UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Pós-graduação Botânica Unesp - Botucatu

# Alocação diferencial do $^{13}C$ em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae - Caesalpinoideae) sob deficiência hídrica

**ANGELO ALBANO DA SILVA BERTHOLDI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)
Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal

**BOTUCATU – SP**
**2015**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 fax (14) 3815-3744 posgraduacao@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Pós-graduação Botânica Unesp - Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

# Alocação diferencial do $^{13}C$ em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae - Caesalpinoideae) sob deficiência hídrica

**ANGELO ALBANO DA SILVA BERTHOLDI**

**PROF. DR. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA**
ORIENTADOR

**PROF. DR. VLADIMIR ELIODORO COSTA**
CO-ORIENTADOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)
Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

**BOTUCATU – SP**
**2015**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 fax (14) 3815-3744 posgraduacao@ibb.unesp.br

"*Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade.*"
*(Dalai Lama)*

***Dedico,***
*Aos meus pais Ronaldo e Cleusa.*
*Minha irmã Anie.*
*Pelo apoio e confiança durante o mestrado.*

# Agradecimentos

Agradeço a Deus.

À CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho.

Ao meu oreintador Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida e meu co-orientador Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa pelo incentivo, por acreditar em meu potencial, pelos ensinamentos e pela amizade. A orientação de vocês me ajudou a superar obstáculos.

À Profª. Drª Luciana Francisco Fleury do Departamento de Química e Bioquímica, pelo auxílo nas extrações realizadas no experimento.

Aos Professores, João Domingos Rodrigues, Anselmo Nogueira e Filipe Pereira Giardini Bonfim, por participarem da minha banca de qualificação e contribuírem na elaboração da minha dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia, Angélica, Danilo, Jennifer, Luis Paulo, Talita, Thayssa, Roberto, Giovanni e Thiago pelo companheirismo e apoio durante o mestrado.

Aos parceiros do Departamento de Botânica, Juliana, Amanda, Ana Cláudia, José Eduardo e Maria Helena, por contribuírem na realização do meu projeto.

Aos amigos da república Biotererê, Nilzinha, André Bergamo, André Nadal, Rafael, Lucas Sampaio, Igor, Stéfano, Guilherme, Leonardo, Matheus e Lucas Neves, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos amigos da Comuna, Adriana, Fernanda, Talita e Rafael, pela amizade.

Ao amigo do Departamento de Ciências Florestais, Rodrigo.

Aos parceiros do Centro de Isótopos Estáveis, Evandro, Cibele e Guilherme.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bertholdi, Angelo Albano da Silva.
Alocação diferencial do 13C em Copaifera langsdorffii Desf. (Fabaceae - Caesalpinoideae) sob condição de deficiência hídrica / Angelo Albano da Silva Bertholdi. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida
Coorientador: Vladimir Eliodoro Costa
Capes: 20303009

1. Carboidratos. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Isótopos estáveis. 4. Plantas - Resistência. 5. Desidratação (Hídrica).

Palavras-chave: Carboidratos não estruturais; Déficit hídrico; Isótopos estáveis; Óleo essencial.

# Sumário

Resumo .....1
Abstract .....2
1. Introdução.....3
2. Hipóteses.....5
3. Objetivos.....5
4. Revisão bibliográfica.....5
4.1 Espécie do estudo.....5
4.2 Aspectos fisiológicos em condições de deficiência hídrica e reidratação.....7
4.3 Síntese e translocação dos compostos orgânicos sob deficiência hídrica.....9
4.4 Isótopos estáveis e as plantas .....14
5. Referências bibliográficas.....17

Capítulo 1: Restrição hídrica de curta duração altera o δ $^{13}C$ em diferentes órgãos e compostos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf (Fabaceae – Caesalpinoideae).....33
Resumo.....33
Introdução.....33
Materiais e métodos.....35
Resultados.....42
Discussão.....49
Referências.....56

6. Considerações finais.....64

## Lista de Tabelas

**Tabela 1**-Característica químicas do solo.....35

**Tabela 2-**Características fisiológicas avaliadas nos tratamentos controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação. Taxa de assimilação de $CO_2$ (A), o potencial da água no solo ($\Psi_{H2Osolo}$) e eficiência quântica do PSII (Fv/Fm).....44

**Tabela 3-**Enriquecimento relativo natural ($\delta\ ^{13}C$) das estruturas vegetativas, óleo essencial das folhas e resíduo da extração do óleo essencial (óleo – folha) da *C. langsdorffii* em diferentes tratamentos.....46

**Tabela 4**-Quantificação do amido, açúcares solúveis e lipídios extraídos das estruturas vegetativas da *C.langsdorffii* em diferentes tratamentos.....48

**Tabela 5**-Enriquecimento relativo natural ($\delta\ ^{13}C$) dos açúcares solúveis extraídos das estruturas vegetativas da *C.langsdorffii* em diferentes tratamentos.....49

**Tabela 6**-Enriquecimento relativo natural ($\delta\ ^{13}C$) dos lipídios extraídos das estruturas vegetativas da *C.langsdorffii* em diferentes tratamentos.....49

## Lista de Figuras

**Figura 1**-Características de relações hídricas; condutância estomática ($g_s$) e potencial da água na folha avaliados em Predawn 5:30 h ($\Psi_{H2Ofolha}$ Pd) e *Midday* 12:00 h ($\Psi_{H2Ofolha}$ Md). Os dados de déficit hídrico são representados pelos valores do final do período de déficit hídrico e os demais dias são representados pelos valores do final do período de reidratação.....43

**Figura 2-**Curva de luz da dissipação fotoquímica (NPQ), taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação fotoquímica (qP) e rendimento quântico efetivo do ΦPSII (ΦPSII).....45

## Lista de abreviaturas

**Pd –** Predawn: Coletas realizadas ás 5:30 am

**Md –** Midday: Coletas realizadas ás 12:00 pm

$\Psi_{H_2O\ folha}$ - Potencial da água na folha

$\Psi_{H_2O\ solo}$ - Potencial da água no solo

$g_s$ - Condutância estomática

**IRGA -** Infra Red Gas Analyser

**A** – Taxa de assimilação de gás carbônico

**PEP- carboxilase** – Fosfoenolpiruvato – carboxilase

**RuBisCo** - Ribulose-Bisfosfato Carboxilase oxigenase

**DFFF** - Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos

$F_0$ – Fluorescência mínima ou inicial

$F_m$ – Fluorescência máxima

$F_v$ – Fluorescência variável

**F –** Fluorescência

**Fv/Fm -** Eficiência quântica máxima do PSII

**ETR –** Taxa de transporte de elétrons

**qP -** Quenching fotoquímico

**NPQ –** Quenching não fotoquímico

**ΦPSII -** Rendimento quântico efetivo do ΦPSII

**OE-** óleo essencial

$\delta\ ^{13}C$ – Enriquecimento relativo natural do isótopo de carbono 13

BERTHOLDI, A.A.S. **ALOCAÇÃO DIFERENCIAL DO $^{13}C$ EM *COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF. (FABACEAE - CAESALPINOIDEAE) SOB CONDIÇÃO DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA.** 2015, 72p – INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Resumo** - O déficit hídrico é um dos fatores de maior influência no crescimento e produtividade das plantas. As respostas bioquímicas e moleculares durante a deficiência hídrica são essenciais para a ativação dos mecanismos de resistência do vegetal. Muitas espécies arbóreas apresentam mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, para superar danos ocasionados pela deficiência hídrica, como mudanças no padrão de crescimento, desenvolvimento de órgãos vegetativos, alteração da condutância estomática, ajuste do potencial osmótico dos tecidos e produção de substâncias do metabolismo secundário. Todas essas mudanças podem ocasionar alterações na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ em diferentes órgãos vegetativos da planta, bem como nos compostos orgânicos produzidos e armazenados nos tecidos. Avaliamos as características de relações hídricas e eficiência fotoquímica na *Copaifera langsdorffii* Desf. sob distintas condições hídricas e relacionamos com as alterações nos compostos orgânicos e o enriquecimento relativo natural $^{13}C/^{12}C$ de diferentes estruturas vegetativas. As características de relações hídricas apresentaram redução no final do período de déficit hídrico e recuperação hídrica no final do período de reidratação. As análises referentes às etapas fotoquímicas apresentaram alterações significativas no final do período de reidratação. Os altos valores de taxa de transporte de elétrons e *quenching* fotoquímico podem ter auxiliado na recuperação dos danos causados pela fotoinibição durante o período de deficiência hídrica. A retomada da atividade fotoquímica após a reidratação aponta a capacidade de fotoproteção da *C. langsdorffi* em condições de déficit hídrico. No final do período de déficit hídrico ocorreram diferenças na proporção isotópica natural $^{13}C/^{12}C$, sendo que nas folhas e no resíduo da extração do óleo essencial houve o enriquecimento de $^{13}C$ no óleo essencial e lipídios extraídos das folhas observou o empobrecimento em $^{13}C$. Ainda, como resultado do período de déficit hídrico, folhas e raiz principal apresentaram redução na quantidade de amido e açúcares solúveis.

**Palavras chave:** isótopos estáveis, déficit hídrico, carboidratos não estruturais, óleo essencial

BERTHOLDI, A.A.S. **DIFFERENTIAL ALLOCATION OF $^{13}C$ IN *COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF. (FABACEAE - CAESALPINOIDEAE) UNDER WATER STRESS CONDITION.** 2015, 72p – INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU

**Abstract** - Drought is one of the most factors that influence the growth and the productivity of plants. The biochemical and molecular responses during water stress are essential to activate mechanisms of plant resistance. Many tree species have morphological, physiological and biochemical mechanisms to overcome damage caused by water stress. Such changes are modidications on the pattern of growth, development of vegetative organs, changes in stomatal conductance, osmotic potential adjustment of tissues and production of substances from secondary metabolism. All these changes may cause modifications on the isotopic $^{13}C/^{12}C$ ratio in different vegetative organs of the plant, as well as in organic compounds produced and stored on tissues. We evaluated the water relations and photochemical efficiency in *Copaifera langsdorffii* Desf. under different water conditions and related it with the changes on the organic and natural relative enrichment $^{13}C/^{12}C$. The water relations characteristics decreased at the end of the period of water deficit and water recover at the end of the rehydration period. The analyzes regarding the photochemical steps showed significant changes at the end of the rehydration period. The high values of electron transport rate and photochemical quenching may have aided in the recovery of damages caused by photoinhibition during water deficit period. The resumption of photochemical activity after rehydration pointed photoprotection capacity of *C. langsdorffi* in water deficit conditions. The end of the drought period did not show differences in natural isotopic ratio $^{13}C$ / $^{12}C$, and the leaves and residue of essential oil extraction was $^{13}C$ enrichment in essential oil, and lipids extracted from the leaves observed depletion in $^{13}C$. Furthermore, in drought period, leaves and principal root decreased the amount of starch and soluble sugars.

**Keywords:** stable isotopes, dry, non-structural carbohydrates, essential oil

## 1. Introdução

*Copaifera langsdorffii* Desf. pertence à família Fabaceae (subfamília Caesalpinoideae) (APG III, 2009) é uma espécie arbórea, heliófita e com grande plasticidade fenotípica. Caracteriza-se como espécie neotropical distribuindo-se em fisionomias como Cerrado, floresta estacional, floresta ombrófila densa e Caatinga (PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002; CARVALHO, 2003). A espécie apresenta folhas com mecanismos fisiológicos e adaptação morfológica que permitem o ajuste à variação da distribuição da luz e estresse hídrico sazonal (CASTRO et al., 1999). Ronquim, Prado e Souza (2009) descreveram a capacidade de *C. langsdorffii* em alterar a alocação de biomassa entre as partes aéreas e subterrâneas, em decorrência do déficit hídrico e disponibilidade de luz.

A fenologia da espécie tem relação direta com a sazonalidade das fisionomias na qual pertence; a maturação e dispersão dos frutos ocorrem na época seca, enquanto a germinação e o crescimento das plântulas ocorrem logo em seguida, durante o período chuvoso (FREITAS; OLIVEIRA, 2002). Dentre as características da espécie destaca-se a perda parcial das folhas em épocas de estiagem. A troca gradual de folhas permite a manutenção de folhas ativas durante todo o ano.

