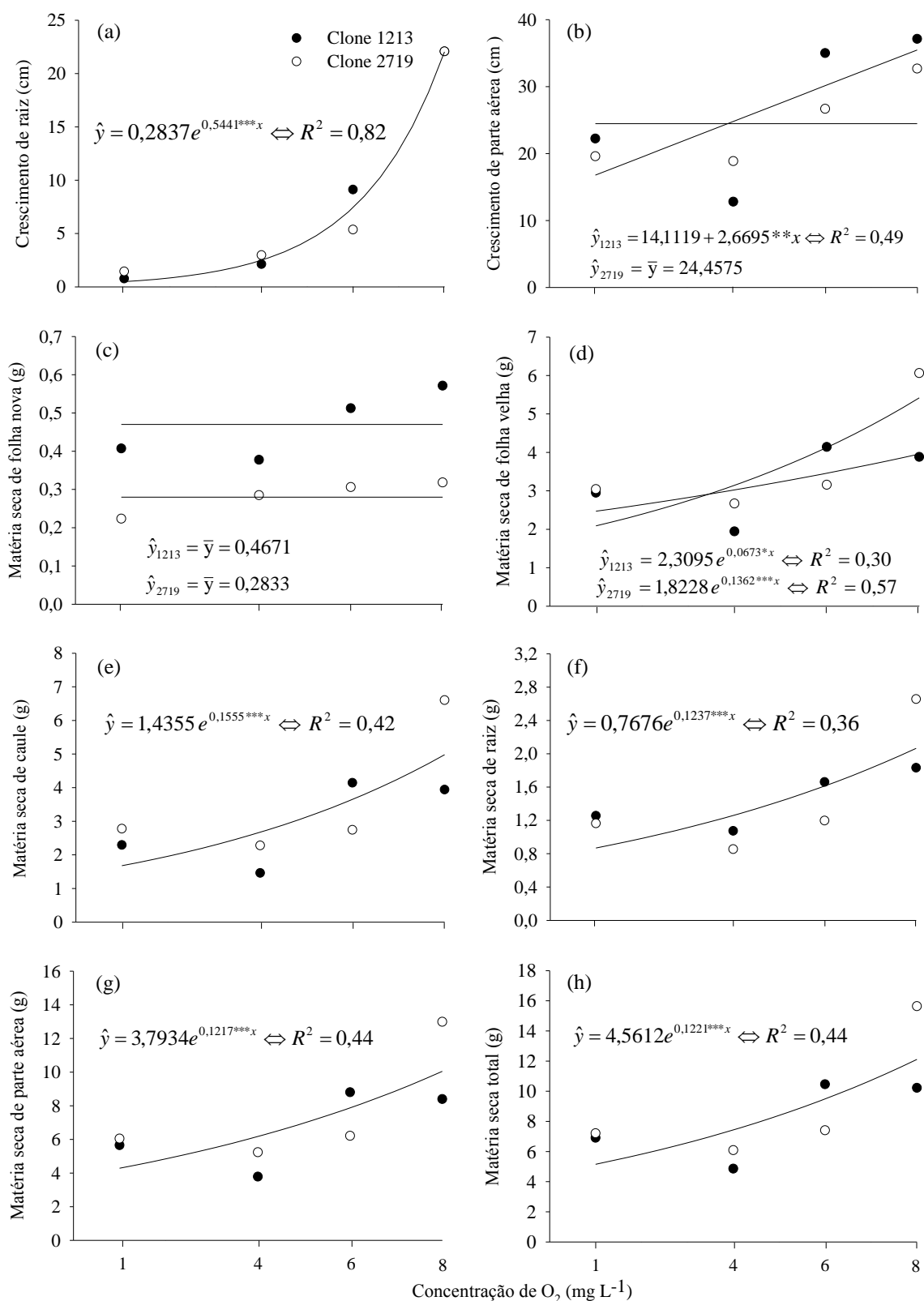


Figura 4. Crescimento de raiz (a) e de parte aérea (b), matéria seca de folha nova (c), folha velha (d), caule (e), raiz (f), parte aérea (g) e total (h) em mudas de eucalipto (clones 1213[®] e 2719[®] CENIBRA S.A.) influenciados pelas concentrações de O_2 aos 21 dias. *, **, ***: significativo a 5, 1 e 0,1 %, respectivamente, pelo teste F. Teste de identidade de modelos a 10 % exemplifica em (a), (e), (f), (g) e (h) modelo estimado de crescimento similares para ambos os clones.

camaldulensis e *E. globulus*, em que a hipoxia causou a redução da produção de matéria seca de todos os compartimento da planta (Sena Gomes & Kozlowski, 1980).

O crescimento radicular mostrou-se o mais influenciado por esta condição de estresse (Figuras 4a e 5), sendo que uma pequena redução na disponibilidade de O₂ acarretou grande redução no crescimento do sistema radicular, em até 70 % para ambos os clones. Certamente, isto ocorre pela menor produção de ATP em função das menores taxas de respiração e, ou, pelo processo de fermentação. A fermentação é um processo pouco eficiente para produção de ATP se comparado com a respiração, com menor produção de energia pela fermentação para o metabolismo da planta (George et al., 2012).

O efeito da hipoxia no sistema radicular foi relatado em alguns estudos. Rocha et al. (2010), estudando *Lotus japonicus*, Medri et al. (1998), em *Peltophorum dubium*, e Kozlowski (1984), em plantas lenhosas, observaram que o crescimento radicular destas plantas era influenciado negativamente pela condição de déficit de O₂. Já em casos mais extremos, por exemplo, na ausência de O₂ (anoxia), pode ocorrer à morte do sistema radicular. Subbaiah et al. (2000) observaram que o sistema radicular do milho não pode sobreviver por mais que 48 h na ausência de O₂. Tais afirmações corroboram com o encontrado neste estudo.

Em elevada condição de hipoxia (1 mg L⁻¹ de O₂), ambos os clones apresentaram escurecimento intenso do sistema radicular, sugerindo baixa atividade ou até mesmo sua morte (Figura 5). Por outro lado, a parte aérea parece suportar mais essa condição. Nessa condição, o acúmulo de metabólitos tóxicos como lactato e, ou, etanol, o declínio do pH citosólico (George et al., 2012) e a maior produção de espécies reativas de O₂ (Bai et al., 2010) são intensos, culminando com a perda de integridade das células, evidenciado pelo escurecimento de todo o tecido radicular.

Com relação ao crescimento de parte aérea, ambos os clones foram alterados pela concentração de O₂ (Figura 5), ocorrendo resposta positiva para tal característica com o aumento na disponibilidade de O₂. No entanto, não houve ajuste de equação para o clone tolerante (2719) (Figura 4b), para o qual sugere-se que o período da hipoxia não foi suficiente para converter o estresse sofrido no sistema radicular para a parte aérea. O contrário foi observado para o clone mais sensível (1213). George et al. (2012) afirmam que o sistema radicular de algumas espécies cessam seu crescimento imediatamente após o início da hipoxia, podendo chegar à morte após alguns dias; por outro lado, a parte aérea mantém seu crescimento, reduzindo-o apenas a longo prazo. Isto é possível



Figura 5. Crescimento da parte aérea e sistema radicular dos clones 1213[®] e 2719[®] CENIBRA S.A., sendo o primeiro da esquerda para direita o clone 1213[®], frente concentração decrescente de O₂. Os valores numéricos representam as concentrações de O₂ (mg L⁻¹) em solução nutritiva de Clark.

devido ao estoque de nutriente que a parte aérea acumulou antes ao período de estresse.

Em condição de hipoxia, os genes que regulam a expressão de proteínas transportadoras de nutrientes tem sua expressão reduzida (Kreuzwieser & Gessler, 2010), ocorrendo a redução na absorção de nutrientes pelas raízes e seu transporte para a parte aérea (Armstrong & Drew, 2002). Em milho, a falta de O₂ no sistema radicular resulta em menores teores de N, P e K na zona de alongação da parte aérea, resultando em declínio no crescimento (Atwell & Steer, 1990). O presente estudo compartilha com tais afirmações e indica maior sensibilidade do clone sensível (1213) em condição de hipoxia.

Em relação à diferença entre clones, o tolerante (2719) mostrou-se superior em produção de matéria seca de folha velha em condição de hipoxia branda (Figura 4d). Porém, em condição de intensa hipoxia foi observado o inverso. A matéria seca de folha nova não foi alterada pela concentração de O₂. No entanto, o clone sensível (1213) apresentou maior crescimento de folha nova. Com relação às demais características de crescimento, não foram obtidas diferenças entre clones ($p > 0,10$).

Teores de nutrientes

Os teores de Mn em folhas velhas foram influenciados pela concentração de O₂, apresentando incremento com o acréscimo da oxigenação para ambos os clones (Figura 6a). Além disso, o clone tolerante (2719) apresentou maiores teores em relação ao clone sensível (1213), porém com maior redução no teor de Mn ao se aproximar da condição de intensa de hipoxia (1 mg L⁻¹ de O₂). Apesar de os teores de Mn na folha nova não apresentarem influência da concentração de O₂, mais uma vez, os teores de Mn foram superiores no clone tolerante (2719) (Figura 6b). Tal observação contraria o observado em campo, na qual o clone sensível (1213) acumula maiores teores de Mn na parte aérea da planta (Leite et al., 2013). Porém, deve-se salientar que os teores foliares de Mn são ligeiramente superiores e, em contra partida, os valores observados em campo são até cinco vezes maiores para o clone sensível à SPEVRD. Talvez, como foram utilizadas concentrações intermediárias de Mn (30 mg L⁻¹), não foi possível verificar o mesmo efeito ocorrido no campo.

