PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES

COMPORTAMENTO FOTOSSINTÉTICO DE DUAS ESPÉCIES DE EUCALIPTO SOB CONDIÇÕES FOTOINIBITÓRIAS: ALTERAÇÕES FOTOQUÍMICAS EM RESPOSTA A ALTA IRRADIÂNCIA E BAIXA TEMPERATURA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a Pedro Luís da Costa Aguiar Alves e aprovada pela Comissão Julgadora.
03/08/98 Antônio Celso Magalhães

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio C. Novaes Magalhães

9822654

Campinas - SP

1998

UNICAMP

UNICAMP
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
Al 8fc
V Ex.
TOMBO BC/35705
PROC. 395/98
C D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 04/12/98
N.º CPD

CM-00118006-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

A87c

Alves, Pedro Luís da Costa Aguiar
Comportamento fotossintético de duas espécies de eucalipto sob condições fotoinibitórias: alterações fotoquímicas em resposta a alta irradiância e baixa temperatura/Pedro Luís da Costa Aguiar Alves. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
176f.

Orientador: Antonio C.Novaes Magalhães
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fotossintese. 2. Eucalipto. 3. Fluorescênci. I. Magalhães, Antonio C. Novaes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 03 de agosto de 1998

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof.Dr. ANTÔNIO CELSO NOVAES MAGALHÃES.....
(orientador)

Prof.Dr. ANTÔNIO NATAL GONÇALVES.....

Prof.Dr. CARLOS ALBERTO LABATE.....

Prof.Dr. ANTÔNIO MANUEL MANSANARES.....

Prof.Dr. PAULO MAZZAFERA.....

SUPLENTES:

Prof.Dr. LADASLAV SODEK.....

Prof.Dr. EDSON CORREA DA SILVA.....

ÍNDICE

Banca examinadora.....i

Índice.....ii

Abreviaturas.....v

Resumo.....vii

Summary.....x

1.Introdução.....1

1.1.Histórico da eucaliptocultura.....1

1.2.Descrição das plantas de *E. urophylla* e *E. grandis*....4

1.3.A cultura do eucalipto.....6

1.4.O fenômeno da fotoinibição da fotossíntese.....9

1.5.Mecanismo da fotoinibição.....16

1.6.Fotoinibição do fotossistema I.....19

1.7.Indução da fotoinibição pela interação entre a luz e outros fatores de estresse ambiental.....20

1.7.1.Interação entre a luz e o estresse por baixas temperaturas.....21

1.7.2.Interação entre a luz e o estresse por alta temperatura.....25

1.7.3.Interação entre a luz e o estresse hídrico.....29

1.7.4.Interação entre a luz e outros tipos de estresses.....29

1.8.Recuperação da fotoinibição do fotossistema II.....30

1.9.Mecanismos para evitar ou tolerar a fotoinibição.....31

2.Objetivos.....37

3.Materiais e Métodos.....38

3.1.Cultivo das plantas.....38

3.2. Padrão de crescimento das plantas.....39

3.3. Medidas da liberação do oxigênio fotossintético.....41

3.3.1. Avaliação dos parâmetros de atividade fotossintética.....44

3.4.Medidas por espectroscopia fotoacústica.....47

3.4.1.Atividade do fotossistema II.....50

3.4.2.Tratamento fotoinibitório.....53

3.5.Medidas da fluorescência da clorofila **a**.....56

3.5.1.Padronização das medidas.....62

3.5.2.Efeito da temperatura na cinética de indução da fluorescência.....66

3.5.3.Efeito da DFF na cinética de indução da fluorescência, sob duas temperaturas.....67

4.Resultados.....69

4.1.Padrão de crescimento das plantas.....69

4.2.Avaliação dos parâmetros de atividade fotossintética pelo eletrodo de Clark.....86

4.3.Avaliação dos parâmetros da atividade fotossintética pela espectroscopia fotoacústica.....92

4.3.1.Atividade do fotossistema II.....92

4.3.2.Tratamento fotoinibitório da fotossíntese.....96

a) Indução da fotossíntese.....96

b) Recuperação da fotossíntese.....103

4.4.Efeito da temperatura na cinética de indução da fluorescência.....105

4.5.Efeito da densidade de fluxo de fótons na cinética de indução da fluorescência, sob duas temperaturas.....111

4.5.1. Recuperação do tratamento fotoinibitório.....121

5.Discussão.....124

6.Considerações Finais.....154

7.Conclusões.....156

8.Literatura Citada.....157

ABREVIATURAS

θ	Convexidade da curva de resposta da fotossíntese a irradiância
Φ	Eficiência quântica
ΔEN	Amplitude do efeito negativo
ΔS	Amplitude do sinal fotoacústico
$\Delta S/\Delta T$	Taxa de variação do sinal fotoacústico
ΔT	Amplitude de tempo entre o sinal fotoacústico mínimo e máximo
$1/\Phi$	Exigência quântica
AFE	Área foliar específica
clor **a**	Clorofila a
clor **b**	Clorofila b
clor **total**	Clorofila total
DFF	Densidade de fluxo de fótons
$DFF_{1/2}$	DFF para atingir metade do valor de $F_{máx}$
DFF_{680}	DFF em λ=680nm
DFF_{sat}	DFF para atingir $F_{máx}$
EN	Efeito negativo
Fi	Fluorescência intermediária I
Fj	Fluorescência intermediária J
Fm, Fp	Fluorescência máxima
$F_{máx}$	Fotossíntese máxima
Fo	Fluorescência inicial
Fv	Fluorescência variável
Fv/Fm	Relação entre as fluorescências variável e máxima

PA/SR	Relação entre as massas de matérias secas da parte aérea e raízes
PCL	Ponto de compensação luminoso
PEF	Peso específico de folhas
FS_{II}	Fotossistema II
RAF	Razão de área foliar
RE	Respiração
RPF	Razão de peso de folhas
$S_{bár}$	Sinal fotobárico
$S_{máx}$	Sinal fotoacústico máximo
$S_{máx}^{ini}$	Sinal fotoacústico máximo inicial
S_{min}	Sinal fotoacústico mínimo
$S_{térm}$	Sinal fototérmico
$T_{1/2}$	Tempo necessário para atingir metade do sinal fotoacústico
TCA	Taxa de crescimento absoluto
TFm	Tempo para atingir Fm
Ti	Tempo para atingir Fi
Tj	Tempo para atingir Fj
Tp	Tempo para atingir Tp
$TS_{máx}$	Tempo para atingir $S_{máx}$
$TS_{máx}^{ini}$	Tempo para atingir $S_{máx}^{ini}$
TS_{min}	Tempo para atingir $S_{mín}$

RESUMO

A implantação de florestas de eucalipto no Brasil tem sido feita a partir de mudas produzidas em viveiros, principalmente de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, as duas espécies mais utilizadas em reflorestamentos. A produção de mudas emprega técnicas de manipulação do material vegetal, como sombreamento, irrigação e nutrição, que objetivam não apenas o bom desenvolvimento das mudas, mas, também, sua adaptação ao transplante ao campo. Essas técnicas eventualmente se traduzem em estresses às mudas, resultando na intensificação do fenômeno da fotoinibição. A fotoinibição tem sido considerada como sendo uma redução lenta e reversível na eficiência fotossintética, redução essa dependente da irradiância.

Este trabalho visou estudar o comportamento fotossintético dessas duas principais espécies de eucalipto sob condições fotoinibitórias, principalmente as alterações fotoquímicas decorrentes da exposição a alta irradiância (até 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ por 15 minutos) e a baixa temperatura (10°C), por meio da análise de crescimento e a utilização do eletrodo de Clark e das técnicas de fluorescência da clorofila **a** e da espectroscopia fotoacústica.

Foi observado que as plantas de *E. grandis* com 60 dias de idade apresentaram menor área foliar, com folhas mais espessas, mas com menor biomassa seca que as de *E. urophylla*. O conteúdo de clorofilas **a** e **b** e a relação clor **a**/clor **b** foi maior em *E. grandis*, resultando em maior absorção de energia radiante a λ=700nm. Essas plantas apresentaram indução fotossintética mais

rápida, com maior fotossíntese, eficiência quântica e respiração, enquanto as de *E. urophylla* apresentaram maior sinal fototérmico.

A temperatura de 10°C acelerou a indução da fotossíntese nas plantas das duas espécies, mas reduziu a taxa máxima de fotossíntese, a eficiência quântica e a respiração. Esses efeitos foram mais acentuados em *E. grandis*.

Quando as plantas foram submetidas ao tratamento fotoinibitório foi verificado que *E. grandis* apresentou maior fotossíntese quando exposto a DFF de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$. Contudo, as duas espécies apresentaram incapacidade de recuperação na taxa de fotossíntese inicial quando foram expostas a DFF superior a 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, demonstrando a ocorrência da fotoinibição. Esse fenômeno se mostrou irreversível até duas horas após o tratamento fotoinibitório e foi mais acentuado em *E. urophylla*, sem se constatar efeito da temperatura.

Enquanto as plantas permaneceram no escuro, não ocorreram diferenças entre espécies e entre os efeitos das temperaturas sobre Fo, Fm, Fj, Fi, Fv, Fv/Fm e na velocidade de transição entre os níveis intermediários de fluorescência Fj, Fi e Fm, mas TFm foi maior nas plantas aclimatadas a 30°C. Com a exposição a irradiância, o valor de Fo aumentou e o dos demais parâmetros diminuiu, sendo que eles tenderam a ser menores em *E. urophylla*. Os efeitos da DFF sobre os parâmetros de fluorescência ocorreram a partir de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$ para *E. urophylla* e a partir de 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ para *E. grandis*

(acentuadamente a partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ para as duas espécies), mas foi constatada a recuperação nas duas espécies após 12 horas de reaclimatação no escuro.

Com base nesses resultados pode-se concluir que a atividade fotossintética de *E. grandis* foi maior que a de *E. urophylla*, mas ele foi mais sensível a temperatura de resfriamento. A fotoinibição da fotossíntese, que foi reversível, ocorreu acentuadamente a partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ para as duas espécies, mas *E. grandis* se mostrou mais tolerante aos seus efeitos do que *E. urophylla*, provavelmente por apresentar maior dissipação de energia radiante pela fluorescência.

SUMMARY

The plantation of eucalyptus forests in Brazil has been done with the use of seedlings produced in nurseries, mainly of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis*, the two species most commonly used in reforestations. The production of seedlings uses techniques of vegetable material handling, such as shadowing, irrigation and nutrition, with a view to the good development of the seedlings and also to enable them to be transplanted to the field. These techniques may cause stress to the seedlings and, consequently, result in a more intense photoinhibition phenomenon. Photoinhibition may be defined as a slow and reversible reduction in the photosynthetic efficiency, which depends on irradiation.

The objective of this work is to study the photosynthetic behavior of those two main species of eucalyptus under photoinhibitory conditions, specially the photochemical alterations that resulted from the exposure to high irradiation (until reach 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ for 15 minutes) under low temperatures (10°C), based on the growth analysis, and the utilization of Clark's electrode, techniques of chlorophyll **a** fluorescence, and photoacoustic espectroscopy.

It was observed that 60 days old *E. grandis* plants have presented smaller, but thicker, leaves than the *E. urophylla*, and with smaller dry biomass. The presence of chlorophylls **a** and **b** and the ratio clor**a**/clor**b** was higher in those leaves, which resulted in larger absorption of radiating energy at λ=700nm. *E. grandis* plants have shown faster photosynthetic

induction, larger photosynthesis, quantum yield and respiration; on its turn, *E. urophylla* plants have shown larger thermal signal.

The 10°C temperature has improved the photosynthesis in the plants of both species, but it reduced the maximum level of photosynthesis, quantum yield and respiration. These effects were more visible in the *E. grandis* plants.

When both plants were exposed to photoinhibitory treatment, it was observed that the *E. grandis* presented larger photosynthesis when exposed a FFD of 500 to 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$. However, both species have shown to be unable to recover and to return to the initial photosynthesis level when exposed to FFD bigger than 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, which shows the occurrence of photoinhibition. This phenomenon has proved to be irreversible, even two hours after the photoinhibitory treatment, and was more significant in the *E. urophylla*, not having been observed temperature influence.

In the dark, the two species have shown no difference between them and among the effects of temperature on Fo, Fm, Fj, Fi, Fv, Fv/Fm, and in the transition speed from the intermediate levels of fluorescence Fj, Fi and Fm, but TFm was higher in the plants acclimatized at 30°C. The value of Fo has increased with the exposure to irradiance, and the value of the other parameters has decreased, and tended to be smaller in the *E. urophylla*. FFD effects on the parameters of fluorescence have been initially observed at 500 μmol $m^{-2}s^{-1}$ for *E. urophylla* and 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ for *E. grandis*; for both

species, these effects were more significant from 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$. After 12 hours in the dark, both species have recovered from photoinhibition.

Based on these results we may conclude that the photosynthetic activity of *E. grandis* is larger than *E. urophylla*, which, on its turn, is more resistant to chilling temperatures. Photoinhibition of photosynthesis, which was reversible, has been significant for both species from 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, but *E. grandis* has shown to be more resistant to its effects than *E. urophylla*, probably because of its larger dissipation of radiant energy through fluorescence.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da eucaliptocultura

A crescente necessidade de madeira e celulose para atender a demanda do mercado mundial aumenta, de forma preocupante, a pressão da sociedade sobre o setor florestal. Essa pressão é justa, pois a maior parte da madeira utilizada é extraída de reservas florestais nativas. A retirada indiscriminada da cobertura florestal dessas regiões pode representar grande risco ao equilíbrio regional. Em virtude disto, POGGIANI (1988, 1989) concluiu que a única solução para preservação e conservação dos ecossistemas é a intensificação da implantação de florestas homogêneas de rápido crescimento, destacando-se as espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*.

O estabelecimento de plantações florestais de rápido crescimento, além de aliviar a pressão que conduz a devastação das matas naturais remanescentes, apresenta-se como solução viável para a recuperação dessas áreas degradadas, bem como pode desempenhar a função de florestas de proteção em muitas situações: estabilização de dunas, prevenção de erosão, controle do escoamento superficial em bacias hidrográficas, recreação, quebra-ventos e outras (LIMA, 1987).

Os primeiros ensaios para reflorestamento com eucalipto datam de 1854, principalmente com *E. globulus*, na época a espécie mais conhecida e difundida, com plantações bem sucedidas em Portugal e na Espanha. Nos Estados Unidos, datam de 1856 as primeiras introduções na Califórnia (PRYOR,1976).

Na Índia, o segundo país em área total reflorestada com eucalipto (cerca de 550.000 ha reflorestados até 1980 e com taxa anual de plantio de 6.000 ha), as primeiras introduções ocorreram em 1843 e sua cultura expandiu a partir de 1856 (FAO,1981; MATHUR, 1983; ELDRIDGE, 1986).

A África do Sul, que em superfície total reflorestada ocupa o 4° lugar, com um total em 1983 de cerca de 370.000 ha e uma taxa anual de reflorestamento de 10.500 ha, iniciou os ensaios de introdução de eucalipto em 1828 (FAO, 1981; ELDRIDGE, 1986)

Espanha, Angola e China são outras nações com extensas áreas reflorestadas com eucalipto, com valores de aproximadamente 400.000 ha para as duas primeiras e de 300.000 ha para a China (ELDRIDGE, 1986).

Na América do Sul, admite-se que o Chile tenha sido o primeiro país a introduzir o eucalipto por volta de 1823. Logo a seguir, a Argentina e o Uruguai também iniciaram o plantio (LIMA, 1993).

No Brasil, os primeiros ensaios de introdução do eucalipto datam de 1868, no Rio Grande do Sul. Todavia, a expansão em larga escala da eucaliptocultura foi devida ao trabalho pioneiro de Navarro de Andrade, na então Companhia Paulista de Estrada de Ferro, iniciado em 1903. Desde essa data e até por volta de 1966, as estimativas dão conta de uma área plantada de 400.000 ha. Em 1966 o governo federal estabeleceu o programa de incentivos fiscais, a fim de atender a crescente demanda de uma incipiente, porém agressiva, industria baseada na utilização de madeira como matéria prima,

principalmente nas regiões sul e sudeste, as quais estavam, já naquela época, bastante destituídas de cobertura florestal natural. Com o advento do programa de incentivos fiscais, a área plantada aumentou consideravelmente e, em 1973, tinha atingido o total de 1.052.000 ha, com incremento médio anual de 100.000 ha, ocupando, assim, o 1° lugar no mundo em área reflorestada com eucalipto. Considerando a área total de plantações florestais com todas as espécies, o Brasil ocupava, em 1981, o 4° lugar, atrás da China, Rússia e Estados Unidos (FAO, 1981).

Segundo informações da FAO (1981), a cobertura florestal mundial é aproximadamente de 3,6 trilhões de ha, com uma produção de madeira roliça de 1,65 bilhões de metros cúbicos. Deste total, cerca de 1,14 bilhões de metros cúbicos (69%) é de coníferas e o restante de folhosas. Em levantamento realizado em 1987 (ELDRIDGE & CROMER, 1987), a estimativa da área total plantada com eucalipto era de 6 milhões de ha.

Por ser uma espécie de rápido crescimento, com alta produção de madeira, com ampla gama de utilizações e fácil adaptação às condições edafoclimáticas existentes no Brasil, o eucalipto vem sendo preferido pelas empresas reflorestadoras, ocupando atualmente mais da metade da área destinada à silvicultura. O mesmo fenômeno vem sendo observado em outros países produtores de madeira (SBS, 1992). O plantio de eucalipto é de grande importância econômica para o país, sendo responsável pelo faturamento anual superior a 2,3 bilhões de dólares (AFONSO NETO, 1986).

As doze espécies de eucalipto mais importantes nas plantações florestais no mundo, de um total de 244 espécies introduzidas, incluem, em termos de incremento médio anual de madeira, as seguintes: *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. viminalis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. deglupta*, *E. exserta*, *E. citriodora*, *E. paniculata* e *E. robusta* (ELDRIDGE & CROMER, 1987). Todas essas espécies pertencem ao subgênero *Symphyomyrtus*, à exceção de *E. citriodora*, que pertence ao subgênero *Corymbia*. Atualmente, os híbridos, principalmente *E. urograndis* (*E. grandis* x *E. urophylla*) vêm recebendo especial atenção por parte das empresas reflorestadoras.

1.2. Descrição das plantas de *E. urophylla* e *E. grandis*

E. urophylla S. T. Blake é uma espécie nativa do Timor e de outras ilhas da parte oriental do Arquipélago Indonesiano, se desenvolvendo em latitudes variando de 8 a 10°S e em uma altitude de até 3000m. Essa espécie necessita de 1000 a 1500mm de chuva acumulada, tolerando períodos secos não muito severos (1 a 5 meses), com temperatura máxima ideal de 29°C e mínima de 8°C (JACOBS, 1981; TURNBULL & PRYOR, 1984). Nas fases de plântula e juvenil, as suas folhas são opostas, curto pecioladas e ovadas, com superfície adaxial do limbo brilhante e de coloração verde, enquanto a superfície abaxial é menos brilhante e de coloração verde-amarelada (bicolor); o caule é avermelhado a partir da metade superior. Na fase adulta, a planta pode atingir 50m de altura (altura média de 39m), com a casca do caule fibrosa (principalmente na parte

basal) a lisa, e as folhas são lanceoladas a largo-lanceoladas (10-13cm de comprimento por 3 a 4cm de largura), pecioladas e bicolores (BROOKES & KLEINING, 1983; PRYOR *et al*, 1995).

Essa espécie foi melhor conhecida recentemente, após sua descrição formal feita por BLAKE (1977). Ela tem sido plantada no Brasil há mais de 50 anos, mas sua identificação foi cancelada devido as incorreções descritivas ligadas a sua antiga designação de *E. alba* (PRYOR *et al.*, 1995). Esses autores, por meio de análise morfométrica de 400 espécimes, de 26 localizações, representativas de uma lista de formas usualmente designadas como *E. urophylla*, separaram, dessa, duas novas espécies: *E. orophila* e *E. wetarensis*.

E. grandis W. Hill ex Maiden é uma espécie originária da Austrália, se desenvolvendo em latitudes variando de 17° a 32°S e em uma altitude de até 900m. Essa espécie necessita de 1000 a 1750mm de chuva acumulada, suportando 3 meses de estação seca raramente severa, com temperatura máxima ideal de 32°C e mínima de 5°C (JACOBS, 1981; TURNBULL & PRYOR, 1984). Nas fases de plântula e juvenil, as suas folhas são aparentemente alternas a opostas, curto pecioladas e ovadas a largo-lanceoladas, com superfície adaxial do limbo brilhante e de coloração verde-azulada, enquanto a superfície abaxial é menos brilhante e de coloração verde-clara; o caule é verde a marrom (no terço superior). Quando adulta, a planta pode atingir 55m de altura, com a casca do caule decídua, normalmente lisa, e as folhas são lanceoladas (com 13 a 20cm

de comprimento por 2 a 3,5cm de largura), pecioladas e bicolores (JACOBS, 1981; BROOKES & KLEINING, 1983).

1.3. A cultura do eucalipto:

O estabelecimento de eucaliptais no Brasil tem sido feito a partir de mudas produzidas em viveiros, uma vez que a semeadura direta no campo não é comum, estando limitada a condições especiais de clima e de preparo de solo (AGUIAR & MELLO, 1974). Devido a isso, a semeadura é feita em recipientes adequados, geralmente tubetes plásticos, e as mudas obtidas são assim conduzidas até a ocasião do transplante. Existem, ainda, mudas obtidas por técnicas de propagação vegetativa, principalmente por enraizamento de estacas e por micropropagação. No entanto, essas técnicas estão sendo, ainda, assimiladas e adequadas para o uso em escala comercial (INOUE *et al.*, 1990).

Com o aumento anual das áreas reflorestadas, a produção de mudas de essências florestais tem aumentado obrigatoriamente, visando não somente a quantidade de mudas, mas, também, a qualidade dessas. A qualidade irá definir o êxito ou não de um reflorestamento, principalmente pela redução do índice de mortalidade (GOMES *et al.*, 1979b).

A muda é considerada boa para ser levada ao campo quando for sadia e tiver resistência para reagir satisfatoriamente as condições adversas do meio (REIS *et al.*, 1988). Um dos fatores limitantes ao estabelecimento de mudas no campo é o teor de água no solo, seguido do estado nutricional da muda, que juntos vão condicionar a velocidade de crescimento e,

consequentemente, o pegamento da muda (BRANDI, 1976). Em função desses fatores são adotadas técnicas para o chamado "endurecimento" da muda, tais como alterações físicas e químicas do substrato, emprego de sais e antitranspirantes, poda e manipulação das condições hídricas e de irradiância (GOMES *et al.*, 1980; CALDER, 1992).

Um outro fator condicionante da adaptabilidade da muda por ocasião do transplante, e que não vinha sendo reconhecido com a devida atenção, é o seu desempenho fotossintético. Normalmente, a seleção de mudas para a obtenção da correlação juvenil-adulta é feita por características biométricas (altura, número de folha e de ramos e diâmetro do coleto) e de coloração das folhas (verde ou vermelha). Recentemente, a atenção tem sido voltada para a eficiência fotossintética da muda, que revela a sua habilidade na retomada do crescimento após o transplante e de mantê-lo enquanto adulta (INOUE & ODA, 1988; INOUE *et al.*, 1990).

O cultivo do eucalipto envolve uma fase inicial de crescimento das mudas sob condições de sombreamento, para as quais são geralmente empregadas telas de poliolefinas de cor preta (sombrite) com diferentes níveis de interceptação da luz solar. Há alguns anos, esse sombreamento se estendia até 70-80 dias após a semeadura, alternando períodos de cobertura nas horas do dia com temperaturas mais elevadas com períodos em que as mudas ficavam descobertas (GOMES *et al.*, 1979a). Atualmente, esse tempo de cobertura se restringe aos 40 dias iniciais de cultivo, utilizando sombrites com menor interceptação (30-50%) e mantendo a alternância dos períodos

de cobertura. Após essa fase, as mudas são mantidas a pleno sol. O sombrite tem como principais funções a manutenção da umidade do substrato e a proteção das mudas contra agentes externos (pássaros, insetos, ventos, granizo, etc) (PEREIRA *et al.*, 1980).

Vários trabalhos publicados recentemente demonstram que plantas com ciclo fotossíntético C_3, como o eucalipto, aclimatadas a baixas intensidade de irradiância (sombreamento) estão sujeitas a fotoinibição da fotossíntese quando transferidas para ambiente com alta intensidade de irradiância.

Na fase de crescimento das mudas no viveiro, além do reduzido volume do substrato (50mL), são empregadas técnicas de manipulação do material que eventualmente se traduzem em condições estressantes, tais como deficiência hídrica e nutricional (REIS *et al.*, 1988). O estresse hídrico se manifesta mais acentuadamente com a retirada do sombrite, quando as mudas, que se desenvolveram em recipientes com dimensões reduzidas, ficam expostas a pleno sol até a ocasião do transplante (REIS *et al.*, 1988). Por outro lado, aos 70 dias após a semeadura cessa a adubação, que até então era realizada pela aplicação diária de solução nutritiva, induzindo as mudas ao estresse nutricional. Esses procedimentos visam justamente o endurecimento das mudas, mas podem causar a intensificação do fenômeno da fotoinibição (SMITH, 1982; OFFLER *et al.*, 1983).

1.4. O fenômeno da fotoinibição da fotossíntese:

A fotoinibição tem sido definida como inibição da fotossíntese pela alta irradiância, podendo causar danos no aparato fotossintético, como a fotodestruição dos pigmentos fotossintetizantes (POWLES, 1984). Contudo, recentemente, a fotoinibição tem sido considerada como sendo uma redução lenta e reversível da eficiência fotossintética, redução essa dependente da irradiância e independente de qualquer mudança evolutiva, causando a queda na capacidade de conversão da energia radiante em matéria seca e, consequentemente, no crescimento (LONG *et al.*, 1994; KRAUSE *et al.*, 1995; LAING *et al.*, 1995).

A radiação solar ou irradiância, normalmente designada como luz, é a única fonte de energia para os processos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem nas plantas. A produção final de matéria seca de uma planta depende, em uma instância, da eficiência com que as folhas convertem energia radiante em energia química através da fotossíntese. Somente uma fração do espectro solar, contudo, é utilizada pela planta no processo de conversão (ASSIS & MENDEZ, 1989). Essa fração, denominada de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), é considerada como sendo o fluxo de fótons na faixa de 400 a 700nm do espectro solar (McCREE, 1972). Nessa revisão, os termos luz e irradiância referem-se a RFA.

A evolução das plantas seguiu um caminho entre maximizar a interceptação da luz para a fotossíntese e minimizar o

potencial de danos resultantes do excesso de luz no aparato fotossintético (LONG *et al.* ,1994).

Na natureza, a luz difere dos outros elementos climáticos pelo tamanho e velocidade de sua variação. No decorrer de um dia, as plantas enfrentam mudanças, de várias ordens de grandeza, na qualidade e quantidade de luz. As plantas podem responder a variações de baixa freqüência na qualidade e quantidade de luz adaptando sua capacidade e habilidade fotossintética para dissipar a energia luminosa interceptada (ANDERSON *et al.*, 1988; OSMOND & CHOW, 1988). Quando ocorrem variações em alta freqüência, como, por exemplo, a passagem de uma nuvem, ou quando as plantas não apresentam habilidade para se adaptarem as condições de luz que prevalecem, ocorre o excesso de excitação do aparato fotossintético, podendo resultar na fotoinibição (LONG *et al.*, 1994). Na natureza, as plantas apresentam uma série de respostas ao excesso de luz, as quais podem ser parcialmente categorizadas entre danos e escape aos danos, e ocorrem em uma variação de escala de tempo, conforme esquematizaram OSMOND & CHOW (1988).

O fenômeno da fotoinibição pode ser causado pela luz ultra violeta (UV), visível (V) e combinação UV-V (POWLES, 1984). A absorção do fóton pela folha é diretamente proporcional à densidade do fluxo de fótons, resultando em uma resposta linear; mas, a utilização desse fóton pela fotossíntese apresenta uma resposta hiperbólica não retangular, demonstrando que a partir de determinada densidade ocorre a saturação da fotossíntese (FARQUHAR *et*

al., 1980). Sob luz de baixa intensidade (<100μmol $m^{-2}s^{-1}$) mais de 80% dos quanta de luz absorvidos podem ser utilizados para fotossíntese, de acordo com a medida de eficiência quântica máxima da liberação de O_2 (BJÖRKMAN & DEMMIG, 1987). Quando a intensidade da luz se aproxima de 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ (metade do valor da luz solar), menos de 25% dos quanta de luz absorvidos são utilizados e, a pleno sol, a utilização decresce para 10% (LONG *et al.*, 1994).

Vários termos têm sido utilizados para designar o fenômeno da redução da capacidade fotossintética induzida pela exposição de organismos, estruturas ou organelas ao excesso de luz visível. Alguns desses termos são: fotoinibição, fotooxidação, fotoinativação, fotolabilidade, solarização e reações fotodinâmicas (POWLES, 1984; KRAUSE, 1988). O termo fotoinibição tem sido utilizado com maior freqüência, principalmente devido a importância que o estudo do fenômeno assumiu nos últimos 20 anos (KRAUSE, 1988). Contudo, esse termo também tem sido utilizado como sinônimo de danos causados ao fotossistema II (FS_{II}), mas é importante ressaltar que o dano da luz ao FS_{II} é considerado fotoinibição, por definição, se ocorrer decréscimo em toda capacidade fotossintética e não apenas em um componente do aparato fotossintético (LONG *et al.*, 1994), sendo que a fotoinibição não é um fenômeno uniforme (KRAUSE, 1988).

Funcionalmente, as conseqüências da fotoinibição da fotossíntese são: redução na eficiência quântica máxima para absorção de CO_2 (Φ) e liberação de O_2 (Φ_o), decréscimo na

convexidade (θ) da curva de resposta da fotossíntese à luz, redução na atividade fotoquímica do FS_{II} (razão de fluorescência Fv/Fm da clorofila **a**) e, com a exposição prolongada ao excesso de luz, ocorre o decréscimo na taxa de fotossíntese máxima ($FS_{máx}$) (BOESE & HUNER, 1992; LONG *et al.*, 1994). Os decréscimos de Φ, Φ_o e Fv/Fm têm sido observados precedendo a redução na $FS_{máx}$ e esses podem ocorrer sem que haja alteração na $FS_{máx}$ (LONG *et al.*, 1994).

A exposição prolongada de plantas ou organelas ao excesso de luz pode resultar na fotodestruição dos pigmentos fotossintéticos, uma vez que a descoloração (branqueamento) desses é dependente do oxigênio e da luz. Esse fenômeno é normalmente denominado de fotooxidação, podendo levar à morte da célula ou do organismo (POWLES, 1984; HENDREY *et al.*, 1987).

Na grande maioria dos casos, a fotooxidação é um fenômeno secundário, ocorrendo após uma fase distinta, lenta, durante a qual há um declínio da fotossíntese dependente da intensidade da luz e do tempo de exposição (fotoinibição), sem que ocorram mudanças na composição do reservatório dos pigmentos (POWLES, 1984; LONG *et al.*, 1994). Portanto, a fotoinibição da fotossíntese não é conseqüência da destruição do reservatório de pigmentos, mas, ao contrário, a descoloração dos pigmentos ocorre depois que dado grau de fotoinibição ocorreu, separando, assim, em dois fenômenos distintos (SATOH, 1970a; HENDREY *et al.*, 1987).

Geralmente, plantas adaptadas ao sol possuem a capacidade de se aclimatarem e crescerem em condições

sombreadas, enquanto plantas adaptadas a sombra podem não se aclimatar e crescer em condições de pleno sol. Essa diferença demonstra a sensibilidade à fotoinibição (SMITH, 1982).

A transferência de uma planta de sol que se desenvolveu sob condições de baixa irradiância para alta irradiância resulta em um incremento na capacidade fotossintética para se adaptar e utilizar o aumento da irradiância. Contudo, as folhas dessas plantas podem apresentar fotoinibição da fotossíntese quando as plantas são repentinamente transferidas para plena luz. Com isso, as folhas maduras que inicialmente sofreram fotoinibição podem se adaptar à nova situação ou podem sofrer uma descoloração dos pigmentos fotossintetizantes, com morte celular. Folhas jovens desenvolvidas após a transferência para alta irradiância não apresentam fotoinibição. Plantas aclimatadas a baixa irradiância e expostas a alta irradiância são mais severamente fotoinibidas do que aquelas adaptadas inicialmente a alta irradiância (LONG *et al.*, 1994). Essa diferença esclarece a importância da capacidade fotossintética em influenciar o grau de suscetibilidade à fotoinibição.

As estruturas coletoras de luz (antenas) precisam conter pigmentos organizados de forma e tamanho a promover eficiente transferência de energia para os centros de reação. A vantagem que isso confere em condições de baixa irradiância é mostrada pelo aumento na relação dos pigmentos da antena por centros de reação quando a planta (ou folha) se desenvolve na sombra (ANDERSON & OSMOND, 1987; OSMOND & CHOW, 1988; HORTON

& RUBAN, 1992). O resultado dessa adaptação, contudo, é que a fotossíntese é saturada a baixas irradiâncias. Como conseqüência, sob alta irradiância, a taxa de absorção de energia radiante excede em maior ou menor extensão a taxa com que ela pode ser utilizada para a fotossíntese, predispondo a planta aos danos induzidos pelo excesso de luz (HORTON & RUBAN, 1992).CLELAND & MELIS (1987) demonstraram que um mutante de *Secale cereale* sem o complexo de clorofila **a/b** coletor de luz foi menos afetado pelo tratamento com alta irradiância do que o tipo selvagem.

Sob dadas condições, uma quantidade significante de fótons é interceptada pelo aparato fotossintético, afunilada para os centros de reação e transferida, via reações do transporte de elétrons, para a produção de $NADPH_2$ e ATP (POWLES, 1984). De acordo com o esquema vigente de transporte de elétrons, são necessários 8 moles de fótons para a redução de 2 moles de $NADPH^+$, à qual está acoplada a síntese de 2,66 moles de ATP. Em plantas C_3, 2 NADPH e 3 ATP são necessários para assimilar 1 CO_2 em carboidrato (KRAUSE, 1988). Os principais drenos dessa energia química são os ciclos de redução fotossintética do CO_2 (PCR) e da oxidação fotorespiratória do carbono (PCO). Portanto, sob condições favoráveis, uma quantidade significativa de fótons interceptada é transferida para impulsionar o metabolismo do carbono. Na ausência desse metabolismo, a utilização da energia de excitação é desprezível, enquanto a interceptação da radiação continua constante, podendo resultar na fotoinibição (POWLES, 1984; KRAUSE, 1988), o que vai

depender, também, da taxa de absorção de luz através da folha (ANDERSON & OSMOND, 1987).

A fotoinibição em folhas de plantas terrestres não é causada por uma limitação estomática à difusão do CO_2, pois na maioria dos experimentos realizados foi verificado que a pressão parcial intercelular do CO_2 após o tratamento fotoinibitório era similar ou maior que a observada antes do tratamento (POWLES, 1984). WONG *et al.* (1985) verificaram que após as folhas de *E. pauciflora* terem sido expostas por até 7h a alta irradiância (2000μmol $m^{-2}s^{-1}$) em uma atmosfera livre de CO_2 e com 10 mBar de O_2 a 30°C, as taxas de assimilação de CO_2 e a condutância foliar, medidas em condições padrões, decresceram em proporções similares, enquanto a pressão parcial do CO_2 permaneceu inalterada.

Segundo POWLES & OSMOND (1978), a ausência de CO_2 e a baixa pressão parcial de O_2 resultou na fotoinibição do feijão e de outras plantas C_3, que se mostrou dependente da intensidade e duração da luz. Quando quantidades mínimas de pressão parcial de CO_2 foram mantidas durante o tratamento fotoinibitório, não ocorreu fotoinibição nessas plantas. Em adição, os autores observaram que a fotoinibição pode ser total ou grandemente prevenida pela provisão de certa pressão parcial de O_2, mas apenas em plantas C_3. Como o O_2 participa do metabolismo do carbono pelo ciclo PCO, tanto o CO_2 como o O_2 podem prevenir a fotoinibição, por permitirem a manutenção de uma taxa, mesmo que baixa, do metabolismo do carbono durante o período de exposição a luz (POWLES, 1984).

1.5. Mecanismo da fotoinibição:

Já a partir de 1956, com a publicação do trabalho de Kok (citado por LONG *et al.*, 1994), tem sido proposto que o sítio primário do dano da fotoinibição é o centro de reação do FS_{II}. Desde então, decréscimos na Φ e na Φ_o têm sido correlacionados com reduções na fluorescência variável do FS_{II} *in vivo* (usualmente caracterizada pela relação Fv/Fm), as quais implicam em decréscimo na eficiência de conversão fotoquímica do FS_{II} (KRAUSE, 1988).

O fotossistema II (FS_{II}) consiste do complexo que evolve o oxigênio (fotooxidação da água), do complexo do centro de reação e do complexo proteínas/clorofilas coletoras de luz, que totalizam seis polipeptídios conectados não covalentemente uns aos outros. Dois desses polipeptídios, com pesos moleculares próximos a 32 KDa e 31 KDa são normalmente denominados de D_1 e D_2, respectivamente, e estão diretamente ligados ao centro de reação P_{680} e a certas quinonas necessárias à oxidação da água (FUERST & NORMAN, 1991; TAIZ & ZEIGER, 1991; SALISBURY & ROSS, 1992;).

Atualmente, existem duas hipóteses para o sítio primário do dano da fotoinibição do FS_{II}: a primeira está relacionada ao centro de reação e a segunda à proteína D_1.

Quanto à primeira hipótese, POWLES (1984) relata que o transporte de elétrons através do FS_{II} é inibido quando a fotoinibição é induzida pelo excesso de luz ou pela iluminação sem a reciclagem do carbono. Observações de que o espectro de ação para fotoinibição acompanha o da fotossíntese e de que o sintoma inicial da fotoinibição é o

declínio na eficiência fotoquímica do FS_{II} suportam a hipótese de que a fotoinibição resulta da energia absorvida pelos pigmentos fotossintéticos e canalizada para o centro de reação do FS_{II}, alterando-o (LONG *et al.*, 1994). Esse centro alterado ainda atua como um eficiente capturador de energia radiante, mas converte a energia capturada em calor (KRAUSE, 1988).

Tilacóides fotoinibidos apresentaram diminuição no transporte de elétrons de P_{680} para Qa, que pode ser evidenciada pela redução na fluorescência variável da clorofila (CLELAND & MELIS, 1987). Esses autores sugerem que a inativação do centro de reação do FS_{II} ocorre por uma mudança molecular desconhecida resultante da captura de um exciton pelo P_{680}^{+}. Contudo, DEMETER *et al.* (1987) concluíram que o tratamento fotoinibitório causou inicialmente uma inibição na separação de cargas entre P_{680} e a feofitina.

A doação de elétrons para o centro de reação também tem sido relatada como possível mecanismo de fotoinibição, mas, segundo BARÉNYI & KRAUSE (1985) e BRADBURY & BAKER (1986), como foi constatado em tilacóides isolados, pode não ter importância *in vivo*.

Embora a fotoinibição do FS_{II} possa envolver mecanismos múltiplos, ocorrendo sob condições experimentais diferentes, acredita-se que os eventos primários ocorram mesmo no centro de reação (HAVAUX & DAVAUD, 1994).

A outra hipótese, de que o sítio inicial do dano da fotoinibição é a proteína D_1, mais particularmente o nicho de

ligação de Qb, tem sido recentemente estudada e bem aceita (RICHTER *et al.*, 1990a).

Estudos demonstraram a participação da proteína D_1 no fenômeno da fotoinibição. HUNDAL *et al.* (1990), KUHN & BÖGER (1990) e RICHTER *et al.* (1990a) constataram inativação e/ou degradação dessa proteína do FS_{II} associada ao fenômeno. GREER *et al.* (1986) e LEITSCH *et al.* (1994) verificaram o bloqueio do processo de recuperação da fotoinibição por cloramfenicol, um inibidor da síntese da proteína D_1. KUHN & BÖGER (1990) e FUERST & NORMAN (1991) observaram que herbicidas que se fixam ao sítio de ligação de Qb na proteína D_1 proporcionam relativa proteção ao fenômeno da fotoinibição. Todos esses autores atribuem à proteína D_1 o sítio inicial de dano da fotoinibição.

A proximidade de D_1 com poderosos oxidantes com potencial para formar radicais altamente reativos pode explicar a vulnerabilidade dessa proteína (RICHTER *et al.*, 1990b).

A degradação da proteína D_1 induz várias mudanças na organização do complexo do FS_{II}: liberação de manganês, desarranjo de subunidades de proteínas intrínsecas e extrínsicas e migração lateral das proteínas danificadas das regiões comprimidas para as não comprimidas do tilacóide (HUNDAL *et al.*, 1990). ARO *et al.* (1993) e RINTAMÄKE *et al.* (1995) relatam que a síntese da proteína D_1 ocorre na região do tilacóide exposta ao estroma (não comprimida), indicando que o ciclo de reparação dessa proteína é dependente da luz.

1.6. Fotoinibição do fotossistema I:

O FS_I também é rapidamente afetado quando cloroplastos isolados são expostos a alta irradiância (BARÉNYI & KRAUSE, 1985; KRAUSE *et al.*, 1988; LAPOINTE *et al.* 1991). Entretanto, é observado pequeno ou nenhum efeito de fotoinibição no FS_I *in vivo*, cujas razões para essa discrepância, segundo KRAUSE (1988), são ainda desconhecidas.

Em sua revisão, POWLES (1984) relatou que o FS_I é geralmente considerado como sendo muito mais tolerante a alta irradiância do que o FS_{II}. De acordo com HAVAUX & DAVAUD (1994), a diferença de sensibilidade do FS_I à fotoinibição entre medidas feitas *in vivo* e *in vitro* sugere que a tolerância do FS_I não é uma propriedade intrínseca do fotossistema, mas sim uma conseqüência de um eficiente mecanismo fotoprotetor ou de processos de controle, os quais podem se tornar menos ativos quando *in vitro*.

Embora o FS_I seja considerado mais tolerante à fotoinibição, ele é passível de sofrer os danos decorrentes da exposição ao excesso de luz, uma vez que o espectro de ação da fotoinibição implica claramente como sendo a absorção de luz visível pelas clorofilas a responsável pela inibição (SATOH, 1970b). Uma diferença marcante entre o FS_{II} e o FS_I é que, neste último, a presença de oxigênio é essencial para a fotoinibição da capacidade de transporte de elétrons (SATOH, 1970b). Essa dependência de oxigênio faz da fotoinibição do FS_I um fenômeno diferente daquele que ocorre no FS_{II}, o que pode ser confirmado pelo fato da fotoinibição do FS_I ser evitada pelo bloqueio do transporte de elétrons no FS_{II} pelo

DCMU durante a exposição à luz (SATOH, 1970a; HAVAUX & DAVAUD, 1994).

O mecanismo de inativação do FS_I pelo excesso de luz não se encontra, ainda, esclarecido. A dependência de oxigênio e de um fluxo de elétrons contínuo (quando a irradiância não é excessiva) sugerem que interações com oxigênio gerando compostos destrutivos (H_2O_2, O_2^- e $-OH^-$) podem contribuir para a ocorrência do efeito (POWLES, 1984; ASADA & TAKAHASHI, 1987; TAKAHASHI & ASADA, 1988). Além disso, HAVAUX & DAVAUD (1994) alegam que a fotoinibição do FS_I ocorre em condições nas quais há acúmulo de P_{700} na forma reduzida, reduzindo o seqüestro do O_2^-.

1.7. Indução da fotoinibição pela interação entre a luz e outros fatores de estresse ambiental:

Como a fotoinibição envolve inativação fotoquímica principalmente do FS_{II}, todos organismos fotossintetizantes podem ser potencialmente suscetíveis a alguma irradiância incidente. Entretanto, como mencionado anteriormente, o grau de suscetibilidade está sob influência de vários fatores: ambientais (luz, temperatura, água, CO_2, O_2 e fertilidade do solo), genotípicos (planta de sol x sombra), fenotípicos (inclinação da folha) e fisiológicos (metabolismo do carbono). A imposição de fatores estressantes adicionais durante a exposição a alta irradiância exacerba os efeitos adversos da luz (POWLES, 1984; KRAUSE, 1988; LONG *et al.*, 1994; LONG & HUMPHRIES, 1994).

1.7.1. Interação entre a luz e o estresse por baixas temperaturas:

A exposição de várias plantas a temperaturas na faixa de resfriamento (0-12°C) ou de congelamento (<0°C) causa efeitos adversos nas suas funções metabólicas. A fotossíntese é um dos primeiros processos a serem afetados. Uma característica que chama a atenção é que os sintomas do dano de baixa temperatura no aparato fotossintético são especialmente pronunciados ou apenas ocorrem quando intensidade substancial de luz acompanha a exposição à baixa temperatura. Tratamento prolongado resulta na fotooxidação dos pigmentos (VAN HASSELT, 1973; HENDREY *et al.*, 1987).