A época de renovação das folhas ocorre após o período de senescência. Durante a senescência foliar enzimas hidrolíticas decompõem as reservas energéticas das folhas (amido) em solutos (açúcares solúveis) nos quais são transportados para o corpo principal da planta via floema. Os solutos são reutilizados nos processos de síntese da planta e atuam no crescimento de raízes, florescimento ou desenvolvimento de frutos (NEWELL; MULKEY; WRIGHT, 2002). A renovação das folhas tem relação com a precipitação de chuva, pois ocorre no final da época seca e início da úmida.

Em floresta estacional semidecidual mesmo com a ocorrência dos primeiros pulsos de chuva, a espécie apresenta baixa $g_s$ e valores constantes de $\Psi_{H2Ofolha}$ e CRA. Essas respostas fisiológicas contribuem no estabelecimento e distribuição em fisionomias com sazonalidade bem definida (RODRIGUES, 2013). A plasticidade da *C. langsdorffii* em diferentes fisionomias torna esta espécie um importante objeto de estudo, para a compreensão do potencial adaptativo sob influência da sazonalidade.

O déficit hídrico é um dos fatores de maior influência no crescimento e produtividade das plantas (REDDY; REDDY; ANBUMOZHI, 2003). As respostas bioquímicas e moleculares durante a época seca são essenciais para a percepção geral dos mecanismos de resistência vegetal (SHAO et al., 2005; SHAO, LIANG, SHAO, 2005; JALEEL et al., 2006).

Em condições de déficit hídrico, nota-se a relação direta entre a redução da concentração intercelular de $CO_2$, em razão do fechamento estomático, gerando decréscimos na assimilação do $CO_2$ e no rendimento quântico do fotossistema II (DRIEVER, BAKER, 2011). Entretanto, em casos de estresse hídrico severo, podem ocorrer limitações em componentes não estomáticos, como danos nos centros de reação do fotossistema II, os quais podem apresentar reversão parcial após reidratação (AIDAR et al.,2014).

A utilização de fotoassimilados é outro fator que pode ser alterado em decorrência da deficiência hídrica (ALBUQUERQUE, 2013). Plantas submetidas a restrição hídrica reduzem a turgescência das células dos órgãos vegetais, comprometendo a expansão celular, promovendo a redução no alongamento do caule e da folha (BENGOUGH et al, 2011). A translocação de carbono (oriundo dos fotoassimilados) para as raízes é comprometida em condições de deficiência hídrica (ANDEREGG et al, 2012). O acúmulo de carbono nas raízes é um importante mecanismo de adaptação, para algumas espécies (GALVEZ et al, 2011). Tal acúmulo proporciona maior comprimento da parte subterrânea em relação a aérea, permitindo a obtenção de água pelas plantas mesmo depois da superfície do solo ter perdido a umidade durante a época seca (AROCA, PORCEL, RUIZ-LOZANO, 2012).

A análise do enriquecimento relativo natural ($\delta\ ^{13}C$) é a técnica frequentemente utilizada na avaliação de trocas gasosas (LEAVITT; WRIGHT, 2002), determinação dos ciclos fotossintéticos (NATE, CRAIG, LAURA, 2010) e translocação e alocação de carbono em plantas submetidas à deficiência hídrica (ADIREDJO et al., 2014). Os processos responsáveis pelo enriquecimento relativo natural de $^{13}C/^{12}C$ nas plantas está associado à difusão de $CO_2$ nos espaços intracelulares da folha e a carboxilação pela enzima RuBisCo (catalisa a redução de $CO_2$ no ciclo de Calvin). Desta forma, a escassez de água altera a razão $^{12}C/^{13}C$ na planta devido ao fechamento estomático e baixa taxa fotossintética (FARQUHAR; LLOYD, 1993, EBDON; KOPP, 2004). Tal fato é responsável por variações no enriquecimento relativo nos tecidos vegetais de espécies cultivadas em diferentes condições hídricas (FARQUHAR; RICHARDS, 1984).

A análise de $\delta\ ^{13}C$ permite detectarmos as alterações na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ em resposta a curtos períodos de déficit hídrico. Respostas à deficiência hídrica e reidratação, além de indicarem o padrão fisiológico da espécie, também influenciam na síntese e translocação de esqueletos carbônicos nos órgãos vegetativos. Portanto as técnicas de análises de $\delta\ ^{13}C$ podem indicar alterações na proporção isotópica $^{13}C/^{12}C$ de tecidos e compostos orgânicos.

## 2. Hipóteses

- O curto período de déficit hídrico influencia na translocação de carbono nos órgãos vegetativos e compostos orgânicos da *C.langsdorffii.*

- As respostas fisiológicas durante a deficiência hídrica influencia nas alterações da razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ de órgãos vegetais e compostos orgânicos.

## 3. Objetivos

- Avaliar as alterações na $\delta$ $^{13}C$ em diferentes estruturas vegetativas e compostos orgânicos da *C. langsdorffii* submetidas a variação disponibilidade hídrica.

- Relacionar os efeitos das respostas fisiológicas com o enriquecimento relativo natural $^{13}C$ da *Copaifera langsdorffi* Desf..

- Avaliar as alterações no conteúdo de amido, açúcares solúveis e lipídeos das estruturas vegetativas de *C. langsdorffi* durante diferentes períodos de disponibilidade hídrica.

## 4. Revisão Bibliográfica

### 4.1 Espécie do estudo

*Copaifera langsdorffii* Desf, pertence à família Fabaceae Lindl. ou Leguminosae é conhecida como copaíba, copaíba-vermelha e bálsamo. Quanto à classificação fitoecológica é uma espécie secundária tardia a clímax, com grande plasticidade ecológica, ocorrendo tanto em áreas de solo fértil e bem drenado como em áreas de solo muito pobre, ácido e álico, do Cerrado (LORENZI, 2008). É uma espécie arbórea, perenifólia, de grande longevidade, de crescimento lento a moderado e com grande plasticidade fenotípica pode ser encontrada em distintas fisionomias como cerrado stricto sensu, cerradão, matas ciliares e florestas estacionais semideciduais (SARMIENTO; MONASTERIO 1983; FELFILI; SILVA-JÚNIOR, 1999). Em Floresta Ombrófila Densa, na idade adulta, pode atingir de 10 a 35 m de altura; no Cerrado e Caatinga, apresenta porte menor, variando de 2 a 10 m de altura (CARVALHO, 2003).

A troca gradual de folhas de *C. langsdorffii* permite a ocorrência de folhas ativas o ano todo. A perda de parte das folhas na época seca resulta em trocas gasosas menos intensas e economia de água, o auge da renovação das folhas ocorre em sequência à perda de folhas, no final da época seca e início da chuvosa. O período de seca, seguido das primeiras chuvas pode

ser considerado um estímulo para o início do crescimento vegetativo (MIRANDA,1995; FREITAS; OLIVEIRA, 2002)

O ritmo fenológico da espécie favorece o estabelecimento e a reprodução de *Copaifera langsdorffii*. Na época chuvosa, as árvores maximizam o ganho de carbono por estarem com as copas plenamente desenvolvidas e isso influencia no florescimento e produtividade de frutos. Na época seca, as plantas perdem as folhas em resposta ao déficit hídrico. Além disso, ocorre a deiscência dos frutos e consequentemente a exposição das sementes aos dispersores. A estratégia vegetativa parece ser mais influenciada por fatores climáticos. No entanto, a estratégia reprodutiva é influenciada pelas interações entre planta e animal. (PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002).

Os locais de produção de óleo de copaíba são as cavidades e canais secretores, estes são amplamente distribuídas pelos órgãos vegetativos da planta (RODRIGUES; TEIXEIRA; MACHADO, 2011). As cavidades e os canais secretores em *C. langsdorffii* são responsáveis pela defesa contra fatores bióticos e abióticos (LANGENHEIM, 2003). A presença de canais e cavidades secretoras são importantes para a manutenção das mudas e estabelecimento dos indivíduos adultos (RODRIGUES; TEIXEIRA; MACHADO, 2011). As cavidades secretoras estão envolvidas na produção de óleos compostos principalmente por sesquiterpenos voláteis. Esses compostos, além de serem encontrados nas folhas, também estão presentes em estruturas reprodutivas como o fruto e arilo (PORTELLA, 2015).

Algumas plantas apresentam plasticidade no seu desenvolvimento crescendo como plantas de sol ou plantas de sombra. Esse crescimento é influenciado por diversos fatores ambientais sendo a luz um agente determinante da morfologia e da anatomia foliar (LORETO; TSONEV; CENTRITTO, 2009; COSTA et al., 2010). Em Nascimento et al (2014) *C.langsdorffi* foi exposta a variações na intensidade e na qualidade de luz, isso afetou as características de crescimento, como área foliar, espessura do limbo e biomassa seca da parte aérea e da raiz, a frequência e a biometria dos estômatos, a espessura do estrato epidérmico adaxial e abaxial, a frequência e os diâmetros das cavidades secretoras de óleo-resina e o diâmetro do feixe vascular da nervura central da folha. Tais características indicaram plasticidade fenotípica da *C.langsdorffii*, quando esta foi submetida a diferentes níveis de sombreamento. (SOUZA et al., 2010).

Existem poucos trabalhos relacionando as respostas fisiológicas da *C.langsdorffi* com a deficiência hídrica (PRADO; MORAES; MATTOS, 1994; RONQUIM; PRADO, SOUZA, 2009). A sazonalidade do Cerrado teve influência nas respostas ecofisiológicas de *C. langsdorffii.* A espécie superou o período de déficit hídrico ajustando os valores do $\Psi_{H2Ofolha}$,

também reduziu a perda de água com menores valores de $g_s$ na época seca. A espécie apresentou fotoinibição porém não houve prejuízos ao aparato fotossintético (RODRIGUES, 2013).

### 4.2 Aspectos fisiológicos em condições de deficiência hídrica e reidratação

A seca é um estresse abiótico que consiste num período sem precipitação de chuva no qual a quantidade de água no solo é reduzida, submetendo as plantas à diminuição de disponibilidade hídrica. O estado de dessecação do solo acontece devido à forte evaporação causada pela demanda evaporativa do ar e intensa radiação solar. (CARUSO et al., 2008; XU et al., 2008).

O déficit hídrico provoca uma série de respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas. A indução do metabolismo hormonal, o fechamento dos estômatos, a repressão da fotossíntese e do crescimento celular e a ativação da respiração, podem afetar no crescimento e produtividade vegetal (REDDY; REDDY; ANBUMOZHI, 2003; MENG et al., 2014). As respostas bioquímicas e moleculares durante a época seca são essenciais para a percepção geral dos mecanismos de resistência da planta em condições de déficit hídrico (SHAO et al., 2005; SHAO, LIANG, SHAO, 2005; JALEEL et al., 2006). Para avaliar a intensidade do estresse hídrico nas plantas são utilizadas diversas características para inferir a disponibilidade de água no solo e distribuição pluviométrica (LARCHER, 2004).

As plantas possuem diferentes mecanismos de resistência à deficiência hídrica os quais podemos dividir em escape, evitação e tolerância. No escape é possível observar estratégias "evasivas" das plantas, o rápido desenvolvimento fenológico e alto grau de plasticidade são exemplos dessas estratégias. Em alguns casos de deficiência hídrica, as plantas são capazes de encurtar seu ciclo de vida, antecipando a produção de flores ou sementes. Na evitação à desidratação a planta evita o equilíbrio termodinâmico com o ambiente. Neste caso a manutenção do turgor e volume celular pode ser suprida pela absorção de água por um sistema radicular abundante, redução da perda de água por transpiração através do fechamento estomático ou por vias não estomáticas como a cutícula (LEVITT, 1972). A tolerância à época seca é um mecanismo que permite manutenção do metabolismo, mesmo com a redução do potencial hídrico dos tecidos. Isso ocorre devido ao acúmulo de solutos compatíveis ou osmólitos, proteínas osmoprotetoras e à capacidade antioxidante (KRAMER; BOYER, 1995; APSE; BLUMWALD, 2002; VERSLUES et al., 2006). Espécies arbóreas e arbustivas do mediterrâneo apresentam estratégias ecológicas distintas durante a época seca no verão. Neste caso o que difere essas estratégias são os padrões de deciduidade

foliar. As espécies que perdem a maioria de suas folhas apresentam estratégia de evitação a dissecação e as espécies que mantem a maioria das folhas apresentam mecanismos de tolerância ao estresse (PALACIO; MAESTRO; MONTSERRAT-MARTÍ, 2007).

