



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**  
**DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**RODOLFO INÁCIO NUNES SANTOS**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EVIDENCIAM A  
SENSIBILIDADE DO AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) A ALTAS  
TEMPERATURAS**

**BELÉM**  
**2019**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EVIDENCIAM A  
SENSIBILIDADE DO AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) A ALTAS  
TEMPERATURAS**

**Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de doutorado em agronomia: Área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de doutor.**

**Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro**

**Co-orientador: Prof. Dr. Walter Vellasco Duarte Silvestre.**

**BELÉM**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na  
Publicação (CIP) Bibliotecas da  
Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S237a Santos, Rodolfo Inacio Nunes Santos  
Alterações Fisiológicas e Metabólicas Evidenciam a Sensibilidade do Açaizeiro  
(*Euterpe oleracea* Mart.) a Altas Temperaturas / Rodolfo Inacio Nunes Santos Santos. -  
2019.  
71 f. : il.
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA),  
Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia,  
Belém, 2019.  
Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro  
Pinheiro Coorientador: Prof. Dr. Walter  
Vellasco Duarte Silvestre.
1. Fisiologia Vegetal. 2. Produção Vegetal. I. Pinheiro, Hugo Alves Pinheiro,  
*orient.* II. Título

---

CDD 000

RODOLFO INÁCIO NUNES SANTOS

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EVIDENCIAM A  
SENSIBILIDADE DO AÇAIZEIRO (*Eutepa oleracea* Mart.) A ALTAS  
TEMPERATURAS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de doutorado em agronomia: Área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

Co-orientador: Prof Dr. Walter Vellasco Duarte Silvestre

Aprovado em 29 DE MARÇO DE 2019

**BANCA EXAMINADORA**

  
Dr. Hugo Alves Pinheiro - Orientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

  
Dr. Marcelo Murad Magalhães - 1º Examinador  
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

  
Dr. Roberto Lisboa Cunha - 2º Examinador  
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

  
Dr. Rafael Gomes Viana - 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

  
Dr. Candido Ferreira de Oliveira Neto - 4º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

## **DEDICO**

Aos meus pais, Almerio do Couto Santos e Angela Maria Cruz Nunes (*in memorian*), pelos os seus sacrifícios, incentivos e apoio nos momentos mais difíceis para me manter em meus estudos.

Ao meu irmão Rodrigo Nunes dos Santos, por todo amor, carinho e o apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos e demais familiares, tão importantes em todos os momentos da minha vida pelo incentivo.

## **OFEREÇO (*in memorian*)**

A minha querida mãe, Angela Maria Cruz Nunes, por todo amor, carinho, força, em todos os momentos. Muito obrigado por acreditar em meu crescimento profissional.

Obrigado por tudo!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me conceder a vida, saúde e paz. Por toda a força concedida diante das dificuldades e por todas as vitórias alcançadas. Sempre serei muito grato por estar comigo, por iluminar a minha mente e fazer de mim um instrumento em suas mãos.

À Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, pela formação profissional e oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Agronomia;

À professora e coordenadora do Programa de Pós-graduação em Agronomia Dr.<sup>a</sup> Giselle Barata da Silva pela sua disposição em fazer seu melhor para elevar o nível do curso.

Ao meu orientador, Dr. Hugo Alves Pinheiro, pela orientação, ensinamentos e conhecimentos repassados desde o início desta jornada. Muito obrigado pelas oportunidades e confiança depositadas em mim.

Ao meu co-orientador, Dr. Walter Velasco, pela orientação, ensinamentos e conhecimentos repassados desde o início desta jornada. Muito obrigado pelas oportunidades e confiança depositadas em mim.

Ao estudante de iniciação científica, em especial, à Gabriel Ito pelo auxílio na condução do experimento.

Aos meus pais, Almerio do Couto Santos e Angela Maria da Cruz Nunes, pelos os seus sacrifícios, incentivos e apoio nos momentos mais difíceis para me manter em meus estudos. Por estarem sempre comigo dando-me muito amor e carinho.

Ao meu irmão, Rodrigo Nunes Santos por todo amor, carinho e o apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos do Doutorado, Bruna Sayuri Fujiyama, Josué Valente, Gledson Castro, Nara Pontes que desde os tempos de graduação sempre estiveram comigo me incentivando e me apoiando em minhas decisões. Pelos momentos de alegria e de descontração.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação e para o meu crescimento profissional.

**Minhas sinceras considerações e agradecimentos**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A</i>	Taxa de assimilação líquida de CO <sub>2</sub>
<i>g<sub>s</sub></i>	Condutância estomática
<i>g<sub>m</sub></i>	Condutância mesofílica
<i>E</i>	Transpiração
<i>C<sub>i</sub></i>	Concentração de CO <sub>2</sub> intercelular
CRA	Conteúdo relativo de água
<i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></i>	Eficiência máxima do fotossistema II
<i>qP</i> e <i>qL</i>	Coefficiente de extinção fotoquímica
NPQ	Coefficiente de extinção não fotoquímica
$\Phi_{\text{PSII}}$	Eficiência quântica do fotossistema II
PSII	Fotossistema II
MDA	Aldeído malônico
GLOx	Glicolato oxidase
SOD	Superóxido desmutase
APX	Ascorbato peroxidase
UR	Umidade relativa
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
T <sub>fol</sub>	Temperatura da folha

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 02: RESPOSTAS FOTOQUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DE MUDAS DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE TÉRMICO

**Figura 01.** Alterações na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*, Fig. 1a), na condutância estomática (*g<sub>s</sub>*, Fig. 1b), na transpiração (*E*, Fig. 1c) e na concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*, Fig. 1d) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 02.** Conteúdo relativo de água (CRA) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 03.** Alterações na eficiência fotoquímica máxima do PSII (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*, Fig. 3a), rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII ( $\Phi_{PSII}$ , Fig. 3b), coeficiente de extinção fotoquímica (*q<sub>L</sub>*, Fig. 3c) e coeficiente de dissipação não-fotoquímica (NPQ, Fig. 3d) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 04.** Atividade da glicolato oxidase (GLOx) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 05.** Atividade da inicial (Fig. 5a), total (Fig. 5b) e estado de ativação da Rubisco (Fig. 5c) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).



### CAPÍTULO 03. ALTERAÇÕES NAS TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EVIDENCIAM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ESTRESSE TÉRMICO EM DOIS MATERIAIS VEGETAIS DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.)

**Figura 01.** Alterações na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ , Fig. 1a), na condutância estomática ( $g_s$ , Fig. 1b), na transpiração ( $E$ , Fig. 1c) e na concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ , Fig. 1d) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 02.** Conteúdo relativo de água (CRA) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 03.** Alterações na eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ , Fig. 3a), rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII ( $\Phi_{PSII}$ , Fig. 3b), coeficiente de extinção fotoquímica ( $q_p$ , Fig. 3c) e coeficiente de dissipação não-fotoquímica (NPQ, Fig. 3d) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 04.** Concentração de aldeído malônico (MDA) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 05.** Alteração nas concentrações de amido (Fig 5a), sacarose (Fig 5b) e glicose (Fig. 5c) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 01: CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>04</b>
REFERÊNCIAS.....	08
<b>CAPÍTULO 02: RESPOSTAS FOTOQUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DE MUDAS DE AÇAIZEIRO (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE TÉRMICO.....</b>	<b>11</b>
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3. RESULTADOS.....	18
4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS.....	33
<b>CAPÍTULO 03. ALTERAÇÕES NAS TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EVIDENCIAM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ESTRESSE TÉRMICO EM DOIS MATERIAIS VEGETAIS DE AÇAIZEIRO (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) .....</b>	<b>39</b>
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3. RESULTADOS.....	45
4. DISCUSSÃO.....	53
5. CONCLUSÃO.....	55
6. REFERÊNCIAS.....	55



## RESUMO

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia e de grande interesse econômico no Brasil e no mundo. O Brasil é o maior produtor mundial do fruto de açaí, sendo o estado do Pará o maior produtor nacional. Essa produção era destinada ao consumo local, porém a conquista de novos mercados e o aumento nas exportações estimulou a expansão dos plantios comerciais em terra firme. As crescentes emissões de gases relacionados ao efeito estufa deverão influenciar o aumento da temperatura e o estresse térmico leva a uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas nas plantas. Nesse sentido a sensibilidade do açaizeiro ao estresse térmico está relacionada a perda progressiva da atividade da Rubisco em função do tempo de exposição das plantas ao estresse e suas consequências na fisiologia da planta. Além disso a busca de materiais tolerantes a esse tipo de estresse se torna primordial para contornar os efeitos negativos ocasionados pelo mesmo. Nesse contexto a variedade BRS-PA, que apresenta maior tolerância ao déficit hídrico que materiais não melhorados ou nativos, também apresenta maior tolerância ao estresse térmico. Para testar essas hipóteses, dois experimentos independentes foram conduzidos com os objetivos de avaliar a magnitude das alterações fisiológicas diretamente relacionadas ao metabolismo fotossintético em função de diferentes tempos de exposição das plantas ao estresse térmico e avaliar o comportamento fisiológico e bioquímico de dois materiais vegetais de açaizeiro submetidos (material vegetal nativo, Wt; e var. BRS-PA) à alta temperatura. O açaizeiro é extremamente sensível ao estresse térmico, tanto em sua magnitude como quando comparando-se dois materiais vegetais (Wt e BRS-PA) apresentando danos expressivos no seu aparato fotossintético, a nível de trocas gasosas e estabilidade do fotossistema II, quando submetido a um estresse de 40 °C, ocasionando alterações oxidativas e metabólicas negativas, como reduções na atividade da Rubisco, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (peroxidação lipídica) e diminuição de metabólitos primários (amido, glicose e sacarose). No entanto a variedade BRS-PA apresentou menores danos relacionados ao *status* hídrico, alterações fisiológicas e estabilidade do PSII.

Palavras chaves: alta temperatura, danos celulares, Rubisco, peroxidação lipídica.

## ABSTRACT

The açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) Is a palm native to the Amazon and of great economic interest in Brazil and in the world. Brazil is the world's largest producer of açai fruit, the state of Pará being the largest national producer. This production was destined for local consumption, but the conquest of new markets and the increase in exports stimulated the expansion of commercial plantations on land. Increasing greenhouse gas emissions are expected to influence temperature rise and thermal stress leads to a series of physiological and biochemical changes in plants. In this sense the sensitivity of açaiseiro to thermal stress is related to the progressive loss of Rubisco activity as a function of the time of exposure of the plants to stress and its consequences in plant physiology. In addition, the search for materials that are tolerant to this type of work becomes essential to overcome the negative effects caused by it. In this context, the BRS-PA variety, which presents greater tolerance to water deficit than unimproved or native materials, also presents greater tolerance to thermal stress. To test these hypotheses, two independent experiments were conducted with the objective of evaluating the magnitude of the physiological changes directly related to the photosynthetic metabolism as a function of the different times of exposure of the plants to thermal stress and to evaluate the physiological and biochemical behavior of two plant materials of açaiseiro (native plant material, Wt; and var BRS-PA) at high temperature. The açaiseiro is extremely sensitive to thermal stress, both in its magnitude and when comparing two plant materials (Wt and BRS-PA) presenting significant damage in its photosynthetic apparatus, in terms of gas exchange and photosystem II stability, when submitted to a stress of 40 °C, causing negative oxidative and metabolic alterations, such as reductions in Rubisco activity, increase in the production of reactive oxygen species (lipid peroxidation) and decrease of primary metabolites (starch, glucose and sucrose). However, the BRS-PA variety presented lower damages related to water status, physiological changes and PSII stability.

Keywords: high temperature, cellular damage, rubisco, lipid peroxidation.

## CAPÍTULO 01. CONTEXTUALIZAÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia brasileira predominantemente encontrada no Estado do Pará, mas com populações espontâneas também encontradas no Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Tocantins; e em alguns países da América do Sul (Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname e Guiana) e da América Central (Panamá). No entanto, é na região do estuário do Rio Amazonas que se encontram as maiores e mais densas populações naturais dessa palmeira, distribuída ao longo de várzeas e igapós, compondo ecossistemas de floresta natural ou em forma de maciços conhecidos como açazais (HOMMA et al., 2006). Também ocorre em áreas de terra firme adjacentes às várzeas e igapós (HOMMA et al., 2006).

O açazeiro pertence à família Arecaceae, que abrange, aproximadamente, 200 gêneros e cerca de 2.600 espécies, cuja distribuição é predominantemente tropical e subtropical (JONES, 1995). É uma palmeira cespitosa, com até 25 estipes por touceira em diferentes estádios de desenvolvimento (HENDERSON & GALEANO, 1996; OLIVEIRA et al., 1998). As folhas são compostas pinadas, de arranjo espiralado e os folíolos são pendentes nos indivíduos adultos e ligeiramente horizontais nos indivíduos jovens, com base obtusa e extremidade apical pontiaguda. Possui sistema radicular do tipo fasciculado relativamente denso, com raízes emergindo do estipe da planta adulta (HENDERSON & GALEANO, 1996).

O açazeiro produz um fruto que constitui a base da alimentação ribeirinha (HOMMA et al., 2014). O fruto do açazeiro é uma drupa globosa e levemente depresso, apresentando resíduo do estigma lateralmente, com diâmetro variando entre 1 e 2 cm e pesando, em média, 1,5 g. Apresenta níveis consideráveis de vitaminas, fibras, gorduras, vitaminas, antocianinas e antioxidantes (MENEZES; TORRES; SRUR, 2008; HOLDNERSS et al., 2011). O palmito colhido do estipe é geralmente comercializado em conserva e sua produção aumentou de forma expressiva nas últimas três décadas do século XX e início do século XXI. O palmito é a parte cilíndrica localizada na extremidade superior do estipe (tronco), que é envolvida pela bainha das folhas (MOURÃO, 2010)

No cenário nacional e internacional, o Estado do Pará destaca-se como maior produtor e consumidor do fruto, respondendo por algo em torno de 80 a 90% da produção de açaí (POLL et al., 2013), que supera 700.000 toneladas/ano, proporcionando, aproximadamente, 350.000 toneladas do suco de consistência pastosa chamado simplesmente açaí (CARVALHO, 2013). O mercado tem sido abastecido em sua maior

parte pela exploração de populações nativas da planta. No entanto, a quase totalidade dessas populações já está sobre-explorada e para atender a crescente demanda por frutos faz-se necessário aplicar e/ou intensificar o uso de técnicas de manejo em toda cadeia a produtiva, iniciando pela implantação de pomares em áreas de terra firme (CARVALHO, 2013).

Um importante fator que limita o crescimento das plantas, são as crescentes emissões de gases relacionados ao efeito estufa deverão influenciar a temperatura na terra. Estima-se que a temperatura no globo terrestre sofra acréscimos de 0,2 °C a cada dez anos, o que conduzirá a temperaturas entre 1,8 e 4,0 °C mais elevadas do que o nível atual no ano de 2100 (IPCC, 2014).

O estresse térmico (ou estresse por altas temperaturas) é frequentemente definido como o aumento da temperatura além do nível limite para causar danos irreversíveis ao crescimento e desenvolvimento das plantas (WAHID & CLOSE 2007). Devido ao aquecimento global, a temperatura está aumentando continuamente e se tornou uma séria ameaça ao rendimento de culturas. Temperaturas acima do ideal (normal) são denominadas de estresse térmico, que altera a homeostase celular, levando ao retardo no crescimento e desenvolvimento e até morte em condições extremas (GIAVENO 2003; VOLLENWEIDER & GUNHARDT-GOERG 2005).

Em geral, plantas submetidas ao estresse térmico apresentam significativas alterações no crescimento e produção, perdas estas associadas os efeitos do estresse na fotossíntese (GIAVENO 2003; VOLLENWEIDER & GUNHARDT-GOERG 2005; ALLAKHVERDIEV et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2008). Os parâmetros de trocas gasosas nas plantas sob estresse térmico estão diretamente relacionados à tolerância ou sensibilidade à alta temperatura (YANG et al., 2006; KUMAR et al., 2011). A alta temperatura afeta consideravelmente o *status* hídrico, a condutância estomática ( $g_s$ ) e a concentração subestomática de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) (ASHRAF & HAFEEZ., 2004; GREER & WEEDON., 2012). Em plantas de arroz (*Oryza sativa*) submetidas à alta temperatura (35°C) durante cinco dias, a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> reduziu em 16% em relação ao controle (HURKMAN et al., 2009). Em plantas de videira (*Vitis vinifera* cv. Semillon) a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> diminuiu 60% com o aumento da temperatura de 25°C para 45°C. Essa redução em  $A$  foi atribuída ao fechamento estomático de 15 a 30% (GREER & WEEDON., 2012). Além disso, sob altas temperaturas é possível haver a degradação de clorofilas  $a$  e  $b$ , que é resultado da peroxidação lipídica da membrana do cloroplasto e

tilacóides (MOHAMMED & TAPLEY., 2010). Como por exemplo, plantas de tabaco (*Nicotiana langsdorffii*) submetidas a 38°C apresentaram 18% de redução no teor de clorofila total (TAN et al., 2011).