Existe uma distinção clara entre a resposta das plantas a temperatura de resfriamento no escuro e na luz (LONG *et al.*, 1983). A temperatura de resfriamento no escuro tem pequeno efeito na fotossíntese e, em particular, no complexo do FS_{II} (ÖQUIST, 1983). YAKIR *et al.* (1985) verificaram que a exposição de plantas de *Lycopersicum esculentum* a 3°C por 18 horas, no escuro, praticamente não afetou Φ_o, fluorescência da clorofila **a** e a absorção de CO_2, enquanto a exposição a 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ por 5 horas a 5°C causou drástica redução nesses parâmetros.

Espécies sensíveis a temperatura de resfriamento são altamente suscetíveis aos danos fotoquímicos (fotoinibição da fotossíntese) se expostas a alta irradiância sob baixas temperaturas. Espécies tolerantes ao resfriamento, por outro lado, são aparentemente muito menos suscetíveis.

Efeitos do excesso de luz em combinação com baixas temperaturas têm sido frequentemente documentados (POWLES, 1984;ÖGREN & EVANS, 1987; SALTVEIT Jr., 1991; KRAUSE, 1994; LONG *et al.*, 1994). POWLES *et al.* (1983) demonstraram que *P. vulgaris*, *L. esculentum* e *Gossypium hirsutum* sofreram fotoinibição severa sob condições de alta irradiância e de baixa temperatura, mas *Nerium oleander*, *Atriplex expansa* e *A. rosea* não foram afetadas.

Vários pesquisadores têm investigado a ocorrência da fotoinibição em plantas sob condições de campo. Em folhas de kiwi (*Actinidia deliciosa*), a fotoinibição da fotossíntese ocorreu na primavera e no outono, quando a temperatura do ar era baixa (14-16°C), mas não no verão, quando a intensidade da luz era sazonalmente maior (GREER & LAING, 1992). Na Inglaterra, FARAGE & LONG (1987) verificaram redução de 45% na Φ nos 60 dias iniciais de cultivo do milho, período esse em que condições de dia claro coincidiam com temperaturas baixas (<10°C) pela manhã. Esses mesmos autores verificaram redução na Φ de *Brassica napus* de 17%, em média, no período de janeiro a março, sendo que a maior redução (60%) ocorreu quando dias ensolarados coincidiram com temperaturas de congelamento (FARAGE & LONG, 1991). Foi verificada a fotoinibição da Φ_o e Fv/Fm sob temperaturas de congelamento em estandes naturais de plântulas de *E. pauciflora* (BALL *et al.*, 1991) e em árvores de *Ilex aquifolium* (GROOME *et al.*, 1991).

Além da diferença de sensibilidade à fotoinibição entre espécies, têm sido relatadas diferenças entre híbridos de uma

mesma espécie. GREER & HARDACRE (1989) verificaram em *Z. mays*, que o híbrido CT foi mais sensível à fotoinibição, mas o grau de fotoinibição foi mais dependente da temperatura no híbrido CBD. Esses autores propõem que essas susceptibilidades distintas entre os híbridos podem estar relacionadas a diferenças inerentes na recuperação da fotoinibição, especialmente sob temperatura de resfriamento.

A temperatura antecedente à qual a planta foi exposta (histórico térmico) afetará a sensibilidade a temperatura de resfriamento subsequente, sendo que o crescimento e o desenvolvimento da planta sob baixa temperatura confere maior tolerância à fotoinibição sob baixas temperaturas (GREER & HARDACRE, 1989; SOMERSALO & KRAUSE, 1989; SALVEIT Jr., 1991; BOESE & HUNER, 1992). BOESE & HUNER (1992) relataram, ainda, que além desse histórico térmico da planta, o estágio de desenvolvimento e a idade da folha contribuíram para a resposta de *Spinacia oleracea in vivo* à fotoinibição. HAVAUX & TARDY (1996) verificaram que o transporte de elétrons foi mais inibido por temperaturas de resfriamento quando as plantas de *L. esculentum* foram expostas previamente a 35°C por 2h.

O histórico térmico condiciona modificações nos tilacóides durante a fase de crescimento e de desenvolvimento da planta sob baixa temperatura. HUNER *et al.* (1987, 1989) e KRUPA *et al.* (1987) relataram que o desenvolvimento de *S. cereale* sob baixas temperaturas de endurecimento resultou em mudanças organizacionais específicas no complexo coletor de luz do FS_{II}. Microscopia eletrônica *in situ* com ruptura a

frio revelou que o desenvolvimento sob baixa temperatura resultou em menor empilhamento dos grana e em redução no tamanho das partículas da antena do FS_{II}. HUNER *et al.* (1987, 1989) demonstraram *in vitro*, que a antena do FS_{II} de *S. cereale* endurecido a baixa temperatura se estabiliza primariamente na sua forma monomérica, enquanto no não endurecido, ela se estabiliza na forma oligomérica. LAPOINTE *et al.* (1991) verificaram redução de 23% na relação Fv/Fm de *S. cereale* previamente endurecido a baixa temperatura (5°C por 8 semanas) após a exposição a 1500μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto no não endurecido (20-16°C por 8 semanas) a redução na Fv/Fm foi de 46%. Trabalhando com tilacóides isolados, esses autores concluíram que o aumento da tolerância a baixa temperatura indutora da fotoinibição não é uma propriedade das membranas dos tilacóides, mas está associado a um alto nível de organização celular.

Na maioria dos estudos sobre fotoinibição são utilizadas altas irradiâncias e, normalmente, por um período curto de exposição. Não está totalmente elucidado, ainda, qual a extensão dos efeitos da interação luz x temperatura de resfriamento na atividade fotossintética de plantas sensíveis a baixas temperaturas, sob condições nas quais prevalece luz moderada. YAKIR *et al.* (1985) verificaram que temperaturas de resfriamento de 5 e 10°C por 5 dias sob irradiância moderada (400μmol $m^{-2}s^{-1}$) causaram decréscimo significativo na Fv/Fm, Φ_o e no total de energia absorvida estocada nos intermediários fotoquímicos, sem afetar a concentração de RUBISCO em plantas de *L. esculentum*.

De acordo com OTTANDER *et al.* (1993), existem quatro hipóteses para explicar porque as plantas se tornam muito mais sensíveis à fotoinibição quando em baixas temperaturas: a) baixas temperaturas podem reduzir a capacidade fotossintética e, portanto, aumentar a probabilidade de excesso de excitação do FS_{II}; b) a capacidade de recuperação do FS_{II} é reduzida a baixas temperaturas (a degradação e síntese da proteína D_1 nos centros de reação parecem diminuir em baixas temperaturas); c) a capacidade dos seqüestradores de oxigênio, os quais possuem o potencial de prover proteção contra a fotoinibição, diminui a baixa temperatura e d) a habilidade em formar zeaxantina, a qual está capacitada a dissipar a energia de excitação na antena do FS_{II}, pode ser inibida a baixa temperatura. Essas hipóteses não são necessariamente mutuamente exclusivas.

1.7.2. Interação entre a luz e o estresse por alta temperatura:

A combinação entre alta temperatura e pleno sol é um evento comum, que caracteriza condições de verão na maior parte da superfície terrestre. A fotoinibição da fotossíntese *in situ* pode ocorrer em pleno sol, mesmo na ausência de outros fatores estressantes, ainda que a temperatura foliar possa ser alta (POWLES, 1984). Quando a temperatura se eleva acima do ótimo, a fotossíntese começa a decrescer, no início, gradual e reversivelmente, e, depois, paulatina e irreversivelmente em alguma temperatura crítica (BERRY & BJÖRKMAN, 1980). Segundo esses autores, a inativação

reversível da fotossíntese é um reflexo de dano nas reações dos cloroplastos, o qual persiste por algum tempo após o retorno às condições de temperaturas favoráveis.

ÖGREN (1988) e ÖGREN & ROSENGVIST (1992) verificaram o fenômeno da fotoinibição a pleno sol em folhas de *Salix* sp, enquanto ADAMS (1988) o constatou para várias plantas CAM e LAING *et al.* (1995) para feijão (*Phaseolus vulgaris*). Esses últimos autores constataram inibição de 25% na taxa de crescimento vegetativo em plantas de feijão aclimatadas a 25°C a 1300μmol $m^{-2}s^{-1}$, quando comparadas às que se desenvolveram sob mesma temperatura, mas a 650μmol $m^{-2}s^{-1}$; o efeito inibitório foi maior quando essas plantas foram comparadas às que se desenvolveram ou foram transferidas para 10°C. Para o eucalipto, ÖGREN & EVANS (1992) verificaram redução de 30% na Φ e na Fv/Fm de seis espécies (*E. camaldulenses, E. camphora, E. globulus, E. largiflorens, E. melliodora* e *E. sidiroxylon*) no campo, sob excesso de luz e temperatura alta, sendo esse efeito mais acentuado nas folhas de disposição horizontal (40% de inibição).

Pouco se sabe sobre a fotoinibição da fotossíntese no dossel de florestas tropicais. As folhas a pleno sol têm de suportar a alta intensidade de luz e, ainda, serem capazes de ter uma fotossíntese eficiente sob baixa intensidade de luz durante períodos extensos de sombreamento pelas nuvens (KRAUSE *et al.*, 1995). Esses autores estudaram o efeito da fotoinibição da Fv/Fm e da Φ_o em folhas jovens e maduras de seis espécies de plantas que se desenvolveram em uma floresta

tropical semidescídua do Panamá e verificaram alto grau de fotoinibição nas folhas jovens. Essas folhas foram as que apresentaram maior recuperação em função do maior conteúdo de α-caroteno e zeaxantina, para menor conteúdo de clorofila total.

Ao contrário do que acontece em baixas temperaturas, a exposição à luz durante um curto tratamento de alta temperatura é benéfica à planta, diminuindo o dano no aparato fotossintético (SCHRIEBER & BERRY, 1977). Esses autores mencionaram que esse efeito protetor da luz saturou em uma intensidade de irradiância de apenas 125μmol $m^{-2}s^{-1}$, mostrando ser dependente da intensidade e das características espectrais da luz.

HAVAUX *et al.* (1991) verificaram que a exposição de folhas intactas de *Pisum sativum* a 40°C por um curto período, no escuro, provocou inibição drástica na liberação fotossintética de O_2 e na emissão de fluorescência do FS_{II}. Nenhuma alteração, contudo, foi observada nesses parâmetros quando a planta foi iluminada (30 W m^{-2}) durante o tratamento térmico. Esse efeito protetor da luz na intensidade de até 100W.m^{-2} também foi constatado por HAVAUX & STRASSER (1990).

Dentro do aparato fotossintético, o FS_{II} parece ser mais sensível ao calor, enquanto a atividade do FS_I, enzimas do estroma e o envelope cloroplastídico são comparativamente mais termoestáveis (HAVAUX *et al.*, 1991). Acredita-se que o aumento da temperatura acarreta primeiro o bloqueio dos centros de reação do FS_{II} e, em seguida, causa a dissociação do complexo proteína-pigmentos da antena do núcleo central do

aparato coletor de luz do FS_{II} (ARMOND *et al.*, 1978). Para GOUNARIS *et al.* (1983), essa dissociação pode estar relacionada à separação de fases dos lipídios formadores de camada simples nas membranas do tilacóide ou ainda ser consequência da reação entre O_2^- e H_2O_2 oriundos de estresse oxidativo e que causam inativação de enzimas, descoloração de pigmentos, peroxidação de lipídios e proteólise (PASTORI & TRIPPI, 1993).

Da mesma forma que ocorre no estresse por baixa temperatura, o histórico térmico que antecede a exposição a alta temperatura condiciona os efeitos da fotoinibição. SMILLIE & HETHERINGTON (1983) verificaram que plantas com graus decrescentes de adaptação ao frio como *P. sativum*, *Cajanus cajan*, *Triticum aestivum*, *Arachis hypogea*, *Pennisetum* e *Carica papaya* apresentaram, nessa ordem, aumento gradual de tolerância ao tratamento de 44°C por 10 minutos, tolerância essa avaliada pela fluorescência da clorofila **a** *in vivo*. HAVAUX & TARDY (1996) observaram por meio da espectroscopia fotoacústica e da fluorometria que o tratamento prévio de folhas de *L. esculentum* a 35°C por duas horas induziu um rápido aumento na tolerância do FS_{II} a luz e ao calor. Esses mesmos autores verificaram que uma breve exposição de folhas de *L. esculentum* a irradiância de 1000µmol $m^{-2}s^{-1}$ por quatro minutos aumentou significativamente a termoestabilidade do FS_{II}, avaliada por medidas subsequentes de fluorescência x curva de temperatura.

1.7.3.Interação entre a luz e o estresse hídrico:

O efeito do estresse hídrico na fotossíntese apresenta tanto o componente estomático (restrição na disponibilidade de CO_2) como o não estomático (inibição direta da fotossíntese). Como o estresse hídrico ocorre frequentemente durante condições de luz e de temperatura de verão, existe o potencial de fotoinibição e de fotooxidação (POWLES, 1984).

GAUHL (1979) trabalhando com ecótipos de sol e de sombra de *Solanum dulcamara* observou interação entre a luz e o estresse hídrico. Alguns ecótipos de sombra cresceram e fotossintetizaram bem sob condições de pleno sol quando foram irrigados normalmente. Mas, com a imposição de estresse hídrico moderado, eles rapidamente apresentaram sinais de fotoinibição. Para outros ecótipos que sofreram fotoinibição após a transferência a pleno sol, a imposição do estresse hídrico acentuou os efeitos adversos da luz. Segundo OSMOND (1983), esses resultados podem ter sido conseqüência de estresse nutricional, que atuou junto ao estresse hídrico.

WONG *et al.* (1985) verificaram que tanto o estresse hídrico como o tratamento fotoinibitório causaram redução no metabolismo fotossintético de folhas de *E. pauciflora*, com alterações significativas na pressão parcial de CO_2 intercelular.

1.7.4.Interação entre a luz e outros tipos de estresses:

Conforme mencionado anteriormente, fatores de estresse ambiental exercem efeitos nas plantas como tornar ou aumentar

a suscetibilidade do aparato fotossintético à fotoinibição ou à fotooxidação.

A aplicação de vários herbicidas causa inibição direta da fotossíntese e, quando as plantas são expostas à luz, ocorre destruição fotooxidativa dos pigmentos fotossintéticos. Existem três grupos de herbicidas que atuam diretamente sobre a fotossíntese: a) os inibidores do transporte de elétrons, com o modo de ação relacionado aos centros de reação do FS_{II}; b) os bloqueadores do transporte de elétrons antes do aceitador do FS_I, promovendo a produção de oxigênio no estado excitado (O_2^-), com seus efeitos consequentes no FS_I e c) os inibidores da síntese de carotenóides dentro do aparato fotossintético em desenvolvimento, eliminando, assim, seu efeito protetor (POWLES, 1984). A presença de oxigênio é fundamental para a ocorrência do dano fotoquímico induzido pelos herbicidas dos três grupos (KENYON & DUKE, 1985).

1.8. Recuperação da fotoinibição do Fotossistema II:

A suposição de que a perda da proteína D_1 é um fator importante na fotoinibição é embasada em estudos de recuperação. Esses estudos demonstraram que para que haja recuperação da fotoinibição do FS_{II} é necessária a síntese *de novo* da proteína D_1 nos cloroplastos (ARO *et al.*, 1983; GREER *et al.*, 1986; CRITCHLEY & RUSSEL, 1994; LEITSCH *et al.*, 1994).

Vários trabalhos relatam que a fotoinibição do FS_{II} é inversamente proporcional ao estado de fosforilação das

proteínas do FS_{II}. GIARDI *et al.* (1994) verificaram que a fosforilação do complexo coletor de luz de *Spinacea oleracea* o protegeu dos danos da fotoinibição, enquanto a fosforilação dos polipeptídios acelerou o declínio da transferência de elétrons durante o tratamento com alta irradiância; a desfosforilação deles aumentou muito a sensibilidade dos tilacóides ao tratamento fotoinibitório. RINTAMÄKE *et al.* (1995) observaram que a degradação lenta da proteína D_1 de *Cucurbita pepo* exposta ao tratamento fotoinibitório foi acompanhada pelo acúmulo de D_1 na forma fosforilada, o que fez com que os autores inferissem o envolvimento da fosforilação na regulação da degradação da proteína D_1 e, portanto, de todo o ciclo de reparação do FS_{II}.

A taxa máxima de recuperação ocorre após a transição de alta para baixa irradiância. A partir desse comportamento e pelo uso de inibidores de síntese protéica, concluiu-se que a reparação do FS_{II} pela resíntese de D_1 ocorre continuamente também durante o tratamento fotoinibitório e que a fotoinibição se manifesta somente quando a taxa de inativação ou degradação da proteína excede a taxa de sua recuperação (KRAUSE, 1988) e não apenas por um decréscimo do consumo de energia fotossintética (GREER *et al.*, 1986).

1.9. Mecanismos para evitar ou tolerar a fotoinibição:

Mecanismos biofísicos. O excesso de energia de excitação no centro de reação pode ser dissipado por vias alternativas. Uma fração da energia pode ser dissipada não destrutivamente pela fluorescência ou pelo calor (POWLES, 1984). Enquanto a

reemissão como fluorescência é muito limitada como um dissipador quantitativo, a liberação de calor pode dissipar considerável excesso de energia (LONG *et al.*, 1994).

Além da fotossíntese, fluorescência e calor, BUTLER (1978), em sua revisão, apresenta outras vias alternativas para a dissipação e distribuição de energia dentro do aparato fotossintético, incluindo o potencial para o "spillover" da energia de excitação do FS_{II} para o FS_I e as transições estado2-estado3, na qual a fluorescência do FS_{II} diminui sem que ocorra aumento concomitante da fluorescência do FS_I, indicando uma baixa transferência de energia da antena para o centro de reação.

POWLES (1984) relata que uma vez que o oxigênio singleto (O_2^-) contribui pouco nos danos causados no FS_{II}, a captura da clorofila excitada no estado tripleto pelo oxigênio pode constituir uma via alternativa de proteção. Contudo, o autor ressalta que como a fotoinibição do FS_I é dependente do oxigênio, a geração de O_2^- pode causar danos a esse fotossistema

Os carotenóides presentes na membrana dos tilacóides atuam como mecanismo protetor, por seqüestrarem ou prevenirem a formação de radicais ou outras espécies moleculares reativas, particularmente aquelas derivadas do oxigênio (DEMMIG *et al.*, 1987; KRAUSE, 1988). Além disso, esses pigmentos desativam a clorofila tripleto, transformam o oxigênio singleto para seu estado tripleto fundamental e dissipam a energia de excitação na forma de calor (POWLES,

1984; ADAMS *et al.*, 1990; LONG *et al.*, 1994; VERHOEVEN *et al.*, 1996).

Mecanismos metabólicos. A resposta mais rápida ao excesso de luz é o aumento na taxa de dissipação térmica da antena e/ou do centro de reação do FS_{II} associado ao desenvolvimento de um gradiente (Δ) de pH transtilacoidal (WALTERS & HORTON, 1993). Essa alteração no ΔpH pode causar a agregação das partículas formadoras do complexo proteína/clorofilas coletoras de luz, permitindo o aumento da dissipação térmica pela antena. Em adição, a alteração do ΔpH pode acarretar na inativação reversível do centro de reação do FS_{II} pela perda de Ca^{+2} e aumentar a dissipação térmica pelo centro de reação (LONG *et al.*, 1994).

O oxigênio pode ser reduzido pela reação de Mehler para a produção de peróxido de hidrogênio. O oxigênio molecular pode ser um aceitador de elétrons no transporte fotossintético de elétrons, gerando radicais deletérios pela redução monovalente, que pode ocorrer no lado redutor do FS_I (POWLES, 1984; RICHTER *et al.*, 1990b). Essa captura de elétrons pelo oxigênio é favorecida sob alta irradiância, quando a taxa de redução de $NADP^+$ excede em muito a demanda de NADPH para a fixação de CO_2, levando, portanto, ao acúmulo de componentes reduzidos na cadeia de transporte de elétrons (RICHTER *et al.*, 1990b). Foi observado que a regeneração limitada de $NADP^+$ sob condições de ausência de CO_2 aumentou a fotoinibição (KRAUSE *et al.*, 1978). Esse aumento concomitante da fotoinibição e da taxa de ativação do oxigênio leva a

conclusão que o último possa estar envolvido no mecanismo da fotoinibição.

O oxigênio ativado, nas formas de radical livre - $^{-}O_2$, superóxido - H_2O_2 e radicais hidroxil - OH, pode ser neutralizado pela ação da superóxido dismutase (SOD) associada ao sistema ascorbato peroxidase (KRAUSE, 1988; LONG *et al.*, 1994). A esses ainda se associam a catalase e a glutationa, sendo que tanto as enzimas e quanto os antioxidantes ocorrem naturalmente nas plantas (POWLES, 1984; RICHTER *et al.*, 1990b; PASTORI & TRIPPI, 1993). Os danos desses agentes oxidantes podem, ainda, ser evitados ou minimizados pela presença de carotenóides. Entretanto, a capacidade de prevenção dessas reações e/ou compostos antioxidantes pode ser inativada como resultado da fotoinibição (POWLES, 1984), conforme verificaram HAVAUX & DAVAUD (1994) para a atividade da SOD em *Solanum tuberosum*, quando exposto a 3700 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ sob temperatura de 3°C.

Embora a reação de Mehler apresente um papel negativo em facilitar a redução do oxigênio, ela pode atuar como um mecanismo dissipador de energia, por permitir a manutenção do fluxo de elétrons (POWLES, 1984) e manter o ΔpH transtilacoidal (RICHTER *et al.*, 1990b).

A manutenção de uma taxa mínima do metabolismo fotossintético do carbono é essencial para prevenir ou minimizar a fotoinibição (POWLES, 1984; KRAUSE, 1988; LONG *et al.*, 1994). Uma possível explicação para esse mecanismo de proteção é o fato do metabolismo do carbono consumir ATP e $NADPH_2$, mantendo o fluxo de elétrons através da cadeia

fotossintética (POWLES & OSMOND, 1978, 1979; POWLES, 1984). O consumo quantitativo de energia pela fotossíntese por si só não esclarece a prevenção à fotoinibição (KRAUSE, 1988). A taxa específica do metabolismo do carbono necessária para evitar a fotoinibição irá variar de acordo com a irradiância mantida durante o tratamento fotoinibitório e da irradiância sob a qual a planta se desenvolveu, assim como de outras características genotípicas, fenotípicas e fisiológicas da planta (POWLES, 1984; KRAUSE, 1988).

Segundo KRAUSE (1988), a fotorespiração, por consumir o oxigênio, atua como um mecanismo de proteção contra a fotoinibição. LONG *et al.* (1994) relatam que o metabolismo fotossintético do nitrogênio pode consumir até cerca de um décimo do número de quanta de luz utilizado no metabolismo fotossintético do carbono, podendo participar do mecanismo de proteção.

O rápido "turnover" da proteína D_1 em plantas de sol tem sido sugerido como sendo uma proteção eficiente contra a fotoinibição (ARO *et al.*, 1993; LEITSCH *et al.*, 1994). A aclimatação de folhas/plantas a baixa irradiância resulta na retardação do ciclo de reparação do FS_{II}, o mesmo ocorrendo quando sob temperaturas de resfriamento (LEITSCH *et al.*, 1994; TYYSTJÄRVI *et al.*, 1994).

Mecanismos morfológicos. Um dos mecanismos de reduzir o potencial para a fotoinibição é a redução da área superficial total dos cloroplastos exposta a alta irradiância. Essa redução pode ser obtida por um rápido movimento e agregação dos cloroplastos no interior da células (ANDERSON & ARO,

1994; LONG *et al.*, 1994) ou pelo movimento total das folhas, alterando o ângulo de interceptação da luz e, consequentemente, sua absorção (POWLES, 1984; LONG *et al.*, 1994). Algumas plantas superiores, como a *Cotyledon orbicula*, podem evitar o excesso de luz formando uma cutícula altamente refletora (ROBINSON *et al.*, 1993). Outras, como a *Spartina anglica*, uma espécie C_4 tolerante a temperaturas de resfriamento, normalmente apresentam um acúmulo de antocianinas na epiderme superior foliar durante a primavera, quando a combinação de baixas temperaturas pela manhã com o céu limpo predispõe-na à fotoinibição (LONG, 1983; RABINO & MANCINELLI, 1986).

2. OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivos: a) avaliar o padrão de crescimento de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, b) investigar o comportamento fotossintético dessas espécies e c) verificar as alterações nesse comportamento, principalmente as fotoquímicas, decorrentes da exposição das plantas a condições fotoinibitórias (alta irradiância e baixa temperatura).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo das plantas

As plantas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas em todos os ensaios foram obtidas junto ao viveiro de mudas da CELPAV - Celulose e Papel Ltda., localizado em Santa Rita do Passa Quatro, SP.

O substrato utilizado para o cultivo das plantas foi composto de uma mistura de vermiculita (35%), bagaço de cana (35%), terra (20%) e turfa (10%), sendo este fertilizado com 8kg/m^3 do adubo formulado 6-28-20 e 1 kg/m^3 de F.T.E. (composto contendo 9% de Zn, 1,8% de B, 0,8% de Cu, 3% de Fe, 2% de Mn e 0,1% de Mo). O substrato, depois de preparado, foi acondicionado em tubetes plásticos com capacidade para 300mL, encaixados em bandejas plásticas com capacidade para 48 tubetes.

No momento da semeadura foi feita uma adubação, adicionando-se a cada tubete 0,06g do adubo formulado 20-05-20. Em seguida, em cada tubete foram colocadas para germinar cerca de 10 sementes, previamente selecionadas quanto ao tamanho (peneira com malha de 0,59mm), sendo essas cobertas por uma fina camada do mesmo substrato. Após a semeadura, os tubetes foram levados para o viveiro, onde permaneceram sob tela de poliolefina (sombrite) com 50% de interceptação da radiação solar incidente por 120 dias.

Decorridos 30 dias após a semeadura, quando as plântulas atingiram a altura média de um centímetro, foi realizado o desbaste para seleção das plântulas mais uniformes quanto ao

tamanho, deixando-se uma plântula, a mais alta, por tubete. Aos 60 dias foi realizada a alternância dos tubetes. Este procedimento consistiu em se alternar os tubetes localizados no centro da bandeja com os que se encontram nas extremidades, visando o crescimento uniforme das plantas sob as condições adensadas em que se desenvolveram.

Dos 10 aos 40 dias após a semeadura, em intervalos de 3 dias, foram feitas adubações com a aplicação de 0,022g/tubete do adubo formulado 20-30-15. Aos 42 e 56 dias foram feitas adubações com 0,018g de MAP/tubete e, no intervalo de 42 aos 120 dias, foram realizadas adubações complementares com 0,018g/tubete do adubo formulado 10-30-15 a cada três dias.

Da semeadura até os 120 dias, as mudas foram irrigadas por aspersão de 3 a 4 vezes por dia. Devido à alta umidade relativa do ar (normalmente acima de 70%) e às condições de adensamento das plantas, foram feitas aplicações periódicas de fungicidas, utilizando o metalaxyl (Ridomil 250 PM), na dose de 2g p.c./m^2, para o controle de *Phytophthora infestans* nos meses de baixa temperatura, e o iprodione (Rovral), na dose de 1,5g p.c./m^2, para o controle de *Botrytis cinerea*.

3.2. Padrão de crescimento das plantas

A partir de 15 dias após o desbaste das plântulas, ou seja, dos 45 dias após a semeadura (DAS) até os 120 DAS, foram realizadas avaliações quinzenais das plantas, as quais incluíram as seguintes características: altura da parte aérea, área foliar (Li-Cor, modelo LI3000A), teor de clorofilas **a**, **b** e total (segundo metodologia proposta por

ARNON (1949), e massas secas de raiz, caule e folhas (obtidas após secagem do material por 98 horas em estufa com circulação forçada de ar a 70°C), espessura das folhas do terceiro nó e densidade de estômatos nessas. Foi calculada a relação entre os teores de clorofila **a** e clorofila **b** (clor **a**/clor **b**) e a relação entre as massas secas da parte aérea e do sistema radicular (PA/SR).Foram calculadas as taxas de crescimento absoluto (TCA) para altura, área foliar e massa seca de raízes, caule, folhas e total. Com os dados da área foliar e massa seca de folhas e total foram calculadas: área foliar específica (AFE), razão de área foliar (RAF), razão de peso de folhas (RPF) e peso específico de folhas (PEF), segundo as fórmulas propostas por BENINCASA (1988). Para todas essas características analisadas foram consideradas as médias de pelo menos três repetições.

A espessura da folha foi determinada nas duas folhas opostas, sendo considerada a média das duas como uma repetição. O material foi secionado a mão livre, sendo os cortes montados em lâminas semipermanentes, utilizando-se como meio de montagem glicerina a 50% em água destilada. Os cortes foram realizados transversalmente, na região mediana da folha, sendo a espessura da lâmina foliar determinada com o auxílio de uma escala micrométrica, acoplada à ocular de microscópio óptico, em um aumento final de 400X. Para padronização das medidas, foi adotado o critério de determinações de espessuras na região da folha situada à distância de 10μm à direita do centro do tecido xilemático, da nervura principal.

O número de estômatos por área de epiderme foliar (densidade estomática) foi determinado na superfície abaxial da folha, utilizando-se a técnica de impressão de epiderme em adesivo a base de éster de cianoacrilato. Para tanto, uma gota do adesivo foi depositada no centro de uma lâmina de vidro para microscopia, sendo pressionada sobre essa a epiderme a ser analisada. Após secagem do adesivo por trinta segundos, o material vegetal foi retirado, permanecendo a impressão da epiderme abaxial na lâmina, sendo feitas três repetições para cada espécie em estudo em cada época de amostragem. Em cada lâmina, o número de estômatos por área foi determinado em microscópio óptico, sendo realizadas três repetições, cada uma consistindo de diferentes campos de observação, ao acaso, delimitados por uma gratícula retangular e reticulada, acoplada a uma das oculares do aparelho. O resultado da contagem de estômatos em cada campo foi ajustado para áreas de $1\mu m^2$.

3.3. Medidas da liberação do oxigênio fotossintético.

A liberação de oxigênio pela fotossíntese foi quantificada com o uso de um eletrodo de Clark - S1 devidamente calibrado, conectado a uma câmara porta amostra - LD1/2, ambos fabricados pela Hansatech Ltd. (mod. Leaf Lab I).

O eletrodo foi preparado segundo recomendações do fabricante. O ânodo (prata) e o cátodo (platina) foram ligados por uma ponte eletrolítica de solução de cloreto de potássio saturada, colocada numa depressão específica para

tal finalidade, e revestidos por uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE).

O eletrodo, depois de preparado, foi conectado ao módulo de controle (Hansatech, mod. CB1-D). Esse módulo de controle proporciona uma voltagem de polarização estável, de aproximadamente 700 mV que, quando aplicada ao eletrodo, assegura que este operará num nível ótimo. No presente experimento, para assegurar a polarização do eletrodo foi necessário um período de estabilização de uma hora.

A corrente gerada pelo eletrodo na presença de oxigênio é convertida numa voltagem, que é então amplificada e mostrada no visor do módulo, podendo, também, ser transferida pelo conector de saída. No presente caso, o sinal de saída do equipamento, em mV, foi transferido para um microcomputador através de uma interface (Hansatech, mod. IF 1/2). Por meio de um programa específico (Minirec Recording Software - Hansatech) foi possível configurar a aquisição do sinal (leituras/traço, leituras/segundo e amostras/leitura), além de preparar, configurar e gravar gráficos. Posteriormente, usando um fator de calibração, o sinal foi convertido em concentração de oxigênio.

Mesmo na ausência de oxigênio as reações eletroquímicas geram uma pequena corrente residual. Deste modo, para uma calibração exata, esta discrepância entre concentração zero de oxigênio e o zero elétrico deve ser eliminada. Para essa calibração, foi adotada a metodologia proposta por WALKER (1990).

Em um sistema fechado, a quantidade de oxigênio depende de sua pressão parcial e do volume do sistema (no caso, uma câmara porta amostra), sendo necessária, portanto, a determinação desse volume. Antes de determinar o volume útil da câmara, foi necessário prepará-la, introduzindo alguns dispositivos (disco metálico, grades e discos de esponja e feltro) cujas finalidades são descritas por WALKER (1990). O disco de feltro foi umedecido com 1ml de solução tampão (uma parte de tampão 0,4M de borato, pH 9,0, e duas partes de solução de bicarbonato de sódio 1M, pH 9,0), cuja finalidade é repor o CO_2 absorvido pelo tecido, mantendo sua concentração aproximadamente constante durante o período de medida.

Um disco foliar de $10cm^2$, extraído de uma das folhas do terceiro nó do caule a partir do ápice da planta, foi introduzido e a câmara fechada. Nessas condições foi feita a leitura L1 no visor do aparelho. Em seguida, com o auxílio de uma seringa, 1ml de ar foi injetado na câmara para obtenção, após a estabilização, da leitura L2. Com os valores de L1 e L2 foi feito o cálculo do volume útil da câmara (v) segundo a fórmula: v(mL) = L1/ (L2-L1) (WALKER, 1990).

Após a calibração do eletrodo, o sinal em mV gerado correspondeu ao conteúdo de oxigênio no ar, ou seja, 21% em volume. Assim, nas condições normais de temperatura e pressão - CNTP, a quantidade de oxigênio em 1ml de ar é de 210µl ou 210/22,414 = 9,37µmol (sendo 22,414 o volume ocupado por 1 mol de qualquer gás nas CNTP). Em qualquer outra temperatura

(T) a quantidade pode ser calculada multiplicando-se 9,37 por 273/(273+T).

Considerando-se o volume útil da câmara (v), a quantidade (Q) total de oxigênio foi calculada segundo a fórmula: $Q(\mu mol) = 9,37 \frac{* 273 *}{(273+T)} v$ (WALKER, 1990)

Dessa quantidade de oxigênio resultou o sinal L1 lido inicialmente, indicando que a relação Q/L1 foi o fator que, multiplicado pelo sinal L2-L1 (L2 obtido após um período estipulado de tempo (t) de aquisição), forneceu a taxa de oxigênio liberado ou consumido naquele momento dentro da câmara por um disco foliar de $10cm^2$. Para calcular a taxa de liberação de oxigênio (TL) em $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$, foi empregada a fórmula: $TL = 68,2 * v * \Delta L/L1$, proposta por WALKER (1990).

O eletrodo de Clark é muito sensível a variações de temperatura, que por essa razão deve ser bem controlada. Para tanto, a câmara possui uma jaqueta acrílica por onde circula água proveniente de banho com controle termostático (MLW, modelo U2c). Além disto, a base da câmara foi isolada com uma placa de poliuretano e as medidas foram efetuadas em sala climatizada à temperatura de trabalho.

3.3.1. Avaliação dos parâmetros de atividade fotossintética.

Este experimento objetivou avaliar o efeito da temperatura de aclimatação (10 e 25°C) na eficiência quântica das duas espécies de eucalipto aos 60 DAS, bem como detectar diferenças entre elas. As plantas foram aclimatadas no escuro por 15 horas em câmaras termo reguladas a 10 e 25°C (Fanem,

mod. CDG), seguindo-se as determinações de liberação de oxigênio com o uso de eletrodo de Clark.

Inicialmente foi realizada a aferição das densidades de fluxo de fótons (DFF) a serem utilizadas, à saber: 50, 55, 97, 102, 170, 184, 330, 350, 380, 430, 740, 820, 1420 e 1570μmol $m^{-2}s^{-1}$, seguindo o procedimento descrito por WALKER (1990). A fonte de luz utilizada foi a unidade LS2 (Hansatech), que proporciona luz de alta irradiância, com iluminação uniforme e de baixo aquecimento. Esta unidade é composta por uma lâmpada de arco de Xenônio (Osram, mod. HLX, 100 W), um espelho refletor de calor (que reduz o conteúdo de infravermelho na luz emitida), um sistema de lentes para produzir um feixe de luz com baixa variação de intensidade e divergência e duas aberturas para inserção de filtros ópticos. Na saída da unidade foi encaixada uma jaqueta acrílica pela qual circula água oriunda de um banho com controle termostático (MLW, modelo U2c), que proporciona controle mais preciso da temperatura na superfície da folha, no caso, 10 e 25°C. Para obtenção das DFF desejadas, foram utilizadas combinações de filtros ópticos de densidade neutra (densidade óticas de 0.1, 0.3, 0.6 e 1, fornecidos pela Hansatech). A determinação destas intensidades foi feita por meio de um quantômetro (Li-Cor, modelo LI 188), com sensor encostado na jaqueta acrílica.

Em seguida, foi feita a calibração do eletrodo e a determinação do volume útil da câmara para cada disco foliar utilizado. O disco foi retirado da folha do terceiro nó do

caule a partir do ápice da planta e sua área foi aferida por meio do medidor de área foliar.

O disco foliar foi acondicionado na câmara (previamente preparada pela adição da solução tampão) e mantido no escuro por 5 a 10 minutos até a obtenção de uma taxa respiratória constante, quando então foi exposto às DFF crescentes. Os filtros foram trocados em intervalos de tempo constantes (5 minutos), após a estabilização da taxa de liberação de oxigênio. O disco de feltro umedecido com o tampão foi substituído a cada duas trocas de filtro.

A taxa de liberação de oxigênio foi calculada para cada DFF utilizada, após essa ser corrigida para a DFF absorvida pelas folhas. A absorção (A) da DFF pelas folhas das duas espécies de eucalipto foi calculada por meio da equação: A(%) = 100-(T+R), onde T corresponde à transmitância e R à reflectância dessas. As determinações do espectro de T e R de 400 a 700nm, em intervalos de 2nm, foram feitas com uma esfera integradora acoplada ao espectroradiômetro (Li-Cor, modelo LI 1800).

Os valores da taxa de liberação de oxigênio foram ajustados pela equação logística: $F = F_{máx}/(1+DFF_{1/2}\ \exp(V*DFF))$.

A eficiência (Φ) e exigência ($1/\Phi$) quânticas foram determinadas graficamente na porção linear da taxa *versus* DFF absorvido pelas folhas. O tratamento matemático dos dados permitiu estimar a taxa de fotossíntese máxima ($F_{máx}$), as densidades de fluxo de fótons necessárias para atingir metade do valor da fotossíntese máxima ($DFF_{1/2}$) e 99% do valor da fotossíntese máxima (DFF_{sat}), a respiração no escuro (RE) e o

fotossíntese máxima ($DFF_{1/2}$) e 99% do valor da fotossíntese máxima (DFF_{sat}), a respiração no escuro (RE) e o ponto de compensação luminoso (PCL) para as duas espécies de eucalipto nas duas condições de aclimatação. Na análise dos parâmetros da atividade fotossintética foram consideradas as médias de pelo menos três repetições.

3.4. Medidas por espectroscopia fotoacústica.

A técnica da espectroscopia fotoacústica permite avaliar a liberação de O_2 (componente bárica) e a liberação térmica (componente térmica) de uma folha (HAVAUX *et al.*, 1987). As medidas com essa técnica foram feitas utilizando configuração experimental esquematizada na figura 1, e previamente descrita por BARJA (1996). O aparelho possui duas fontes de luz: uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriel, mod. 6128, 1000W) e uma lâmpada de filamento de Tungstênio (Ushio/ELC, 250W). À frente da lâmpada de Xenônio foi colocado um modulador (*chopper*, PAR, mod. 192). Esse modulador abriga uma célula fotoelétrica responsável pelo sinal de referência da modulação. A fase do sinal fotoacústico foi estabelecida em relação a essa referência.

Para obter luz modulada no comprimento de onda necessário para as estimativas da liberação do oxigênio fotossintético (λ=680nm), foi empregado um monocromador (Oriel, mod. 77250). A abertura de fenda selecionada permitiu controlar a resolução de λ em $\pm$ 5nm. Filtros ópticos limitaram a luz emitida pela lâmpada de filamento à faixa visível do espectro e, além disso, foram utilizadas lentes e

extremidade oposta foi posicionada sobre a célula fotoacústica.

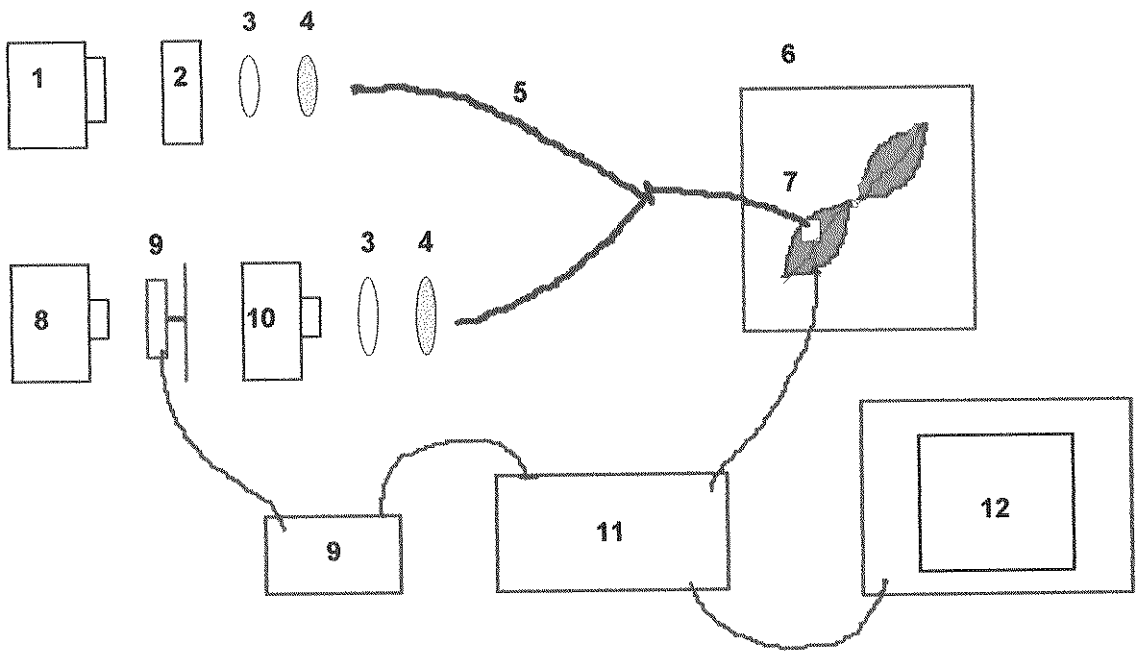


Figura 1. Esquema da montagem experimental para medidas fotoacústicas, onde: 1- lâmpada de Tungstênio, 2- filtro d'água, 3- lentes, 4- espelhos, 5- cabo óptico bifurcado, 6- porta amostra, 7- célula fotoacústica, 8- lâmpada de Xenônio, 9- modulador, 10- monocromador, 11- amplificador síncrono e 12- microcomputador.

O modulador e o microfone da célula fotoacústica foram conectados a um amplificador síncrono (*lock-in*, PAR-EG&G, mod. 5210) que, deste modo, recebe informações sobre a freqüência de referência e o sinal fotoacústico. O amplificador síncrono mede simultaneamente a amplitude e a defasagem do sinal do microfone em relação a referência fornecida pelo modulador, e é conectado (via GPIB) a um microcomputador para aquisição dos dados experimentais. No presente trabalho, após a incidência da luz de excitação, a

leitura do sinal fotoacústico foi efetuada a cada dois segundos.

Foi utilizada a célula fotoacústica aberta - OPC (figura 2), que substitui as células convencionais com vantagem, (BARJA, 1996). O detetor dos sinais fotoacústicos é um microfone comercial de eletreto, de fácil aquisição e boa sensibilidade (10mV/Pa).

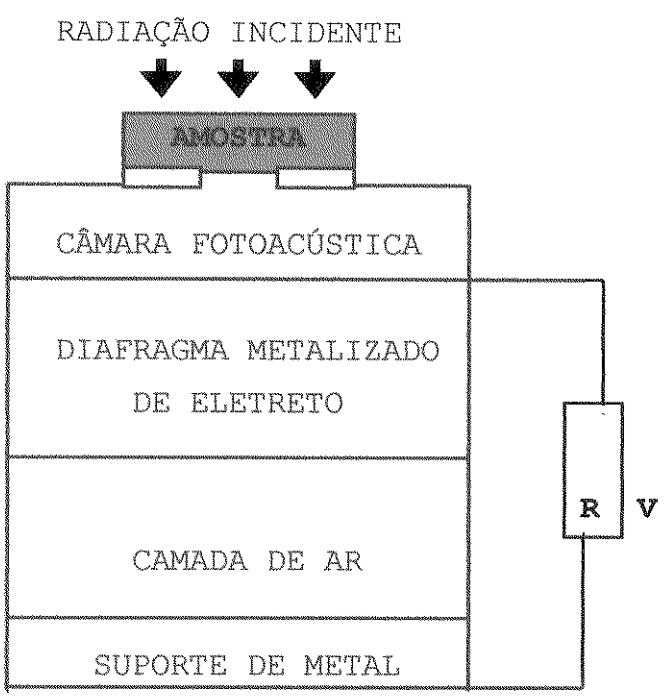


Figura 2. Representação esquemática da célula fotoacústica aberta.

A entrada de som é um orifício circular com diâmetro de 3mm e a câmara de ar adjacente à face metalizada da membrana tem 7mm de diâmetro e 1mm de espessura. Um resistor conecta a camada metálica da membrana à placa metálica de fundo. As oscilações de pressão na câmara de ar provocam deflexões na membrana que geram uma voltagem através de resistor. Esta

voltagem passa por um pré-amplificador FET interno ao microfone.