Em condições de déficit hídrico moderado nota-se a relação direta entre a redução da concentração intercelular de $CO_2$ em razão do fechamento estomático. A interferência no movimento de $CO_2$ pelo mesofilo resulta em alterações na fase fotoquímica e no metabolismo de carbono. O aumento na dissipação de energia luminosa no aparato fotossintético interfere na atividade da RuBisCo, no mesofilo, e da PEP – carboxilase, na bainha, repercutindo no rendimento quântico do fotossistema II, na inativação de enzimas do ciclo de Calvin e na diminuição na síntese de ATP e Ribulose 1,5- bifosfato (RuBP) afetando a eficiência da atividade fotossintética (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; VAZ et al., 2010).

Em casos de estresse hídrico severo ocorrem limitações nos componentes não estomáticos como danos nos centros de reação do fotossistema II, queda acentuada da fotossíntese, ativação da respiração e ajuste do metabolismo. A reversão parcial dos danos nos centros de reação pode ocorrer após reidratação (ANGELOPOULOS et al.,1996). O aumento no período de exposição ao estresse hídrico intensifica os danos nos centros de reação e consequentemente a morte dos tecidos vegetais (SHAO et al., 2005).

A recuperação pós reidratação é um componente importante na resposta das plantas submetidas à deficiência hídrica. O fornecimento de água pós deficiência hídrica proporciona alterações no balanço de carbono e grau do declínio fotossintético, proporcionando a capacidade de recuperação fotossintética nas plantas. (SAPETA et al., 2013; KUDOYAROVA; KHOLODOVA; VESELOV, 2013; AIDAR et al., 2014). Plantas jovens de aroeira, sob estresse hídrico e baixos níveis de luz, apresentaram atividade fotossintética reduzida. A limitação na condutância estomática teve grande influência nesta redução, mesmo havendo níveis elevados de peroxidação lipídica os danos ao fotossistema II, não influenciaram nas respostas das plantas (QUEIROZ; GARCIA, LEMOS FILHO, 2002).

O $\Psi_{H2Ofolha}$ é a característica fisiológica mais utilizada para avaliar o estado hídrico da planta principalmente em condições de deficiência hídrica (KRAMER; BOYER, 1995; GIMENEZ; GALLARDO; THOMPSON, 2005; MARTORELL et al., 2014). Em período de seca, é possível notar redução no $\Psi_{H2Ofolha}$ antes mesmo da redução do $\Psi_{H2Osolo}$. Apesar de ter água suficiente para as plantas no início da época seca, a diminuição do $\Psi_{H2Ofolha}$ Md é observada em dias quentes e ensolarados. Nessas condições as folhas apresentam diminuição do turgor das células do mesofilo. O turgor das células guarda influencia na assimilação de $CO_2$ consequentemente a manutenção do volume do cloroplasto é afetada (GUPTA;

BERKOWITZ, 1987). A utilização da energia fotoquímica nos cloroplastos é prejudicada pois ocorre a diminuição na síntese de ATP e RuBP. Caso não ocorra utilização desta energia os fenômenos de fotoinibição podem ser induzidos e acentuados. A fotoinibição resultará em diminuição do potencial fotoquímico, associado aos mecanismos de ativação da dissipação de energia e/ou da destruição efetiva do fotossistema II.

A produção de fotoassimilados é outro fator que pode ser alterado em decorrência da deficiência hídrica (ALBUQUERQUE, 2013). Plantas submetidas a deficiência hídrica reduzem a turgescência das células dos órgãos vegetais, $\Psi_{H2O}$, $g_s$ e fotossíntese, ocasionando redução ou limitação de carbono nas plantas, isto compromete a expansão celular, promovendo a redução no alongamento do caule e da folha (MCDOWELL et al., 2008; SALA; PIPER; HOCH, 2010). Em plantas jovens de *Populus tremuloides* Michx. houve influência das trocas gasosas e relações hídricas na dinâmica de C nas raízes. As plantas jovens sob grave estresse hídrico apresentaram crescimento nas raízes e aumento nas reservas de açúcar e amido solúvel no sistema radicular (GALVEZ et al., 2011).

A translocação de carbono nas raízes é alterada em condições de deficiência hídrica (WILLAUME; PAGÈS, 2006). O acúmulo de carbono (oriundo da fotossíntese) nas raízes é um importante mecanismo de adaptação, para algumas espécies (MULLER, et al., 2011). Absorção de água é maximizada com o ajuste do padrão de alocação do carbono, ou seja, o aumento de carbono nas raízes proporciona aumento na superfície de absorção. (LAMBERS; CHAPIN; PONS, 2008; ALEXOU, 2013). Em Olmo; Lopez-Iglesias e Villar (2014) a deficiência hídrica resultou em alterações significativas nas raízes de plantas jovens e lenhosas. Os indivíduos submetidos à deficiência hídrica apresentaram alterações na alocação de biomassa, aumento no comprimento e diâmetro das raízes. Além disso notou-se maior desenvolvimento de raízes mais finas nas camadas mais profundas do solo. As médias do índice de plasticidade das raízes sob deficiência hídrica tiveram relação direta com os índices de resistência à seca.

### 4.3 Síntese e translocação dos compostos orgânicos sob deficiência hídrica

A relação fonte-dreno é a interação fisiológica entre órgãos vegetais que consiste no transporte de fotoassimilados de órgãos exportadores (fontes) como folhas para órgãos não fotossintéticos ou que não produzem fotoassimilados em quantidade suficiente para suprir os processos de crescimento ou reserva (drenos) como raízes, frutos e folhas imaturas (ROITSCH, 1999).

Os fotoassimilados são carboidratos não-estruturais oriundos da fotossíntese. Podemos dividir os principais carboidratos não-estruturais, em amido, açúcares solúveis redutores e não-redutores. Entre os açúcares redutores, os principais são a glicose e a frutose, enquanto o principal açúcar não-redutor é a sacarose. Os carboidratos solúveis (frutose, glicose e sacarose) atuam na regulação osmótica e no transporte, enquanto os carboidratos insolúveis (amido) compõem as reservas energéticas das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Estresses abióticos, como déficit hídrico, modificam as relações fonte-dreno influenciando no crescimento das plantas como adaptação ao estresse. Alterações no desenvolvimento das plantas é um exemplo de resposta ao estresse. A redução do tamanho e número de órgãos dreno acontece, pois a produção de carboidratos nos órgãos fonte é insuficiente para a manutenção dos processos de crescimento vegetativo. A estabilidade no desenvolvimento das plantas durante o estresse exige a otimização dinâmica da relação fonte-dreno garantindo o particionamento de carboidratos para estruturas vegetativas e reprodutivas minimizando o consumo de carboidratos dos órgãos fontes tal processo auxilia nas respostas adaptativas das plantas durante o estresse. A otimização dinâmica da relação fonte-dreno é altamente plástica e tem influência da intensidade do estresse (ALBACETEA; MARTÍNEZ-ANDÚJAR; PÉREZ-ALFÓCEA, 2014)

Os carboidratos produzidos durante os processos fotossintéticos podem ser consumidos imediatamente ou armazenados. Em condições de deficiência hídrica a utilização dos carboidratos é afetada; a época seca influencia na conversão de fotoassimilados em novas estruturas das plantas. Mudanças na partição dos carboidratos no interior da planta resultam em mecanismos de adaptação e resistência à deficiência hídrica. Os carboidratos armazenados como reserva (amido) se distribuem entre os órgãos vegetativos e reprodutivos das plantas pela relação fonte-dreno. Esse processo garante a sobrevivência de plantas sob condições sazonais estressantes e consequentemente facilita a recuperação após distúrbios (MCDOWELL, 2011). As formas solúveis dos carboidratos não estruturais são importantes reguladores do ajustamento fisiológico das plantas sob déficit hídrico (PINHEIRO; CHAVES, 2011).

Para que ocorra a síntese de carboidratos nas plantas é necessário inicialmente que o $CO_2$ atmosférico seja fixado pelas plantas. Após a difusão do $CO_2$ atmosférico para os espaços intercelulares do mesofilo foliar até os cloroplastos o é $CO_2$ enzimaticamente combinado a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) pela enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo) formando um intermediário instável de 6 carbonos. Este dissocia-se em duas

moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA) que serão convertidas em trioses-fosfato (triose-P) em reações que requerem ATP e NADPH (TAIZ, ZEIGER, 2010).

As trioses-P são o principal produto da assimilação fotossintética de carbono nos cloroplastos sendo utilizadas na síntese de açúcares solúveis, açúcares alcoóis, oligossacarídeos solúveis. Após a formação das trioses-P, ocorre a formação dos metabólitos do "pool" de hexoses fosfato Os metabólitos do pool de hexoses fosfato (glicose 1-fosfato, glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato) estão em equilíbrio por ação das enzimas fosfoglucomutase e glicose 6-fosfato isomerase (LEEGOOD et al., 2000).

A entrada neste "pool" pode ser feita através de metabólitos provenientes da gliconeogênese e da fosforilação de hexoses livres e na saída ocorre a síntese de amido a partir de glicose 1-fosfato, síntese de sacarose a partir da glicose 1-fosfato e frutose 6-fosfato e formação de parede celular a partir de glicose 1-fosfato através de reações oxidativas da via das pentoses fosfato (glicose 6-fosfato) (DENNIS, BLAKELEY, 2000). A degradação do amido pode ocorrer através de duas rotas bioquímicas: a fosforolítica que produz hexoses fosfato e a hidrolítica que produz açúcares livres. A degradação da sacarose pode ocorrer por ação das enzimas sacarose sintase e invertase (SHARKEY et al., 2004).

Os carboidratos desempenham várias funções em condições de deficiência hídrica, destacando os açúcares solúveis como agentes protetores durante o processo de desidratação celular. Esses são responsáveis pela manutenção do potencial hídrico durante o reajuste osmótico, atuação na manutenção da síntese de isopreno, estabilização das membranas, redução da hidrólise de proteínas, desintoxicação metabólica devido o sequestro de espécies reativas de oxigênio (ROS) além da proteção das células perante a desidratação (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004; REJŠKOVÁ et al., 2007; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; MOUSTAKAS et al, 2011; LOUTFY et al, 2012; RODRÍGUEZ-CALCERRADA et al, 2013).

Os efeitos da época seca sobre a taxa fotossintética diminuem a quantidade de carbono recentemente fixado, modificando a mobilização e a partição de carboidratos não estruturais (açúcares solúveis, amido e açúcar álcoois). As enzimas relacionadas à respiração e biossíntese de carboidratos também são afetadas (KAMELI; LOSEL, 1993; PATTANAGUL; MADORE, 1999; LEE et al., 2008). Devido à restrição da produção e do consumo de fotoassimilados, o déficit hídrico também altera o fracionamento de carboidratos nas folhas e nos demais órgãos da planta. As diferenças genotípicas podem influenciar nos níveis de carboidratos e na aclimatação do metabolismo de carbono (LAWLOR; CORNIC, 2002).

As folhas são os principais órgãos de assimilação das plantas. A senescência foliar pode afetar as taxas de assimilação de carbono e o curso sazonal de carboidratos não estruturais. Vários autores têm relatado diferenças nas dinâmicas de carboidratos de espécies decíduas e perenes (MOONEY; HAYS, 1973; PIISPANEN; SARANPÄÄ, 2001; NEWELL; MULKEY; WRIGHT, 2002). Na maioria dos casos, as espécies perenes exibem flutuações sazonais menos intensas, nas reservas de carboidratos, que as espécies decíduas (HOCH; RICHTER; KÖRNER, 2003).

O aumento dos compostos de carbono (açúcares) é obtido através da quebra do amido, o qual diminui drasticamente na época seca (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO. 2009). O carbono presente nas reservas energéticas da planta é redistribuído para as folhas a fim de suprir as interferências da deficiência hídrica no metabolismo e nos processos fotossintéticos da planta (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; MULLER et al., 2011). As concentrações de açúcares solúveis nas folhas dependem da intensidade e duração da deficiência hídrica. Mesmo havendo menores taxas de assimilação de carbono as plantas submetidas à deficiência hídrica moderada apresentam aumento na concentração de açúcares solúveis, em contrapartida quando a deficiência hídrica é severa essas concentrações tendem a ser constantes ou diminuir (PRAXEDES et al., 2006).

