

IGNÁCIO HARGUINDEGUY

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS À HIPOXIA E A MANGANÊS EM CLONES
DE EUCALIPTO COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SECA DE
PONTEIROS 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

H279r
2013 Harguindeguy, Ignacio, 1987-
Respostas fisiológicas à hipóxia e a manganês em clones de eucalipto com tolerância diferencial à seca de ponteiros do Vale do Rio Doce / Ignacio Harguindeguy. – Viçosa, MG, 2013.
viii, 30 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Roberto Ferreira Novais.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 24-30.

1. Eucalipto - Resistência à seca. 2. Oxigênio - Efeito fisiológico. 3. Manganês. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Solos. Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. II. Título.

CDD 22.ed. 634.973766

IGNÁCIO HARGUINDEGUY

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS À HIPOXIA E A MANGANÊS EM CLONES
DE EUCALIPTO COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SECA DE
PONTEIROS 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*.

Aprovado em 31 de julho de 2013.

Prof. Roberto Ferreira Novais
(Orientador)

Prof. Wagner L. Araújo
(co-orientador)

Dr. Fernando Palha Leite

Prof. Leonardus Vergütz

AGRADECIMENTOS

A todos os meus amigos! Professores, laboratoristas, colegas de curso, estagiários, e qualquer um que tenha tornado esta vida em Viçosa uma experiência única.

Aos meus pais e irmãs pelo carinho e apoio.

Ao professor Roberto F. Novais, que brinca dizendo que é o desorientador, mas sempre me ajudou a abrir a mente e ver que não há um único caminho.

A Juliana e Flancer, que me ensinaram muito nessa vida acadêmica.

A Kelly, Loane, e Carol, que não se cansaram de salvar minha vida repetidas vezes!

A Marina, que suportou meus estresses e mudanças de humor durante todo o mestrado, nunca saindo do meu lado, especialmente o de dentro do coração!

CONTEÚDO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAIS E MÉTODOS	6
Determinação de trocas gasosas.....	7
Teores de nutrientes nas plantas.....	7
Enzimas e compostos do complexo antioxidativo	8
Determinação do dano oxidativo	9
Atividade de enzimas de resposta à hipóxia	9
Determinação do teor de pigmentos fotossintéticos.....	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
Produção de matéria seca.....	11
Teor de nutrientes na planta.....	12
Taxa fotossintética, trocas gasosas e pigmentos	16
Dano celular e complexo antioxidativo em folhas	16
Danos celulares e complexo antioxidativo em raízes.....	21
Enzimas fermentativas e resposta quiescente na raiz.....	21
CONCLUSÕES	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
LITERATURA CITADA.....	24

RESUMO

HARGUINDEGUY, Ignácio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. **Respostas fisiológicas à hipóxia e a manganês em clones de eucalipto com tolerância diferencial à Seca de Ponteiros do Vale do Rio Doce.** Orientador: Roberto Ferreira Novais. Coorientador: Wagner L. Araújo

A Seca de Ponteiros do Eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD) é uma anomalia que afeta cultivos de eucalipto em várias regiões do Brasil, cujas causas ainda não são completamente entendidas. Os sintomas deste distúrbio ocorrem na época de transição do período chuvoso para o seco, em maior incidência em áreas com drenagem deficiente e elevação do lençol freático quando precedidos por uma intensa época chuvosa. Em adição, o acúmulo de Mn também parece estar relacionado à SPEVRD, observando-se teores mais elevados deste nutriente nas folhas das plantas com sintomas. Assim, a presente proposta teve como objetivo compreender as possíveis causas iniciais da SPEVRD bem como identificar possíveis mecanismos fisiológicos, enzimáticos e, ou, fermentativos de tolerância superior do clone de *Eucalyptus* 2719 a esta anomalia, em relação ao clone sensível híbrido de urograndis 1213. Foi conduzido um experimento em hidroponia, em esquema fatorial 2 x 2 x 2 com dois clones (2719 e 1213), duas concentrações de O₂ (8 e 4 mg L⁻¹) e duas de Mn (1,39 e 300 mg L⁻¹), utilizando-se três repetições em delineamento em blocos casualizados. Foram utilizadas mudas com aproximadamente 40 dias de idade mantidas em solução nutritiva de Clark por mais 30 dias e em seguida foram aplicados os tratamentos por 11 dias. Ao final, avaliaram-se as trocas gasosas das plantas e amostras de folhas e raízes foram coletadas. Ambos os clones tiveram reduções na produção de matéria seca de raízes por efeito da hipóxia, mas apenas o tolerante (2719) suspendeu o crescimento das folhas, mantendo a proporção entre folhas e raízes semelhante independente do tratamento, enquanto o sensível (1213) teve um aumento dessa relação devido à queda de produção de raízes e manutenção do crescimento aéreo. O clone sensível acumulou mais Mn nas folhas novas em relação ao clone tolerante. Em ambos os clones, a taxa fotossintética e a condutância estomática foram reduzidas pela hipóxia, sendo que a concentração interna de carbono manteve-se alta, indicativo de limitações bioquímicas à fotossíntese. Em função da manutenção dos teores de clorofilas danos celulares podem acontecer caso

a energia absorvida não seja dissipada corretamente. Estes danos foram comprovados pela elevação dos teores de malonaldeído (MDA) nas folhas do clone sensível, fato não observado no tolerante. Em folhas, embora a atividade da superóxido dismutase (SOD) tenha sido superior no clone tolerante, tanto a atividade da catalase quanto a capacidade antioxidante total foram similares entre os clones, evidenciando que o clone tolerante provavelmente evita os danos por mecanismos preventivos à formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e não apenas desintoxicando-as. Nas raízes, os teores de MDA foram também superiores no clone sensível, especialmente no tratamento com excesso de Mn. O clone tolerante teve uma maior atividade da SOD e maior capacidade antioxidante nas raízes. As atividades da álcool desidrogenase (ADH), da alanina transaminase (AlaT) e da aspartato transaminase (AspT) elevaram-se sob hipóxia, com maior elevação da ADH no clone sensível, que demonstra possuir um metabolismo mais intenso, o que explica ao menos parcialmente, os maiores danos. O clone tolerante ativa respostas características de quiescência, traduzindo-se em maior sobrevivência de raízes profundas em condições de hipóxia. Tomados em conjunto, essa resposta deve conferir ao clone tolerante à SPEVRD maior tolerância também ao déficit hídrico, evitando danos e desordens nutricionais que podem levar ao surgimento dos sintomas da SPEVRD. Por outro lado, o clone sensível possui respostas de escape à hipóxia, que em campo podem lhe conferir maior susceptibilidade ao déficit hídrico, como também ao excesso de Mn nas folhas e iniciar possíveis danos e processos que provoquem esta anomalia.

ABSTRACT

HARGUINDEGUY, Ignácio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2013.
Physiological responses to hypoxia and manganese in eucalyptus clones with differential tolerance to Shoot Dieback of Eucalyptus in Vale do Rio Doce.
Adviser: Roberto Ferreira Novais. Co-adviser: Wagner L. Araújo

The Shoot Dieback of *Eucalyptus* in Vale do Rio Doce (*Seca de Ponteiros do Eucalipto do Vale do Rio Doce* - SPEVRD) is a physiological disorder which affects eucalyptus plantations in several regions of Brazil, whose causes are still not fully understood. The symptoms of this disorder occur in the transition from the rain season to the dry season, with higher incidence in areas with poor drainage and higher water table when preceded by an intense rainy season. In addition, the accumulation of Mn also seems to be related to SPEVRD, observing higher levels of this nutrient in plant leaves with symptoms. Thus, this proposal was aimed at understanding the possible initial causes of SPEVRD as well as identify possible physiological, enzymatic and, or, fermentation mechanisms that confer greater tolerance of *Eucalyptus* clone 2719 to this anomaly in relation to sensitive clone hybrid urograndis 1213. A hydroponic experiment was conducted with a factorial 2 x 2 x 2 with two clones (2719 and 1213), two concentrations of O₂ (8 e 4 mg L⁻¹) and two Mn (1,39 e 300 mg L⁻¹) using three replicates in randomized block design. Seedlings around 40 day old were maintained in Clark nutrient solution for 30 days and then treatments were applied for 11 days. At the end, it was evaluated gas exchange rate and leaves and roots were collected. The hypoxia affected both clones reducing root dry matter production, but only the tolerant clone suspended leaf growth, keeping the proportion between leaves and roots similar regardless the treatment, while the sensitive clone had an increase in this ratio due to the decrease production of roots and maintenance of leaf growth. The sensitive clone had higher concentrations of Mn in young leaves compared to the tolerant one. In both clones, the photosynthesis rate and stomatal conductance were reduced by hypoxia, but the internal carbon concentration remained high, indicating biochemical limitations to photosynthesis. Due to the maintenance of chlorophyll contents, cellular damage can occur if the absorbed energy is not properly dissipated. These damages were proven

by higher levels of malondialdehyde (MDA) in sensitive clone leaves, which increase was not observed in tolerant leaves. In leaves, although the superoxide dismutase (SOD) activity was higher in tolerant clone, both catalase activity and total antioxidant capacity were similar between clones, indicating that the tolerant clone probably has preventive mechanisms to avoid damage caused by reactive oxygen species (ROS) and not only detoxifying them. In roots, MDA levels were also higher in sensitive clone, especially in the treatment with excess of Mn. The tolerant one had a higher SOD activity and increased antioxidant capacity in roots. The activity of alcohol dehydrogenase (ADH), alanine transaminase (AlaT) and aspartate transaminase (AspT) were increased under hypoxia, with the highest elevation of ADH in the sensitive clone which demonstrates to have an increased metabolism, which explains, at least partially, the greater damage. The tolerant clone activates characteristic responses of quiescence, resulting in greater survival of deep roots in hypoxic conditions. Taken together, this response of the tolerant clone to SPEVRD may also increase tolerance to drought, avoiding damage and nutritional disorders that can lead to appearance of symptoms of SPEVRD. On the other hand, the sensitive clone has escape responses to hypoxia, which can confer increased susceptibility to drought, as well as to excess of Mn in leaves and potential damage that can initiate processes which cause this anomaly.

INTRODUÇÃO

A Seca de Ponteiros de Eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD) ocorre com maior intensidade em solos localizados nos fundos dos vales (Cambissolos) e em solos de origem aluvial (Neossolos Flúvicos), locais com drenagem deficiente. Em períodos chuvosos, o eucalipto cultivado no terço inferior e até o terço médio de encostas pode apresentar os sintomas. Embora ainda não se conheçam as causas que levam ao surgimento da SPEVRD, os sintomas desta anomalia são bem definidos, sendo caracterizados por lesões marrons, murcha e queda rápida de folhas, encarquilhamento, rachaduras em ramos laterais, presença de elevado teor de compostos fenólicos (Ferreira & Milani, 2002), dentre outros.

Existem semelhanças entre a SPEVRD e a toxidez causada por Mn que sugerem uma relação ou mesmo ser um dos principais fatores causadores da anomalia. Alguns sintomas da toxidez por Mn são manchas necróticas marrons que se iniciam nas folhas velhas e progridem para as mais novas (Fernandes, 2006). Vários sintomas normalmente associados à toxidez por Mn são, na verdade, deficiências de outros nutrientes induzidas pelo excesso de Mn (Marschner, 2012). Deficiências de Fe, Mg e Ca podem surgir em situações de excesso de Mn no solo e nas folhas (Horst, 1988). Por isso, o encarquilhamento de folhas jovens, morte de meristemas apicais e clorose internerval em folhas velhas também são frequentemente associadas à toxidez causada por Mn. As raízes que apresentam sintomas causados por toxidez de Mn possuem coloração marrom e, frequentemente, quebradiças (Reichman, 2002).