Como era de se esperar, o contrário foi observado nas raízes e caule (Figura 6c e 6d), para os quais o clone sensível (1213) acumulou maiores teores de Mn. A tolerância ao excesso de Mn, assim como de outros micronutrientes metálicos, em diversas

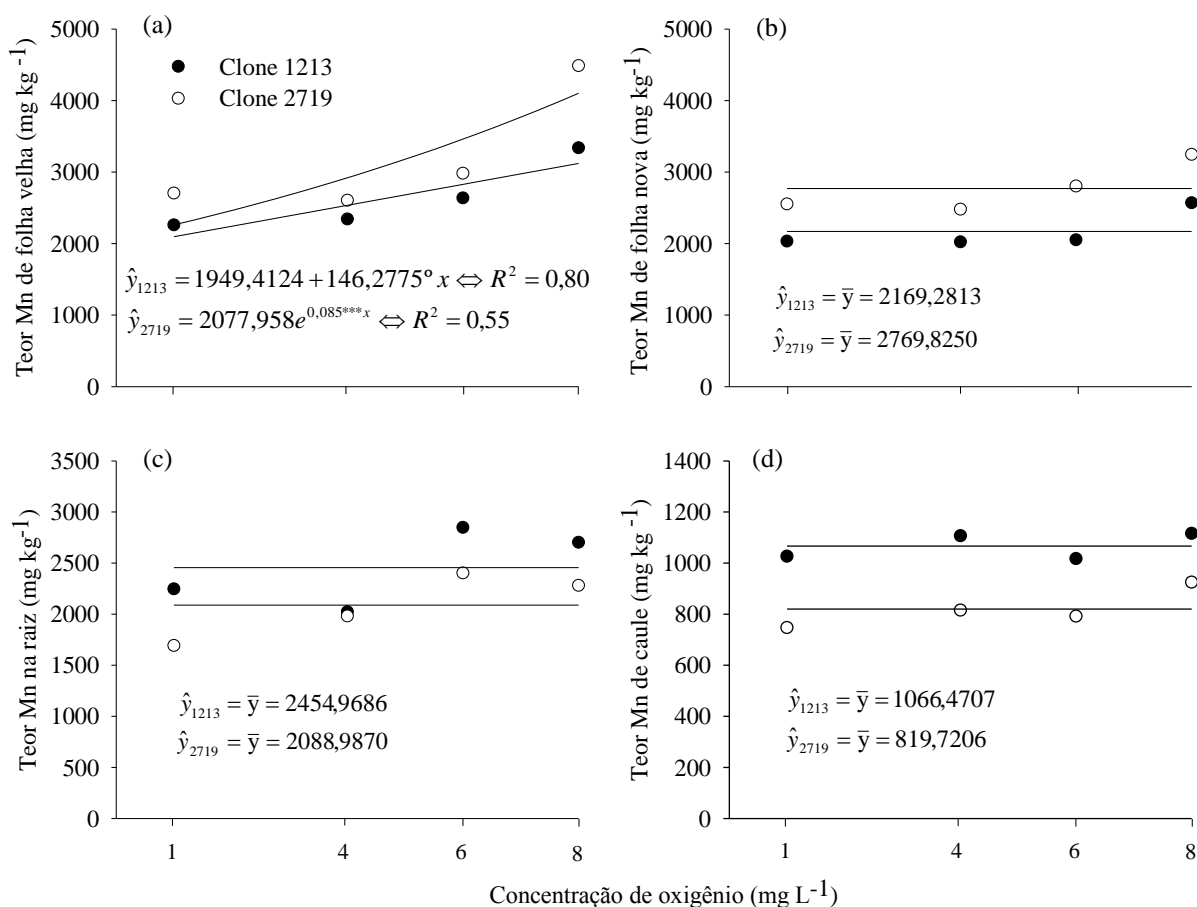


Figura 6. Teores de Mn de folha velha (a) e nova (b), raiz (c) e caule (d) de mudas de eucalipto (clones 1213[®] e 2719[®] CENIBRA S.A.) influenciados pelas concentrações de O₂, aos 21 dias. *, **, ***: significativo a 5, 1 e 0,1 %, respectivamente, pelo teste F.

espécies vegetais tem sido atribuída á maior retenção do excesso nas raízes. Essa capacidade depende, em parte, da formação de complexos no sistema radicular (Yang et al., 1997; Han et al., 2006). No entanto, a maior tolerância ao Mn pode ser também atribuída ao acúmulo em tilacóides (Lidon & Teixeira, 2000), sugerindo que a parte aérea, também, tem papel importante para controlar o excesso de Mn.

De maneira geral, os teores de macro e micronutrientes nos componentes da planta não foram alterados pela concentração de O₂ (Quadro 1). Comportamento oposto ao defendido por Kreuzwieser & Gessler em 2010, que afirmam que o transporte de nutrientes é limitado pela condição de déficit de O₂ no sistema radicular. Não houve diferença entre os clones quanto aos teores de macro e micronutrientes, exceto Zn e Cu, nos componentes da planta.

Quadro 1. Equações relacionadas aos teores de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe e Zn em folha nova e velha (madura), caule e raiz de mudas de eucalipto (clones 1213[®] e 2719[®] CENIBRA S.A.) em resposta à concentração de O₂ em solução nutritiva, aos 21 dias de idade

Nutriente	Clone 1213	Clone 2719
Folha Nova		
P	$\hat{y} = \bar{y} = 0,3922$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,3922$
K	$\hat{y} = \bar{y} = 1,7053$	$\hat{y} = 1,4237 + 0,0442^{\circ}x \quad R^2 = 0,38$
Fe	$\hat{y} = \bar{y} = 136,9125$	$\hat{y} = 159,4012 - 2,6772^{\circ}x \quad R^2 = 0,28$
Mg	$\hat{y} = \bar{y} = 0,3194$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,3194$
Ca	$\hat{y} = \bar{y} = 0,7689$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,7689$
Cu	$\hat{y} = \bar{y} = 14,8813$	$\hat{y} = \bar{y} = 5,1550$
Zn	$\hat{y} = \bar{y} = 46,2281$	$\hat{y} = \bar{y} = 50,7958$
S	$\hat{y} = \bar{y} = 0,2257$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,2257$
Folha Velha		
P	$\hat{y} = \bar{y} = 0,2119$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,2119$
K	$\hat{y} = \bar{y} = 2,174$	$\hat{y} = \bar{y} = 2,174$
Fe	$\hat{y} = 55,8078 + 2,3088^{\circ}x \quad R^2 = 0,96$	$\hat{y} = \bar{y} = 68,3359$
Mg	$\hat{y} = \bar{y} = 0,2144$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1906$
Ca	$\hat{y} = 0,5981 + 0,0375^{**}x \quad R^2 = 0,80$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,7804$
Cu	$\hat{y} = \bar{y} = 10,7036$	$\hat{y} = \bar{y} = 9,4667$
Zn	$\hat{y} = \bar{y} = 41,7813$	$\hat{y} = \bar{y} = 34,3672$
S	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1411$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1627$
Caule		
P	$\hat{y} = 0,1347 + 0,0275^{\circ}x - 0,0038^{\circ}x^2 \quad R^2 = 0,80$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,0862$
K	$\hat{y} = \bar{y} = 1,5083$	$\hat{y} = \bar{y} = 1,4067$
Fe	$\hat{y} = \bar{y} = 27,6701$	$\hat{y} = \bar{y} = 27,6701$
Mg	$\hat{y} = 0,0679 + 0,0043^{\circ}x \quad R^2 = 0,91$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,0726$
Ca	$\hat{y} = \bar{y} = 0,2980$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,3332$
Cu	$\hat{y} = \bar{y} = 14,5588$	$\hat{y} = \bar{y} = 12,0839$
Zn	$\hat{y} = \bar{y} = 46,4047$	$\hat{y} = \bar{y} = 29,3672$
S	$\hat{y} = -0,0042 + 0,0132^{\circ}x - 0,0016^{\circ}x^2 \quad R^2 = 0,53$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,0124$
Raiz		
P	$\hat{y} = 0,2594 - 0,0184^{**}x \quad R^2 = 0,87$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1639$
K	$\hat{y} = \bar{y} = 1,4076$	$\hat{y} = \bar{y} = 1,4076$
Fe	$\hat{y} = \bar{y} = 705,8068$	$\hat{y} = \bar{y} = 705,8068$
Mg	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1978$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1978$
Ca	$\hat{y} = \bar{y} = 0,2965$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,2965$
Cu	$\hat{y} = \bar{y} = 121,8828$	$\hat{y} = \bar{y} = 167,3958$
Zn	$\hat{y} = \bar{y} = 179,4177$	$\hat{y} = \bar{y} = 135,2943$
S	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1476$	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1476$

[°], *, **: significativo a 10, 5 e 1 %, respectivamente, pelo teste F. Teste de identidade de modelos à 10 %.

Formação de aerênquima

Foram observadas diferenças na formação de espaços intercelulares nas raízes de ambos os clones submetidos à hipoxia, sendo que houve formação de aerênquima tanto no clone mais sensível (1213) quanto no mais tolerante (2719) a SPEVRD (Figura 7). Aparentemente a origem do aerênquima é esquizógena, evidenciada pelo afastamento de células do parênquima cortical. Dantas et al. (2001) observaram que hipoxia também induziu o desenvolvimento de grandes espaços intercelulares, formando aerênquima lisígeno em raízes da cultivar de milho Saracura- BRS 4154, devido ao aumento na atividade de celulase. Kawase (1972, 1974), Drew et al. (1989) e He et al. (1996) observaram que a formação de aerênquima está relacionada com a presença de etileno no tecido radicular em condição de hipoxia. Assim, a maior produção desse hormônio provoca a indução de enzimas que atuam no metabolismo da parede celular (He et al., 1996), que culmina, posteriormente, em morte celular (Shiono et al., 2008), evidenciando, assim, a formação de espaços que podem acumular O₂ (aerênquima).

O aerênquima contém canais interligados permitindo a difusão de gases, de modo a manter a respiração aeróbia e a oxigenação da rizosfera, minimizando a condição de hipoxia (Shannon et al., 1996; Colmer, 2003). Em espécies de eucalipto também existem relatos da formação de aerênquima. Van der Moezel et al. (1989), estudando *E. camaldulensis*, observaram formação de aerênquima no sistema radicular, suportando a ideia de que o eucalipto, assim como outras espécies, possui mecanismo de escape à hipoxia, sugerindo tolerância a condições de alagamento.

Em condições de aerobiose, não foi observada formação de aerênquima no sistema radicular dos clones em estudo. Em situação de hipoxia, os dois clones, aparentemente apresentam aumento do tamanho e redução do número de células do córtex da raiz (Quadro 2), estando elas mais desorganizadas (Figura 7). Quando as plantas cresceram em condições normais de O₂, tanto o clone sensível (1213) como o tolerante (2719) apresentaram raízes com células menores, mais organizadas e com menores espaços intercelulares. Observou-se também que os dois clones expostos à hipoxia apresentaram maior número de raízes laterais, como uma possível resposta à condição de hipoxia (Figura 7).