Em Ramalho et al. (2014) três variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris L*) foram submetidas a deficiência hídrica moderada. Nas três variedades observou-se aumento significativo de açúcares solúveis nas folhas e inibição da taxa fotossintética liquida. O aumento na concentração de açúcares (p. ex.: glicose, frutose e sacarose) podem ter contribuído com a inibição da taxa fotossintética líquida proporcionando regulação dos processos de assimilação de carbono (LEE et al., 2008). Dentre os açúcares acumulados nas folhas de feijão, a sacarose apresentou maiores concentrações, o acúmulo de sacarose em resposta à desidratação é geralmente associada com maior tolerância ao déficit hídrico (PALONEN; BUSZARD; DONNELLY, 2000; PRAXEDES et al., 2006; LAHUTA, GÓRECKI, 2011).

Diferentes padrões de utilização de carboidratos durante à deficiência hídrica prolongada foi observado em duas espécies de eucalipto e *Pinus radiata*. No grupo controle, as duas espécies de eucalipto apresentaram acúmulo de amido somente nas raízes. Durante a época seca houve redução nas concentrações de amido. Mesmo havendo a mortalidade das plantas, as reservas de amido não foram totalmente esgotadas. O nível de degradação de amido em *P. radiata* foi muito elevado, variando de 54% a 60% entre os órgãos vegetativos e

48% na planta inteira; as plantas que atingiram a mortalidade, apresentaram redução de 85% de amido em relação as plantas irrigadas (MITCHELL et al., 2013).

Além do amido as plantas possuem outras substâncias responsáveis pelo armazenamento de energia em forma de carbono. Os lipídios apresentam formas de carbono mais reduzidas que os carboidratos. A oxidação dos lipídios proporciona mais energia que os carboidratos, porém para a realização da biossíntese de lipídios é necessária uma quantidade maior de energia metabólica mesmo sendo mais energéticos os lipídios não são utilizados para armazenagem de energia (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Os lipídios são divididos em triacigliceróis (gorduras e óleos) e glicerolipídeos. Os triacigliceróis são eficientes na armazenagem de carbono reduzido, principalmente em sementes, sintetizados no retículo endosplasmático e se acumulam dentro da camada bicamada fosfolipídica formando corpos lipídicos. Os glicerolipídeos polares são os principais constituintes das estruturas primárias além da atuação no metabolismo das membranas celulares (DAKHMA et al., 1995). Os ácidos graxos componentes do glicerolipídeo são sintetizados nos cloroplastos e após duas rotas de acilação que consiste na transferência de ácidos graxos da acil- ACP ou acil-CoA para o glicerol-3- fosfato, forma o ácido fosfatídico (TAIZ, ZEIGER, 2010).

A síntese de glicocerolipídeo pode ocorrer por duas rotas: a procariótica que ocorre nos cloroplastos onde são utilizados produtos da síntese dos ácidos graxos para sintetizar o ácido fosfatídico e seus derivados; e a rota eucariótica que ocorre no citoplasma onde um conjunto de aciltransferases no retículo endoplasmático são utilizadas na incorporação de ácidos graxos no ácido fosfatídico e seus derivados. O ácido fosfatídico é convertido em fosfatidilinositol ou fosfatidilglicerol que darão origem aos glicolipídeos (TAIZ, ZEIGER, 2010; YU; LI, 2014).

Em resposta a condições de estresse, as plantas podem remodelar os níveis químicos dos glicerolípidos para manter a integridade e fluidez das membranas celulares. As membranas celulares respondem rapidamente aos efeitos do estresse hídrico devido a cascata de sinalizações ocasionada pela ação das fosfolipases e mensageiros lipídicos (MEIJER; MUNNIK, 2003). Devido o aumento de espécies reativas de oxigênio e a ativação de enzimas hidrolíticas o déficit hídrico induz danos ás membranas celulares principalmente nas membranas dos cloroplastos. Portanto a capacidade de síntese de componentes lipídicos nos cloroplastos após a reidratação é essencial para o metabolismo de recuperação das folhas. (TORRES-FRANKLIN et al, 2007).

### 4.4 Isótopos estáveis e as plantas

Os isótopos são elementos químicos que apresentam o mesmo número de atômico, porém com número de massa diferente, ou seja, apresentam diferentes números de nêutrons, ocupando o mesmo lugar na tabela periódica. Os isótopos apresentam as mesmas propriedades químicas e são classificados como radioativos ou estáveis. Os elementos que constituem os isótopos estáveis não possuem propriedades radioativas cada isótopo possui sua abundância natural, por exemplo: $^{12}C$ (98.89%) e $^{13}C$ (1.11%); $^{14}N$ (99.62%) e $^{15}N$ (0.38%); e $^{16}O$ (99.796%) e $^{18}O$ (0.204%) e o $^{1}H$ (99.8844%) e $^{2}H$ (0.1156%).

Os isótopos estáveis são marcadores utilizados em reações e transformações químicas em sistemas biológicos e ambientais, sendo monitorados por análises em espectrômetros de massa (SCHIMEL,1993). Os marcadores ou traçadores permitem medições de taxas de fluxo ou transformações entre os isótopos de ocorrência natural (com diferenças muito pequenas da ordem de per mil (‰)) como, por exemplo, nas variações do $\delta$ $^{13}C$ em plantas dos ciclos fotossintéticos $C_3$ e $C_4$.

Os primeiros trabalhos com isótopos estáveis iniciaram na Física por volta de 1930 e 1940, tornou–se o componente principal em estudos na área de geologia. As primeiras contribuições dos isótopos na botânica partiram da iniciativa de geoquímicos que se interessaram pela variação da abundância isotópica natural em diferentes níveis nas plantas (EHLERINGER et al., 1993). Em 1947, Harold Urey e coautores, descobriram a existência do isótopo "pesado" de hidrogênio (deutério). A partir dessa descoberta foi possível observar a existência da variação da abundância de isótopos "pesados" e "leves" na natureza. O grande avanço nas análises isotópicas foi quando Alfred Nier e colaboradores (NIER, 1936; 1940; 1990) desenvolveram o espectrômetro de massas capaz de realizar medidas precisas da abundância relativa de isótopos leves e pesados do hidrogênio, além de outros elementos como carbono e oxigênio.

Com o espectrômetro de massa, Nier e Gulbransen (1939) foram os primeiros a observar que as plantas apresentam menor proporção de $^{13}C$ em componentes inorgânicos como o calcário. Murphey e Nier (1941) mostraram a variação do $^{13}C$ na madeira de diferentes espécies de plantas. Nos trabalhos de Wickman (1952) observou-se que os tecidos vegetais das plantas dos desertos da Ásia Central eram mais enriquecidos com $^{13}C$ do que plantas das florestas tropicais.

A discriminação de isótopos $^{13}C$ nas plantas ocorre durante a assimilação fotossintética de $CO_2$ a consequentemente a difusão e a carboxilação tem papel importante na discriminação de isótopos $^{13}C$. (CRAIG, 1953; O`LEARY, 1981; O`LEARY, 1988). As

plantas são naturalmente empobrecidas em $^{13}C$ em comparação com o $CO_2$ atmosférico. A discriminação fotossintética de isótopos de carbono tem sido extensivamente estudada e modelos robustos foram desenvolvidos e validados para muitas espécies de plantas $C_3$ e $C_4$ (FARQUHAR; O'LEARY; BERRY, 1982; FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989).

As plantas que possuem ciclos fotossintéticos $C_3$ e $C_4$ apresentam diferenças na razão $^{13}C/^{12}C$ como resultado dos processos de fracionamento isotópico, os quais determinam a discriminação, contra ou a favor do $^{13}C$. As diferenças na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ de plantas $C_3$ e $C_4$ ocorrem após o processo de difusão de $CO_2$ pelos estômatos até os cloroplastos. As discriminações isotópicas ocorrem após a ação das enzimas de carboxilação e pela diferença nas concentrações externas e internas de $CO_2$ (EHLERINGER; HALL; FARQUHAR, 1993).

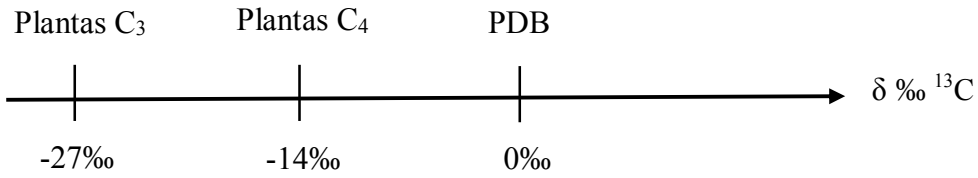
As variações nos valores de discriminação fotossintética em $C_3$ são influenciadas pela limitação do fornecimento de $CO_2$ para a RuBisCo (ribulose 1,5-difosfato). Esse processo ocorre devido ao fechamento estomático ocasionado pelas mudanças nos fatores ambientais. Em $C_3$, a discriminação isotópica ocorre em maior valor pela ação da RuBisCo. No cloroplasto a RuBisCo tem maior atividade na incorporação do $CO_2$ em Ph neutro, nessa fase a discriminação isotópica proporciona o enriquecimento relativo natural em $^{12}C$. Como resultado, espécies de plantas do ciclo fotossintético $C_3$ apresentam valores na razão isotópica que variam de -22 a -34 ‰, tendo valores na ordem de -27‰ (GHASHGHAIE; TCHERKEZ, 2013).

Nas plantas $C_4$ a discriminação é menor em relação a plantas $C_3$ (4‰ em relação a 20‰) devido a mecanismos de concentração de $CO_2$, que envolve a enzima de carboxilação fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEP-carboxilase). Além das etapas citadas para as plantas $C_3$, as alterações nos valores da discriminação fotossintética em plantas $C_4$ ocorrem devido as mudanças no fluxo de carbono na bainha do feixe das células do mesofilo e não pelo fechamento estomático. Na bainha do mesofilo a PEP - carboxilase aumenta a atividade de incorporação do $CO_2$ em Ph ácido neste caso as discriminações isotópicas ocorrem a favor do enriquecimento natural em $^{13}C$ (BRUGNOLI; FARQUHAR, 2000). Dessa forma, o resultado da razão isotópica nas espécies do ciclo $C_4$ variam de -9 a -16 ‰, com valores médios de -14‰ (FARQUHAR et al., 1989; O'LEARY,1993).

Os valores do $\delta\ ^{13}C$ são negativos pois são correlacionados á padrões isotópicos ($\delta$‰ = 0‰). No caso dos isótopos de carbono o padrão utilizado é o carbonato do fóssil de *Bellemnitella americana* da formação Peedee do Sul da Carolina/USA (PDB). As plantas $C_4$, por exemplo, apresentam razão isotópica de -14‰, ou seja, são 14‰ mais leves que o padrão PDB, já as plantas $C_3$ apresentam razão isotópica de -27‰, logo são 27‰ mais leves que o

padrão PDB. Portanto, as plantas das espécies de ciclo $C_3$ são mais pobres em $^{13}C$, em relação às plantas do ciclo $C_4$.

Na régua isotópica, onde o ponto de referência é o padrão PDB e a escala está em δ ‰ $^{13}C$, é possível observar a diferença na razão isotópica das plantas $C_3$ e $C_4$:




Recentemente, o δ $^{13}C$ das folhas, em relação a outros órgãos vegetativos, é considerada a melhor forma de detecção de discriminação fotossintética, sugerindo que o processo de fracionamento ocorre após a produção de fotoassimilados (CERNUSAK et al., 2009). Porém observou-se a existência de processos metabólicos pós-carboxilação que explicam as diferenças isotópicas entre as folhas (BADECK, et al., 2005) e tais processos, em alguns casos, ocasionam variações isotópicas indesejáveis. O fracionamento isotópico pós carboxilação pode ocorrer, por exemplo, durante a respiração (GHASHGHAIE et al., 2003; WERNER; GESSLER, 2011). Os átomos de carbono perdidos na respiração ocasionam diferenças no δ $^{13}C$ em relação a fotossíntese. Muitos trabalhos relatam variações nos valores de δ $^{13}C$ de $CO_2$ respirado em diferentes espécies e órgãos vegetativos (TCHERKEZ et al., 2003; BATHELLIER et al., 2009). A utilização dessa técnica permite investigar a origem metabólica de fracionamento respiratório, além da compreensão dos fluxos metabólicos.