Uma característica comum às regiões de ocorrência da SPEVRD é que em áreas de baixada há uma elevação do lençol freático em anos de maior precipitação pluvial (Almeida et al., 2013). Dessa forma, esse longo período de saturação hídrica do solo, combinado com a alta densidade deste - o que dificulta ainda mais a difusão de gases - pode levar a condições de hipóxia (baixa concentração de O₂) na região radicular. Nesse ambiente redutor ocorre solubilização de óxidos e hidróxidos de Fe e Mn, e suas formas reduzidas tornam-se mais disponíveis para as plantas, podendo atingir teores tóxicos (Khabaz-Saberi et al., 2006). De fato, isto foi constatado por Leite et al. (2013) indicando elevados teores de Mn nas folhas de eucalipto, porém de forma diferencial entre clones de *Eucalytus*. O clone híbrido Urograndis 1215 (considerado sensível à SPEVRD) apresentou maiores teores de Mn (quase cinco

vezes maiores) quando comparado ao clone *E. grandis* 129, considerado tolerante à SPEVRD. Curiosamente em áreas onde os dois clones são plantados o 129 apresenta uma menor incidência da SPEVRD, sendo por isso considerado tolerante a essa anomalia.

Para reverter os problemas causados pelo hipóxia, algumas plantas adotam mecanismos de escape, conhecida como LOES (Low Oxygen Escape Syndrome - Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Tais mecanismos têm alto custo energético sendo ativados por genes específicos e comumente encontrados em plantas adaptadas a longos períodos de alagamento. As plantas que são originárias de áreas que não estão sujeitas a alagamentos frequentes possuem diferentes níveis de tolerância. Uma resposta comum ao alagamento, a formação de raízes adventícias (Bailey-Serres & Voesenek, 2008), caracterizada como escape, é uma resposta tanto de plantas consideradas tolerantes como de plantas consideradas sensíveis à hipóxia. Caracteriza-se pela formação de raízes na área mais próxima da superfície, onde o estresse hipóxico é menor.

Outra resposta à hipóxia encontrada em algumas plantas é conhecida como LOQS (Low Oxygen Quiescence Syndrome - Bailey-Serres & Voesenek, 2010), também denominada como tolerância real à hipóxia, por ser uma resposta de tolerar o estresse em vez de evitá-lo. As respostas dessas espécies estão mais relacionadas a mecanismos de quiescência, como alterações em rotas metabólicas, aumento da eficiência energética, um fino ajuste entre produção e consumo de ATP, manutenção do pH citosólico e redução dos danos provocados pela hipóxia como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou outros compostos tóxicos (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Ou seja, na LOES a planta produz novos tecidos fora da área de hipóxia ou traz o oxigênio de outras partes para contornar a hipóxia, enquanto na LOQS a planta sobrevive naquela situação o maior tempo possível até que o evento de hipóxia passe.

Como o nome indica, na hipóxia há pouca disponibilidade de O₂, comprometendo a respiração aeróbia. Para superar tal situação são necessárias rotas metabólicas alternativas e uma otimização do consumo de ATP. A glicólise torna-se a principal via para produção de ATP, porém ela é cerca de 18 vezes menos eficiente que o ciclo completo, além de necessitar NAD⁺. Para sua regeneração, rotas fermentativas são intensificadas (Licausi & Perata, 2009).

Inicialmente, a lactato desidrogenase (LDH) é a rota preferencial para formação de ATP e regeneração do NADH. Porém o lactato provoca queda no pH citosólico, o que inativa a LDH e ativa a piruvato descarboxilase (PDC) e a álcool desidrogenase (ADH). A fim de suprimir essa deficiência energética, ocorre um aumento na produção e nas atividades das enzimas ADH e LDH (Liao & Lin, 2001). As enzimas da rota alcoólica mostram-se, em certos casos, essenciais à sobrevivência de plantas sob hipóxia, uma vez que, por não reduzir o pH, provocariam menor dano à célula.

Apesar da toxidez causada por álcool em elevadas concentrações, ele possui alta capacidade de atravessar membranas, difundindo-se para o meio externo com facilidade (Liao & Lin, 2001), sendo que algumas plantas também o transportam para a parte aérea (Rottenberger et al., 2008), onde pode ser metabolizado pela ADH e acetaldeído desidrogenase (ALDH). O acetaldeído, composto intermediário da fermentação alcoólica, é altamente tóxico e por isso a importância da alta atividade da ADH. Um aumento da atividade da ALDH já foi documentado em coleóptilos de arroz sob hipóxia (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007), porém pode ser uma resposta desvantajosa por reduzir um NAD^+ , que já se encontra em falta pela paralização da respiração aeróbia.

Embora já tenha sido comprovado em várias espécies que a glicólise e as rotas fermentativas são fundamentais para sobrevivência à hipóxia, o simples aumento da atividade dessas rotas não é o suficiente para uma prolongada tolerância a este estresse (Bailey-Serres & Voeselek, 2008). Assim, o acúmulo de certos metabólitos são indicações de quais rotas metabólicas estão mais ativas. Além do acúmulo de lactato e álcool, têm sido observado o acúmulo de alanina, ácido γ -aminobutírico (GABA), succinato, e alguns casos até mesmo de malato (Drew, 1997; Bailey-Serres & Voeselek, 2008; Rocha et al., 2010).

O acúmulo de piruvato na célula é um sinalizador de que teoricamente haverá energia em pouco tempo, pois entraria no ciclo de Krebs fornecendo ATP caso tenha O_2 disponível, intensificando outras rotas e reações que dependem de ATP como a duplicação de DNA, crescimento e absorção ativa de nutrientes. Por isso, para entrar em um estado de quiescência o tecido deve possuir teores baixos de piruvato para reduzir a demanda da célula por ATP. Por meio de algumas enzimas como a Alanina Transaminase, Aspartato Transaminase e Succinyl-CoA, é possível reduzir o metabolismo celular (Rocha et al., 2010).

A glicólise e a fermentação são pouco eficientes para suprir a energia necessária para sobrevivência. Portanto, será necessário ou reduzir a demanda metabólica por energia (como já descrito) ou consumir muitos carboidratos por unidade de tempo (Kreuzwieser, 2004). Para a segunda opção, a planta necessitará continuamente transportar fotoassimilados para a raiz (que terá dificuldade de descarregá-los do floema por ser um processo que consome ATP) ou esta irá morrer por esgotamento de reservas (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). A redução dos gastos de ATP (assim como a redução da disponibilidade de ATP) pode reduzir o descarregamento do floema, comprometendo o fluxo de fotoassimilados, provocando acúmulo de açúcares e amido em folhas (Kreuzwieser, 2004).

Mesmo em um ambiente limitante de O₂ ocorre a formação de ERO. O acúmulo de peróxido em condições de hipóxia já foi documentado em folhas e raízes de *Hordeum vulgare* (Kalashnikov et al., 1994) e em raízes de trigo (Biemelt et al., 2000). Evidências da formação de ERO em condições de hipóxia foram também demonstradas em diversos outros trabalhos (Yan et al., 1996; Chirkova et al., 1998; Blokhina et al., 1999). As ERO reagem degradando muitos compostos, sendo os lipídeos da membrana um destes (Du & Bramlage, 1992).

Uma vez que a síntese *de novo* da membrana plasmática tem alto custo energético, as células radiculares têm muita dificuldade em refazê-la sob hipóxia, tornando a preservação dos lipídeos da membrana a maneira mais eficiente de manter uma membrana funcional, o que poderia evitar a entrada indiscriminada de íons. Tem sido observado que espécies de plantas tolerantes à hipóxia (e.g. *Acorus calamus* e *Schoenoplectus lacustris*) são capazes de manter seus lipídeos polares durante a anóxia e pós-anóxia, enquanto que plantas sensíveis a hipóxia, como a *Iris germanica*, apresentam uma queda significativa nos lipídeos polares e, conseqüentemente, um aumento de ácidos graxos livres (FFA) e aumento característico da peroxidação de lipídeos durante a reoxigenação (Blokhina et al., 2003). Desta forma, o balanço entre a formação e desintoxicação das ERO é crítica para sobrevivência da célula durante alagamento (Hsu et al., 2000; Kato et al., 2001).

Com a menor disponibilidade de ATP ocorre redução na síntese de aquaporinas (Bramley & Tyerman, 2010), reduzindo a absorção e suprimento de água para a parte aérea. Dessa forma, o transporte de hormônios, nutrientes e outros solutos às partes apicais via fluxo de massa pode reduzir (Jackson et al., 1996; Grichko & Glick, 2001). Essas mudanças podem modificar a fisiologia, o

crescimento e o desenvolvimento da parte aérea, em especial as partes mais novas. Essas modificações podem incluir degradação de moléculas de clorofila, queda na permeabilidade das membranas, peroxidação, queda na expansão foliar, epinastia e redução na condutância estomática.

O fechamento estomático reduz as trocas gasosas, impedindo uma absorção eficiente de CO₂ comprometendo a fixação de C. O acúmulo de amido e açúcares em folhas devido a menor translocação às raízes provoca uma retroinibição na fotossíntese, provocando efeitos similares à baixa disponibilidade do CO₂. Os fotossistemas continuam absorvendo energia luminosa e se esse excesso de energia não for devidamente dissipado pode produzir ERO (Schanz et al., 1996; Carvalho & Amancio, 2002), cujo acúmulo pode levar à senescência e até à morte de tecido ou da planta (Sgherri et al., 1993). A elevação nas atividades das enzimas do complexo antioxidativo já foi verificada como importante na tolerância ao alagamento em tabaco (Hung & Kao, 1994), feijão-mungo (Ahmed et al., 2002), milho (Yan & Dai, 1996), batata-doce (Hwang et al., 2000), trigo (Bielmelt et al., 1998), soja (Van Taai & Bolles, 1991), arroz (Ushimaro et al., 1992) e *Populus trichocarpa* (Fayer et al., 1995).

Após a absorção dos nutrientes, eles são transferidos ao xilema, onde então são translocados para as demais partes da planta. Porém, alguns nutrientes quando em excesso devem ser evitados, pois podem causar fitotoxidez à planta. Harrington et al (1996) e Reichman (2002) observando plantas em condições de excesso de alguns nutrientes, relataram que a maioria destes apresentavam maiores concentrações nas raízes. Este fato provavelmente ocorra devido à incorporação de um grande número de sítios de ligação específicos para estes nutrientes na parede celular das raízes, prevenindo que o xilema os receba em carga excessiva (Liao et al., 2000). Alguns nutrientes, no entanto, apresentam baixa capacidade de ligação. Isso explicaria porque plantas que crescem em condições de excesso de Mn normalmente têm uma maior concentração deste metal nas folhas (Chino & Baba, 1981), uma vez que o Mn apresenta baixa capacidade de ligação e, com isso, menor restrição de sua entrada no xilema, quando comparado, por exemplo, a outros nutrientes como Cu e Zn (Foy et al., 1978; Reichman, 2002).