A principal vantagem da OPC é o fato da própria amostra vedar a câmara. Deste modo, a medida pode ser feita sem destacar a folha da planta, ou seja, torna-se possível realizar medidas *in vivo* e *in situ*. Para evitar vazamento de ar, o que comprometeria a precisão das medidas, foi utilizada graxa de silicone nas bordas da câmara para prender a amostra, vedando a câmara.

Outra característica considerada positiva refere-se à configuração da OPC que minimiza as alterações na atmosfera interna da câmara, pois trabalha-se com uma área amostral de $7mm^2$, permanecendo o restante da folha exposto ao exterior, mantendo a integridade da folha e o suprimento de CO_2 para a área amostral.

3.4.1. Atividade do fotossistema II.

A atividade do FS_{II}, sob o efeito da temperatura de aclimatação de 10 e 25°C, foi avaliada por medidas de fotoacústica em plantas com 60 DAS. Inicialmente foi feita a aferição das densidades de fluxo de fótons a 680nm - DFF_{680} (sem o uso do modulador) por meio do espectroradiômetro com o sensor encaixado na extremidade oposta do cabo óptico. As DFF_{680} de 44, 60, 76, 99, 120, 143, 170 e 180µmol $m^{-2}s^{-1}$, foram obtidas aumentando gradativamente a intensidade de corrente elétrica na fonte (de 15 a 35A). Os resultados dessa aferição demonstraram que o pico de emissão para todas as irradiâncias foi a 686nm.

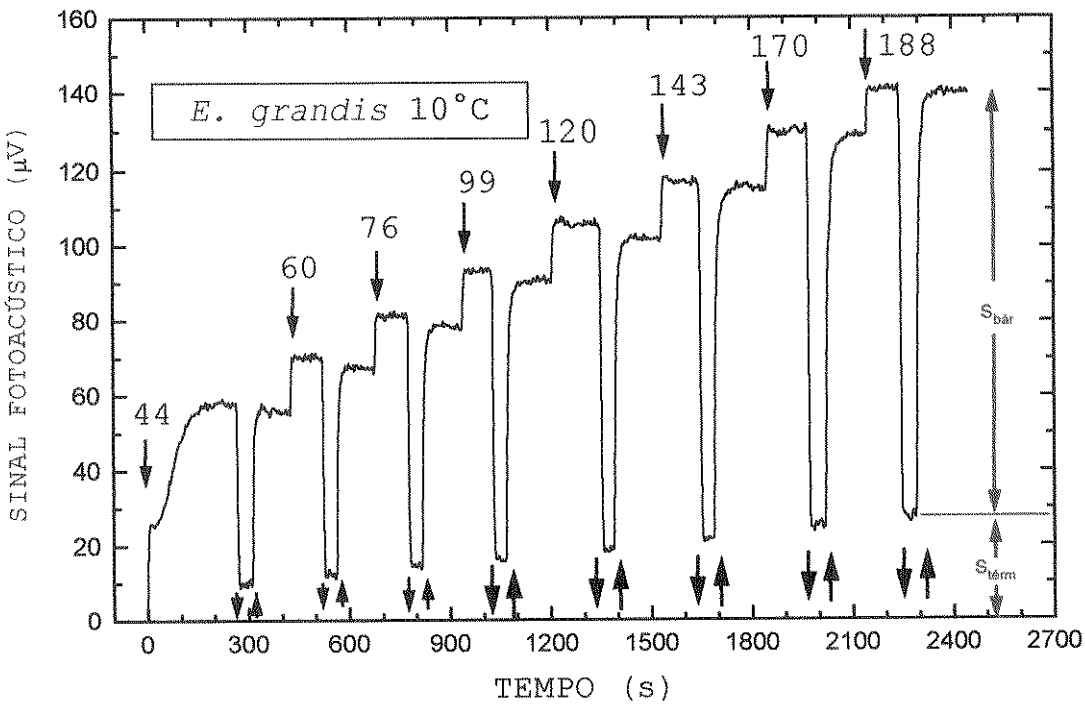


Figura 3. Curva experimental de saturação do fotossistema II. Os números e setas na porção superior da curva indicam o momento em que se aumentou, e para quanto (de 44 até 60μmol $m^{-2}s^{-1}$, p.ex.) a DFF a 680nm. As setas na porção inferior da curva indicam o momento em que a luz de saturação (2150μmol $m^{-2}s^{-1}$) foi ligada (seta para baixo), e desligada (seta para cima), para a obtenção da componente térmica ($S_{térm}$).

Em seguida, sob condições de escuro e com auxílio de uma luz verde, a folha do terceiro nó do caule foi fixada sobre a célula fotoacústica e foi iniciada a indução fotossintética, partindo-se da menor DFF, para obtenção da curva de saturação. Essa foi obtida aumentando-se gradativamente a DFF, sempre na freqüência de modulação de 17Hz, e observando, após a estabilização do sinal fotoacústico e com auxílio da

incidência da luz saturante de 2150μmol $m^{-2}s^{-1}$ (efeito negativo), a respectiva componente bárica (POULET *et al.*, 1983). Paralelamente, o efeito negativo permitiu medir a componente térmica do sinal fotoacústico correspondente, em função da DFF utilizada. O procedimento para obtenção da curva experimental de saturação encontra-se ilustrado na figura 3.

A curva da atividade fotossintética a 680nm foi obtida eliminando-se da curva experimental, a cada DFF_{680}, a respectiva componente térmica. Esse procedimento permitiu a obtenção de duas curvas: a do sinal fotobárico (atividade fotossintética) e a do sinal fototérmico (dissipação térmica). Posteriormente, essas curvas foram ajustadas para a DFF_{680} absorvida pela folha das duas espécies de eucalipto, segundo resultados de absorção a 680nm obtidos no experimento 3.3.1. (A_{680} = 93%).

Para a obtenção do sinal fototérmico devido apenas às folhas, deve-se descontar do sinal térmico final aquele devido à membrana do microfone. A magnitude do sinal térmico da membrana é diretamente proporcional à intensidade da luz de excitação e à transmitância da folha no comprimento de onda da luz incidente (BRAJA & MANSANARES, 1998). No presente trabalho, a magnitude do sinal térmico devido à membrana para a incidência de DFF_{680} de 46 μmol $m^{-2}s^{-1}$, na freqüência de modulação de 17Hz, em *E. urophylla* foi de 2μV e, em *E. grandis*, foi de 1μV.

Para esse experimento, foram consideradas as médias de pelo menos cinco repetições para as duas espécies de eucalipto aclimatadas nas duas temperaturas.

3.4.2. Tratamento fotoinibitório

A técnica de espectroscopia fotoacústica foi utilizada para avaliação dos efeitos do tratamento fotoinibitório nas duas espécies de eucalipto.

As medidas foram conduzidas em folhas expostas a luz modulada a 17Hz, 680nm e DFF de 46μmol $m^{-2}s^{-1}$. As determinações permitiram identificar três fases distintas do processo: 1) indução da fotossíntese; 2) tratamento fotoinibitório; 3) recuperação da fotossíntese (figura 4).

a) Indução da fotossíntese

Os experimentos com tratamento fotoinibitório utilizaram mudas de eucalipto, de 50 a 60 DAS, aclimatadas a 10 e 25°C, no escuro, por cerca de 15 horas. As condições de aclimatação foram semelhantes às do item 3.3.1. Estudos preliminares demonstraram que plantas de eucalipto aclimatadas no escuro por períodos superiores a três horas apresentaram comportamentos de indução fotossintética semelhantes.

Após a aclimatação, ainda sob condições de escuro, e com auxílio de uma luz verde, a folha do terceiro nó foi fixada sobre a célula fotoacústica para o início da indução fotossintética. A aquisição do sinal fotoacústico foi acompanhada até atingir um estado estacionário, que correspondeu ao tempo de indução fotossintética até plena

liberação de oxigênio. Quando o estado estacionário foi atingido, deu-se início ao tratamento fotoinibitório.

Para obtenção das curvas de indução, foram consideradas as médias de cerca de 25 repetições. Nessas curvas, os parâmetros determinados foram: sinal máximo inicial ($S_{máx}^{ini}$), tempo para atingir o sinal máximo inicial ($TS_{máx}^{ini}$), sinal mínimo (S_{min}), tempo para atingir o sinal mínimo (TS_{min}), sinal máximo ($S_{máx}$), tempo para atingir sinal máximo ($TS_{máx}$), amplitude do sinal (ΔS), amplitude de tempo (ΔT), a taxa de variação do sinal fotoacústico ($\Delta S/\Delta T$) e o tempo demandado para atingir metade do valor de equilíbrio ($T_{1/2}$), conforme indicados na figura 4. O tempo para atingir o sinal máximo foi obtido por extrapolação gráfica, considerando com $S_{máx}$ o ponto inicial do estado de equilíbrio. Após as curvas de indução terem atingido o estado estacionário, foram isolados e quantificados os sinais fototérmico ($S_{térm}$) e fotobárico ($S_{bár}$) por meio da incidência da luz de saturação.

b) Tratamento fotoinibitório

O tratamento fotoinibitório consistiu em expor as mudas de eucalipto à DFF de 500, 1000, 1500, 2500 e 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ por 15 minutos. A adoção de 15 minutos como tempo de exposição se deu após várias medidas preliminares, nas quais se constatou que este foi um tempo de exposição suficiente para a ocorrência de fotoinibição.

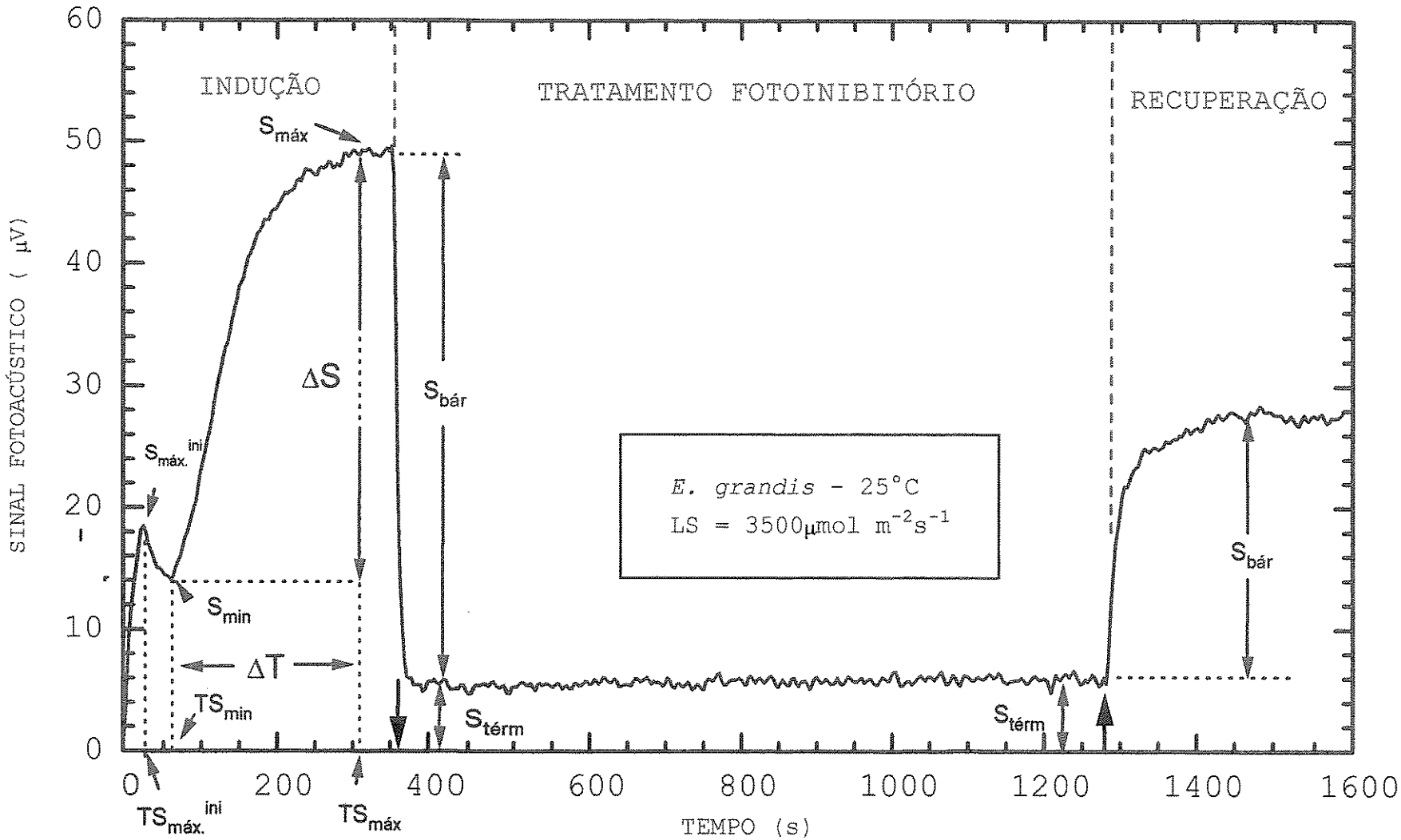


Figura 4. Curva experimental típica para estudo de fotoinibição. Seta preta para baixo indica o momento em que a luz de saturação (LS) foi ligada; para cima, o momento em que foi desligada. Setas azuis indicam os atributos do sinal fotoacústico avaliados nas três fases distintas do processo.

O tratamento fotoinibitório, induzido por luz fotossinteticamente saturante, eliminou a componente bárica referente à evolução modulada do oxigênio. Com isso, o sinal fotoacústico sofreu um imediato decréscimo, chamado de efeito negativo (EN), conforme pode ser observado na figura 4.

O efeito negativo é definido por: $EN = (S_+ - S_-)/S_+$, onde S_- é o sinal fotoacústico na ausência da luz de saturação e S_+, na presença da luz de saturação. Esse efeito avalia o oxigênio evoluído na fotossíntese, descontando-se a dissipação térmica (efeito fototérmico) do sinal fotoacústico. Tal procedimento foi adotado para determinar o $S_{bár}$ antes e depois do tratamento fotoinibitório.

c) Recuperação da fotossíntese

Ao término do período de 15 minutos de exposição a luz saturante, essa foi desligada e foi observada a recuperação do sinal fotoacústico (componente fotobárica). A fotoinibição foi caracterizada quando esse $S_{bár}$ pós-luz saturante não retornou ao valor encontrado antes da incidência da referida luz saturante (figura 4). Para essas determinações foram consideradas médias de cinco repetições para cada espécie de eucalipto aclimatada nas duas temperaturas, sendo os resultados expressos em porcentagem de recuperação do $S_{bár}$ inicial.

3.5. Medidas da fluorescência da clorofila a

As determinações foram feitas utilizando-se o detetor de fluorescência Hansatech Ltd., modelo Plant Efficiency

Analyser (PEA), com fonte de luz composta por seis diodos emitindo luz de alta intensidade (LEDs). O valor da DFF máxima, obtida por meio de um espectroradiômetro (Li-Cor, modelo LI 1800), foi de 462μmol $m^{-2}s^{-1}$, com pico de emissão em 666nm (figura 5).

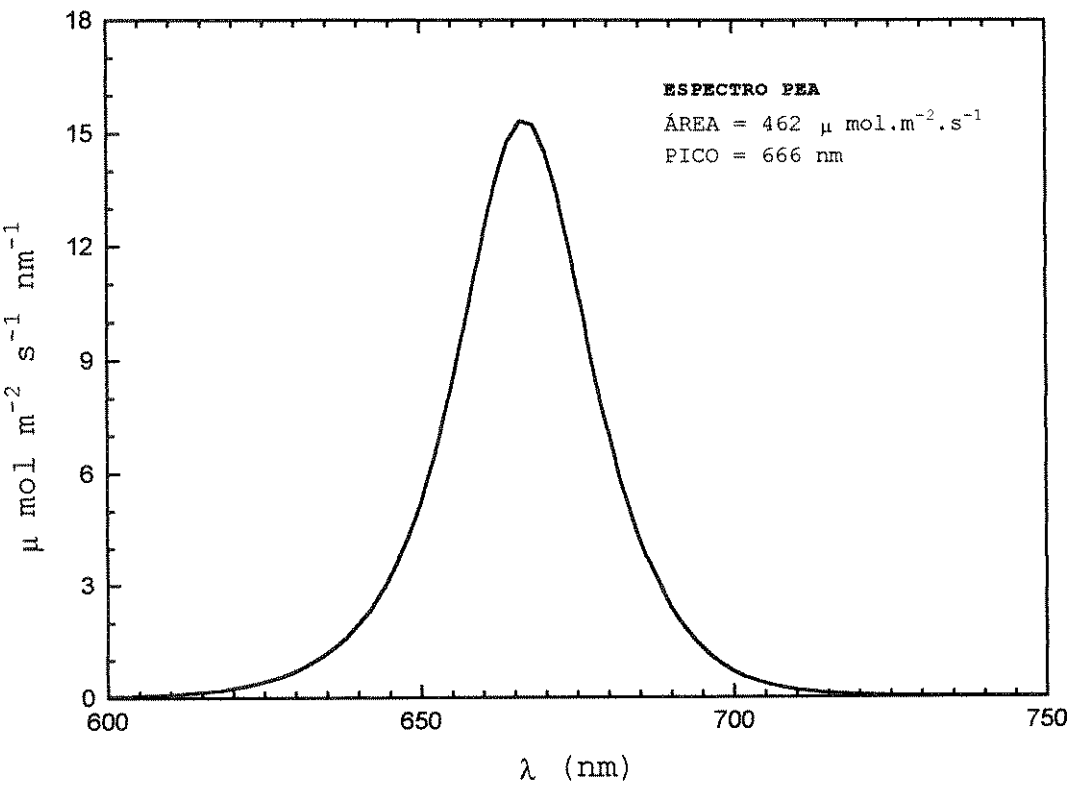


Figura 5. Espectro e densidade da luz emitida pelos LEDs do Plant Efficiency Analyser ajustado para 100% da intensidade de emissão.

O detetor de fluorescência permite determinações *in vivo* e *in situ*, pois, além de portátil, ele possui uma presilha plástica leve e pequena que se fixa na folha da planta. Essa presilha possui uma pequena lâmina móvel que permite fechar a área foliar exposta (12,6mm^2), possibilitando a adaptação

desta ao escuro. Além disso, a presilha possui um anel para o encaixe da unidade sensora.

A unidade sensora é composta, além do conjunto de LEDs, por um circuito óptico de realimentação (que monitora e corrige mudanças na intensidade de emissão dos LEDs, compensando, também, alterações causadas pela variação na temperatura ambiente) e por um detetor da fluorescência emitida (fotodiodo), associado a um circuito amplificador. O desenho óptico da unidade sensora e a presença de filtros garantem que essa irá responder maximamente ao sinal de fluorescência emitida em comprimentos de onda longos (acima de 740nm) e bloqueiam a absorção de comprimentos de onda curtos emitidos pelos LEDs.

A unidade sensora é conectada a um microprocessador, onde o sinal de fluorescência registrado é digitalizado por um conversor analógico/digital, a uma taxa de 10^5 leituras/ segundo nos primeiros 2 milisegundos de registro, após os quais a aquisição passa a ser de 10^3 leituras/segundo até 1 segundo, quando, então, se reduz a 10 leituras/segundo até o tempo final de registro estipulado. O microprocessador permite ajustar o tempo de registro do sinal de fluorescência, a intensidade de emissão de luz e a forma de armazenamento do sinal (parâmetros ou dados).

Todas as funções do instrumento estão sob o controle de um programa (versão P02.002) armazenado permanentemente na EPROM, que também calcula automaticamente, para a intensidade de luz usada durante a medida, os parâmetros básicos da fluorescência: fluorescência inicial - Fo, máxima - Fm,

UNICAMP

variável - Fv, a relação Fv/Fm, o tempo em que ocorreu a fluorescência máxima (TFm) e a área sobre a curva de fluorescência entre Fo e Fm (figura 6). Estes parâmetros (e/ou dados) são armazenados no instrumento, sendo posteriormente transferidos para um microcomputador por meio de um cabo serial (RS232C), onde são analisados com o auxílio de um programa específico (Data Transfer Software - Hansatech).

Em adição, o programa permite logaritmizar a escala de tempo de aquisição do sinal de fluorescência. Com esse recurso, é possível visualizar os passos intermediários J e I no transiente de fluorescência entre a inicial (Fo ou O) e a máxima (Fm ou P), seguindo os procedimentos descritos por SRIVASTAVA *et al.* (1995).

Quando folhas pré adaptadas ao escuro são iluminadas, há um rápido aumento na fluorescência para um nível denominado de O ou Fo. Esse nível é atingido quando a luz é absorvida pelas clorofilas **a** da antena, sem que a energia de excitação resultante tenha sido transferida para o centro de reação do FS_{II} (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993). Segundo SRIVASTAVA *et al.* (1995), o valor da fluorescência inicial (Fo) é obtido aos 40 μs após a incidência da luz de saturação (To), eliminando-se, assim, artifícios eletrônicos do instrumento.

Sob irradiância de alta intensidade, a fluorescência aumenta, partindo de Fo, passando pelos níveis intermediários J e I, e atingindo o valor máximo P ou Fm (figura 7). Esse aumento reflete um incremento gradual na produção de fluorescência pela clorofila, com concomitante redução na

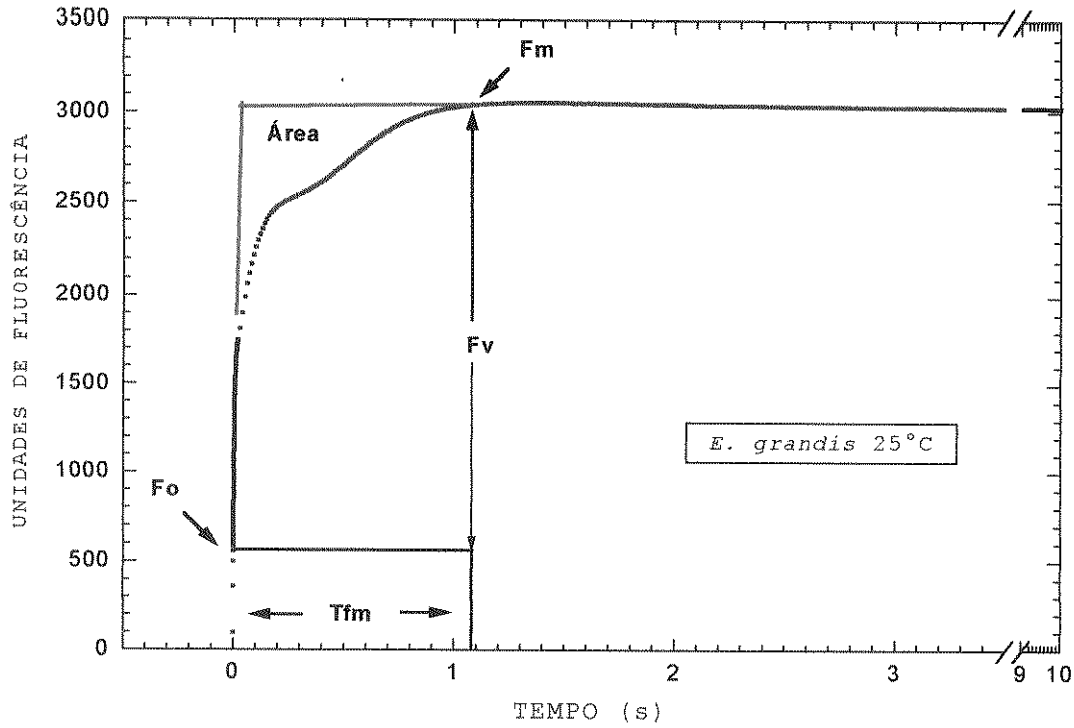


Figura 6. Transientes da fluorescência da clorofila **a** de *E. grandis* a 25°C obtidos na escala linear de tempo.

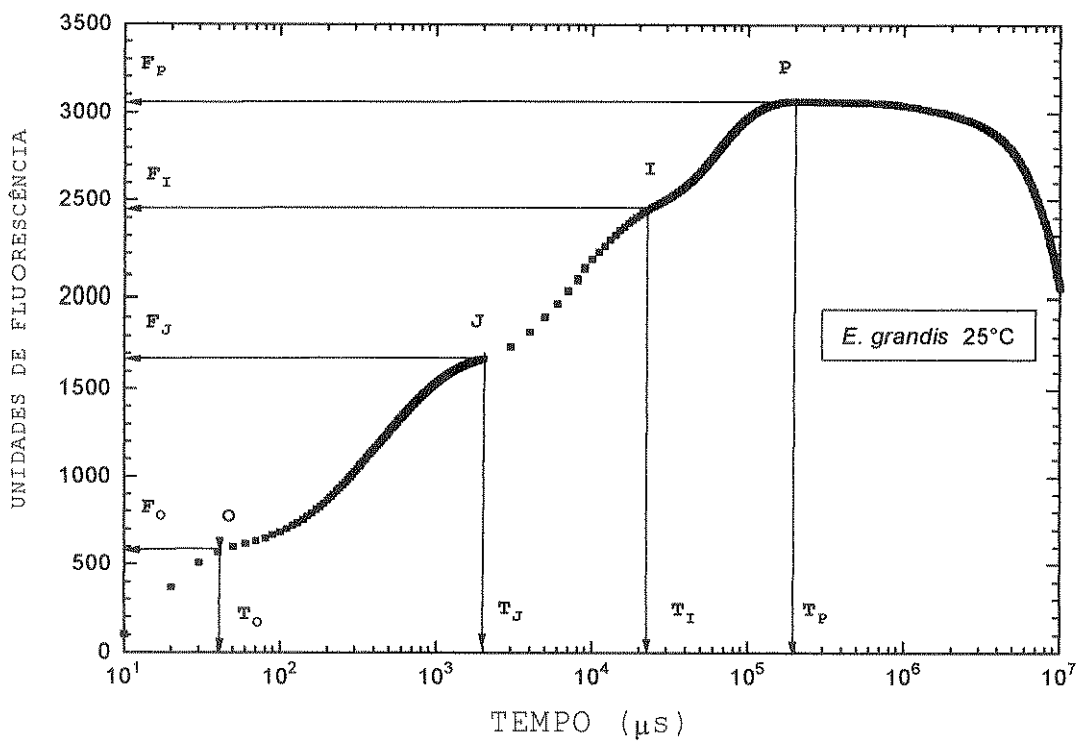


Figura 7. Transientes da fluorescência da clorofila **a** de *E. grandis* a 25°C obtidos na escala logarítmica de tempo.

taxa fotoquímica (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993). Os níveis intermediárias J e I, também denominados de Fj e Fi, são inflexões na curva de indução na escala logarítmica de tempo, representando um estado quase estacionário da emissão de fluorescência, e estão relacionados não apenas a redução de Qa mas, também, a heterogeneidade do reservatório de plastoquinona (PQ) (GOVINDJEE, 1995; SRIVASTAVA *et al.*, 1995).

O nível P (Fp) corresponde ao valor da fluorescência máxima (Fm) obtida no tempo Tp (ou TFm) na escala logarítmica ou linear, respectivamente (figura 7). Em Fm, se a intensidade de luz for suficientemente alta, todos os centros de reação se fecham e a fluorescência atinge seu nível máximo, sem que haja participação fotoquímica (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993; GOVINDJEE, 1995).

A fluorescência variável (Fv), eqüivale ao aumento de Fo para Fm e é função da concentração de Qa^- (OTTANDER *et al.*, 1993). A razão Fv/Fm possui uma variação típica de 0,75 a 0,85 e é uma medida do potencial máximo da eficiência quântica fotoquímica do FS_{II} (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993).

A área sobre a curva, entre Fo e Fm (figura 6), é proporcional ao tamanho do reservatório dos aceitadores de elétrons no lado redutor do FS_{II} (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993).

Para complementar o estudo da cinética da indução da fluorescência, foram calculados os parâmetros: Fj-->Fi e Fi--

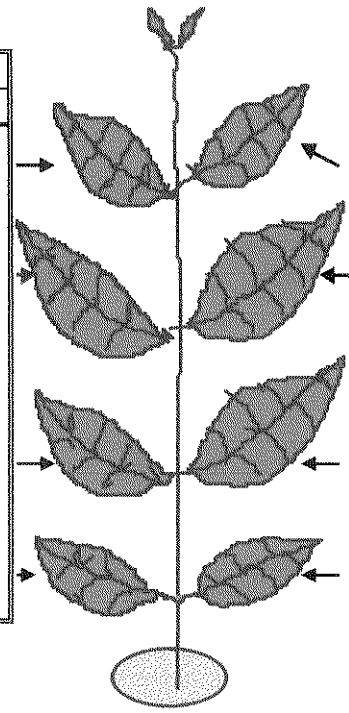
>Fp, que correspondem a velocidade de transição entre os níveis J, I e P.

3.5.1. Padronização das medidas

Para padronização das medidas de fluorescência foi considerada apenas a relação Fv/Fm, obtida durante 5 segundos de exposição a 100% da intensidade de luz emitida pelos LEDs (462μmol $m^{-2}s^{-1}$), em plantas adaptadas ao escuro por 30 minutos a 25°C, seguindo as instruções contidas no manual de operação do PEA. Em todos os procedimentos, foram utilizadas as médias de pelo menos três repetições para as duas espécies de eucalipto estudadas.

Inicialmente, foi avaliado o comportamento deste parâmetro no perfil das plantas que se encontravam com 60 e 75 dias de idade, ou seja, no par de folhas opostas provenientes do primeiro ao quarto nó do caule. A figura 8 mostra que tanto para as espécies *E. grandis* como para *E. urophylla*, com 60 e 75 dias de idade, o maior valor da relação Fv/Fm foi obtido nos segundos e terceiros pares de folhas a partir da gema apical, sendo esses, também, os que apresentaram menor variabilidade. Não se constatou diferença no valor de Fv/Fm entre as folhas opostas. Os dados mostram uma tendência de maiores valores de Fv/Fm em plantas com 60 dias de idade, comparadas com as de 75 dias e de maiores valores em plantas de E. *urophylla* quando comparadas as de *E. grandis*, independentemente do par de folhas analisado. Não foi observada diferença no valor de Fv/Fm quanto à posição de

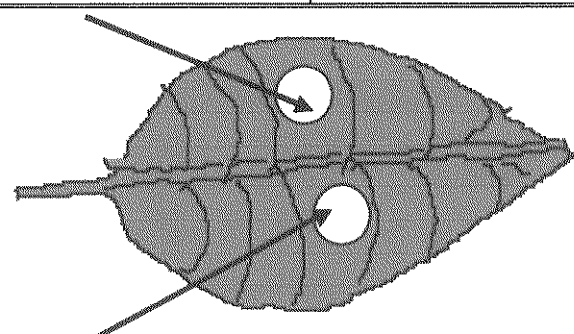
E. urophylla		*E. grandis*	
60DAS	75DAS	60DAS	75DAS
0,825± 0,021	0,786± 0,029	0,805± 0,030	0,723± 0,085
0,831± 0,010	0,801± 0,028	0,824± 0,007	0,798± 0,004
0,829± 0,008	0,792± 0,021	0,831± 0,010	0,797± 0,002
0,813± 0,025	0,779± 0,031	0,824± 0,024	0,775± 0,033



E. grandis		*E. urophylla*	
60DAS	75DAS	60DAS	75DAS
0,808± 0,023	0,722± 0,088	0,821± 0,023	0,787± 0,026
0,829± 0,005	0,782± 0,024	0,840± 0,015	0,796± 0,021
0,839± 0,007	0,790± 0,002	0,832± 0,004	0,801± 0,016
0,824± 0,020	0,775± 0,035	0,813± 0,023	0,790± 0,037

Figura 8. Valores da relação Fv/Fm obtidos no perfil de plantas de *E. grandis* e *E. urophylla* aos 60 e 75 dias após a semeadura (DAS). Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

E. urophylla		*E. grandis*	
2°Nó	3°Nó	2°Nó	3°Nó
0,830±0,004	0,840±0,004	0,823±0,006	0,832±0,008



E. urophylla		*E. grandis*	
2°Nó	3°Nó	2°Nó	3°Nó
0,827±0,004	0,839±0,007	0,826±0,002	0,830±0,005

Figura 9. Valores da relação Fv/Fm obtidos nos lados direito e esquerdo da nervura principal das folhas do 2° e 3° nó de plantas de *E. grandis* e *E. urophylla* aos 60 dias após a semeadura. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

fixação da presilha na lâmina das folhas do segundo e terceiro nós (lado direito e esquerdo da nervura principal) (figura 9).

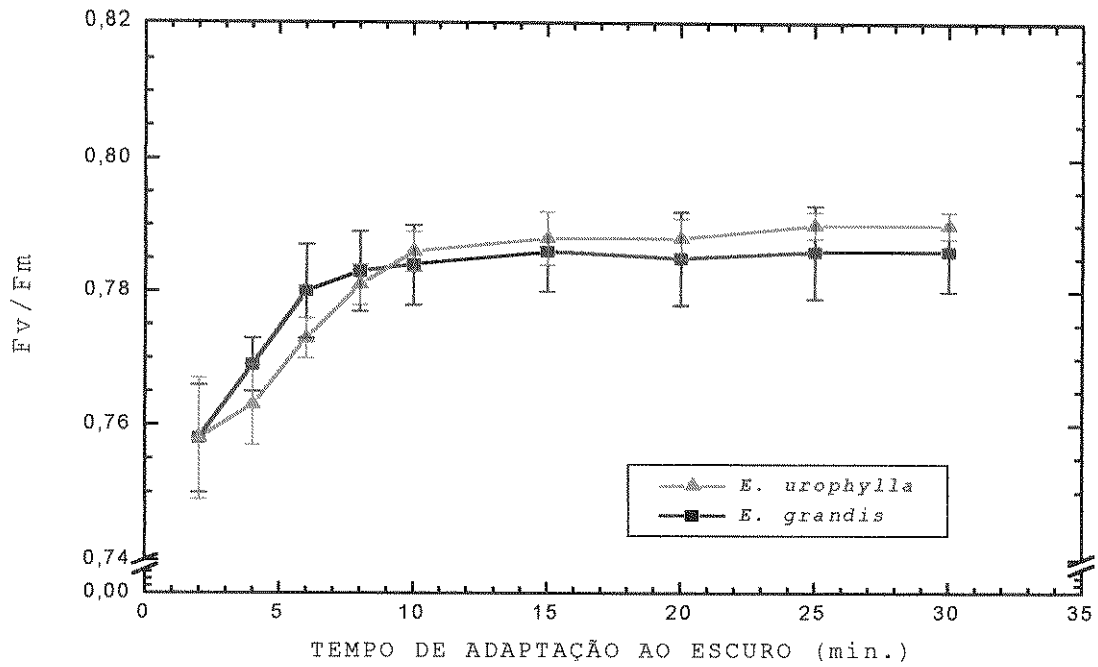


Figura 10. Efeito do tempo de adaptação ao escuro sobre os valores da relação Fv/Fm em plantas de *E. grandis* e *E. urophylla* aos 60 dias após a semeadura. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

A partir da obtenção desses resultados preliminares, ficou determinada a fixação da presilha nas folhas do terceiro nó, independentemente da folha e da posição da presilha na folha. Esse procedimento foi adotado para todos os ensaios de fluorescência.

As medidas seguintes objetivaram definir o tempo de adaptação das plantas ao escuro. Para tanto, as plantas permaneceram por 12 horas expostas ao sol previamente à fixação das presilhas nas folhas anteriormente selecionadas.

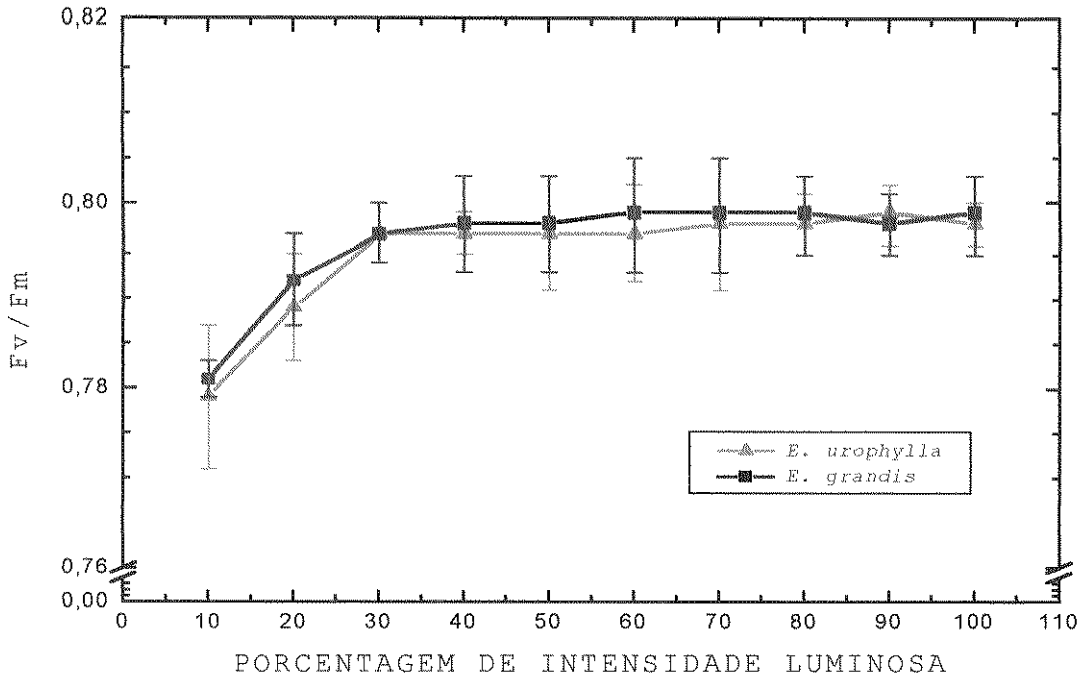


Figura 11. Efeito da intensidade luminosa (porcentagem de luz emitida pelos LEDs, onde 100% = 462 μmol $m^{-2}s^{-1}$) sobre os valores da relação Fv/Fm em plantas de *E. grandis* e *E. urophylla* aos 60 dias após a semeadura. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

Os valores de Fv/Fm foram determinados nos intervalos de tempo de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a fixação das presilhas nas folhas. Pela figura 10 pode-se observar que o valor de Fv/Fm para os diferentes tempos de adaptação das plantas ao escuro passou a ser constante a partir de 8 minutos de adaptação para *E. grandis* e a partir de 10 minutos para *E. urophylla*. A partir deste resultado, foi adotado 15 minutos como o tempo mínimo de adaptação das duas espécies ao escuro para todos os ensaios de fluorescência.

A padronização seguinte objetivou determinar o nível de luz de saturação. Para essa determinação, as plantas foram previamente adaptadas ao escuro por 15 minutos e, em seguida, expostas de 10 a 100%, em intervalos de 10%, da intensidade de luz máxima emitida pelos LEDs (DFF de 462μmol $m^{-2}s^{-1}$). Observou-se que a partir de 30% da intensidade máxima de luz, as folhas das duas espécies de eucalipto encontravam-se saturadas (figura 11). Assim sendo, adotou-se 100% como nível de luz de saturação para todos os ensaios de fluorescência, seguindo instruções de operação contidas no manual de operação do PEA.

3.5.2. Efeito da temperatura na cinética de indução da fluorescência

As plantas de eucalipto com 60 dias de idade foram transferidas para câmaras termo-reguladas (Fanem, mod. CDG) ajustadas para 15 e 30°C, fotoperíodo de 12 horas e DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$ na altura das plantas (medida com quantômetro Li-Cor, modelo LI-1600). As plantas foram colocadas nas câmaras às 18 horas, no início do período de escuro, e após 11, 24, 36, 48 e 60 horas foram realizadas as medidas de fluorescência. Os parâmetros de fluorescência analisados, na escala linear de tempo, foram: Fo, Fm, Fv, Fv/Fm e TFm.

Um segundo experimento foi realizado para estudar o comportamento da relação Fv/Fm das duas espécies adaptadas às temperaturas de 10, 15, 25 e 30°C. As plantas foram colocadas nas câmaras termo-reguladas, ajustadas para essas temperaturas, e deixadas para adaptação por 12 horas no

escuro antes das medidas de Fv/Fm. Ao final dos tratamentos nas diferentes temperaturas, as plantas foram expostas a uma DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$ por um período de duas horas, após o qual obteve-se novos valores de Fv/Fm.

3.5.3. Efeito da DFF na cinética de indução da fluorescência, sob duas temperaturas.

Plantas das duas espécies de eucalipto foram colocadas nas câmaras termo-reguladas ajustadas a 10 e 25°C, e deixadas para adaptação por 12 horas no escuro. Ao término deste período, foram realizadas as medidas de fluorescência e, em seguida, as plantas foram expostas às DFF de 500, 1000, 2000, 2500 e 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, por 15 minutos, após os quais foram realizadas novas medidas de fluorescência. Após as determinações, as plantas voltaram para as câmaras onde permaneceram por mais 12 horas no escuro, quando, então, foram feitas novas medidas de fluorescência para verificar a recuperação das plantas ao estresse de temperatura e irradiância. As medidas de fluorescência foram sempre realizadas no mesmo local de uma mesma folha, sendo este demarcado com tinta nanquim. Neste ensaio, foram analisados os parâmetros de fluorescência obtidos nas escalas linear e logarítmica do tempo de aquisição, conforme descritos no item 3.5., sendo a recuperação determinada apenas pela relação Fv/Fm.

A fonte de luz utilizada foi a unidade LS2 (Hansatech), já descrita anteriormente no item 3.3.1. Para obtenção das densidades de fluxo de fótons utilizadas neste ensaio foram

utilizadas combinações de filtros ópticos de densidade neutra, sendo a calibração feita com quantômetro (Li Cor, modelo LI 1600) encostado na jaqueta acrílica, reproduzindo o posicionamento da folha utilizado durante o tempo de exposição à luz. O controle da temperatura da superfície da folha durante a exposição foi feito com o termopar do porômetro de difusão (Li Cor, modelo LI 1600) em contato com a superfície adaxial da folha, no ponto de incidência da luz.

4. RESULTADOS

4.1. Padrão de crescimento das plantas

Na figura 12 pode-se observar que as duas espécies de eucalipto apresentaram a mesma altura até os 90 dias após a semeadura (DAS), após os quais as plantas de *E. grandis* se sobressaíram como as mais altas (8,4%, em média). No período de 75 aos 105 DAS, as duas espécies de eucalipto apresentaram maior taxa de crescimento absoluto (TCA) em altura quando comparada a das épocas anteriores, principalmente *E. grandis* no período de 90 a 105 DAS (tabela 1). Nesse período, a TCA de *E. grandis* foi maior que a de *E. urophylla*. Aos 120 DAS as duas espécies demonstraram tendência de estabilização no crescimento em altura.

Tabela 1. Taxa de crescimento absoluto em altura e área foliar de plantas de *E. urophylla* e *E. grandis*. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

ÉPOCAS (DAS)	Altura ($cm.dia^{-1}$)	Área foliar ($dm^2.dia^{-1}$)
	E. urophylla	
45-60	0,36±0,006	0,034±0,003
60-75	0,12±0,003	0,003±0,001
75-90	0,57±0,007	0,043±0,005
90-105	0,76±0,003	0,034±0,003
105-120	0,27±0,004	0,023±0,003
	E. grandis	
45-60	0,40±0,003	0,014±0,002
60-75	0,13±0,002	0,016±0,003
75-90	0,46±0,002	0,048±0,004
90-105	1,17±0,007	0,037±0,003
105-120	0,34±0,003	0,024±0,002

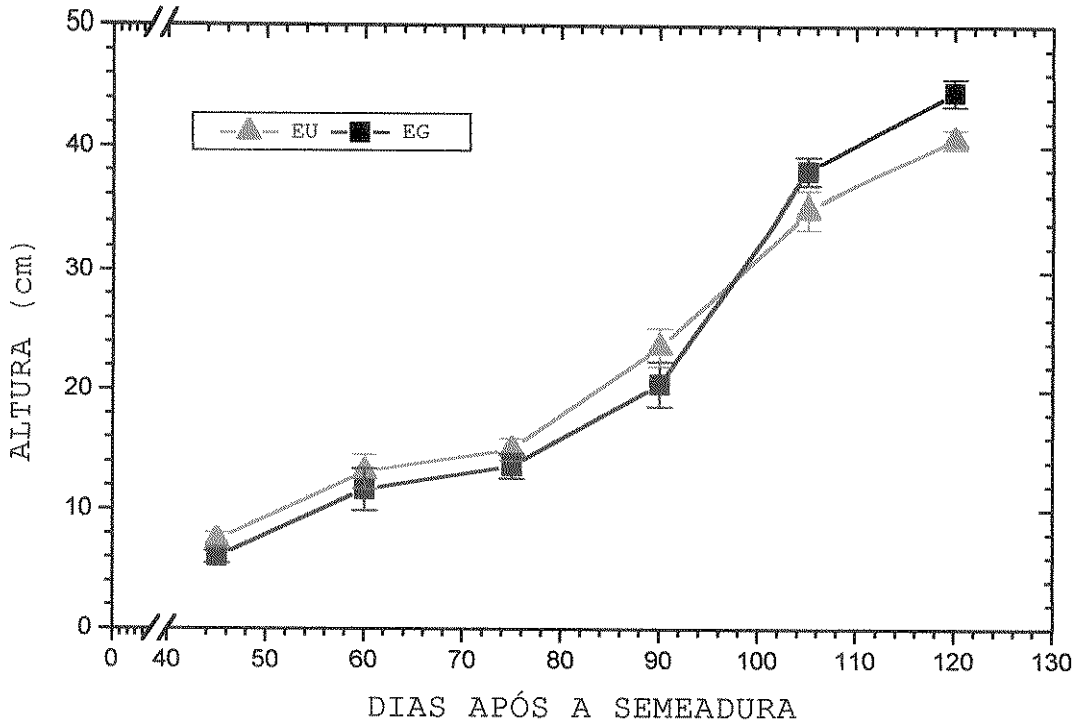


Figura 12. Altura das plantas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos 3 repetições ± desvio padrão.