A alta temperatura também afeta as propriedades de oxido-redução dos receptores do FSII e reduz a eficiência do transporte de elétrons fotossintéticos (MATHUR et al., 2014). Dessa forma, o estresse térmico afeta os valores dos parâmetros relacionados a fluorescência da clorofila *a*. Por exemplo, em plantas de macieira (*Malus domestica*) submetidas a temperatura de 40°C, houve uma diminuição no rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ) e um aumento no valor mínimo de fluorescência ( $F_0$ ) (CHEN et al., 2009; BRESTIC et al., 2013). O aumento em  $F_0$  pode ser devido a inativação da reação fotoquímica do FSII ou uma inibição no fluxo de elétrons devido à transferência reduzida de  $Q_A$  para  $Q_B$  (MARTHUR et al., 2011). Além disso, a diminuição da atividade da Rubisco associada a uma redução no transporte de elétrons do PSII pode levar a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, caso não sejam controladas efetivamente pelo sistema de defesa antioxidante, pode levar a um estresse oxidativo que se manifesta, dentre outros, por um aumento na pode causar peroxidação lipídica (RIZHSKY, 2002; BARTWAL et al., 2012).

As diminuições na fotossíntese em plantas submetidas ao estresse térmico podem levar também a alteração no metabolismo primário do carbono, alterando assim as concentrações foliares de amido e monossacarídeos como a glicose e sacarose (WAHID et al., 2007; CAVATTE et al., 2012; BITA & GERATS, 2013). Por outro lado a sensibilidade ao calor em espécies de plantas varia entre genótipos e estágios de desenvolvimento (CAMEJO et al., 2005; WAHID et al., 2007; MOLINA-BRAVO et al., 2011), além disso as repostas das plantas ao estresse térmico envolvem as regulações dos processos fisiológicos ocasionados por mudanças bioquímicas (WAHID et al., 2007). Atualmente a cultivar, BRS-PA é o único material vegetal melhorado geneticamente para o plantio em terras altas da Amazônia (OLIVEIRA & FARIA NETO, 2004). Estudos anteriores demonstraram que o BRS-PA cv. Mostrou ter um melhor desempenho morfofisiológico sob déficit hídrico moderado (70% da capacidade de campo) em relação a outros materiais vegetais (SILVESTRE et al., 2017). Recentemente, Neves (2018) observou diferentes padrões de respostas fisiológicas em plantas de açaizeiro submetidas altas temperaturas a 36 e 40 °C por 14 dias. No entanto não se há relatos do efeito das altas temperaturas em diferentes tempos de exposição ao estresse térmico no açaizeiro.



Além disso a busca por genótipos mais tolerantes ao estresse térmico se torna primordial para um melhor desenvolvimento e rendimento da cultura.

Nesta pesquisa, foram testadas as seguintes hipóteses: (1) a sensibilidade do açaizeiro ao estresse térmico (40 °C) está relacionada a perda progressiva da atividade da Rubisco em função do tempo de exposição das plantas ao estresse e suas consequências na fisiologia da planta, e (2) a variedade BRS-PA, que apresenta maior tolerância ao déficit hídrico que materiais não melhorados ou nativos (SILVESTRE et al. 2016, 2017), também apresenta maior tolerância ao estresse térmico (40°C). Para testar essas hipóteses, dois experimentos independentes foram conduzidos com os objetivos de (1) avaliar a magnitude das alterações fisiológicas diretamente relacionadas ao metabolismo fotossintético em função de diferentes tempos de exposição das plantas ao estresse térmico (40 °C) e (2) Avaliar o comportamento fisiológico e bioquímicos de dois materiais vegetais de açaizeiro submetidos (material vegetal nativo, Wt; e var. BRS-PA) à alta temperatura (40 °C).

## Referências

- ALLAKHVERDIEV, et al. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. **Photosynthesis research**, v. 98, n. 1-3, p. 541, 2008.
- ASHRAF, M.; HAFEEZ, M. Thermotolerance of pearl millet and maize at early growth stages: Growth and nutrient relations. **Biol. Plant.** 48, 81–86. 2004.
- BARTWAL et al., Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. **J Plant Growth Regul** 32:216–232. 2012.
- BITA & GERATS. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 273, 2013.
- BRESTIC, M., ZIVCAK, M. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. **Molecular Stress Physiology of Plants**. Springer, Berlin, pp. 87–131. 2013.
- CAMEJO, Daymi et al. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. **Journal of plant physiology**, v. 162, n. 3, p. 281-289, 2005.
- CARVALHO, J. E. U. **Frutas da Amazônia na era das novas culturas**. EMBRAPA, 2013.
- CAVATTE et al. Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. **Journal of Experimental Botany**, 63(8), 3071–3082. 2012.
- CHEN, L.-S.; CHENG, L. Photosystem 2 is more tolerant to high temperature in apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves than in fruit peel. **Photosynthetica**, v. 47, n. 1, p. 112-120, 2009.
- GIAVENO. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. **Crop Breed Appl Biotechnol** 3:89–94. 2003.
- GREER, D.H.; WEEDON, M.M. Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. **Plant Cell Environ.** 35, 1050–1064. 2012.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G. Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae). **New York: New York Botanical Garden**, 90P. 1996.
- HOLDERNESS, J. et al. Polysaccharides isolated from Açai Fruit induce innate immune responses. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 1-14, 2011.
- HOMMA, A. K. O. et al. Açai: novos desafios e tendências. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2006.

HOMMA, A. K. O. et al. Açaí: novos desafios e tendências. In: HOMMA, A. K. O. (Ed.) **Extrativismo vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação**. Brasília, DF: Embrapa Amazônia Oriental. Cap. 7. p. 133–148. 2014.

HURKMAN, W.J. et al. Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain. **J. Cereal Sci.** 49, 12–23. 2009.

IPCC. Climate change: impacts, adaptation, and vulnerability. part b: regional aspects. contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, Barros VR et al. (eds), **Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA**, 688 pp. 2014.

JONES, D.L. **Palms: throughout the world**. Washington: Smithsonian Institution. 410p. 1995.

KUMAR, Sanjeev et al. Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 6, p. 2091, 2011.

MATHUR S, AGRAWAL D, JAJOO A. Photosynthesis: limitations in response to high temperature stress. **J Photochem Photobiol B Biol.** 2014.

MATHUR S, MEHTA P, JAJOO A, BHARTI. Analysis of elevated temperature induced inhibition of Photosystem II using Chl *a* fluorescence induction kinetics. **Plant Biology** 13:1–6. 2011.

MENEZES, S. E. M.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Revista **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, p. 311-316, 2008.

MOHAMMED, A.R.; TARPLEY, L. Effects of high night temperature and spikelet position on yield-related parameters of rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Eur. J. Agron.** 33, 117–123. 2010.

MOLINA-BRAVO, Ramón et al. A protocol to assess heat tolerance in a segregating population of raspberry using chlorophyll fluorescence. **Scientia horticultrae**, v. 130, n. 3, p. 524-530, 2011.

MOURÃO, Leila. História e natureza: do açaí ao palmito. **Revista Territórios e Fronteiras**, v.3, n.2, jul./dez. 2010.

NEVES. Respostas fotoquímicas de mudas de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) às altas temperaturas. **Dissertação de mestrado Universidade Federal Rural da Amazônia**. 2018.

OLIVEIRA, M do S.P de. **Melhoramento genético do açaizeiro na Amazônia Oriental**. 15p. 1998.

OLIVEIRA, M. do S. P. de & FARIAS NETO, J. T. de. Cultivar BRS-Pará: açazeiro para produção de frutos em terra firme. **Belém: Embrapa Amazônia Oriental**. p. 1-3. (Comunicado Técnico, 114). 2004.

POOL et al., **Anuario brasileiro de fruticultura 2013**. Santa Cruz do Sul: Gazeta. 136p. 2013.

RIZHSKY & MITTLER. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant physiology**, v. 130, n. 3, p. 1143-1151, 2002.

SILVESTRE, et al. Differential tolerance to water deficit in two açai (*Euterpe oleracea* Mart.) plant materials. **Acta Physiol Plant**. 39(1): 4. 2017.

SILVESTRE, et al. Morphological and physiological responses of açai seedlings subjected to different watering regimes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 4, p. 364-371, 2016.

TAN, W. et al. Photosynthesis is improved by exogenous calcium in heat-stressed tobacco plants. **J. Plant Physiol**. 168, 2063–2071. 2011.

VOLLENWEIDER & GUNHRADT. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. **Environ Pollut** 137:455–465. 2005.

WAHID, A; CLOSE, T. J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 104-109, 2007.

WAHID, Abdul et al. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and experimental botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.

YAMAMOTO, Yasusi et al. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. **Photosynthesis Research**, v. 98, n. 1-3, p. 589-608, 2008.

YANG, X. et al. Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: A comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions. **Plant Science**. 171, 389–397. 2006.

## **CAPÍTULO 02: RESPOSTAS FOTOQUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DE MUDAS DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE TÉRMICO**

### **1. Introdução**

O estresse térmico ou estresse por alta temperatura é um dos principais estresses abióticos que limitam a produtividade das plantas (ALLAKHVERDIEV et al., 2008) e é frequentemente definido como o aumento da temperatura além do nível limite para causar danos irreversíveis ao crescimento e desenvolvimento das plantas (WAHID & CLOSE 2007). Este estresse altera a homeostase celular, levando ao retardo no crescimento e desenvolvimento e até a morte da planta em condições extremas (GIAVENO 2003; VOLLENWEIDER & GUNHARDT-GOERG 2005). No cenário mundial, o estresse térmico tem sido foco de várias pesquisas principalmente devido as predições de aumento da temperatura no globo terrestre, as quais poderão sofrer acréscimos de 0,2 °C a cada dez anos, podendo resultar em aumentos de 1,8 e 4,0 °C no ano de 2100 (IPCC, 2014).

Os parâmetros de trocas gasosas nas plantas sob estresse térmico estão diretamente relacionados à tolerância ou sensibilidade à alta temperatura (YANG et al., 2006; KUMAR et al., 2011). Estudos evidenciaram que algumas variedades de plantas de algodão (*Gossypium* sp.), pepino (*Cucumis sativus*) e trigo (*Triticum* sp.) apresentam considerável sensibilidade ao estresse térmico (40 °C), pois o estresse causa significativas reduções na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) e transpiração (*E*), além de danos ao aparato fotossintético (PSII) e aumento na peroxidação lipídica (SAIRAM et al. 2000; MAHAN & MAUGET 2005; CHEN et al., 2017). A alta temperatura também pode afetar o *status* hídrico da planta e as reduções na *g<sub>s</sub>* podem

levar a uma diminuição na concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) (ASHRAF & HAFEEZ., 2004; GREER & WEEDON., 2012)

A redução na eficiência do PSII pode estar associada às alterações na fluidez das membranas dos tilacóides e às alterações no rendimento quântico do transporte de elétrons do PSII (LIU et al., 2009). Em plantas de arroz, trigo e milho, foi demonstrado que o estresse térmico leva a uma diminuição na atividade da Rubisco e da Rubisco ativase, o que explica, pelo menos em parte, as reduções na fotossíntese (PERDOMO et al., 2017).

As diminuições na  $A$  em plantas submetidas ao estresse térmico podem levar a uma alteração no metabolismo primário do carbono, alterando assim as concentrações foliares de amido e monossacarídeos como a glicose e sacarose (WAHID et al., 2007; CAVATTE et al., 2012; BITA & GERATS, 2013). Em várias mono e dicotiledôneas, a diminuição da fotossíntese em plantas submetidas a altas temperaturas levou a diminuições nas concentrações de amido (WAHID et al., 2007 & MARIAS et al., 2016). Então, os efeitos do estresse térmico na fotossíntese têm sido associados às reduções no crescimento e na produção das plantas (GIAVENO 2003; VOLLENWEIDER & GUNHARDT-GOERG 2005; ALLAKHVERDIEV et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2008). Em algumas espécies, contudo, o estresse térmico não altera as concentrações de sacarose, tendo sido atribuído a esse dissacarídeo um papel osmorregulador que visa atenuar os efeitos do estresse térmico no status hídrico das plantas (CAVATTE et al., 2012; BITA & GERATS, 2013).

Por outro lado, a diminuição da atividade da Rubisco em plantas submetidas ao estresse térmico tem sido associada a uma redução no transporte de elétrons no PSII pode levar a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos cloroplastos que, caso não sejam controladas efetivamente pelo sistema de defesa antioxidante, pode levar a um estresse oxidativo que se manifesta, dentre outros, por um aumento na peroxidação lipídica (RIZHISKY, 2002; BARTWAL et al., 2012). Então, variáveis de fluorescência da clorofila  $a$ , em especial a eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ), e a quantificação de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (aldeído malônico, MDA) tem se mostrado, respectivamente, bons indicadores de foto-oxidação ao PSII e peroxidação lipídica de membranas celulares em plantas submetidas ao estresse térmico (HERNÁNDEZ et al., 1993; FOYER et al., 1994; OGBONNAYA et al., 2003).

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma espécie tropical amplamente encontrada nas várzeas da Amazônia no norte do Brasil (CATTANIO et al., 2002). Considerando-se o cenário de mudanças climáticas globais e as previsões de incremento na temperatura do globo previstas para as próximas décadas (IPCC, 2014) e a partir dos dados de médios de temperatura do ar que caracterizam as regiões produtoras de açaí no Estado do Pará sistematizados por NEVES (2018), é possível sugerir, na ótica das mudanças climáticas, que as temperaturas locais possam atingir médias que variem entre 36 e 40 °C até o final deste século. Então, este aumento de temperatura pode funcionar como um fator de estresse relevante para o crescimento e produção do açaizeiro e de outras culturas importantes para a agricultura na Amazônia.

Recentemente, Neves (2018) observou diferentes padrões de respostas fisiológicas em plantas de açaizeiro submetidas a 36 e 40 °C por 14 dias. Em geral, as plantas submetidas a 36 °C apresentaram reduções em algumas variáveis de fluorescência em relação às plantas controle (28 °C). Entretanto, a atividade de enzimas antioxidantes (dismutase do superóxido, SOD; e peroxidase do ascorbato, APX) controlaram adequadamente a ocorrência de peroxidação lipídica nesta temperatura. Em contraste, as plantas submetidas a 40 °C apresentaram reduções significativas nas trocas gasosas e variáveis de fluorescência, dentre elas as reduções na  $F_v/F_m$  que, associadas a uma maior concentração de MDA, indicaram a ocorrência de danos foto-oxidativos e peroxidação lipídica nas plantas estressadas. Dessa forma, o açaizeiro mostra-se tolerante a temperaturas constantes de 36 °C mas sensível ao estresse térmico por 40 °C (NEVES 2018).

Neste trabalho, foi testada a hipótese de que a sensibilidade do açaizeiro ao estresse térmico (40 °C) está relacionada a perda progressiva da atividade da Rubisco em função do tempo de exposição das plantas ao estresse. Conseqüentemente, espera-se que as reduções na fotossíntese levem a uma alteração nas concentrações de carboidratos primários e a uma sobrecarga nas reações fotoquímicas, esta última disparando danos foto-oxidativos ao PSII e peroxidação lipídica. Desta forma, objetivou-se neste trabalho avaliar a magnitude das alterações fisiológicas diretamente relacionadas ao metabolismo fotossintético em função de diferentes tempos de exposição das plantas de açaizeiro ao estresse térmico (40 °C).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material vegetal e condições experimentais

Mudas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) foram produzidas em casa de vegetação no Campus da Universidade Federal Rural da Amazônia, em Belém, Pará (01°27'29"S, 48°26'06"W) a partir de sementes de material nativo coletadas de árvores adultas no município de Santa Izabel – Pará “Fazenda 2 irmãos”. O clima local é do tipo Afi segundo Köppen. O semeio foi realizado em setembro de 2017 em bandejas de polietileno preenchidas com fibra de coco (Golden Mix 87, Sococo Agroindústria da Amazônia, Ananindeua, Brasil) como substrato de cultivo. A irrigação foi realizada manualmente, com 500 mL de água por bandeja a cada dois dias. Após aproximadamente 60 dias do semeio, as plântulas mais vigorosas contendo uma única folha cotiledonar aberta foram transferidas para vasos de polietileno de 1,5 L (10 x 14 cm, altura e diâmetro) contendo como substrato 1,4 L de uma mistura composta de terriço e cama de aviário curtida (2:1; v/v). Nesta operação, cada vaso recebeu uma só planta, sendo preparados um total de 48 vasos. A irrigação foi realizada diariamente, entre 8:00 e 9:00 h, com reposição de 100% de água necessária para levar o solo a capacidade de campo (CC), sendo o volume de água de irrigação aplicado estimado pelo método gravimétrico (KLAR et al., 1966). Após 30 dias do transplantio, as mudas foram fertilizadas com 3,0 g de NPK 18:18:18 e esta operação foi igualmente repetida quatro vezes em intervalos de 30 dias contados após a primeira fertilização. Aos 150 dias do transplantio foi realizada uma fertilização com 2,8 g de NPK (16:16:16) por planta.