O dano celular causado por toxidez de metais depende da quantidade de ERO formada e da capacidade da planta em fazer a desintoxicação e reparo dos danos. Tem sido demonstrado que o excesso de Mn é responsável pela formação de ERO

como O_2^- , H_2O_2 e OH^* (Demirevska-Kepova et al., 2004; Boojar & Goodarzi, 2008). Nessas circunstâncias, as células se protegem do estresse oxidativo por meio da ação combinada de várias enzimas antioxidantes como SOD (superóxido dismutase), Catalase, APX (ascorbato peroxidase), GPX (glutathione peroxidase), GR (glutathione reductase) e também com mecanismos antioxidantes não enzimáticos como ascorbato, glutathione, compostos fenólicos e fitoalequinas (Arora et al., 2002).

O cultivo de arroz em condição de excesso de Mn ocasionou inibição do crescimento de folhas e raízes (Srivastava, 2011). Devido à toxidez por Mn, os níveis de ERO foram elevados, provocando danos às membranas. Consequentemente, enzimas do sistema antioxidativo, como a SOD, a GPX e a GR apresentaram aumento de suas atividades, amenizando o estresse oxidativo em função da fitotoxidez por Mn.

A maioria dos trabalhos diferenciando comportamentos de LOQS e LOES são realizados com plantas herbáceas. Poucos trabalhos com plantas lenhosas avaliam como as respostas diferenciais destas plantas influenciam a sobrevivência das raízes em profundidade no solo, muito menos os efeitos destas respostas em relação aos ciclos de umedecimento e secagem do solo.

É possível que a SPEVRD se inicie por danos provocados pela hipóxia, talvez intensificados pelo Mn. A resposta de tolerância do clone 2719 pode estar relacionada com uma resposta diferenciada à hipóxia e, ou, ao Mn, reduzindo danos e com maior sobrevivência das raízes.

A presente proposta tem como objetivo compreender as possíveis causas iniciais da SPEVRD bem como identificar prováveis mecanismos fisiológicos, enzimáticos e, ou, fermentativos de tolerância diferencial a esta anomalia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um experimento fatorial 2 x 2 x 2, com dois clones, dois níveis de oxigenação e duas concentrações de Mn, foi conduzido em hidroponia em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados dois clones de *Eucalyptus* produzidos pela Celulose Nipo-Brasileira S/A com susceptibilidades diferentes à SPEVRD baseados em observações de campo. Um híbrido Urograndis susceptível (1213) e outro clone híbrido Rio Claro (*E. grandis* x desconhecido) tolerante à SPEVRD (2719). A oxigenação foi aplicada em

duas concentrações de O₂: normal (8 mg L⁻¹) e hipóxica (4 mg L⁻¹), ajustadas com injeção contínua de N₂. O Mn foi aplicado em duas concentrações: 1,39 e 300 mg L⁻¹, definidas em experimentos anteriores. Foram utilizados três repetições em blocos inteiramente casualizados.

Inicialmente as mudas receberam solução de Clark (Clark, 1975) pH 5,5, com metade da concentração e oxigenação adequada (8 mg L⁻¹) durante 15 dias, quando então receberam a solução de Clark completa por mais 15 dias. Foram adicionados ainda 100 µmol L⁻¹ de Al na solução nutritiva para promover estabilidade de membrana (Silva et al., 2004). QAo final destes 15 dias, aplicaram-se os tratamentos. A redução da concentração de O₂ foi feita de forma gradual, reduzindo-a a cada 6 h, até ficar entre 4 e 6 mg L⁻¹. Passados 11 dias desde a aplicação dos tratamentos, as plantas foram coletadas e subdivididas em folhas novas, velhas, caule e raiz. Amostras de folhas totalmente expandidas e de raízes foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C para posterior análise.

Determinação de trocas gasosas

Trocas gasosas foram analisadas no último dia do experimento antes da coleta do material. Foram utilizadas a terceira ou quarta folha completamente expandida a partir do ápice do ramo ortotrópico das plantas. As taxas de assimilação líquida de carbono (*A*), a condutância estomática (*g_s*), a transpiração (*E*) e a concentração interna de CO₂ (*C_i*) foram medidas entre 7:00 e 11:00 h, sob luz saturante artificial (1400 µmol m⁻² s⁻¹), concentração de CO₂ ambiente, com um analisador de gás a infravermelho (IRGA– *Infrared Gas Analyzer*) LICOR modelo 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA). Em todas as análises a quantidade de luz azul aplicada foi de 10% da radiação fotossinteticamente ativa (*RFA*) para maximizar a abertura estomática. Mais detalhes foram descritos por Cavatte et. al. (2002).

Teores de nutrientes nas plantas

O material vegetal de folhas novas e velhas, caule e raiz foi pesado, seco em estufa com circulação forçada de ar a 72 °C até peso constante e, posteriormente, moído. Os teores de Mg, Ca, Fe, Cu, Zn e Mn, foram determinados após digestão nitro-perclórica em espectrofotometria por absorção atômica e o K por fotometria de emissão de chama. Os teores de N foram determinados pelo método Kjeldahl, descrito por Bataglia et al. (1983).

Enzimas e compostos do complexo antioxidativo

Para determinação da atividade das enzimas SOD e CAT, foi preparado um extrato enzimático utilizando-se 0,060 g de tecido foliar ou 0,10 g de tecido radicular congelado, macerados com 40 mg de PVPP (polyvinylpyrrolidone) em almofariz e pistilos congelados e 1 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,8) e Triton X-100 a 1 %. O material macerado foi centrifugado à 15.000 g por 20 min a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para a análise da atividade das enzimas e quantificação de proteínas solúveis totais como descrito por Bradford (1976).

A determinação da atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi feita pela adição de 30 µL de extrato enzimático diluído (1:10) a 220 µL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8) contendo metionina 13 mmol L⁻¹, 75 µL de azul de p-nitro tetrazólio (NBT), EDTA 0,1 mmol L⁻¹ e riboflavina 2 µmol L⁻¹. A reação foi conduzida em placa de ELISA disposta em câmara de reação a 25 °C, sob iluminação de lâmpada fluorescente de 45 W. Após 7,5 min de exposição à luz a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi quantificada em espectrofotômetro a 560 nm. Um meio de reação idêntico foi mantido no escuro por igual período, sendo utilizado como branco (Giannopolitis & Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

A atividade da catalase (EC 1.11.1.6) foi determinada pelo consumo de H₂O₂ determinado pelo decréscimo da absorbância a 240 nm por 2 min, de acordo com o método descrito por Aebi (1983). O meio de reação foi um tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,0), com H₂O₂ 40 mmol L⁻¹ e 100 µL de extrato enzimático diluído (1:10) para um volume final de reação de 1 mL. O branco foi constituído por uma solução sem extrato. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ e uma unidade de catalase foi definida como quantidade necessária para reduzir 1 µmol min⁻¹ de H₂O₂.

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), como descrito por Benzie & Strain (1996). Tecidos vegetais provenientes de folhas e raízes (0,050 e 0,100 g, respectivamente) foram macerados em almofariz e pistilos congelados sem o acréscimo de PVPP. Foi adicionado 1 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 6,8) com

Triton X-100 a 1% e EDTA a 0,1 mmol L⁻¹. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 min e o sobrenadante coletado. O meio de reação foi preparado na relação de 10:1:1, sendo eles tampão acetato 300 mmol L⁻¹ (pH 3,6), tripiridiltriasina (TPTZ) 10 mmol L⁻¹ dissolvido em 40 mmol L⁻¹ de HCl e 20 mmol L⁻¹ de FeCl₃. Pipetaram-se 2,5 µL do extrato enzimático de raízes e 5 µL de extrato enzimático foliar diluído (1:100) em tampão de extração, ambos completando-se para um volume final de reação de 300 µL em placa de ELISA. Foi preparada uma curva de concentrações conhecidas de FeCl₂ e a incubação por 5 min a 37 °C seguido de leitura a 593 nm. A capacidade antioxidante total foi expressa em µmol g⁻¹ de matéria seca.

Determinação do dano oxidativo

Tecidos vegetais provenientes de folhas e raízes (0,050 e 0,100 g, respectivamente) foram macerados em almofariz e pistilos congelados com 40 mg de PVPP. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA 0,1 %, p/v), seguido de centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4 °C. Em um tubo com tampa de rosca foram acrescentados 500 µL do sobrenadante e 1,5 mL da solução de TCA 20 % (p/v) contendo 0,65 % (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrio). As amostras foram então misturadas vigorosamente e incubadas a 95 °C por 25 min no escuro e a reação foi paralisada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 10 min. A leitura foi feita em placa de Elisa nos comprimentos 440, 532 e 600 nm e os cálculos foram feitos como sugeridos por Du & Bramlage (1992).

Atividade de enzimas de resposta à hipóxia

Foi pesado 0,110 g de tecido radicular congelado e macerados com 40 mg de PVPP (polyvinylpyrrolidone) em almofariz e pistilos congelados, acrescentado 1 mL de solução tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,0) com Triton X-100 a 1%, DTT (dithiothreitol) 10 mmol L⁻¹, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol L⁻¹ e EDTA 1 mmol L⁻¹. O material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante recolhido e separadas alíquotas para análises das atividades das enzimas e quantificação de proteínas solúveis totais como descrito por Bradford (1976).

A enzima Alanina Transaminase (AlaT; EC 2.6.1.2) teve sua atividade quantificada como descrito por Good & Muench (1992). A solução de reação

utilizada foi um tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8,0) com NADH 0,2 mmol L⁻¹, L-Alanina 20 mmol L⁻¹, 1 unidade de Lactato desidrogenase, 30 µL de extrato enzimático e 2-oxiglutarato 10 mmol L⁻¹ (*Start*). Para os cálculos da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ e uma unidade de AlaT foi definida pela oxidação de 1 µmol min⁻¹ de NADH.

A enzima Aspartato Transaminase (AspT; EC 2.6.1.1) teve sua atividade quantificada como descrito por Griffith & Vance (1989). A solução de reação utilizada foi um tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8,0) com NADH 0,2 mmol L⁻¹, L-Asparato 20 mmol L⁻¹, 30 µL de extrato enzimático e 2-oxiglutarato 10 mmol L⁻¹ (*Start*). Para os cálculos da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ e uma unidade de AspT foi definida pela oxidação de 1 µmol min⁻¹ de NADH.

A enzima Álcool Desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) teve sua atividade quantificada como descrito por Kogawara et al. (2006). A solução de reação utilizada foi composta de um tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0), DTT 2 mmol L⁻¹, NAD⁺ 0,25 mmol L⁻¹, 30 µL de extrato enzimático e etanol a 5 %. A reação foi quantificada na direção da oxidação do etanol. Para os cálculo foi utilizado o coeficiente de extinção de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ e uma unidade de ADH foi definida pela formação de 1 µmol min⁻¹ de NADH.

Determinação do teor de pigmentos fotossintéticos

Para a avaliação de pigmentos fotossintéticos, um disco foliar com 1 cm de diâmetro foi colocado em um tubo de vidro com tampa, acrescentado 7 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio. Foram incubados em banho-maria a 65 °C por 1,5 h no escuro. As leituras foram feitas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm, como descritos por Wellburn (1994).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente segundo delineamento de blocos casualizados, com os tratamentos arranjados em esquema fatorial 2 x 2 x 2 com dois clones, dois níveis de oxigenação e duas concentrações de Mn utilizando-se três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre médias realizado pelo teste *F* ($P \leq 0,05$) com auxílio algoritmos presentes no programa Microsoft Excel[®] (Microsoft, Seattle).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de matéria seca

As mudas utilizadas no experimento não apresentavam inicialmente o mesmo tamanho e assim mudas do clone sensível à SPEVRD (1213) eram visivelmente maiores que as do clone tolerante à SPEVRD (2719). Esperava-se que estas diferenças se reduzissem ao longo do experimento, porém isso não ocorreu. Assim, ao final do experimento, em todos os tratamentos, o clone sensível (1213) apresentava maior massa seca. Por este motivo, os dados de matéria seca são discutidos comparando-se os efeitos dos tratamentos em relação ao tratamento controle (sem hipóxia e com concentração normal de Mn), dentro de cada clone.