A análise anatômica do sistema radicular mostrou a interação entre o efeito de genótipo e do tratamento de hipóxia, e que os clones apresentam comportamento diferente quanto ao tratamento. Independente da concentração de O₂, o clone susceptível (1213) não apresentou diferença significativa para as variáveis avaliadas,

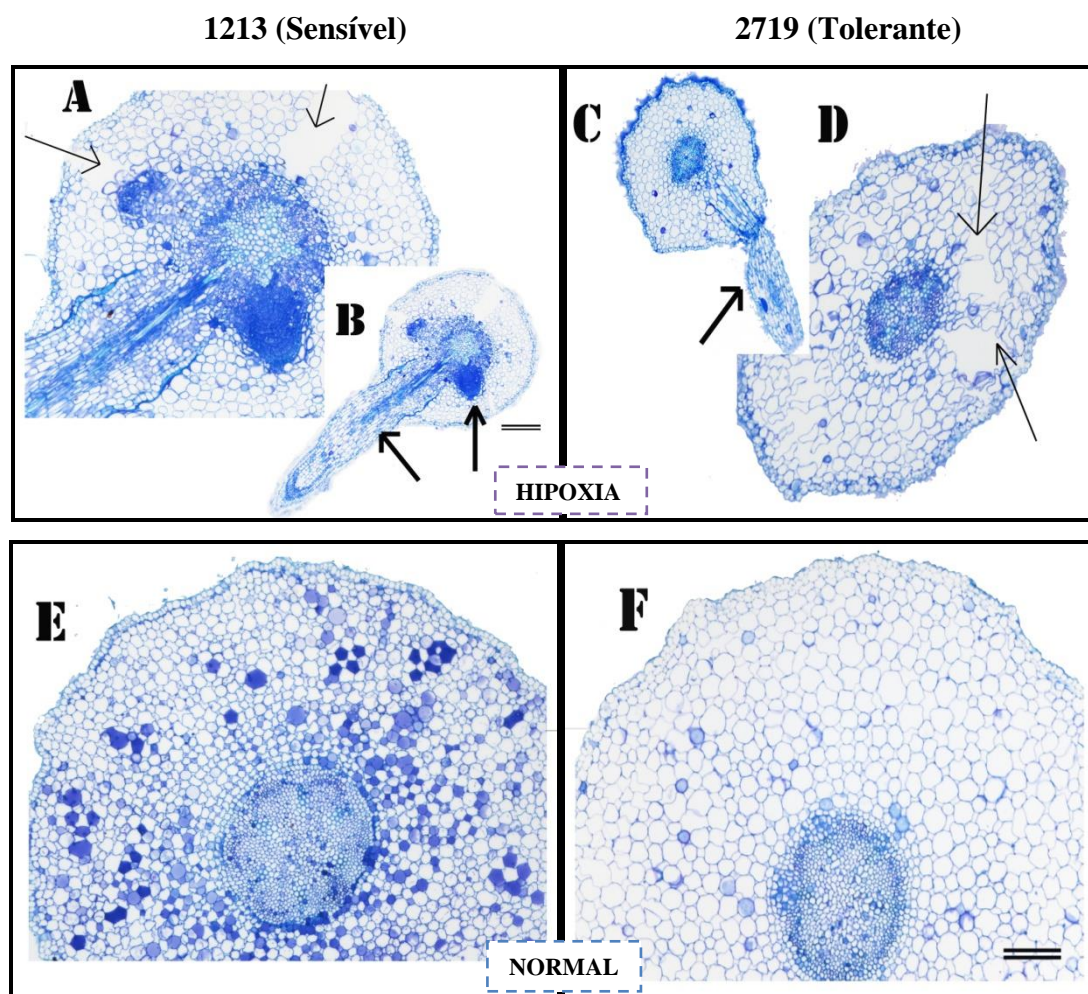


Figura 7. Secção transversal em raiz de mudas de eucalipto (clones 1213[®] e 2719[®] CENIBRA S.A.), sob crescimento em solução nutritiva em condição normal de O₂ (8 mg L⁻¹) e hipoxia (4 mg L⁻¹). As figuras (A, D, E, F) e (B, C), estão representadas nas escalas 200 e 100 μm, respectivamente, indicadas na figura A e F por duas barras paralelas. As setas cheias indicam lançamento de raízes laterais e as setas mais finas indicam espaços intercelulares.

exceto para o número de células do córtex. Isto sugere a diferenciação menor das células de uma mesma área de córtex para o genótipo. O clone 1213 (sensível) também apresentou menor área de córtex em comparação ao clone 2719 (tolerante), independentemente da concentração de O₂.

Por outro lado, exceto pela área de raiz e número médio de células, todas as variáveis avaliadas, em condição normal de oxigenação (8 mg L⁻¹ de O₂), foram significativamente superiores à condição de hipoxia para o clone tolerante (2719). Estes resultados sugerem a tendência de manutenção de um mesmo número de células para uma menor área de córtex.

Quadro 2. Médias de área de raiz (AR); área da epiderme (AE); área do cilindro (AC); área do córtex (ACO); diâmetro médio de raiz (DR); diâmetro médio do cilindro (DMC); número médio de células (NMC) em dois clones de eucalipto, 1213 (sensível) e 2719 (tolerante), frente concentrações de O₂ em solução nutritiva

Clone	O ₂	AR	AE	AC	ACO	DR	DMC	NMC
	mg L ⁻¹	----- μm ² -----				----- μm -----		
1213	4	576601 Aa	84830 Aa	67041 Aa	426823 Aa	858 Aa	263 Aa	8,8 Ba
1213	8	765638 Aa	91856 Aa	62710 Aa	609248 Aa	983 Aa	271 Aa	14,6 Aa
2719	4	417847 Aa	87642 Ba	28797 Bb	357945 Ba	728 Ba	184 Ba	8,7 Aa
2719	8	874518 Aa	107910 Aa	48370 Ab	680095 Aa	1028 Aa	254 Aa	13,5 Aa

Médias na vertical seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem quanto a efeito de O₂ para o mesmo clone pelo teste Tukey (p<0,05). Médias na vertical seguidas pela mesma letra minúscula não diferem quanto a clones para a mesma dose de O₂ pelo teste Tukey (p<0,05).

Análises adicionais ainda são necessárias para inferência quanto à diferença no padrão de crescimento e desenvolvimento dos dois clones em diferentes concentrações de O₂. Apesar da manutenção de uma mesma área de raiz, a possibilidade de redução do transporte no sistema vascular devido à redução da área de cilindro central, e a relevância da alteração da área de epiderme em relação à redução da concentração de O₂ ainda devem ser consideradas.

Trocas gasosas

A redução da concentração de O₂ provocou queda na maioria dos parâmetros avaliados, sendo mais expressiva no clone tolerante - 2719 (Figura 8). Houve diminuição da taxa fotossintética líquida (A) para ambos os clones, podendo chegar a 70 % para o clone 2719 (tolerante) em condição intensa de hipoxia (1 mg L⁻¹ de O₂) (Figura 8a). Martinazzo et al. (2012), estudando plantas de ameixeira (*Prunus Salicina* Lindl.), observaram redução de A quando essas plantas foram submetidas ao alagamento. Esta redução pode estar associada ao fechamento estomático, que desencadeia vários processos, como a redução da concentração interna CO₂, da transpiração e altera a relação entre CO₂ interno (Ci) e ambiente (Ca) as plantas. Em plantas de carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore) foi observado que a condição de alagamento causa redução da condutância estomática e fotossíntese (Arruda & Calbo, 2004).

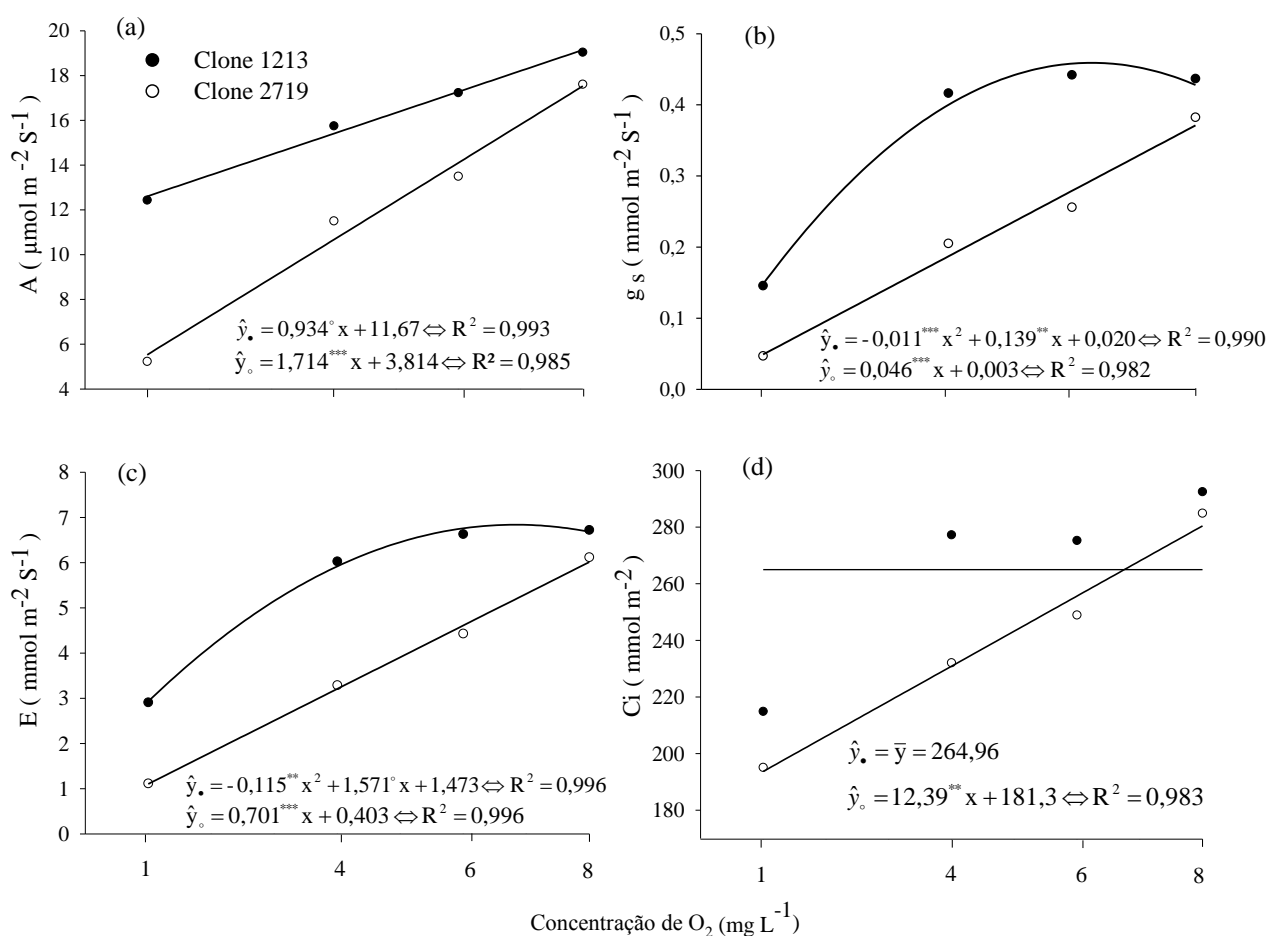


Figura 8: Taxa fotossintética (a), condutância estomática (b), transpiração (c) e concentração interna de CO₂ (d) em mudas de eucalipto (clones 1213[®] - sensível e 2719[®] -tolerante-CENIBRA S.A) em 14 dias de experimento. Equações de regressão foram ajustadas para cada atributo acima, sendo os níveis de significância ° (p<0,1), ** (p<0,05), *** (p<0,01) e ^{ns} (não significativo) pelo teste t.