Após 180 dias do semeio, 24 plantas uniformes em altura e número de folhas (quatro folhas bipinadas) foram selecionadas para a instalação do experimento definitivo, que consistiu de quatro tratamentos correspondentes a diferentes regimes térmicos assim definidos:



Controle (C) – incubação das mudas a 28 °C por todo o período experimental (11 dias)

Estresse térmico 1 (ET<sub>1</sub>) – incubação das mudas a 28 °C por 10 dias e a 40 °C por 1 dia  
(total de 11 dias)

Estresse térmico 2 (ET<sub>2</sub>) – incubação das mudas a 28 °C por 5 dias e a 40 °C por 6 dias  
(total de 11 dias)

Estresse térmico 3 (ET<sub>3</sub>) – incubação das mudas a 40 °C por todo o período experimental  
(11 dias).

No período de incubação das plantas, as mesmas foram submetidas a um fotoperíodo de 12 h sob radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de  $162 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Na câmara regulada a 28 °C, a média de umidade relativa do ar (UR) foi de  $67 \pm 3,7\%$ ; enquanto na câmara regulada a 40 °C a média de UR foi de  $69 \pm 4,5\%$ . A irrigação das plantas foi realizada diariamente em duas aplicações (manhã/tarde), cada uma com 50 mL de água destilada por planta.

O experimento foi instalado em blocos inteiramente casualizados, em que cada bloco foi constituído de duas repetições (i.e., duas plantas) por tratamento. Um total de três blocos experimentais foi utilizado, perfazendo um total de 24 plantas. A opção pelo delineamento em blocos foi necessária devido a limitação de câmaras de crescimento disponíveis para incubar todas as plantas de todos os tratamentos simultaneamente e a impossibilidade de avaliar as trocas gasosas de todas as plantas do experimento no intervalo de aproximadamente duas horas de trabalho ao longo de uma manhã.

O período de 11 dias de incubação foi definido com base em resultados preliminares (NEVES 2018). Ao final deste tempo, as mudas de todos os regimes térmicos foram levadas à casa de vegetação para as determinações fisiológicas (trocas gasosas, fluorescência da clorofila e *status* hídrico da planta) e amostragens para análises bioquímicas. Estas operações foram realizadas entre 8:30 e 10:30 h, usando como amostra a segunda folha a partir do ápice. Durante as medições, as médias de temperatura do ar, déficit de pressão de vapor, umidade relativa do ar e PAR na casa de vegetação foram respectivamente de  $32 \pm 2 \text{ °C}$ ,  $2,00 \pm 0,48 \text{ kPa}$ ,  $61 \pm 2\%$ ,  $548 \pm 79 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As amostras para análises bioquímicas foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a  $-80 \text{ °C}$  até o momento das análises.

## 2.2 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As trocas gasosas ( $A$ ,  $g_s$ ,  $C_i$  e  $E$ ) foram determinadas utilizando-se um analisador portátil de gases a infravermelho (LI-6400 XT, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, EUA) sob PAR saturante de  $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (CALBO; MORAES, 2000) e concentração de  $\text{CO}_2$  de  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . Em seguida, a fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se um fluorômetro (LI-6400-40; LI-COR Biosci. Inc., Nebraska, USA) conforme Lima et al. (2002). Para isto, as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 min e  $F_v/F_m$  estimada pela razão entre fluorescência variável e máxima [ $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$ ]. Subsequentemente, pulsos saturantes de luz branca foram aplicados para atingir a máxima fluorescência ( $F'_m$ ). Em seguida, a luz actínica foi desligada e a radiação vermelha distante ligada para obter a  $F_0$  adaptada a luz ( $F'_0$ ). A eficiência de captura de energia de excitação por centros de reação FSII abertos ( $F'_v/F'_m$ ) foi estimada como a razão entre ( $F'_m - F'_0$ ) /  $F'_m$ . O coeficiente de extinção fotoquímica ( $qL$ ) foi calculado segundo Murchie and Lawson (2013) e o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) foi determinado a partir da equação de Stern - Volmer [ $\text{NPQ} = (F_m/F'_m) - 1$ ] (KRAUSE; WEIS, 1991). O rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) foi calculado como ( $F'_m - F_s$ ) /  $F'_m$  (GENTY et al., 1989).

## 2.3 Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado relacionando-se as massas fresca (MF), túrgida (MT) e seca (MS) das amostras pela fórmula  $\text{CRA} = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$  (GONZÁLEZ e GONZÁLEZ-VILAR (2001). Os resultados foram expressos em porcentagem.

## 2.4 Ensaio enzimáticos

A Ribulose 1,5 bisfosfato carboxylase/oxygenase (Rubisco) foi extraída a partir de amostras foliares (200 mg MF) em presença de PVPP 100% (p/p) e 1,3 mL de tampão “Stitt” [Hepes 50 mM, pH 7,4,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, BSA 0,1% (p/v), glicerol 10% (v/v), triton X-100 0,1%, DTT 5 mM, benzamida 2 mM, ácido aminocapóico 2 mM e PMSF 0,5 mM] (GEIGENBERGER & STITT; 1993). As amostras foram centrifugadas (25.000 *g* por 25 min a 4 °C) e uma alíquota do sobrenadante (500  $\mu\text{L}$ ) foi aplicada em uma coluna de polietileno empacotada com Sephadex G-25. A

eluição da amostra foi realizada com 1500  $\mu\text{L}$  de tampão Stitt. Foram coletados 2000  $\mu\text{L}$  de volume total por amostra, as quais foram utilizadas nos ensaios de atividade. A atividade inicial e final da Rubisco foi determinada medindo-se o consumo de NADH a 340 nm. Para a atividade inicial, 20  $\mu\text{L}$  de extrato foram misturados a 125  $\mu\text{L}$  do meio de reação composto de bicina 100 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  15 mM, DTT 10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  9,2 mM, NADH 0,5 mM, ATP 2 mM, BSA 0,1% (p/v), fosfocreatina 5 mM, fosfocreatina cinase 2  $\text{U mL}^{-1}$ , fosfoglicerato cinase 40  $\text{U mL}^{-1}$ , gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 40  $\text{U mL}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Para a atividade total, 20  $\mu\text{L}$  de extrato foram misturados a 125  $\mu\text{L}$  do meio de reação composto de bicina 100 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  20 mM, DTT 10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, NADH 0,5 mM, ATP 2 mM, BSA 0,1% (p/v), fosfocreatina 5 mM, fosfocreatina cinase 2  $\text{U mL}^{-1}$ , fosfoglicerato cinase 40  $\text{U mL}^{-1}$ , gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 40  $\text{U mL}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (SHARKEY et al., 1991). O extrato foi o “start” da reação em ambos os ensaios. O estado de ativação da Rubisco foi estimado pela fórmula, (Estado de ativação = (Atividade inicial x 100) / Atividade total).

A extração da GLOx foi realizada em 3 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) contendo DTT 5 mM e Triton X-100 0,01% (v/v) (BOOKER et al., 1997). Após a centrifugação (30.000 g por 20 min a 4 °C) uma alíquota (2000  $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante foi usada para os ensaios enzimáticos. A atividade da GLOx foi determinada medindo-se a produção de glicolato de fenil-hidrazona a 324 nm, em 175  $\mu\text{L}$  de meio de reação [Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), Triton X 100 0,009% (v/v), fenil-hidrazona HCl 3,3 mM (pH 6,8), ácido glicólico 5 mM (neutralizado para pH 7,0 com KOH 0,1M)] e 20  $\mu\text{L}$  de extrato (BOOKER et al., 1997). Para os cálculos, foi usado o coeficiente de extinção molar de 17  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  foi utilizado para os cálculos.

Os resultados de atividade inicial e total da Rubisco e atividade da GLOx foram expressos com base na dosagem de proteínas (BRADFORD, 1976).

## 2.5. Peroxidação lipídica

As amostras de folhas (100 mg MF) foram maceradas a pó fino com uso de nitrogênio líquido e a extração foi realizada em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). O homogenato foi centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4 °C. Uma alíquota (500  $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante foi misturada vigorosamente a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (v/v) preparado em TCA 20% (p/v). As amostras foram incubadas a 90 °C por 20

min e em seguida a reação foi parada em banho de gelo. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 15 min a 4 °C para sedimentar qualquer resíduo ainda presente e evitar interferência nas leituras das absorvâncias, as quais foram registradas a 532 e 600 nm em espectrofotômetro UV-Visível (Bel espectro S - 2000). A peroxidação lipídica foi estimada como o conteúdo de substâncias reativas ao TBA expressas como equivalentes de MDA (CAKMAK; HORST, 1991).

## 2.6 Carboidratos foliares

Amostras foliares (100 mg MF) foram submetidas a extração etanólica (TRETHERWEY et al., 1998) e após centrifugação (13.000 g por 10 min a 4 °C) o sobrenadante foi utilizado para as determinações de glicose e sacarose. O precipitado foi congelado (-80 °C) para posterior determinação das concentrações de amido.

As concentrações foliares de glicose e sacarose foram determinadas de acordo com Stitt et al. (1989), com algumas modificações. A mistura de reação (100 µL) continha tampão imidazol 100 mM/ MgCl<sub>2</sub> 5 mM (pH 6,9), NAD<sup>+</sup> 2 mM, ATP 1 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U e 5 µL de extrato etanólico. As determinações de glicose, frutose e sacarose foram avaliadas pela adição de hexocinase (1 U), glicose-6-fosfato isomerase (1 U) e invertase (1 U) respectivamente. Após a adição de cada enzima, a produção de NADH foi acompanhada a 340 nm utilizando-se um leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO, Japão).

Para a determinação do amido, os sedimentos congelados obtidos a partir de extrato etanólico foram solubilizados em 1 mL de etanol absoluto e incubados por 20 min a 80 °C. Após centrifugação (12.000 g, por 5 min a 4 °C), o sobrenadante foi descartado e o resíduo foi solubilizado em 1 mL de KOH 0,2 M e incubado por 60 min a 90 °C. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação (12.000 g por 5 min a 4 °C) foram neutralizados com ácido acético (TRETHERWEY et al., 1998) e em seguida, uma alíquota (20 µL) do extrato neutralizado foi incubado por 60 min a 55 °C em uma mistura de reação contendo (30 µL de citrato de sódio 0,3M/ tampão de cítrico 0,3M pH 4,6), 10 µL amiloglucosidase (correspondente a 1 U) e 240 µL de água destilada. Após a hidrólise, o teor de glicose resultante foi analisado pelo método já descrito acima e a concentração de amido nas amostras foi estimada em equivalentes de glicose.

## 2.7 Análise estatística

A distribuição normal dos dados foi feita através do teste de Shapiro-Wilk e submetidos à ANOVA (teste F,  $P \leq 0,05$ ) e as diferenças entre médias de tratamentos para cada variável comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) usando o software R versão 3.4.1 (2016).

## 3. Resultados

### 3.1 Trocas gasosas e conteúdo relativo de água

A  $A$  foi reduzida em 36% nas plantas submetidas a 40 °C/1d em relação às plantas controle (Fig. 1a). A exposição das plantas por 6 e 11 dias a 40 °C causou reduções médias de 81% na  $A$  em relação às plantas controle e 84% em relação às plantas estressadas por 1 dia (Fig. 1a). Independentemente do tempo de exposição ao estresse térmico, reduções de 84% na  $g_s$  e  $E$  das plantas estressadas foram observadas em relação às plantas controle (Fig. 1b-c). Ainda que a  $g_s$  tenha sido reduzida em função do estresse, foi observado que a exposição das plantas por 1 ou 6 dias a 40 °C não alterou a  $C_i$ , cujas médias foram similares a das plantas controle (Fig. 1d). Porém, um aumento de 62% na  $C_i$  das plantas submetidas a 40 °C/11d foi observado em relação ao controle (Fig. 1d).

O *status* hídrico da planta, avaliado por meio do CRA, estão apresentados na Fig. 2. Esta variável foi reduzida em 27% nas plantas estressadas a 40 °C por 1 ou 6 dias em relação às plantas controle. No maior tempo de exposição ao estresse, o CRA das plantas estressadas foi reduzido em 85% em relação as plantas controle.

### 3.2 Fluorescência da clorofila *a*

Nas plantas submetidas a 40 °C por 1 e 6 dias, as médias de  $F_v/F_m$  não diferiram do controle, indicando ausência de danos foto-oxidativos (Fig. 3a). Porém, danos foto-oxidativos foram observados nas plantas submetidas a 40 °C/11d, como evidenciado pela redução de 27% no  $F_v/F_m$  dessas plantas em relação as plantas controle (Fig. 3a). A  $\Phi_{PSII}$  nas plantas estressadas foi reduzida em 40, 66 e 98% quando essas plantas foram respectivamente submetidas por 1, 6 e 11 dias a 40 °C (Fig. 3b). O efeito do tempo de exposição ao estresse no  $q_L$  foi semelhante ao observado para o  $\Phi_{PSII}$ , então, comparado

ao controle, a  $q_L$  foi reduzida em 50, 60% e 98% nas plantas submetidas a 40 °C por 1, 6 e 11 dias (Fig. 3c). As plantas estressadas perderam capacidade de dissipação térmica de excessos de energia sob condições de estresse, visto que o NPQ foi reduzido em média 27% nas plantas submetidas por 1 ou 6 dias ao estresse e em 95% nas plantas submetidas a 40 °C/11d (Fig. 3d).

### **3.3 Atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do carbono**

A atividade da GLOx nas plantas submetidas a 40 °C por 1 ou 6 dias permaneceu inalterada em relação as plantas controle (Fig. 4). No entanto, o estresse térmico a 40 °C por 11 dias levou a um aumento de 60% na atividade da GLOx em relação as plantas controle (Fig. 4). Em relação às plantas controle, a atividade inicial da Rubisco não foi alterada pela exposição das plantas a 40 °C por 1 dia, mas foi 21% menor nas plantas submetidas a 40 °C por 6 ou 11 dias (Fig. 5a). Nenhum efeito negativo do estresse térmico na atividade total da Rubisco foi observado independentemente do tempo de exposição das plantas ao estresse (Fig. 5b), porém, o estresse em qualquer dos tempos de exposição reduziu o estado de ativação da enzima em 40% quando comparado ao controle (Fig. 5c).

### **3.4 Peroxidação lipídica e carboidratos foliares**

As plantas submetidas a 40 °C/1d apresentaram um incremento de 48% na concentração de MDA em relação às plantas controle, sendo reduzido para valores similares ao das plantas controle aos seis dias de estresse (Fig. 6). No entanto, a concentração de MDA aumentou novamente (32%) nas plantas submetidas a 40 °C por 11 dias, indicando um aumento na peroxidação lipídica em relação ao controle (Fig. 6).

### **3.5 Carboidratos foliares**

As plantas estressadas apresentaram alterações nas concentrações de carboidratos foliares, de modo que as concentrações de amido e sacarose foram em média 66 e 37% menores nas plantas estressadas em relação ao controle, independentemente do tempo de exposição ao estresse (Fig. 7a, b). As concentrações de glicose não diferiram entre plantas

controle e àquelas submetidas ao estresse por 1 ou 6 dias, mas foi significativamente reduzida (47%) nas plantas submetidas a 40 °C por 11 dias (Fig. 7c).