A hipóxia influenciou a produção de matéria seca das folhas de forma diferente entre clones. O clone sensível (1213) apresentou menor redução do crescimento (cerca de 9 %), enquanto o clone tolerante apresentou uma redução mais acentuada (cerca de 44 %). O Mn não influenciou significativamente nenhum dos tratamentos (Figura 1).

Para as raízes, o comportamento entre clones foi semelhante, ambos tiveram perdas superiores a 40 % na produção de matéria seca sob hipóxia (Figura 1). Novamente não foram observadas diferenças significativas causadas pelo Mn.

Essa diferença de respostas entre as folhas e raiz levou a uma diferença na relação entre folha e raiz sob hipóxia. Enquanto o clone tolerante (2719) manteve a proporção, com pequena elevação nos tratamentos sob hipóxia (média de 13,5 %), o sensível apresentou aumento médio de 67 % dessa relação. A paralização do crescimento da parte aérea pode ter diferentes motivos: redução acentuada da fotossíntese; redução dos teores de nutrientes provocando limitação do crescimento ou redirecionamento dos carboidratos produzidos para outras funções que não o crescimento, como defesas, compostos secundários ou reparo de danos. Estes possíveis efeitos são discutidos mais à frente.

Nas raízes de ambos os clones foi observada formação de raízes adventícias, porém com maior intensidade e frequência no clone sensível (Figura 2). A formação de raízes adventícias é uma resposta comum de escape à hipóxia em muitas plantas (Bailey-Serres & Voisenek, 2008), porém pode tornar a planta mais susceptível ao déficit hídrico, uma vez que são raízes superficiais (Kozłowski, 1997).

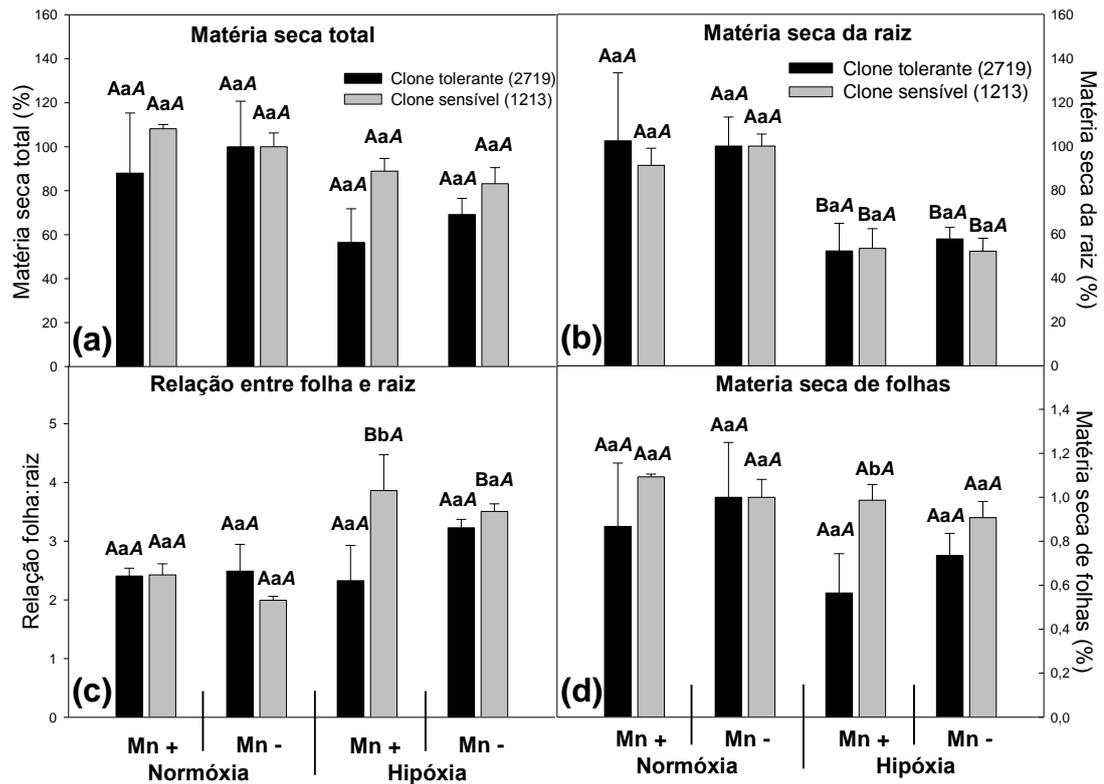


Figura 1: Produção de matéria seca do experimento em hidroponia com dois clones de *Eucalyptus*. Matéria seca total relativa ao tratamento controle (a). Matéria seca da raiz relativa ao tratamento controle (b). Relação entre matéria seca de folhas e de raiz (c). Matéria seca de folhas relativa ao tratamento controle (d). As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de O₂ (normóxia 8 mg L⁻¹ e hipóxia 4 mg L⁻¹), para o mesmo clone e mesma concentração de Mn. As letras minúsculas comparam o efeito dos clones (um tolerante e outro sensível à SPEVRD), para as mesmas concentrações de Mn e O₂. Letras maiúsculas em itálico comparam o efeito da concentração de Mn da solução nutritiva (300 e 1,39 mg L⁻¹), para o mesmo clone e mesmas concentrações de O₂. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Teor de nutrientes na planta

Ambos os clones tiveram variações similares dos teores de nutrientes quando aplicados os tratamentos de hipóxia e Mn, com pequenas diferenças entre elas (Quadro 1). A hipóxia provocou diminuições significativas nos teores de macro e micronutrientes na parte aérea, chegando a concentrações consideradas baixas para Zn, Fe e Mg (Camargo et al., 1997) Já nas raízes a hipóxia elevou os teores de Fe em ambos os clones, em especial com a aplicação de maiores concentrações de Mn na solução nutritiva. No clone tolerante (2719) houve incremento do teor de Fe nas raízes em 112 e 49 %, para concentrações excessiva (300 mg L⁻¹) e normal (1,39 mg L⁻¹) de Mn, e no clone sensível em 193 % e 79 %, respectivamente. Um mecanismo

de defesa observado em diversas espécies submetidas a altas concentrações de nutrientes é a formação de sítios de ligação na parede celular das raízes (Foy et al., 1978; Reichman, 2002). Dessa forma, para teores tóxicos de Zn e Cu, por exemplo, observa-se maiores teores desses nutrientes nas raízes. É possível assim que os clones submetidos a essa situação tenham produzido um maior número de sítios de ligação em resposta à dose excessiva de Mn; porém, como o Fe possui maior capacidade de ligação do que o Mn uma maior concentração do Fe nas raízes nos tratamentos com excesso de Mn seria esperado. Este acúmulo de Fe nas raízes foi também observado em outro experimento similar com estes mesmos clones (Lacerda, 2013).

Como esperado, os tratamentos com 300 mg L⁻¹ de Mn tiveram maiores teores deste micronutriente em todas as partes da planta. Nas folhas novas, o clone sensível (1213) apresentou teores de Mn em média 56 % maiores em todos os tratamentos quando comparados com o clone tolerante (2719). O clone sensível (1213) também acumulou mais Mn em folhas velhas nos tratamentos sob normóxia. Em ambos os clones a hipóxia causou redução do teor de Mn das folhas novas em, aproximadamente, 33 % para o clone tolerante, e em 44 % para o sensível. Com a hipóxia, os teores de Mn nas raízes do clone tolerante (2719) sob excesso de Mn passaram de 3.055 para 4.169 mg kg⁻¹ e no sensível (1213) de 2.535 para 6.014 mg kg⁻¹. O Mn comumente acumula nas folhas (Chino & Baba, 1981), porém o aumento similar dos teores de Mn em todos os tecidos pode ser devido ao curto período que os tratamentos foram aplicados.

A hipóxia reduz a capacidade de absorção de nutrientes provocando reduções de seus teores na parte aérea, em parte explicada pela redução da absorção de água reduzindo o transporte, mas também pela redução da absorção ativa nas raízes pela limitação da energia disponível pela glicólise (Liao & Lin, 2001; Parent, et al., 2008; Marschner, 2011). Um tecido radicular em estado de quiescência deve reduzir ao mínimo necessário os gastos de energia, bem como a absorção ativa de nutrientes. Com a redução da expansão foliar, a absorção de nutrientes também é reduzida, preservando o sistema radicular, pois este poderá destinar suas reservas para sobrevivência ao invés de gastá-la na absorção ativa de nutrientes (Fukao & Bailey-Serres, 2004), assim como evitando desordens nutricionais na parte aérea pela menor absorção de nutrientes



Figura 2: Fotos do experimento (a, b) utilizando dois clones de *Eucalyptus* com tolerância diferencial à SPEVRD, submetidos a diferentes concentrações de O₂ (8 e 4 mg L⁻¹) e Mn (300 e 1,39 mg L⁻¹). Cada unidade experimental é constituída por duas plantas. Parte aérea (c) e raiz (d) do clone tolerante (129) sob normóxia com 300 mg L⁻¹ de Mn. Parte aérea (e) e raiz (f) do clone sensível (1215) sob normóxia com 1,39 mg L⁻¹ de Mn. Raízes do clone tolerante sob hipóxia com 300 mg L⁻¹ de Mn (g,h) e com 1,39 mg L⁻¹ de Mn (i), destaque para menor formação de raízes adventícias. Raízes do clone sensível sob hipóxia com 300 mg L⁻¹ de Mn (j, k), e com 1,39 mg L⁻¹ de Mn (i, m), destaque para maior formação de raízes adventícias

Quadro 1: Teores de nutrientes em folhas novas e velhas, raiz e caule de dois clones de *Eucalyptus*, um tolerante (129) e outro sensível (1215) à SPEVRD, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de Mn (300 mg L⁻¹ e 1,39 mg L⁻¹) e de O₂ (normóxia 8 mg L⁻¹ e hipóxia 4 mg L⁻¹).