O fornecimento de $CO_2$ nos espaços intercelulares da folha é controlado principalmente pela concentração de $CO_2$ no exterior da folha (ca) e pela $g_s$ (FARQUHAR; SHARKEY, 1982). Quando as condições ambientais são favoráveis, a turgescência das células guarda regula a difusão de $CO_2$ no mesofilo para a realização da fotossíntese. Ao mesmo tempo os estômatos reduzem a perda de água pelas folhas evitando desidratação excessiva e comprometimento da capacidade fotossintética. Os estômatos determinam fortemente a difusão de $CO_2$ nas folhas, principalmente quando o fornecimento de água no solo é relativamente baixo e/ou se a demanda evaporativa da atmosfera estiver relativamente alta (MARSHALL; WARING, 1984). Como resultado, as alterações no δ $^{13}C$ podem ser esperadas em resposta à variação da umidade no solo e ao déficit de pressão de vapor atmosférico. Tal variação pode ser manifestada ao longo de gradientes de precipitação, ou mais precisamente, ao longo de gradientes de umidade que levam em conta a disponibilidade local de água no solo e a evapotranspiração (CERNUSAK et al., 2013).

Nos trabalhos de Diefendorf et al. (2010) e Kohn (2010) foi possível observar as respostas do $\delta\ ^{13}C$ em relação a precipitação média anual. Nos dois estudos observou-se a diminuição do $\delta\ ^{13}C$ em decorrência da redução da precipitação média anual. Zang et al (2014), observaram a influência do déficit hídrico e reidratação na dissociação de fluxos de carbono em plantas jovens de faia (*Fagus sylvatica)*. A desaceleração metabólica, ocorrida durante a época seca, contrapõem-se a redução da fotossíntese, indicando maior resistência dos indivíduos à deficiência hídrica. A rápida recuperação dos indivíduos pós reidratação permitiu a manutenção dos fluxos essenciais de carbono, independente da limitação de carbono ocorrida na época seca.

## 5. Referências Bibliográficas[1]

ADIREDJO, A.L.; NAVAUD, O.; LAMAZE, T.; GRIEU, P. Leaf carbon isotope discrimination as an accurate indicator of water-use efficiency in sunflower genotypes subjected to five stable soil water contents. *Journal of Agronomy and Crop Science,* p. 1-9. DOI: 10.1111/jac.12079. 2014.

AIDAR, S.T.; MEIRELLES, S.T.; OLIVEIRA, R.F.; CHAVES, A.R.M.; FERNANDES-JÚNIOR, P.I. Photosynthetic response of poikilochlorophyllous desiccation-tolerant *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae) to dehydration and rehydration. *Photosynthetica*, v. 52, n. 1, p. 124-133. 2014.

ALBACETEA, A.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Hormonal and metabolic regulation of source–sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability. *Biotechnology advances*, v. 32, n. 1, p. 12-30. 2014.

ALBUQUERQUE, M.P.F.; MORAES, F.K.C.; SANTOS, R.I.N.; CASTRO, G.L.S.; RAMOS, E.M.L.S.; PINHEIRO, H.A. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno africano submetidas a déficit hídrico e reidratação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.48, n.1, p. 9-16, 2013.

ALEXOU, M. Development-specific responses to drought stress in Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seedlings. *Tree physiology*. 2013.

[1] De acordo com a associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – NBR-6023 – Informação de Documentação – Referências – Elaboração – versão atual. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

ANDEREGG, W. R.; BERRY, J. A.; SMITH, D. D.; SPERRY, J. S.; ANDEREGG, L. D.; FIELD, C. B. The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n .1, p. 233-237. 2012.

ANGELOPOULOS, K.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C. Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *Journal* of Experimental Botany, v. 47, p. 1093-1100, 1996.

APG III. THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGII. *Botanical Journal of the Linnean Society*, London, v.161, n. 2, p. 105-121, Oct. 2009.

APSE, M.P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology,* v.13, p. 146–150. 2002.

AROCA, R.; PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of experimental botany*, v.63, n. 1, p. 43-57. 2012.

BADECK, F. W.; TCHERKEZ, G.; NOGUÉS, S.; PIEL, C.; GHASHGHAIE, J. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs—A widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 19, n. 11, p. 1381–1391. 2005.

BATHELLIER, C.; TCHERKEZ, G.; BLIGNY, R.; GOUT, E.; CORNIC, G. GHASHGHAIE, J. Metabolic origin of d13C of respired CO2 from the roots of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist*, v. 181, p. 387–399. 2009.

BENGOUGH, A. G.; MCKENZIE, B. M.; HALLETT, P. D.; VALENTINE, T. A. Root elongation, water stress, and mechanical impedance: a review of limiting stresses and beneficial root tip traits. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n.1, p. 59-68. 2011.

BRUGNOLI, E.; FARQUHAR, G.D. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In LEEGOOD, R.C.; SHARKEY, T.D.; CAEMMERER, S.V. (eds.), *Photosynthesis:*

*Physiology and metabolism*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 399–434. 2000.

CARUSO, A.; CHEFDOR, F.; DEPIERREUX, C.; DELMOTTE, F.M.; KAHLEM, G.; MORABITO, D. Physiological characterization and identification of genes 17 differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, v. 165, p. 932-941, 2008.

CARVALHO, P.E.R. *Espécies arbóreas brasileiras.* Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Colombo, Embrapa Florestas, v.1, 2003. 1039p.

CASTRO, A.A.J.F.; MARTINS, F.R.; TAMASHIRO, J.Y.; SHEPERD, G.J. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden.* v.86, p.192-224. 1999.

CERNUSAK, L. A.; TCHERKEZ, G.; KEITEL, C.; CORNWELL, W.K.; SANTIAGO, L.S.; KNOHL, A., BARBOUR, M.M.; WILLIAMS, D.G.; REICH, P.B.; ELLSWORTH, D.S., DAWSON, T.E.; GRIFFITHS, H.G.; FARQUHAR, G.D.; WRIGHT, I.J. Viewpoint: Why are non-photosynthetic tissues generally 13C enriched compared with leaves in C3 plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology*, v. 36, p. 199–213. 2009.

CERNUSAK, L.A.; UBIERNA, N.; WINTER, K.; HOLTUM, J.A.; MARSHALL, J.D.; FARQUHAR, G.D. Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist*, v. 200, n. 4, p. 950-965. 2013.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, v. 103, p. 551–560. 2009.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.P. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, v. 30, p.239 – 264. 2003.

COSTA, L.C.B.; PINTO, J.E.B.P.; CASTRO, E.M.; ALVES, E.; ROSAL, L.F.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ALVES, P.B.; EVANGELINO, T.S. Yield and composition of the essential oil of *Ocimum selloi* Benth. cultivated under colored netting. *Journal of Essential Oil Research*, v. 22, n. 1, p. 34-39. 2010.

CRAIG, H. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 3, p. 53-92. 1953.

DAKHMA, W. S.; ZARROUK, M.; CHERIF, A. Effects of drought stress on lipids in rape leaves. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1383-1386. 1995.

DENNIS, D.T.; BLAKELEY, S.D. Carbohydrate Metabolism. *In:* Biochemistry & Molecular Biology of Plants. BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES R. (Eds) *American Society of Plant Physiologists*. 2000, p. 630-675.

DIEFENDORF, A.F.; MUELLER, K.E.; WING, S.L.; KOCH, P.L.; FREEMAN, K.H. Global patterns in leaf $^{13}C$ discrimination and implications for studies of past and future climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* v. 107, p. 5738–5743. 2010.

DRIEVER, S. M.; BAKER, N. R. The water–water cycle in leaves is not a major alternative electron sink for dissipation of excess excitation energy when $CO_2$ assimilation is restricted. *Plant, cell & environment*, v. 34, n. 5, p. 837-846, 2011.

EBDON, J.S.; KOPP, K.L. Relationships between water use efficiency, carbon isotope discrimination, and turf performance in genotypes of Kentucky bluegrass during drought. *Crop Science*, v. 44, n. 5, p. 1754–1762. 2004.

EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. Elsevier. 1993.

FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J. R.; HUBICK, K. T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual review of plant biology*, v. 40, n. 1, p. 503-537, 1989.

FARQUHAR, G.D.; HUBICK, K.T.; CONDON, A.G.; RICHARDS, R.A. Carbon isotope fractionation and plant water-use efficiency. In RUNDEL, P.W.; EHLERINGER, J.R.; NAGY, K.A. (eds.) *Stable isotopes in ecological research.* Nova York: Springer-Verlag New York Inc., 1989. p. 21-40.

FARQUHAR, G.D.; LLOYD, J. Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A.E.; FARQUHAR G.D. (eds) *Stable Isotopes and Plant Carbon – Water Relations*, Academic Press, San Diego, CA, USA. 1993. p. 47–70.

FARQUHAR, G.D.; O'LEARY, M.H.; BERRY, J.A. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 9, p. 121–137. 1982.

FARQUHAR, G.D.; RICHARDS, R.A. Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*. v, 11, n. 6, p. 539–552. 1984.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual review of plant physiology*, v. 33, n. 1, p. 317-345. 1982.

FARQUHAR, G.D.; WONG, S.C.; EVANS, J.R.; HUBICK, K.T. Photosynthesis and gas exchange. In: JONES, H.G., FLOWERS, T.J., JONES, M.B. (Eds.), *Plants Under Stress*. 1989.

FELFILI, J.M.; SILVA-JÚNIOR, M.C.S.; DIAS, B.J.; REZENDE, A.V. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no Cerrado *sensu strictu* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica,* v. 22, p. 83-90. 1999.

FREITAS, C.V.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae*). Brazilian Journal of Botany*, São Paulo, v.25, n.3, p.311-321. 2002.

GALVEZ, D. A.; LANDHÄUSSER, S. M.; TYREE, M. T. Root carbon reserve dynamics in aspen seedlings: does simulated drought induce reserve limitation? *Tree physiology*, p. tpr012, 2011.

GHASHGHAIE, J.; BADECK, F.W.; LANIGAN, G.; NOGUÉS, S.; TCHERKEZ, G.; DELÉENS, E.; CORNIC, G.; GRIFFITHS, H. Carbon isotope discrimination during dark respiration and photorespiration in $C_3$ plants. *Phytochemistry Reviews*, v. 2, p. 145–161. 2003.

GHASHGHAIE, J.; TCHERKEZ, G. Isotope Ratio Mass Spectrometry Technique to Follow Plant Metabolism: Principles and Applications of $^{12}C/^{13}C$ Isotopes. *Metabolomics coming of age with its technological diversity*, v.*67*, p. 377-405, 2013.

GIMENEZ, C.; GALLARDO, M.; THOMPSON, R.B. Plant–water relations. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, p.231-238. 2005.

GUPTA, S. A.; BERKOWITZ, G. A. Osmotic adjustment, symplast volume, and nonstomatally mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. *Plant Physiology*, Washingotn, v. 85 n. 4, p. 1040-1047, 1987.

HOCH, G.; RICHTER, A.; KÖRNER, C. Non-structural compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment*, v. 26, p. 1067–1081. 2003.

JALEEL, C.A.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; PANNEERSELVAM, R. Paclobutrazol influences vegetative growth and floral characteristics of *Catharanthus roseus* L. *Journal of Pure Applied Biology*, v. 21, p. 369–372, 2006.

KAMELI, A.; LOSEL, D.M. Carbohydrates and water status in wheat plants under water stress. *New Phytologist,* v. 125, p. 609–614. 1993.

KOHN, M.J. Carbon isotope compositions of terrestrial C3 plants as indicators of (paleo)ecology and (paleo)climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* v. 107, p. 19691–19695. 2010.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. *Water relations of plants and soils*. California: Academic, 1995. 482p.

KUDOYAROVA, G.R.; KHOLODOVA, V.P.; VESELOV, D.S. Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. *Russian Journal of Plant Physiology,* v. 60, n. 2, p. 165–175, 2013.

LAHUTA, L.B.; GÓRECKI, R.J. Raffinose in seedlings of winter vetch (*Vicia villosa* Roth.) under osmotic stress and followed by recovery. *Acta Physiologica Plantarum*, v. 33, p. 725–733. 2011.

LAMBERS, H.; CHAPIN H. F. S.; PONS, T. L. Plant physiological ecology. *Springer*, New York, USA. 2008.