Figura 01: Alterações na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*, Fig. 1a), na condutância estomática (*g<sub>s</sub>*, Fig. 1b), na transpiração (*E*, Fig. 1c) e na concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*, Fig. 1d) em mudas de açazeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

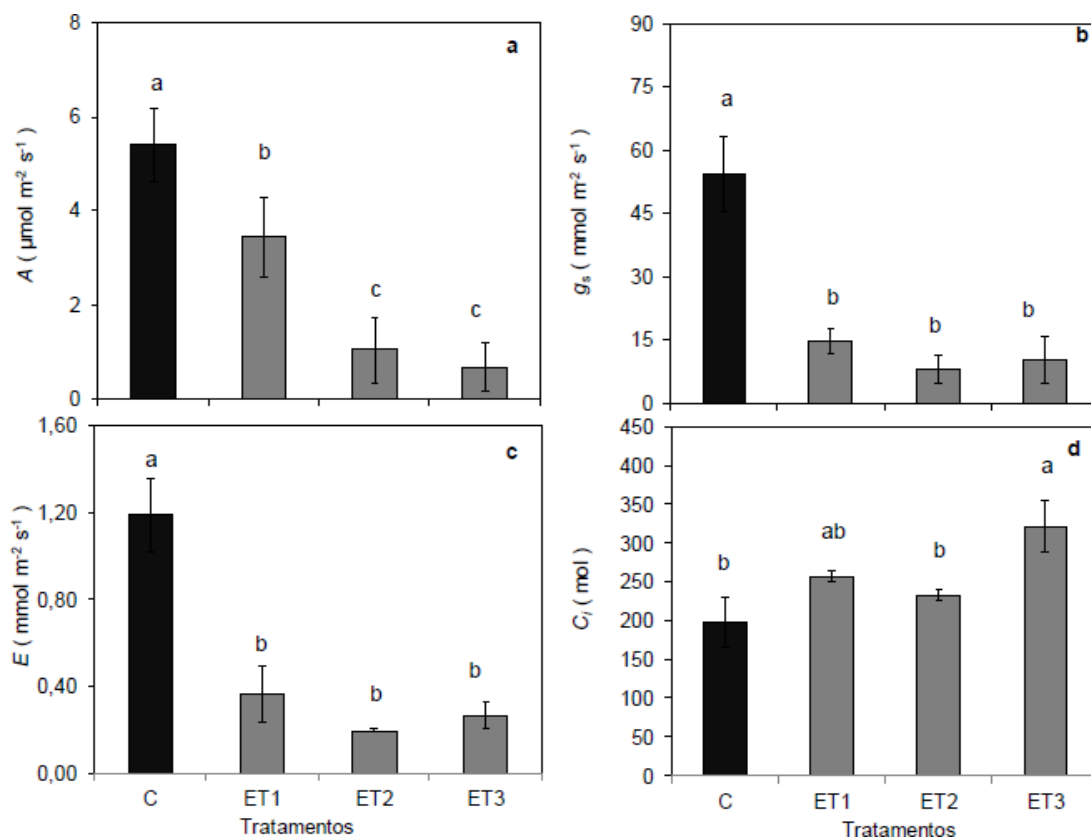




Figura 02: Conteúdo relativo de água (CRA) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

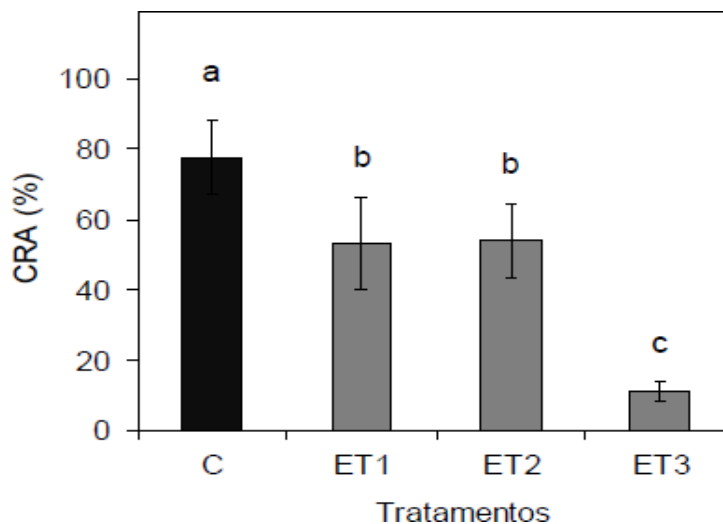


Figura 03: Alterações na eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ , Fig. 3a), rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII ( $\Phi_{PSII}$ , Fig. 3b), coeficiente de extinção fotoquímica ( $q_L$ , Fig. 3c) e coeficiente de dissipação não-fotoquímica (NPQ, Fig. 3d) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

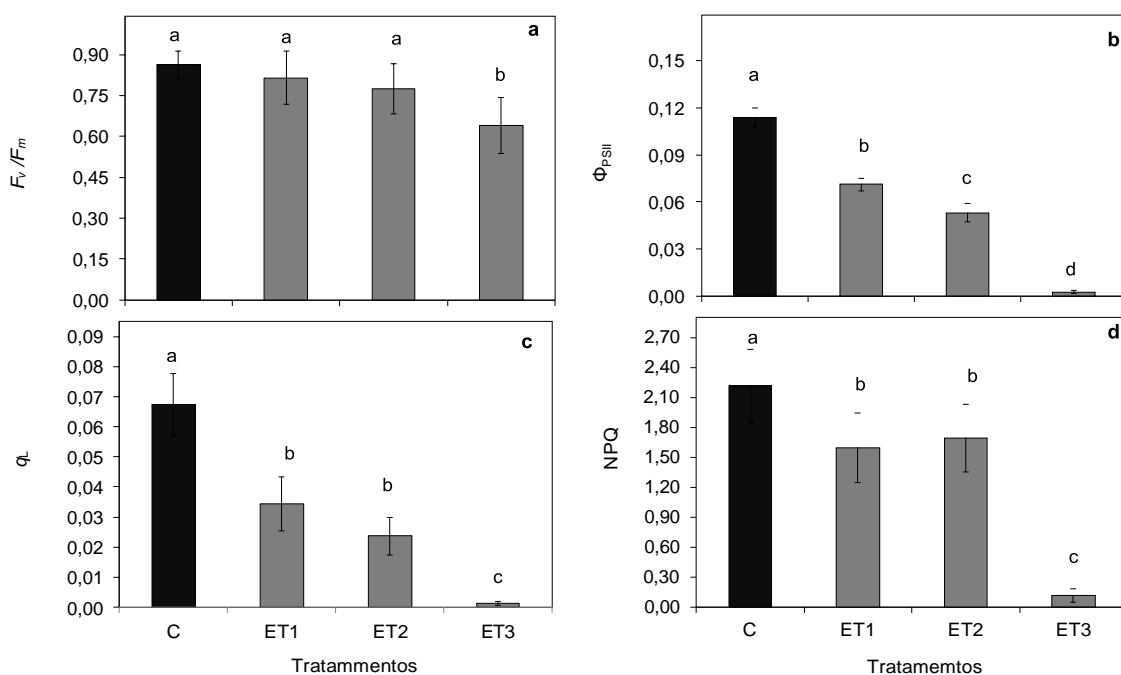


Figura 04: Atividade da glicolato oxidase (GLOx) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

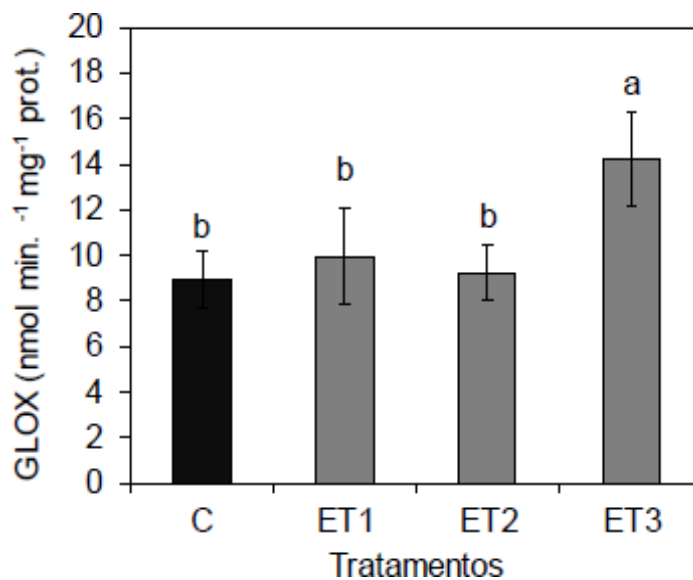


Figura 05: Atividade da inicial (Fig. 5a), total (Fig. 5b) e estado de ativação da Rubisco (Fig. 5c) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

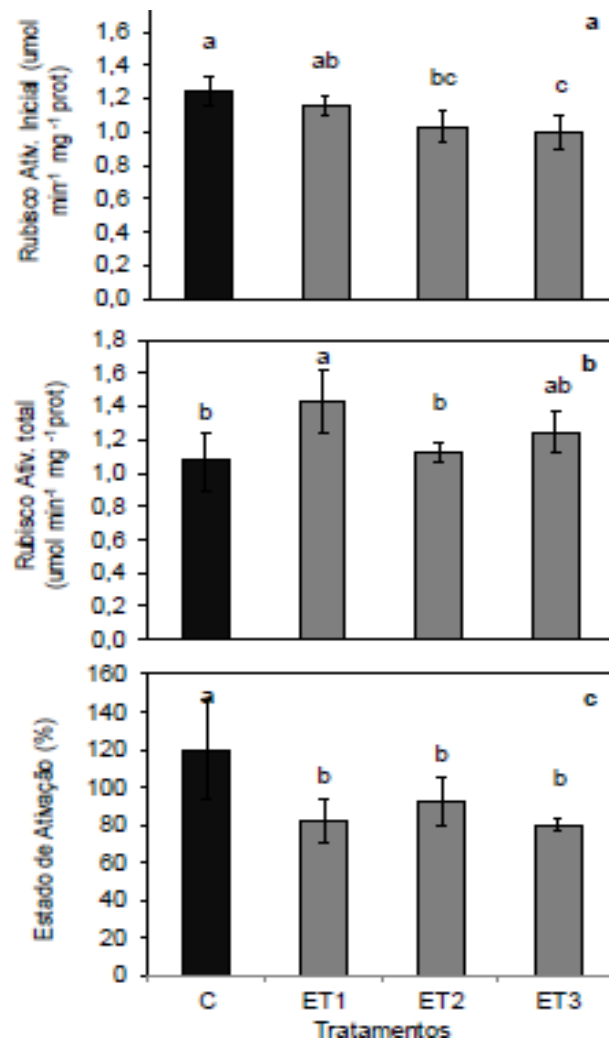


Figura 06: Peroxidação lipídica acessada em termos da concentração de aldeído malônico (MDA) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

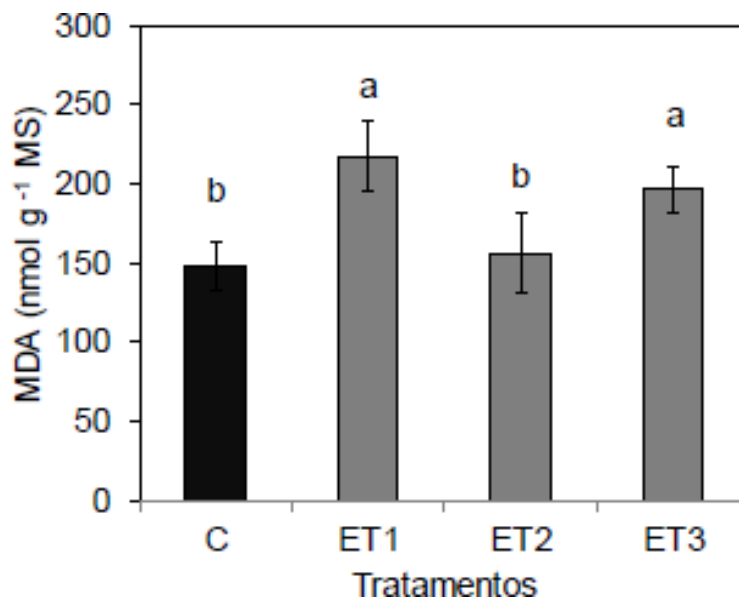
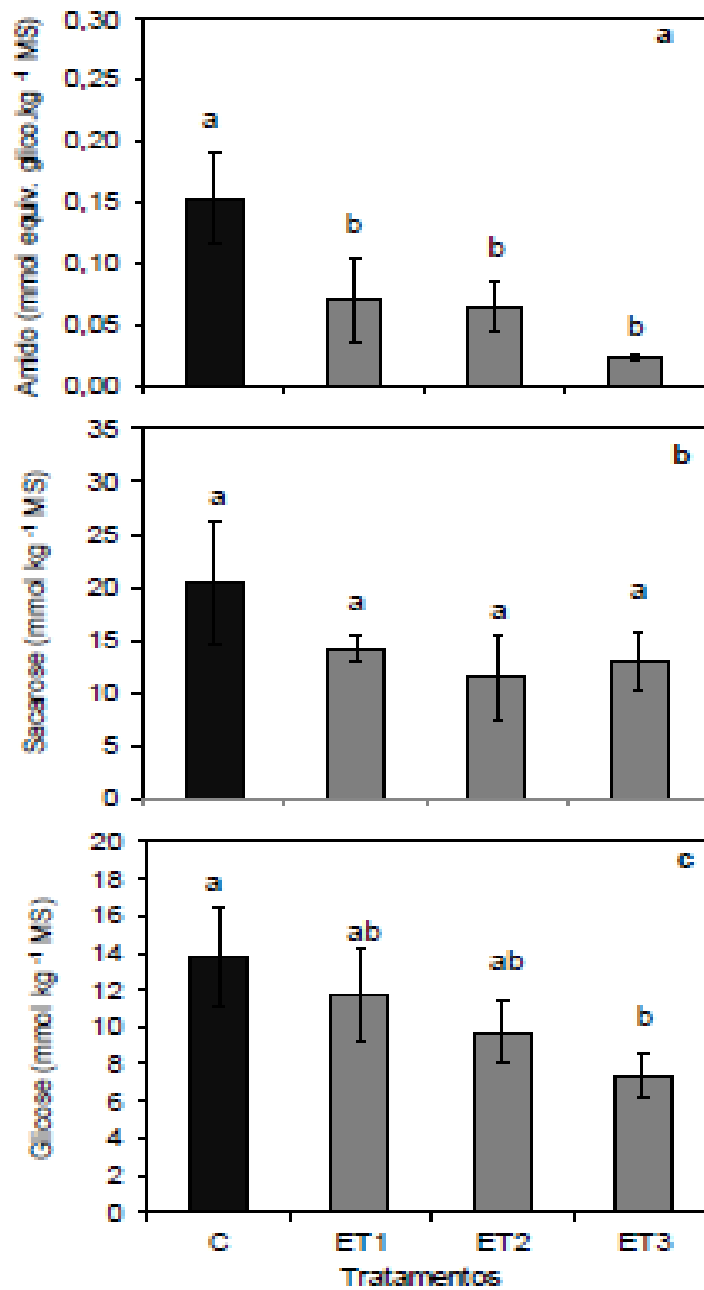


Figura 07: Alteração nas concentrações de amido (Fig 7a), sacarose (Fig 7b) e glicose (Fig. 7c) em mudas de açaizeiro submetidas a diferentes regimes térmicos (C, tratamento controle em que as mudas foram incubadas a 28 °C/11 dias; ET<sub>1</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/10 dias e 40 °C/1 dia; ET<sub>2</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 28 °C/5 dias e 40 °C/6 dias; e ET<sub>3</sub>, estresse térmico em que as mudas foram incubadas a 40 °C/11 dias). Os dados são a média de quatro blocos ± D.P. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).



#### 4. Discussão

Neste trabalho, foi observado que o estresse térmico levou a um rápido e expressivo fechamento estomático evidenciado pelas reduções na  $g_s$  mesmo no tratamento de 1 dia de exposição das plantas a 40 °C. As reduções na  $g_s$  nos tempos de 1 e 6 dias foram acompanhadas de reduções de mesma magnitude na  $E$  e de decréscimos menos expressivos no CRA, o que sugere que o rápido fechamento estomático contribuiu significativamente para atenuar a perda excessiva de água pela planta nesses tempos de exposição ao estresse. Contudo, as reduções na  $g_s$  e na  $E$  não evitaram a desidratação quase que completa das folhas observada aos 11 dias de exposição ao estresse, quando o CRA alcançou os valores mais baixos (em torno de 20%). Reduções expressivas no CRA em plantas submetidas ao estresse térmico tem sido observada em outras espécies sob condições de estresse térmico variadas (combinações temperatura x tempo). Por exemplo, um CRA de 20 % foi observado em plantas de Poaceae submetidas a 35 °C por 30 dias (JIANG & HUANG 2001), *Zea mays* e *Helianthus annuus* foi observado um CRA de 80 % a 45 °C por 2 dias (DEKOV et al., 2000), em *Phaseolus aureus* Roxb. foi observado um CRA de 78 % a 45 °C por 10 dias (KUMAR et al., 2011). A desidratação acentuada dos tecidos foliares observada pode ter sido decorrente da continuada transpiração sob condições de estresse, pois esse processo fisiológico é crucial para criar o gradiente de potencial hídrico que permite a absorção e distribuição de água na planta ao mesmo tempo que contribui para a regulação da temperatura foliar (MATHUR et al., 2014), que, de fato, manteve-se em torno de  $32 \pm 1,2$  °C, não diferindo estatisticamente entre os tratamentos avaliados.

As reduções na  $A$  observadas em plantas submetidas a estresses abióticos podem ser explicadas por diversos fatores, o que inclui aqueles de ordem estomática e difusiva (BOTA et al., 2004)) e problemas associados tanto às reações fotoquímicas quanto ao processo de assimilação do CO<sub>2</sub>, tais como alteração na atividade da Rubisco e regeneração da ribulose 1,5 bisfosfato (LAWLOR & CORNIC 2002; BOTA et al., 2004; FLEXAS et al., 2006; SILVA et al., 2016; HEYNEKE & FERNIE 2018; DE OLIVEIRA et al., 2018). Neste experimento, a  $A$  e a  $g_s$  foram reduzidas em diferentes magnitudes nos diferentes tempos de exposição ao estresse. Este padrão de resposta suporta a ideia de que a diminuição da  $A$  no menor tempo de exposição ao estresse (1 dia) deve ter sido principalmente decorrente da menor condutância estomática associada a limitações difusivas ao CO<sub>2</sub> (MATHUR et al., 2014; GREER & WEENDON 2012). Embora curvas  $A-C_i$  para determinar a condutância mesofílica ao CO<sub>2</sub> não tenham sido realizadas, sabe-

se que esta variável é significativamente diminuída em plantas submetidas ao déficit hídrico, reduzindo a concentração de  $\text{CO}_2$  nos cloroplastos (FLEXAS et al. 2004), o que pode ter ocorrido neste experimento em função das reduções no CRA nas plantas estressadas. Então, a menor concentração de  $\text{CO}_2$  nos cloroplastos diminuiria a atividade carboxilase da Rubisco, favorecendo a fotorrespiração e contribuindo para a diminuição da  $A$  (TAKAGI et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2018; SUNIL et al., 2018).