A condutância estomática (g_s) é uma das primeiras alterações fisiológicas que as plantas, de modo geral, apresentam em condição de alagamento. Bradford & Hsiao (1982), estudando uma variedade de tomate (*Lycopersicon esculentum*), observaram redução de 30 % em g_s quando a planta permaneceu por 24 h em condição de alagamento. Para duas espécies de eucalipto (*E. camaldulensis* e *E. lesouefii*), também foi observado que a hipoxia causa alteração de condutância estomática, sendo que para *E. lesouefii*, a redução foi mais intensa (Van der Moezel et al., 1989). Para os clones de eucalipto deste estudo, a redução em g_s foi mais intensa para o clone tolerante (2719), sendo que uma pequena variação na concentração de O₂ de 8 para 6 mg L⁻¹ acarretou redução em g_s de 33 %, diferentemente do clone suscetível (1213) que não apresentou variação (Figura 8b).

A transpiração (E) das mudas de eucalipto também foi alterada pela hipoxia, sendo reduzida com o aumento da restrição de O_2 ao sistema radicular (Figura 8c). Este fato é explicado, basicamente, pela redução em g_s . Essa afirmação, corrobora com o estudo realizado por Martinazzo et al. (2012), em que a imposição de hipoxia causou a redução na transpiração de plantas de amexeira.

A redução da concentração interna de CO_2 (C_i) foi similar aos demais atributos fotossintéticos, porém não foi significativa para o clone 1213 (sensível) (Figura 8d). No clone 2719 (tolerante) essa redução sugere que em condição de hipoxia, a taxa fotossintética líquida possa ser controlada por g_s .

O clone tolerante (2719) responde mais rapidamente à hipoxia do que o suscetível (1213); uma pequena queda na concentração de O_2 já causa redução em g_s e, conseqüentemente, da fotossíntese pela diminuição da concentração de C absorvido. Porém, ele mantém C no sítio de carboxilação e isso o permite manter a fotossíntese em taxas suficientes para sobreviver e evitar degradação pelas espécies reativas de O_2 . Esse mecanismo parece ser vantajoso para a recuperação das plantas após o estresse.

Experimento III: Efeito de hipoxia e toxidez de Mn

Matéria seca de componentes de plantas

A concentração mais elevada de Mn (300 mg L^{-1}) em condição de oxigenação normal (8 mg L^{-1}) provocou menor crescimento da parte aérea, bem como da altura, acarretando menores valores de matéria seca de caule e de folha nova e, conseqüentemente, de matéria seca da parte aérea e total para o clone 1213 (sensível) (Quadros 3 e 4). Junior et al. (2008), elevando a concentração de Mn de 2 para $250 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução nutritiva, observaram que o excesso deste micronutriente é danoso para soja, causando redução da matéria seca da raiz, parte aérea, total e de grãos. Estas perdas de produtividade, provavelmente, podem ser atribuídas à redução na taxa fotossintética (Macfie & Taylor, 1992; Macfie et al., 1994) e a distúrbios metabólicos, tais como redução na respiração, distúrbio do metabolismo de N e da síntese de proteínas, e redução do conteúdo de clorofila (El-Jaoual & Cox, 1998; Lindon & Texeira, 2000; Demirevska-Kepova et al., 2004; Dat et al., 2004).

Quadro 3. Valores médios de crescimento em altura de parte aérea (CPA), altura da parte aérea (H), concentração de etileno (CET), diâmetro do caule (D) e crescimento de raiz (CR) em função de concentrações Mn e O₂

O ₂	Mn	CPA	H	CET	D	CR
	mg L ⁻¹	cm	cm	µg kg ⁻¹	mm	cm
Clone 1213						
6	30	21,4 <i>AbB</i>	65,5 <i>AbB</i>	144,4 <i>AaA</i>	5,2 <i>AaA</i>	7,7 <i>AbB</i>
6	300	22,5 <i>AbA</i>	69,0 <i>AaA</i>	126,9 <i>AaA</i>	4,9 <i>AaA</i>	7,6 <i>AbB</i>
8	30	26,1 <i>AbA</i>	71,6 <i>AbA</i>	94,9 <i>AaB</i>	5,8 <i>AaA</i>	13,3 <i>AbA</i>
8	300	22,7 <i>BbA</i>	63,2 <i>BbB</i>	77,4 <i>BaB</i>	5,2 <i>AaA</i>	13,0 <i>AaA</i>
Clone 2719						
6	30	32,5 <i>AaA</i>	75,3 <i>AaA</i>	110,8 <i>AbA</i>	5,5 <i>AaA</i>	16,1 <i>AaA</i>
6	300	32,1 <i>AaA</i>	55,8 <i>BbB</i>	111,7 <i>AaA</i>	5,4 <i>AaA</i>	12,2 <i>AaA</i>
8	30	35,4 <i>AaA</i>	77,2 <i>AaA</i>	77,6 <i>AbB</i>	5,4 <i>AaA</i>	19,5 <i>AaA</i>
8	300	30,0 <i>AaA</i>	74,4 <i>AaA</i>	58,8 <i>BbB</i>	5,3 <i>AaA</i>	14,1 <i>BaA</i>

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na vertical para o mesmo clone e O₂ não diferem quanto a concentrações de Mn pelo teste Tukey a 5 %. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na vertical para mesma concentração de Mn e O₂ não diferem quanto a clones pelo teste Tukey a 5 %. Médias seguidas por letras maiúsculas e itálicas iguais na vertical para o mesmo clone e concentração de Mn não diferem quanto a concentrações O₂ pelo teste Tukey a 5 %.

Quadro 4. Médias de matéria seca da raiz (R), caule (C), folha nova (FN), folha velha (FV), parte aérea (PA) e total (T) em função de concentrações de Mn e O₂

O ₂	Mn	R	C	FN	FV	PA	T
	mg L ⁻¹	g planta ⁻¹					
Clone 1213							
6	30	4,7 <i>AbA</i>	6,6 <i>AaB</i>	0,35 <i>AbB</i>	5,3 <i>AaB</i>	12,2 <i>AaB</i>	17,0 <i>AaB</i>
6	300	4,6 <i>AaA</i>	7,0 <i>AaA</i>	0,31 <i>AaA</i>	5,2 <i>AaA</i>	12,5 <i>AaA</i>	17,2 <i>AaA</i>
8	30	4,9 <i>AaA</i>	9,1 <i>AaA</i>	0,48 <i>AaA</i>	6,1 <i>AaA</i>	15,7 <i>AaA</i>	20,6 <i>AaA</i>
8	300	4,6 <i>AbA</i>	6,8 <i>BbA</i>	0,31 <i>BbA</i>	5,8 <i>AaA</i>	12,9 <i>BaA</i>	17,6 <i>BbA</i>
Clone 2719							
6	30	5,4 <i>AaA</i>	7,5 <i>AaB</i>	0,53 <i>AaA</i>	5,0 <i>AaA</i>	13,1 <i>AaA</i>	18,5 <i>AaA</i>
6	300	4,7 <i>BaB</i>	5,7 <i>BbB</i>	0,36 <i>BaB</i>	2,8 <i>BbB</i>	8,9 <i>BbB</i>	13,7 <i>BbB</i>
8	30	5,2 <i>AaA</i>	8,9 <i>AaA</i>	0,55 <i>AaA</i>	5,4 <i>AaA</i>	14,9 <i>AaA</i>	20,2 <i>AaA</i>
8	300	5,5 <i>AaA</i>	8,5 <i>AaA</i>	0,55 <i>AaA</i>	6,1 <i>AaA</i>	12,2 <i>AaA</i>	20,8 <i>AaA</i>

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na vertical para o mesmo clone e O₂ não diferem quanto a concentrações de Mn pelo teste Tukey a 5 %. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na vertical para mesma concentração de Mn e O₂ não diferem quanto a clones pelo teste Tukey a 5 %. Médias seguidas por letras maiúsculas e itálicas iguais na vertical para o mesmo clone e concentração de Mn não diferem quanto a concentrações O₂ pelo teste Tukey a 5 %.

Em condição de hipoxia branda (6 mg L^{-1}), apenas altura do clone 2719 (tolerante) foi alterada negativamente pela concentração de Mn mais elevada, não acarretando em menores crescimentos de raiz, parte aérea e diâmetro do caule em ambos os clones (Quadro 3). No entanto, houve menor produção de matéria seca de todos os componentes da planta na dose mais elevada de Mn para o clone tolerante (2719) (Quadro 4). O mesmo não foi observado em relação ao clone 1213 (sensível). Estas observações sugerem que o excesso de Mn foi mais danoso para o crescimento do clone sensível (1213) em condição normal de O_2 ; já para clone tolerante (2719), a condição de hipoxia foi mais limitante. Isto é confirmado na produção de matéria seca total das plantas, em que o clone 1213 (sensível) teve maior acúmulo de biomassa em condição de hipoxia. Em contra partida, em condição adequada de O_2 , o clone 2719 (tolerante) obteve melhor desempenho.