LANGENHEIM, J.H. Plant resins: chemistry, evolution, ecology, ethnobotany. Timber Press, Cambridge. 586p. 2003.

LARCHER, W. *A Planta sob Estresse. Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2004. p. 341-478.

LAWLOR, D.H.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, Oxford, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LEAVITT, S.W.; WRIGHT, W.E. Spatial expression of ENSO, drought, and summer monsoon in seasonal d13C of ponderosa pine tree rings in southern Arizona and New Mexico. *Journal of Geophysical Research*, v. 107, p. 1–10. 2002.

LEE, B.R.; JIN, Y.L.; JUNG, W.J.; AVICE, J.C.; MORVAN-BERTRAND, A.; OURRY, A.; PARK, C.W.; KIM, T.H. Water-deficit accumulates sugars by starch degradation – not by de novo synthesis – in white clover leaves (*Trifolium repens*). *Physiologia Plantarum*, v. 134, p. 403–411. 2008.

LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. & VON CAEMMERER, S. Photosynthesis: Physiology and Metabolism. Kluwer Academic Publishers. 2000, p.1-8.

LEVITT, J. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. New York: Academic Press, 1972. 698p.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras*: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v. 1, 351 p.

LORETO, F.; TSONEV, T.; CENTRITTO, M. The impact of blue light on leaf mesophyll conductance. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 8, p. 2283-2290, 2009.

LOUTFY, N.; EL-TAYEB, M. A.; HASSANEN, A. M.; MOUSTAFA, M. F.; SAKUMA, Y.; INOUHE, M. Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (Triticum aestivum). *Journal of plant research*, v. 125, n.1, p. 173-184. 2012.

MARSHALL, J.D.; WARING, R.H. Conifers and broadleaf species - stomatal sensitivity differs in western Oregon. *Canadian Journal of Forest Research,* v. 14, p. 905–908. 1984.

MARTORELL, S.; DIAZ-ESPEJO, A.; MEDRANO, H.; BAL, M.C.; CHOAT, B. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas Exchange. *Plant, Cell and Environment,* v. 37, p. 617–626. 2014.

MCDOWELL, N. G. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiology.* v. 155, p.1051–1059. 2011.

MCDOWELL, N.; POCKMAN, W.T.; ALLEN, C.D.; Breshears, D. D..; COBB, N.; KOLB, T.; PLAUT, J.; SPERRY, J.; WEST, A.; WILLIANS, D. DG.; YEPEZ, E. A. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytol.* v.178, p.719–739. 2008.

MEIJER, H. J. G; MUNNIK, T. Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, n. 1, p. 265-306, 2003.

MENG, Y.; MA, N.; ZHANG, Q.; YOU, Q.; LI, N.; ALI KHAN, M.; GAO, J. Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration. *The Plant Journal*, v. 79, n. 6, p. 941-950. 2014.

MIRANDA, I.S. Fenologia do estrato arbóreo de uma comunidade de cerrado em Alter-do-Chão, PA. *Revista Brasileira de Botânica,* v. 18, p. 235-241. 1995.

MITCHELL, P.J.; O'GRADY, A.P.; TISSUE, D.T.; WHITE, D.A.; OTTENSCHLAEGER, M.L.; PINKARD, E.A. Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree Mortality. *New Phytologist,* v. 197, p. 862–872. 2013.

MOONEY, H.A.; HAYS, R.I.; Carbohydrate storage cycles in two Californian mediterranean climate trees. *Flora*, v. 162 S, p. 295–304. 1973.

MOUSTAKAS, M.; SPERDOULI, I.; KOUNA, T.; ANTONOPOULOU, C. I.; THERIOS, I. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of Arabidopsis thaliana leaves. *Plant Growth Regulation*, v. 65, n. 2, p. 315-325. 2011.

MULLER, B.; PANTIN, F.; GÉNARD, M.; TURC, O.; FREIXES, S.; PIQUES, M.; GIBON Y. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 1715–1729. 2011.

MURPHEY, B.F.; NIER, A.O. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *Physical Review*, v. 59, p. 771-772. 1941.

NASCIMENTO, M.E.; PINTO, J.E.B.P.; SILVA JÚNIOR, J.M.; CASTRO, E.M.; SANTOS, F.M. Leaf plasticity and dry biomass yield in *Copaifera langsdorffii* Desf. cultivated

under different light spectra. *Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 57, n.1, p. 41-48. 2014.

NATE, G .M.; CRAIG, D . A.; LAURA, M. Growth, carbon-isotope discrimination, and drought-associated mortality across a *Pinus ponderosa* elevational transect. *Global Change Biology*, v. 16, p. 399–415. 2010.

NEWELL, E. A.; MULKEY, S. S.; WRIGHT, S. J. Seasonal patterns of carbohydrate storage in four tropical tree species. *Oecologia,* v.131, p. 333–342. 2002

NIER, A.O. A mass-spectrographic study of the isotopes of argon, potassium, rubidium, zinc and cadmium. *Physical Review*. v. 50, p. 1041-1045. 1936.

NIER, A.O. A mass-spectrometer for routine isotope abundance measurements. *Review of Scientific Instrument,* v. 11, p. 212-216. 1940.

NIER, A.O. Some reminiscences of isotopes, geochronology and mass spectrometry. In: LEDERBERG, J. (ed.) *Excitement and Fascination of Science: Reflections by Eminent Scientists*. Annual Reviews, Inc., Palo Alto, CA. v. 3, parts 1 and 2, 1990. p. 590-607.

NIER, A.O.; GULBRANSEN, E. A. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *Journal of the American Chemical Society,* v. 61, p. 697-698. 1939.

O`LEARY, M.H. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry,* v. 20, p. 553-567. 1981.

O`LEARY, M.H. Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience,* v. 38, p. 328-336. 1988.

OLMO, M.; LOPEZ-IGLESIAS, B.; VILLAR, R. Drought changes the structure and elemental composition of very fine roots in seedlings of ten woody tree species. Implications for a drier climate. *Plant and Soil*, p. 1-17. DOI: 10.1007/s11104-014-2178-6. 2014.

PALACIO, S.; MAESTRO, M.; MONTSERRAT-MARTÍ, G. Seasonal dynamics of non-structural carbohydrates in two species of mediterranean sub-shrubs with different leaf phenology. *Environmental and Experimental Botany,* v. 59, p. 34–42. 2007.

PALONEN, P.; BUSZARD, D.; DONNELLY, D. Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum*, v. 110, p. 393–401. 2000.

PATTANAGUL, W.; MADORE, M.A. Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in *Coleus*. *Plant Physiology*, v. 121, p. 987–993. 1999.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F.A.M. Fenologia da copaíba (*Copaiferalangsdorffii* Desf. – Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica,* v.25, n.2, p.183-194. 2002.

PIISPANEN, R.; SARANPÄÄ, P. Variation of non-structural carbohydrates in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. *Trees*, v. 15, p. 444–451. 2001.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J Exp Bot* v. 62, p. 869–882. 2011.

PORTELLA, R., FACANALI, R., MARQUES, M. O. M., & DE ALMEIDA, L. F. R. Chemical composition of essential oils from the vegetative and reproductive structures of Copaifera langsdorffii Desf. *Natural product research*, (ahead-of-print), 1-5. 2015.

PRADO, C.H.B.A.; MORAES, J.A.P.V.; MATTOS, E. A. Gas exchange and leaf water status in potted plants of *Copaifera langsdorffii*. L. Responses to water stress. *Photosynthetica,* v. 30, p. 207-213, 1994.

PRAXEDES, S.C.; DaMATTA, F.M.; LOUREIRO, M.E.; FERRÃO, M.A.G.; CORDEIRO, A.T. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *Kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, Oxford, v. 56, n. 3, p. 263-273, 2006.

QUEIROZ, C.G.; GARCIA, Q.S.; LEMOS FILHO, J.P. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 14, n.1, p. 59-63. 2002.

RAMALHO, J.C.; ZLATEV, Z.S.; LEITÃO, A.E.; PAIS, I.P.; FORTUNATO, A.S.; LIDON, F.C. Moderate water stress causes different stomatal and non-stomatal changes in the photosynthetic functioning of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes. *Plant Biology,* v. 16, p. 133–146. 2014.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 161, p. 1189–1202. 2004.

REDDY, T.Y.; REDDY, V.R.; ANBUMOZHI, V. Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to drought stress and its amelioration: A critical review. *Plant Growth Regulation,* v. 41, p. 75–88, 2003.

REJSKOVA, A.; PATKOVA, L.; STODULKOVA, E.; LIPAVSKA, H. The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology*, v. 164, p. 174– 184. 2007.

RODRIGUES, A. L. Efeito da reidratação nos aspectos ecofisiológicos da *Copaifera langsdorffii* Desf. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado) – Ciências Biológicas (botânica), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

RODRIGUES, T.M.; TEIXEIRA, S.P.; MACHADO, S.R. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora*, v. 206, p. 585–594. 2011.

RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J.; BUATOIS, B.; CHICHE, E.; SHAHIN, O.; STAUDT, M. Leaf isoprene emission declines in *Quercus pubescens* seedlings experiencing

drought–Any implication of soluble sugars and mitochondrial respiration?. *Environmental and Experimental Botany*, v. *85*, p. 36-42. 2013.

ROITSCH, T. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current opinion in plant biology*, v. 2, n. 3, p. 198-206, 1999.

RONQUIM, C.C.; PRADO, C.H.B.A.; SOUZA, J.D. Growth, photosynthesis and leaf water potential in young plants of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae) under contrasting irradiances. *Brazilian Society of Plant Physiology*, v.21, n.3, p.197-208. 2009.

SALA, A.; PIPER, F.; HOCH, G. Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. *New Phytol*. v.186, p.274–281. 2010.

SAPETA, H.; COSTA, J.M.; LOURENÇO, T.; MAROCO, J.; LINDE, P, OLIVEIRA, M.M. Drought stress response in *Jatropha curcas*: Growth and physiology. *Environmental and Experimental Botany* v.85, p.76– 84.2013.

SARMIENTO, G.; MONASTERIO, M. Life forms and phenology. In: BOULIERE, F. *Ecosystems of the world: tropical savannas.* ed. Elsevier Science, Amsterdam, p.79-108. 1983.

SCHIMEL, D.S. *Theory and application of tracers.* San Diego: Academic Press Inc., 1993.113p.

SHAO, H.B.; LIANG, Z.S.; SHAO, M.A. LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces***,** v. 45, p. 131–135, 2005.

SHAO, H.B.; LIANG, Z.S.; SHAO, M.A.; SUN, Q. Dynamic changes of antioxidative enzymes of ten wheat genotypes at soil water deficits. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, v. 42, p. 187–195, 2005.

SHARKEY, T.D.; LAPORTE, M.; LU, Y.; WEISE, S. & WEBER, A.P.M. Engineering plants for elevated CO2: A relationship between starch degradation and sugar sensing. *Plant Biology* v. 6, p. 280-288. 2004.

SOUZA, G.S.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M.; PINTO, J.E.B.P. Características biométricas e fisiológicas de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker cultivadas sob malhas coloridas. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 8, n.4, p. 330-335, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGUER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 720 p.

TCHERKEZ, G.; NOGUÉS, S.; BLETON, J.; CORNIC, G.; BADECK, F.; GHASHGHAIE, J. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired $CO_2$ in French bean. *Plant Physiology*, v. 131, p. 237–244. 2003.

TORRES-FRANKLIN, M. L.; GIGON, A.; DE MELO, D. F.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A. T. Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiologia plantarum*, v. 131, n. 2, p. 201-210. 2007.

UREY, H.C. The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society*. p. 562-581. 1947.

VAZ, M.; PEREIRA, J.S.; GAZARINI, L.C.; DAVID, T.S.; DAVID, J.S.; RODRIGUES, A.; MAROCO, J.;CHAVES, M.M. Drought-induced photosynthetic inhibition and autumn recovery in two Mediterranean oak species (*Quercus ilex and Quercus suber*). *Tree Physiology,* v.30, p.946–956. 2010.

VERSLUES, P.E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, v. 45, p. 523-539. 2006.

WERNER, C.; GESSLER, A. Diel variations in the carbon isotope composition of respired $CO_2$ and associated carbon sources: A review of dynamics and mechanisms. *Biogeosciences*, v. 8, p. 2437–2459. 2011.

WICKMAN, F.E. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes in plants. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 2, p. 243-252. 1952.