O ₂	Mn	N	K	Ca	Mg	Mn	Cu	Fe	Zn
mg L ⁻¹	dag kg ⁻¹					mg kg ⁻¹			
Folhas Novas									
-----Clone tolerante-----									
8	300	3,28 AaA	1,10 AaA	1,01 AaA	0,44 AaA	2993 AaA	10,4 AaA	51,2 AaA	30,2 AaA
	1,39	4,08 AaB	1,51 AaA	1,02 AaA	0,44 AaA	381 AaB	12,3 AaA	79,5 AaA	32,4 AaA
4	300	2,38 BaA	0,70 AaA	0,76 AaA	0,29 AaA	1977 BaA	5,6 BaA	26,3 AaA	14,7 BaA
	1,39	2,35 BaA	0,98 AaA	0,65 AaA	0,31 AaA	243 AaB	6,6 BaA	34,1 BaA	17,2 BaA
-----Clone sensível-----									
8	300	3,41 AaA	1,27 AaA	0,95 AaA	0,41 AaA	5083 AbA	11,2 AaA	69,7 AaA	35,5 AaA
	1,39	3,51 AaA	2,32 AaB	1,03 AaA	0,61 AaB	557 AaB	10,3 AaA	70,3 AaA	30,8 AaA
4	300	2,14 BaA	0,97 AaA	0,69 AaA	0,28 AaA	2811 BaA	5,8 BaA	29,4 BaA	14,6 BaA
	1,39	2,22 BaA	0,93 BaA	0,73 AaA	0,35 BaA	315 AaB	6,0 BaA	30,9 BaA	15,9 BaA
Folhas Velhas (maduras)									
-----Clone tolerante-----									
8	300	2,89 AaA	1,11 AaA	1,01 AaA	0,29 AaA	2407 AaA	11,3 AaA	63,5 AaA	32,4 AaA
	1,39	3,13 AaA	1,60 AaA	1,32 AaA	0,36 AaA	714 AaB	14,9 AaA	99,3 AaB	35,8 AaA
4	300	2,30 AaA	0,73 AaA	1,10 AaA	0,29 AaA	1748 AaA	6,3 BaA	74,1 AaA	23,6 BaA
	1,39	2,50 AaA	1,02 BaA	1,05 AaA	0,31 AaA	629 AaB	7,3 BaA	63,7 BaA	23,0 BaA
-----Clone sensível-----									
8	300	3,24 AaA	1,13 AaA	1,03 AaA	0,33 AaA	3899 AbA	12,9 AaA	88,2 AaA	26,8 AaA
	1,39	3,48 AaA	1,38 AaA	1,24 AaA	0,45 AbB	777 AaB	13,2 AaA	99,3 AaA	26,6 AbA
4	300	2,30 AaA	1,00 AaA	0,74 AaA	0,27 AaA	1301 BaA	7,7 BaA	56,9 BaA	17,4 BaA
	1,39	2,14 BaA	0,75 BaA	0,74 BaA	0,25 BaA	608 AaA	8,5 BaA	57,0 BaA	19,3 AaA
Raiz									
-----Clone tolerante-----									
8	300	2,01 AaA	1,12 AaA	0,99 AaA	0,36 AaA	3055 AaA	60,5 AaA	1691 AaA	252 AaA
	1,39	1,97 AaA	0,88 AaA	1,33 AaA	0,37 AaA	328 AaB	57,9 AaA	1863 AaA	230 AaA
4	300	1,65 AaA	0,59 AaA	1,91 AaA	0,36 AaA	4169 AaA	83,1 AaA	3588 BaA	172 AaA
	1,39	1,58 AaA	0,84 AaA	2,47 BaA	0,37 AaA	380 AaB	54,9 AaB	2780 AaA	146 AaA
-----Clone sensível-----									
8	300	2,26 AaA	0,90 AaA	1,12 AaA	0,38 AaA	2535 AaA	28,6 AbA	1453 AaA	117 AbA
	1,39	1,63 AaB	1,42 AaA	1,21 AaA	0,45 AaA	143 AaB	27,9 AbA	1662 AaA	181 AaA
4	300	2,35 AbA	1,21 AbA	1,43 AaA	0,43 AaA	6014 BbA	63,7 BaA	4258 BaA	183 AaA
	1,39	1,89 AaA	0,94 AaA	2,05 AaA	0,44 AaA	261 AaB	47,3 AaA	2989 BaB	140 AaA
Ramos e caule									
-----Clone tolerante-----									
8	300	1,16 AaA	1,52 AaA	1,05 AaA	0,29 AaA	1981 AaA	12,0 AaA	51,2 AaA	33,6 AaA
	1,39	1,10 AaA	1,60 BaA	1,63 AaA	0,27 AaA	280 AaB	12,6 AaA	56,7 AaA	30,1 AaA
4	300	1,08 AaA	1,14 AaA	1,21 AaA	0,19 BaA	1801 AaA	8,1 BaA	51,9 AaA	22,6 BaA
	1,39	1,04 AaA	0,94 AaA	0,88 BaA	0,16 BaA	156 AaB	8,6 BaA	40,7 AaA	19,5 BaA
-----Clone sensível-----									
8	300	1,08 AaA	1,22 AaA	1,31 AaA	0,25 AaA	2749 AbA	13,4 AaA	46,3 AaA	25,5 AaA
	1,39	1,06 AaA	1,35 AaA	2,18 AaB	0,34 AaB	237 AaB	15,0 AaA	53,2 AaA	21,1 AbA
4	300	0,88 AaA	1,11 AaA	1,29 AaA	0,13 BaA	1704 BaA	7,5 BaA	23,4 BbA	12,8 BbA
	1,39	0,92 AaA	1,23 AaA	1,59 AaA	0,16 BaA	110 AaB	7,6 BaA	37,9 AaA	12,5 BaA

As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de O₂, para o mesmo clone e mesma concentração de Mn. As letras minúsculas comparam o efeito dos clones, para as mesmas concentrações de Mn e O₂. Letras maiúsculas em itálico comparam o efeito da concentração de Mn da solução nutritiva, para o mesmo clone e mesmas concentrações de O₂. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Taxa fotossintética, trocas gasosas e pigmentos

A taxa fotossintética em ambos os clones comportou-se de forma similar, com reduções significativas (37 %) provocadas pela hipóxia, sem efeitos aparentes do Mn (Figura 3). O mesmo aconteceu com a condutância estomática, que foi 70 % menor em relação à normóxia. Porém o carbono interno não sofreu as mesmas alterações nesses tratamentos; dessa forma, a menor eficiência fotossintética não se deve à falta de CO₂. Árvores de áreas tropicais com inundações sazonais apresentam resposta semelhante (Rengifo et al., 2005), com redução da taxa fotossintética e da condutância, porém com acúmulo de amido nas folhas. O acúmulo de amido e açúcares em folhas compromete a eficiência fotossintética devido à retroinibição (Kreuzwieser et al., 2005).

O teor de clorofilas comportou-se de forma similar em ambos os clones, com ligeiras reduções no teor (aproximadamente 12 %) provocadas pela hipóxia, sem efeitos significativos do Mn. Porém essas reduções não alteraram a relação clorofila *a* clorofila *b* (Figura 3). Dessa forma, observa-se que a absorção de energia luminosa não é reduzida, então a redução da taxa fotossintética é causada por outros fatores que não a limitação de energia luminosa ou falta de substrato. Uma limitação da ativação ou ação da Rubisco, desequilíbrios no ciclo de Calvin ou até mesmo uma retroinibição devido ao acúmulo de açúcares podem ter ocorrido provocando essa redução. A retroinibição é comumente observada em plantas com raiz sob hipóxia (Kreuzwieser et al., 2005; Rengifo et al., 2005). Independentemente da forma de inibição da fotossíntese, o excesso de energia luminosa deve ser devidamente dissipado ou poderá gerar danos celulares (Schanz et al., 1996; Carvalho & Amancio, 2002).

Dano celular e complexo antioxidativo em folhas

As ERO danificam diferentes constituintes celulares, sendo o MDA (malonaldeído) um composto estável formado pela peroxidação de lipídios. O acúmulo de MDA em um tecido é amplamente utilizado para estimar o dano celular. O teor de MDA nas folhas do clone tolerante (2719) teve pequenos aumentos nos tratamentos que receberam altas concentrações de Mn (300 mg L⁻¹), com a média subindo de 17 para 25 nmol g⁻¹ de matéria seca. Altos teores de Mn em tecido vegetal provocam danos oxidativos devido às ERO formadas na reação de

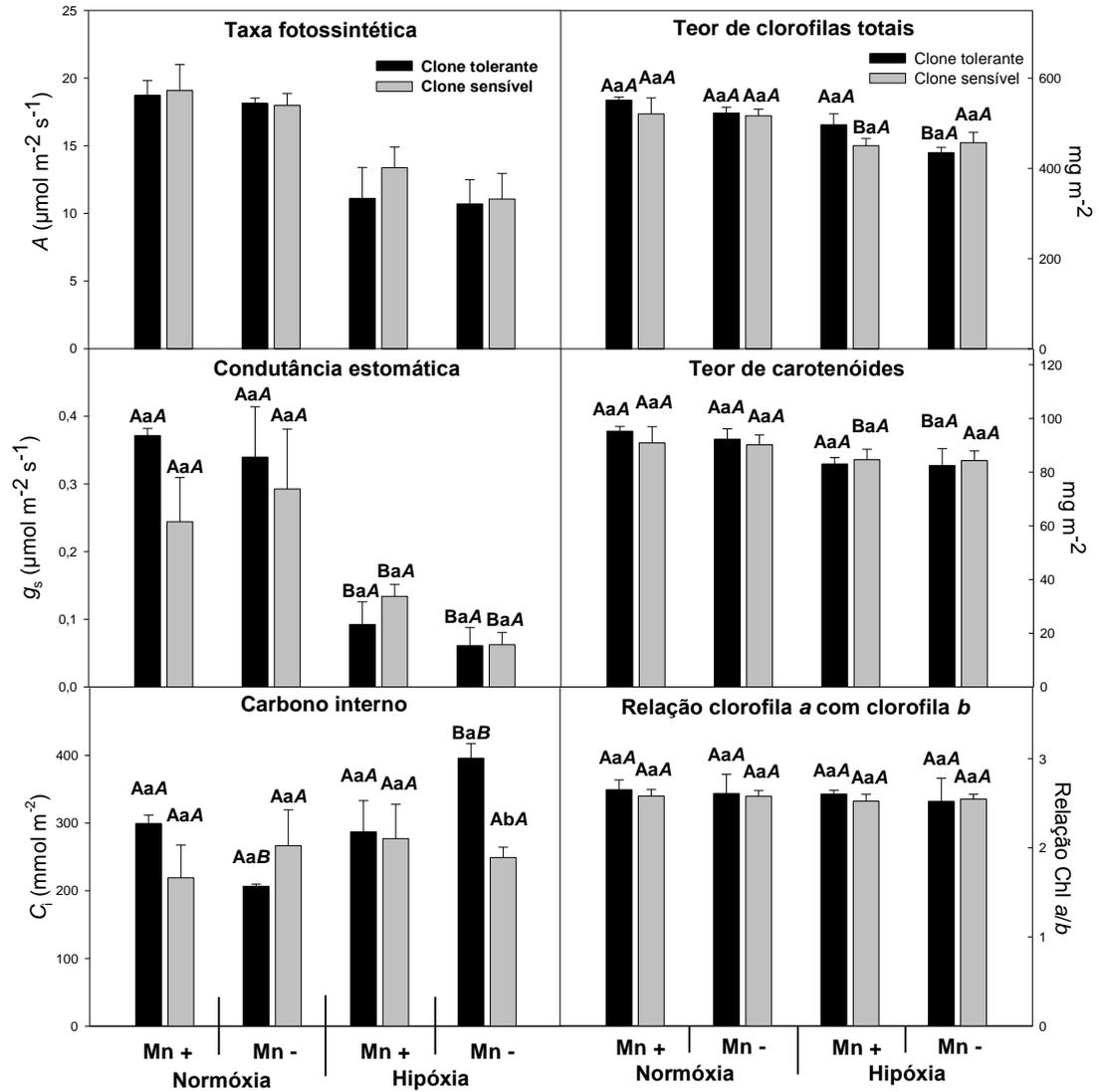


Figura 3: Trocas gasosas e teores de pigmentos em folhas de mudas dois clones de *Eucalyptus* em hidroponia em resposta aos tratamentos testados. Taxa fotossintética (a). Teor de clorofila *a* em folhas (b). Condutância estomática (c). Teor de carotenóides em folhas (d). Concentração do carbono interno (e). Relação entre clorofila *a* e clorofila *b* em folhas (f). As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de O_2 (normóxia 8 mg L^{-1} e hipóxia 4 mg L^{-1}), para o mesmo clone e mesma concentração de Mn. As letras minúsculas comparam o efeito dos clones (um tolerante e outro sensível à SPEVRD), para as mesmas concentrações de Mn e O_2 . Letras maiúsculas em itálico comparam o efeito da concentração de Mn da solução nutritiva (300 mg L^{-1} e $1,39 \text{ mg L}^{-1}$), para o mesmo clone e mesmas concentrações de O_2 . Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Fenton (Reichman, 2002; Demirevska-Kepova et al., 2004; Boojar & Goodarzi, 2008). A hipóxia não provocou aumentos deste metabólito no clone tolerante (2719), já no sensível (1213) os teores foram mais elevados, com médias de 45 nmol g^{-1} em situação de hipóxia, superiores aos encontrados no clone tolerante (Figura 4). Isso demonstra como inicialmente o Mn tem pouco efeito se comparado aos danos provocados pela hipóxia. Lacerda (2013) demonstrou que os efeitos dos danos da hipóxia nas raízes destes mesmos clones são mais rápidos e intensos do que altas concentrações de Mn. Estes clones podem ainda ser considerados tolerantes ao excesso de Mn, por apresentarem sintomas de toxidez com doses altas se comparado a outras plantas (Ducic & Polle, 2005).