A tolerância de uma espécie ao excesso de Mn pode ser atribuída ao maior acúmulo deste nutriente no sistema radicular (Junior et al., 2008); no entanto, maiores teores de Mn no sistema radicular não foram evidenciados em condição de hipoxia para o clone 1213 (sensível), tão pouco para o clone 2719 (tolerante), em condição de oxigenação normal, sugerindo outros mecanismo no controle de excesso de Mn. A restrição na taxa de absorção pelas raízes, o transporte do excesso de Mn para as folhas, a distribuição uniforme do Mn nos tecidos vegetais, a maior tolerância interna e a interação com outros nutrientes são sugeridos como mecanismo de tolerância ao excesso de Mn (Foy et al., 1988; Moroni et al., 2003).

Em relação à diferença apresentada entre clones, independentemente da concentração de Mn e da oxigenação, o clone tolerante (2719) mostrou-se superior em altura e crescimento da parte aérea, sendo a exceção para a condição de hipoxia e 300 mg L^{-1} de Mn, em que o clone sensível (1213) apresentou maior valor em altura de planta (Quadro 3). Esta mesma sincronia de resultados não foi observada na produção de matéria seca dos componentes de plantas.

Crescimento radicular

O crescimento radicular do clone sensível (1213) à SPEVRD foi inferior ao clone tolerante (2719) para as duas variáveis analisadas: disponibilidade de O_2 e Mn (Quadro 3). Tal afirmação é indicativa da superioridade de adaptação do sistema radicular do clone tolerante (2719) em condição adversa ou não de crescimento. O excesso de Mn não fez efeito ao crescimento radicular de ambos os clones, exceto para

o clone tolerante (2719) em condição adequada de O₂. O crescimento radicular do clone sensível (1213) mostrou-se extremamente sensível à condição de hipoxia, apresentando redução de 41 % no crescimento deste componente de planta, independente da concentração de Mn. Isto ajuda a estabelecer o conceito de que a hipoxia é extremamente danosa ao sistema radicular, como observado por outros autores (Medri et al., 1998; Kozłowski, 1984; Rocha et al., 2010; George et al., 2012). O mesmo não foi evidenciado para o clone tolerante (2719). Esta observação reforça a ideia da superioridade do sistema radicular do clone tolerante (2719) em condição de hipoxia. A limitação que a hipoxia oferece ao crescimento radicular pode ser esclarecida pela menor demanda de energia (ATP) a que as plantas estão sujeitas (George et al., 2012). Adicionalmente, o menor crescimento de raiz pode ser atribuído à elevação da concentração de etileno (Jackson, 1990a,b). Em solos com alagamento, o etileno produzido pelas raízes estimula a biossíntese de auxina (Lynch et al., 2012), que ao ser transportada para zona de crescimento radicular pode inibir a alongação celular, limitando, assim, o crescimento da raiz (Ruzicka et al., 2007).

Ao longo dos 27 dias do período experimental, o crescimento radicular foi reduzido em ambos os clones (Figura 9). Novamente, o efeito da hipoxia foi muito mais pronunciado do que o efeito da alta concentração de Mn. A redução na taxa de crescimento radicular ao longo do tempo foi mais pronunciada para o clone 1213 (sensível) do que no 2719 (tolerante), indicando maior sensibilidade às condições adversas do meio para o primeiro. A exceção foi observada na concentração mais baixa de Mn (30 mg L⁻¹) em condição de hipoxia branda (6 mg L⁻¹ de O₂), na qual o crescimento radicular do clone 1213 (sensível) não foi influenciado pelo tempo, contudo, foi o menor valor ao longo do tempo. Possivelmente, já no momento da primeira avaliação, o sistema radicular já estava sob efeito negativo da hipoxia e, assim, não apresentou redução no restante do tempo. A concentração mais elevada de Mn em solução para o clone 1213 (sensível) em condição de hipoxia fez com que, ao longo do tempo, houvesse redução do crescimento diário da raiz de forma linear. Na condição de oxigenação normal, a concentração de Mn mais alta proporcionou maior crescimento radicular diário, ao contrário do esperado, indicando que o acúmulo de Mn nos níveis testados, isoladamente, não estava comprometendo o crescimento das plantas. Para o clone 2719 (tolerante), na condição de oxigenação normal, a menor concentração de Mn proporcionou o maior crescimento radicular diário. Em condição de hipoxia, independentemente da concentração de Mn, para o clone 1213 (sensível) o crescimento

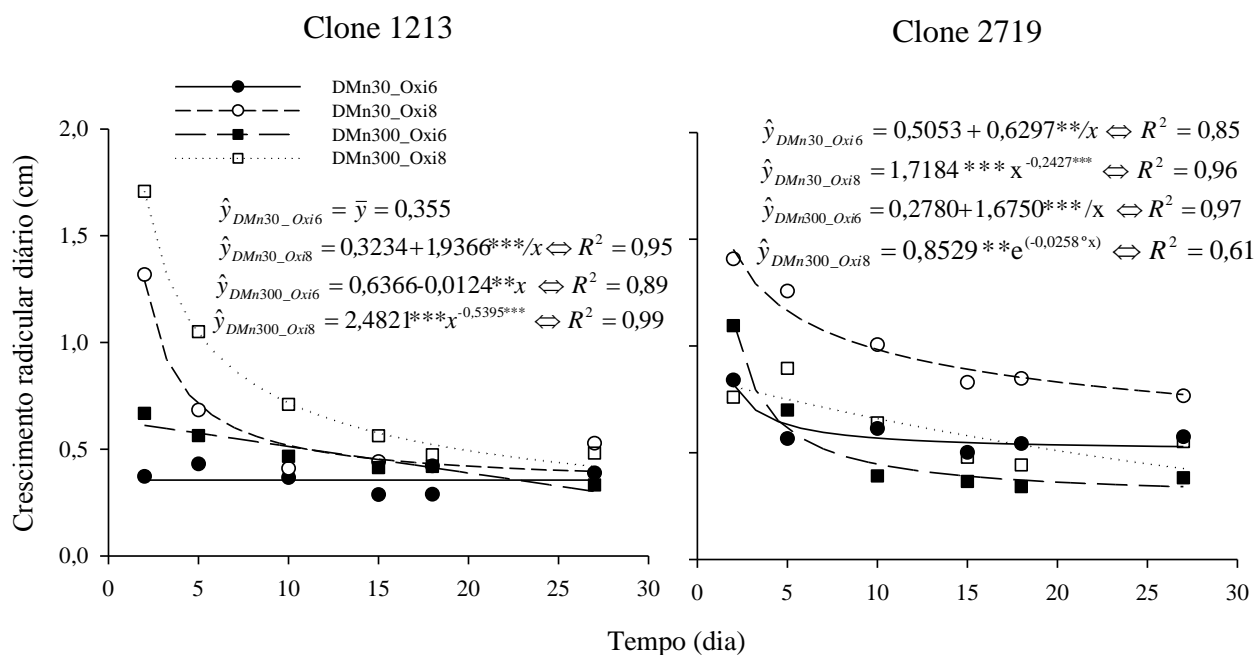


Figura 9. Crescimento radicular diário de mudas de eucalipto (clones 1213[®] e 2719[®] CENIBRA S.A.) em função da concentração de Mn (DMn) em mg L⁻¹ e o O₂ (Oxi) em mg L⁻¹ aplicado. °, **, ***: significativo a 10, 5 e 1 %, respectivamente, pelo teste F. Teste de identidade de modelos à 10 %.

radicular diário foi sempre menor do que na condição de oxigenação normal. O mesmo também foi observado para o clone 2719 (tolerante).

Síntese de etileno

O estresse anaeróbico provocado às raízes desencadeou produção significativa de etileno em ambos os clones (Quadro 3), sendo que o clone sensível a SPEVRD (1213) apresentou maior incremento. Entretanto, o Mn não influenciou este incremento. Este mesmo incremento ocorreu para as espécies *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. obliqua* (Blake & Reid, 1981) e *E. robusta* (Clemens & Pearson, 1977) em condição de alagamento, sugerindo que este hormônio é uma das principais modificações fisiológicas que ocorre em condição de hipoxia em eucalipto. Nesta condição, a expressão de genes que regulam a produção de etileno intensifica-se (Van der Straeten et al., 1997; Peng et al., 2005; Bailey-Serres & Voisenek, 2008), alterando o crescimento e a morfologia do sistema radicular (George et al., 2012). Os efeitos que o etileno produz foram identificados em arroz e em *Arabidopsis* (Licausi et al., 2010). Esta maior produção de etileno corrobora com os resultados apresentados nos experimentos I e II, uma vez que a sensibilidade em crescimento do sistema radicular (Lynch et al., 2012; Ruzicka et al., 2007) e a formação de aerênquima (Kawase, 1972;

1974; Drew et al, 1989; He et al., 1996b), estão estreitamente correlacionadas com a produção deste hormônio, como observados nos clones em questão, em condição de hipoxia.

O etileno é o principal regulador de sinal em respostas à inundação (Hinz et al., 2010) e, por isso, seu incremento em condição de hipoxia pode criar mecanismo para maior tolerância à deficiência de O₂. Em *E. camaldulensis* isto já foi observado (Blake & Reid, 1981). Nesta condição, o aumento na produção de etileno no sistema radicular ofereceu suporte para maior tolerância às demais espécies (*E. globulus* e *E. obliqua*). Em relação aos clones deste estudo, ainda serão necessárias novas pesquisas para elucidar melhor a tolerância diferenciada que o etileno pode causar, uma vez que o clone sensível (1213), aparentemente o mais sensível a hipoxia, foi quem mais produziu etileno. Entretanto, o incremento na produção de etileno e as modificações anatômicas ocorridas sugerem que o eucalipto, assim como outras espécies, apresenta o etileno como um dos principais hormônios responsáveis pelas modificações anatômicas e metabólicas, criando mecanismos para tolerância mesma que parcial à hipoxia.

Toxidez de Mn

O aumento da concentração do Mn de 30 para 300 mg L⁻¹, em condição de hipoxia ou não, elevou em ambos os clones os teores deste micronutriente em todos os compartimentos da planta (Quadros 5). O clone mais sensível (1213) acumulou maiores teores de Mn nas folhas. Este resultado compartilha com os observados em campo, onde clones mais sensíveis à SPEVRD estocam maiores teores de Mn (Leite et al., 2013). Neste estudo, os teores de Mn no clone sensível (1213) foram maiores que 11.000 e 19.000 mg kg⁻¹ em folhas velhas e novas, respectivamente. Para o clone tolerante (2719), teores bem menores, próximos de 6.000 e 9.000 mg kg⁻¹ em folha velha e nova, respectivamente, foram observados. No entanto, isto não refletiu em maiores teores de Mn no sistema radicular deste clone, indicando que a possível maior tolerância ao excesso de Mn para este clone, pode estar ligada à limitação na taxa de absorção de Mn pelas raízes. Além deste, outros mecanismos são citados, como a distribuição uniforme do Mn nos tecidos vegetais, a oxidação do Mn nas raízes, o transporte do excesso de Mn para as folhas, bem como a maior tolerância interna e a interação com outros nutrientes (Foy et al., 1988; Moroni et al., 2003).