As reduções na  $g_s$  e as possíveis limitações difusivas como causa da diminuição da  $A$  nas plantas submetidas ao estresse térmico não podem ser diretamente relacionadas às  $C_i$ , pois além desta variável não ter diferenciado entre plantas estressadas e controle nos tempos de 1 e 6 dias, a mesma foi significativamente maior nas plantas estressadas no tempo de 11 dias. Este padrão de resposta do  $C_i$  pode ser explicado por diferentes fatores, tais como: (1) a diminuição na taxa de transporte de elétrons no PSII, sugerindo uma redução na síntese de ATP e NADH pela etapa fotoquímica da fotossíntese o que poderia afetar negativamente as etapas de redução e regeneração do Ciclo de Calvin (CRAFTS-BRANDNER & SALVUCCI 2000; MATHUR et al., 2014; HEYNEKE & FERNIE 2018), (2) a diminuição da atividade carboxilase da Rubisco, diminuindo a assimilação do consumo líquido de  $\text{CO}_2$  (TAKAGI et al., 2016; FOYER et al., 2012)

A fotossíntese é o mais sensível dos processos celulares vegetais às altas temperaturas (SHARKEY & SCHRADER 2006), sensibilidade esta comprovada neste experimento. Além dos fatores estomáticos e difusivos que contribuem pra redução na  $A$ , foi observado que as plantas estressadas de açazeiro apresentaram sucessivos decréscimos na  $A$  (dias 6 e 11) sem diminuições adicionais na  $g_s$  em relação ao tempo de 1 dia de exposição a  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . Isto é um forte indicativo de que problemas fotoquímicos e/ou bioquímicos relacionado podem contribuir mais significativamente para reduzir a  $A$  sob condições de estresse mais severas (CHEN et al., 2017).

Dentre os diferentes problemas associados à fase fotoquímica da fotossíntese em plantas submetidas ao estresse térmico, pode-se citar as mudanças nas propriedades de óxido-redução dos receptores do PSII, que reduzem a eficiência do transporte de elétrons nos fotossistemas (MARTHUR et al., 2014), o que neste experimento foi constatado pelas reduções significativas em  $q_L$  e  $\Phi_{\text{PSII}}$  em todos os tempos de exposição a  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , principalmente aos 6 e 11 dias. Por outro lado, os valores de  $F_v//F_m$  ao final do período de estresse (11 dias) indicam a ocorrência de danos fotooxidativos ao PSII, o que está de acordo com resultados obtidos para outras espécies submetidas ao estresse térmico



(JIANG et al., 2003; CHEN et al., 2008; 2009). Esses danos foto-oxidativos foram observados no tempo de 11 dias, quando os menores valores de  $A$ ,  $qL$ ,  $\Phi_{PSII}$  e NPQ foram observados. Portanto, os resultados demonstram que o excesso de energia de excitação no complexo antena do PSII não utilizado para fins de trabalho químico e nem dissipado adequadamente na forma de calor foram cruciais para a redução na  $F_v/F_m$  (CHEN et al., 2017). A menor taxa de transporte de elétrons na cadeia do PSII ao longo do período de estresse pode ter diminuído a síntese de NADPH e ATP, contribuindo para a redução da  $A$  até certo período (seis dias) (LAWLOR & CORNIC 2002; FOYER et al., 2012; ROACH & KRIEGER-LISZKAY 2014).

É interessante ressaltar a progressiva perda de capacidade de dissipação térmica das plantas com o progresso do estresse, conforme evidenciado pelas sucessivas reduções no NPQ. Esta ineficiente capacidade de dissipação de excessos de energia de excitação no PSII pode estar associada a danos aos pigmentos do ciclo das xantofilas (zeaxantina e antherxantina que são formadas a partir da violaxantina), que são sintetizados sob condições de excesso de excitação de energia e estão envolvidos na fotoproteção e dissipação de energia. Desta forma, a não dissipação adequada do excesso de energia ocasionou uma retro-inibição da etapa fotoquímica da fotossíntese disparando os danos foto-oxidativos (DEMMING-ADAMS & ADAMS, 1996; GILMORE, 1997). As altas temperaturas estão relacionadas a um aumento na fluidez da membrana do tilacóide, que podem atuar como sensor para alterações funcionais induzidas pela temperatura (LOS & MURATA 2004; TURÓCZY et al., 2011). Quando o estresse térmico é brando, estas alterações na fluidez da membrana podem ser ocasionadas pela menor interação entre os lipídeos sem a ocorrência de peroxidação dos mesmos (LOS & MURATA 2004; TURÓCZY et al., 2011). Contudo, as alterações nas concentrações de MDA mostraram a ocorrência de peroxidação lipídica após 1 e 11 dias de estresse térmico, tendo sido controlada no tempo de 6 dias de incubação. Este resultado sugere que no menor tempo de exposição ao estresse, o aumento nas ROS deve ter desempenhado um papel de sinalização ao estresse para induzir as respostas adaptativas da planta (MTTLER., 2002; FOYER., et al., 2012). Porém, esta produção induzida de ROS nas plantas submetidas a 40 °C/1d foi maior que a capacidade de defesa antioxidante das plantas e, por isso, o aumento de MDA foi evidente. No tempo de 6 dias, o controle da peroxidação lipídica pode ter sido resultante de um melhor ajuste no sistema antioxidante, visto que o MDA reduziu ao nível das plantas controle. Já no tempo de 11 dias de exposição ao estresse térmico, a peroxidação lipídica deve ser decorrente de uma maior produção de ROS nos

cloroplastos, consequentemente danificando a proteína D1 do PSII e inibindo sua reparação (ALLAKHVERDIEV et al., 2005). Estes resultados confirmam aqueles encontrados para MDA diferentes plantas submetidas a altas temperaturas (40°C), como em *Gossypium* (MAHAN & MAUGET 2005) e *Cucumis sativus* (CHEN et al., 2017).

Além dos problemas fotoquímicos, uma resposta peculiar da fotossíntese à alta temperatura é a alteração na cinética da Rubisco (CARMO-SILVA & SALVUCCI, 2012; WANG, et al., 2015). Nesse estudo o estado de ativação da Rubisco diminuiu conforme o período de estresse, juntamente com sua atividade inicial. A atividade da Rubisco é regulada pela Rubisco ativase (PERDOMO et al., 2017). Sob altas temperaturas, a ativação da Rubisco é prejudicada justamente pela atividade da sua enzima catalítica rubisco ativase, que se torna a principal causa da diminuição da fotossíntese em resposta a alta temperatura, pois a atividade dessa enzima é extremamente sensível a altas temperaturas, pois a mesma torna-se inativa, e consequentemente diminuindo a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (CRAFTS-BRANDER & SALVUCCI, 2000; SALVUCCI & CRAFTS-BRANDNER, 2004; GALMÉS et al., 2013). Mudanças relacionadas ao estado redox e na razão ADP/ATP do cloroplasto modulam a atividade da Rubisco ativase, mediando dessa forma a regulação da ativação da Rubisco e a A (SALVUCCI et al., 1985; MOTT & WOODROW, 2000; CARMO-SILVA & SALVUCCI, 2013; SCALES et al., 2014). Nesse trabalho as plantas submetidas a 40°C, independente do regime térmico, apresentaram reduções significativas no estado de ativação da Rubisco conforme verificado em outros trabalhos prévios (CRAFTS-BRANDNER & SALVUCCI, 2000; SALVUCCI E CRAFTS-BRANDNER, 2004, YAMORI & VON CAEMMERER, 2009; SCAFARO et al., 2012).

A atividade da GLOx nesse estudo aumentou nas plantas submetidas a 40 °C/11d, resultados similares aos previamente obtidos para plantas de arroz sob estresse térmico Cui et al. 2016). O aumento na atividade desta enzima é um forte indicativo de aumento na taxa de fotorrespiração (CHAOUCH et al., 2010). Sabe-se que sob alta temperatura a solubilidade do CO<sub>2</sub> na água (presente no meio celular) diminui mais que a solubilidade do O<sub>2</sub>, resultando em uma menor relação CO<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> no sítio ativo da Rubisco. Então, este desvio nas propriedades enzimáticas da Rubisco com o aumento da temperatura e maior tempo de exposição ao calor, estimula a oxidação da RuBP em maior grau do que a carboxilação (FOYER et al., 2009). Além disso, o estresse térmico pode resultar no fechamento estomático, como foi o caso desse trabalho, o que reduz a relação C:O em torno da Rubisco, promovendo a fotorrespiração como resultado indireto

(KANGASJARVI et al., 2012). Considerando-se também que a GLOx está intimamente ligada a produção  $H_2O_2$  no peroxissomo, que por sua vez é uma ROS sinalizadora de vários processos fisiológicos, dentre eles o estresse oxidativo que ativaria a morte celular programada, se não for controlada pela a atividade da catalase (FOYER et al., 2009; CHAOUCH et al., 2010).

A redução acentuada nas concentrações de amido e glicose ao longo do período de estresse dos teores coincidiu com as reduções na *A*. Portanto, a diminuição de açúcares (amido e glicose) está relacionada a uma redução na assimilação de carbono pela planta decorrente da inibição da fotossíntese e da condutância estomática (ZHAO et al., 2013) e/ ou aumento da utilização (demanda) pelo aumento da respiração e manutenção metabólica (DUAN et al., 2013), como relatado em plantas de *Coffea arabica* submetidas há 45°C (MARIAS et al., 2016). Em contraste, não houve diferença no conteúdo de sacarose ao longo do período de estresse, em parte isto pode está refletindo uma resposta inicial de reparo ou defesa ao dano causado pela severidade do estresse, pois a sacarose tem sido associada à defesa contra ROS (BITA & E GERATS, 2013), à produção de antioxidantes (COUÉE et al., 2006) e ao ajuste osmótico (CAVATTE et al., 2012).

## 5. Conclusão

O açazeiro apresenta considerável sensibilidade ao estresse térmico (40 °C), sendo esta sensibilidade decorrente do menor estado de ativação da Rubisco e subsequente diminuição de sua atividade inicial. Estes dois fatores disparam uma cascata de eventos em cadeia que levam a um aumento da fotorrespiração, a uma diminuição na disponibilidade de carboidratos primários (amido e glicose), à perda de estabilidade do PSII (e reações fotoquímicas) e a uma perda da capacidade de dissipação térmica de excedentes de energia, ocasionando danos foto-oxidativos e peroxidação lipídica.

## 6. Referências

ALLAKHVERDIEV, et al. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. **Photosynthesis research**, v. 98, n. 1-3, p. 541, 2008.

ALLAKHVERDIEV, Suleyman I. et al. Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis*. **Plant physiology**, v. 137, n. 1, p. 263-273, 2005.

ASHRAF, M.; HAFEEZ, M. Thermotolerance of pearl millet and maize at early growth stages: Growth and nutrient relations. **Biol. Plant.** 48, 81–86. 2004.

BARTWAL et al., Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. **J Plant Growth Regul** 32:216–232. 2012.

BITA & GERATS. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 273, 2013.

BOOKER, Fitzgerald L. et al. Photosynthesis and photorespiration in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] chronically exposed to elevated carbon dioxide and ozone. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 10, p. 1843-1852, 1997.

BOTA J, et al. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? **New Phytologist**. 2004.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, p. 248-254, 1976.

CAKMAK & HORST. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.

CALBO & MORAES. Efeitos da deficiência de água em plantas de *Euterpe oleracea* (açai). *Revista Brasileira de Botânica*, v.23, p.225-230, 2000.

CARMO-SILVA & SALVUCCI. The regulatory properties of Rubisco activase differ among species and affect photosynthetic induction during light transitions. **Plant Physiol.** 161, 1645–1655. 2013

CATTANIO, J.H. et al. Floristic composition and topographic variation in a tidal floodplain forest in the Amazon estuary. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, p.419-430. 2002.

CAVATTE et al. Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. **Journal of Experimental Botany**, 63(8), 3071–3082. 2012.

CHAOUCH et al. Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by isochorismate synthase1 in a daylength-related manner. **Plant Physiol.** 153, 1692–1705. 2010.

CHEN, Qihong et al. Hydrogen-rich water pretreatment alters photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant activities in heat-stressed cucumber leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 83, n. 1, p. 69-82, 2017.

CRAFTS-BRANDNER, Steven J.; SALVUCCI, Michael E. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO<sub>2</sub>. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13430-13435, 2000.

DE OLIVEIRA, Hellen Oliveira et al. Coupling physiological analysis with proteomic profile to understand the photosynthetic responses of young *Euterpe oleracea* palms to drought. **Photosynthesis Research**, p. 1-17, 2018.

DEKOV et al. Effects of water stress and hightemperature stress on the structure and activity of photosynthetic apparatus of *Zea mays* and *Helianthus annuus*. **Photosynthetica** 38, 361– 366. 2000.

DEMING-ADAMS et al. In vivo function of carotenoids in higher plants. **FASEB J.** 10:403-412. 1996.

DUAN et al. Carbon dynamics of eucalypt seedlings exposed to progressive drought in elevated [CO<sub>2</sub>] and elevated temperature. **Tree Physiology**, 33(8), 779–792. 2013.

FLEXAS, J. et al. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. **New Phytologist**, v. 172, n. 1, p. 73-82, 2006.

FOYER, Christine H. et al. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1637-1661, 2012.

FOYER, Christine H.; LELANDAIS, Maud; KUNERT, Karl J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia plantarum**, v. 92, n. 4, p. 696-717, 1994.

GALMÉS et al. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. **Photosynth. Research.** 2013

GEIGENBERGER & STITT. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta** 189, 329–339. 1993.

GENTY et al. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. – **Biochem. Biophys. Acta** 990: 87-92, 1989.

GIAVENO. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. **Crop Breed Appl Biotechnol** 3:89–94. 2003.

GILMORE, Adam M. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 99, n. 1, p. 197-209, 1997.

GONZÁLEZ & GONZÁLEZ. Determination of relative water content. In: Reigosa-Roger, M.J. (Ed.), **Handbook of Plant Ecophysiology Techniques**. Springer, New York, pp. 207–211. 2001.

GREER, D.H.; WEEDON, M.M. Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. **Plant Cell Environ.** 35, 1050–1064. 2012.

HERNANDEZ et al. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. **Physiol. Plant** 89, 103/110. 1993.

HEYNEKE, Elmien; FERNIE, Alisdair R. Metabolic regulation of photosynthesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 2, p. 321-328, 2018.

IPCC. Climate change: impacts, adaptation, and vulnerability. part b: regional aspects. contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, Barros VR et al. (eds), **Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA**, 688 pp. 2014.

JIANG, Yiwei; HUANG, Bingru. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. **Crop science**, v. 41, n. 2, p. 436-442, 2001.

JIANG. Changes of donor and acceptor side in photosystem 2 complex induced by iron deficiency in attached soybean and maize leaves. **Photosynthetica** 41, 267–271. 2003.

KANGASJARVI et al. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. **J. Exp. Bot.** 63, 1619–1636. 2012.

KLAR, A. E. et al. Determinação da umidade do solo pelo método das pesagens. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, p.15–30, 1966.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v.42, p.313-349, 1991.

KUMAR, Sanjeev et al. Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 6, p. 2091, 2011.

LAWLOR, D. W; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LIMA et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and experimental botany**, v. 47, n. 3, p. 239-247, 2002.

LIU et al. Dephosphorylation of photosystem II proteins and phosphorylation of CP29 in barley photosynthetic membranes as a response to water stress. **Biochim Biophys Acta** 1787(10):1238–1245. 2009.

LOS & MURATA. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. **Biochim Biophys Acta** 1666:142–157. 2004.

MAHAN, James R. & MAUGET, Steven A. Antioxidant metabolism in cotton seedlings exposed to temperature stress in the field. **Crop science**, v. 45, n. 6, p. 2337-2345, 2005.

MARIAS et al. Christopher. Impacts of leaf age and heat stress duration on photosynthetic gas exchange and foliar nonstructural carbohydrates in *Coffea arabica*. **Ecology and evolution**, v. 7, n. 4, p. 1297-1310, 2016.

MATHUR S, AGRAWAL D, JAJOO A. Photosynthesis: limitations in response to high temperature stress. **J Photochem Photobiol B Biol**. 2014.

MITTLER, Ron. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MOTT & WOODROW. Modelling the role of Rubisco activase in limiting non-steady-state photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 51, 399–406. doi: 10.1093/ jexbot/51.suppl\_1.399. 2000.