Já a partir dos 45 DAS as plantas de *E. urophylla* possuíam maior área foliar do que as plantas de *E. grandis* e esse comportamento se manteve até os 120 DAS, período esse em que a área foliar dessa espécie foi 24,6% maior que a de *E. grandis* (figura 13). As duas espécies de eucalipto apresentaram maior TCA em área foliar no período de 75 aos 90 DAS (tabela 1). A TCA de *E. urophylla* foi maior que a de *E. grandis* no período de 45 aos 60 DAS, enquanto no período de 60 aos 75 DAS ocorreu o inverso. Nas demais épocas de avaliação não foi constatada diferença entre as espécies quanto à TCA em área foliar.

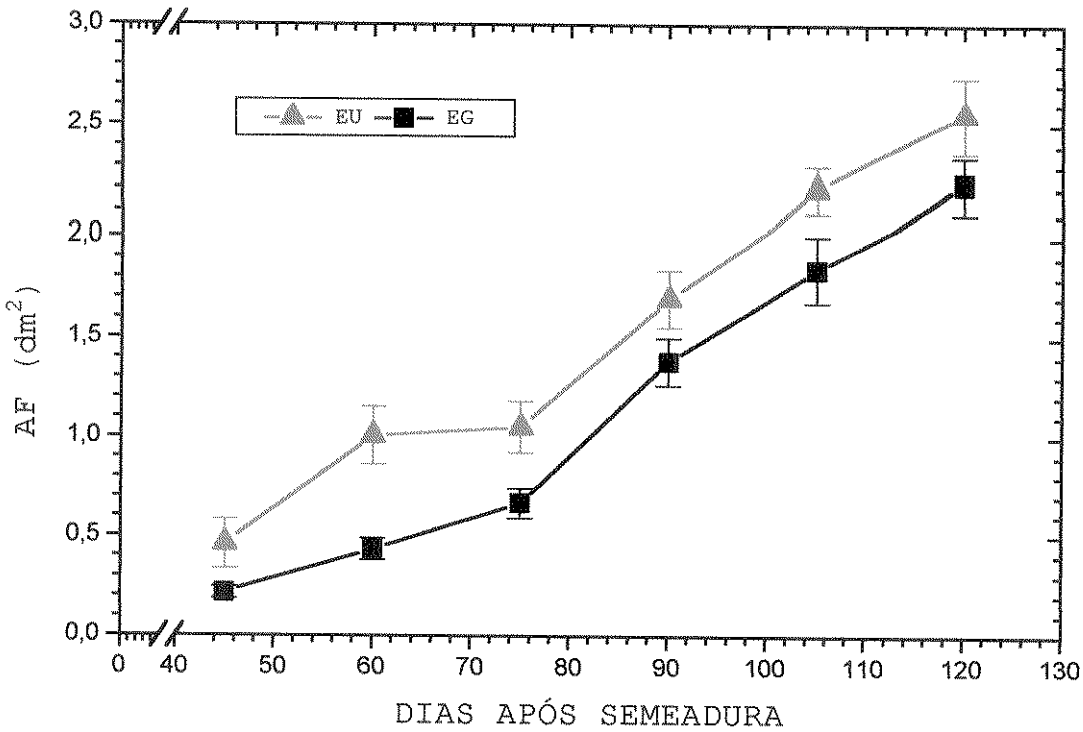


Figura 13. Área foliar de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos 3 repetições ± desvio padrão.

O conteúdo de clor **a** nas folhas de *E. grandis* foi 14,9% superior ao das folhas de *E. urophylla* dos 45 aos 120 DAS (figura 14). Com relação as épocas de avaliação, foi observado que o conteúdo de clor **a** nas folhas das duas espécies de eucalipto aos 45 DAS foi superior (36,2%, em média) ao determinado nas demais épocas. Para *E. urophylla*, o conteúdo de clor **a** manteve-se praticamente constante em 0,843mg.gMF^{-1} a partir dos 60 DAS, enquanto para *E. grandis* o conteúdo de clor **a** manteve-se constante em 0,953mg.gMF^{-1} a partir dos 75 DAS.

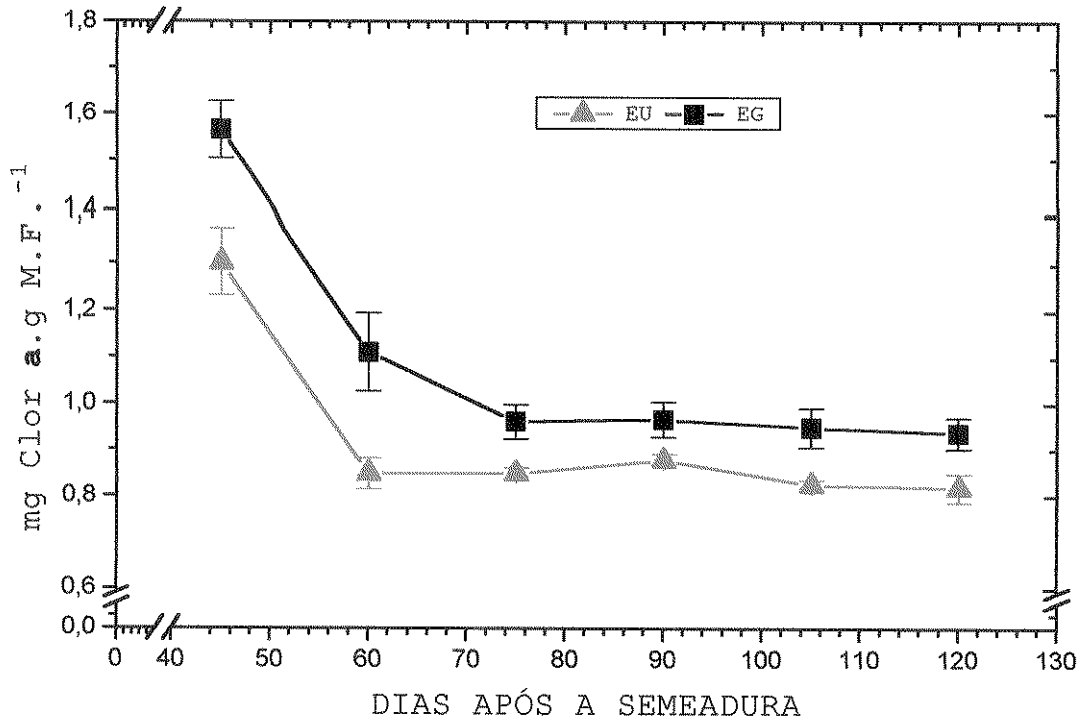


Figura 14. Conteúdo de clorofila **a** nas folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos 3 repetições ± desvio padrão.

Para o conteúdo de clor **b**, os resultados obtidos foram semelhantes aos da clor **a** (figura 15). As folhas de *E. grandis* apresentaram maior conteúdo de clor **b** do que as de *E. urophylla*, sendo que aos 45 DAS a diferença entre espécies foi de 25% e dos 60 aos 120 DAS foi de 14%, em média. As duas espécies de eucalipto apresentaram maior conteúdo de clor **b** aos 45 DAS (42,0%, em média), quando comparado ao determinado nas demais épocas de avaliação. O conteúdo de clor **b** nas folhas de *E. grandis* manteve-se constante em 0,462mg.gMF^{-1} dos 60 aos 120 DAS, enquanto, para *E. urophylla*, o conteúdo de

clor **b** manteve-se constante em 0,431mg.gMF^{-1} no período de 75 aos 90 DAS e em 0,367mg.gMF^{-1} no período de 105 aos 120 DAS.

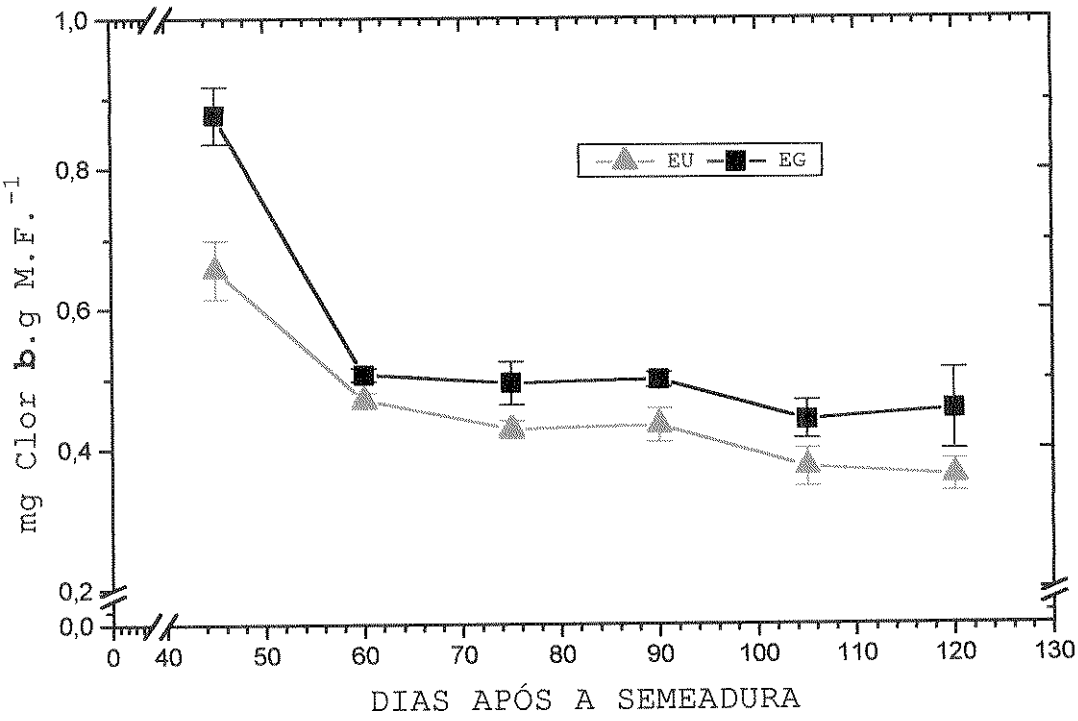


Figura 15. Conteúdo de clorofila **b** nas folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

O conteúdo de clor **t** apresentou mesmo comportamento relatado para clor **a** e clor **b** (figura 16). O conteúdo de clor **t** nas folhas de *E. grandis* foi 20% superior ao das folhas de *E. urophylla* aos 45 DAS e 14% superior no período de 60 aos 120DAS. Aos 45 DAS o conteúdo de clor **t** nas folhas das duas espécies de eucalipto foi superior ao determinado nas demais épocas de avaliação (39,3%, em média), sendo que a partir dos 60 DAS o conteúdo manteve-se constante em 1,419mg.gMF^{-1} para *E. grandis* e em 1,250mg.gMF^{-1} para *E. urophylla*.

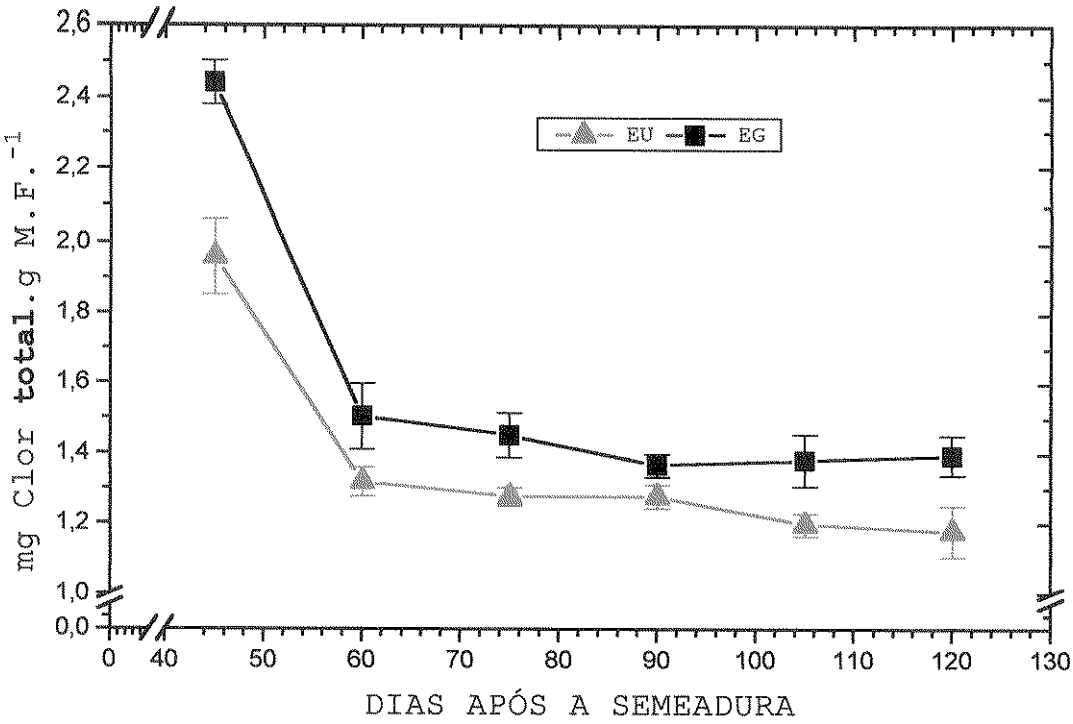


Figura 16. Conteúdo de clorofila **total** nas folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

A relação clor **a** /clor **b** nas folhas das duas espécies de eucalipto variou no decorrer do período experimental (figura 17). Para *E. urophylla* foi observada tendência de que essa relação permanecesse constante em 1,93 até 90 DAS e em 2,24 no período de 105 aos 120 DAS. Para *E. grandis* a relação clor **a**/clor **b** de 1,79 aos 45 DAS aumentou para 2,00 aos 60 DAS, mantendo-se constante nesse valor até 75 DAS, após os quais aumentou para 2,42 aos 90 DAS, quando decresceu para 2,20 aos 105 DAS e para 2,07 aos 120 DAS. A relação clor **a**/clor **b** nas folhas de *E. grandis* foi maior que a de *E. urophylla* aos 60 e 90 DAS, enquanto a de *E. urophylla* foi maior que a de *E. grandis* apenas aos 45 DAS; nas demais épocas

de avaliação não foi constatada diferença na relação clor **a**/clor **b** entre as duas espécies.

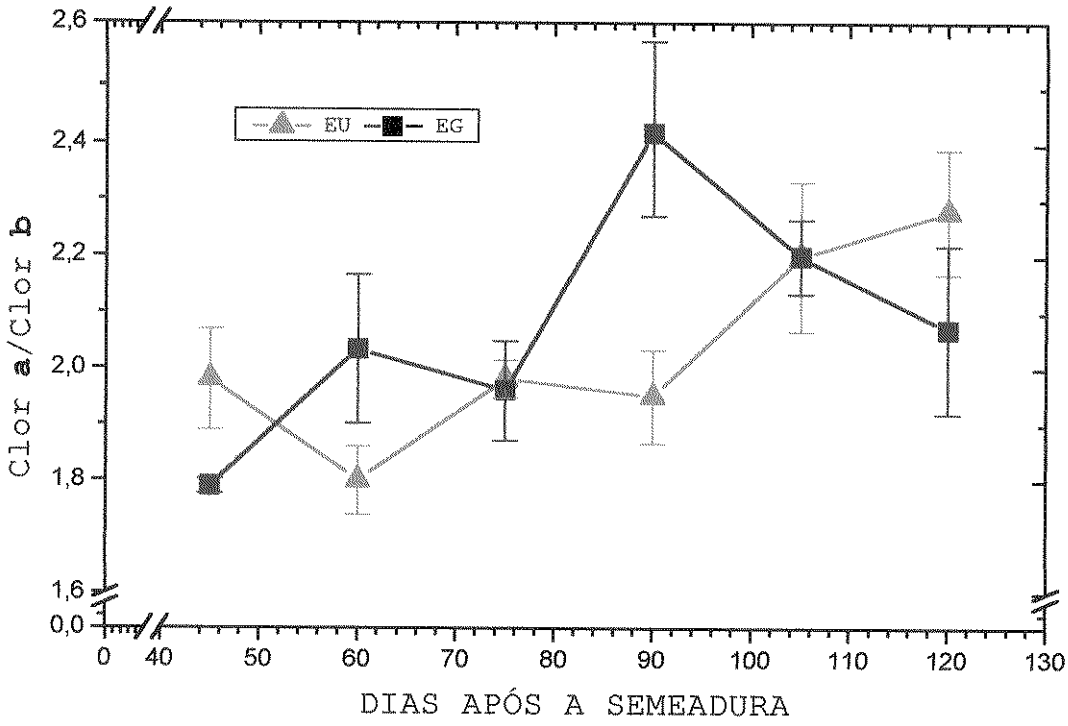


Figura 17. Relação entre os conteúdos de clorofila **a** e clorofila **b** nas folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em função da idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

A massa seca do sistema radicular (PMSR) das plantas de *E. urophylla* foi maior que o das plantas de *E. grandis* apenas aos 60 DAS, enquanto nas demais épocas de avaliação não foi verificada diferença no PMSR entre as espécies (figura 18). A taxa de crescimento absoluto (TCA) em massa seca de raízes de *E. urophylla* foi maior que a de *E. grandis* nos períodos de 45 aos 60 DAS e de 75 aos 90 DAS, enquanto *E. grandis* apresentou maior TCA que *E. urophylla* nos períodos de 60 aos 75 DAS e de 90 aos

120 DAS (tabela 2). As duas espécies de eucalipto apresentaram maior TCA no período de 90 aos 120 DAS quando comparada a dos demais períodos. No período de 105 aos 120 DAS, *E. urophylla* não apresentou ganho de massa seca de raízes.

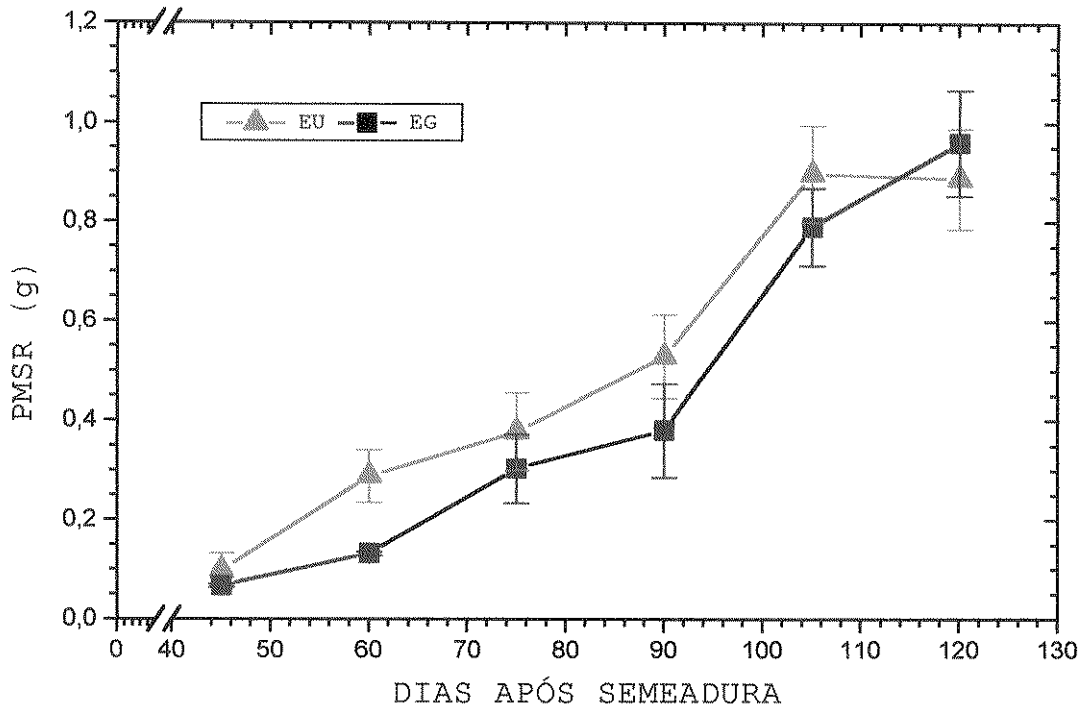


Figura 18. Massa seca do sistema radicular (PMSR) de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

A massa seca do caule (PMSC) das plantas de *E. urophylla* foi maior que o das plantas de *E. grandis* no período de 60 aos 75 DAS. Nas demais épocas de avaliação não foi constatada diferença no PMSC entre espécies (figura 19). Não foi constatada diferença na TCA em massa seca de caule entre as duas espécies de eucalipto (tabela 2). Ambas apresentaram pequena TCA no período de 45 até os 75 DAS. A maior TCA para

as duas espécies de eucalipto foi observada no período de 90 aos 105 DAS, quando comparada a dos demais períodos.

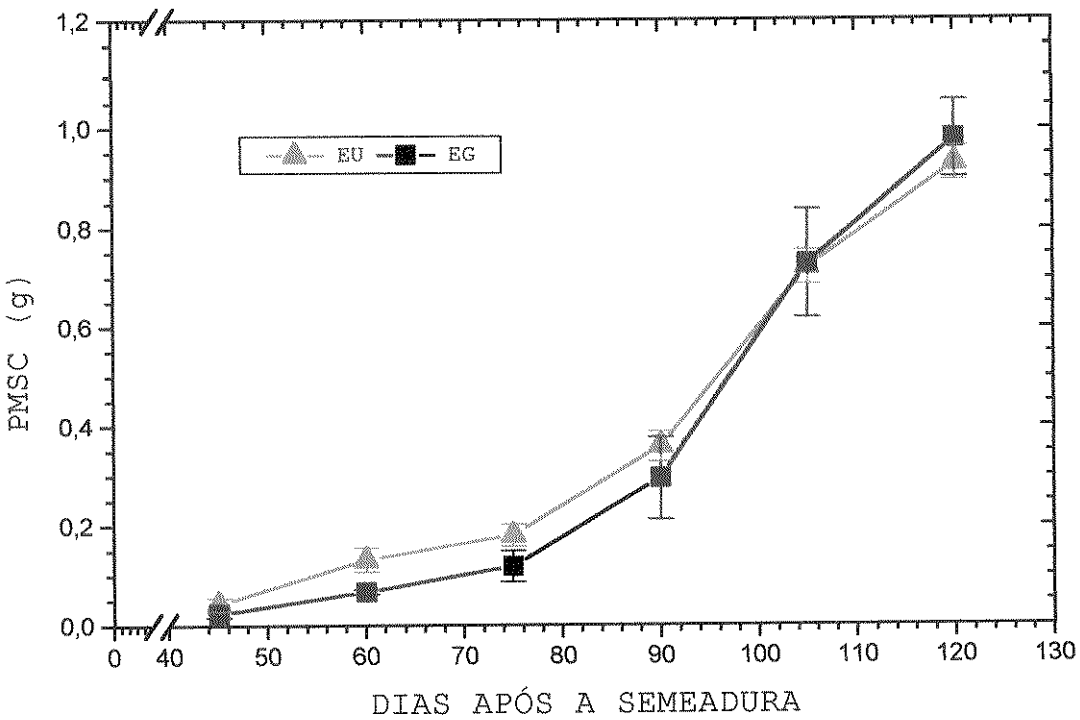


Figura 19. Massa seca do caule (PMSC) de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

A massa seca de folhas (PMSF) das plantas de *E. urophylla* foi 22,2% maior, em média, que a das plantas de *E. grandis* no decorrer de todo o período experimental (figura 20). A TCA em massa seca de folhas de *E. urophylla* foi maior que a de *E. grandis* apenas no período de 45 aos 60 DAS, enquanto nas demais épocas de avaliação não foi constatada diferença na TCA entre as espécies. Ambas apresentaram TCA constante no período de 75 aos 120 DAS (tabela 2).

Tabela 2. Taxa de crescimento absoluto em massa seca de raízes (MSR), caule (MSC), folhas (MSC) e total (MST) de plantas de *E. urophylla* e *E. grandis*. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

ÉPOCAS (DAS)	MSR	MSC	MSF	MST
	(mg.dia^{-1})			
E. urophylla				
45-60	14±2	6±2	13±2	33±3
60-75	6±2	3±1	6±1	15±3
75-90	10±2	12±2	20±2	42±2
90-105	25±3	24±3	16±3	65±3
105-120	-1±0,1	4±1	21±3	24±2
E. grandis				
45-60	4±1	3±1	6±1	13±1
60-75	11±2	3±1	7±1	21±3
75-90	4±1	12±1	19±2	34±2
90-105	27±3	29±2	24±5	94±4
105-120	8±2	7±2	16±3	31±2

A massa seca total (PMST) das plantas de *E. urophylla* foi maior que o das plantas de *E. grandis* no período de 60 aos 90 DAS, quando a diferença entre as espécies foi de 31,8%, em média (figura 21). A TCA em massa seca total das plantas de E. urophylla foi maior que a de E. grandis nos períodos de 45 aos 60 DAS e de 75 aos 90 DAS, enquanto no período de 90 aos 105 DAS ocorreu o inverso. Nas demais épocas de avaliação não foi constatada diferença entre as espécies quanto a TCA. Ambas apresentaram maior TCA em massa seca total no período de 90 aos 105 DAS.

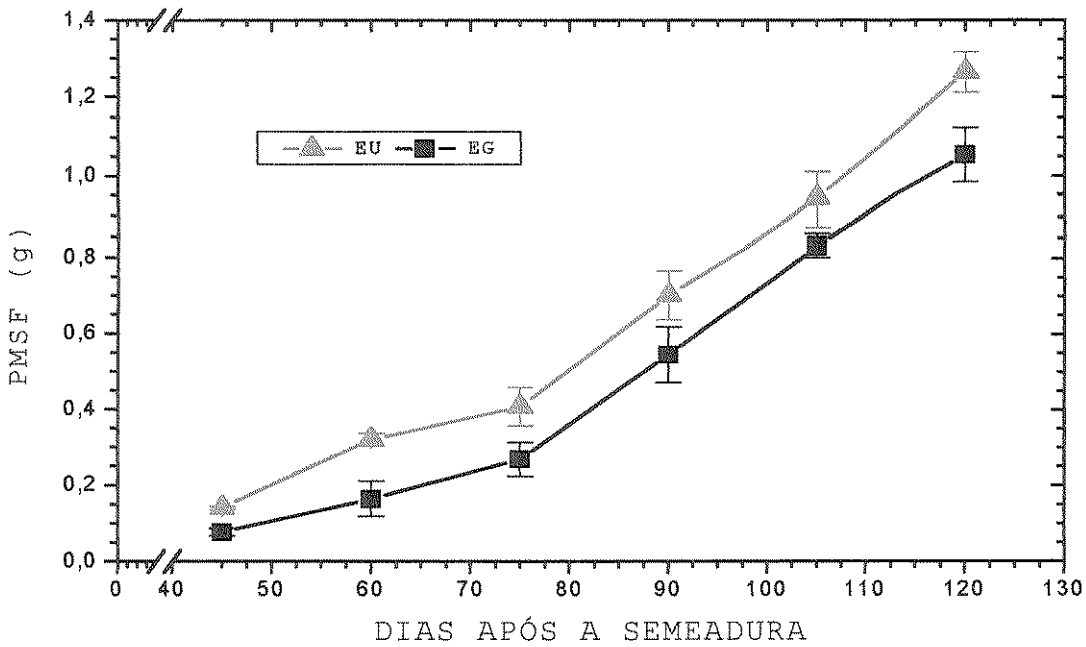


Figura 20. Massa seca de folhas (PMSF) de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

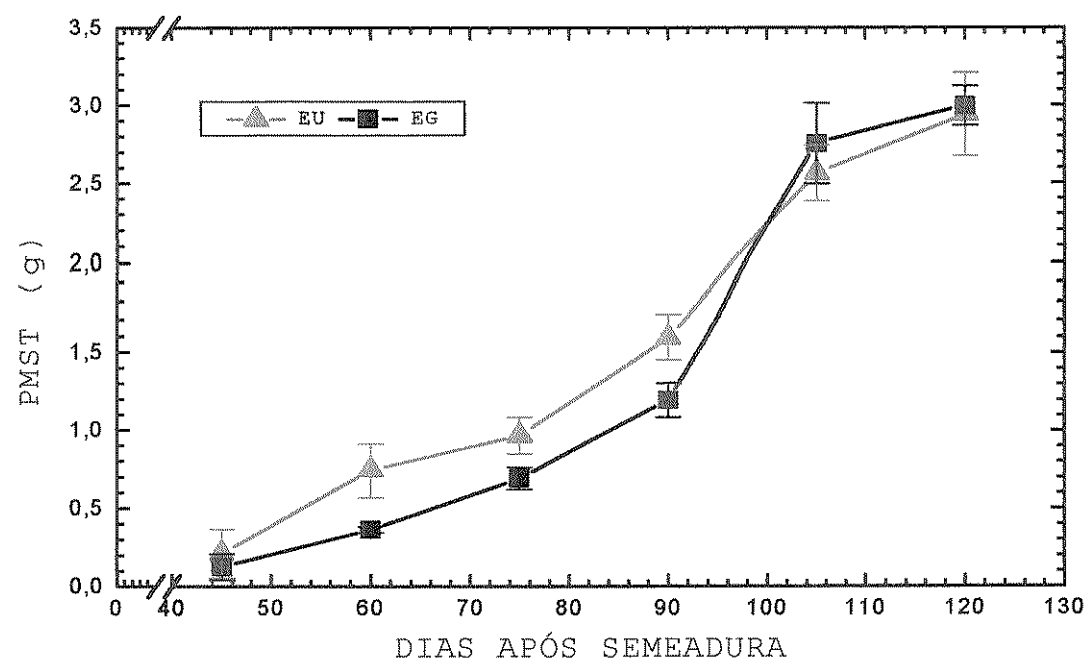


Figura 21. Massa seca total (PMST) de plantas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) determinada dos 45 aos 120 dias após a semeadura. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

Não foi observada diferença entre as duas espécies de eucalipto quanto a relação de massa seca entre a parte aérea e o sistema radicular (PA/SR) das plantas (figura 22). Com relação as épocas de avaliação, foi verificado que a relação PA/SR manteve-se praticamente constante em 1,9 para *E. urophylla* e em 1,8 para *E. grandis*, no decorrer do período experimental, à exceção de *E. grandis* aos 90 DAS, cuja relação PA/SR (2,4) foi maior que a determinada nas demais avaliações.

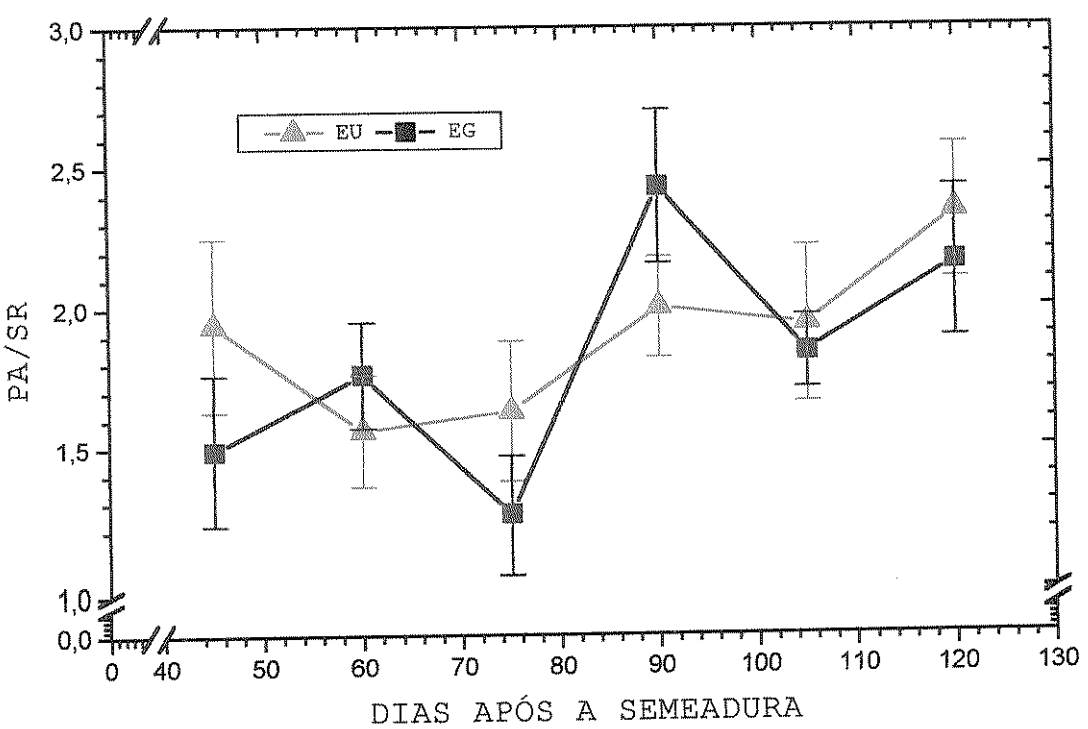


Figura 22. Relação entre a massa seca da parte aérea e do sistema radicular de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em função da idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

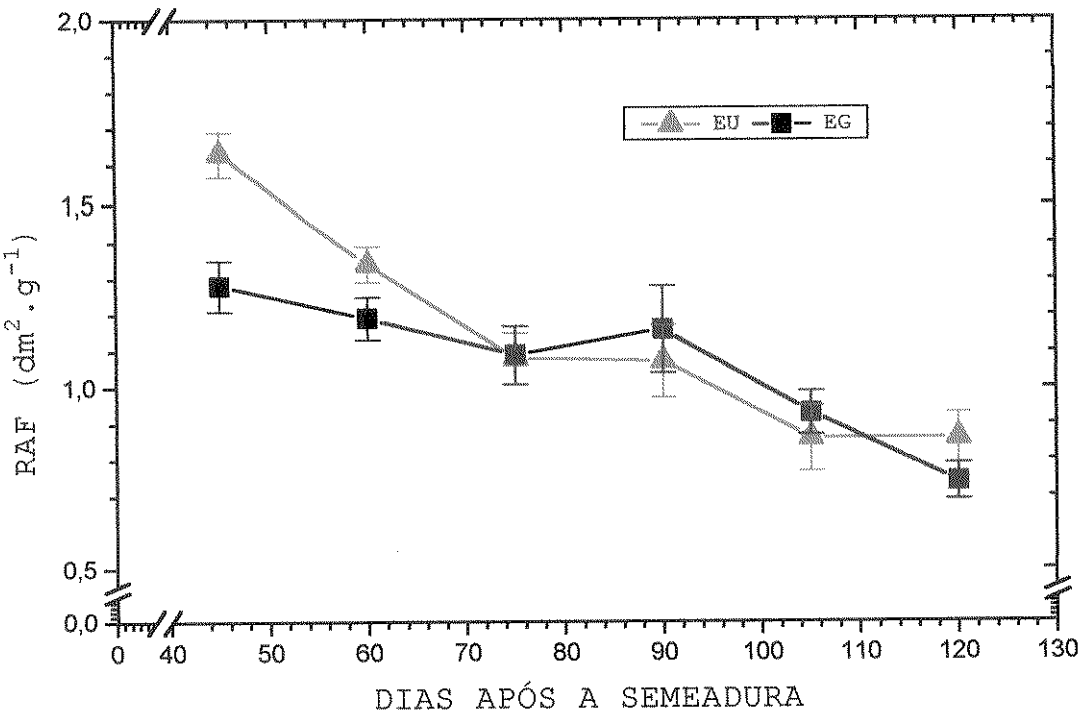


Figura 23. Razão de área foliar (RAF) de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

A razão de área foliar (RAF) expressa a área útil para a fotossíntese e é um componente morfo-fisiológico, pois é a razão entre a área foliar e a massa seca total (BENINCASA, 1988). Na figura 23 pode-se observar que a RAF para as plantas de *E. urophylla* foi superior a das plantas de *E. grandis* no período de 45 aos 60 DAS. A RAF das duas espécies de eucalipto decresceu com o desenvolvimento das plantas. Para *E. urophylla*, a RAF inicial de $1,63 dm^2.g^{-1}$ decresceu para $1,08 dm^2.g^{-1}$ até os 75 DAS se estabilizando nesse valor até os 90 DAS, após os quais decresceu e se estabilizou em $0,86 dm^2.g^{-1}$, em média, no período de 105 aos 120 DAS. Para *E. grandis* foi observado comportamento inverso, com uma

fase de estabilização em 1,15$dm^2.g^{-1}$ no período de 45 aos 90 DAS, após os quais a RAF decresceu para 0,74$dm^2.g^{-1}$ aos 120 DAS. A RAF pode ser desmembrada em dois componentes: área foliar específica (AFE) e razão de peso de folhas (RPF). Assim, a variação na RAF será função de alterações em um ou nos seus dois componentes.

A área foliar específica (AFE) é o componente morfológico e anatômico da RAF, porque relaciona a superfície com a massa seca da própria folha (BENINCASA, 1988). Na figura 24 pode-se observar que a AFE das plantas de *E. urophylla* foi superior a das plantas de *E. grandis* no período de 45 a 60 DAS, após o qual se igualaram. A AFE de *E. grandis* manteve-se praticamente constante em 2,60$dm^2.g^{-1}$ no período de 45 aos 105 DAS, decrescendo para 2,11$dm^2.g^{-1}$ aos 120 DAS. Para *E. urophylla*, a AFE manteve-se constante em 3,18$dm^2.g^{-1}$, em média, no período de 45 a 60 DAS, após o qual decresceu para 2,46$dm^2.g^{-1}$, em média, até os 105 DAS e para 2,00$dm^2.g^{-1}$ aos 120 DAS.

A razão de peso de folha (RPF) é o componente fisiológico da RAF, já que é a razão entre a massa seca retida nas folhas e a massa seca acumulada na planta toda (BENINCASA, 1988). Na figura 25 pode-se verificar que a RPF de *E. urophylla* diferenciou da RPF de *E. grandis* apenas na avaliação realizada aos 120 DAS, quando seu valor foi 18,6% superior ao do *E. grandis*. Foi verificado que o valor do RPF de *E. grandis* foi igual nas avaliações realizadas aos 45, 60 e 90 DAS (0,45, em média), que por sua vez foram superiores aos das avaliações realizadas aos 75, 105 e 120 DAS (0,37, em média). Para *E. urophylla* foi verificado que a RPF de 0,51 aos 45 DAS decresceu para 0,43 aos 60 DAS, após os quais manteve-se praticamente constante.

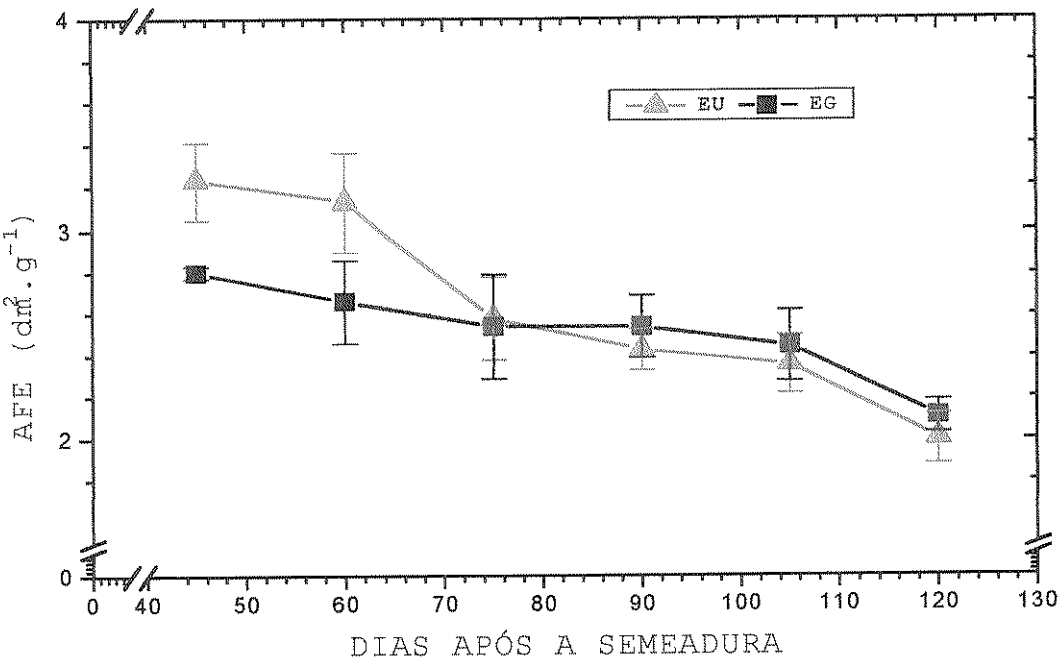


Figura 24. Área foliar específica (AFE) de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

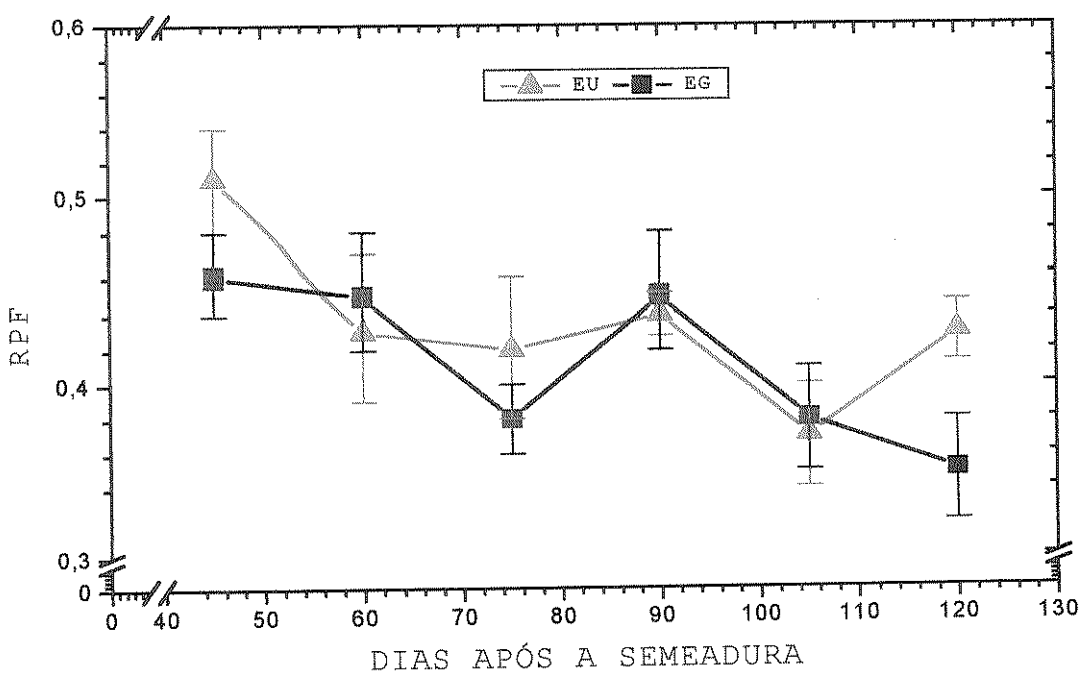


Figura 25. Razão de peso de folha (RPF) de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

Se considerarmos a massa da folha como uma expressão do volume foliar, o inverso da AFE indica a espessura da folha, que é chamado peso específico da folha (PEF) (BENINCASA, 1988). Na figura 26 pode-se observar que o PEF de *E. grandis* foi superior ao de *E. urophylla* no período de 45 aos 60 DAS. No período de 75 aos 90 DAS o PEF das duas espécies se igualou e, a partir dos 105 DAS *E. urophylla* apresentou PEF maior que *E. grandis*. O PEF de *E. grandis* manteve-se constante em 0,396g.dm^{-2}, em média, no período de 45 aos 105 DAS, após o qual aumentou para 0,470g.dm^{-2}. Para *E. urophylla*, o PEF manteve-se constante em 0,320g.dm^{-2} dos 45 aos 60 DAS, após os quais aumentou para 0,413g.dm^{-2}, em média, no período de 75 aos 105 DAS e para 0,500g.dm^{-2} aos 120 DAS.