Quadro 5. Teores médios de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, manganês, ferro e zinco em função da concentração de Mn e O₂

O ₂	Mn	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Fe	Zn	
mg L ⁻¹		----- dag kg ⁻¹ -----						----- mg kg ⁻¹ -----			
Raiz											
Clone 1213											
6	30	0,15 AaA	1,3 AbA	0,30 AaA	0,30 AaA	0,07 AaA	38,6 AbA	4704 BbA	562 BaA	69 AbB	
6	300	0,15 AbA	0,9 BaB	0,21 BbA	0,26 AaA	0,06 AaA	33,6 AbA	17298 AaA	737 AbA	60 AbB	
8	30	0,13 AaB	1,3 AaA	0,32 AaA	0,21 BaB	0,05 AbA	38,5 AbA	4788 BbA	560 BaA	93 AbA	
8	300	0,15 AaA	1,3 AaA	0,23 BaA	0,29 AaA	0,06 AbA	38,7 AaA	16625 AaA	730 AaA	83 AbA	
Clone 2719											
6	30	0,16 BaA	1,5 AaA	0,35 AaA	0,22 AaA	0,19 AaA	63,0 AaA	6524 BaA	492 BaA	157 AaA	
6	300	0,29 AaA	0,9 BaA	0,41 AaA	0,28 AaA	0,07 AaA	63,6 AaA	15310 AaB	1207 AaA	131 AaA	
8	30	0,14 AaB	1,4 AaA	0,34 AaA	0,20 AaA	0,11 AaA	56,6 AaA	6134 BaA	505 AaA	143 AaA	
8	300	0,13 AaB	1,0 BbA	0,26 AaA	0,15 AbB	0,10 AaA	37,1 BaB	19006 AaA	455 AbB	141 AaA	
Caulo											
Clone 1213											
6	30	0,14 AaA	1,1 AbB	0,45 AaA	0,05 AaA	0,01 BbB	1,4 AaA	2779 BbB	6,2 AaA	3,4 AbA	
6	300	0,14 AbA	1,1 AaB	0,25 BbA	0,04 AbA	0,02 AaA	1,4 AaA	5471 AaA	3,2 BbA	2,5 BbB	
8	30	0,08 BbB	1,2 AbA	0,37 AaB	0,05 AbA	0,04 AaA	1,2 BaB	3326 BaA	3,5 AaB	2,6 BbB	
8	300	0,16 AaA	1,2 AaA	0,31 AaA	0,05 BaA	0,01 BbB	1,9 AaA	5398 AbA	3,3 AaA	3,4 AbA	
Clone 2719											
6	30	0,15 BaA	1,2 AaB	0,29 BbA	0,06 AaA	0,02 AaA	1,5 AaA	3004 BaB	3,1 BbA	4,5 BaA	
6	300	0,26 AaA	1,2 AaA	0,36 AaA	0,06 AaA	0,02 AaA	1,6 AaA	5294 AaA	4,2 AaA	5,4 AaA	
8	30	0,13 AaA	1,4 AaA	0,26 AbA	0,061AaA	0,02 AaA	1,3 AaB	3664 BaA	2,8 AbA	5,1 AaA	
8	300	0,12 AaB	1,2 AaA	0,24 AaB	0,052BaB	0,02 AaA	1,2 AbB	5868 AaA	4,1 AaA	4,6 AaB	
Folha Nova											
Clone 1213											
6	30	0,30 BaB	1,3 BbB	0,66 BaB	0,18 BaB	0,11 BaA	14,9 AaA	7267 BaA	81 BaB	27 BbB	
6	300	0,34 AaA	1,6 AaA	0,93 AaA	0,22 AaA	0,15 AaA	13,6 AaA	19152 AaA	91 AaA	33 AaA	
8	30	0,36 AaA	1,6 AaA	0,77 AaA	0,22 AaA	0,13 AaA	13,7 AaA	9647 BaA	90 AaA	38 AaA	
8	300	0,33 AaA	1,6 AaA	0,71 AaB	0,20 AaA	0,11 AaB	15,1 AaA	12461 AaB	89 AaA	31 BaA	
Clone 2719											
6	30	0,32 AaA	1,8 AaA	0,65 AaA	0,19 AaA	0,10 AaA	12,2 AbA	4560 BbB	77 AaA	33 AaA	
6	300	0,19 BbB	1,4 BaA	0,58 AbA	0,16 BbA	0,09 AbA	10,7 AbB	8983 AbA	77 AbB	25 BbB	
8	30	0,31 AbA	1,6 AaA	0,74 AaA	0,21 AaA	0,11 AaA	13,9 AaA	6061 BbA	83 AaA	33 AaA	
8	300	0,26 AbA	1,6 AaA	0,63 BbA	0,19 AaA	0,10 AaA	14,2 AaA	9326 AbA	86 AaA	30 AaA	
Folha Velha											
Clone 1213											
6	30	0,16 BaA	1,7 AaA	0,86 AaA	0,20 AaA	0,07 AaB	7,3 AaA	5412 BaA	77 AaA	27 AbA	
6	300	0,19 AaA	1,7 AaA	0,82 AaA	0,17 BbA	0,06 AaA	5,5 AaA	11030 AaA	72 AaA	23 BbA	
8	30	0,17 AaA	1,8 AaA	0,87 AaA	0,20 AaA	0,09 AaA	6,9 AaA	5921 BaA	78 AaA	27 AbA	
8	300	0,16 AaB	1,5 BaA	0,78 AaA	0,17 AaA	0,07 BaA	5,5 AbA	9484 AaA	65 BaA	25 AbA	
Clone 2719											
6	30	0,16 AaA	1,8 AaA	0,79 AbB	0,19 AaA	0,07 AaA	6,7 AaA	4235 BaB	72 AaA	31 AaA	
6	300	0,15 AbB	1,4 BbA	0,79 AaA	0,19 AaA	0,05 AaA	4,5 AaB	7173 AbB	60 BbB	32 AaA	
8	30	0,18 AaA	1,8 AaA	0,87 AaA	0,20 AaA	0,07 AbA	8,3 AaA	5856 BaA	79 AaA	34 AaA	
8	300	0,18 AaA	1,7 AaA	0,78 BaA	0,17 BaB	0,06 AaA	8,8 AaA	10123 AaA	73 AaA	34 AaA	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na vertical para o mesmo clone e O₂ não diferem quanto a concentrações de Mn pelo teste Tukey a 5 %. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na vertical para mesma concentração de Mn e O₂ não diferem quanto a clones pelo teste Tukey a 5 %. Médias seguidas por letras maiúsculas e itálicas iguais na vertical para o mesmo clone e concentração de Mn não diferem quanto a concentrações O₂ pelo teste Tukey a 5 %.



Figura 10. Crescimento da parte aérea (A) e sistema radicular (B) do clone sensível (1213) submetido à condição normal (8 mg L^{-1} de O_2) ($+\text{O}_2$) e de Hipoxia (6 mg L^{-1} de O_2) ($-\text{O}_2$), combinados com duas concentrações de Mn (30 e 300 mg L^{-1}); Sintoma inicial de toxidez de Mn em folha nova (C) e, em fase mais avançada (D), em clone 1213 (6 mg L^{-1} de O_2 e 300 mg L^{-1} de Mn).

Em condição de hipoxia e excesso de Mn, foram observados, para o clone sensível (1213), a perda de dominância apical e necrose amarronzada em folhas novas, sendo que, posteriormente, tornaram-se encarquilhadas e necrosadas (Figura 10C e D). O teor foliar de Mn para esta condição foi de $19.000 \text{ mg kg}^{-1}$, sugerindo ser este tóxico para o clone sensível (1213) (Quadro 5). Sintomas parecidos foram observados por Winterhalder (1963); no entanto, além destes sintomas, as folhas apresentaram-se pequenas e cloróticas. Isto pode ser atribuído à limitação que o excesso de Mn causa na absorção de Fe (Malavolta et al., 1997). Para este estudo, os teores de Fe não foram reduzidos, atribuindo, assim, ao Mn, o sintoma típico de toxidez descrito anteriormente. No mesmo estudo realizado por Winterhalder (1963), o *E. gummifera* foi mais sensível ao Mn do solo, enquanto *E. saligna* foi capaz de absorver grandes quantidades deste micronutriente sem mostrar sintomas de toxidez. Os teores tóxicos de Mn observados em folhas de *E. gummifera* e *E. saligna* foram, respectivamente, 2.040 e 4.250 mg kg^{-1} ,

sendo que os teores adequados são de 510 mg kg⁻¹. Assim, estas observações sugerem diferenças entre espécies de eucalipto quanto à tolerância de Mn, como reportado por El-Jaoual & Cox (1998), sendo que, possivelmente, o *E. urograndis*, de modo geral, figure entre as espécies mais tolerantes ao excesso de Mn.

Assim, como em eucalipto, os teores de Mn variam entre outras espécies. Em culturas agrícolas, os teores de Mn descritos como tóxicos, também, são flexíveis, tanto intra como interespecífico. Na cultura da soja, os teores variam entre 1.000-6.000 (Oliveira Junior et al., 2000; Junior et al., 2008); para café, entre 1.200-1.700 mg kg⁻¹ (Pavan & Bingham, 1981); para algodão, entre 750-5.000 mg kg⁻¹ (Edwards & Asher 1982; Rehab & Wallace, 1978) e, para arroz, maiores que 1.000 mg kg⁻¹ (Fageria et al., 1995). A ação tóxica do Mn é normalmente evidenciada na parte aérea das plantas. As raízes parecem insensíveis às altas concentrações de Mn e alteradas somente de forma indireta, como resultado da inibição no crescimento da parte aérea, mencionado por Foy (1976) e Pavan & Bingham (1981).