MURCHIE & LAWSON. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*. ;64 :3983-98.2013.

NEVES. Respostas fotoquímicas de mudas de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) às altas temperaturas. **Dissertação de mestrado Universidade Federal Rural da Amazônia**. 2018.

OGBONNAYA, C. I. et al. Selection of cowpea genotypes in hydroponics, pots, and field for drought tolerance. **Crop Science**, v. 43, n. 3, p. 1114-1120, 2003.

PERDOMO, et al. Rubisco and rubisco activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 490, 2017.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2016.

RIZHISKY & MITTLER. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant physiology**, v. 130, n. 3, p. 1143-1151, 2002.

ROACH & KRIEGER-LISZKAY. Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, n. 4, p. 351-362, 2014.

SAIRAM et al. Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, v. 43, n. 2, p.245-251, 2000.

SALVUCCI & CRAFTS-BRANDNER. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. **Plant Physiol.** 134, 1460–1470. 2004.

SCAFARO et al. Rubisco activity is associated with photosynthetic thermotolerance in a wild rice (*Oryza meridionalis*). **Physiol. Plant.** 146, 99–109. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01597.2012

SCALES et al. A non-radioactive method for measuring Rubisco activase activity in the presence of variable ATP: ADP ratios, including modifications for measuring the activity and activation state of Rubisco. **Photosynth. Res.** 119, 355–365. 2014.

SHARKEY & SCHRADER. High temperature stress. In: **Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants**. Springer, Dordrecht. p. 101-129. 2006.

SILVA, Priscilla A. et al. Leaf gas exchange and multiple enzymatic and non-enzymatic antioxidant strategies related to drought tolerance in two oil palm hybrids. **Trees**, v. 30, n. 1, p. 203-214, 2016.

STITT et al. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. In: **Methods in enzymology**. Academic Press. p. 518-552. 1989.

SUNIL, Bobba et al. Photorespiration is complemented by cyclic electron flow and the alternative oxidase pathway to optimize photosynthesis and protect against abiotic stress. **Photosynthesis research**, p. 1-13, 2018.

TAKAGI, et al. Photorespiration provides the chance of cyclic electron flow to operate for the redox-regulation of P700 in photosynthetic electron transport system of sunflower leaves. **Photosynthesis research**, v. 129, n. 3, p. 279-290, 2016.

TRETHEWEY et al. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. **The Plant Journal**, v. 15, n. 1, p. 109-118, 1998.

TURÓCZY, Zoltán et al. Overproduction of a rice aldo–keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification. **Plant molecular biology**, v. 75, n. 4-5, p. 399-412, 2011.

VOLLENWEIDER & GUNHRADT. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. **Environ Pollut** 137:455–465. 2005.

WAHID, A; CLOSE, T. J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 104-109, 2007.

WAHID, Abdul et al. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and experimental botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.



WANG, D. et al. Molecular characteristics and expression patterns of Rubisco activase, novel alternative splicing variants in a heterophyllous aquatic plant, *Sagittaria graminea*. **Photosynthetica**, v. 52, n. 1, p. 83-95, 2014.

YAMAMOTO, Yasusi et al. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. **Photosynthesis Research**, v. 98, n. 1-3, p. 589-608, 2008.

YAMORI & CAEMMERER. Effect of Rubisco activase deficiency on the temperature response of CO<sub>2</sub> assimilation rate and Rubisco activation state: insights from transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco activase. **Plant Physiol.** 151, 2073–2082. 2009.

YANG, X. et al. Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: A comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions. **Plant Science**. 171, 389–397. 2006.

ZHAO et al. High temperature causes negative whole-plant carbon balance under mild drought. **New Phytologist**, 200, 330–339. 2013.

### **CAPÍTULO 03. ALTERAÇÕES NAS TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EVIDENCIAM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ESTRESSE TÉRMICO EM DOIS MATERIAIS VEGETAIS DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.)**

#### **1. Introdução**

O estresse térmico é frequentemente definido como o aumento da temperatura além do nível limite para causar danos irreversíveis ao crescimento e desenvolvimento das plantas (WAHID & CLOSE 2007). Devido ao aquecimento global, a temperatura está aumentando continuamente e se tornou uma séria ameaça ao rendimento de culturas. Estima-se que a temperatura no globo terrestre sofra acréscimos de 0,2 °C a cada dez anos, o que conduzirá a temperaturas entre 1,8 e 4,0 °C mais elevadas do que o nível atual no ano de 2100 (IPCC, 2014).

Em geral, plantas submetidas ao estresse térmico apresentam significativas alterações no crescimento e produção, perdas estas associadas os efeitos do estresse na fotossíntese (ALLAKHVERDIEV et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2008; ALMESELMANI et al., 2010 & 2012). O estresse térmico provoca uma série de alterações nas plantas em níveis morfo-anatômicos, fisiológicos e bioquímicos que podem se manifestar desde a germinação das sementes até a floração (ALMESELMANI et al., 2010 & 2012). Durante a reprodução, um período curto de estresse térmico pode reduzir significativamente o número de gemas florais e aumentar o abortamento de flores, embora a variação na sensibilidade entres espécies de plantas e seus materiais vegetais possam existir (LI et al., 2012; KAUSHAL et al., 2013; ANNISA et al., 2013).

A sensibilidade de uma espécie ao estresse térmico varia dentre genótipos (cultivares ou variedades), com o estágio de desenvolvimento da planta quando da ocorrência do estresse, com a temperatura aplicada e com o tempo de duração do estresse (WAHID et al., 2007; MOLINA-BRAVO et al., 2011; ALMESELMANI et al., 2010 & 2012). Devido as variabilidades genótípicas que ocorrem para uma dada espécie, é possível a identificação de materiais vegetais mais sensíveis e outros mais tolerantes ao estresse térmico, como observado em *Vigna radiata* (KAUR et al., 2015), *Solanum lycopersicum* (ZHOU et al., 2017) e *Triticum aestivum* (ALMESELMANI et al., 2010 & 2012).

O estresse térmico afeta o status hídrico da folha, reduz a condutância estomática e a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (GREE & WEDON, 2012; ASHRAF & HAFEEZ, 2012). Nos cloroplastos, reduções na eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) estão associadas às alterações na fluidez das membranas dos tilacóides e às alterações no rendimento quântico do transporte de elétrons do PSII (LIU et al., 2009). Quando a fotossíntese é reduzida causando um aumento na concentração de NADPH no estroma, o transporte de elétrons entre fotossistemas se torna um potencial sítio de produção de espécies reativas de oxigênio, podendo levar à peroxidação de lipídeos de membrana (MITTLER, 2002). Então, variáveis de fluorescência da clorofila *a*, em especial a  $F_v/F_m$ , e a quantificação de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (aldeído malônico, MDA) tem se mostrado respectivamente bons indicadores de foto-oxidação ao PSII e peroxidação lipídica de membranas celulares em plantas submetidas ao estresse térmico (HERNÁNDEZ et al., 1993; FOYER et al., 1994; ALI et al., 2004).

As diminuições na fotossíntese em plantas submetidas ao estresse térmico podem levar a uma alteração no metabolismo primário do carbono, alterando assim as concentrações foliares de amido e monossacarídeos como a glicose e sacarose (WAHID et al., 2007; CAVATTE et al., 2012; BITA & GERATS, 2013). Em várias dicotiledôneas (WAHID et al., 2007; MARIAS et al., 2016 & ZHOU et al., 2017), a diminuição da fotossíntese em plantas submetidas a altas temperaturas levou a diminuições nas concentrações de amido. Em algumas espécies, contudo, o estresse térmico não altera as concentrações de sacarose, tendo sido atribuído a este dissacarídeo um papel osmorregulador que visa atenuar os efeitos do estresse térmico no status hídrico das plantas (CAVATTE et al., 2012; BITA & GERATS, 2013).

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma espécie tropical amplamente encontrada nas várzeas da Amazônia no norte do Brasil (CATTANIO et al., 2002) e que apresenta um grande potencial econômico devido a qualidade nutritiva e propriedades medicinais de seus frutos, em especial seu poder antioxidante (HEIRINCH et al., 2011; RUFINO et al., 201). No norte do Brasil, em especial no estado do Pará, a maioria dos plantios comerciais de açaí ocorrem em terras altas (OLIVEIRA & FARIAS NETO, 2004). Nesses plantios, pequenos produtores geralmente utilizam mudas produzidas de materiais vegetais não melhorados (ditos nativos), enquanto produtores com maior capacidade de investimento utilizam mudas da única variedade de açazeiro disponível no mercado, chamada BRS-Pará (ou BRS-PA), a qual foi desenvolvida pela Embrapa para produção de frutos de açaí em áreas de terra alta na Amazônia (OLIVEIRA &

FARIA NETO, 2004). Em recente estudo, foi demonstrado que a variedade BRS-PA apresenta um melhor desempenho morfofisiológico sob condições de déficit hídrico moderado em relação a outros materiais vegetais de açaizeiro não melhorados geneticamente (SILVESTRE et al., 2016; 2017). Contudo, não há estudos prévios que explorem as respostas desta variedade ao estresse térmico.

Considerando-se o cenário de mudanças climáticas globais e as previsões de incremento na temperatura do globo previstas para as próximas décadas (IPCC, 2014) e considerando-se a possibilidade de variabilidade genotípica quanto a tolerância/sensibilidade ao estresse térmico dentro de uma mesma espécie (ALMESELMANI et al., 2010 & 2012; KAUR et al., 2015; ZHOU et al., 2017), pretende-se neste trabalho testar a hipótese de que a variedade de açaí BRS-PA, mais tolerante ao déficit hídrico que materiais não melhorados (SILVESTRE et al. 2016, 2017), é também mais tolerante ao estresse térmico que materiais não melhorados. Para testar essa hipótese, plantas de açaizeiro da variedade BRS-PA e de um material vegetal nativo (Wt) foram submetidas ao estresse térmico (40°C) por oito dias com o objetivo de avaliar a magnitude das alterações no status hídrico, nas trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a*, nas concentrações foliares de carboidratos primários e ocorrência de peroxidação lipídica.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Material vegetal e condições experimentais**

Mudas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) foram produzidas em casa de vegetação no Campus da Universidade Federal Rural da Amazônia, em Belém, Pará (01°27'29"S, 48°26'06"W). O material nativo foi oriundo a partir de sementes coletadas de árvores adultas no município de Santa Izabel - Pa, sementes da cultivar BRS-PA, foram adquiridas de loja certificada (Amazonflora) e em parceria com a Embrapa Amazônia Oriental. O clima local é do tipo Af1 segundo Köppen. O semeio foi realizado em setembro de 2017 em bandejas de polietileno preenchidas com fibra de coco (Golden Mix 87, Sococo Agroindústria da Amazônia, Ananindeua, Brasil) como substrato de cultivo. A irrigação foi realizada manualmente, com 500 mL de água por bandeja a cada dois dias. Após aproximadamente 60 dias do semeio, as plântulas mais vigorosas contendo uma única folha cotiledonar aberta foram transferidas para vasos de polietileno de 1,5 L (10 x 14 cm, altura e diâmetro) contendo como substrato 1,4 L de uma mistura composta de terriço

e cama de aviário curtida (2:1; v/v). Nesta operação, cada vaso recebeu uma só planta, sendo preparados um total de 50 vasos. A irrigação foi realizada diariamente, entre 8:00 e 9:00 h, com reposição de 100% de água necessária para levar o solo a capacidade de campo (CC), sendo o volume de água de irrigação aplicado estimado pelo método gravimétrico (KLAR et al., 1966). Após 30 dias do transplântio, as mudas foram fertilizadas com 3,0 g de NPK 18:18:18 e esta operação foi igualmente quatro vezes em intervalos de 30 dias contados após a primeira fertilização. Aos 150 dias do transplântio foi realizada uma fertilização com 2,8 g de NPK (16:16:16) por planta.

Após 180 dias do semeio, foram selecionadas 20 plantas uniformes em altura e número de folhas (quatro folhas bipinadas) para a instalação do experimento definitivo, que consistiu de quatro tratamentos em esquema fatorial 2 x 2 formado por dois materiais vegetais (açai não melhorado ou nativo, Wt; e a variedade BRS-PA) e duas temperaturas (28 °C, controle; e 40 °C, estresse térmico).

O experimento foi instalado em blocos inteiramente casualizados, em que cada bloco foi constituído de uma repetição (i.e., uma planta) por tratamento. Um total de cinco blocos experimentais foi utilizado perfazendo um total de 20 plantas. A opção pelo delineamento em blocos foi necessária para permitir a avaliação fisiológica de um número adequado de plantas sem haver influência das variações climáticas ao longo da manhã.

Os tratamentos térmicos foram realizados em câmaras de crescimento (modelo, fabricante, cidade e país) sob fotoperíodo de 12 h com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) média de  $162 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nas câmaras regulas a 28 °C, as médias de umidade relativa do ar e temperatura interna (auferidas com um termohigrômetro) foram respectivamente de  $65 \pm 4,8 \%$ ; enquanto na câmara regulada a 40 °C foram respectivamente de  $70 \pm 2,7 \%$ . A irrigação das plantas foi realizada diariamente em duas aplicações (manhã/tarde), cada uma com 50 mL de água destilada por planta. O período de oito dias de incubação foi baseado em resultados preliminares (NEVES 2018) e, ao final deste tempo, as mudas de todos os tratamentos foram retiradas das respectivas câmaras de crescimento e levadas à casa de vegetação para as determinações fisiológicas (trocas gasosas, fluorescência da clorofila e *status* hídrico da planta) e amostragens para análises bioquímicas. Estas operações foram realizadas entre 8:30 e 10:30 h, usando como amostras a segunda folha a partir do ápice. Durante as medições, as médias de temperatura do ar, déficit de pressão de vapor, UR e PAR na casa de vegetação foram respectivamente de  $30 \pm 3 \text{ °C}$ ,  $1,80 \pm 0,35 \text{ kPa}$ ,  $61 \pm 3 \%$ ,  $616 \pm 62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As amostras para análises

bioquímicas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e em seguida mantidas a -80 °C até o momento das análises.

## 2.2 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), a condutância estomática ao vapor d'água (*g<sub>s</sub>*), a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*), e a transpiração (*E*) foram determinadas utilizando-se um analisador portátil de gases a infravermelho (LI-6400 XT, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, EUA) sob PAR saturante de 1.000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (CALBO; MORAES, 2000) e concentração de CO<sub>2</sub> de 400 μmol m<sup>-1</sup>.

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se um fluorômetro (LI-6400-40; LI-COR Biosci. Inc., Nebraska, USA) após a avaliação de trocas gasosas, utilizando as mesmas folhas como amostras como descrito por Lima et al. (2002). Para as amostras adaptadas ao escuro, a máxima eficiência fotoquímica do PSII (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*) foi estimada pela razão entre fluorescência variável e máxima [ $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$ ]. Subsequentemente, pulsos saturantes de luz branca foram aplicados para atingir a máxima fluorescência (*F'<sub>m</sub>*). Em seguida, a luz actínica foi desligada e a radiação vermelha distante ligada para medir *F<sub>0</sub>* adaptada a luz (*F'<sub>0</sub>*). A eficiência de captura de energia de excitação por centros de reação PSII abertos (*F'<sub>v</sub>/F'<sub>m</sub>*) foi estimada como a razão entre  $(F'_m - F'_0) / F'_m$ . O coeficiente de extinção fotoquímica (*qP*) foi calculado como  $qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0)$  e o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) foi determinado a partir da equação de Stern - Volmer [ $NPQ = (F_m/F'_m) - 1$ ] (KRAUSE; WEIS, 1991). O rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) foi calculado como  $(F'_m - F_s) / F'_m$  (GENTY et al., 1989).

## 2.3 Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado relacionando-se as massas fresca (MF), túrgida (MT) e seca (MS) das amostras pela fórmula  $CRA = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$  (GONZÁLEZ e GONZÁLEZ-VILAR (2001). Os resultados foram expressos em porcentagem.

## 2.5. Peroxidação lipídica

As amostras de folhas (100 mg MF) foram maceradas a pó fino com uso de nitrogênio líquido e a extração foi realizada em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). O homogenato foi centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4 °C. Uma alíquota (500 µL) do sobrenadante foi misturada vigorosamente a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (v/v) preparado em TCA 20% (p/v). As amostras foram incubadas a 90 °C por 20 min e em seguida a reação foi parada sob banho de gelo. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 15 min a 4 °C para sedimentar qualquer resíduo ainda presente e evitar interferência nas leituras das absorvâncias, as quais foram registradas a 532 e 600 nm em espectrofotômetro UV-Visível (Bel espectro S - 2000). A peroxidação lipídica foi estimada como o conteúdo de substâncias reativas ao TBA expressas como equivalentes de aldeído malônico (MDA) por unidade de MS (CAKMAK; HORST, 1991).

## 2.6 Carboidratos foliares

Amostras foliares congeladas (100 mg MF) foram submetidas a extração etanólica (TRETHERWEY et al., 1998) e após a centrifugação (13.000 g, 10 min a 4 °C) o sobrenadante foi utilizado para as determinações de glicose e sacarose e o precipitado foi congelado para a posterior determinação das concentrações de amido.