WILLAUME, M.; PAGÈS, L. How periodic growth pattern and source/sink relations affect root growth in oak tree seedlings. *Journal of Experimental Botany*, v.57, p. 815-826. 2006.

XU, X.; PENG, G.; WU, C.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Drought inhibits photosynthetic capacity more in females than in males of *Populus cathayana*. *Tree Physiology*, v. 28, p.1751–1759, 2008.

YU, B.; LI, W. Comparative profiling of membrane lipids during water stress in Thellungiella salsuginea and its relative Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry*, v. 108, p. 77-86. 2014.

ZANG, U.; GOISSER, M.; GRAMS, T.E.; HÄBERLE, K.H.; MATYSSEK, R.; MATZNER, E.; BORKEN, W. Fate of recently fixed carbon in European beech (*Fagus sylvatica*) saplings during drought and subsequent recovery. *Tree physiology*, v. 34, n. 1, p. 29-38. 2014.

**Capítulo 1**: Restrição hídrica de curta duração altera o δ $^{13}C$ em diferentes órgãos e compostos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf (Fabaceae – Caesalpinoideae).

De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do IBB, UNESP, expresso na portaria PORTARIA Nº 02/2010-SPG/IBB/UNESP os resultados obtidos neste Projeto de Mestrado foram reunidos em um artigo científico para publicação, os quais são apresentados de acordo com as normas do periódico New Phytologist (A1 – Comitê de Biodiversidade da Capes).

**Restrição hídrica de curta duração altera o δ $^{13}C$ em diferentes órgãos e compostos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf (Fabaceae – Caesalpinoideae)**

Angelo A. S. Bertholdi[1], Vladimir E. Costa[2] e Luiz Fernando R. Almeida[1]

[1]Universidade Estadual Paulista, UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Botânica, Botucatu-SP, Brasil; [2]Universidade Estadual Paulista, UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Física e Biofísica, Botucatu-SP.

**Resumo -** O déficit hídrico é um dos fatores de maior influência no crescimento e produtividade das plantas. Alterações nos mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, em decorrência dos danos ocasionados pela deficiência hídrica, podem acarretar mudanças na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ em diferentes órgãos vegetativos e compostos orgânicos das plantas. Avaliamos as características de relações hídricas, eficiência fotoquímica na *Copaifera langsdorffii* Desf. sob distintas condições hídricas e relacionamos com o enriquecimento relativo natural $^{13}C/^{12}C$ de órgão vegetativos e compostos orgânicos. No final do período de déficit hídrico ocorreram diferenças na proporção isotópica natural $^{13}C/^{12}C$, sendo que nas folhas e no resíduo da extração do óleo essencial houve o enriquecimento de $^{13}C$ e no óleo essencial e lipídios extraídos das folhas observou-se o empobrecimento em $^{13}C$. Ainda, como resultado do período de déficit hídrico, folhas e raiz principal apresentaram redução na quantidade de amido e açúcares solúveis.

**Palavras chave:** isótopos estáveis, fotoassimilados, deficiência hídrica, óleo essencial

## Introdução

O efeito do estresse hídrico na fotossíntese da planta tem sido estudado extensivamente as restrições dos estômatos na fotossíntese talvez seja a resposta fisiológica de maior influência na produtividade das plantas sob deficiência hídrica (CHAVES, FLEXAS, PINHEIRO, 2009; VEIGA, HABERMANN, 2013). Entretanto a disponibilidade hídrica tem influência numa série de outros processos envolvidos no crescimento das plantas, expansão celular, transporte pelo floema, transporte de nutrientes e função metabólica (WOODRUFF; MEINZER, 2011). A alteração desses processos tem grande influência no crescimento e produtividade das plantas principalmente quando a disponibilidade de água é afetada.

Compreender as relações entre oferta e demanda de carbono é importante quando se investiga restrições no crescimento as plantas. Quando o carbono produzido na fotossíntese não é utilizado em processos como crescimento, reprodução e defesa, parte é armazenada na

forma de carboidratos não estruturais. As concentrações de carboidratos não estruturais nas plantas é o indicativo do equilíbrio entre o carbono que foi fixado e o carbono que tem sido utilizado para o crescimento e metabolismo (NEWELL, MULKEY, WRIGHT, 2002).

A deficiência hídrica modifica as relações fonte-dreno influenciando no crescimento das plantas como adaptação ao estresse (MCDOWELL, 2011). A otimização dinâmica da relação fonte-dreno durante o estresse garante o particionamento de carboidratos para estruturas vegetativas e reprodutivas proporcionando estabilidade no desenvolvimento das plantas. Além disso, é altamente plástica e tem influência da intensidade do estresse (ALBACETEA; MARTÍNEZ-ANDÚJAR; PÉREZ-ALFÓCEA, 2014).

A *Copaifera langsdorffi* Desf apresenta relação direta com a sazonalidade das fisionomias, com estratégias adaptativas em períodos de deficiência hídrica (CASTRO et al., 1999). Devido a senescência foliar em períodos de déficit hídrico a *C. langsdorffii* apresenta mecanismos de quebra de reservas energéticas das folhas (amido) em solutos (açúcares solúveis) nos quais são transportados para outras estruturas vegetativas da planta via floema (RONQUIM et al, 2003). A capacidade da *C. langsdorffii* em alterar a translocação de biomassa entre as partes aéreas e subterrâneas em decorrência do estresse hídrico (RONQUIM, PRADO, SOUZA, 2009) torna esta espécie um importante objeto de estudo para análise da dinâmica de translocação de fotoassimilados em plantas submetidas á diferentes regimes hídricos.

A análise do enriquecimento relativo natural ($\delta$ $^{13}C$) é a técnica utilizada na avaliação de trocas gasosas (LEAVITT; WRIGHT, 2002), determinação dos ciclos fotossintéticos (NATE; CRAIG; LAURA, 2010) e translocação e alocação de carbono em plantas submetidas à deficiência hídrica (ADIREDJO et al., 2014). As variações no enriquecimento relativo natural $^{12}C/^{13}C$ de espécies cultivadas em diferentes condições hídricas ocorre devido difusão de $CO_2$ nos espaços intracelulares da folha e a carboxilação pela enzima RuBisCo. A escassez de água altera a razão $^{12}C/^{13}C$ na planta devido ao fechamento estomático e baixa taxa fotossintética (FARQUHAR; LLOYD, 1993, EBDON; KOPP, 2004).

A análise de $\delta$ $^{13}C$ permite detectarmos as alterações na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ em resposta a curtos períodos de déficit hídrico. Respostas à deficiência hídrica e reidratação, além de indicarem o padrão fisiológico da espécie, também influenciam na síntese e translocação de esqueletos carbônicos nos órgãos vegetativos. As técnicas de análises de $\delta$ $^{13}C$ podem indicar alterações na proporção isotópica $^{13}C/^{12}C$ de tecidos e compostos orgânicos.

Portanto avaliaremos os efeitos das respostas fisiológicas e as alterações na $\delta$ $^{13}C$ em diferentes estruturas vegetativas e compostos orgânicos da *C. langsdorffii* submetidas a variação disponibilidade hídrica.

## Material e Métodos

*Local do experimento e características do cultivo*

Executamos o experimento na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. A casa de vegetação possui sistema controlado no qual mantem a umidade relativa do ar em torno de 50% e temperatura em torno de 25°C (utilização do data logger para o monitoramento da temperatura e umidade relativa do ar) no interior da casa de vegetação a DFFF atinge em média 800 µmol/m²s durante o dia.

Utilizamos aproximadamente 3 kg de terra por vaso, peneirado em malha de 2mm, sendo este coletado em um fragmento de Cerrado com área de 180 ha, na Fazenda Palmeira da Serra, pertencente ao município de Pratânia, estado de São Paulo, Brasil. Essa área localiza-se à latitude 22º48'30" Sul e longitude 48º39'58" Oeste e altitude de 697 m. A fisionomia da área de estudo é caracterizada como Cerradão. Escolhemos o solo desta área pois a *Copaifera langsdorrfii* Desf. encontra-se em regiões com fisionomia semelhante à área de coleta do substrato, além disso há presença de indivíduos adultos da espécie nessa região.

O solo caracteriza-se como latossolo vermelho cuja a análise granulométrica revelou valores médios de 788 g $kg^{-1}$ de areia, 110 g $kg^{-1}$ de argila, e 102 g $kg^{-1}$ de silte (classe textural arenoso) e com capacidade de campo de -0.006 Mpa.

Os resultados da análise química seguem na Tabela 1. Determinamos: pH em $CaCl_2$, matéria orgânica, P (resina), K, Ca, Mg e S trocáveis e calculada a capacidade de troca de cátions (CTC) e a saturação por bases (V%) conforme metodologia descrita por Raij et al. (2001). Os teores de Fe, Cu, Zn e Mn foram determinados após extração com solução de DTPA em pH 7.3; já os teores de B foram determinados seguindo-se o método em água quente (RAIJ et al., 2001). Realizamos as análises físicas e químicas no Laboratório de Solos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais – FCA/UNESP

**Tabela 1**. Característica químicas do solo

| pH | M.O. | $P_{resina}$ | H+Al | K | Ca | Mg | SB | CTC | V% | Boro | Cobre | Ferro | Manganês | Zinco |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $CaCl_2$ | $g/dm^3$ | $mg/dm^3$ | ——— | ——— | $mmol_c/dm^3$ | ——— | ——— | ——— | | ---------- | ---------- | $mg/dm^3$ | ---------- | ---------- |
| 5.6 | 26 | 9 | 11 | 0.7 | 9 | 4 | 15 | 26 | 57 | 0.40 | 0.4 | 50 | 6.2 | 3.1 |

*Delineamento experimental*

Utilizamos 36 plantas jovens de *Copaifera langsdorffii* Desf. com 24 meses de idade e aproximadamente 50 cm de altura oriundas do viveiro do Instituto Ambiental Vidágua, localizado no município de Bauru no Estado de São Paulo.

Distribuímos as plantas jovens de *C. langsdorffii*, em grupos inteiramente casualizados sendo estas divididas em três tratamentos e 12 repetições, cada unidade experimental composta por uma planta. Mantivemos o grupo T1(controle) na capacidade de campo durante todo o experimento (37 dias). Submetemos o grupo T2 (final do período de déficit hídrico) e T3 (final do período de reidratação) à deficiência hídrica (18 dias), porém no grupo T3 iniciamos a irrigação após o período de deficiência hídrica (19 dias). Certificamos que os vasos estavam na capacidade de campo através do método de gravimetria (THAMEUR; LACHIHEB; FERCHICHI, 2012). Pelo método de gravimetria consideramos os vasos na capacidade de campo aqueles que apresentavam em média 15% de água no solo. Os vasos próximos ao ponto de murcha permanente (PMP) apresentaram redução 16% da água no solo ao longo do período de deficiência hídrica. Além disso, monitoramos a eficiência da irrigação avaliando periodicamente o $\Psi_{H20solo}$.

Dividimos as coletas de dados em três partes, na primeira realizamos análises fisiológicas como $g_s$, $\Psi_{H20folha}$, $\Psi_{H20solo}$, fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas. Com tais características aferimos as respostas fisiológicas das plantas durante o experimento. Classificamos os grupos T2 e T3 como final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação pois o último dia de avaliação desses tratamentos melhor representaram os efeitos da deficiência hídrica e reidratação nas respostas fisiológicas da *C.langsdorffii*.

No grupo T2 (final do período de déficit hídrico) interrompemos as análises fisiológicas quando as unidades experimentais apresentaram valores próximos ao ponto de murcha permanente. Submetemos o grupo T3 (final do período de reidratação) à deficiência hídrica até apresentarem valores semelhantes ao grupo T2, posteriormente iniciamos a reidratação (mantidos na capacidade de campo). As análises fisiológicas continuaram até os valores de $g_s$ do final do período de reidratação se igualarem aos valores das plantas do controle.

Após as análises fisiológicas iniciamos a segunda parte do experimento. Extraímos amostras de folhas (fotossinteticamente ativas), raiz principal, raízes laterais, gemas caulinares e em parte das folhas extraímos, óleo essencial e o resíduo da extração do óleo essencial. Para diferenciar a idade das folhas levamos em consideração a coloração do limbo foliar. Utilizamos todas essas amostras para a obtenção do $\delta^{13}C$ entre os tratamentos. Na

terceira parte quantificamos o amido, açúcar e lipídios das mesmas estruturas nas quais avaliamos o $\delta^{13}C$ (exceto o óleo essencial e o resíduo da extração do óleo essencial). Posteriormente avaliamos $\delta^{13}C$ dos açúcares solúveis e lipídios extraídos das folhas, raízes laterais, raiz principal e gemas caulinares.