Entre os sintomas característicos de toxidez por Mn, lesões de cor marrom (Wissemeir & Horst, 1992), perda de dominância apical, encarquilhamento de folhas (El-Jaoual & Cox, 1998; Marschner, 2008) e rachaduras nos ramos laterais, também ocorrem com frequência em plantas com alta incidência de SPEVRD. Como descrito anteriormente, alguns destes sintomas assemelham-se com os apresentados em campo, como lesões marrons e encarquilhamento de folhas. No entanto, lesões em ramos, pecíolos e galhos não foram observadas. Tal informação indica que o tempo de exposição ao Mn pode ter sido muito curto para completa expressão dos sintomas de SPEVRD. Porém, atribuir ao Mn a causa do distúrbio de SPEVRD ainda não é confiável, mesmo porque as plantas expostas ao excesso de Mn estão sujeitas a diversas complicações oriundas da condição de hipoxia.

Teor de nutriente

Como exposto, a toxidez por Mn pode ser acompanhada pela deficiência de Ca, Mg, Fe (Horst, 1988; Marschner, 1995) e Zn (De Varennes et al., 2001). Alguns trabalhos citam a deficiência do Fe como o principal fator de impacto negativo em doses excessivas de Mn (Lingle et al., 1963; Pereira et al., 2001) e responsável por parte do sintoma de toxidez de Mn, a clorose em folhas (Pereira et al., 2001). Em *E. gummifera*, a aplicação de FeEDTA em folhas com sintoma clorótico resultou em recuperação (Winterhalder, 1963). Para este estudo, os teores de Fe, no clone sensível (1213), teve

aumento significativo em todos os compartimentos da planta, exceto para folhas velhas (Quadro 5). Certamente, por isso o sintoma de clorose em folhas novas com toxidez de Mn não foi observado no clone sensível (1213). Maiores teores de Zn foram observados no sistema radicular do clone tolerante (2719); no entanto, isto não refletiu em alteração nos teores na parte aérea. Os demais nutrientes analisados parecem não sofrer alteração quanto ao excesso de Mn e, ou, da hipoxia.

CONCLUSÕES

1. A hipoxia acentuada causa redução no crescimento tanto do clone sensível (1213) quanto do clone tolerante (2719) a SPEVRD, embora o efeito seja mais acentuado no clone mais sensível à SPEVRD (1213).

2. O crescimento radicular é o melhor indicador da condição de estresse provocada pela hipoxia, sendo que o clone 1213 é o mais alterado; o Mn não influencia esta avaliação.

3. A hipoxia branda desencadeia o maior incremento de etileno para o clone sensível (1213), o Mn não influencia este incremento.

4. A hipoxia branda possibilita a formação de aerênquima em ambos os clones.

5. A condição de hipoxia é mais limitante para abertura estomática do clone tolerante (2719) do que para o clone sensível (1213), conseqüentemente, reduzindo a taxa fotossintética, a transpiração e a concentração interna de CO₂.

6. O sintoma visual de toxidez de Mn ocorre somente em folhas novas do clone sensível (1213), caracterizada pela formação de necrose amarronzada nas bordas de folhas, seguida pelo seu encarquilhamento.

7. A hipoxia é o primeiro fator a predispor os clones a SPEVRD, diferentemente do excesso de Mn que parece atuar em longo prazo para a completa expressão dos sintomas de Seca de Ponteiro.

LITERATURA CITADA

- ATWELL & STEER, B. The effect of oxygen deficiency on uptake and distribution of nutrients in maize plants. *Plant Soil*, 122:1-8, 1990.
- ARMSTRONG, W. & DREW, M.C. Root growth and metabolism under oxygen deficiency. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A & KAFKAFI, U., eds. *Plant Roots: The Hidden Half*. 3.ed. New York, Marcel Dekker, 2002. p. 729-761.
- ARRUDA, G.M. & CALBO, M.E.R. Efeitos da inundação no crescimento, trocas gasosas e porosidade radicular da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore). *Acta bot. bras.* 18:219-224, 2004.
- BAI, T.; LI, C.; MA, F.; FENG, F. & SHU, H. Responses of growth and antioxidant system to root-zone hypoxia stress in two *Malus* species. *Plant Soil*, 327:95-105, 2010.
- BAILEY-SERRES, J. & VOESENEK, L.A.C.J. Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 59:313-339, 2008.
- BLAKE, T.J. & REID, D.M. Ethylene, water relations and tolerance to waterlogging of three *eucalyptus* species. *Aust. J. Plant Physiol.*, 8:497-505, 1981.
- BOARD, J.E. Waterlogging effects on plant nutrient concentrations in soybean. *J. Plant Nutr.*, 31: 828–838, 2008.
- BRADFORD, K.J. & HSIAO, T.C. Stomatal Behavior and Water Relations of Waterlogged Tomato Plants. *Plant Physiol.*,70:1508-1513, 1982.
- BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z. & ZHAO, F. Function of Nutrients: Micronutrients. In: MARSCHNER, P., ed. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3.ed. New York, Academic Press, 2012. p.191-248.
- CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.*, 23:458-460, 1975.
- CLARKSON, D.T. The uptake and translocation of manganese by plant roots. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J. & UREN, N.C., eds. *Manganese in soils and plants*. Dordrecht, Kluwer Academic, 1988. p.101-111.
- CLEMENS, J., ANN-MAREE KIRK & MILLS, P.D. The resistance to waterlogging of three *eucalyptus* species. *Oecologia*, 34:125-131, 1978.
- CLEMENS, J. & PEARSON, C.J. The effect of waterlogging on the growth and ethylene content of *Eucalyptus robusta* Sm. (Swamp Mahogany). *Oecologia*, 29:249-255, 1977.

- COLMER, T.D. Long-distance transport of gases in plants: A perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant Cell Environ.*, 26:17-36, 2003
- DANTAS, B.F.; ARAGÃO, C.A. & ALVES, J. D. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquima e atividade de celulases em plântulas de milho submetidas à hipoxia. *Sci. Agric.*, 58:251-257, 2001.
- DAT, J.F.; CAPELLI, N.; FOLZER, H.; BOURGEADE, P. & BADOT, P.M. Sensing and signaling during plant flooding. *Plant Physiol. Biochem.*, 42:273-282, 2004.
- DE VARENNES, A.; CARNEIRO, J.P. & GOSS, M.J. Characterization of manganese toxicity in two species of annual medics. *J. Plant Nutr.*, 24:1947-1955, 2001.
- DEMIREVSKA-KEPOVA, K.; SIMOVA-STOILOVA. L.; STOYANOVA, Z.; HOLZER, R. & FELLER, U. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ. Exp. Bot.*, 52:253-266, 2004.
- DREW, M.C.; HE, C.J. & MORGAN, P.W. Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays L.* *Plant Physiol.*, 91:266-271, 1989.
- EDWARDS, D.G. & ASHER, C.J. Tolerance of crop and pasture species to manganese toxicity. In: SCAIFE, ed. *Plant nutrition colloquium*, 8., Warwick, 1982. *Proceedings Farnham Royal, Commonwealth Agricultural Bureau*, 1982. p.140-150.
- ELAMIN, O.M. & WILCOX, G.E. Effect of magnesium and manganese nutrition on muskmelon growth and manganese toxicity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 111:582-587, 1986a.
- ELAMIN, O.M. & WILCOX, G.E. Effect of magnesium and manganese nutrition on watermelon growth and manganese toxicity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 111:588-593, 1986b.
- EL-JAOUAL, T. & COX, D.A. Manganese toxicity in plants. *J. Plant Nutr.*, 21:353-386, 1998.
- ERNANI, P.R. Sintoma de toxidez de manganês em macieira. Disponível em: <http://www.sbcs.org.br/solos/visao/verDetalheMaterial.php?material=11>.
- Acesso em: agosto 2012.
- FAGERIA, N.K. Adequate and toxic levels of copper and manganese in upland rice, common bean, corn, soybean and wheat grown on an Oxisol. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 32:1659-1676, 2001.

- FAGERIA, N.K.; FERREIRA, E.; PRABHU, A.S.; BARBOSA FILHO, M.P. & FILIPPI, M.C. Seja doutor do seu arroz. Piracicaba, Potafos, 1995. 20p. (Arquivo do Agrônomo, 9)
- FEDER, N. & O'BRIAN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am. J. Bot.*, 55:123-142, 1968.
- FERREIRA, F.A. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Vicosa: SIF, 1989. 570p.
- FOY, C.D.; SCOTT, B.J. & FISHER, J.A. Genetics and breeding of plant of manganese toxicity. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J. & UREN, N.C., eds. Manganese in soils and plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988. p.293-307.
- FOY, C. D.; CHANEY, R. L. & WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29:511-566, 1978.
- FOY, C.D. Differential aluminium and manganese tolerances of plant species and varieties in acid soils. *C. Cult.*, 28:150-155, 1976.
- GEORGE, E.; HORST, W.J. & NEUMANN, E. Adaptation of Plants to Adverse Chemical Soil Conditions. In: MARSCHNER, P., ed. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. 3.ed. New York, Academic Press, 2012. p.409-472.
- GONÇALVES, J.L.M.; VAN RAIJ, B.; GONÇALVES, J.C. Florestais. In: RAIJ, B.VAN; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2.ed. Campinas, Instituto Agronômico e Fundação IAC, 1996. p.245-259. Boletim Técnico, 100
- GRICHKO, V.P. & GLICK, B.R. Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 39:1-9, 2001.
- HAN, F.; SHAN, X.; ZHANG, S.; WEN, B. & OWENS, G. Enhanced cadmium accumulation in maize roots - The impact of organic acids. *Plant Soil*, 289:355-368, 2006.
- HE, C.J.; MORGAN, P.W. & DREW, M.C. Transduction of an ethylene signal required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation during hypoxia. *Plant Physiol.*, 112:463-472, 1996.
- HINZ, M.; WILSON, I.W.; YANG, I.; BUERSTENBINDER, K.; LLEWELLYN, D.; DENNIS, S.E.; SAUTER, M. & DOLFERUS, R. Arabidopsis RAP2.2: An ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiol.*, 153: 757-772, 2010.