O clone tolerante (2719) teve maiores atividades da SOD em folhas (em média 22 %) quando comparado ao clone sensível (1213) (Figura 4). A SOD é a primeira enzima de desintoxicação das ERO e o aumento desta enzima pode conferir maior tolerância a estresses abióticos (Bowler & Montagu, 1992; Blokhina et al., 2000; Lima et al., 2002). Já a catalase em folhas não diferiu entre os clones, tendo pequenas variações provocadas pelos demais tratamentos. A capacidade antioxidante total foi semelhante entre os clones em todos os tratamentos. A hipóxia provocou aumentos da ordem de 50 % na capacidade antioxidante total, enquanto o tratamento com excesso de Mn (300 mg L^{-1}) teve valores 20 % menores em média em ambos os clones. Clones de *Prunus cerasifera* L. (Pistelli et al., 2012) tolerantes e sensíveis à hipóxia apresentaram elevação da capacidade antioxidante total em folhas quando foi imposta hipóxia em suas raízes.

Uma capacidade antioxidante similar, porém com danos oxidativos diferentes, pode ser explicada de duas formas. A primeira é de o clone tolerante ser mais eficiente em dissipar o excesso de energia luminosa e, assim, evitar a formação de ERO. A segunda é que o clone sensível não produz defesas antioxidativas no compartimento celular correto, fator fundamental especialmente para as ERO mais reativas (Gil & Tuteja, 2010). Por exemplo, não adianta produzir mais SOD mitocondrial se os danos se formam no cloroplasto, ou aumentar o teor de compostos antioxidantes no cloroplasto se o dano forma-se nos vacúolos por um acúmulo de Mn.

Tomados em conjunto, a similaridade nas taxas fotossintéticas e os teores da maioria dos nutrientes entre os clones, não explicam satisfatoriamente a menor produção de matéria seca da parte aérea do clone tolerante, restando como explicação mais provável o redirecionamento da energia metabólica para prevenção de danos celulares em folhas. Dessa forma, a necessidade de nutrientes pela parte aérea será menor, o que pode permitir às raízes redirecionarem suas reservas para outras funções.

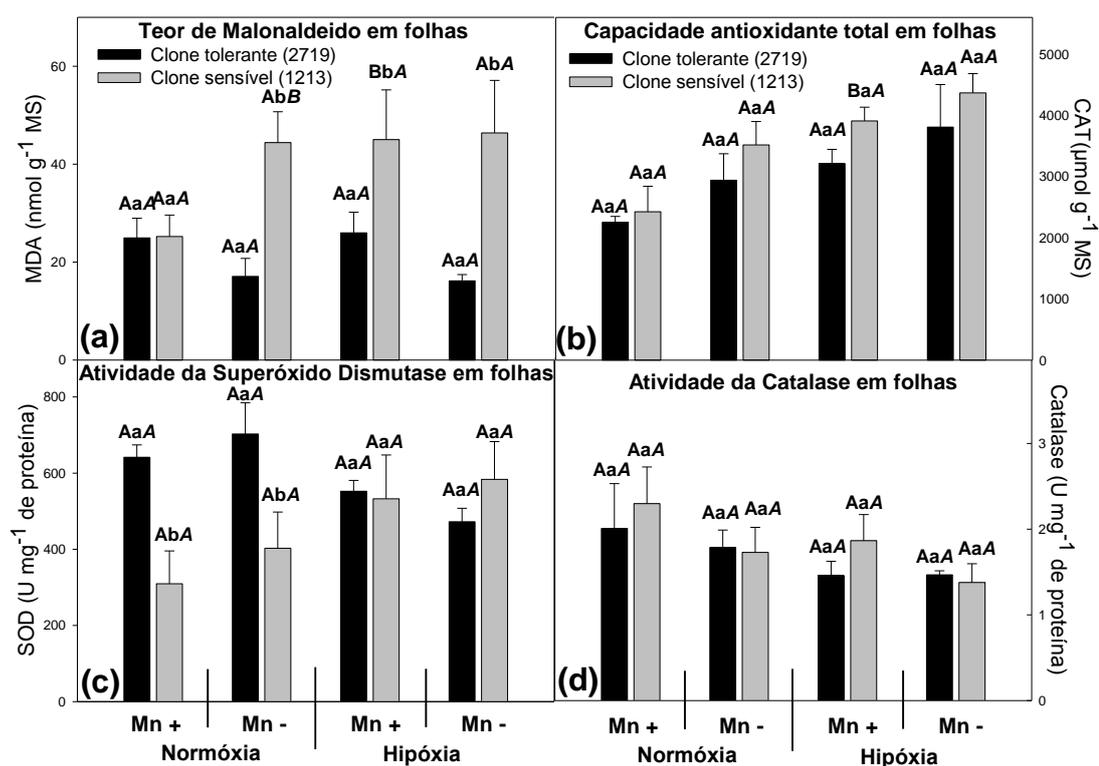


Figura 4: Atividades enzimáticas e metabólitos em folhas de mudas dois clones de *Eucalyptus* em hidroponia em resposta aos tratamentos testados. Teor de malonaldeído em folhas (a). Capacidade antioxidante total em folhas (b). Atividade da Superóxido dismutase (c). Atividade da Catalase em folhas (d). As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de O₂ (normoxia 8 mg L⁻¹ e hipoxia 4 mg L⁻¹), para o mesmo clone e mesma concentração de Mn. As letras minúsculas comparam o efeito dos clones (um tolerante e outro sensível à SPEVRD), para as mesmas concentrações de Mn e O₂. Letras maiúsculas em itálico comparam o efeito da concentração de Mn da solução nutritiva (300 mg L⁻¹ e 1,39 mg L⁻¹), para o mesmo clone e mesmas concentrações de O₂. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

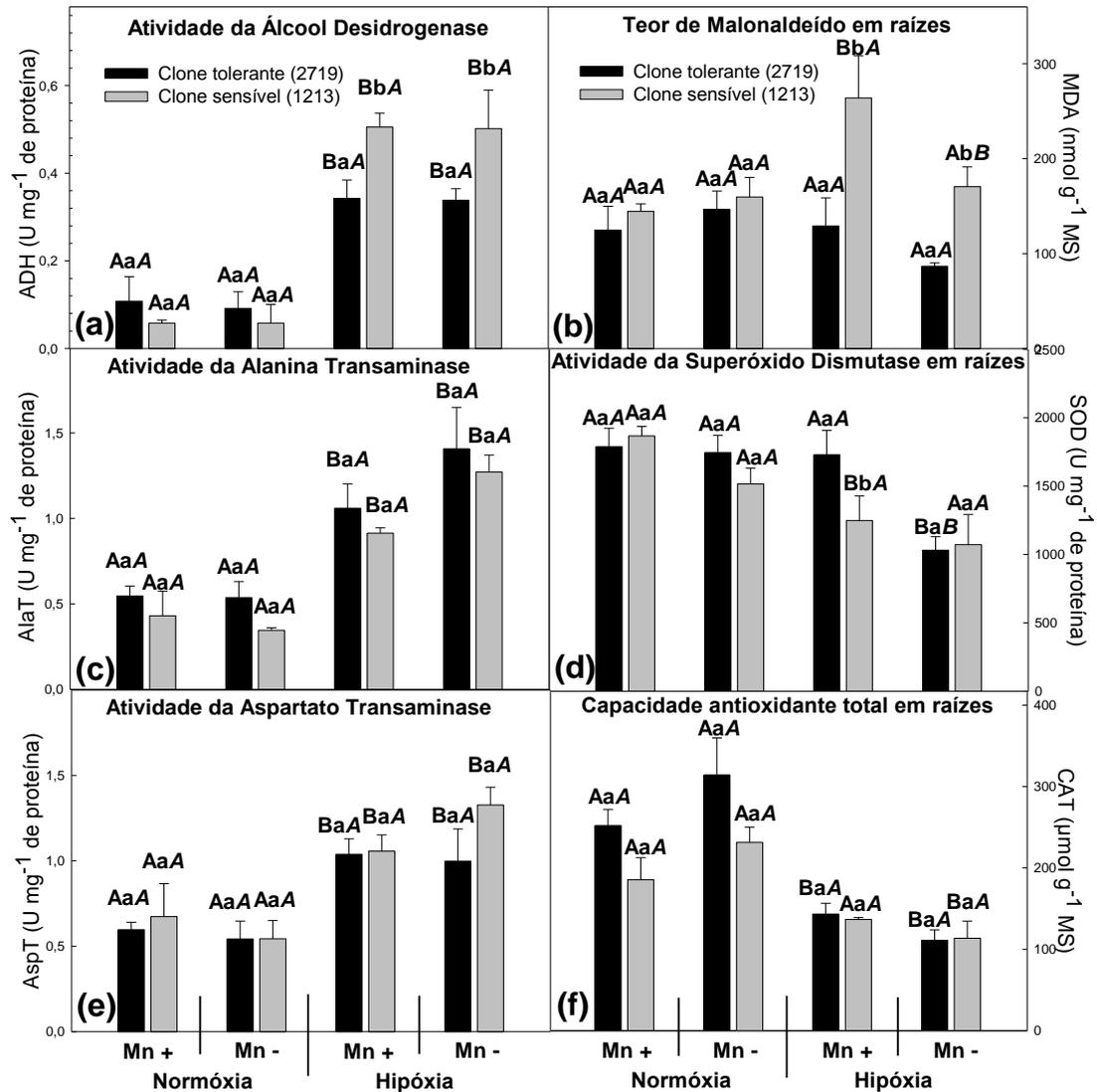


Figura 5: Atividades enzimáticas e metabólitos em raiz de mudas dois clones de *Eucalyptus* em hidroponia em resposta aos tratamentos testados. Atividade da Álcool desidrogenase em raiz (a). Teor de malonaldeído em raiz (b). Atividade da Alanina transaminase em raiz (c). Atividade da Superóxido dismutase (d). Atividade da Alanina transaminase (e). Capacidade antioxidante total em raiz (f). As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de O₂ (normóxia 8 mg L⁻¹ e hipóxia 4 mg L⁻¹), para o mesmo clone e mesma concentração de Mn. As letras minúsculas comparam o efeito dos clones (um tolerante e outro sensível à SPEVRD), para as mesmas concentrações de Mn e O₂. Letras maiúsculas em itálico comparam o efeito da concentração de Mn da solução nutritiva (300 mg L⁻¹ e 1,39 mg L⁻¹), para o mesmo clone e mesmas concentrações de O₂. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Danos celulares e complexo antioxidativo em raízes

O teor de MDA nas raízes do clone tolerante (2719) manteve-se estável em todos os tratamentos (Figura 5). Por outro lado, no clone sensível (1213) seus teores foram influenciados pela hipóxia e pela alta dose de Mn (300 mg L^{-1}). Nos tratamentos sob hipóxia com excesso de Mn o clone sensível apresentou teores de MDA em média 100 % maiores que o tolerante. O excesso de Mn nas raízes sob hipóxia do clone sensível provocou aumento do MDA em 50 %. Assim como nas folhas, as células nas raízes do clone sensível também não têm a mesma eficiência de evitar a formação de ERO, bem como desintoxicá-los. Bailey-Serres et al., (2012) também observaram que a variedade com resposta quiescente possuía maior atividade antioxidante assim como menores danos oxidativos nos tecidos que foram submersos.