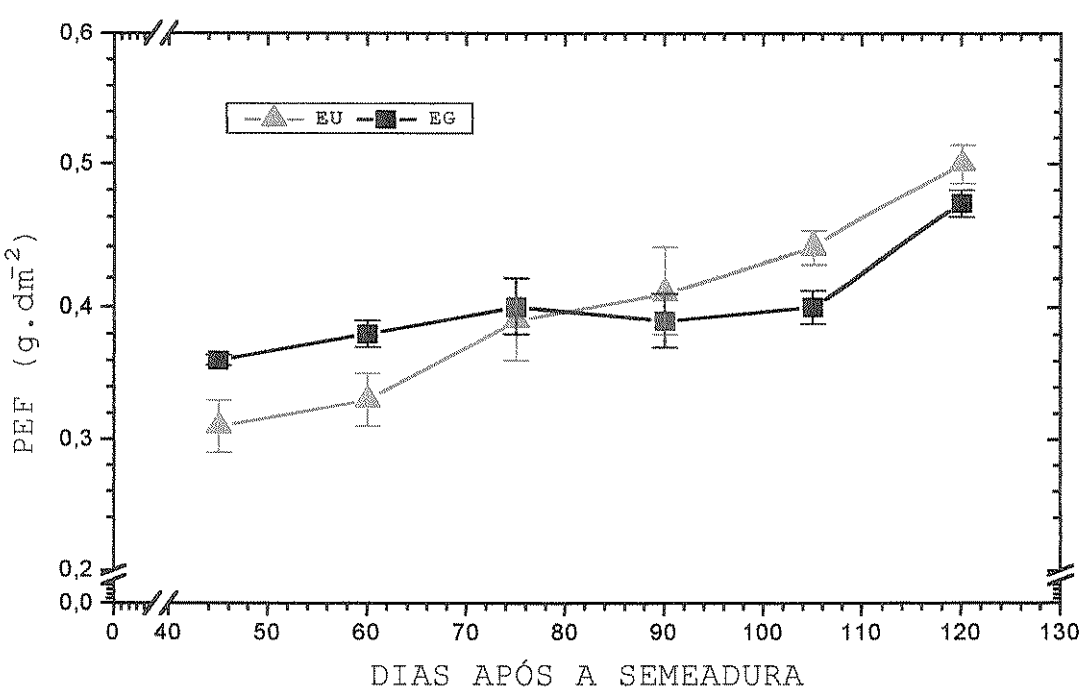


Figura 26. Peso específico de folhas (PEF) de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos 3 repetições ± desvio padrão.

Os resultados de espessura de folha obtidos com o cálculo do PEF foram semelhantes aos determinados pelo uso do microscópio. Na figura 27 pode-se observar que no período de 45 a 60 DAS as folhas do *E. grandis* eram mais espessas do que as do *E. urophylla*, sendo que após esse período a espessura das folhas das duas espécies se igualaram, com tendência de que *E. urophylla* apresentasse folhas mais espessas aos 120 DAS. A espessura das folhas de *E. grandis* manteve-se praticamente constante em 265µm no decorrer do período experimental, enquanto a espessura das folhas de *E. urophylla* aumentou de 237µm aos 45 DAS para 273µm aos 120 DAS.

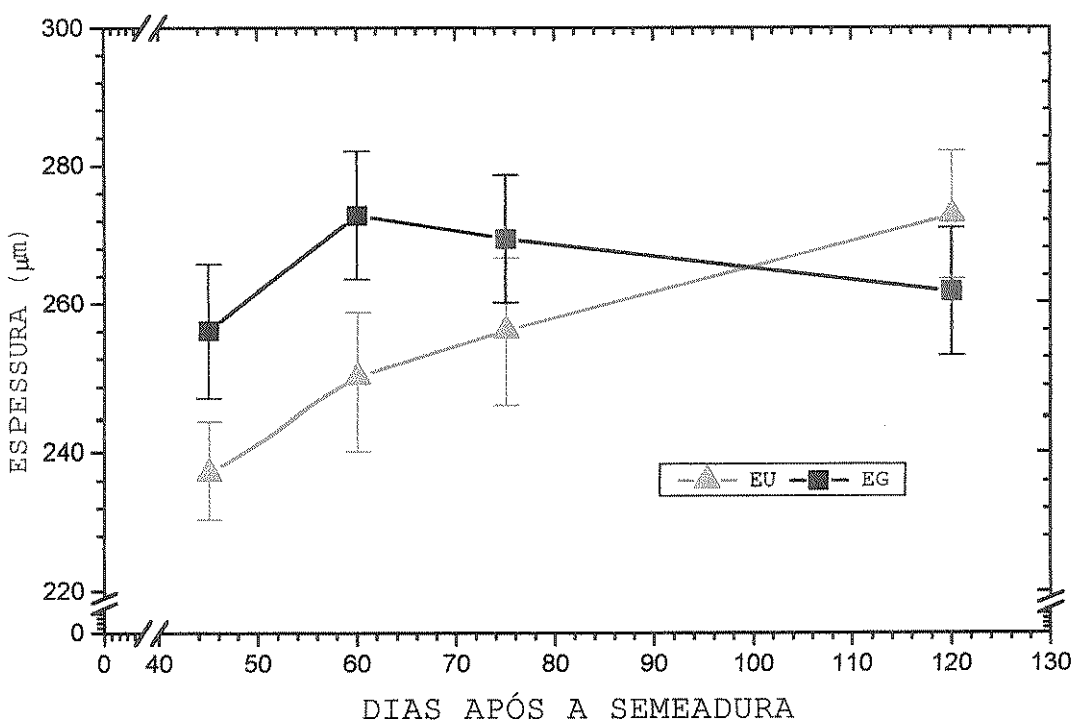


Figura 27. Espessura das folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos 3 repetições ± desvio padrão.

A densidade de estômatos nas folhas de *E. grandis* foi maior (10,6%, em média) que a determinada nas folhas de *E. urophylla* no período de 75 aos 120 DAS (figura 28). Foi observado que a densidade de estômatos nas duas espécies de eucalipto aumentou 16,5%, em média, dos 45 aos 75 DAS, sendo que aos 120 DAS a densidade estomática foi igual a determinada aos 45 e 60 DAS.

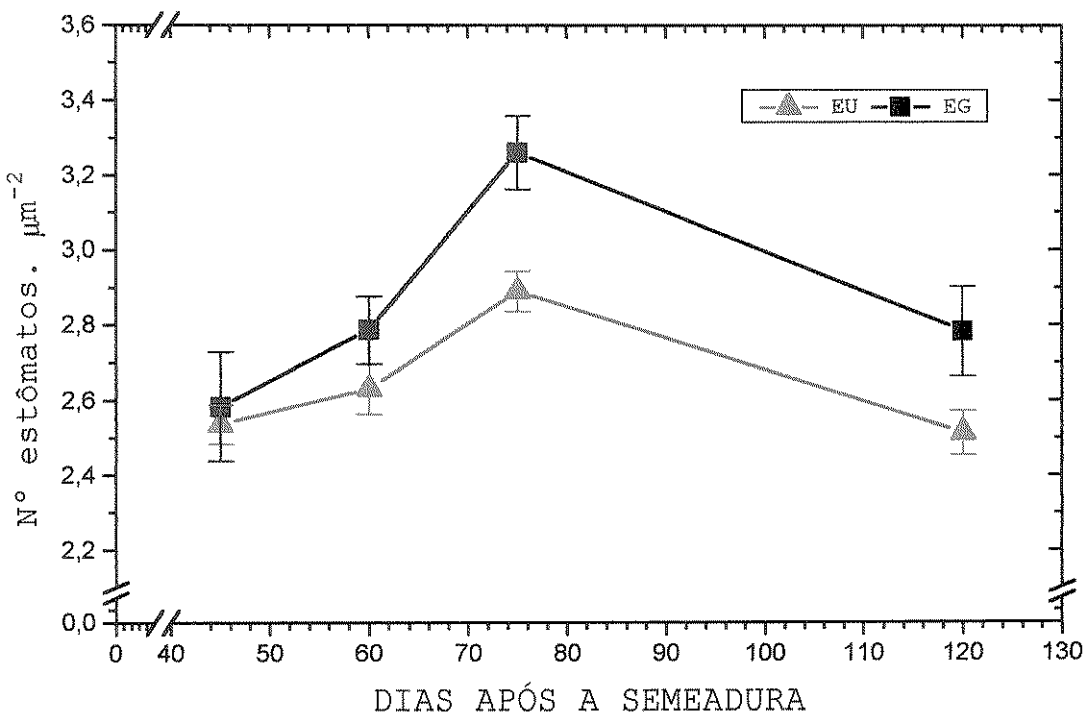


Figura 28. Densidade estomática nas folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) em relação à idade das plantas. Média de pelo menos 3 repetições ± desvio padrão.

4.2. Avaliação dos parâmetros de atividade fotossintética pelo eletrodo de Clark.

Na figura 29-A pode-se observar que a reflexão da luz pelas folhas de *E. grandis* foi superior à das folhas de *E.*

urophylla nas faixas de comprimento de onda (λ) de 400 a 510nm e de 650 a 690nm do espectro da luz visível. As folhas de *E. urophylla* refletiram mais do que as folhas de *E. grandis* na faixa de 540 a 660nm e aos 700nm. Para λ=680nm, a porcentagem de luz refletida pelas folhas de *E. grandis* foi de 5,58 e pelas de *E. urophylla* foi de 4,17. A transmissão de luz pelas folhas de *E. urophylla* foi maior que a das folhas de *E. grandis* a partir de λ=460nm, mantendo esse comportamento até λ=700nm. Para λ=680nm, a porcentagem de luz transmitida pelas folhas de *E. grandis* foi de 0,81 e pelas de *E. urophylla* foi de 2,10.

Esse padrão de refletividade e transmissividade das folhas das duas espécies de eucalipto resultou em maior absorção da luz pelas folhas de *E. urophylla* na faixa de 400 a 490nm, correspondendo aos comprimentos de onda da luz violeta a azul (figura 29-B). Nas faixas de 520 a 660nm e de 688 a 700nm, que correspondem às luzes amarela, laranja e vermelha, a absorção pelas folhas de *E. grandis* foi superior a das folhas de *E. urophylla*. Para λ=680nm, as porcentagens de luz absorvidas pelas folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* foram semelhantes, 93,61 e 93,73, respectivamente. Considerando todo o espectro da luz visível, as folhas de *E. grandis* absorveram 89% da radiação incidente e as de *E. urophylla* absorveram 87%.

A taxa máxima de liberação de oxigênio pela fotossíntese ($F_{máx}$) das folhas de *E. urophylla* aclimatadas a 10 e 25°C foi 48,4% menor, em média, que a das folhas de *E. grandis*

aclimatadas nas mesmas temperaturas, sendo que a $F_{máx}$ das folhas de *E. grandis* foi significativamente superior a das folhas de *E. urophylla* nas duas temperaturas de aclimatação (tabela 3 e figura 30). Com relação ao efeito da temperatura de aclimatação dentro de cada espécie, foi observada redução

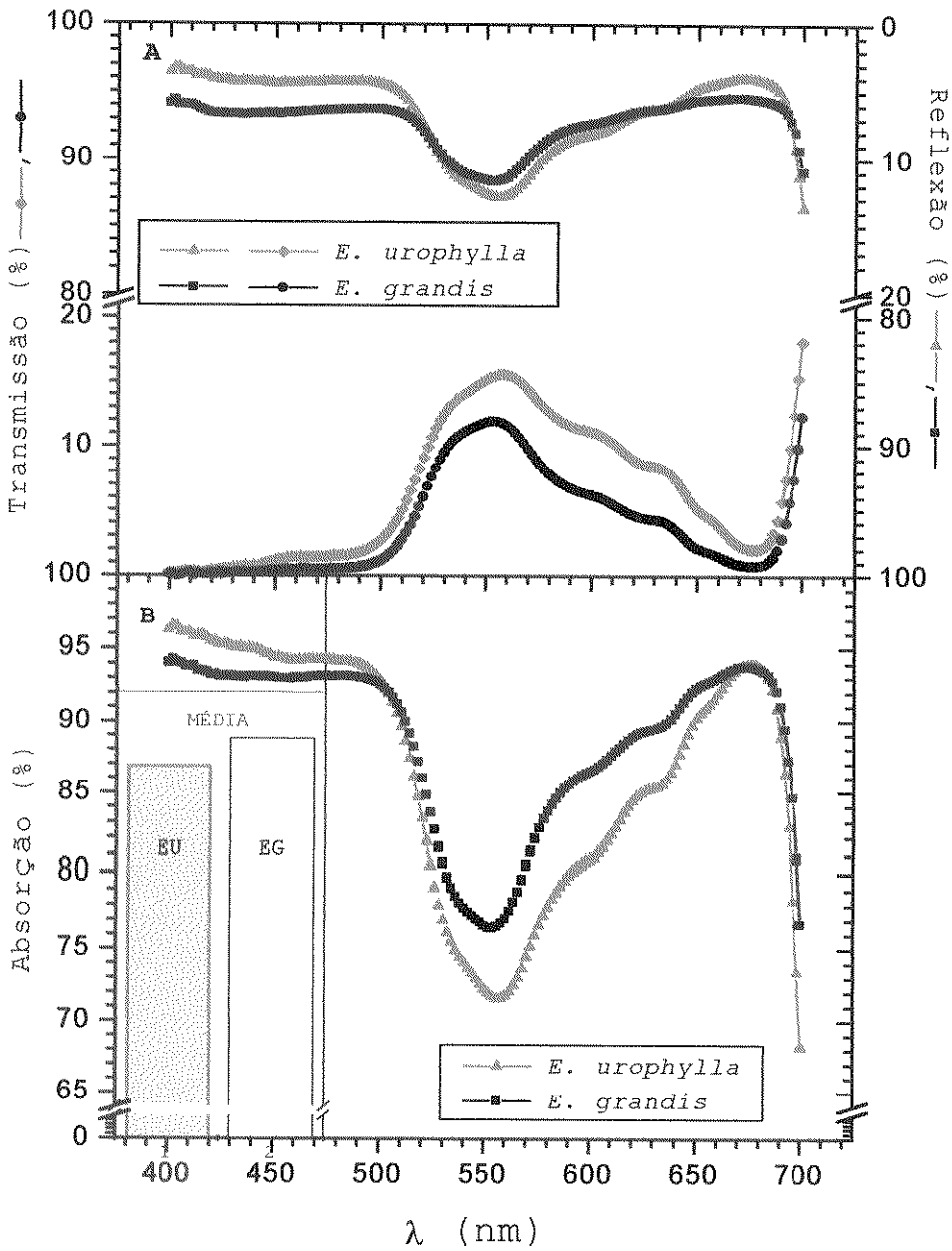


Figura 29. Espectro de reflexão e transmissão (A) e de absorção (B) de luz pelas folhas de *E. urophylla* e *E. grandis*.

de 21,3% na $F_{máx}$ das folhas de *E. urophylla* aclimatadas a 10°C quando comparada a das folhas aclimatadas a 25°C. Para *E. grandis*, a redução na $F_{máx}$ em função da temperatura de aclimatação de 10°C foi de 31,8%. Na figura 30 pode-se observar que para *E. urophylla* a redução na liberação de oxigênio decorrente da aclimatação a 10°C foi constatada a partir da DFF de 184 μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto para *E. grandis* foi a partir de 102 μmol $m^{-2}s^{-1}$.

Tabela 3. Efeito da temperatura de aclimatação sobre alguns parâmetros de atividade fotossintética de folhas de *E. urophylla* e *E. grandis*. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

Parâmetros	***E. urophylla***		***E. grandis***	
	10°C	**25°C**	**10°C**	**25°C**
$F_{máx}$ ($\mu molO_2\ m^{-2}s^{-1}$)	7,18±0,16	9,12±0,14	12,82±0,42	18,80±0,21
$DFF_{1/2}$ ($\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$)	308±9	249±40	315±21	219±43
DFF_{sat} ($\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$)	1349±61	1230±35	1318±29	1156±54
Φ	0,013±0,001	0,025±0,002	0,027±0,001	0,043±0,006
1/Φ	75,09±3,17	40,73±3,32	37,51±0,82	23,57±3,32
PCL ($\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$)	24±7	18±6	18±5	14±2
RE ($\mu molO_2\ m^{-2}s^{-1}$)	2,17±0,26	3,46±0,52	2,26±0,58	7,06±0,93

A densidade de fluxo de fótons necessária para a liberação de oxigênio atingir metade do valor máximo ($DFF_{1/2}$) nas folhas de *E. urophylla* aclimatadas a 10°C não diferiu da

$DFF_{1/2}$ das folhas de *E. grandis* aclimatadas na mesma temperatura (tabela 3). O mesmo resultado foi verificado para a temperatura de aclimatação de 25°C.

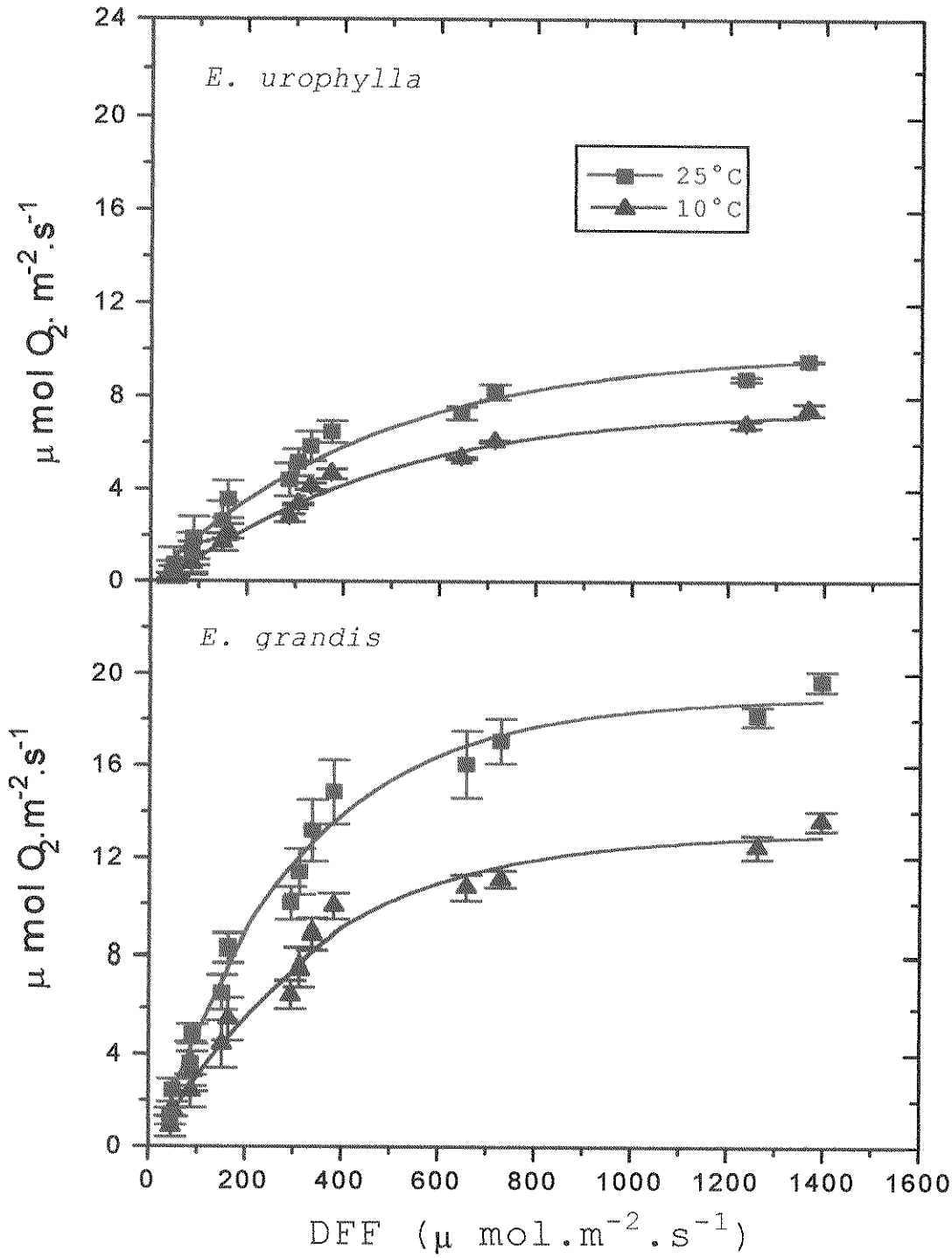


Figura 30. Taxa de liberação de oxigênio pelas folhas de *E. urophylla* e *E. grandis* em função da densidade de fluxo de fótons (DFF) absorvida pelas folhas.

Para as duas espécies de eucalipto foi constatado que a $DFF_{1/2}$ foi significativamente maior quando as folhas foram aclimatadas a 10°C. Para *E. urophylla*, o aumento na $DFF_{1/2}$ em função da temperatura de aclimatação foi de 23,7%, enquanto para *E. grandis* foi de 43,8%.

A densidade de fluxo de fótons necessária para atingir 99% da fotossíntese máxima (DFF_{sat}) pelas folhas de *E. urophylla* aclimatadas nas temperaturas de 10 e 25°C foi semelhante a DFF_{sat} das folhas de *E. grandis* aclimatadas nas mesmas temperaturas (tabela 3). Quanto ao efeito da temperatura de aclimatação na DFF_{sat} dentro de cada espécie, foi constatado aumento significativo de 9,7% nas folhas de *E. urophylla* aclimatadas a 10°C quando comparadas às aclimatadas a 25°C. Para *E. grandis*, o aumento na DFF_{sat} decorrente da temperatura de aclimatação de 10°C foi de 14,0%.

A eficiência quântica (Φ) das folhas de *E. urophylla* aclimatadas a 10 e 25°C foi 45,7% menor, em média, que a das folhas de *E. grandis* aclimatadas nas mesmas temperaturas (tabela 3). Para *E. urophylla* foi observado que a temperatura de aclimatação de 10°C reduziu em 48,0% a Φ, enquanto para *E. grandis* a redução foi de 37,2%. A maior Φ foi constatada nas folhas de *E. grandis* aclimatadas a 25°C, enquanto a menor Φ foi constatada nas folhas de *E. urophylla* aclimatadas a 10°C; a diferença entre essas Φ foi de 69,8%. A Φ das folhas de *E. grandis* aclimatadas a 10°C se assemelhou a das folhas de *E. urophylla* aclimatadas a 25°C, que, por sua vez, se mostraram 50,0%, em média, superiores a Φ das folhas de *E.*

urophylla aclimatadas a 10°C. Os resultados obtidos para exigência quântica (1/Φ) foram semelhantes aos descritos para Φ, ressaltando que, como conseqüência, as plantas de eucalipto aclimatadas a 25°C, independentemente da espécie, apresentaram menor 1/Φ que as aclimatadas a 10°C e que as plantas de *E. grandis* demonstraram, em média, menor 1/Φ que as de *E. urophylla*.

Não foi constatada diferença entre espécies e entre temperaturas de aclimatação das espécies quanto ao ponto de compensação luminoso (PCL), que foi, considerando a média geral, de 18,5 μmol $m^{-2}s^{-1}$ (tabela 3).

As folhas de *E. urophylla* e de *E. grandis*, ambas aclimatadas a 10°C, apresentaram mesma taxa de respiração no escuro - RE (2,21 $\mu molO_2.m^{-2}\ s^{-1}$, em média), sendo que essa se mostrou 36,1% menor que a RE de *E. urophylla* aclimatada a 25°C e 68,7% menor que a RE de *E. grandis* aclimatada a 25°C. A RE das folhas de *E. urophylla* aclimatada a 25°C foi 51% menor que a de *E. grandis* aclimatada na mesma temperatura.

4.3. Avaliação dos parâmetros da atividade fotossintética pela espectroscopia fotoacústica.

4.3.1. Atividade do fotossistema II.

As folhas de *E. urophylla* e *E. grandis*, previamente aclimatadas a 10 e 25°C foram expostas a densidades crescentes de fluxo de fótons (DFF) a 680nm, isolando-se, de cada sinal fotoacústico obtido, a contribuição das componentes fotobárica e fototérmica.

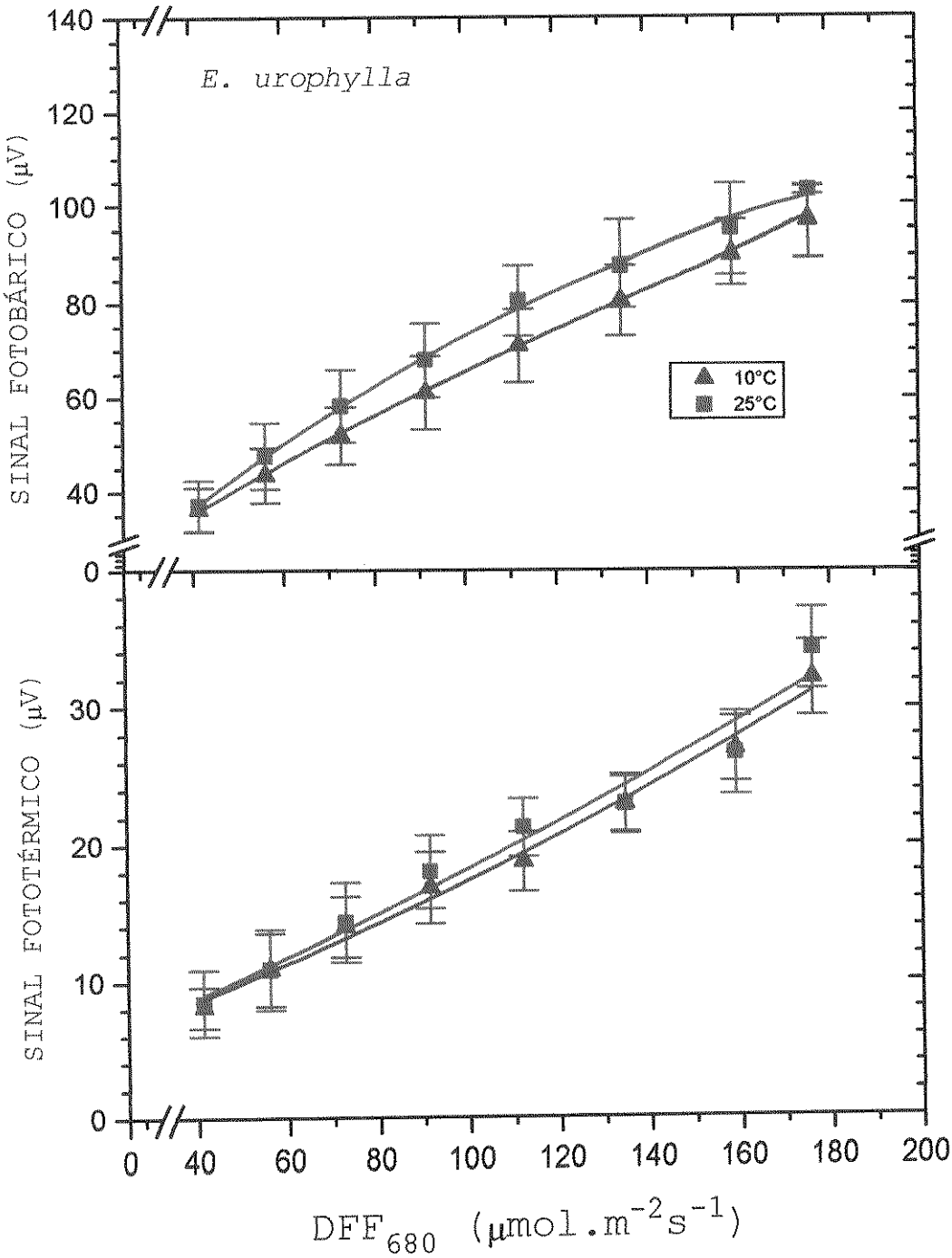


Figura 31. Curvas de resposta dos sinais fotobárico e fototérmico à densidades crescentes de fluxo de fótons a 680nm (DFF_{680}) de *E. urophylla* aclimatada a 10 e 25°C. Média de pelo menos cinco repetições ± desvio padrão.

Embora as plantas de *E. urophylla* demonstrassem tendência de maior taxa de liberação de oxigênio (sinal fotobárico) quando aclimatadas a 25°C, essa não diferiu significativamente da taxa das plantas aclimatadas a 10°C (figura 31). A taxa de liberação de oxigênio das plantas aclimatadas nas duas temperaturas foi crescente com o aumento da DFF_{680}, sem se constatar tendência de saturação.

Para *E. grandis* foi verificado que as plantas aclimatadas a 10°C apresentaram menor liberação de oxigênio que as plantas aclimatadas a 25°C a partir da DFF_{680} de 158 μmol $m^{-2}s^{-1}$, densidade essa a partir da qual as plantas aclimatadas a 10°C demonstraram tendência de menor $S_{térm}$ que as aclimatadas a 25°C (figura 32). A taxa máxima de liberação de oxigênio das plantas aclimatadas a 10°C foi 11% menor que a das plantas aclimatadas a 25°C.

A taxa máxima de liberação de oxigênio por *E. grandis* a 25°C (119±6μV) foi superior a verificada para *E. urophylla* aclimatada a 10°C (97±7μV) e a 25°C (103±1μV).

O $S_{térm}$ das duas espécies de eucalipto nas temperaturas de aclimatação foi crescente com o aumento da DFF_{680}, mesmo descontando-se a contribuição do sinal térmico da membrana do microfone, conforme indicação de BARJA & MANSANARES (1998). Não foi constatado efeito das temperaturas de aclimatação na dissipação térmica das duas espécies, mas *E. urophylla* demonstrou tendência de maior $S_{térm}$ que *E. grandis*, principalmente quando expostas a DFF_{680} superiores a 112 μmol $m^{-2}s^{-1}$.

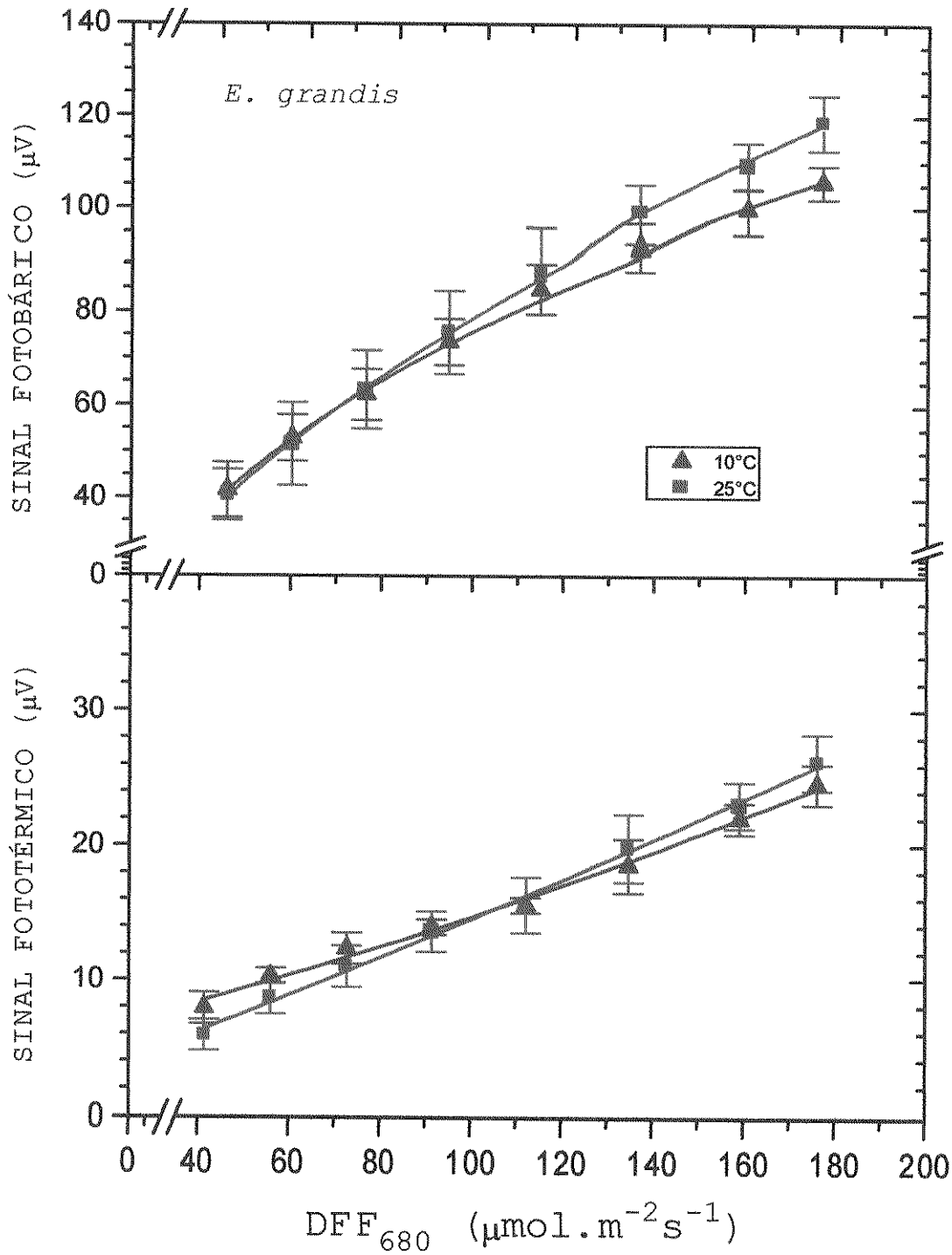


Figura 32. Curvas de resposta dos sinais fotobárico e fototérmico à densidades crescentes de fluxo de fótons a 680nm (DFF_{680}) de *E. grandis* aclimatada a 10 e 25°C. Média de pelo menos cinco repetições ± desvio padrão.

4.3.2. Tratamento fotoinibitório da fotossíntese

a) Indução da fotossíntese

Na figura 33 pode-se observar que as espécies de eucalipto aclimatadas nas duas temperaturas apresentaram, na fase inicial de indução da fotossíntese, um pico seguido de uma redução no sinal fotoacústico, cuja intensidade e tempo de ocorrência variaram de acordo com a espécie e com a temperatura de aclimatação.

O sinal fotoacústico correspondente a esse pico inicial ($S_{máx}^{ini}$), embora não tenha diferenciado entre espécies e entre temperaturas de aclimatação, apresentou tendência de ser maior nas plantas de *E. urophylla* aclimatadas a 10°C (tabela 4). Não foi constatada diferença no tempo de ocorrência desse pico ($TS_{máx}^{ini}$) entre espécies e entre as temperaturas.

O mesmo comportamento foi verificado para a redução que se seguiu do pico, cujo sinal fotoacústico (S_{min}) de *E. urophylla* tendeu a ser maior que o de *E. grandis*, não se constatando efeito das temperaturas nesse sinal dentro de cada espécie de eucalipto. O tempo demandado para atingir o sinal mínimo (TS_{min}) após o início da exposição a luz foi 28% menor para as espécies aclimatadas a 10°C quando comparadas às aclimatadas a 25°C, não se verificando diferenças entre as espécies dentro de cada temperatura de aclimatação (tabela 4).

Após esse transiente inicial, seguiu-se a indução da fotossíntese até que o sinal fotoacústico atingisse um estado estacionário, que correspondeu ao sinal máximo ($S_{máx}$). Na tabela 4 e figura 33 pode-se observar que o $S_{máx}$ foi igual

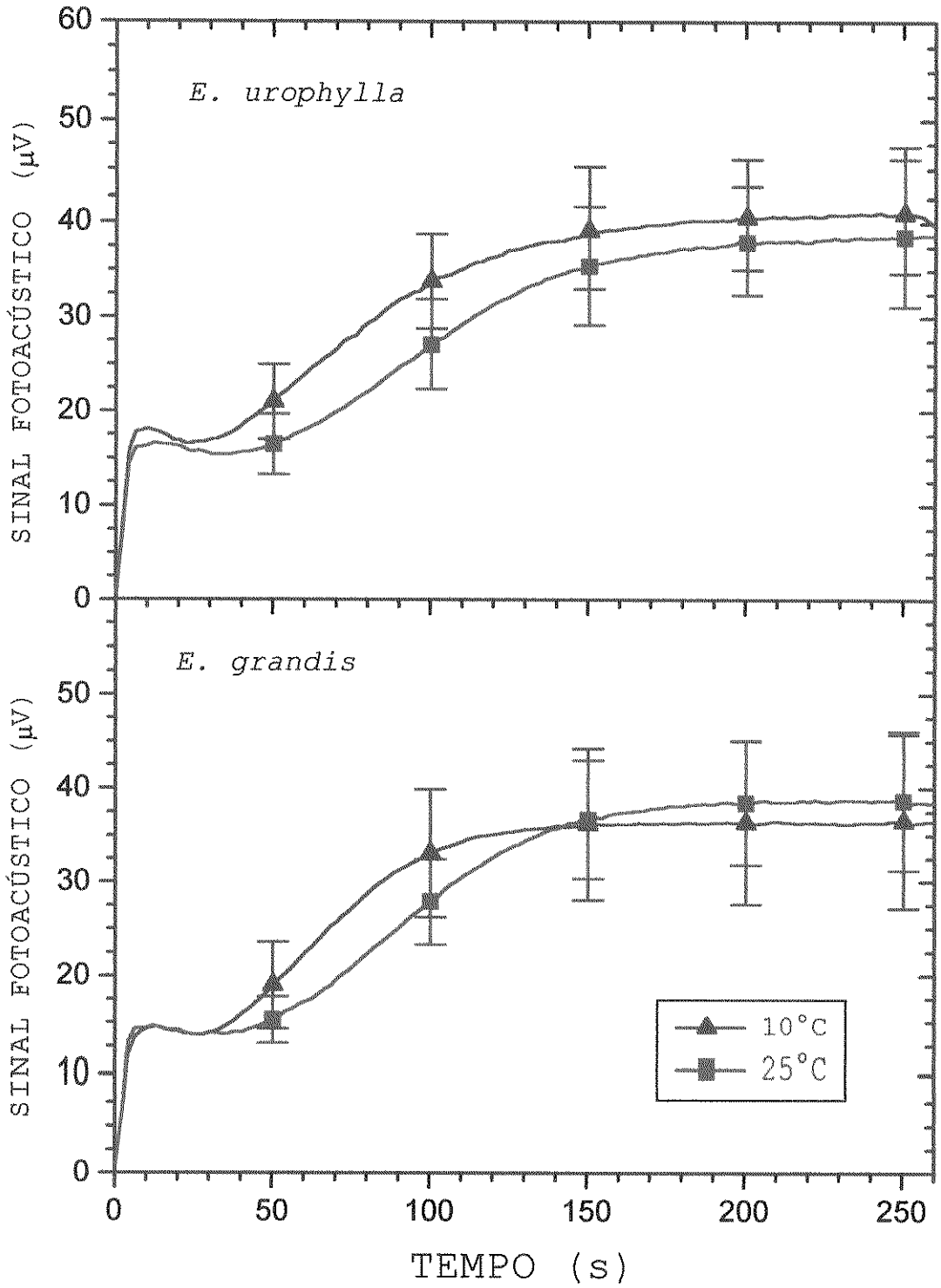


Figura 33. Curvas de indução fotossintética de *E. urophylla* e *E. grandis* aclimatadas a 10 e 25°C. Média de pelo menos 25 repetições ± desvio padrão.

para as duas espécies de eucalipto, independentemente da temperatura de aclimatação. Contudo, foi verificado que, dentro de cada temperatura de aclimatação, *E. grandis* atingiu o sinal máximo ($TS_{máx}$) antes que *E. urophylla*. Para *E. urophylla* a temperatura de aclimatação não influenciou no $TS_{máx}$, mas para *E. grandis* aclimatada a 10°C o $TS_{máx}$ foi menor que o das plantas aclimatadas a 25°C.

Tabela 4. Atributos do sinal fotoacústico na indução fotossintética de *E. urophylla* e *E. grandis* aclimatadas a 10 e 25°C. Média de pelo menos 25 repetições ± desvio padrão.

ATRIBUTOS	*E. urophylla*		*E. grandis*	
	10°C	25°C	10°C	25°C
$S_{máx.}^{ini}$ (μV)	18,0±3,2	16,5±3,4	14,9±4,1	14,5±3,3
$TS_{máx.}^{ini}$ (s)	9,2±2,8	10,9±4,8	12,4±2,5	11,3±3,1
S_{min} (μV)	16,7±2,5	15,6±3,8	14,2±3,1	13,7±1,9
TS_{min} (s)	25,0±3,2	35,3±2,4	25,2±3,0	34,2±5,4
$S_{máx}$ (μV)	41,0±11,9	38,6±8,2	37,0±8,3	39,1±8,7
$TS_{máx}$ (s)	215,3±17,0	230,1±15,2	130,3±5,1	190,0±10,0
$T_{1/2}$ (s)	78±8	99±7	68±10	95±6
ΔS (μV)	24,3±8,4	23,0±7,2	22,8±6,8	25,4±6,5
ΔT (s)	190,0±11,3	194,7±10,5	104,8±4,8	155,8±6,3
$\Delta S/\Delta T$ ($\mu V.s^{-1}$)	0,128±0,014	0,118±0,011	0,217±0,009	0,163±0,006
$S_{bár}$ (μV)	31,0±9,2	31,7±7,3	29,2±4,4	29,5±6,5
$S_{térm}$ (μV)	12,6±4,7	11,1±4,2	7,6±3,7	7,9±3,9

O tempo necessário para que o sinal fotoacústico atingisse metade do seu valor máximo ($T_{1/2}$) foi menor para as plantas aclimatadas a 10°C, independentemente da espécie de eucalipto. Não foi constatada diferença no $T_{1/2}$ entre as espécies dentro de cada temperatura de aclimatação tabela 4).

A amplitude do sinal fotoacústico ($S_{máx}$-S_{min} = ΔS) não diferenciou entre espécies e não foi afetada pela temperatura de aclimatação. Entretanto, o intervalo de tempo entre o sinal mínimo e o máximo (ΔT) foi menor para *E. grandis* quando comparado ao de *E. urophylla*, independentemente da temperatura de aclimatação (tabela 4). Para *E. urophylla*, a temperatura de aclimatação não influenciou no ΔT, mas para *E. grandis* aclimatada a 10°C o ΔT foi menor que o das plantas aclimatadas a 25°C. Como conseqüência, a taxa de variação do sinal fotoacústico ($\Delta S/\Delta T$) de *E. grandis* foi maior que a de *E. urophylla*, principalmente para as plantas aclimatadas a 10°C, cujo $\Delta S/\Delta T$ foi maior que o das plantas aclimatadas a 25°C.

Uma vez que as curvas de indução atingiram o estado estacionário, foi possível, por meio da incidência de luz fotossintéticamente saturante, separar as componentes térmica (sinal fototérmico - $S_{térm}$) e bárica (sinal fotobárico - $S_{bár}$). Na tabela 4 pode-se observar que o $S_{bár}$ não diferenciou entre espécies e não foi afetado pela temperatura de aclimatação. Quanto ao $S_{térm}$, embora não tenha sido constatada diferença significativa entre espécies e entre temperaturas de aclimatação, foi observada tendência de o $S_{térm}$ das plantas de

E. urophylla ser maior que o das plantas de E. *grandis*, independentemente da temperatura.

b) Recuperação da fotossíntese

Ao término do período de 15 minutos de exposição às diferentes DFF, foi observado o novo valor do sinal fotoacústico, eliminando-se desse a contribuição da componente fototérmica, sendo os resultados expressos em porcentagem de recuperação do sinal fotobárico inicial, conforme ilustrado na figura 34.

Após a exposição às DFF de 500 e 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, *E. urophylla* apresentou 110% de recuperação, em média, do sinal fotobárico inicial, sem haver diferença entre os efeitos dessas DFF. Contudo, após a exposição às DFF de 2000 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, foi verificada uma recuperação de 75%, em média, do sinal fotobárico inicial, sem se constatar diferenças entre os efeitos dessas DFF e das temperaturas de aclimatação.

Para *E. grandis*, as DFF de 500 e 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ resultaram numa recuperação de 144,9%, em média, do sinal fotobárico inicial, mas com as DFF de 2000 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, a recuperação no sinal decresceu para 84,4%. Também não foi observada diferença entre os efeitos das temperaturas de aclimatação sobre a recuperação do sinal fotobárico de *E. grandis*.