As concentrações foliares de glicose e sacarose foram determinadas de acordo com Stitt et al. (1989), com algumas modificações. A mistura da reação continha tampão imidazole 100 mM/ MgCl<sub>2</sub> 5 mM (pH 6,9), NAD<sup>+</sup> 2 mM, ATP 1 mM, 1 unidade (U) glicose-6-fosfato desidrogenase e 5 µL de extrato etanólico da folha. As determinações de glicose, frutose e sacarose foram avaliadas pela adição de 1 U hexoquinase, 1 U glicose-6-fosfato isomerase e 1 U invertase, respectivamente. Após a adição de cada enzima, a produção de NADH foi acompanhada a 340 nm utilizando-se um leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO, Japão).

Para a determinação do amido, os sedimentos congelados obtidos a partir de extrato etanólico foram solubilizados em 1 mL de etanol absoluto e incubados por 20 min a 80 °C. Após centrifugação (12.000 g, por 5 min a 4 °C), o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi incubado em 1 mL de KOH 0,2 M durante 60 min a 90 °C. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação (12.000 g, por 5 min a 4 °C) foram neutralizados com ácido acético antes da determinação do amido (TRETHERWEY et al.,

1998). Em seguida, uma alíquota (20  $\mu\text{L}$ ) do extrato neutralizado foi incubado por 60 min a 55  $^{\circ}\text{C}$  em uma mistura de reação contendo (30  $\mu\text{L}$  de citrato de sódio 0,3M/ tampão de cítrico 0,3M pH 4,6), 10  $\mu\text{L}$  amiloglucosidase (correspondente a 1 U) e 240  $\mu\text{L}$  de água destilada. Após a hidrólise, o teor de glicose resultante foi analisado pelo método já descrito acima e a concentração de amido nas amostras foi estimada em equivalentes de glicose.

## 2.7 Análise estatística

A distribuição normal dos dados foi feita através do teste de Shapiro-Wilk e submetidos à ANOVA, considerando um esquema fatorial 2 x 2 (dois materiais vegetais e dois regimes térmicos) e testados quanto à significância pelo teste  $F'$  e a diferença entre médias foram testadas quanto à significância pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ( $P \leq 0,05$ ), usando o software R versão 3.4.1 (2016).

## 3. Resultados

### 3.1 Trocas gasosas e conteúdo relativo de água

Nas condições controle (28  $^{\circ}\text{C}$ ), houve diferença significativa entre os materiais vegetais, com redução de 39 % da  $A$  no material BRS-PA em relação ao Wt (Fig 1a). Sob condições de estresse (40  $^{\circ}\text{C}$ ), não houve diferença entre os materiais vegetais com média de  $0,74 \pm 0,16 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para o Wt e  $0,89 \pm 0,25 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para o BRS-PA. Para o Wt foi observado que o estresse térmico reduziu a  $A$  em 86%, e no BRS-PA a  $A$  reduziu 73% em relação as plantas controle. Na temperatura de 28  $^{\circ}\text{C}$  foi observado que as mudas do material Wt apresentaram comportamento semelhante as mudas do material BRS-PA na  $g_s$ ,  $E$  e  $Ci$  (Fig. 1b-c-d). Em condições de estresse (48  $^{\circ}\text{C}$ ), houve diferença significativa na  $g_s$  e  $E$ , com o material BR-PA apresentando uma  $g_s$  38 e 66 % maior em relação ao Wt, e o  $Ci$  80 % maior no Wt em relação ao BRS-PA. O efeito do estresse nos materiais vegetais foi mais expressivo no Wt com diminuição na  $g_s$  e  $E$  de 77 e 66 % em relação as plantas controle, enquanto que no material BRS-PA a redução na  $g_s$  e  $E$  foi de 50 e 20% em relação as plantas controle. Aumentos mais expressivos no  $Ci$  foi observado no material Wt, com 78% de incremento em relação as plantas controle, enquanto que no material BRS-PA o incremento foi de 36 % em relação as plantas controle.



O status hídrico da planta foi avaliado por meio do CRA (Fig. 2). Sob regime térmico de 28 e 40 °C, o CRA não diferiu entre os materiais vegetais testados, com média de  $61 \pm 13$  % no Wt e  $58 \pm 9$  % no BRS-PA a 28 °C e  $26 \pm 4$  % no Wt e  $35 \pm 10$  % para o BRS-PA a 40 °C. Houve efeito do estresse térmico nos dois materiais vegetais com no CRA de 58 % no Wt e de 40% no BRS-PA em relação as plantas controle.

### 3.2 Fluorescência da clorofila *a*

Nas condições controle (28 °C) e estresse térmico (40 °C) não houve diferenças significativas entre os materiais vegetais, para  $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $qP$ , e NPQ com médias de  $0,85 \pm 0,02$  e  $0,85 \pm 0,01$  a 28°C e  $0,71 \pm 0,04$  e  $0,78 \pm 0,04$  a 40 °C no  $F_v/F_m$  no dois materiais vegetais (Fig. 3a), no  $\Phi_{PSII}$ ,  $qP$  e NPQ as médias foram de  $0,13 \pm 0,01$  e  $0,11 \pm 0,02$  a 28 °C e  $0,08 \pm 0,008$  e  $0,09 \pm 0,009$  a 40 °C,  $0,05 \pm 0,009$  e  $0,07 \pm 0,009$  a 28 °C e  $0,04 \pm 0,005$  e  $0,02 \pm 0,01$  a 40 °C e  $1,90 \pm 0,17$  e  $2,13 \pm 0,41$  a 28 °C e  $0,88 \pm 0,16$  e  $0,50 \pm 0,28$  a 40 °C respectivamente nos materiais Wt e BRS-PA (Fig. 3b-c-d). O efeito do estresse térmico foi significativo nos dois materiais vegetais, com reduções em  $F_v/F_m$  de 17 % no Wt e 9 % no BRS-PA, na  $\Phi_{PSII}$  as reduções foram de 39 % no WT e 19 % no BRS-PA, no  $qP$  foram observadas reduções de 50 % no Wt e 47 % no BRS-PA e no NPQ as reduções foram de 54 % no Wt e 77 % no BRS-PA, em relação as plantas controle.

### 3.3 Peroxidação lipídica e carboidratos foliares

O conteúdo de MDA nos materiais vegetais sob 28 °C não apresentou diferenças significativas com médias de  $238,9 \pm 38$  no Wt e  $134 \pm 26$  nmol g<sup>-1</sup> MS no BRS-PA (Fig. 4). Também não houve diferença significativa sob 40 °C com média de  $185 \pm 10$  no Wt e  $185 \pm 57$  nmol g<sup>-1</sup> MS no BRS-PA. No entanto foi observado que para o material WT houve uma redução de 44% em relação as plantas controle, já no material BRS-PA não houve diferença significativa.

### 3.4 Carboidratos foliares

O conteúdo de amido nos materiais vegetais sob 28 °C não apresentou diferença significativa (Fig. 5a). O estresse térmico afetou mais expressivamente o material BRS-PA com reduções de 75 % no teor de amido em relação ao Wt. Além disso para o BRS-PA foi observado que o estresse térmico reduziu 55 % o teor de amido, e no material Wt

a redução foi 36 % em relação as plantas controle. O teor de sacarose nos matérias vegetais a 28 °C foi 13 % menor no BRS-PA em relação ao Wt, no entanto sob condições de estresse térmico não houve diferença significativa (Fig. 5b). O material BRS-PA apresentou maior redução no teor de sacarose (58%), enquanto que o material Wt apresentou redução de 53 % em relação as plantas controle.

Figura 01. Alterações na taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ , Fig. 1a), na condutância estomática ( $g_s$ , Fig. 1b), na transpiração ( $E$ , Fig. 1c) e na concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ , Fig. 1d) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

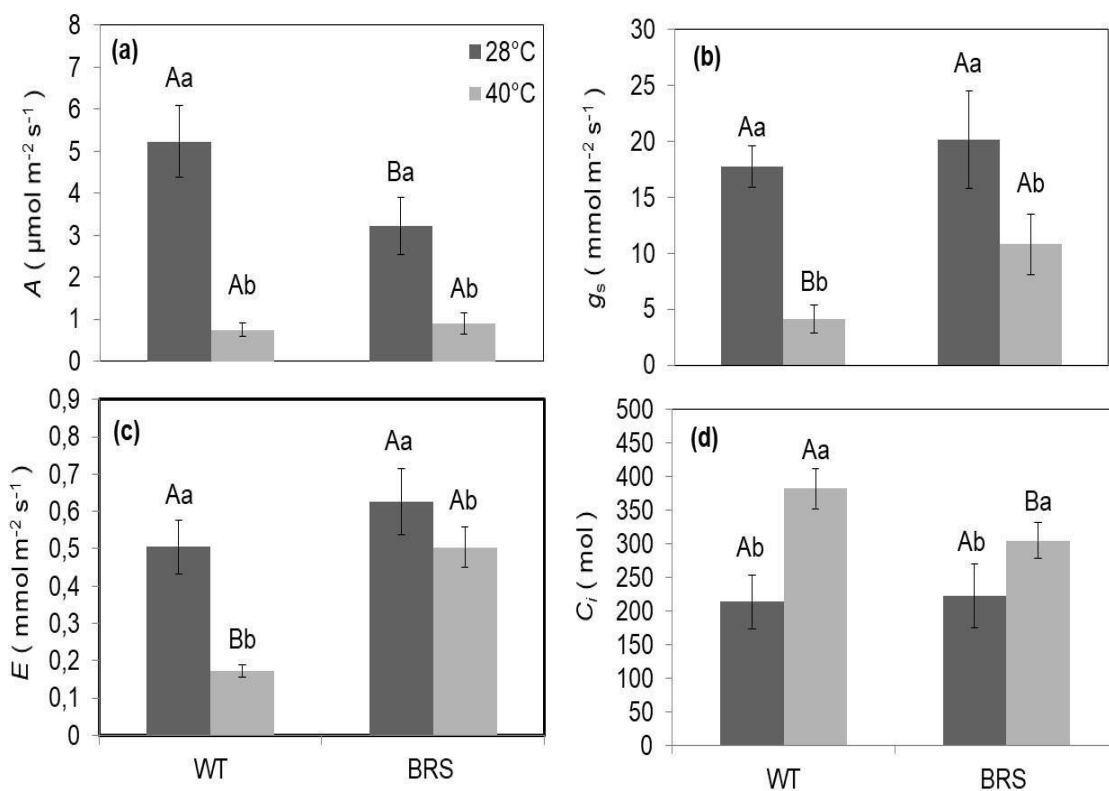


Figura 02: Conteúdo relativo de água (CRA) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ )

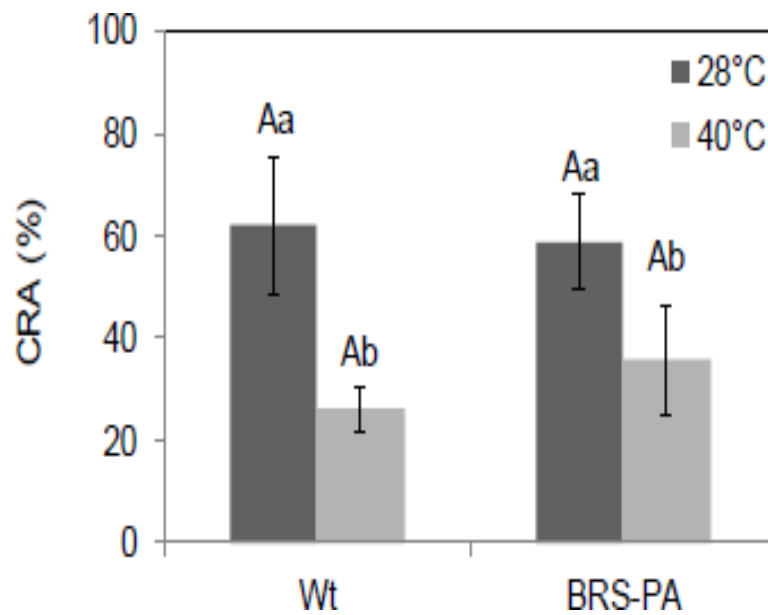


Figura 03: Alterações na eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ , Fig. 3a), rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII ( $\Phi_{PSII}$ , Fig. 3b), coeficiente de extinção fotoquímica ( $q_p$ , Fig. 3c) e coeficiente de dissipação não-fotoquímica (NPQ, Fig. 3d) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ )

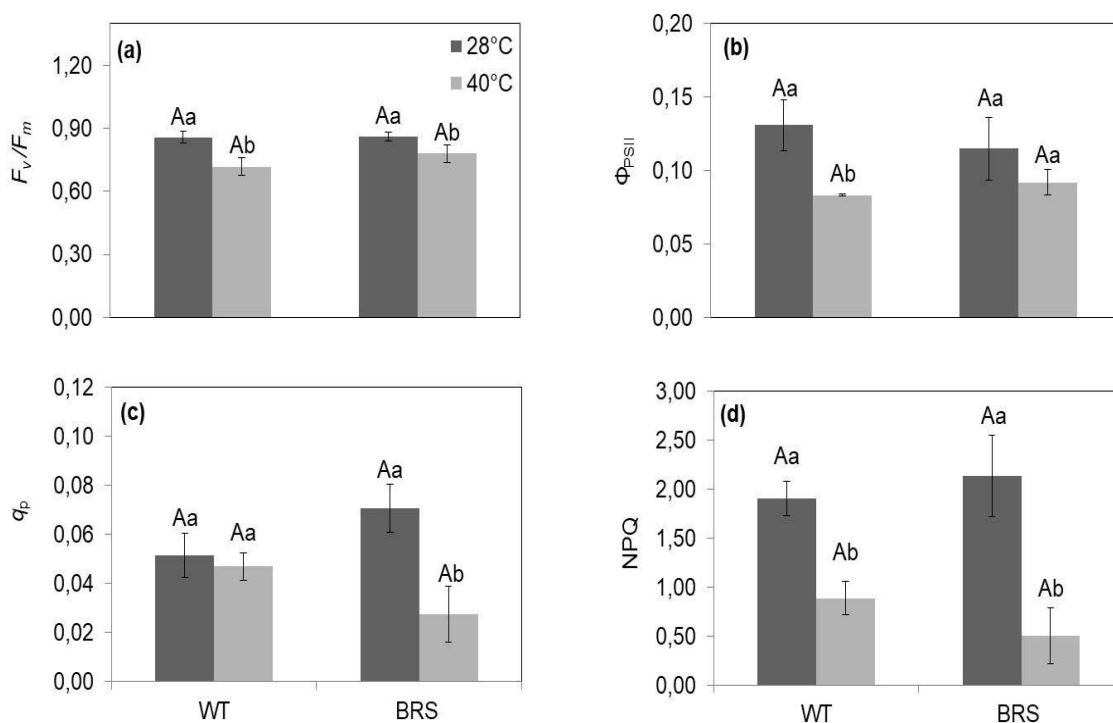


Figura 04: Concentração de aldeído malônico (MDA) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ )

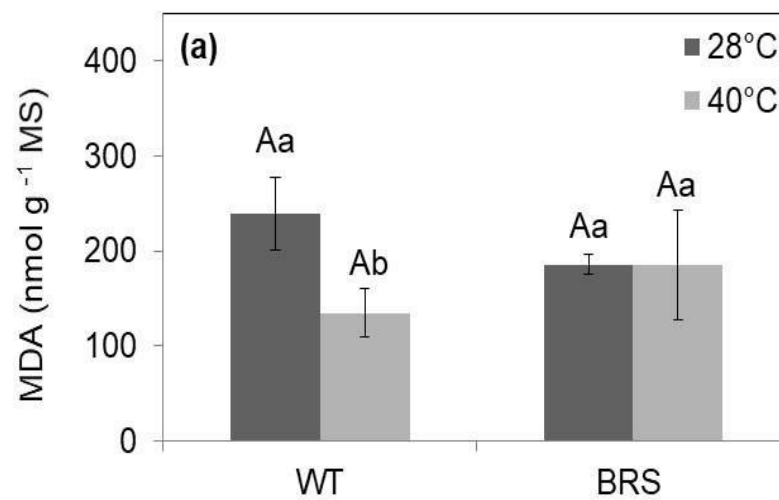
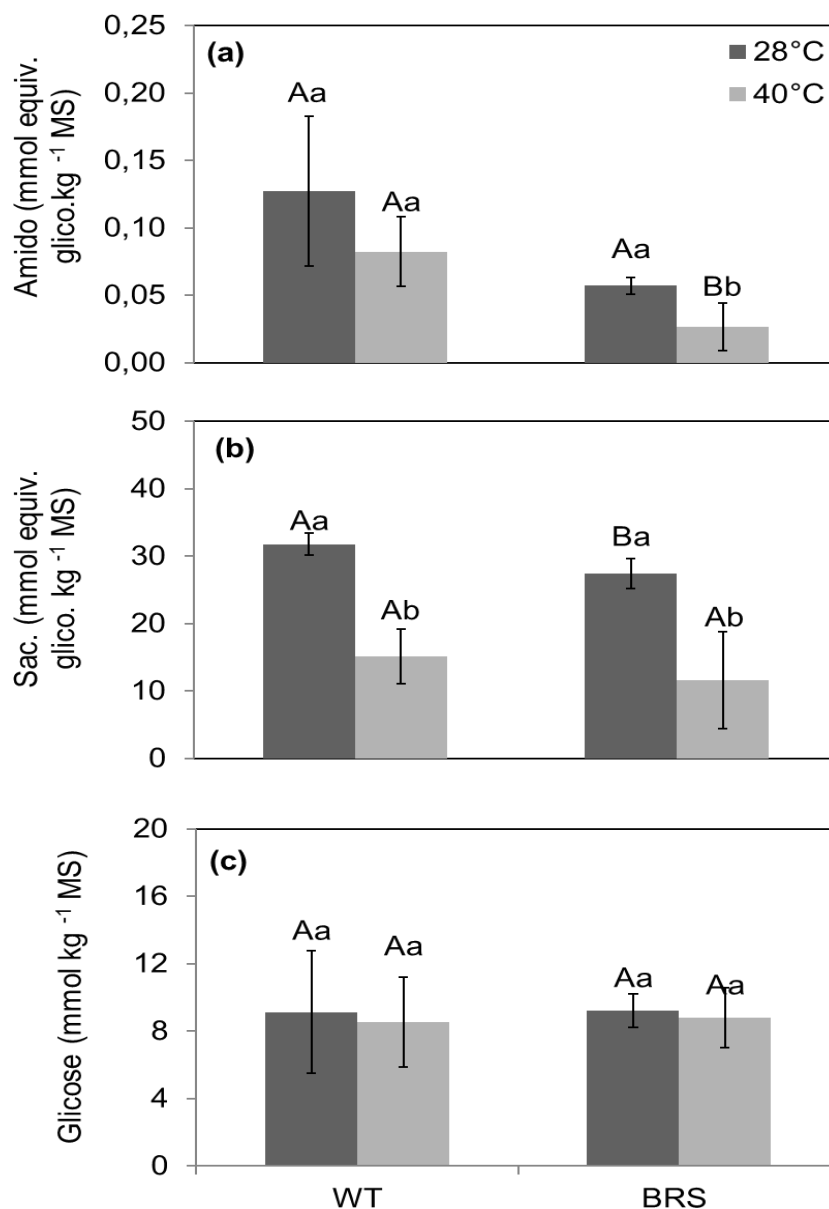


Figura 05: Alteração nas concentrações de amido (Fig 5a), sacarose (Fig 5b) e glicose (Fig. 5c) em mudas de açaizeiro (nativo, Wt; e var. BRS-PA) submetidas a diferentes temperaturas (28 e 40 °C). Os dados são a média de quatro blocos  $\pm$  D.P. Letras maiúsculas comparam médias de um mesmo material vegetal avaliado sob as diferentes temperaturas e letras minúsculas comparam materiais vegetais diferentes sob a mesma temperatura. Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas) não diferem pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ )



#### 4. Discussão

As reduções substanciais na  $A$  nos materiais vegetais submetidos ao estresse térmico podem estar relacionados a limitação estomática ao influxo de  $\text{CO}_2$  nas folhas, o que é geralmente evidenciado pela diminuição significativa na  $g_s$  (LAWLOR e CORNIC 2002). Neste trabalho com 8 dias de estresse térmico foi observado um expressivo fechamento estomático, acompanhados de uma redução na  $E$  e de decréscimos no CRA. O declínio na  $A$  pode está relacionado a limitações estomáticas e não estomáticas. As reduções no CRA nos dois materiais vegetais pode está associado a manutenção da transpiração mesmo em condições de estresse térmico (40 °C), o material Wt apresentou maior transpiração sob estresse térmico, esse processo fisiológico é de extrema importância para criar um gradiente de potencial hídrico que permite a absorção e distribuição de água na planta e ao mesmo tempo contribuir para a regulação e manutenção da temperatura foliar (CARMEJO et al., 2006; SHARMA et al. 2014; MATHUR et al., 2014). Foram observados, um CRA de 20 % em plantas de *Poaceae* submetidas a 35 °C por 30 dias (JIANG & HUANG 2001), *Zea mays* e *Helianthus annuus* foi observado um CRA de 80 % a 45 °C por 2 dias (DEKOV et al., 2000), em *Phaseolus aureus* Roxb. foi observado um CRA de 78 % a 45 °C por 10 dias (KUMAR et al., 2011). Os maiores incrementos na  $g_s$  e  $E$ , contribuíram para os maiores incrementos no  $C_i$  nas plantas do material Wt sob 40 °C, pois com a maior abertura estomática e conseqüentemente maior entrada de  $\text{CO}_2$  um aumento significativo no  $C_i$  foi observado. Além disso o aumento de  $C_i$  em ambos os materiais vegetais está relacionado por uma diminuição na taxa de transporte de elétrons do PSII, inferindo uma diminuição na síntese de ATP e NADH pela etapa fotoquímica da fotossíntese que poderia ocasionar efeitos negativos nas etapas de redução e regeneração do Ciclo de Calvin (CRAFTS- BRANDNER & SALVUCCI 2000; MATHUR et al., 2014; HEYNEKE & FERNIE 2018) como demonstrado em plantas de *Triticum* spp (FENG et al., 2014) e *Solanum lycopersicum* (ZHOU et al., 2017).

Efeitos negativos podem estar associados a fase fotoquímica da fotossíntese em ambos os materiais submetidos ao estresse térmico, dentre eles pode-se citar mudanças nas propriedades de óxido-redução na cadeia transportadora de elétrons do PSII (MARTHUR et al., 2014). Reduções significativas foram observadas em  $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{\text{PSII}}$ ,  $qP$  e NPQ tanto no Wot como no BRS-PA sob 40 °C, danos foto-oxidativos foram



observados com 8 dias de estresse, esses resultados demonstram que o excesso de energia de excitação no complexo antena do PSII não foi utilizado para o trabalho fotoquímico e nem dissipado na forma de calor, como pode ser demonstrado com reduções em  $qP$  e NPQ, dessa forma essa redução sendo determinante para a redução em  $F_v/F_m$  (CHEN et al., 2017). A não dissipação adequada do excesso de energia por calor ocasionou uma retro-inibição da etapa fotoquímica da fotossíntese aumentando os danos foto-oxidativos (DEMMING-ADAMS & ADAMS, 1996; GILMORE, 1997). Além disso, a menor taxa de transporte de elétrons na cadeia do PSII ao longo do período de estresse pode ter diminuído a síntese de NADPH e ATP, contribuindo para a redução da  $A$  nos dois materiais vegetais como citado anteriormente para o aumento de  $C_i$  (LAWLOR 2002; FOYER et al., 2012; ROACH & KRIEGER-LISZKAY 2014).

A diminuição no conteúdo de MDA no WT a 40 °C e as não alterações no BRS-PA a 40 °C, sugerem um controle na peroxidação lipídica com 8 dias de estresse, que pode ter sido resultado um melhor ajuste no sistema antioxidante, visto que a concentração de MDA reduziu em relação as plantas controle no material WT e se manteve inalterado nas plantas de BRS-PA (MURATA et al., 2007).

As reduções na  $A$  tanto no material Wt como no BRS-PA a 40 °C são uma evidência da produção limitada de triose fosfatada pelo Ciclo de Calvin sob condições de estresse (LAWLOR & CORNIC 2002; CHAVES & OLIVEIRA 2004). O material vegetal BRS-PA a 40 °C apresentou menor acúmulo de amido no cloroplasto o que se deve a reduções acentuadas na  $A$  (ZHAO et al., 2013). Além disso há um aumento na demanda de amido para a manutenção dos processos metabólicos sob estresse térmico (DUAN et al., 2013), como relatado por Marias et al. (2016) em plantas de *Coffea arabica* submetidas a 45 °C. As reduções observadas no conteúdo de sacarose nos materiais vegetais sob estresse térmico, pode estar relacionado a diminuições na atividade enzimática relacionadas a síntese e hidrólise da sacarose, que como resultado fornece hexoses para vários requisitos estruturais e funcionais, como a geração de energia ou a síntese de macromoléculas, como o amido (NGUYEN & FOYER, 2001), e relatado por Yuan et al. (2017) em genótipos de *Brassica campestris* L. submetidas a 40 °C por 7 dias.

## 5. Conclusão

O Wt e o BRS-PA apresentaram sensibilidade ao estresse térmico (40 °C), sendo essa sensibilidade mais expressiva no material Wt, com reduções mais acentuadas na A, maior desidratação celular com diminuições mais expressivas no *status* hídrico perda de estabilidade do PSII, com maiores danos foto-oxidativos, e conseqüentemente uma diminuição na disponibilidade de carboidratos do metabolismo primário (amido e glicose).

### Conclusão geral

O açazeiro é extremamente sensível ao estresse térmico (alta temperatura), tanto em sua magnitude como quando comparando dois materiais vegetais (WT e BRS-PA cv.) apresentando danos expressivos no seu aparato fotossintético, a nível de trocas gasosas e estabilidade do fotossistema II, quando submetido a um estresse de 40 °C, ocasionando alterações oxidativas e metabólicas negativas, como reduções na atividade da Rubisco, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (peroxidação lipídica) e diminuição de metabólitos primários (amido, glicose e sacarose).

## 6. Referências

ALLAKHVERDIEV, Suleyman I. et al. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. **Photosynthesis research**, v. 98, n. 1-3, p. 541, 2008.

BARTWAL et al., Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. **J Plant Growth Regul** 32:216–232. 2012

BERNACCHI, Carl J. et al. Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. **Plant physiology**, v. 130, n. 4, p. 1992-1998, 2002.

BITA, Craita; GERATS, Tom. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 273, 2013.

CARMO-SILVA & SALVUCCI. The regulatory properties of Rubisco activase differ among species and affect photosynthetic induction during light transitions. **Plant Physiol.** 161, 1645–1655. 2013

CATTANIO, J.H. et al. Floristic composition and topographic variation in a tidal floodplain forest in the Amazon estuary. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, p.419–430. 2002.

CAVATTE et al. Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. **Journal of Experimental Botany**, 63(8), 3071–3082. 2012.

CHAOUCH et al. Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by isochorismate synthase1 in a daylength-related manner. **Plant Physiol.** 153, 1692–1705. 2010.

CHEN et al. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. **Planta** 228, 745–756. 2008.

CHEN et al. Comparison of thermotolerance of sun-exposed peel and shaded peel of ‘Fuji’ apple. **Environ. Exp. Bot.** 66, 110–116. 2009.

CHEN, Qihong et al. Hydrogen-rich water pretreatment alters photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant activities in heat-stressed cucumber leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 83, n. 1, p. 69-82, 2017.

COUÉE et al. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 57, 449–459. 2006.

CRAFTS-BRANDNER, Steven J.; SALVUCCI, Michael E. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO<sub>2</sub>. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13430-13435, 2000.

DEMING-ADAMS et al. In vivo function of carotenoids in higher plants. **FASEB J.** 10:403-412. 1996.

DUAN et al. Carbon dynamics of eucalypt seedlings exposed to progressive drought in elevated [CO<sub>2</sub>] and elevated temperature. **Tree Physiology**, 33(8), 779–792. 2013.

Foyer, C. H., Bloom, A. J., Queval, G., and Noctor, G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annu. Rev. Plant Biol.** 60, 455–484. 2009.

FOYER, Christine H. et al. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1637-1661, 2012.

GALMÉS et al. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. **Photosynth. Research.** 2013

GEIGENBERGER & STITT. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta** 189, 329–339. 1993.

GENTY et al. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. – **Biochem. Biophys. Acta** 990: 87-92, 1989.

GIAVENO. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. **Crop Breed Appl Biotechnol** 3:89–94. 2003.

GILMORE, Adam M. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 99, n. 1, p. 197-209, 1997.

GONZÁLEZ & GONZÁLEZ. Determination of relative water content. In: Reigosa-Roger, M.J. (Ed.), **Handbook of Plant Ecophysiology Techniques**. Springer, New York, pp. 207–211. 2001.

GREER, D. H.; WEEDON, M. M. Photosynthetic light responses in relation to leaf temperature in sun and shade leaves of grapevines. In: **VII International Symposium on Light in Horticultural Systems** 956. 2012. p. 149-156.

HERNANDEZ et al. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. **Physiol. Plant** 89, 103/110. 1993.

IPCC. Climate change: impacts, adaptation, and vulnerability. part b: regional aspects. contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, Barros VR et al. (eds), **Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA**, 688 pp. 2014.

JIANG. Changes of donor and acceptor side in photosystem 2 complex induced by iron deficiency in attached soybean and maize leaves. **Photosynthetica** 41, 267–271. 2003.

JIANG, Yiwei; HUANG, Bingru. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. **Crop science**, v. 41, n. 2, p. 436-442, 2001.

KANGASJARVI et al. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. **J. Exp. Bot.** 63, 1619–1636. 2012.

KLAR et al. Determinação da umidade do solo pelo método das pesagens. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v.23, p.16-30, 1966.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v.42, p.313-349, 1991.

KUMAR, Sanjeev et al. Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 6, p. 2091, 2011.

LAWLOR, D. W. ; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LIU et al. Dephosphorylation of photosystem II proteins and phosphorylation of CP29 in barley photosynthetic membranes as a response to water stress. **Biochim Biophys Acta** 1787(10):1238–1245. 2009.

LOS & MURATA. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. **Biochim Biophys Acta** 1666:142–157. 2004.

MAHAN, James R.; MAUGET, Steven A. Antioxidant metabolism in cotton seedlings exposed to temperature stress in the field. **Crop science**, v. 45, n. 6, p. 2337-2345, 2005.

MARIAS et al. Impacts of leaf age and heat stress duration on photosynthetic gas exchange and foliar nonstructural carbohydrates in *Coffea arabica*. **Ecology and evolution**, v. 7, n. 4, p. 1297-1310, 2017.

MATHUR, S.; AGRAWAL, D.; JAJOO, A. Photosynthesis: Response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.137, p.116-126, 2014.

MAXWELL, Kate; JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MORALES et al. High-temperature preconditioning and thermal shock imposition affects water relations, gas exchange and root hydraulic conductivity in tomato. - **Biol. Plant.** 47: 203-208, 2003

MOTT & WOODROW. Modelling the role of Rubisco activase in limiting non-steady-state photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 51, 399–406. doi: 10.1093/ jexbot/51.suppl\_1.399. 2000.

MURCHIE & LAWSON. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*. ;64 :3983-98.2013.

PERDOMO, et al. Rubisco and rubisco activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 490, 2017.

RIZHISKY & MITTLER. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant physiology**, v. 130, n. 3, p. 1143-1151, 2002.

ROACH & KRIEGER-LISZKAY. Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, n. 4, p. 351-362, 2014.

SAIRAM et al. Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, v. 43, n. 2, p.245-251, 2000.

SALVUCCI & CRAFTS-BRANDNER. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. **Plant Physiol.** 134, 1460–1470. 2004.

SALVUCCI et al. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation in vivo. **Photosynth. Res.** 7, 193–201. 1985.

SCAFARO et al. Rubisco activity is associated with photosynthetic thermotolerance in a wild rice (*Oryza meridionalis*). **Physiol. Plant.** 146, 99–109. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012. 01597 2012

SCALES et al. A non-radioactive method for measuring Rubisco activase activity in the presence of variable ATP: ADP ratios, including modifications for measuring the activity and activation state of Rubisco. **Photosynth. Res.** 119, 355–365. 2014.

SHARKEY & SCHRADER. High temperature stress. In: **Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants**. Springer, Dordrecht. p. 101-129. 2006.

TAKAGI, et al. Photorespiration provides the chance of cyclic electron flow to operate for the redox-regulation of P700 in photosynthetic electron transport system of sunflower leaves. **Photosynthesis research**, v. 129, n. 3, p. 279-290, 2016.

TRETHEWEY et al. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and stimulation of glycolysis. **Plant Journal** 15, 109–118. 1998.

TURÓCZY, Zoltán et al. Overproduction of a rice aldo–keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification. **Plant molecular biology**, v. 75, n. 4-5, p. 399-412, 2011.

VOLLENWEIDER & GUNHRADT. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. **Environ Pollut** 137:455–465. 2005.

WAHID, Abdul et al. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and experimental botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.

WAHID, A ; CLOSE, T. J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 104-109, 2007.

YAMAMOTO et al. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. **Photosynth Res.**;98: 589–608. 2008.

YAMORI & CAEMMERER. Effect of Rubisco activase deficiency on the temperature response of CO<sub>2</sub> assimilation rate and Rubisco activation state: insights from transgenic

tobacco with reduced amounts of Rubisco activase. **Plant Physiol.** 151, 2073–2082. 2009.

ZHAO et al. High temperature causes negative whole-plant carbon balance under mild drought. **New Phytologist**, 200, 330–339. 2013.

1