- HORST, W. J. The physiology of manganese toxicity. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J. & UREN, N.C., eds. Manganese in soils and plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 175-188.
- HORST, W.J. & MARSCHNER, H. Effect of excessive manganese supply on uptake and translocation of calcium in bean plants (*Phaseolus vulgaris L.*). Zeitschrift Pflanzenphysiol., 87:137-148, 1978.
- HUGHES, N.P. & WILLIAMS, R.J.P. An introduction to manganese biological chemistry, In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J. & UREN, N.C., eds. Manganese in Soils and Plants, Dordrecht, Kluwer Academic, 1988. p. 7-19.
- JACKSON, M.B.; DAVIES, W.J. & ELSE, M.A. Pressure-flow relationships, Ann. Bot., 77:17-24, 1996.
- JACKSON, M. B. Communication between the root and shoots of flooded plants. In Importance of Root to Shoot Communication in the Response to Environmental Stress. British Sec. Plant Growth Regulation Nonography 21, p. 115-133, 1990a.
- JACKSON, M. B. Hormones and developmental change in plants subjected to submergence or soil waterlogging. Aquatic Bot., 38:49-72, 1990b.
- JOHANSEN, D.A. Plant Microtechnique. McGraw Hill, New York. 1940. 523p.
- JUNIOR, J.L.; MORAES, M.F.; CABRAL, C.P. & MALAVOLTA, E. Influência genotípica na absorção e na toxidez de manganês em soja. R. Bras. Ci. Solo, 32:173-181, 2008.
- KAWASE, M. Role of ethylene in induction of flooding in sunflower. Physiol. Plant., 31:29-38, 1974.
- KAWASE, M. Effect of flooding on ethylene concentration in horticultural plants. J. Am. Soc. Hort. Sci., 97:584-588, 1972.
- KHABAZ-SABERI, H.; SETTER, T. & WATERS, I. Waterlogging induces high to toxic concentrations of iron, aluminum, and manganese in wheat varieties on acidic soil. J. Plant Nutr., 29:899-911, 2006.
- KREUZWIESER, J. & GESSLER, A. Global climate change and tree nutrition: influence of water availability. Tree Physiol., 30:1221-1234, 2010.
- KOZLOWSKI, T.T. Responses of woody plants to flooding. In: KOZLOWSKI, T.T., ed. Flooding and plant growth. London, Academic Press, 1984. p. 129-163.
- LEITE, F.P.; NOVAIS, R.F.; SILVA, I.R.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L.N.; MEDEIROS, A.G.B.; VENTRELLA, M.C. & VILLANI, E.M.A. Excesso

- temporário de manganês em eucalipto e sua relação com a seca de ponteiro do eucalipto do Vale do Rio Doce. R. Bras. Ci. Solo, 2013 (No prelo).
- LICAUSI, F.; VAN DONGEN, J.T.; GIUNTOLI, B.; NOVI, G.; SANTANIELLO, A.; GEIGENBERGER, P. & PERATA, P. *HRE1* and *HRE2*, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 62:302-315, 2010.
- LIDON, F.C. & TEIXEIRA, M.G. Rice tolerance to excess Mn: Implications in the chloroplast lamellae and synthesis of a novel Mn protein. *Plant Physiol. Biochem.*, 38:969-978, 2000.
- LINGLE, J.C., TIFFIN, L.O. & BROWN, J.C. Iron uptake-transport of soybeans as influenced by other cations. *Plant Physiol.*, 38:71-76, 1963.
- LYNCH, J.; MARSCHENER, P. & RENGEL, Z. Effect of internal and external factors on root growth and development. In: MARSCHNER, P., ed. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3.ed. New York, Academic Press, 2012. p.331-346.
- MACFIE, S.M. & TAYLOR, G.J. The effects of excess manganese on photosynthetic rate and concentration of chlorophyll in *Triticum aestivum* grown in solution culture. *Physiol. Plant.*, 85:467-475, 1992.
- MACFIE, S.M., COSSINS, E.A. & Taylor, G.J. Effects of excess manganese on production of organic acids in Mn-tolerant and Mn-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. (wheat). *J. Plant Physiol.*, 143:135-144, 1994.
- MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T.C.; PEREIRA, F.J.; CASTRO, E.M. & PARENTONI, S.N. Atividade de enzimas do sistema antioxidante e as modificações no desenvolvimento de aerênquimas em raízes de milho sob alagamento. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Sorgo e Milho*, Sete Lagoas, 2009. 21p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C. & OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional de plantas: Princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba, Potafos, 1997. 308p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. & OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, Potafos, 1989. 201p.
- MARSCHNER, P. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3.ed. New York, Academic Press, 2012. 651 p.
- MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2.ed. New York, Academic, 1995. 889 p.

- MARTINAZZO, E.G.; PERBONI, A.T.; OLIVEIRA, P.V.; BIANCHI, V.J. & BACARIN, M.A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. *Cienc. Rural*, 43:35-41, 2013.
- McCAIN, D.C. & MARKLEY, J.L. More manganese accumulates in maple sun leaves than in shade leaves, *Plant Physiol.*, 90:1417-1421, 1989.
- MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; DELGADO, M.F. & CORREA, G.T. Aspectos morfo-anatômicos e fisiológicos de *Peltophorum dubium* (Spr.) Taub. submetida ao alagamento e à aplicação de Etrel. *R. Bras. Bot.*, 21:261-267, 1998.
- MELO, H.C.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M.; MELO, L.A. & ALVES, J.D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea*, 34:145-153, 2007.
- MENON, A.R. & YATAZAWA, M. Nature of manganese complexes in manganese accumulator plant *Acanthopanax sciadophylloides*, *J. Plant Nutr.*, 7:961-974, 1984.
- MORONI, J.S.; SCOTT, B.J. & WRATTEN, N. Differential tolerance of high manganese among rapeseed genotypes. *Plant Soil*, 253:507-519, 2003.
- OLIVEIRA JUNIOR, J. A.; MALAVOLTA, E. & CABRAL, C. P. Efeitos do manganês sobre a soja cultivada em solo de cerrado do triângulo mineiro. *Pesp. Agropec. Bras.*, 35:1629-1636, 2000.
- PAVAN, M. A. & BINGHAM, F.T. Toxidez de metais em plantas. I. Caracterização de toxidez de manganês em cafeeiros. *Pesq. Agropec. Bras.*, 16:825-821, 1981.
- PENG, H.P.; LIN, T.Y.; WANG, N.N. & SHIH, M.C. Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis* during hypoxia. *Plant Mol. Biol.*, 58:15-25, 2005.
- PEREIRA, G.D.; BERTONI, J.C.; CARVALHO, J.G. & MORAIS, A.R. Doses e modos de adubação com manganês e seus efeitos na produção da cultura do arroz. *R. Bras. Ci. Solo*, 25:625-633, 2001
- REHAB, F.I. & WALLACE, A. Excess trace metal effects on cotton. 1. Copper, zinc, cobalt and manganese in solution culture. *Commun. Soil Sci. Plant Nutr.*, 9:507-518, 1978.
- ROCHA, M.; LICAUSI, F.; ARAUJO, W.L.; NUNES-NESE, A.; SODEK, L.; FERNIE, A.R. & VAN DONGEN, J.T. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are

- linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicas*. *Plant Physiol.*, 152:1501-1513, 2010.
- RUZICKA, K.; LJUNG, K.; VANNESTE, S.; PODHORSKÁ, R.; BEECKMAN, T.; FRIML, J. & BENKOVÁ, E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell*, 19: 2197-2212, 2007.
- SHANNON, R.D.; WHITE, J.R.; LAWSON, J.E. & GILMOUR, B.S. Methane efflux from emergent vegetation in peat lands. *J. Ecol.*, 84:239-246, 1996.
- SCHENCK, H. Ueber das aerenchym, ein dem kork homogenes gewebe bei sumpfpflanzen. *Jahrb. Wisse. Bot.*, 20:526-574, 1890.
- SENA GOMES, A.R. & KOZLOWSKI, T.T. Effects of flooding on *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* seedlings. *Oecologia*, 46:139-142, 1980.
- SHIONO, K., TAKAHASHI, H., COLMER, T. D. & NAKAZONO, M. Role of ethylene in acclimations to promote oxygen transport in roots of plants in waterlogged soils. *Plant Sci.*, 175:52-58, 2008.
- SILVA, I.R.; NOVAIS, R.F.; JHAM, G.N.; BARROS, N.F.; GEBRIM, F.O.; NUNES, F.N.; NEVES, J.C.L. & LEITE, F.P. Responses of eucalypt species to aluminum: the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism. *Tree Physiol.*, 24:1267-1277, 2004.
- SUBBAIAH, C.C.; KOLLIPARA, K.P. & SACHS, M.M. A Ca²⁺-dependent cysteine protease is associated with anoxia-induced root tip death in maize. *J. Exp. Bot.* 51:721-730, 2000.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre, Artmed, 2009. 848p.
- TROUGHT, M.C.T. & DREW, M.C. The development of waterlogging damage in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). I. Shoot and root growth in relation to changes in the concentrations of dissolved gases and solutes in the soil solution. *Plant Soil*, 54:77-94, 1980.
- VAN DER MOEZEL, P.G.; WATSON, L.E & BELL, D.T. Gas exchange responses of two eucalyptus species to salinity and waterlogging. *Tree Physiol.*, 5:251-257, 1989.
- VAN DER STRAETEN, D.; ANUNTALABHOCHAI, S.; VAN CAENEGHEM, W.; ZHOU, Z.; GIELEN, J. & VAN MONTAGU, M. Expression of three members of the ACC synthase gene family in deepwater rice by submergence, wounding, and hormonal treatments. *Plant Sci.*, 124:79-87, 1997

- VISSER, E.J.W. & VOESENEK, L.A.C.J. Acclimation to soil flooding – sensing and signal-transduction. *Plant Soil*, 254:197-214, 2004.
- WINTERHALDEER, E.K. Differential resistance of two species of *Eucalyptus* to toxic soil manganese levels. *Aust. J. Sci.*, 25:363-364, 1963.
- WISSEMEIER, A.H. & HORST, W.J. Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Soil*, 143:299-309, 1992.
- WU, S. Effect of manganese excess on the soybean plant cultivated under various growth conditions. *J. Plant Nutri.*, 17:993-1003, 1994.
- YANG, W.E.; BALIGAR, V.C.; FOSTER, J.C. & MARTENS, D.C. Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize grown with different nickel levels. *Plant Soil*, 196:271-276, 1997.
- ZABINI, A.V.; MARTINEZ, H.E. & SILVA, C.A. Tolerância de progênies de cafeeiros (*Coffea arabica* L) ao excesso de manganês em solução nutritiva. *Coffee Science*, 2:87-96, 2007.
- ZANÃO JÚNIOR, L.A.; FONTES, R.L.F.; NEVES, J.C.L.; KORNDÖRFER, G.H. & ÁVILA, V.T. Rice grown in nutrient solution with doses of manganese and silicon. *R. Bras. Ci. Solo*, 34:1629-1639, 2010.