O clone tolerante (2719) teve maiores atividades da SOD em raízes (38 % maior) sob hipóxia com alta dose de Mn quando comparado ao clone sensível-1213 (Figura 5). O clone tolerante teve também uma capacidade antioxidante total em raízes sob normóxia levemente superiores, porém houve uma menor atividade da SOD e menor capacidade antioxidante total em ambos os clones nas raízes sob hipóxia. Essa mesma redução foi observada em dois clones de *Prunus cerasifera* L., um sensível e outro tolerante à hipóxia (Pistelli et al., 2012). Em folhas é comum os estresses abióticos provocarem aumentos de compostos antioxidantes, porém em raízes já foram documentadas reduções da capacidade antioxidante total devido ao consumo e degradação destes compostos (Blokhina et al., 2000), uma vez que o método utilizado -FRAP (Benzie & Strain, 1996) avalia a capacidade de todos os compostos capazes de transferir um elétron para íon férrico, e não de prevenção da formação de ERO. Dessa forma, fica evidente que na raiz, assim como nas folhas, o clone tolerante (2719) é mais eficiente em evitar a formação de ERO, o que pode conferir uma maior capacidade de sobrevivência da raiz sob hipóxia.

Enzimas fermentativas e resposta quiescente na raiz

As atividades da ADH, da AlaT e da AspT apresentaram resultados semelhantes sob normóxia, com os dois clones com atividades baixas. Com a redução da oxigenação as atividades destas enzimas foram intensificadas, com maior magnitude a ADH (até sete vezes maior). O clone sensível apresentou maiores atividades da ADH em raízes sob hipóxia em relação ao clone tolerante- 2719

(Figura 5). A AlaT e a AspT tiveram respostas semelhantes entre os clones. O excesso de Mn parece não influenciar a atividade destas enzimas, apenas a atividade da AlaT teve uma leve tendência de redução sob hipóxia em ambos os clones.

Em outro experimento com estes mesmos clones, a expressão gênica da ADH, AlaT e AspT elevaram-se nas primeiras 2 h no clone tolerante, mas com 4 h já havia reduzido e igualado ao clone sensível, que não variou dentro das primeiras 48 h (dados não publicados, comunicação pessoal Prof. Ivo Ribeiro, DPS-UFV). Plantas com respostas quiescentes intensificam temporariamente a atividade destas enzimas, reduzindo-as nos dias seguintes (Xu et al., 2000; Singh et al., 2001). Redução da atividade da AspT e AlaT após 3 a 5 dias de hipóxia foram observadas individualmente em diferentes trabalhos (Good & Crosby, 1989; Good & Muench 1998). De forma semelhante, a atividade da ADH de tecidos submersos de plantas de açaí intensificou-se nos primeiros dias, mas no oitavo já encontrava-se semelhante ao controle (Gonçalves, 2010). As diferentes taxas de fermentação não conferem diretamente maior tolerância a hipóxia, pois há uma relação de aumento de dano celular com o aumento da ADH, uma vez que pode ocorrer reação inversa produzindo acetaldeído (Fukao & Bailey-Serres, 2004; Jackson & Colmer, 2005). Essa relação entre aumento da ADH e aumento do MDA pode ser observada no clone sensível (Figura 5).

O clone tolerante (2719) possui respostas características de LOQS (Fukao & Bailey-Serres, 2004; Colmer & Voesenek, 2009), suspendendo o crescimento da parte aérea e redirecionando suas energias para defesas e prevenção de danos em folhas e raízes. Promove a redução do metabolismo radicular, o que pode prolongar a sobrevivência das raízes mais profundas num solo que sofra de períodos de hipóxia. O clone sensível (1213) possui respostas características de LOES (Bailey-Serres & Voesenek, 2008), promovendo a formação de novas raízes superficiais para manter o crescimento da parte aérea. Este clone é menos eficiente na prevenção de danos, o que pode comprometer a sobrevivência de raízes mais profundas num solo que passe por um período de hipóxia.

Essas respostas de escape podem conferir ao clone sensível (1213) uma solução paliativa, que permite a sobrevivência no período de hipóxia, porém deixa a planta mais susceptível ao déficit hídrico (Kozłowski, 1997). Com o fim do período chuvoso das áreas afetadas pela SPEVRD, o lençol freático desce (Almeida et al., 2013). Dessa forma, a planta que não foi eficiente em manter raízes vivas em

profundidade terá uma demanda de nutrientes e água maior que a capacidade de absorção destes pela raiz. É possível que os sintomas da SPEVRD se iniciem por consequência da redução da absorção de nutrientes, pela redução de absorção de água e pelo acúmulo de danos em folhas e raízes. Essa relação entre LOES e sensibilidade ao déficit hídrico foi documentada em arroz, em que as variedades com resposta quiescente foram mais tolerantes ao déficit hídrico após um período de alagamento do que aquelas com resposta de escape (Fukao et al., 2011).

O Mn pode ter papel importante neste fenômeno, porém aparentemente secundário, sendo um efeito provocado pela hipóxia e seus danos intensificados provavelmente durante o déficit hídrico. Com a redução da absorção dos outros nutrientes pela hipóxia, pela alta proporção folha:raiz e a menor absorção de água e nutrientes no período seco pela falta de raízes profundas, pode gerar um aumento da relação Mn/Mg que intensifica os danos nas folhas (Davis, 1996; Bot et al., 1990), provocando a morte destas.

CONCLUSÕES

1. O Mn tem inicialmente papel secundário, não sendo fator majoritário nos danos ou com resposta diferencial entre clones.
2. A tolerância diferencial à SPEVRD pode estar relacionada com a diferença de resposta à hipóxia, pois respostas de quiescência podem evitar danos que levariam ao surgimento desta anomalia.
3. O clone tolerante (129) ativa respostas características de quiescência, enquanto o clone sensível (1215) possui respostas de escape a hipóxia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior parte dos estudos de tolerância à hipóxia avalia os efeitos das respostas em curto prazo, porém o eucalipto é uma planta perene, cujo cultivo prolonga-se por mais de sete anos. Isso demonstra a necessidade de critérios de avaliação e escolha dos biomarcadores levar em consideração não só respostas vantajosas durante a hipóxia (ou qualquer outro estresse), mas também vantagens em

longo prazo, permitindo a sobrevivência (e maior produtividade) mesmo com a identificação de outros fatores bióticos ou abióticos estressantes.

Para melhor compreensão da SPEVRD, são necessários trabalhos avaliando respostas destes clones após a drenagem das águas, avaliando a capacidade de formação de raízes para suprimento de água e nutrientes durante o período. Outro ponto interessante de trabalho seria a avaliação da compartimentação do Mn dentro das folhas e também dentro das diferentes células da folha, assim como a concentração do nutriente no citosol, e não apenas o teor em relação à matéria seca.

LITERATURA CITADA

- AEBI, H. Catalase. In BERDMAYER, H., ed. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chem., Weinheim, 1983, p 273-277.
- AHMED, S.; NAWATA, E.; HOSOKAWA, M.; DOMAE, Y. & SAKURATANI, T. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Sci.*, 163:117-123, 2002.
- ALMEIDA, A.Q.; RIBEIRO, A. & LEITE, F. P. Relação entre a seca dos ponteiros do eucalipto e o clima no vale da bacia hidrográfica do rio Doce. *Engenharia Ambiental*, 10:005-013, 2013.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.*, 113:548-554, 1985.
- ARORA, A.; SAIRAM, R.K. & SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.*, 82:1227-1238, 2002.
- BAILEY-SERRES, J. & VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:313-339, 2008.
- BAILEY-SERRES, J. & VOESENEK, L.A.C.J. Life in the balance: A signaling network controlling survival of flooding. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13:89-494, 2010.
- BAILEY-SERRES, J.; LEE, S.C. & BRINTON, E. Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.*, 160:1698-70, 2012.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R. & GALLO, J.R. 1983. *Métodos de análise química de plantas*. Campinas, Instituto Agrônômico de Campinas, 1983. 48p. (Boletim Técnico, 78)
- BEAUCHAMP, C & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Annal. Biochem.*, 44: 276-287, 1971.

- BIEMELT, S.; KEETMAN, U. & ALBRECHT, G. Reaeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings, *Plant Physiol.*, 116:651-658, 1998.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; MOCK, H-P & GRIMM, B. Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. *Plant Cell Environ.*, 23:135-144, 2000.
- BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K.V. & CHIRKOVA, T.V. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reaeration. *Physio. Plant.*, 105:625-632, 1999.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E. & FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.*, 91:179-194, 2003.
- BLOKHINA, O.B.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V.; HOIKKALA, A.; WÄHÄLÄ K.; & CHIRKOVA, T.V. Antioxidant status of anoxia-tolerant and intolerant plant species under anoxia and reaeration. *Physiol. Plant.* 109:396-403, 2000.
- BOOJAR, M.M.A. & GOODARZI, F. Comparative evaluation of oxidative stress status and manganese availability in plants growing on manganese mine. *Ecotox. Environ. Safe.*, 71:692-699, 2008.
- BOT, J.; GOSS, M.; CARVALHO, M.; BEUSICHEM, M. & KIRKBY, E. The significance of the magnesium to manganese ratio in plant tissues for growth and alleviation of manganese toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Plant Soil*, 124:205-210, 1990.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M.V. & INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43:83-116, 1992.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.
- BRAMLEY, H. & TYERMAN, S. Root water transport under waterlogged conditions and the roles of aquaporins. In MANCUSO, S. & SHABALA, S. eds. *Waterlogging signalling and tolerance in plants*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2010. p151-180.
- CAMARGO, M.A.F. Matéria seca, concentração e conteúdo de macronutrientes em mudas de clones de eucalipto, em função da idade. Piracicaba, 1997. 94p. (Dissertação de Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CAMBRAIA, J.; PIMENTA, J.A.; ESTEVÃO, M.M. & SANT'ANNA, R. Aluminum effects on nitrate uptake and reduction in sorghum. *J. Plant Nut.* 12:1435-1445, 1989.
- CARVALHO, L.C. & AMANCIO, S. Antioxidant defence system in plantlets transferred from in vitro to *ex vitro*: Effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. *Plant Sci.*, 162:33-40, 2002.