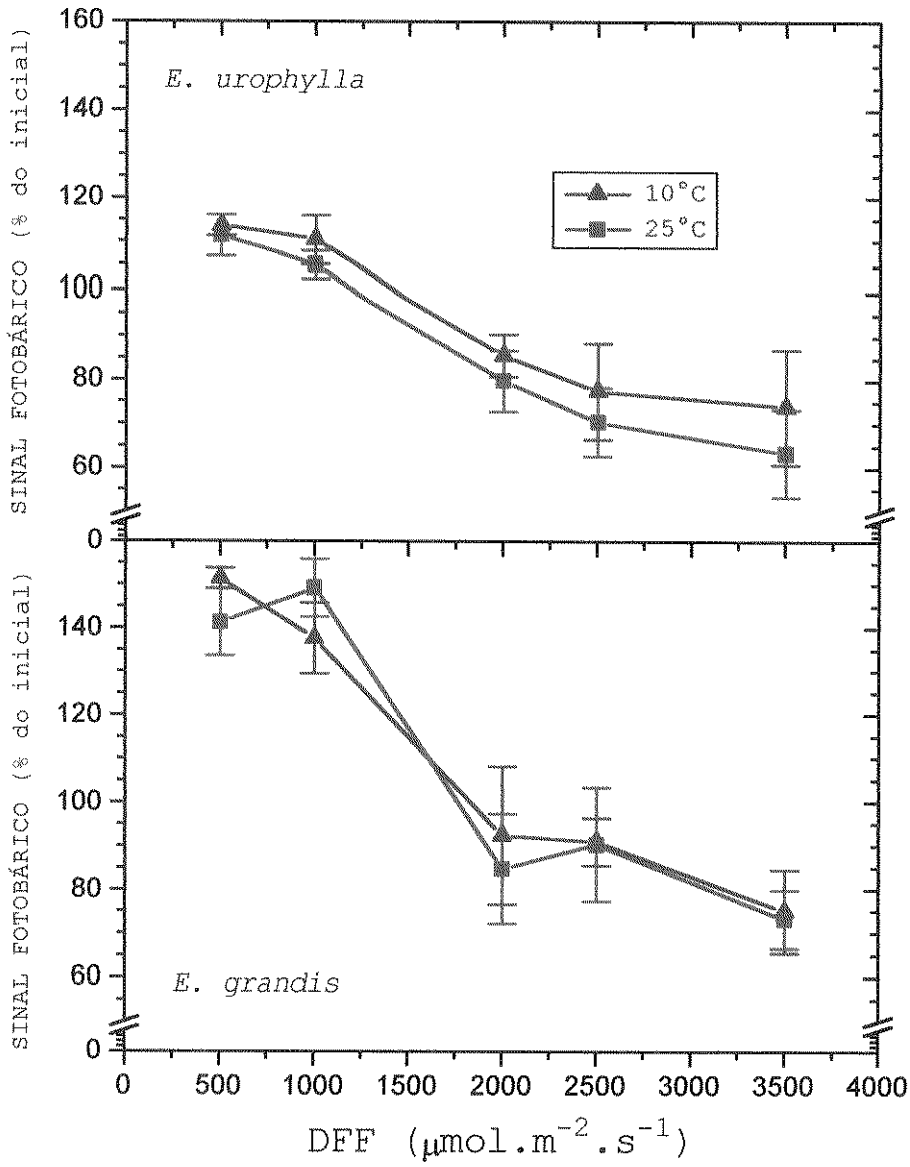


Figura 34. Recuperação do sinal fotobárico de *E. urophylla* e *E. grandis*, aclimatadas a 10 e 25°C, após 15 minutos de exposição a densidades crescentes de fluxo de fótons (DFF). Média de pelo menos cinco repetições ± desvio padrão.

E. grandis apresentou maior recuperação no sinal fotobárico que *E. urophylla* quando exposto a DFF de 500 a 1000µmol $m^{-2}s^{-1}$, independentemente da temperatura de aclimatação. Para DFF superior a 2000µmol $m^{-2}s^{-1}$, a

porcentagem de recuperação do sinal fotobárico inicial das duas espécies foi semelhante.

A incapacidade de recuperação do sinal fotobárico de *E. urophylla* e *E. grandis* após 15 minutos de exposição a DFF superior a 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ demonstra a ocorrência do fenômeno da fotoinibição da fotossíntese. Esse fenômeno se mostrou irreversível com até duas horas de readaptação das plantas ao escuro após o tratamento fotoinibitório com DFF de 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$. Foi verificado que a fotoinibição da fotossíntese foi mais acentuada nas folhas de *E. urophylla*, uma vez que a recuperação do sinal fotobárico foi de 75%, enquanto para *E. grandis* foi de 84,4%. Para as DFF de 500 e 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, que não foram fotoinibitórias, *E. grandis* apresentou maior taxa fotossintética (sinal fotobárico) que *E. urophylla*. Como conseqüência, se considerarmos esse ganho na taxa fotossintética decorrente da exposição até 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, a fotoinibição foi mais severa para *E. grandis*, reduzindo em 41,7% o seu potencial fotossintético. Para *E. urophylla*, essa redução foi de 31,8%. Para ambas espécies de eucalipto não foi constatado efeito diferenciado das temperaturas de aclimatação sobre o fenômeno da fotoinibição.

4.4. Efeito da temperatura na cinética de indução da fluorescência

Na figura 35 encontram-se expressos os resultados da fluorescência inicial (Fo), máxima (Fm) e variável (Fv) da

clorofila **a** de folhas de *E. urophylla* e *E. grandis* em função do tempo de aclimatação a 15 e 30°C.

Nessa figura pode-se observar que enquanto as plantas se encontravam no escuro, após 11 horas de aclimatação a 15 e 30°C, o valor de Fo não diferenciou entre as espécies de eucalipto e entre as temperaturas de aclimatação, permanecendo em 591 unidades de fluorescência (UF), em média. Contudo, após 12 horas de exposição a DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$, o valor de Fo nas plantas aclimatadas a 15°C aumentou para 780 UF, em média, enquanto nas plantas aclimatadas a 30°C o valor de Fo se manteve constante, não havendo diferença entre as espécies. Doze horas após a exposição a luz, período esse em que as plantas se encontravam no escuro, totalizando 36 horas de aclimatação nas duas temperaturas, foi verificado que o valor de Fo das plantas aclimatadas a 15°C aumentou para 1177 UF, enquanto o das plantas aclimatadas a 30°C permaneceu constante em 629 UF, sem se constatar diferença entre as espécies. Entretanto, após novo período de 12 horas de exposição a DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$, correspondendo a 48 horas de aclimatação nas duas temperaturas, foi observado que o valor de Fo das plantas aclimatadas a 15°C decresceu (1038 UF), principalmente em *E. grandis*, cujo valor de Fo (1020 UF) foi significativamente menor que o obtido na avaliação anterior (1199 UF). Seguindo outro período de 12 horas no escuro, totalizando 60 horas de aclimatação nas duas temperaturas, o valor de Fo das plantas aclimatadas a 15°C decresceu ainda mais, principalmente em *E. grandis*, cujo valor de Fo (772±42 UF) tendeu a se igualar ao das plantas

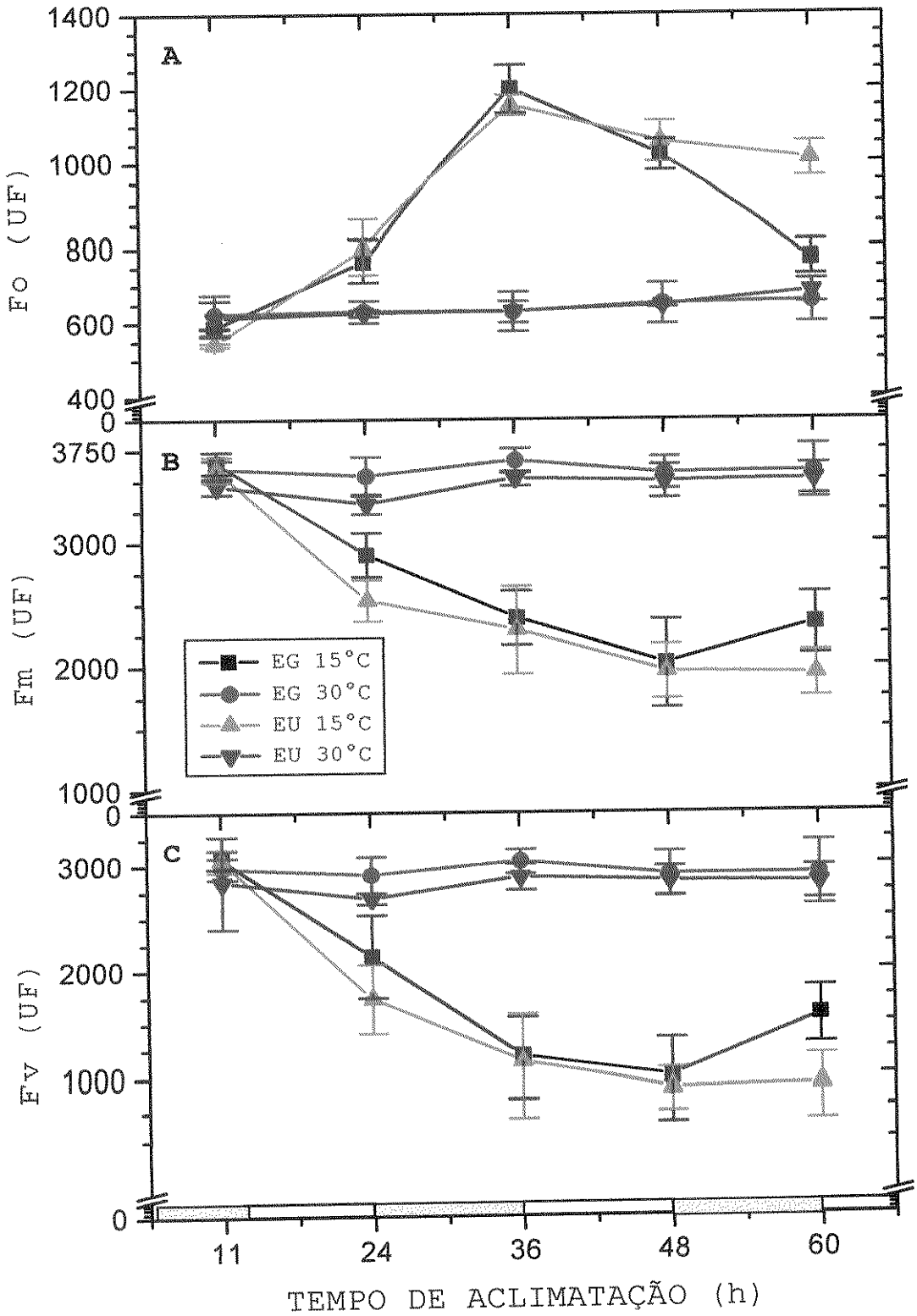


Figura 35. Valores de fluorescência inicial (Fo), máxima (Fm) e variável (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de *E. urophylla* e *E. grandis* decorrentes do tempo de aclimatação a 15 e 30°C, onde ▭ corresponde ao período no escuro. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

aclimatadas a 30°C (658±32 UF). Nesse período, o valor de Fo das plantas aclimatadas a 30°C se manteve igual ao determinado nas avaliações anteriores.

O comportamento dos resultados de Fm e Fv foi semelhante (figura 35B e C). Tanto a Fm como a Fv das plantas aclimatadas a 30°C permaneceu constante ao longo de 60 horas de aclimatação, não se constatando diferenças entre as espécies de eucalipto. Para as plantas aclimatadas a 15°C foi observado que enquanto essas se encontravam no escuro, após 11 horas de aclimatação, os valores de Fm e Fv não diferenciaram do obtido nas plantas aclimatadas a 30°C. Contudo, ao término de mais 12 horas de exposição a DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$, os valores de Fm e Fv dessas plantas decresceram significativamente. Doze horas após a exposição a luz, período esse em que as plantas voltaram a permanecer no escuro, totalizando 36 horas de aclimatação a 15°C, foi verificado que os valores de Fm e Fv voltaram a decrescer. Esse comportamento de decréscimo nos valores de Fm e Fv se manteve até o término do período de aclimatação (60 horas), independentemente se as plantas foram expostas ou não a luz. Não foi constatada diferença entre as espécies de eucalipto ao longo do período de aclimatação, mas após 60 horas de aclimatação a 15°C foi verificada tendência de recuperação nos valores de Fm de *E. grandis*, enquanto a Fv dessas plantas foi significativamente maior que o das plantas *de E. urophylla*.

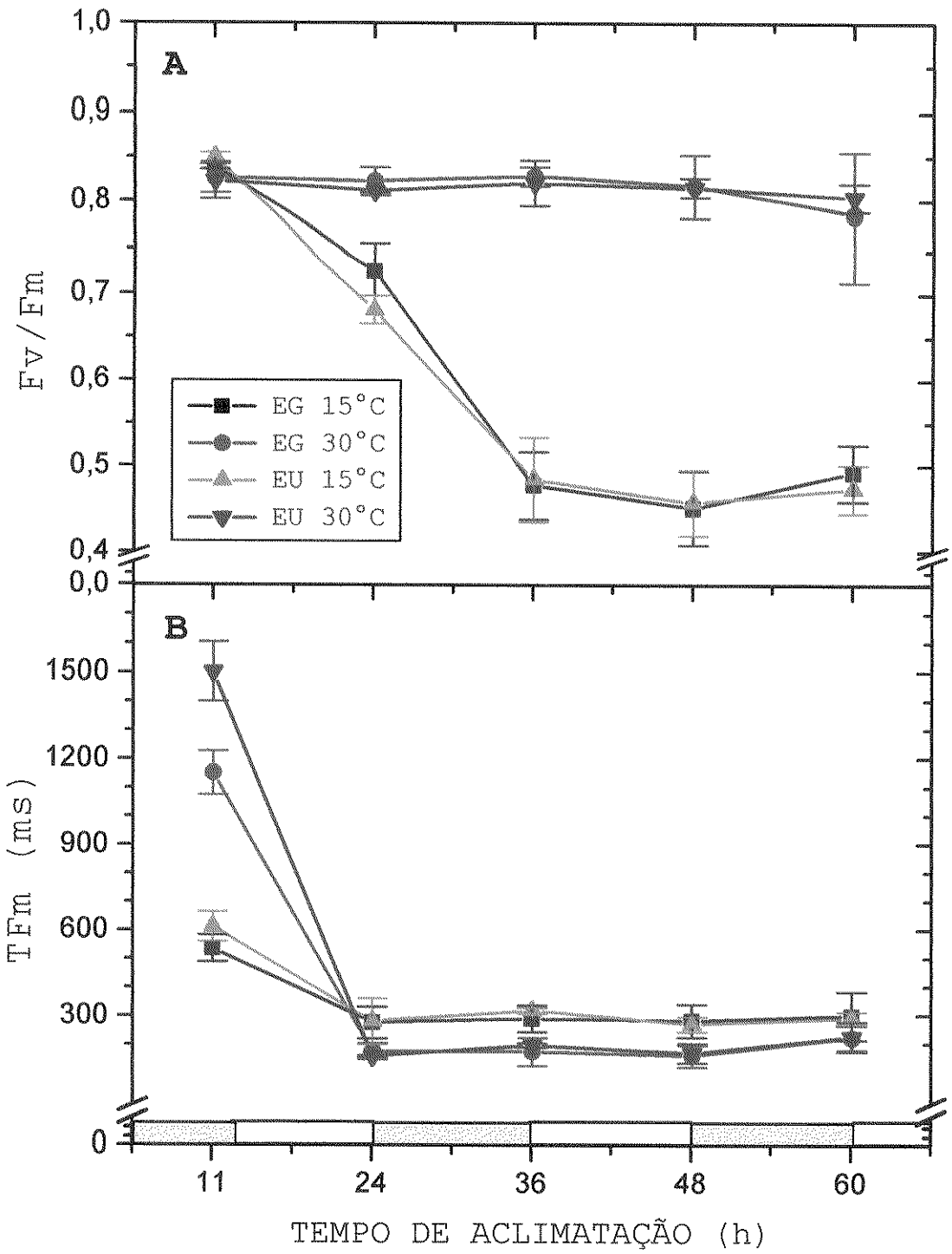


Figura 36. Relação entre fluorescência variável e máxima (Fv/Fm) e tempo necessário para atingir a fluorescência máxima (TFm) em folhas de *E. urophylla* e *E. grandis* em função do tempo de aclimatação a 15 e 30°C, onde ▭ corresponde ao período no escuro. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

Quanto a relação Fv/Fm (figura 36A), foi observado que essa se manteve constante em 0,815, em média, no decorrer de 60 horas de aclimatação a 30°C para as duas espécies de eucalipto, que não diferenciaram entre si. Para as plantas aclimatadas a 15°C foi verificado que enquanto elas se encontravam no escuro, após as primeiras 11 horas de aclimatação, o valor da relação Fv/Fm (0,839) não diferenciou do obtido nas plantas aclimatadas a 30°C, não se constatando, novamente, diferença entre as espécies. Contudo, ao término de 12 horas de exposição a DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$, a relação Fv/Fm dessas plantas diminuiu para 0,704, em média. Doze horas após a exposição a luz, período esse em que as plantas voltaram a permanecer no escuro, totalizando 36 horas de aclimatação a 15°C, foi verificado que a relação Fv/Fm decresceu para 0,480, permanecendo nesse valor até o término do período de aclimatação, sem haver diferença entre as espécies.

Enquanto as plantas se encontravam no escuro, nas primeiras 11 horas de aclimatação, o tempo necessário para a fluorescência da clorofila **a** atingir seu valor máximo (TFm) foi maior para as plantas aclimatadas a 30°C do que para as aclimatadas a 15°C (figura 36B). Para as plantas aclimatadas a 15°C não foi constatada diferença no TFm entre as espécies (574ms, em média), mas para as plantas aclimatadas a 30°C o TFm de *E. urophylla* (1502ms) nessas primeiras 11 horas de aclimatação foi maior que o de *E. grandis* (1152ms). Após as 12 horas de exposição a luz, o TFm das plantas aclimatadas a 15 e 30°C diminuiu para 222ms, em média, não sendo mais

constatada diferença entre as espécies e entre as temperaturas. Esse comportamento do TFm se manteve até o término das 60 horas de aclimatação.

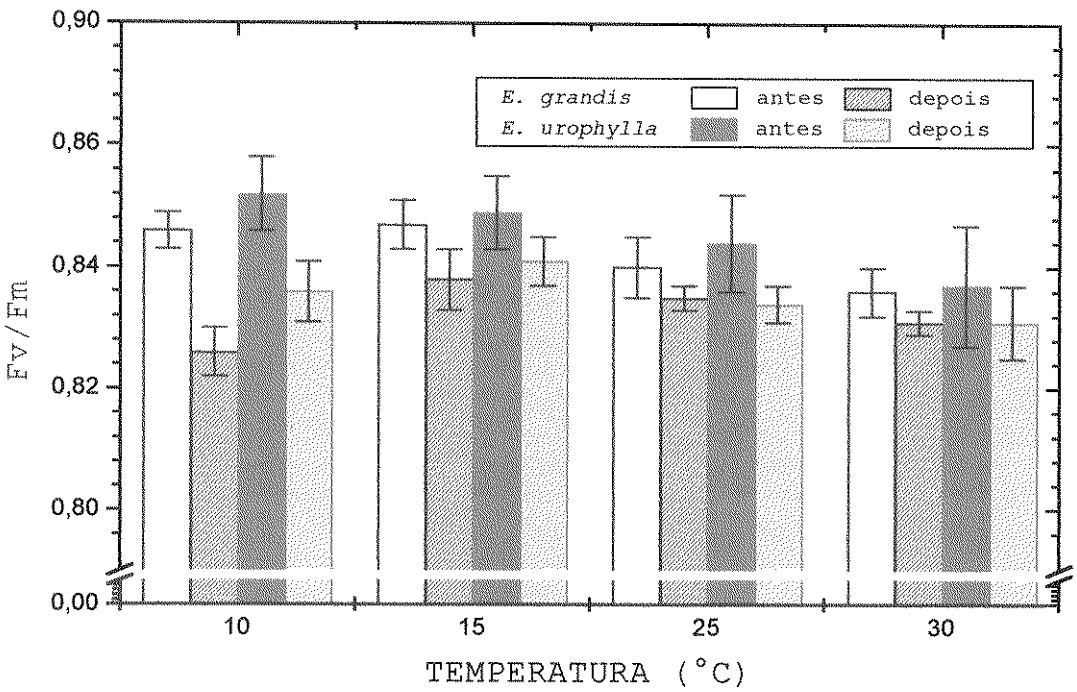


Figura 37. Valores da relação entre a fluorescência variável e máxima (Fv/Fm) em folhas de *E. urophylla* e *E. grandis*, aclimatadas a 10, 15, 25 e 30°C, antes e depois da exposição a 600μmol $m^{-2}s^{-1}$ por 2 horas. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

Foi observado que após 12 horas de aclimatação a 10, 15, 25 e 30°C, no escuro, os valores de Fv/Fm de *E. urophylla* e *E. grandis* não foram afetados pelas temperaturas e não diferenciaram entre as espécies (figura 37). Contudo, após 2 horas de exposição a DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$, o valor de Fv/Fm das plantas aclimatadas a 10°C diminuiu significativamente

quando comparado ao das plantas que se encontravam no escuro, principalmente nas plantas de *E. grandis*, cujo valor de Fv/Fm foi, inclusive, menor que o de *E. urophylla* e que o obtido nas demais temperaturas de aclimatação após a exposição a luz. Para as temperaturas de 15, 25 e 30°C, a exposição das plantas por 2 horas a DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$ não reduziu significativamente o valor de Fv/Fm, embora nas plantas aclimatadas a 15°C tenha sido observada tendência de redução, em função da amplitude de seus resultados. Para essas temperaturas não foram verificadas diferenças no valor de Fv/Fm entre as espécies de eucalipto em decorrência da exposição a luz.

4.5. Efeito da densidade de fluxo de fótons na cinética de indução da fluorescência, sob duas temperaturas.

A fluorescência inicial (Fo) nas folhas de *E. grandis* aumentou com a densidade de fluxo de fótons (DFF) de até 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, permanecendo constante até 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, sem se constatar efeito da temperatura de aclimatação (figura 38A). A partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi observado que a Fo das plantas aclimatadas a 10°C voltou a aumentar e se estabilizou até 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto a Fo das plantas aclimatadas a 25°C manteve-se constante e significativamente menor que a das plantas aclimatadas a 10°C.

Para *E. urophylla*, a Fo aumentou até 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, também sem se constatar efeito da temperatura de aclimatação. Para as plantas aclimatadas a 10°C a Fo voltou a aumentar com

DFF de 2500μmol $m^{-2}s^{-1}$, se estabilizando até 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto nas plantas aclimatadas a 25°C a Fo permaneceu constante e menor que a das aclimatas a 10°C.

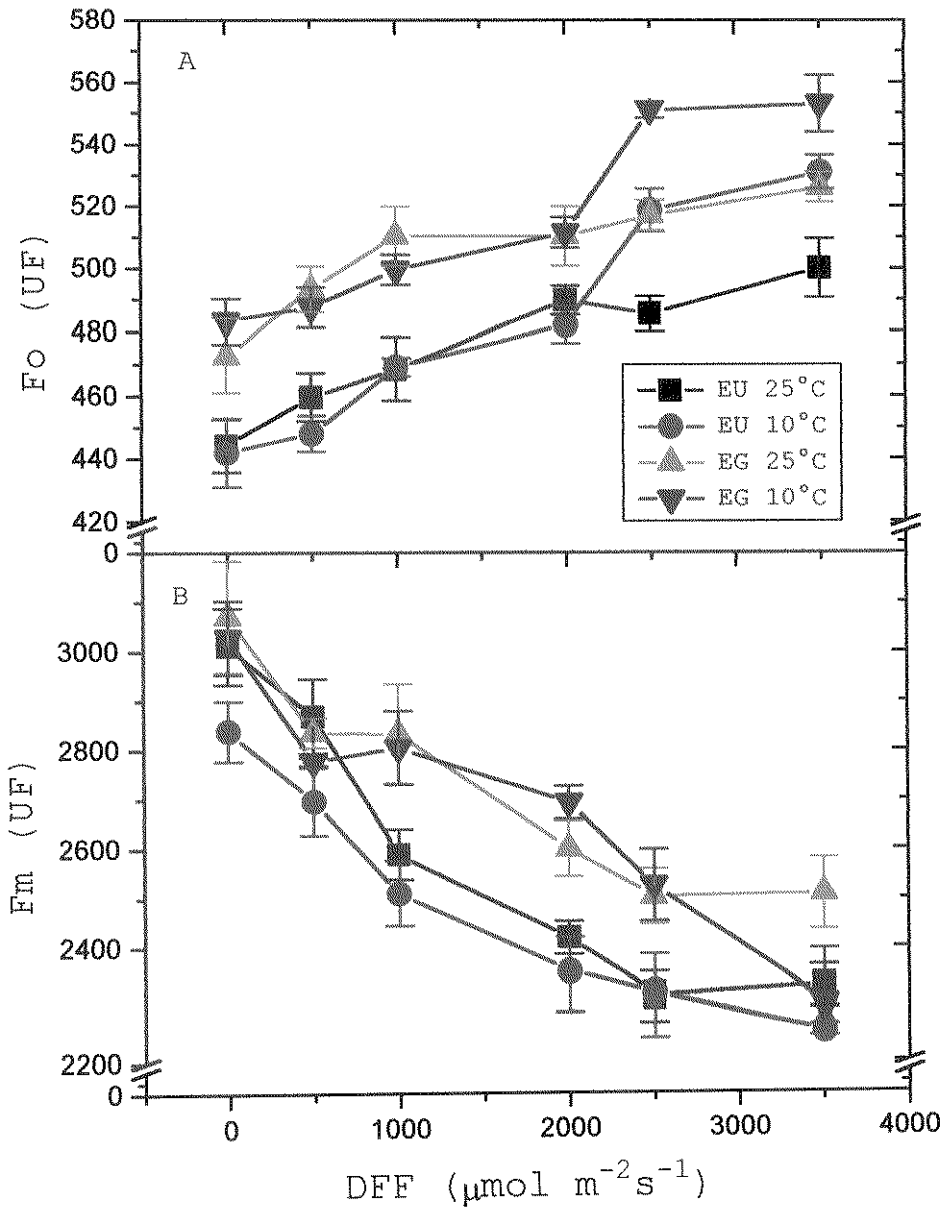


Figura 38. Fluorescência inicial - Fo (A) e máxima - Fm (B) em folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) aclimatadas a 10 e 25°C e expostas a densidades crescentes de fluxo de fótons (DFF). Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

Dentro de cada temperatura de aclimatação e de cada DFF (inclusive no escuro), a Fo de *E. urophylla* foi significativamente menor que a de *E. grandis*. A Fo das duas espécies se igualaram quando as plantas de *E. urophylla* foram aclimatadas a 10°C e as de *E. grandis* foram aclimatadas a 25°C, sendo ambas expostas a DFF de 2500 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$.

A fluorescência máxima (Fm) das folhas de *E. urophylla* decresceu com o aumento da DFF, independentemente da temperatura da aclimatação (figura 38B). Até a DFF de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$, a Fm das plantas aclimatadas a 25°C foi maior que a das plantas aclimatadas a 10°C, mas a partir de 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ não mais se constatou efeito diferenciado da temperatura de aclimatação.

Para *E. grandis*, nas duas temperaturas de aclimatação, a Fm decresceu com o aumento da DFF. Nas plantas aclimatadas a 25°C foi observado que a Fm permaneceu constante nos intervalos de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ e de 2000 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto nas plantas aclimatadas a 10°C a constância de Fm foi observada apenas no intervalo de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$. Foi constatado efeito da temperatura apenas quando as plantas foram expostas a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, onde a Fm das plantas aclimatadas a 25°C foi maior que a das plantas aclimatadas a 10°C.

A Fm de *E. urophylla* foi menor que a *E. grandis* no intervalo de 1000 a 2500μmol $m^{-2}s^{-1}$, principalmente quando essas foram aclimatadas a 10°C. Quando as plantas se encontravam no escuro, a Fm de *E. urophylla* aclimatada a 25°C se igualou à de *E. grandis* aclimatada nas duas temperaturas.

A 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ a Fm de *E. grandis* aclimatada a 10°C se igualou a de *E. urophylla* aclimatada nas duas temperaturas.

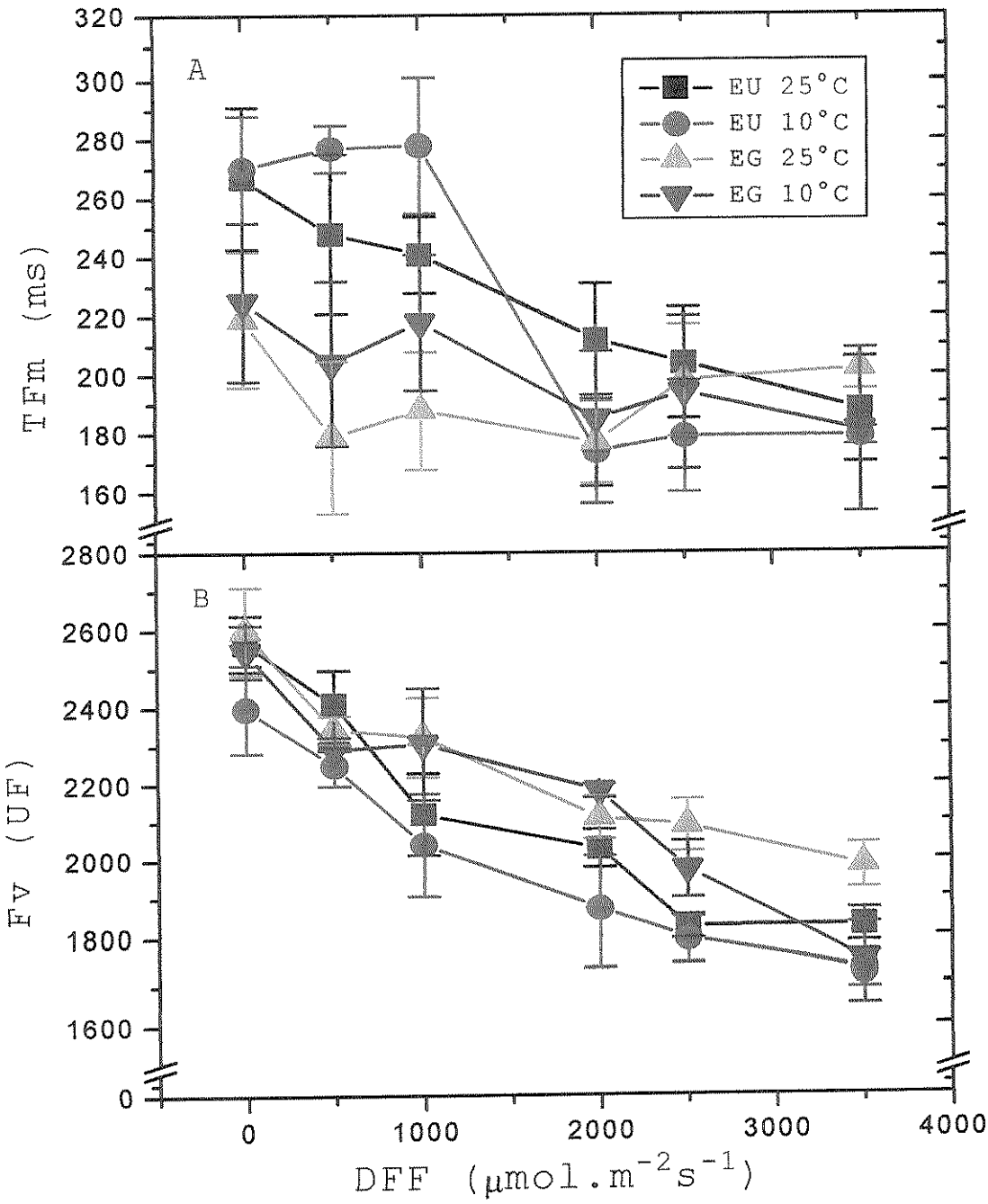


Figura 39. Tempo para atingir a fluorescência máxima - TFm (A) e fluorescência variável - Fv (B) em folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) aclimatadas a 10 e 25°C e expostas a densidades crescentes de fluxo de fótons (DFF). Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

O tempo necessário para atingir a fluorescência máxima (TFm) nas plantas de *E. urophylla* aclimatada nas duas temperaturas diminuiu com o aumento da DFF, principalmente a partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, quando o TFm foi significativamente menor que o observado para as DFF de 0 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, intervalo esse em que o TFm manteve-se constante (figura 39A). Foi observado que o TFm das plantas aclimatadas a 10°C demonstrou tendência de ser maior que o das plantas aclimatadas a 25°C no intervalo de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$; a partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi observado comportamento contrário do TFm em função da temperatura de aclimatação.

Para *E. grandis* o TFm manteve-se praticamente constante com o aumento da DFF, independentemente da temperatura de aclimatação. Para essa espécie não foi constatado efeito da temperatura de aclimatação.

Com DFF de até 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi verificada tendência de maior TFm nas plantas de *E. urophylla* quando comparadas com as de *E. grandis*, principalmente quando as plantas de *E. urophylla* foram aclimatadas a 10°C.

A fluorescência variável (Fv) nas plantas de *E. urophylla* decresceu com o aumento da DFF, independentemente da temperatura de aclimatação, a qual não causou efeito diferenciado significativo, mas apenas tendência de maior Fv nas plantas aclimatadas a 25°C quando expostas a DFF de até 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ (figura 39B).

Para *E. grandis*, aclimatada nas duas temperaturas, a Fv também decresceu com o aumento da DFF. Para essa espécie foi

observada uma fase de estabilização na Fv com DFF de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, nas duas temperaturas de aclimatação e uma outra fase de estabilização na Fv de 2000 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ nas plantas aclimatadas a 25°C. Com DFF de 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi verificado que a Fv das plantas aclimatadas a 10°C foi significativamente menor que a das plantas aclimatadas a 25°C.

A partir da DFF de 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, *E. grandis* apresentou tendência de maior Fv que *E. urophylla*, principalmente quando essa última foi aclimatada a 10°C. Contudo, a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi observado que a Fv de *E. grandis* aclimatada a 10°C se igualou à de *E. urophylla* aclimatada nas duas temperaturas.

A relação entre a fluorescência variável e a máxima (Fv/Fm) nas duas espécies de eucalipto decresceu com o aumento da DFF, nas duas temperaturas de aclimatação (figura 40A). Para *E. urophylla* esse decréscimo foi mais acentuado a partir de 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, sem se constatar efeito da temperatura, enquanto para *E. grandis* foi observado que Fv/Fm decresceu a partir de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$ e manteve-se constante até 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, também sem efeito da temperatura. Com DFF superior a 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ houve decréscimo acentuado na Fv/Fm, principalmente nas plantas de *E. grandis* aclimatadas a 10°C, cujos valores foram significativamente inferiores que os das plantas aclimatadas a 25°C.

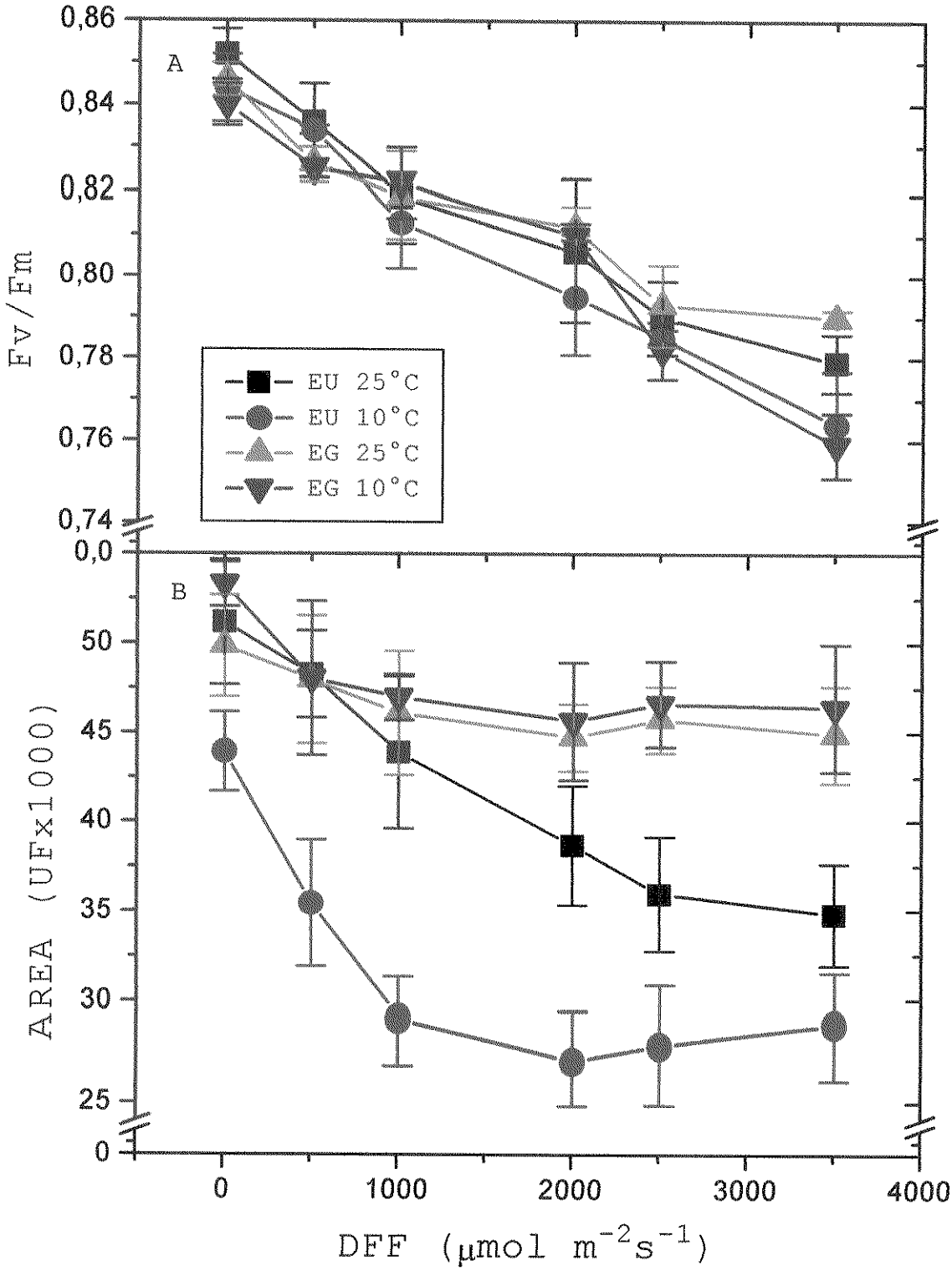


Figura 40. Relação entre a fluorescência variável e máxima - Fv/Fm (A) e área sobre a curva de fluorescência (B) em folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) aclimatadas a 10 e 25°C e expostas a densidades crescentes de fluxo de fótons (DFF). Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

Não foi constatada diferença na Fv/Fm entre as espécies de eucalipto quando as plantas foram expostas até 2500 μmol $m^{-2}s^{-1}$. Contudo, a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi verificado que a Fv/Fm de *E. grandis* aclimatada a 25°C foi maior que a das plantas de *E. urophylla* aclimatadas nas duas temperaturas.

A área sobre a curva de fluorescência de *E. urophylla* decresceu com o aumento da DFF, nas duas temperaturas de aclimatação (figura 40B). Contudo, as plantas aclimatadas a 10°C apresentaram menor área que as aclimatadas a 25°C já a partir de 0μmol $m^{-2}s^{-1}$, sendo que a área manteve-se constante em DFF superiores a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$. Nas plantas aclimatadas a 25°C a área se manteve constante a partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$.

Para *E. grandis* não foi constatado efeito da DFF na área, sendo que essa permaneceu praticamente constante com o aumento da DFF e não foi influenciada pela temperatura.

A área de *E. grandis* nas duas temperaturas de aclimatação foi significativamente maior que a de *E. urophylla* aclimatada a 10°C já a partir de 0μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto para as plantas aclimatadas a 25°C essa diferença foi observada a partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$.

A fluorescência intermediária J (Fj) nas plantas de *E. urophylla* aclimatadas a 10°C permaneceu constante com o aumento da DFF até 2500μmol $m^{-2}s^{-1}$, sendo que a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ essa demonstrou tendência de redução (figura 41A). Mesmo comportamento foi verificado nas plantas aclimatadas a 25°C, à exceção de que a Fj a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi significativamente inferior a obtida nas demais DFF. A Fj das plantas aclimatadas a

25°C foi menor que a das plantas aclimatadas a 10°C quando essas foram expostas a DFF acima de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$.

Para *E. grandis*, a Fj permaneceu constante até 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, após os quais decresceu acentuadamente e permaneceu constante até 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$. Não foi constatado efeito da temperatura de aclimatação no comportamento da Fj.

A Fj de *E. urophylla* foi maior que a de *E. grandis* nas duas temperaturas de aclimatação, em todas as DFF testadas, à exceção de 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, cujo valor de Fj de *E. urophylla* aclimatada a 25°C se igualou ao da *E. grandis* aclimatada a 10°C.

A fluorescência intermediária I (Fi) decresceu com o aumento da DFF, nas duas espécies de eucalipto aclimatadas nas duas temperaturas (figura 41B). Para *E. urophylla* esse decréscimo se manifestou a partir de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto para *E. grandis* foi a partir de 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$. Foi constatado efeito da temperatura de aclimatação em *E. urophylla* quando as plantas se encontravam no escuro e após a exposição a 500μmol $m^{-2}s^{-1}$, sendo que as plantas aclimatadas a 25°C apresentaram maior Fi. Para *E. grandis* o efeito da temperatura foi verificado após a exposição a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, quando as plantas aclimatadas a 25°C apresentaram maior Fi do que as aclimatadas a 10°C. Para as plantas aclimatadas a 10°C, independentemente da espécie, foi verificado que a Fi permaneceu constante para DFF maiores que 2500μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto para as plantas aclimatadas a 25°C a Fi decresceu.

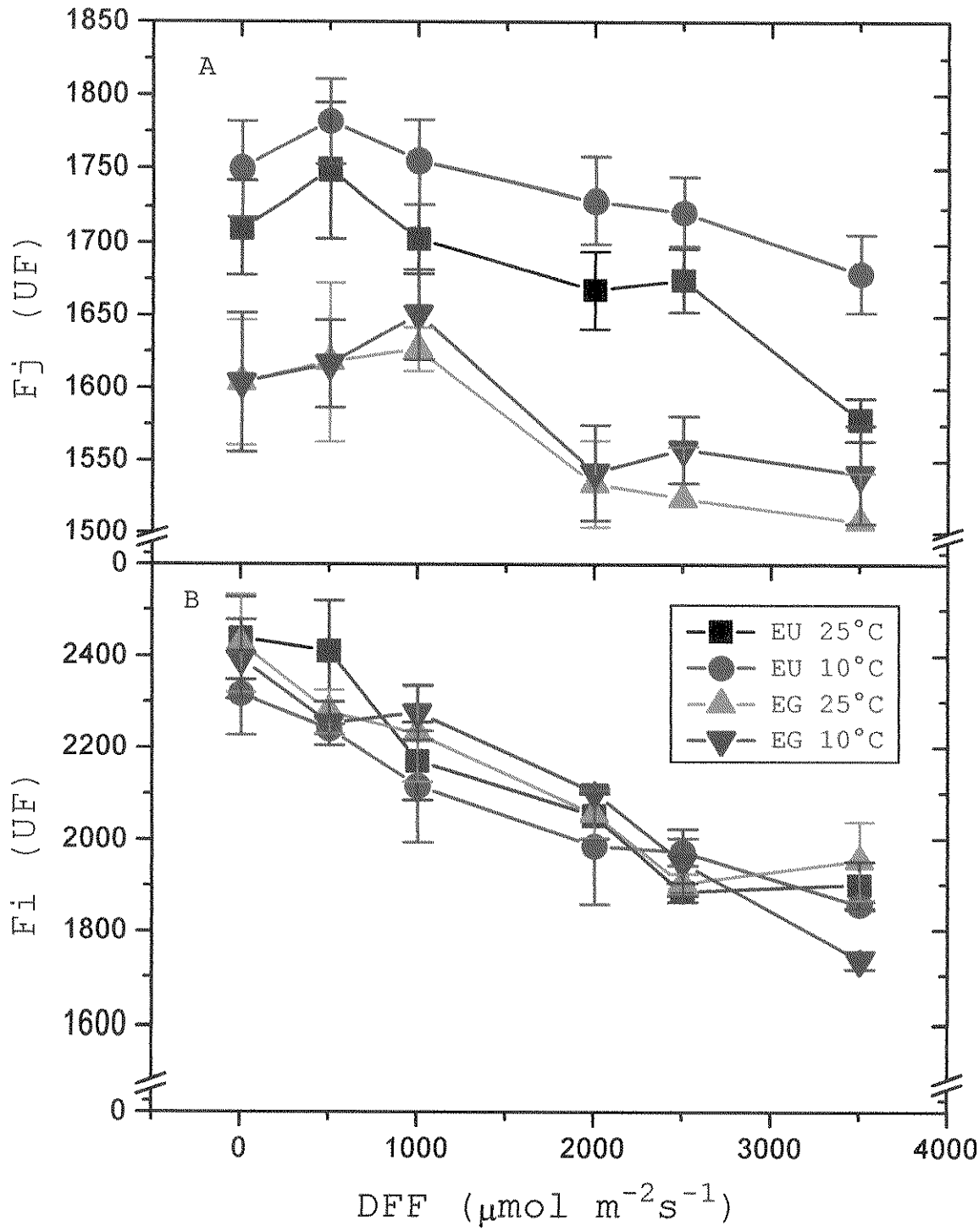


Figura 41. Fluorescências intermediárias I - Fi (A) e J - Fj (B) em folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) aclimatadas a 10 e 25°C e expostas a densidades crescentes de fluxo de fótons (DFF). Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

A velocidade com que a fluorescência passou do nível intermediário J para o I (Fj>Fi) nas plantas de *E. urophylla* diminuiu com o aumento da DFF (figura 42A). Essa diminuição se manifestou a partir de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$ nas plantas aclimatadas a 10°C e a partir de 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ nas plantas aclimatadas a 25°C. Para ambas temperaturas de aclimatação, Fj>Fi manteve-se constante para DFF superior a 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$. As plantas aclimatadas a 25°C apresentaram maior Fj>Fi que as aclimatadas a 10°C já a partir de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$.