- CAVATTE, P.C.; OLIVEIRA, A.A.; MORAIS, L.E.; MARTINS, S.C.; SANGLARD, L.M. & DAMATTA, F.M. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiol. Plant.*, 144(2):111-22, 2012.
- CHINO, M. & BABA, A.. The effects of some environmental factors on the partitioning of zinc and cadmium between roots and tops of rice plants. *J. Plant Nutr.*, 3:203-214, 1981.
- CHIRKOVA, T.V.; NOVITSKAYA, L.O. & BLOKHINA, O.B. Lipid peroxidation and antioxidant systems under anoxia in plants differing in their tolerance to oxygen deficiency. *Rus. J. Plant Physiol.*, 45:55-62, 1998.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphates in intact maize root. *J. Agric. Food Chem.*, 23:458-460, 1975.
- COLMER, T.D. & VOESENEK, L.A.C.J. Flooding tolerance: Suites of plant traits in variable environments. *Funct. Plant Biol.* 36:665-681, 2009. DAVIS, J. G. Soil pH and magnesium effects on manganese toxicity in peanuts. *J. Plant Nutr.*, 19:535-550, 1996.
- DECHEN, A.R.; & NACHTIGALL, G.R. Micronutrientes FERNANDES, M. S. Nutrição mineral de plantas. 1. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. v. 1. 432 p.
- 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. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:223-50, 1997.
- DU, Z. & BRAMLAGE, W. J. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 40:1566-1570, 1992.
- DUCIC, T. & POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17:103-112, 2005.
- FANTE, C.A.; ALVES, J.D.; GOULART, P.F.P.; DEUNER, S. & SILVEIRA, N.M. Respostas fisiológicas em cultivares de soja submetidas ao alagamento em diferentes estágios. *Bragantina*, 69:253-261, 2010.
- FERREIRA, F. A. & MILANI, D. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogi Guaçu: Universidade Federal de Viçosa/International Paper, 2002. 98 p.
- FERREIRA, F.A. Patologia florestal: Principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: SIF, 1989, 570p.
- FOY, C.; CHANEY, R. & WHITE, M. The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29:511-566, 1978.

- FUKAO, T., & BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia- Is survival a balancing act? *Trends Plant Sci.*, 9:449–456, 2004.
- FUKAO, T.; YEUNG, E. & BAILEY-SERRES, J. The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *Plant Cell*, 23:412-427, 2011.
- GIANNOPOLITIS, C.N. & RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 59:309-314, 1977.
- GILL, S.S. & TUTEJA, A.N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem*, 48:909-930, 2010.
- GONCALVES, J.F.C.; LIMA, R.B.S.; FERNANDES, A.V.; BORGES, E.E.L. & BUCKERIDGE, M.S. Physiological and biochemical characterization of the assai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) during seed germination and seedling growth under aerobic and anaerobic conditions. *Rev. Árvore*, 34:1045-4053, 2010.
- GOOD, A.G. & CROSBY, W.L. Anaerobic Induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. *Plant Physiol.* 90:1305-1309, 1989.
- GOOD, A.G. & MUENCH, D.G. Purification and characterization of an anaerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. *Plant Physiol.*, 99:1520-1525, 1992.
- GRICHKO, V.P. & GLICK, B.R. Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 39:1-9, 2001.
- GRIFFITH, S. M. & VANCE, C. P. Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. I. Purification and partial characterization. *Plant Physiol.*, 90:1622-1629, 1989.
- HARRINGTON, C.F.; ROBERTS, D.J. & NICKLESS, G. The effect of cadmium, zinc, and copper on the growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Can. J. Bot.*, 74:1742-1752, 1996.
- HORST, W. J.. The physiology of manganese toxicity. In. GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J. & UREM, N.C., eds. *Manganese in soils and plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988. p.175-188.
- HSU, F.H.; LIN, J.B. & VHANG, S.R. Effects of waterlogging on seed germination. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 41:267-273, 2000.
- HUMG, W.P. & KAO, C.H. Lipid peroxidation and antioxidative enzymes in senescing tobacco leaves following flooding. *Plant Sci.*, 96:41-44, 1994.
- HWANG, S.Y.; LO, H.F.; SHAO, C.K. & SHEN, L.F. Changes in antioxidative enzyme activities in two leafy vegetable sweet potato cultivars subjected to waterlogged conditions. *J. Chin. Soc. Hortic. Sci.*, 46:287-296, 2000.

- JACKSON, M.B. & COLMER, T.D. Response and adaptation by plants to flooding stress. *Ann. Bot.*, 96:501–505, 2005.
- JACKSON, M.B.; DAVIES, W.J. & ELSE, M.A. Pressure-flow relationships. *Ann. Bot.*, 77:17-24, 1996.
- JENNER, H.L.; WINNING, B.M.; MILLAR, A.H.; TOMLINSON, K.L.; LEAVER, C.J. & HILL, S.A. NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol.*, 126:1139-1149, 2001.
- KALASHNIKOV, J.E; BALAKHNINA, T.I. & ZAKRZHEVSKY, D.A. Effect of soil hypoxia on activation of oxygen and the system of protection from oxidative destruction in roots and leaves of *Hordeum vulgare*. *Rus. J. Plant Physiol.*, 41:583-588, 1994.
- KATO, C.; OHSHIMA, N.; KAMADA, H. & SATOH, S. Enhancement of the inhibitory activity for greening in xylem sap of squash root with waterlogging. *Plant Physiol. Biochem.*, 39:513-519, 2001.
- KATO-NOGUCHI, H. Evaluation of the importance of lactate for the activation of ethanolic fermentation in lettuce roots in anoxia. *Physiol. Plant.*, 109:28-33, 2000.
- KHABAZ-SABERI, H; SETTER, T.L. & WATERS, I. Waterlogging induces high toxic concentrations of iron, aluminium and manganese in wheat varieties on acidic soil. *J. Plant Nut.*, 29:899-912, 2006.
- KOGAWARA, S.; YAMANOSHITA, T.; NORISADA, M.; MASUMORI, M. & KOJIMA, K. Photosynthesis and photoassimilate transport during root hypoxia in *Melaleuca cajuputi*, a flooding-tolerant species, and in *Eucalyptus camaldulensis*, a moderately flood-tolerant species. *Tree Physiol* 26:1413-1423, 2006.
- KOZLOWSKI, T.T. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree physiol monogr.* 1. Heron Pub, Victoria, Canada, 1997, 29p.
- KREUZWIESER, J.; PAPADOPOULOU, E.; & RENNENBERG, H. Interaction of flooding with carbon metabolism of forest trees. *Plant Biol.*, 6:299-306, 2004.
- LACERDA, F.J.P. Papel da hipóxia e do manganês na tolerância diferencial de clones de eucalipto à seca de ponteiro no vale do rio doce. Viçosa, 2013. 94p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- LASANTHI-KUDAHETTIGE, R.; MAGNESCHI, L.; LORETI, E.; GONZALI, S.; LICAUSI, F.; NOVI, G.; BERATTA, O.; VITULLI, F.; ALPI, A. & PERATA, P. Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. *Plant Physiol.*, 144:218-231, 2007.
- 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).

- LIAO, C.T. & LIN, C.-H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B, 25:148-157, 2001.
- LIAO, M.T.; HEDLEY, M.J.; WOOLLEY, D.J.; BROOKS, R.R. & NICHOLS, M.A. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rondy) plants grown in NFT system. I- Copper uptake and distribution in plants. Plant Soil., 221:135-142, 2000.
- LICAUSI, F. & PERATA, P. Low oxygen signalling and tolerance in plants. Adv. Bot. Res., 50:139-198, 2009.
- LIMA, A.L.; DAMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.A.; TOTOLA, M.R. & LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canaphora* under water deficit conditions. Environ. Exp. Bot., 47:239-247, 2002.
- MARSCHNER, P. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier/Academic Press, 2011, 684p.
- MUENCH, D.G. & GOOD, A.G. Cloning and expression of a hypoxic and nitrogen inducible maize alanine aminotransferase gene. Physiol. Plant., 103:503-512, 1998.
- PARENT, C.; CAPELLI, N. BERGER, A.; CREVECOEUR, M. & DAT J.F. An overview of plant responses to soil waterlogging. Plant Stress, 2:20-27, 2008.
- PFISTER-SIEBER, M. & BRAENDLE, R. Aspects of plants behavior under anoxia and post-anoxia. Proc. R. Soc. Edinb. Sec. Biol. Sci., 102:313-324, 1994.
- PISTELLI, L.; IACONA, C.; MIANO, D.; CIRILLI M.; COLAO, M.C.; MENSUALI-SODI, A. & MULEO, R. Novel *Prunus* rootstock somaclonal variants with divergent ability to tolerate waterlogging. Tree Physiol., 32:355-68, 2012.
- RADIN, J.W. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. Plant Physiol., 53:458-463, 1974.
- REICHMAN, S.M. The responses of plant to metal toxicity: A review of focusing on copper, manganese and zinc. AMEEF, Melbourne, Australia, 2002, 54p.
- RENGIFO, E.; TEZARA, W. & HERRERA, A. Water relations, chlorophyll *a* fluorescence, and contents of saccharides in tree species of a tropical forest in response to flood. Photosynthetica, 43:203-210, 2005.
- ROCHA, M.; LICAUSI, F.; ARAUJO, W.L.; NUNES-NES, 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.
- ROTTENBERGER, S.; KLEISS, B.; KUHN, U.; WOLF, A.; PIEDADE, M. T. F.; JUNK, W. & KESSELMEIER, J. The effect of flooding on the exchange of the volatile C₂-compounds ethanol, acetaldehyde and acetic acid between

leaves of Amazonian floodplain tree species and the atmosphere. *Biogeosciences*, 5:463-499, 2008.

- SCHANZ, P.; PICON, C.; VIVIN, P.; DRYER, E.; GUEHL, J.M. & POLE, A. Responses of antioxidative systems to drought stress in pendunculate oak and maritime pine as modulated by elevated CO₂. *Plant Physiol.*, 110: 393-402, 1996.
- SGHERRI, C.L.M.; PINZIO, C. & NAVARI-IZZO, F. Chemical changes and O₂ production in thylakoid membranes under water stress. *Physiol. Plant.*, 87:21-216, 1993.
- SINGH, H.P.; SINGH, B.B. & RAM, P.C. Submergence tolerance of rainfed lowland rice: search for physiological marker traits. *J. Plant Physiol.*, 158:883-889, 2001.
- SRIVASTAVA, S. & DUBEY, R. S. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regul.*, 64:1-16, 2011.
- URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E. & HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiol. Plant.*, 13:43-50, 1991.
- USHIMARO, T.; SHIBASAKA, M. & TSUJI, H. Development of O₂ - detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 33: 1065-1071, 1992.
- VAN TAAI, T.T. & BOLLES, C.S. Postanoxia injury in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Plant Physiol.*, 97:588-592, 1991.
- WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 144:307-313, 1994.
- XU, K.; XU, X.; RONALD, P.C. & MACKILL, D.J. A high-resolution linkage map of the vicinity of the rice submergence tolerance locus Sub1. *Mol. Gen. Genet.*, 263:681-689, 2000.
- YAN, B.; DAI, Q.; LIU, X.; HUANG, S. & WANG, Z. Flooding induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant Soil*, 179:261-268, 1996.
- YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst*, 80:209-213, 1955.