Para *E. grandis*, Fj>Fi decresceu com a exposição a 500μmol $m^{-2}s^{-1}$, após os quais manteve-se constante até 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, sem que tenha sido constatado efeito da temperatura. Para as plantas aclimatadas a 10°C, Fj>Fi voltou a decrescer com a exposição a DFF de 2500 e 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, enquanto nas plantas aclimatadas a 10°C a Fj>Fi decresceu com a exposição a 2500μmol $m^{-2}s^{-1}$, após os quais manteve-se constante. Foi verificado efeito da temperatura apenas na DFF de 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$, onde Fj>Fi das plantas aclimatadas a 25°C foi maior que a das plantas aclimatadas a 10°C.

Plantas de *E. grandis*, nas duas temperaturas de aclimatação, apresentaram Fj>Fi maior que a das plantas de *E. urophylla* aclimatadas a 10°C em todas as DFF testadas. Para as plantas aclimatadas a 25°C essa diferença se manifestou a partir da DFF de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$, sendo que a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ a Fj>Fi das plantas de *E. grandis* a 10°C se igualou a de *E. urophylla* a 25°C.

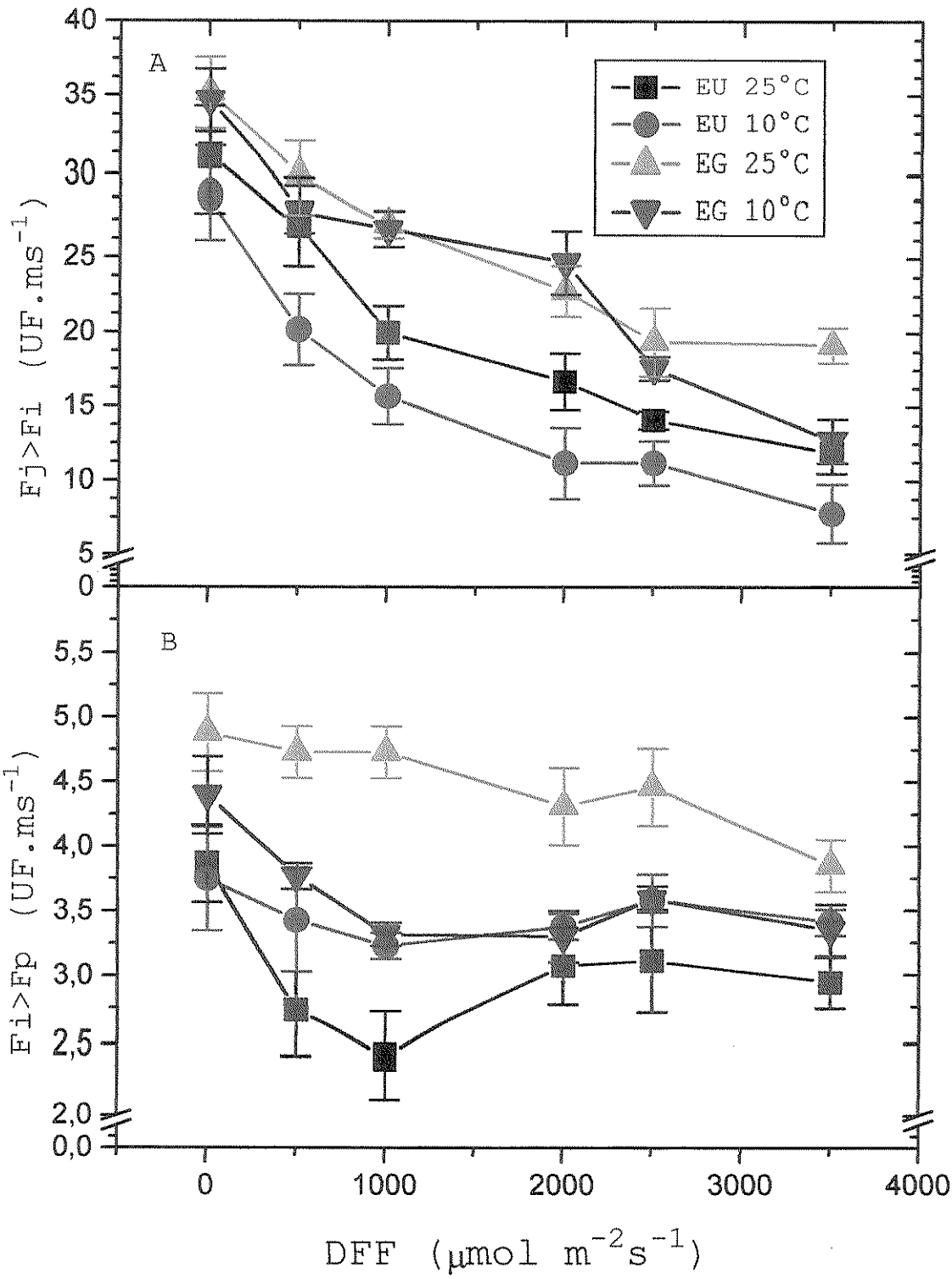


Figura 42. Velocidade de transição da fluorescência Fj para Fi (A) e de Fi para Fp (B) em folhas de *E. urophylla* (EU) e *E. grandis* (EG) aclimatadas a 10 e 25°C e expostas a densidades crescentes de fluxo de fótons (DFF). Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

A velocidade com que a fluorescência passou do nível intermediário I para o P (Fi>Fp) nas plantas de *E. urophylla* aclimatadas a 10°C não foi afetada pela DFF, enquanto nas plantas aclimatadas a 25°C essa reduziu com a exposição a 500μmol $m^{-2}s^{-1}$ e manteve-se constante até 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ (figura 42B). As plantas aclimatadas a 10°C apresentaram tendência de maior Fi>Fp que as aclimatadas a 25°C após a exposição a luz, sendo essa significativa nas DFF de 500 e 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$.

Para *E. grandis*, foi observado que Fi>Fp das plantas aclimatadas a 25°C não foi afetada pela DFF até 2500μmol $m^{-2}s^{-1}$, mas reduziu após a exposição a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$. Para as plantas aclimatadas a 10°C, Fi>Fp decresceu com o aumento da DFF até 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, após os quais permaneceu constante. A Fi>Fp das plantas aclimatadas a 25°C foi maior que a das plantas aclimatadas a 10°C a partir de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$.

E. grandis aclimatada a 25°C apresentou Fi>Fp maior que a de *E. urophylla* aclimatada nas duas temperaturas em todas as DFF testadas, enquanto a Fi>Fp de *E. grandis* a 10°C se igualou a de *E. urophylla* aclimatada a 10°C e foi maior que a de *E. urophylla* a 25°C somente nas DFF de 500 e 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$.

4.5.1. Recuperação do tratamento fotoinibitório.

A relação Fv/Fm tem sido muito utilizada no diagnóstico do efeito de diferentes tipos de estresses (SMILLIE & HETHERINGTON, 1983). Na tabela 5 pode-se observar que após 12 horas do tratamento fotoinibitório, período esse em que as

plantas permaneceram no escuro sob as duas temperaturas de aclimatação, os valores da relação Fv/Fm anteriormente obtidos após a exposição a DFF de 500 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ se igualaram aos verificados a 0μmol $m^{-2}s^{-1}$ (no escuro). Esse comportamento da relação Fv/Fm demonstra a recuperação das plantas ao tratamento fotoinibitório de até 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$. Os demais parâmetros de fluorescência analisados (Fo, Fm, Fv, TFm e área), apresentaram o mesmo padrão relatado para Fv/Fm (dados não apresentados).

Tabela 5. Valores de Fv/Fm de *E. urophylla* e *E. grandis* obtidos após 12 horas, no escuro e nas temperaturas de aclimatação, do tratamento fotoinibitório. Média de pelo menos três repetições ± desvio padrão.

ESPÉCIES	T(°C)	Densidade de fluxo de fótons (µmol $m^{-2}s^{-1}$)					
		0	500	1000	2000	2500	3500
Eucalyptus urophylla	10	0,853±0,007	0,852±0,009	0,846±0,008	0,848±0,009	0,848±0,001	0,845±0,007
	25	0,841±0,004	0,834±0,004	0,836±0,006	0,834±0,002	0,835±0,009	0,834±0,002
Eucalyptus grandis	10	0,846±0,004	0,834±0,006	0,835±0,007	0,835±0,005	0,836±0,005	0,837±0,007
	25	0,842±0,004	0,836±0,003	0,838±0,008	0,836±0,002	0,837±0,005	0,837±0,004

5. DISCUSSÃO

A produtividade de plantações de eucalipto está intimamente relacionada a área foliar disponível para a interceptação da energia radiante, fato esse constatado para *E. globulus, E. nitens* e *E. delegatensis* (SANDS *et al.*, 1992).

O crescimento em área foliar é conseqüência da alocação de biomassa em resposta a nutrição e a água, da área foliar específica e da capacidade fotossintética da planta (CROMER & JARVIS, 1990).

BLAKE & BEVILACQUA (1988) verificaram que plantas de *E. grandis* aos 120 DAS acumularam mais matéria seca (principalmente nas raízes), com menor área foliar, mas com maior área foliar específica que plantas de *E. urophylla*. Embora não tenha sido constatada diferença na condutância estomática e na taxa de transpiração entre as espécies, a taxa de fotossíntese de *E. grandis* foi muito superior a de *E. urophylla*, acarretando em maior taxa de crescimento absoluto em massa seca total, sem resultar em diferença na altura das plantas. INOUE & RIBEIRO (1988) também verificaram maior fotossíntese em *E. grandis* aos 120 DAS quando comparado a clones de *E. saligna*, mesmo apresentando menor área foliar e taxa de transpiração semelhante. Em outro trabalho, INOUE *et al.* (1990) constataram maior taxa de fotossíntese em mudas de *E. urograndis* aos 90 dias obtidas por estaquia quando comparadas às obtidas por micropropagação, resultado esse atribuído à maior concentração de clorofilas e carotenos.

Na presente tese, foi verificado que as plantas de *E. urophylla* possuíam maior área foliar e massa de matéria seca de folhas do que *E. grandis* dos 45 aos 120 DAS. Nesse período, *E. grandis* mostrou maior concentração de clorofilas **a**, **b** e **total** nas folhas. Ambas as espécies apresentaram maior TCA em área foliar no período de 75 aos 90 DAS, enquanto em altura e em massa seca a maior TCA foi no período de 90 aos 105 DAS. A TCA de *E. urophylla* foi maior que a de *E. grandis* na fase inicial de crescimento das plantas (45-60 DAS) e *E. grandis* superou *E. urophylla* no período de 90 aos 105 DAS.

Ao término do período experimental, aos 120 DAS, as plantas de *E. grandis* atingiram maior altura. As suas folhas possuíam maior densidade estomática, enquanto as de *E. urophylla* apresentaram maior RPF, PEF e espessura das folhas.

Aos 60 DAS, idade essa correspondente à das plantas utilizadas nos demais ensaios, foi observado que *E. urophylla* superou *E. grandis* nas seguintes características: área foliar, massa de matéria seca de todas as partes da planta, RAF e AFE, enquanto *E. grandis* apresentou maior conteúdo das clorofilas, relação clor**a**/clor**b**, PEF e espessura das folhas. Nessa época, não foi constatada diferença entre espécies quanto a altura das plantas, relação PA/SR, RPF e densidade estomática.

A energia radiante absorvida por uma folha é resultado da irradiância incidente menos aquela que se perde por reflexão e transmissão. A absorção pela água contida na folha é alta em λ de 1300 a 2500nm, resultando no decréscimo da reflectância e transmitância. Entre 700 e 1300nm a absorção pela água é pouca e as folhas geralmente não contêm outras substâncias que

absorvem fortemente nessa faixa. Portanto, a reflectância e a transmitância em λ de 700 a 1300nm são relativamente altas. Na faixa visível do espectro da luz (λ=400 a 700nm), a absorbância da água é muito mais fraca do que na região do infravermelho, o que pode ser caracterizada por sua alta transmitância. Entretanto, clorofilas e pigmentos acessórios, como os carotenóides, absorvem fortemente entre 400 e 700nm, o que faz com que a reflectância e transmitância nessa faixa seja tipicamente baixa. Portanto, a absorção de irradiância pela água e pigmentos determina o espectro de absorbância, reflectância e transmitância de uma folha (CARTER, 1991).

O conteúdo de água em uma folha influencia direta e indiretamente a sua absorbância. O efeito direto refere-se unicamente às propriedades radiativas da água, enquanto os efeitos indiretos referem-se à influência desse conteúdo de água na absorbância de outras substâncias nas folhas, como os pigmentos, assim como nas múltiplas reflexões no interior da folha. Esses processos dependem, ainda, da estrutura interna da folha, incluindo tamanho, forma, número, distribuição e ultraestruturas das células (GAUSMAN & ALLEN, 1973; CARTER, 1991).

Embora nesse trabalho tenha se verificado que a absorção total de irradiância tenha sido semelhante pelas folhas das duas espécies de eucalipto, *E. grandis* refletiu mais e transmitiu menos energia radiante a λ=680nm. Para λ=700nm, *E. grandis* refletiu e transmitiu menos que *E. urophylla*, resultando em maior absorção de irradiância nesse comprimento de onda por *E. grandis*, o que se deve, provavelmente, ao seu

maior conteúdo de clorofilas, uma vez que o estado hídrico das plantas das duas espécies era semelhante (resultados não apresentados).

Nas avaliações realizadas com o eletrodo de Clark foi verificado que a fotossíntese máxima ($F_{máx}$) de *E. urophylla* foi 48% menor que a de *E. grandis* nas duas temperaturas de aclimatação, com eficiência quântica (Φ) 46% menor e, consequentemente, maior exigência quântica ($1/\Phi$), não apresentando diferenças no ponto de compensação luminoso (PCL) e na densidade de fluxo de fótons (DFF) necessária para atingir metade da fotossíntese máxima ($DFF_{1/2}$) e a saturação da fotossíntese (DFF_{sat}). *E. grandis* aclimatado a 25°C apresentou maior respiração no escuro (RE) que *E. urophylla* aclimatado nas duas temperaturas.

A maior capacidade e/ou taxa fotossintética de *E. grandis*, comparando-a com a de outras espécies, tem sido relatada em vários trabalhos. BLAKE & BEVILACQUA (1988) verificaram que a fotossíntese líquida de *E. grandis* aos 15 meses de idade foi superior a de *E. urophylla* e *E. cloeziana*. Quando as mudas de *E. grandis* foram obtidas por estaquia (clones 79, 33 e 93), essa diferença tornou-se mais acentuada. INOUE & ODA (1988) e INOUE & RIBEIRO (1988) constataram que a fotossíntese líquida de clones de *E. grandis* foi superior a de clones de *E. saligna* e a do híbrido *E. urograndis*. SANDS *et al.*(1992) verificaram que a Φ de *E. grandis* (Φ=0,044±0,001) foi independente do suprimento de nitrogênio (N), mas $F_{máx}$ diminuiu com a redução na dose de N (de 18μmol $m^{-2}s^{-1}$ para 10μmol $m^{-2}s^{-1}$). A taxa de

fotossíntese saturou em 900μmol $m^{-2}s^{-1}$, com a maior dose de N, e em 500μmol $m^{-2}s^{-1}$, com a menor dose de N.

Segundo SANDS *et al.* (1992), EVANS *et al.* (1993) e ÖGREN & EVANS (1993) a curva de resposta da fotossíntese de *Eucalyptus* (incluindo *E. grandis*) à irradiância pode ser modelada como uma função hiperbólica não retangular, cuja convexidade (θ) depende da pressão parcial de CO_2 (ρ) e da inter relação entre os gradientes de absorção de luz e a capacidade fotossintética através da folha. Sob baixas irradiâncias, a fotossíntese é limitada pela taxa de transporte de elétrons, enquanto sob altas irradiâncias a fotossíntese é freqüentemente limitada pela atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco), de acordo com o suprimento de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) (FERRAR *et al.*, 1989; ÖGREN & EVANS, 1993). Existirá, portanto, uma transição na curva, da fase onde há limitação no transporte de elétrons, para uma fase de limitação da atividade de Rubisco. A menor ρ e a menor irradiância na transição fazem com que θ tenda ao valor um. Se a taxa limitante da atividade da Rubisco nunca é atingida, a curva de resposta a luz reflete a resposta da taxa de transporte de elétrons à irradiância e θ tende a zero (ÖGREN & EVANS, 1993).

Enquanto a Φ e a $F_{máx}$ podem ser relacionadas basicamente com as propriedades bioquímicas das folhas, o significado de θ é, provavelmente, devido a vários fatores. O primeiro é que a ativação da Rubisco muda com a irradiância e a transição pode ser abrupta apenas se a ativação total da enzima for alcançada por aquela irradiância (ÖGREN & EVANS, 1993). O segundo fator

que afeta θ é que a curva de resposta da fotossíntese depende, como foi mencionado anteriormente, da absorção de luz através da folha, com consequente gradiente de potencial fotossintético (EVANS *et al.*, 1993).

A curva de resposta da fotossíntese de uma folha a luz representa a soma de curvas de todos os cloroplastos (TERASHIMA & SAEKI, 1985). Esses autores verificaram que 60% da luz incidente em folhas de *Camellia* foi absorvida pelas primeiras 20% das clorofilas. Obviamente, é esperado que o gradiente de absorção de luz seja dependente da concentração de clorofilas, posição e movimento dos cloroplastos e anatomia foliar e, portanto, variando entre espécies. No caso de *Eucalyptus*, EVANS *et al.* (1993) citam que a luz pode ser preferencialmente transmitida através das paredes celulares e vacúolos, evitando as linhas de cloroplastos adjacentes às paredes celulares. Por outro lado, a expansão dos feixes vasculares e a presença de numerosas glândulas de óleo podem atuar como guias para os feixes de luz, facilitando sua penetração mais profunda nas folhas.

O gradiente na capacidade fotossintética é determinado pela taxa de absorção de luz através da folha e pode ser alterado em folhas em desenvolvimento ou totalmente expandidas por mudanças na condição de iluminação da folha como, por exemplo, ângulo de inserção da folha ou inversão da superfície adaxial/abaxial exposta a luz (WONG *et al.*, 1985). ÖGREN & EVANS (1993) verificaram que a iluminação da superfície adaxial de folhas de *E. pauciflora* e *E. maculata* proporcionou maior evolução de O_2 quando comparado à iluminação da superfície

abaxial, revelando a existência de gradiente de absorção de luz através das folhas. Sete dias após a inversão da superfície iluminada, foi observada a reversão na taxa de evolução de O_2, o que implicou na reaclimatação maciça dos cloroplastos no interior das folhas, resultando no aumento da θ.

EVANS (1987) e EVANS & TERASHIMA (1987) verificaram que em folhas de *Pisum sativum* e *Spinacea oleracea* a θ (de aproximadamente 0,7) mostrou-se independente do conteúdo de clorofilas e da irradiação de crescimento quando as medições foram realizadas sob ρ saturante. Para *E. pauciflora* e *E. maculata*, ÖGREN & EVANS (1993) verificaram que o valor de θ diminuiu com o aumento de ρ, atingindo o valor mínimo de 0,6 a 100Pa de CO_2; pressões superiores a essa resultaram na inibição da evolução de O_2. Em outro trabalho com essas duas espécies, EVANS *et al.* (1993) constataram que os valores de θ foram maiores em folhas horizontais, sendo que as folhas verticais não apresentaram diferenças no potencial fotossintético com relação à superfície iluminada.

Quanto ao efeito isolado das temperaturas de aclimatação, foi observado, nesse trabalho, que plantas aclimatadas a 10°C exigiram maior $DFF_{1/2}$ (24% para *E. urophylla* e 44% para *E. grandis*) e DFF_{sat} (10% para *E. urophylla* e 14% para *E. grandis*), e apresentaram menor $F_{máx}$ (21% para *E. urophylla* e 32% para *E. grandis*), Φ(48% para *E. urophylla* e 37% para *E. grandis*) e RE (36% para *E. urophylla* e 69% para *E. grandis*), mas não mostraram diferenças no PCL das plantas aclimatadas a 25°C. A redução na $F_{máx}$ a 10°C ocorreu em DFF superiores a 184μmol $m^{-2}s^{-1}$

para *E. urophylla* e a 102μmol $m^{-2}s^{-1}$ para *E. grandis*. A $DFF_{1/2}$ para *E. urophylla* e *E. grandis*, independentemente da temperatura de aclimatação, foi de 278 e 267μmol $m^{-2}s^{-1}$, a DFF_{sat} foi de 1290 e 1237μmol $m^{-2}s^{-1}$ e o PCL foi 21 e 16μmol $m^{-2}s^{-1}$, respectivamente.

É pouco provável que a fotossíntese, com sua complexidade, se processe otimamente sob ampla variação de temperatura sem que ocorra qualquer forma de aclimatação (LABATE & LEEGOOD, 1988).

A aclimatação da resposta fotossintética a mudanças na temperatura de crescimento tem sido relatada para várias espécies, sob várias condições ambientais (FERRAR *et al.*, 1989). O termo aclimatação é usado para descrever uma mudança observada na temperatura ótima para fotossíntese líquida e no seu valor máximo, resultantes da alteração na temperatura de crescimento (BERRY & BJORKMAN, 1980). É postulado que esse fenômeno é mais evidente em plantas lenhosas com folhas sempre verdes, as quais são encontradas sob uma ampla faixa de condições de crescimento e as quais, em um lugar em particular, estão sujeitas a uma grande variação sazonal na temperatura. É esperado que essas espécies modifiquem suas respostas a temperatura para manter a fotossíntese a uma dada temperatura de crescimento. Plantas oriundas de regiões onde o crescimento é restrito a uma única estação do ano ou de regiões com uma variação moderada na temperatura durante todo o ano possuem uma capacidade limitada na aclimatação fotossintética (BERRY & BJORKMAN, 1980).

No caso de *Eucalyptus*, a aclimatação da fotossíntese varia de acordo com a espécie, aparentemente correlacionada aos seus agrupamentos em subgêneros (STAYLER & FERRAR, 1978; FERRAR *et al.*, 1989). Esses autores observaram que para as espécies pertencentes ao subgênero *Symphyomyrtus*, o mesmo do *E. urophylla* e *E. grandis*, as temperaturas ótimas para a fotossíntese foram: próxima a 20°C (12,3μmol $m^{-2}s^{-1}$) para as plantas de altas altitudes (15°C) e próxima a 30°C (14,2μmol $m^{-2}s^{-1}$) para as plantas de baixas altitudes (35°C). Temperaturas superiores ou inferiores a essas resultaram em decréscimo na fotossíntese, principalmente quando plantas de baixas altitudes foram colocadas a 10°C e as de altas altitudes foram colocadas a 40°C. FERRAR *et al.* (1989) relatam que o mecanismo de aclimatação de *Eucalyptus* a baixa temperatura implica na manutenção de alta atividade da Rubisco e em uma alta capacidade para o transporte de elétrons ou fosforilação.

Esse comportamento observado nas espécies de *Eucalyptus* demonstra que a temperatura antecedente a qual a planta foi exposta (histórico térmico) afetará a sua sensibilidade ao tratamento térmico subsequente. O crescimento e o desenvolvimento da planta sob baixa temperatura confere maior tolerância a fotoinibição sob baixa temperatura (BOESE & HUNER, 1992). As duas espécies de eucalipto estudadas neste trabalho se desenvolveram por 60 dias sob uma temperatura média de 26°C e foram expostas por 15 horas, em média, a temperatura de resfriamento de 10°C. Esse período de exposição a baixa temperatura é considerado insuficiente para que ocorra a aclimatação das plantas (BERRY & BJÖRKMAN, 1980), tornando-as

suscetíveis aos efeitos da temperatura de resfriamento. O grau de suscetibilidade vai depender basicamente de fatores metabólicos, como a atividade da Rubisco (FERRAR *et al.*, 1989), e estruturais, como modificações nos tilacóides (HUNER *et al.*, 1987, 1988; KRUPA, 1987), uma vez que a ρ e a condutância foliar tendem a aumentar ou permanecer constantes quando plantas de eucalipto são expostas a baixas temperaturas (FERRAR *et al.*, 1989)

Sob condições normais, a taxa de fotossíntese é um equilíbrio entre a atividade da RuBP carboxilase (maior quando sob baixa ρ) e a limitação na taxa de regeneração da RuBP (a qual predomina sob alta ρ) (FARQUAR *et al.*, 1980). A taxa de regeneração da RuBP é determinada pela taxa de transporte de elétrons, pela taxa com que o carbono é consumido pelo ciclo de Calvin e pela reciclagem do ortofosfato, pela síntese do produto ou pela fotorespiração (LABATE & LEEGOOD, 1988).

Folhas de plantas que se desenvolveram sob alta temperatura e iluminadas sob baixa temperatura tendem a exibir uma inibição da fotossíntese, o que é atribuído a baixa regeneração da RuBP. SCHNYDER *et al.* (1986) demonstraram que a exposição de plantas ou folhas a baixas temperaturas resulta em mudanças no estado de ativação da RuBP carboxilase e em um acúmulo de RuBP.

YAKIR *et al.* (1985) e LABATE & LEEGOOD (1988) verificaram que a exposição de plantas a baixa temperatura fez com que a fotossíntese saturasse em menor irradiância e menor ρ, resultando no aumento de θ.

Quando uma folha é irradiada com luz modulada, ela produz uma vibração, a qual pode ser detectada por um microfone sensível. A fotoacústica é uma técnica relativamente nova que pode ser aplicada para a medição da fotossíntese bruta (HAVAUX *et al.*, 1987). O uso e as características do método fotoacústico no estudo da fotossíntese foram recentemente revistos por MALKIN & CANAANI (1994). Essa técnica é baseada na emissão de pulsos periódicos de calor e oxigênio seguindo a absorção de luz periodicamente modulada. O calor e o oxigênio se difundem dos cloroplastos para a superfície da célula, causando contrações e expansões periódicas na camada de ar limítrofe à célula. As ondas acústicas, assim criadas, se propagam através dos espaços intercelulares e são transmitidas para fora da folha através da epiderme, a qual, presumivelmente, atua como uma membrana flexível. As duas componentes do sinal fotoacústico - liberação de O_2 (sinal fotobárico) e liberação de calor (sinal fototérmico) modulados - podem ser estimados separadamente (POULET *et al.*, 1983). Devido às suas características únicas, incluindo o fato de ser rápida, não destrutiva, pouco sensível ao fechamento dos estômatos e à fotorespiração, a técnica fotoacústica parece ser uma ferramenta valiosa no estudo da fotossíntese e dos fatores que a afetam (HAVAUX *et al.*, 1987; MALKIN & CANAANI, 1994)

Nas determinações feitas com a espectroscopia fotoacústica, quando se utilizou luz monocromática (λ=680nm) para avaliar a atividade do fotossistema II, foi verificado que a liberação de O_2 de *E. urophylla* foi 16% menor que o de *E. grandis* a partir da DFF_{680} de 99μmol $m^{-2}s^{-1}$. O sinal fototérmico

de *E. urophylla* foi 27% maior que o de *E. grandis* a partir da DFF_{680} de 112μmol $m^{-2}s^{-1}$, fato esse que pode ser devido a uma maior dissipação térmica ou a diferenças morfológicas/ anatômicas das folhas (p.e. espessura) de forma que a capacidade térmica de *E. urophylla* seja menor. Foi constatado efeito da temperatura apenas em *E. grandis* que, a 10°C, apresentou menor sinal fotobárico para DFF_{680} superiores a 158μmol $m^{-2}s^{-1}$. Ambos os sinais aumentaram com a DFF_{680} até 180μmol $m^{-2}s^{-1}$, mas não atingiram a saturação.

Com o tratamento fotoinibitório foi observado, na fase de indução da fotossíntese utilizando DFF_{680} constante de 46μmol $m^{-2}s^{-1}$, que o sinal fotoacústico apresentou inicialmente um transiente rápido, seguido de um lento, até atingir o estado estacionário. Durante o primeiro transiente ocorreu um rápido aumento no sinal($S_{máx}^{ini}$), seguido por um rápido decréscimo até o valor inicial(S_{min}), enquanto o segundo transiente apresentou um aumento continuo do sinal até atingir o estado estacionário ($S_{máx}$).

PRINSLEY & LEEGOOD (1986), estudando a indução fotossintética em folhas de espinafre com o uso do eletrodo de Clark, também constataram esse transiente inicial, ao qual denominaram de "estouro na taxa de evolução de O_2". O pico desse estouro se manifestou ao redor de 30 segundos do início da indução fotossintética e sua intensidade foi diretamente proporcional ao período de aclimatação das plantas ao escuro e à intensidade da pré iluminação. Esse fenômeno também tem sido constatado por outros autores utilizando a técnica da

espectroscopia fotoacústica (CANAANI & MALKIN, 1984; MALKIN, 1987; MALKIN & CANAANI, 1994; BUCKHOV *et al.*, 1997).

A origem dessa explosão na curva de indução fotossintética em cloroplastos intactos ou em folhas é, ainda, passível de discussão. Em sistema de cloroplastos reconstituídos ela reflete a rápida taxa de transporte de elétrons para $NADP^+$ (STOKES & WALKER, 1971). Por outro lado, CLAYTON (1980) sugere que esse fenômeno é resultado de um estoque limitado de carregadores de elétrons reduzidos entre os dois fotossistemas, principalmente plastoquinona. Entretanto, BUCKHOV *et al.* (1997) correlacionam esse primeiro transiente ao alto grau de redução de Qa, o que foi caracterizado pela redução no sinal fotoacústico e aumento na dissipação térmica e na emissão de fluorescência.

Contudo, existem evidências de que os componentes do transporte de elétrons isoladamente não são os responsáveis pelo transiente inicial. Uma dessas evidências é a existência de um consumo repentino de CO_2 que está claramente relacionado a explosão do O_2 e que indica que essa explosão está associada a atividade do ciclo de Calvin (SIVAK & WALKER, 1985). PRINSLEY & LEEGOOD (1986) citam a hipótese de Frank (1953), que considera o transiente inicial uma manifestação da redução fotoquímica de intermediários acumulados durante o período de escuro e que se tornam disponíveis para a redução nos primeiros instantes da iluminação. A explosão de O_2 pode ser reflexo da imediata redução do glicerato-3-P presente no estroma sob iluminação, com RuBP formada da carboxilação de triose P, resultando no consumo de CO_2.

Durante a adaptação ao escuro, as folhas perdem progressivamente a sua capacidade fotossintética, efeito esse atribuído tanto a inativação de enzimas chaves no ciclo da RuBP quanto ao esgotamento de metabólitos intermediários (VU *et al.*, 1984). Segundo BUSCHMANN & KOCSÁNYI (1989), nesse período de adaptação ocorrem lentas mudanças: os componentes redox intermediários entre o FS_{II} e FS_I (incluindo Qa) tornam-se oxidados e o complexo da antena, que estava no estado 2 quando exposta a luz, é lentamente revertido ao estado 1, fato esse atribuído a desfosforilação do complexo (RUBAN & HORTON, 1995). CANNANI & MALKIN (1984) relataram que no período de adaptação ao escuro parece que as antenas dos FS_I separam-se funcionalmente de seus centros de reação, causando inibição no transporte de elétrons.

A readaptação a luz envolve um transiente complexo nos parâmetros fotossintéticos mensuráveis, seguido subsequentemente pela ativação de enzimas do ciclo da RuBP pela luz e pelo aumento da concentração de substratos intermediários a níveis apropriados (LEEGOOD & WALKER, 1981). Esses autores observaram em cloroplasto de trigo que são necessários cerca de 30 segundos para o término do transiente inicial e início da indução fotossintética, a qual atinge o estado estacionário após dois minutos de iluminação. Esses resultados se assemelham aos obtidos com as duas espécies de eucalipto neste trabalho. CANNANI & MALKIN (1984) relataram que a recuperação do FS_I dependente da luz ocorre em um período de 0,5 a 2 minutos.

Em seu estudo sobre rápidos transientes fotoacústicos, MALKIN (1987) infere cinco hipóteses, que correspondem a

eventos consecutivos, para explicá-los: a) com a exposição a luz após um período de adaptação ao escuro, apenas o FS_{II} é ativado. Isso resulta em um pulso de rápida liberação de O_2 causado pelo reservatório de aceitadores de elétrons entre os dois fotossistemas; b) o FS_I torna-se ativo no transporte de elétrons para o O_2 e não para o NADP, resultando na primeira onda de absorção de O_2. Alternativamente, a absorção de O_2 pode ocorrer também pelos carregadores do FS_{II} isoladamente; c) os reservatórios de aceitadores endógenos (NADP, ácido 3 fosfoglicério, etc.) tornam-se disponíveis para o FS_I, competindo com a absorção de O_2, resultando em um segundo pulso lento na liberação de O_2; d) o reservatório instantâneo de aceitadores do FS_I é exaurido e a absorção de O_2 recomeça e é máxima; e) há uma lenta recomposição catalítica do reservatório de aceitador (RuBP), que se reflete pelo aumento gradual na evolução de O_2 até atingir a fase estacionária.

Analisando o transiente inicial obtido neste trabalho, foi verificado que o tempo necessário para atingir o sinal mínimo (TS_{min}) nas plantas aclimatadas a 10°C foi 28% menor que o requerido nas plantas aclimatadas a 25°C ($TS_{mín}$ = 34 segundos), não se constatando diferença entre as espécies. Não foram verificadas diferenças quanto ao $S_{máx}^{ini}$, o tempo necessário para atingir esse valor ($TS_{máx}^{ini}$ = 11 segundos) e S_{min} entre espécies e entre temperaturas de aclimatação. O valor do sinal fotoacústico no estado estacionário ($S_{máx}$) foi igual para as duas espécies de eucalipto, mas o tempo para atingir esse sinal ($TS_{máx}$) em *E. grandis* foi 28% menor que o de *E. urophylla*, nas duas temperaturas de aclimatação.

Para *E. urophylla* a temperatura de aclimatação não influenciou no $TS_{máx}$, mas para *E. grandis* aclimatada a 10°C o $TS_{máx}$ foi 32% menor que o das plantas aclimatadas a 25°C. O tempo necessário para atingir a metade do valor do sinal máximo ($T_{1/2}$) foi 24% menor nas duas espécies aclimatadas a 10°C quando comparado ao das plantas aclimatadas a 25°C, não se constatando diferença entre espécies em cada temperatura de aclimatação. Também não foi constatada diferença na amplitude do sinal fotoacústico-ΔS ($S_{máx}$-$S_{mín}$) entre as espécies de eucalipto e entre as temperaturas de aclimatação. Entretanto, o intervalo de tempo entre o sinal mínimo e máximo-ΔT ($TS_{máx}$-$TS_{mín}$) foi menor para *E. grandis* quando comparado ao de *E. urophylla*, nas duas temperaturas de aclimatação. Para *E. urophylla*, a temperatura de aclimatação não influenciou no ΔT, mas para *E. grandis* aclimatada a 10°C o ΔT foi 33% menor que o das plantas aclimatadas a 25°C. Como conseqüência, a taxa de variação do sinal fotoacústico ($\Delta S/\Delta T$) de *E. grandis* foi maior que a de *E. urophylla*, principalmente para as plantas aclimatadas a 10°C, cujo $\Delta S/\Delta T$ foi maior que o das plantas aclimatadas a 25°C. Quando o sinal fotoacústico atingiu o estado estacionário, e foi isolado dele as componentes térmica ($S_{térm}$) e bárica ($S_{bár}$), foi observado que $S_{bár}$ e $S_{térm}$ não diferenciaram entre as espécies e não foram afetados pela temperatura de aclimatação, sendo que o $S_{térm}$ de *E. urophylla* tendeu a ser maior que o de *E. grandis* nas duas temperaturas.

Ao término do tratamento fotoinibitório foi observado que o $S_{bár}$ de *E. urophylla* exposta às DFF de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$

demostrou 110% de recuperação do $S_{bár}$ inicial, enquanto nas DFF de 2000 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ essa recuperação foi 75%, não se constatando efeito diferenciado da temperatura. Para *E. grandis* a recuperação após a exposição às DFF de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi de 145% e para as DFF de 2000 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ foi de 84%, também sem se constatar efeito das temperaturas. Foi observado, também, que para as DFF de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ a recuperação no $S_{bár}$ em *E. grandis* foi superior a de *E. urophylla*, enquanto nas DFF mais elevadas que 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ não foi constatada diferença na recuperação entre as espécies. A incapacidade de recuperação no $S_{bár}$ das duas espécies após a exposição a DFF superior a 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ sugere a ocorrência do fenômeno da fotoinibição, que se mostrou irreversível até duas horas após o tratamento com alta irradiância, fenômeno que se mostrou mais acentuado em *E. urophylla*. Contudo, se considerarmos o potencial fotossintético das duas espécies (ganho no $S_{bár}$ após a exposição às DFF de 500 a 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$), a fotoinibição foi mais severa em *E. grandis*, reduzindo em 42% seu potencial fotossintético, enquanto para *E. urophylla* essa redução foi de 32%.

A fotoinibição pode ocorrer quando a irradiância absorvida pelas folhas excede sua utilização fotossintética (LONG *et al.*, 1994). Essa fotoinibição pode se manifestar como uma redução na eficiência quântica na liberação de O_2, na sua taxa máxima e por transformações nas características da fluorescência da clorofila **a** e na dissipação térmica, dentre outros parâmetros

fotossintéticos mensuráveis (POWLES, 1984; SOMERSALO & KRAUSE, 1989, BUSCHMANN, 1987).

No caso de *Eucalyptus*, ÖGREN & EVANS (1992) verificaram, por meio da liberação de O_2 e pela relação Fv/Fm, que a fotoinibição é um fenômeno de ocorrência natural nas seis espécies avaliadas. Essa fotoinibição se mostrou dependente da hora do dia, com uma correlação não linear com a intensidade da irradiância, e ocorreu tanto nas folhas de disposição horizontal quanto vertical, embora essas últimas interceptassem apenas um terço da irradiação incidente. As folhas se recuperaram dos efeitos da fotoinibição em um intervalo de doze horas após a exposição a irradiância máxima, resultado esse que se assemelha ao obtido neste trabalho.

Nem todos os processos relacionados a fotoinibição podem ser considerados como efeitos adversos da alta irradiância. Condições de excesso de energia de excitação supostamente induz o funcionamento de mecanismos para a proteção dos cloroplastos contra a destruição do sistema fotossintético (BUSCHMANN & KOCSÁNYI, 1989; SOMERSALO & KRAUSE, 1989). Um desses mecanismos é o aparente ajustamento, de forma reversível, da dissipação térmica dos pigmentos fotossintéticos da antena às condições de alta irradiância (BUSCHMANN, 1987; KRAUSE *et al.*, 1988; BUSCHMANN & KOCSÁNYI, 1989; SOMERSALO & KRAUSE, 1989). Esse ajustamento, que corresponde ao aumento da dissipação térmica, ocorre em intervalo de segundos a minutos após a exposição ao excesso de luz (SOMERSALO & KRAUSE, 1989).

Com o aumento na dissipação térmica ocorre a redução na liberação de O_2, uma vez que esses processos de desexcitação

energética , juntamente com a emissão de fluorescência, são competitivos (BUSCHMANN, 1987; BUSCHMANN & KOCSÁNYI, 1989; KRAUSE *et al.*, 1989).

Nesse trabalho foi possível verificar que quando as plantas de eucalipto foram expostas a irradiância de até 1000 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$, não ocorreu a saturação e nem a fotoinibição da fotossíntese. Mas, a partir de 2000$\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$, intensidade a partir da qual houve saturação da fotossíntese, ocorreu a fotoinibição, com redução na liberação de O_2. Essa fotoinibição foi mais acentuada em *E. urophylla*.

Os sintomas da fotoinibição são pronunciados quando, em adição a alta irradiância, as plantas são expostas a temperatura de resfriamento (YAKIR *et al.*, 1985, SOMERSALO & KRAUSE, 1989; LONG *et al.*, 1994), que reduz o consumo de energia pelo metabolismo do carbono (YAKIR *et al.*, 1985) e, provavelmente, os processos de recuperação nos cloroplastos (SOMERSALO & KRAUSE, 1989), principalmente aqueles envolvendo a proteína D1 (GIARDI *et al.*, 1994; LEITSCH *et al.*, 1994). A fotoinibição nas duas espécies de eucalipto avaliadas neste trabalho não foi afetada pela temperatura de resfriamento, resultado esse que pode ser atribuído ao aumento da temperatura da folha durante o tratamento fotoinibitório. Embora as plantas tenham sido previamente adaptadas às temperaturas em estudo, as medições fotoacústicas foram realizadas a 25°C, em média, o que pode ter acarretado no equilíbrio térmico do material durante os quinze minutos de exposição. Além disso, o tratamento fotoinibitório pode ter proporcionado aumento na temperatura das folhas avaliadas.

A curva da cinética da indução da fluorescência é também denominada de curva de Kautsky (KRAUSE & WEIS, 1991; BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993, GOVINDJEE, 1995). Essa curva é composta por vários transientes ou fases, que para alguns autores são denominados de O I D P S M T (SIVAK *et al.*, 1985, KRAUSE & WEIS, 1991) e por outros de O I J P S M T (GOVINDJEE, 1995, SRIVASTAVA *et al.*, 1995). Esses últimos autores justificaram plenamente a adoção da terminologia O I J P para o transiente rápido da fluorescência, motivo pelo qual essa foi adotada no presente trabalho.

Os transientes da curva de indução da fluorescência medem a cinética do preenchimento do reservatório de platoquinona (PQ) e a heterogeneidade associada a ele (SRIVASTAVA *et al.*, 1995). Durante o aumento da fluorescência da clorofila **a**, o reservatório de aceitadores de elétrons (Qa, Qb e PQ) do FS_{II} é preenchido com elétrons originários da água, no lado doador do FS_{II} (GOVINDJEE, 1995). Portanto, a cinética da fluorescência representa todos os passos do transporte de elétrons no FS_{II}, se constituindo, devido a isso e ao fato de ser um método rápido e não invasivo, em uma importante ferramenta no estudo da fotossíntese, com aplicações nas mais diversas áreas (KRAUSE & WEIS, 1991; GOVINDJEE, 1995), inclusive na ecologia florestal (BALL *et al.*, 1994).

Cerca de 90% da fluorescência da clorofila **a**, na temperatura ambiente, se origina do FS_{II}, enquanto o FS_I emite pouca fluorescência (KRAUSE & WEIS, 1991; BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993). Segundo GOVINDJEE (1995), essa pequena participação do FS_I na emissão de fluorescência pode ser devida

a três fatores: a) o centro de reação do FS_I captura mais intensamente a energia do que o do FS_{II}, fazendo com que a sua fotoquímica não seja limitada pelo capturador e a transferência da energia seja irreversível; b) o doador/aceitador de elétrons imediato ao FS_I não é um sequestrador químico da clorofila **a** e, portanto, não ocorrem variações na fluorescência da clorofila **a** e d) a natureza fisico-química da antena de clorofila **a** do FS_I, que absorve preferencialmente luz com maiores comprimentos de onda, faz com que predomine a dissipação térmica da energia absorvida.

Durante o primeiro segundo da iluminação, a fluorescência aumenta do nível O para o P e esse aumento é denominado de fase ou transiente rápido da cinética da indução da fluorescência. A fase lenta é aquela que ocorre após o nível P e pode durar vários minutos até que a fluorescência terminal (T) seja atingida (KRAUSE & WEIS, 1991; SCHEIBER *et al.*, 1993; GOVINDJEE, 1995). A fase rápida é relacionada aos processos primários do FS_{II}, enquanto a fase lenta é principalmente relacionada às interações entre os processos que ocorrem nas membranas dos tilacóides e os processos metabólicos que ocorrem no estroma, primariamente o metabolismo do carbono (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993). Neste trabalho, é considerada apenas a fase rápida da cinética da indução da fluorescência.

Quando folhas pré adaptadas ao escuro são iluminadas, há um rápido aumento na fluorescência para um nível denominado de O ou Fo. Esse nível é atingido quando a luz é absorvida pelas clorofilas **a** da antena, sem que a energia de excitação resultante tenha sido capturada pelo centro de reação do FS_{II}.

Este estado dura apenas pico a nanosegundos, sendo o valor de Fo obtido por extrapolação matemática ou por luz de excitação de baixa intensidade (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993). Em ambos os casos, Fo é medido quando todos os centros de reação estão abertos e equivale a Qa totalmente oxidada (BALL *et al.*, 1994), com o potencial máximo para o uso fotoquímico da energia de excitação. O sinal Fo proporciona uma referência valiosa para todos os outros parâmetros da curva de indução da fluorescência (KRAUSE & WEIS, 1991; BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993). Pelo menos três fatores (dissipação de energia não radiativa, inativação e dano do centro de reação do FS_{II}) podem ser responsáveis pelas alterações de Fo durante a fotoinibição e subsequente recuperação das funções do FS_{II} (BUSCHMANN & KOCSÁNYI, 1989).

Sob irradiância de alta intensidade, a fluorecência aumenta, partindo de Fo, passando pelos níveis intermediárias J e I, e atingindo o valor máximo P ou Fm. Esse aumento reflete um incremento gradual na produção de fluorescência pela clorofila, com concomitante redução na taxa fotoquímica (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993). A razão para essa diminuição é que o aceitador Qa torna-se cada vez mais reduzido, com os capturadores fechados (GOVINDJEE, 1995).

Os níveis intermediárias J e I, também denominados de Fj e Fi, são inflexões na curva de indução, representando um estado quase estacionário da emissão de fluorescência, e estão relacionados não apenas a redução de Qa mas, também, a heterogeneidade do reservatório de plastoquinona (PQ) (GOVINDJEE, 1995; SRIVASTAVA *et al.*, 1995). A presença destes

níveis intermediários estabelece três fases na curva de indução (STRASSER *et al.*, 1995). A fase Fo-Fj, a qual reflete principalmente a redução de Qa para Qa^- (fase fotoquímica), também inclui o estado de oxidação de Qa. As fases Fj-Fi e Fi-Fm são devidas ao preenchimento do reservatório de PQ e reflete a heterogeneidade desse (PQ de rápida redução *versus* PQ de lenta redução). Segundo GOVINDJEE (1990), a heterogeneidade do reservatório de PQ se deve a presença de Qa com dois potenciais de redução - Ql e Qh e de Qb com três tipos, sendo um desses não funcional para o transporte de elétrons. A fase Fj-Fi demonstra que os elétrons começam a ser transferidos, via Qb, para o reservatório de PQ, ocorrendo um transiente de reoxidação de Qa. Em Fm, se a intensidade de luz for suficientemente alta, todos os centros de reação se fecham e a fluorescência atinge seu nível máximo, sem que haja participação fotoquímica (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993; GOVINDJEE, 1995).

Os capturadores de fluorescência, particularmente Fm, refletem um aumento na dissipação de energia não radiativa e podem ser utilizados para proteger parcialmente os centros de reação do FS_{II} durante períodos de superexcitação (DEMMING *et al.*, 1987; GREER, 1988).

Um parâmetro muito útil derivado da cinética rápida da indução da fluorescência é a fluorescência variável - Fv, a qual equivale ao aumento de Fo para Fm e é função da concentração de Qa^- (OTTANDER *et al.*, 1993). A razão Fv/Fm possui uma variação típica de 0,75 a 0,85 e é uma medida do

potencial máximo da eficiência quântica fotoquímica do FS_{II} (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993).

A área sobre a curva, entre Fo e Fm, é proporcional ao tamanho do reservatório dos aceitadores de elétrons no lado redutor do FS_{II} (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993). Esse parâmetro é fornecido diretamente pelo PEA, mas também pode ser estimado pela metade do tempo necessário para atingir Fm ($T_{1/2}$), sendo que quanto menor for $T_{1/2}$, menor será o reservatório de PQ (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993; GOVINDJEE, 1995).

Após atingir o máximo, a fluorescência decresce conforme Qa vai sendo oxidada pelos elétrons transferidos para o FS_I via complexo citrocromo *f*/b_6 e plastocianina (BOLHÁR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993).

Quando o efeito das temperaturas de aclimatação, de 15 e 30°C, foi analisado durante a cinética de indução da fluorescência, foi verificado que, quando as plantas permaneceram no escuro, não ocorreram diferenças entre espécies e entre temperaturas quanto a fluorescência inicial (Fo), máxima (Fm), variável (Fv) e na relação Fv/Fm. Contudo, o tempo necessário para a fluorescência da clorofila **a** atingir seu valor máximo (TFm) foi maior nas plantas aclimatadas a 30°C, principalmente nas de *E. urophylla*, cujo valor de TFm foi maior que o de *E. grandis*, revelando que o aceitador Qa demandou mais tempo para ser reduzido. Após 36 horas de aclimatação, nas quais foram intercaladas 12 horas de exposição a 600μmol $m^{-2}s^{-1}$, foi verificado que os valores de Fo das plantas aclimatadas a 15°C aumentaram, enquanto os valores de Fm, Fv e Fv/Fm diminuíram. Nesse período, os valores desses parâmetros nas

plantas aclimatadas a 30°C permaneceram constantes, à exceção do TFm que diminuiu. Não foram constatadas diferenças entre as espécies quanto a esses parâmetros. No período de 36 a 60 horas de aclimatação, no qual foi intercalado novo período de 12 horas de exposição a DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$, os valores dos parâmetros permaneceram constantes e iguais aos observados às 36 horas de aclimatação, à exceção de *E. grandis* aclimatada a 15°C, que demonstrou tendência de recuperação nos valores desses parâmetros aos obtidos nas plantas após 60 horas de aclimatação a 30°C. Foi somente nesse período de aclimatação que se constatou diferença entre as espécies para os parâmetros Fo, Fm e Fv/Fm.

Foi observado que após 12 horas de aclimatação a 10, 15, 25 e 30°C, no escuro, os valores de Fv/Fm das duas espécies não foram afetados pelas temperaturas e não diferenciaram entre espécies. Após 2 horas de exposição a DFF de 600μmol $m^{-2}s^{-1}$, contudo, apenas o valor de Fv/Fm das plantas aclimatadas a 10°C diminuiu, principalmente nas plantas de *E. grandis*, cujo valor de Fv/Fm foi, inclusive, menor que o de *E. urophylla* e que o obtido nas demais temperaturas de aclimatação.

Pelos resultados obtidos nesses experimentos, ficou evidente que a temperatura de resfriamento no escuro não causou nenhum efeito sobre o FS_{II} das plantas de eucalipto. Esse resultado está de acordo com os obtidos por LONG *et al.* (1983), ÖQUIST (1983) e YAKIR *et al.* (1985).

Os efeitos da temperatura de resfriamento só se manifestaram após a exposição a luz, com o aumento no valor de Fo e diminuição nos valores de Fm, Fv e Fv/Fm. Resultados

semelhantes a esses foram obtidos por GEORGIEVA *et al.* (1993) Esses efeitos ocorreram já a partir de duas horas de exposição a luz de intensidade média. Normalmente, quando as plantas ainda não se aclimataram a temperatura de resfriamento e são expostas a luz, a fotoinibição se caracteriza por decréscimo em Fv e aumento em Fo, resultando na diminuição de Fv/Fm (ÖGREN & ÖQUIST, 1984; GREER *et al.*, 1986; SOMERSALO & KRAUSE, 1989) e aumento na dissipação térmica (SOMERSALO & KRAUSE, 1989). Esse comportamento demonstra baixa eficiência quântica fotoquímica, devido a baixa concentração de Qa no estado oxidado. Além disso, GEORGIEVA *et al.* (1994) relatam que o aumento de Fo e a redução de Fm podem ser resultado da desconexão entre as moléculas de clorofilas da antena e/ou entre a antena e os centros de reação. Com a aclimatação das plantas, esses parâmetros tendem a normalizar, como foi observado em *E. grandis* após 60 horas de adaptação a 15°C.

A variação na dissipação térmica pode se tornar importante para a interpretação da curva de cinética da indução da fluorescência. Essa cinética tem sido intimamente relacionada a eficiência fotoquímica do FS_{II} (KRAUSE & WEIS, 1991) e nem sempre considera a competição existente entre todos os processos de desexcitação, o que acarreta em uma relação quase linear entre as duas características (GIERSCH & KRAUSE, 1991; FRACKOWIACK & PTAK, 1994).

No estudo do efeito da DFF na cinética de indução da fluorescência foi observado que o valor de Fo aumentou com a exposição por quinze minutos a intensidade crescente de irradiância, principalmente nas plantas aclimatadas a 10°C e a

partir da DFF de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, quando se constatou efeito diferenciado da temperatura de aclimatação. O valor de Fo de *E. urophylla* foi menor que o de *E. grandis* nas duas temperaturas e em todas DFF. Os valores de Fm, Fv, Fv/Fm, TFm e área decresceram com o aumento da DFF (mais acentuadamente a partir de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$ para *E. urophylla* e a partir de 1000 μmol $m^{-2}s^{-1}$ para *E. grandis*), sendo que os valores desses parâmetros tenderam, de modo geral, a serem menores nas plantas de *E. urophylla*, principalmente quando aclimatadas a 10°C. Para os parâmetros de fluorescência obtidos na escala logarítmica de tempo foi observado o mesmo comportamento. Para a fluorescência intermediária J (Fj) os menores valores foram obtidos em *E. grandis* aclimatado nas duas temperaturas, seguida de *E. urophylla* aclimatado a 25°C. Para a fluorescência intermediária I (Fi) não foi constatada diferença entre espécies e efeito das temperaturas. A velocidade com que a fluorescência passou do nível intermediário J para o I (Fj>Fi) foi menor nas plantas de *E. urophylla*, principalmente nas aclimatadas a 10°C, enquanto para *E. grandis* não foi constatado efeito da temperatura. A velocidade de transição de Fi para Fp (Fi>Fp) também foi menor nas plantas de *E. urophylla*, mas essa se igualou a de *E. grandis* aclimatado a 10°C quando *E. urophylla* foi aclimatado a 10°C. Para esses parâmetros obtidos na escala logarítmica de tempo foi observado que as reduções ocorreram a partir de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$ para *E. urophylla* e a partir de 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$ para *E. grandis*, sendo as reduções mais acentuadas com DFF superiores a 2000 μmol $m^{-2}s^{-1}$.

SOMERSALO & KRAUSE (1989) relatam que o tratamento com alta irradiância transforma parte dos centros de reação do FS_{II} em seqüestradores de fluorescência. Esses centros deverão estar habilitados em capturar a energia de excitação, mas convertendo-a em calor. Entretanto, o aumento pronunciado de Fo também indica decréscimo na eficiência de captura de energia pelos centros de reação do FS_{II}.

A resposta de Fo a fotoinibição parece ser complicada e difere dependendo do material e das condições experimentais (SOMERSALO & KRAUSE, 1989). DEMMING & BJÖRKMAN (1987) relatam que a fotoinibição relacionada ao decréscimo de Fo se recupera plenamente, enquanto a fotoinibição que leva ao aumento de Fo é irreversível por longo tempo. Contudo, SOMERSALO & KRAUSE (1989) verificaram que a fotoinibição com o aumento de Fo foi reversível, principalmente quando a recuperação foi realizada sob baixa irradiância e em temperatura superior a de resfriamento. Os autores inferem a existência de dois mecanismos envolvidos na fotoinibição: um caracterizado pelo aumento na fluorescência inicial do FS_{II} e que se recupera sob baixas temperaturas, e o outro é caracterizado por um decréscimo na fluorescência variável e necessita de altas temperaturas e, presumivelmente, de certas atividades metabólicas para se recuperar.

O dano fotoinibitório aos centros de reação do FS_{II} acarretam no aumento de Fo, enquanto um aumento na dissipação de energia não radiativa leva a um decréscimo de Fo (DEMMING *et al.*, 1987). Entretanto, um aumento de Fo pode ser devido a uma inativação do centro de reação (KRAUSE & WEIS, 1991).

O fato de Fo de *E. urophylla* ter sido menor que a de *E. grandis* demonstra menor potencial de captura fotoquímica dessa espécie. Esse resultado pode ser devido a uma maior concentração de Qa^- e/ou menor reservatório de PQ (OTTADER *et al.*, 1993), conforme pode ser verificado pelos valores de Fm, Fv, área e Fj. Os menores valores obtidos para Fj>Fi e Fi>Fp em *E. urophylla* revelam que essa espécie demandou mais tempo para a redução de Qa e para a transferência do elétron para PQ, talvez como resultado de uma maior heterogeneidade de seu reservatório de PQ. A somatória desses efeitos levaram a uma menor eficiência quântica fotoquímica dessa espécie de eucalipto.

Nesse ensaio, os efeitos da temperatura de resfriamento se manifestaram a partir da DFF de 500μmol $m^{-2}s^{-1}$ em *E. urophylla* e a partir de 1000 μmol $m^{-2}s^{-1}$ em *E. grandis*, sendo esses mais acentuados a partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ para as duas espécies, principalmente sobre Fo. Essa transição a DFF de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ coincidiu com a obtida com a técnica fotoacústica, demonstrando ser essa uma irradiância crítica para a fotoinibição das duas espécies, sendo *E. urophylla* mais sensível.

Foi verificado, após 12 horas de reaclimatação no escuro nas temperaturas de 10 e 25°C, que os valores da relação Fv/Fm anteriormente obtidos após a exposição a DFF de 500 a 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ se igualaram aos obtidos a 0μmol $m^{-2}s^{-1}$, demonstrando recuperação das duas espécies de eucalipto ao tratamento fotoinibitório. Essa recuperação poderia ter sido mais rápida

caso ocorresse em irradiância de baixa intensidade (KRAUSE, 1988).

A maior parte da inativação do FS_{II} observada em alguns trabalhos não está relacionada a nenhum dano irreversível ou a degradação do centro de reação do FS_{II} (KIRILOVSKY *et al.*, 1988). Com isso, a inativação reversível pode ser vista como um mecanismo eficiente de proteção das proteínas do FS_{II} contra os danos decorrentes da exposição ao excesso de luz (BUSCHMANN & KOCSÁNYI, 1989).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora *E. grandis* possuísse folhas mais espessas e com maior conteúdo de clorofilas, inclusive maior relação clor**a**/clor**b**, que *E. urophylla* aos 60 dias após a semeadura, a absortividade das duas espécies de eucalipto sob irradiância de λ=680nm foi igual. Contudo, *E. urophylla* apresentou menor eficiência fotossintética, demonstrada por sua menor liberação de O_2, e menor eficiência quântica fotoquímica, revelada pelos menores valores de Fo, Fv, Fm, Fv/Fm, Fj e área. Esses resultados podem estar relacionados a sua maior liberação de calor quando exposta a irradiância crescente nesse comprimento de onda, o que representa perda de energia para a fotossíntese (BUSCHMANN, 1987; KRAUSE *et al.*, 1988) e/ou ao estado e a composição de seus aceitadores de elétrons (GENTY *et al.*, 1989; BUKHOV & CARPENTIER, 1996) ou, ainda, menor capacidade térmica inerente à sua anatomia. Por outro lado, a liberação de calor pelos pigmentos fotossintéticos de *E. urophylla* pode ter lhe conferido maior termoestabilidade (HAVAUX & TARDY, 1997), uma vez que sua liberação de O_2 não foi influenciada pela temperatura de resfriamento de 10°C, enquanto a de *E. grandis* foi reduzida a partir da DFF_{680} de 158μmol $m^{-2}s^{-1}$, com redução na eficiência quântica fotoquímica. Esse resultado pode estar relacionado a conformação da antena do FS_{II} de *E. urophylla* (HAVAUX & TARDY, 1997), bem como a uma maior interação entre os carotenóides e as clorofilas nessa espécie (FRACKOWIACK & PTAK, 1994).

Quando se considerou a fotossíntese líquida, medida com o eletrodo de Clark, a superioridade da atividade fotossintética de *E. grandis* sobre *E. urophylla* ficou mais evidente. Esta superioridade pode ser devida a maior concentração de clorofilas em *E. grandis*, a sua maior relação clora/clob e, talvez, a uma atividade diferenciada de seu FS_I induzida pela presença de O_2 (POWLES, 1984; TAKAHASHI & ASADA, 1988).

A fotoinibição da fotossíntese é comum em espécies de *Eucalyptus* (ÖGREN & EVANS, 1992) e em outras espécies arbóreas tropicais (KRAUSE *et al.*, 1995). Neste trabalho ela ocorreu nas duas espécies de eucalipto, mas em *E. urophylla* ela se manifestou a partir de menor intensidade de irradiância e foi mais severa na redução da eficiência quântica fotoquímica e, consequentemente, na liberação de O_2. A fotoinibição foi mais acentuada nas duas espécies a partir da DFF de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$, provavelmente em conseqüência da presença de maior concentração de Qa reduzida (SOMERSALO & KRAUSE, 1989).

Não foi constatada a recuperação na fotoinibição quando as plantas foram expostas a DFF de 3500μmol $m^{-2}s^{-1}$ e, em seguida, reaclimatadas por até duas horas no escuro. Contudo, após 12 horas de reaclimatação, a recuperação da atividade fotoquímica das plantas foi total. Pela recuperação da liberação de O_2 após o tratamento fotoinibitório de até 1000μmol $m^{-2}s^{-1}$, bem como dos parâmetros da fluorescência após a exposição a DFF superiores a essa, pode-se inferir que as alterações obtidas durante o tratamento podem ser consideradas como mecanismos regulatórios de proteção ao excesso de luz, ao invés de danos no aparato fotossintético (SOMERSALO & KRAUSE, 1989).

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a atividade fotossintética de *E. grandis* foi maior que a de *E. urophylla*, mas ele foi mais sensível à temperatura de resfriamento de 10°C. A fotoinibição da fotossíntese, que foi reversível, ocorreu acentuadamente a partir de 2000μmol $m^{-2}s^{-1}$ para as duas espécies, mas *E. grandis* se mostrou mais tolerante aos seus efeitos do que *E. urophylla*, provavelmente por apresentar maior dissipação de energia radiante pela emissão de fluorescência.

8. LITERATURA CITADA

ADAMS, W. W. III, 1988. Photosynthetic acclimation and photoinhibition of terrestrial and epiphytic CAM tissues growing in full sunlight and deep shade. Aust. J. Plant Physiol. 15: 123-34.

ADAMS, W. W. III, DEMMIG-ADAMS, B., WINTER, K., 1990. Relative contributions of zeaxanthin-related and zeaxanthin-unrelated types of "high-energy-state" quenching of chlorophyll fluorescence in spinach leaves exposed to various environmental conditions. Plant Physiol. 92: 302-309.

AFONSO NETO, M.J., 1986. Cultura do eucalipto: uma atividade estratégica. Inf. Agropecuário 12:

AGUIAR, I. B. & MELLO, H. A. 1974. Influência do recipiente na produção de mudas e no desenvolvimento inicial após o plantio no campo, de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden e *Eucalyptus saligna* Smith. IPEF 6: 19-39.

ANDERSON, J.M. & ARO, E-M., 1994. Grana stacking and protection of photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: an hypothesis. Photosyn. Res. 41:315-326.

ANDERSON, J. M. & OSMOND, C. B., 1987. Shade-sun responses: Compromises between acclimation and photoinhibition. IN: Photoinhibition (D.J. Kyle, C.B. Osmond and C.J. Arntzen, Eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 1-38.

ANDERSON, J. M., CHOW, W. S., GOODCHILD, D. J., 1988. Thylakoid membrane organization in sun/shade acclimation. Aust. J. Plant. Physiol. 15: 11-26.

ARMOND, P.A., SCHREIBER, U., BJÖRKMAN, O., 1978. Photosynthetic acclimation to temperature in the desert Shrub *Larrea divaricata* II. Light- harvesting efficiency and electron transport. Plant Physiol. 61: 411-415.

ARNON, D.I., 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.

ARO, E. M., VIRGIN, I., ANDERSSON, B., 1993. Photoinhibtion of photosystem II - Inactivation, protein damage and turnover. Biochim. Biophys. Acta 1143: 113-134.

ASADA, K. & TAKAHASHI, M., 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. IN: Photoinhibition (D.J. Osmond and C. J. Arntzen, Eds), Vol. 9, Elsevier, Amsterdam, pp. 227-287.

ASSIS, F. N. & MENDEZ, M. E. G., 1989. Relação entre radiação fotossinteticamente ativa e radiação global. Pesq. Agrop. Bras. 24: 797-800.

BALL, M. C., HODGES, V. S., LAUGHLIN, G. P., 1991. Cold-induced photoinhibition limits regeneration of snow gum at tree-line. Func. Ecol. 5: 663-668.

BALL, M. C., BUTTERWORTH, J. A., RODEN, J. S., CHRISTIAN, R., EGERTON, J. J.G., 1994. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. Aust. J. Plant Physiol. 22 311-319.

BARÉNYI, B. & KRAUSE, G. H., 1985. Inhibition of photosynthetic reactions by light. A study with isolated spinach chloroplasts. Planta 163: 218-226.

BARJA, P. R., 1996. Estudo da indução fotossintética através da técnica fotoacústica: efeitos da saturação e da fotoinibição. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, tese de mestrado.

BARJA, P.R. & MANSANARES, A.M., 1998. Photosynthetic energy storage and oxygen evolution determined through open photoacoustic cell technique. Instr. Science Technol. 26 (no prelo)

BENINCASA, M. M. P., 1988. Análise de crescimento de plantas (noções básicas). FUNEP, Jaboticabal, 42p.

BERRY, J. A. & BJöRKMAN, O., 1980. Photosysthetic response and adaptation to temperature in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 31:491-543.

BJÖRKMAN, O. & DEMMIG, B., 1987.Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77k among vascular plants of diverse origins. Planta 170:489-504.

BLAKE, S. T., 1977. Four new species of *Eucalyptus*. Austrobaileya 1:7-9.

BLAKE, S. T. & BEVILACQUA, E., 1988. Early selection of fast-growing eucalyptus clones and species. IPEF 40: 5-13.

BOESE, S. R. & HUNER, N. P. A., 1992. Developmental history affects the susceptibility of spinach leaves to *in vivo* low temperature photoinhibition. Plant Physiol. 99: 1141-1145.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R. & ÖQUIST, G., 1993. Chlorophyll fluorescence as a toll in photosynthesis research. IN:

Photosynthesis and production in a changing environment: field and laboratory manual (D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhàr-Nordenkampf, R.C. Leegood and S.P. Long, Eds.), Chapman & Hall, London, pp. 193-206.

BRADBURY, M. & BAKER, N. R., 1986. The kinetics of photoinhibition of the photosynthetic apparatus in pea chloroplasts. Plant Cell. Environm. 9: 289-297.

BRANDI, R. M., 1976. Efeito da adubação NPK no desenvolvimento inicial e na resistência à seca de mudas de *Eucalyptus citriodora* Hook. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, Tese de Mestrado.

BROOKES, M. I .H. & KLEINING, D. A., 1983. The eucalypt plant. IN: Field guide to *Eucalyptus* (M.I.H. Brookes and D.A. Kleining, Eds), Vol. 1, The Dominion Press, Melbourne, pp. 4-18.

BUCKHOV, N. G., BOUCHER, N., CARPENTIER, R., 1997. The correlation between the induction kinetics of photoacoustic signal and chlorophyll fluorescence in barley leaves is governed by changes in the redox state of photosystem II acceptor side. A study under atmospheric and high CO_2 concentrations. Can. J. Bot. 75: 1399-1406.

BUSCHMANN, C., 1987. Induction kinetics of heat emission before and after photoinhibition in cotyledons of Raphanus sativus. Photosynth. Res. 14: 229-240.

BUSCHMANN, C.& KOCSÁNYI, L., 1989. Light-induced heat production correlated with fluorescence and its quenching mechanisms. Photosynth. Res. 21: 129-136.

BUTLER, W. L., 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 29: 345-378.

CALDER, I. R., HALL, R. L., ADLARD, P. G., 1992. Growth and water use of forest plantations. John Wiley & Sons, Chichester, 381p.

CANAANI, O. & MALKIN, S., 1984. Physiological adaptation to low light intensity in intact leaves resulting in an extreme imbalanced light distribution between the two photosystems of photosynthesis. Biochem. Biophys. Acta 766: 525-532.

CARTER, G. A., 1991. Primary and secondary effects of water content on the spectral reflectance of leaves. Am. J. Bot. 78: 916-924.

CLELAND, R. E. & MELIS, A., 1987. Probing the events of photoinhibition by altering electron-transport activity and light-harvesting capacity in thylakoids. Plant Cell Environm. 10: 747-752.

CRITCHLEY, C. & RUSSEL, W., 1994. Photoinhibition of photosynthesis in vivo: the role of protein turnover in photosystem II. Physiol. Plant. 92: 188-196.

CROMER, R. N. & JARVIS, P. G., 1990. Growth and biomass partitioning in *Eucalyptus grandis* seedlings in response to nitrogen supply. Aust. J. Plant Physiol. 17:503-515.

DEMETER, S., NEALE, P. J., MELIS, A., 1987. Photoinhibition: Impairment of the primary charge separation between P-680 and pheophytin in photosystem II of chloroplast. FEBS Lett. 214: 370-374.

DEMMIG, B., WINTER, K., KRÜGER, A., CZYGAN, F.-C., 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. Plant Physiol. 84: 218-224.

ELDRIDGE, K., 1986. Role of *Eucalyptus* plantation abroad. Research Working Group 1. Burnie, Australian Forestry Councill, p. 87-88.

ELDRIDGE, K. & CROMER, R.N., 1987. Adaptation and physiology of *Eucaliptus* in relation to genetic improvement. IN: Simposio sobre Silvicultura y Mejoramiento Genético de Espécies Forestales, Buenos Aires, Argentina, Resumos, p.1-15.

EVANS, J. R., 1987. The relation between electron transport components and photosynthesis capacity in pea leaves grown at different irradiances. Aust. J. Plant Physiol. 14: 157-170.

EVANS, J. R. & TERASHIMA, I., 1987. Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. Aust. J. Plant Physiol. 14:59-68.

EVANS, J. R., JAKBSEN, I., ÖGREN, E. 1993. Photosynthetic light-response curves. I. Gradients of light absorption and photosynthetic capacity. Planta 189: 191-200.

FAO, 1981. El Eucalipto en la repoblacion vegetal. Colección FAO Montes II. Roma, 723p.

FARQUHAR, G. H., VON CAEMMERER, S., BERRY, J. A., 1980. A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species. Planta 149: 78-90.

FERRAR, P. J., SLATYER, R. O., VRANJIC, J. A., 1989. Photosynthetic temperature acclimation in *Eucalyptus*

species from diverse habitats, and comparison with *Nerium oleander*. Aust. J. Plant Physiol. 16: 199-217.

FRACKOWIAK, D. & PTAK, A., 1994. Radiative and thermal deexitation of photosynthetic pigments in organisms and model systems. Photosynthetica 90: 553-566.

FUERST, E. P. & NORMAN, M. A., 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. Weed Sci. 39: 458-464.

GAUHL, E., 1979. Sun and shade ecotypes of *Solanum dulcamara* L.: Photosynthetic light dependence characteristics in relation to mild water stress. Oecologia 39: 61-70.

GAUSMAN, H. W. & ALLEN, W. A., 1973. Optical parameters of leaves of 30 plant species. Plant Physiol. 52:57-62.

GIARDI, M. T., KOMENDA, J., MASOJIDEK, J., 1994. Involvement of protein phosphorylation in the sensitivity of photosystem II to strong illumination. Physiol. Plant. 92: 181-87.

GIORGIEVA, K. & YORDANOV, I., 1993. Temperature dependence of chlorophyll fluorescence parameters of pea seedlings. J. Plant Physiol. 142: 151-155.

GIORGIEVA, K. & YORDANOV, I., 1994. Temperature dependence of photochemical and non-photochemical fluorescence quenchings in intact pea leaves. J. Plant Physiol. 144: 754-759.

GOMES, J. M., BRANDI, R. M., COUTO, L., BARROS, N. F., 1979a. Efeitos do sombreamento e tipos de suportes para fertil-pot na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex. Maiden Rev. Floresta 10: 24-28.

GOMES, J. M., RESENDE, G. C., SOUZA, A. L., NOVAIS, R. F., 1979b. Métodos de aplicação de adubos na formação de mudas

de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex. Maiden. Rev. Floresta 10: 21-23.

GOMES, J. M., RESENDE, G. C., SOUZA, A. L., 1980. Efeitos do sal, antitranspirante e poda no endurecimento à seca de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex. Maiden. Rev. Floresta 11: 18-24.

GOUNARIS, K., BRAIN, A. P. R., QUINN, P. J., WILLIAMS, W. P., 1983. Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes. FEBS Lett. 153: 47-52.

GOVINDJEE, 1990. Photosystem II heterogeneity: the acceptor side. Photosynth. Res. 25: 151-160.

GOVINDJEE, 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. Aust. J. Plant Physiol. 22: 131-160.

GREER, D. H. & HARDACRE, A. K., 1989 Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in two maize hybrids varying low temperature tolerance. Aust. J. Plant Physiol. 16: 189-198.

GREER, D. H. & LAING, W. A., 1992. Photoinhibition of photosynthesis in intact kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves: Changes in susceptibility to photoinhibition and recovery during the growth season. Planta 186: 418-425.

GREER, D. H., BERRY, J. A., BJÖRKMAN, O., 1986. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: Role of light and temperature, and requirement for chloroplast-protein synthesis during recovery. Planta 168-253-260.

GROOME, Q. J., BAKER, N. R., LONG, S., 1991. Photoinhibition of holly (*Ilex aquifolium*) in the field during the winter. Physiol. Plant. 83: 585-590.

HAVAUX, M. & DAVAUD, A., 1994. Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of photosystem-II activity. Preferential inactivation of photosystem I. Photosynth. Res. 40: 75-92.

HAVAUX, M. & STRASSER, R. J., 1990. Protection of photosystem II by light in heat-stressed pea leaves. Z Naturforsch. 45c: 113-141.

HAVAUX, M. & TARDY, F., 1996. Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II *in vivo*: possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. Planta 198: 324-333.

HAVAUX, M. & TARDY, F., 1997. Thermostability and photostability of photosystem II in leaves of the *Clorina-f2* barley mutant deficient in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex. Plant Physiol. 113: 913-923.

HAVAUX, M., GREPPIN, H., STRASSER, R. J., 1991. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light. Planta 186: 88-98.

HENDREY, G. A. F., HOUGHTON, J. D., BROWN, S. B., 1987. The degradation of chlorophyll- A biological enigma. New Phytol. 107: 255-302.

HORTON, P. & RUBAN, A. V., 1992. Regulation of photosystem II. Photosynth. Res. 34: 375-385.

HUNDAL, T., VIRGIN, I., STYRING, S., ANDERSSON, B., 1990. Changes in the organization of photosystem II following

light-induced D1-protein degradation. Biochim. Biophys. Acta 1017: 235-241.

HUNER, N. P. A., KROL, M., WILLIAMS, J. P., MAISSAN, E., LOW, P. S., ROBERTS, D., THOMPSON, J. E., 1987. Low temperature development induces a specific decrease in trans-Δ^3-hexadecenoic acid content which influences LHC organization. Plant Physiol. 89: 144-150.

HUNER, N. P. A., WILLIAMS, J. P., MAISSAN, E., MYSCICH, E. G., KROL, M., LAROCHE, A., SINGH, J., 1989. Low temperature-induced decrease in trans-Δ^3-hexadecenoic acid content is correlated with freezing tolerance in cereals. Plant Physiol. 89: 144-150.

INOUE, M. T. & ODA, S. 1988. Photosynthesis and transpiration of cuttings and micropropagated clones of *Eucalyptus grandis* and *E. grandis* X *E. urophylla hybrids*. IN: 1st International Symposium on Forest Tree Physiology, Nancy, França, Resumos, pp. 101.

INOUE, M. T. & RIBEIRO, F.A., 1988. Fotossíntese e transpiração de clones de *Eucalyptus grandis* e *E. saligna*. IPEF 40: 15-20.

INOUE, M. T., VIEIRA, J. D., CORREA, G., 1990. Estudo comparativo do desempenho fotossintético entre mudas micropropagadas e estaqueadas de 4 clones do híbrido *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. IN: 6° Congresso Florestal Brasileiro, Campos do Jordão, Brasil, Resumos, p. 493-496.

JACOBS, M. R., 1981. Eucalyptus for planting. FAO: Roma. FAO Forestry Series, n°11, pp. 355-515.

KENYON, W. H. & DUKE, S. O., 1985. Effects of acifluorfen on endogenous antioxidants and protective enzymes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledones. Plant Physiol. 79: 862-866.

KRAUSE, G. H., 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. Physiol. Plant. 74: 566-574.

KRAUSE, G. H., 1994. Photoinhibition at low temperatures in vivo. IN: Photoinhibition of photosynthesis-Molecular mechanisms to the field (N.R. Baker and J.R. Bowyer, Eds), Bios Sci, Oxford, pp.

KRAUSE, G. H. & WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 42: 313-349.

KRAUSE, G. H., KIRK, M., HEBER, U., OSMOND, C. B., 1978. O_2-Dependent inhibition of photosynthetic capacity in intact isolated chloroplasts and isolated cells from spinach leaves illuminated in the absence of CO_2. Planta 142: 229-233.

KRAUSE, G. H., VIRGO, A., WINTER, K., 1995. High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. Planta 197: 583-591.

KRUPA, Z., HUNER, N. P. A., KROL, M., WILLIAMS, J. P., MAISSAN, E., JAMES, D. R., 1987. Development at cold hardening temperatures. The structure and composition of purified rye light harvesting complex II. Plant Physiol. 84:19-24.

KUHN, M. & BÖGER, P., 1990. Studies on the light-induced loss off the D1 protein in photosystem II membrane fragments. Photosynth. Res. 23: 291-296.

LABATE, C. A. & LEEGOOD, R. C., 1988. Limitation of photosynthesis by changes in temperature. Factors affecting the response of carbon-dioxide assimilation to temperature in barley leaves. Planta 173: 519-527.

LAING, W. A., GREER, D. H., SCHNELL, T., 1995. Photoinhibition of photosynthesis causes a reduction in vegetative growth rates of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. Aust. J. Plant Physiol. 22: 511-520.

LAPOINTE, L., HURNER, N. P. A., CARPENTIER, R., OTTANDER, C., 1991. Resistance to low temperature photoinhibition is not associated with isolated thylakoid membranes of winter rye. Plant Physiol. 97: 804-810.

LEEGOOD, R. C. & WALKER, D. A., 1981. Photosynthetic induction in wheat protoplasts and chloroplasts. Autocatalysis and light activation of enzymes. Plant Cell Environm. 4: 59-66.

LEITSCH, J., SCHNETTGER, B., CRITCHLEY, C., KRAUSE, G. H., 1994. Two mechanisms of recovery from photoinhibition *in vivo*: Reactivation of photosystem II related and unrelated to D1- protein turnover. Planta 194: 15-21.

LIMA, W. P., 1987. O Reflorestamento com eucalipto e seus impactos ambientais. Art Press, São Paulo, 114p.

LIMA, W. P., 1993. Impacto ambiental do eucalipto. 2ª Edição, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 301p.

LONG, S. P., 1983. C_4 Photosynthesis at low temperatures. Plant Cell Environm. 6: 345-363.

LONG, S. P., HUMPHRIES, S., FALKOWSKI, P. G., 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 633-662.

MALKIN, S., 1987. Fast photoacoustic transients from dark-adapted intact leaves: oxygen evolution and uptake pulses during photosynthesis induction - a phenomenology record. Planta 171: 65-72.

MALKIN, S. & CANAANI, O., 1994. The use and characteristics of the photoacoustic method in the study of photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 45: 493-526.

MATHUR, H. N., 1983. Editorial. Indian Forester 109.

McCREE, K. J., 1972. Test of current definitions of photosynthetically active radiation to shortwave radiation in the San Joaquim Valley. Agric. Meteorol. 10: 443-453.

OFFLER, C. E., PATRICK, J. W., ROSE, R. J., 1983. Chloroplast characteristics and photochemical efficiency of low irradiance grown *Eucalyptus pilularis* Sm seedlings. Photosynthetica 17: 227-234.

ÖGREN, E. 1988. Photoinhibition of photosynthesis in willow leaves under field conditions. Planta. 175: 229-36.

ÖGREN, E. & EVANS, J. R., 1992. Photoinhibition of photosynthesis *in situ* in six species of *Eucalyptus*. Aust. J. Plant Physiol. 19: 223-232.

ÖGREN, E. & EVANS, J. R., 1993. Photosynthetic light-response curves. 1. The influence of CO_2 partial pressure and leaf inversion. Planta 189: 182-190.

ÖGREN, E. & ROSENQVIST, E., 1992. On the significance of photoinhibition of photosynthesis in the field and its generality among species. Photosynth. Res. 33: 63-71.

ÖQUIST, G. & HUNER, N. P. A. 1991. Effects of cold acclimation on the susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in scots pine and in winter and spring cereals: A fluorescence analysis. Funct. Ecol. 5: 91-100.

OSMOND, C. B., 1983. Interactions between irradiance, nitrogen nutrition, and water stress in the sun-shade responses of *Solanum dulcamara*. Oecologia 57: 316-321.

OSMOND, C. B. & CHOW, W. S., 1988. Ecology of photosynthesis in the sun and shade: Summary and prognostications. Aust. J. Plant Physiol. 15: 1-9.

OTTANDER, C., HUNDAL, T., ANDERSSON, B., HUNER, N. P. A., ÖQUIST, G., 1993. Photosystem II reaction centers stay intact during low temperature photoinhibition. Photosynth. Res. 35: 191-200.

PASTORI, G. M. & TRIPPI, V.S., 1993. Cross resistance between water and oxidative stresses in wheat leaves. J. Agric. Sci. 120: 289-294.

PEREIRA, A. R., OLIVEIRA, A. C., MORAIS, E. J., 1980. Estudos de tipos de cobertura na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex Maiden. Rev. Floresta 5: 49-52.

POGGIANI, F., 1988. As implicações ecológicas dos reflorestamentos. IN: 1° Seminário Técnico sobre Plantas Daninhas e o Uso de Herbicidas em Reflorestamento, Rio de Janeiro, Brasil, Anais, p. 17-43.

POGGIANI, F., 1989. Estrutura, funcionamento e classificação das florestas - Implicações ecológicas das florestas plantadas. Doc. Florestais 3: 1-14.

POULET, P., CAHEN, D., MALKIN, S., 1983. Photoacoustic detection of photosynthesis oxygen evolution from leaves-quantitative analysis by phase and amplitude measurements. Biochem. Biophys Acta 724: 433-446.

POWLES, S. B., 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 15-44.

POWLES, S. B. & OSMOND, C. B. 1978. Inhibition of the capacity and efficiency of photosynthesis in bean leaflets illuminated in a CO_2-free atmosphere at low oxygen: a possible role for photorespiration. Aust. J. Plant Physiol. 5: 619-629.

POWLES, S. B., BERRY, J. A., BJORKMAN, O., 1983. Interaction between light and chilling temperature on the inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants. Plant Cell Environm. 6: 117-123.

PRINSLEY, R. T. & LEEGOOD, R. C., 1986. Factors affecting photosynthetic induction in spinach leaves. Biochem. Biophys. Acta 849: 244-253.

PRYOR, L. D., 1976. Biology of Eucalyptus. The Institute of Biology. Studies in Biology 61. Edward Arnold, London, 82p.

PRYOR, L. D., WILLIAMS, E. R. GUNN, B. V., 1995. A morphometric analysis of *Eucalyptus urophylla* and related taxa with descriptions of two new species. Aust. Syst. Bot. 8:57-70.

RABINO, I. & MANCINELLI, A. L., 1986. Light, temperature, and anthocyanin production. Plant Physiol. 81: 922-924.

REIS, G. G., REIS, M. G. F., MAESTRI, M., 1988. Crescimento e relações hídricas de mudas de *Eucalyptus grandis* e *E. camaldulensis* em tubetes sob três regimes de irrigação. Rev. Árvore 12: 183-195.

RICHTER, M., RÜHLE, W., WILD, A., 1990a. Studies on the mechanism of photosystem II photoinhibition I. A two-step degradation of D1- protein. Photosynth. Res. 24: 229-235.

RICHTER, M., RÜHLE, W., WILD, A., 1990b. Studies on the mechanisms of photosystem II photoinhibition II. The involvement of toxic oxygen species. Photosynth. Res. 24: 237-243.

RINTAMÄKI, E., SALO, R., LEHTONEN, E., ARO, E-M., 1995. Regulation of D1-protein degradation during photoinhibition of photosystem II *in vivo*: Phosphorylation of D1 protein in various plant group. Planta 195: 379-386.

ROBINSON, S. A., LOVELOCK, C. E., OSMOND, C. B., 1993. Wax as a mechanism for protection against photoinhibition- A study of *Cotyledon orbiculata*. Bot. Acta 106:

SALISBURY, F. B. & ROSS, C. W., 1992. Plant physiology, 4th Edition, Wadsworth Publishing Company, Belmont, pp. 207-224.

SALTVEIT JR., M. E., 1991. Prior temperature exposure affects subsequent chilling sensitivity. Physiol. Plant. 82: 529-536.

SANDS, P. J., CROMER, R. N., KIRSCHBAUM, M. U. F., 1992. A model of nutrient response in *Eucalyptus grandis* seedlings. Aust. J. Plant Physiol. 19: 459-470.

SATOH, K., 1970a. Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems. I. The dark reaction in photoinactivation. Plant Cell Physiol. 11: 15-27.

SATOH, K., 1970b. Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems. II. The occurrence and properties of two different types of photoinactivation. Plant Cell Physiol. 11: 29-38.

SCHRIEBER, U. & BERRY, J. A., 1977. Heat induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage to the photosynthetic apparatus. Planta 136: 233-238.

SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C., 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. IN: Ecophysiology of photosynthesis (E.D. Schultze and M.M. Caldwell, Eds.), Spring-Verlag, Berlin, pp. 49-70.

SCHNYDER, H., MÄCHLER, F., NOSBERGER, J., 1986. Regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity associated with lack of oxygen inhibition of photosynthesis at low temperature. J. Exp. Bot. 37: 1170-1179.

SIVAK, M. N. & WALTER, D. A., 1985. Chlorophyll *a* fluorescence: can it shed light on fundamental questions in photosynthetic carbon fixation? Plant Cell Environm. 8: 439-448.

SLATYER, R. O. & FERRAR, P. J., 1978. Photosynthetic characteristics of tree-line population of Australian snow gum, *Eucalyptus pauciflora*. Photosynthetica 12: 137-144.

SMILLIE, R. M. & HETHERINGTON, S. E., 1983. Stress tolerance and stress-induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence *in vivo*. Chilling, freezing, ice cover, heat, and light. Plant Physiol. 72: 1043-50.

SMITH, H., 1982. Light quality, photoperception, and plant strategy. Annu. Rev. Plant Physiol. 33: 481-518.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (SBS), 1992. A quanto andas o setor florestal brasileiro? Silvicultura 12: 6-9.

SOMERSALO, S. & KRAUSE, G.H., 1989. Photoinhibition at chilling temperature. Fluorescence characteristics of unhardened and cold-acclimated spinach leaves. Planta 177: 409-416.

SRIVASTAVA, A., STRASSER, R. J., GOVINDJEE, 1995. Polyphasic rise of chlorophyll a fluorescence in herbicide-resistant D1 mutants of *Chlamydomonas reinarditii*. Photos. Res. 43: 131-141.

STOKES, D. M. & WALKER, D. A., 1971. Phosphoglycerate as a Hill oxidant in a reconstituted chloroplast system. Plant Physiol. 48: 163-165.

STRASSER, R. K., SRIVASTAVA, A., GOVINDJEE, 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. Photochem. Photobiol. 61: 32-42.

TAIZ, L. & ZEIGER, E., 1991. Plant physiology. Benjamin/Cummings Publishing Company, New York, pp. 179-216.

TAKAHASHI, M. & ASADA, K., 1988. Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. Arch. Biochem. Biophys. 267: 714-722.

TARDY, F. & HAVAUX, M., 1996. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana*. J. Photochem. Photobiol. 34: 87-94.

TERASHIMA, I. & SAEKI, T., 1985. A new model for leaf photosynthesis incorporating the gradients of light environment and of leaf photosynthetic properties of chlorophyll within a leaf. Annu. Bot. 56: 489-499.

TURNBULL, F. W. & PRYOR, L. D., 1984. Species and seed sources. IN: *Eucalyptus* for wood production (W.E. Hillis and A.G. BROWN, Eds), CSIRO, Academic Press, Melbourne, pp. 18-63.

TYYSTJÄRVI, E., MÄENPÄÄ, P., ARO, E-M., 1994. Mathematical modeling of photoinhibition and photosystem II repair cycle. I. Photoinhibition and D1 protein degradation *in vitro* and in the absence of chloroplast protein synthesis *in vivo*. Photosynth. Res. 41: 439-449.

VAN HASSELT, Ph. R., 1973 Photooxidation of leaf pigments in cucumis leaf discs during chilling. Acta Bot. Neerl. 21:539-548.

VASCONCELLOS & COUTINHO

VU, J., CU, V., ALLEN, L. H., BOWES, G., 1984. Dark/light modulation of ribulosebisphosphate carboxilase activity in plants from different photosynthetic categories. Plant Physiol. 76: 843-845.

VERHOEVEN, A. S., ADAMS, W. W. III, DEMMIG-ADAMS, B., 1996. Close relationship between the state of xanthophyll cycle pigments and photosystem II efficiency during recovery from winter stress. Physiol. Plant. 96: 567-576.

WALKER, D., 1990. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis.2nd Edition, University of Sheffield Print Unit, Sheffield, 203p.

WALTERS, R. G. & HORTON, P., 1993. Theoretical assessment of alternative mechanisms for non-photochemical quenching of PS II fluoresce in barley leaves. Photosynth. Res. 36: 119-139.

WONG, S-C, COWAN, I. R., FAREQUAR, G.D., 1985. Leaf conductance in relation to rate of CO_2 assimilation. III. Influences of water stress and photoinhibition. Plant Physiol. 78: 830-834.

YAKIR, D., RUDICH, J., BRAVDO, B. A., 1985. Photoacoustic and fluorescence measurements of the chilling response and their relationship to carbon dioxide uptake in tomato plants. Planta 164: 345-353.

YAKIR, D., RUDICH, J., BRAVDO, B. A., MALKIN, S., 1986. Prolonged chilling under moderate light: effects on photosynthetic activity measured with the photoacoustic method. Plant Cell Environm. 9: 581-588.