*Avaliações fisiológicas*

Dividimos as análises fisiológicas em características destrutivas e não destrutivas evitando a interferência nos valores de uma característica na outra. As características destrutivas são compostas pelo $\Psi_{H2Ofolha}$ e $\Psi_{H2Osolo}$ todos ocorreram em intervalos de três dias, em três unidades experimentais de cada tratamento, ás 5:30 h (predawn) e ás 12:00 h (midday). Avaliamos o $\Psi_{H2Ofolha}$ e $\Psi_{H2Osolo}$ nesses dois períodos com o intuito de verificar a possível recuperação ou acúmulo dos efeitos do déficit hídrico durante o dia.

As análises não destrutivas são compostas pela $g_s$, fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas. As avaliações de $g_s$ e fluorescência da clorofila *a* ocorreram em intervalos de quatro dias em nove unidades experimentais de cada tratamento. As avaliações de trocas gasosas ocorreram no início, meio (último dia de deficiência hídrica) e fim (último dia de reidratação) do experimento. Avaliamos as três características entre 9:00 h (am) e 11:00 h (am) da manhã em dias ensolarados.

*Potencial da água no solo ($\Psi_{H2Osolo}$) e potencial da água na folha ($\Psi_{H2Ofolha}$)*

Nas duas características utilizamos o analisador de potencial de água com controlador de temperatura WP4-T (DECAGON DEVICES, EUA). Para a obtenção dos resultados de $\Psi_{H2Ofolha}$, retiramos uma folha por unidade experimental em todos os tratamentos. No $\Psi_{H2Osolo}$ retiramos, por vaso, uma pequena porção de terra a profundidade de 15 cm.

*Condutância estomática ($g_s$)*

Realizamos as medições de $g_s$ utilizando o porômetro em estado de equilíbrio dinâmico (Leaf Prometer Modelo SC-1; DECAGON DEVICES, EUA) em uma folha (totalmente expandida e exposta) por unidade experimental em todos os tratamentos.

*Fluorescência da clorofila a*

Realizada em folhas completamente expandidas e expostas por unidade experimental para realizar as medidas das características da fluorescência da clorofila *a* e avaliadas com auxílio do fluorômetro PAM – Junior (Chlorophyll – Fluorometer WALZ/Alemanha).

Calculamos diversas características fotoquímicas com base em parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: a eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do ΦPSII (ΦPSII = ΔF/Fm') medido de acordo com Genty et al. (1989), taxa de transporte de elétrons (ETR = ΔF/Fm'× DFFF × 0.5 × 0.84), dissipação fotoquímica [qP = (Fm'-Fs)/(Fm '-Fo')] e dissipação não-fotoquímica [NPQ = (Fm-Fm ') / Fm '] (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Para estimar o ETR usamos 0.5 como fração de energia de excitação distribuída entre os fotossistemas, e 0.84 como fração de absorção de luz (BAKER, 2008). Cobrimos as amostras das folhas com papel alumínio mantidas no escuro durante aproximadamente 30 minutos. A intensidade da curva de luz chega até 1500 μmol/m²s de DFFF (Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos).

*Trocas gasosas*

Avaliamos as características de trocas gasosas utilizando equipamento com sistema aberto de fotossíntese com analisador de $CO_2$ e vapor d'água por radiação infra-vermelha *("Infra Red Gas Analyser – IRGA"* modelo LI-6400, LI-COR). Estimamos tais medidas a partir da diferença entre a concentração de $CO_2$ e vapor d'água do ar de referência (valor presente na câmara sem a folha) e da amostra (valor com a folha presente na câmara), obtendo as concentrações de vapor d'água e $CO_2$ que foram liberados (transpiração – vapor d'água) e assimilados (assimilação de $CO_2$) pelos estômatos das folhas. Realizamos as medidas em uma folha por unidade experimental totalmente expandida e exposta. Dentre as características de trocas gasosas avaliamos apenas a taxa de assimilação de $CO_2$ (A, μmol $CO_2$ $m^{-2}s^{-1}$).

*Análises isotópicas*

*Preparação do material vegetal*

Utilizamos as mesmas unidades experimentais que avaliamos as características não destrutivas, ou seja, nove unidades experimentais por tratamento. Extraímos as seguintes estruturas: folhas, raiz principal, raízes laterais, gemas caulinares, posteriormente extraímos o OE das folhas adultas, resíduo da extração do OE, os açúcares solúveis e lipídios das mesmas estruturas vegetativas.

No momento da separação dos órgãos vegetais colocamos, imediatamente, todas as amostras em nitrogênio líquido (-196 ºC) para provocar o congelamento instantâneo dos tecidos e assim evitar quaisquer riscos de alterações do enriquecimento relativo natural causadas por processos respiratórios.

No laboratório do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu-SP, colocamos as amostras previamente identificadas em estufa com circulação de ar forçada à 65 ºC por 72 horas, para secagem e posterior moagem. No processo de moagem dos órgãos vegetativos, utilizamos o moinho criogênico à base de nitrogênio líquido (Spex - Modelo 6700). Neste moinho, colocamos as amostras em tubos individualizados, imersas em nitrogênio líquido, minimizando quaisquer riscos de contaminação. A utilização desse equipamento permite a obtenção de um material com finíssima granulometria (semelhante a talco) permitindo perfeita homogeneização das amostras. Como o espectrômetro de massas apresenta grande sensibilidade e precisão (±0.2‰) na leitura das amostras, a utilização desse moinho permite minimizar as diferenças entre as repetições de cada tratamento.

Após a moagem, retiramos de cada amostra uma alíquota que variou entre 50 e 70 µg (exceto os lipídios, OE e seu respectivo resíduo). Posteriormente acondicionamos todas as alíquotas em cápsulas de estanho, com 6 mm de altura e 4 mm de diâmetro.

*Extração e análises isotópicas do óleo essencial*

Para a extração do OE utilizamos 50-70 g de folhas secas em estufa a 65 ºC. Realizamos o método de hidrodestilação no qual colocamos as folhas em um balão de vidro de 2L juntamente com 1L de água e mantemos em ebulição durante duas horas. Coletamos a mistura água/óleo no aparelho tipo Clevenger modificado (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960).

Para a realização da análise isotópica do OE, retiramos três alíquotas de cada tratamento do OE. O OE é composto por substâncias voláteis, para avaliar isotopicamente as substâncias não voláteis analisamos o enriquecimento relativo natural do resíduo da extração (folha – óleo). Para definirmos o peso das alíquotas do OE e do resíduo realizamos alguns testes e definimos a variação do peso das alíquotas entre 50 e 115 µg. Posteriormente acondicionamos todas as alíquotas em cápsulas de estanho, com 6 mm de altura e 4 mm de diâmetro.

*Análise do enriquecimento relativo*

Colocamos inicialmente as cápsulas de estanho no analisador Elemental (Carlo Erba EA 1108 - Fisons, Milão - Itália), no qual está acoplado ao espectrômetro de massas (IRMS) (Modelo Delta S - Finnigam Mat – Alemanha), neste aparelho, através da combustão das amostras, é liberado o $CO_2$ que é separado na coluna de cromatografia.

Posteriormente, o $CO_2$ será transferido para o ConFlu (Finnigan Mat - Alemanha), onde ocorre o ajuste entre a altura, em Volts, do $CO_2$ da amostra e do padrão. Após esse ajuste a amostra é conduzida até o espectrômetro de massas para razões isotópicas. Neste sistema, de acordo com Ducatti (2007), a amostra e o padrão são admitidos na forma de $CO_2$ e após a passagem por uma fonte de ionização, os feixes dos íons gerados são separados por um campo magnético de acordo com as relações massa/carga. Basicamente, compara-se a razão do $^{13}CO_2$ (massa 45) / $^{12}CO_2$ (massa 44) com uma amostra padrão. O resultado em termo de enriquecimento relativo ($\delta^{13}C$) da amostra em relação ao padrão é expresso em partes por mil (‰) segundo a fórmula:

$$\delta^{13}C = \frac{R_{amostra} - R_{padrão}}{R_{padrão}} \times 10^3$$

Onde, R é a razão isotópica obtida entre o isótopo pesado sobre o isótopo leve ($^{13}C/^{12}C$) da amostra e do padrão, respectivamente. Como os valores numéricos das diferenças são pequenos, costuma-se multiplicar a expressão por 1000, obtendo-se a terminologia em delta per mil [‰ (amostra, padrão)].

*Extração e quantificação dos açúcares solúveis*

Realizamos a extração dos açúcares solúveis segundo metodologia adaptada de Garcia et al. (2006), a partir de 100 mg das amostras secas e moídas de folhas, raiz principal, raízes laterais e gemas caulinares. Como coletamos as amostras em nitrogênio líquido, não foi necessária a etapa de inativação de enzimas. Realizamos a extração com etanol 80% na proporção de 1:10 (p:v) à 80 °C por 15 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Ao término da centrifugação, retirou-se o sobrenadante, reservando-o em tubos devidamente identificados. O procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes, para a retirada completa de todos os açúcares solúveis, unindo os sobrenadantes das três extrações.

Os sobrenadantes tiveram seu volume igualado e submetemos à quantificação dos açúcares solúveis totais por análise colorimétrica pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando solução de glicose (100µg $mL^{-1}$) como padrão. Realizamos a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 490nm, em triplicatas para cada amostra, os açúcares solúveis totais foram expressos em miligramas por grama de massa seca ($mg.g^{-1}$ MS).

Posteriormente liofilizamos as amostras dos açúcares solúveis obtidos da extração retiramos três amostras de açúcares solúveis de cada estrutura vegetativa e acondicionamos de

50 a 70 µg das amostras em cápsulas de estanho, com 6 mm de altura e 4 mm de diâmetro, posteriormente colocamos as amostras no espectrômetro de massas para realização das análises isotópicas.

*Extração e quantificação do lipídio*

As amostras secas e moídas de folhas, raiz principal, raízes laterais e gemas caulinares (100 mg) foram extraídas com 1ml de MCA (12:5:3, v/v/v) – metanol, clorofórmio e água por 30 mim a 70ºC. Depois do arrefecimento as amostras foram centrifugadas a 12000g por 5mim. A alíquota de 0.65ml do sobrenadante foi removido e as fases foram removidas adicionando 0.2ml clorofórmio e 0.7ml de água. Depois da centrifugação a fase metanol/água (camada superior) foi descartada e posteriormente a fase clorofórmio (camada inferior) foi colocada na capela para a volatilização do clorofórmio e obtenção dos lipídios. Posteriormente as amostras de lipídios foram quantificadas pelo método de gravimetria em triplicatas para cada amostra os resultados foram expressos em miligramas por grama de massa seca (mg $g^{-1}$ MS). Para a determinação da razão isotópica dos carbonos dos lipídios retiramos três amostras de lipídios de cada estrutura vegetativa e pipetamos 50µL das amostras em cápsulas de estanho com 6 mm de altura e 4 mm de diâmetro e submetidas ao espectrômetro de massas

*Extração e quantificação do amido*

Para a realização da técnica de extração do amido utilizamos o precipitado da extração dos açúcares solúveis. Adicionamos 5ml (500µl) de $H_20$ ao precipitado, agitamos e colocamos em banho de gelo, adicionamos 6.5ml (600µl) de ácido perclórico ($HClO_4$) a 52%. Mantemos as amostras em banho de gelo e agitamos ocasionalmente (a cada 5 minutos) durante 15 minutos, adicionamos 2ml de $H_20$ e centrifugamos a 2500 g por 5 minutos (MCCREADY et al., 1950).

Recolhemos o sobrenadante (SN1) filtrando-o em algodão e colocamos em tubos identificados, repetimos esta operação três vezes, posteriormente centrifugamos as amostras a 2500g por 5 minutos, recolhemos o sobrenadante (SN2) no mesmo tubo do SN1, por fim mantemos as amostras em freezer até a quantificação.

Para a quantificação do amido utilizamos o método antrona (MORRIS, 1948; YEMM; WILLIS, 1954). Inicialmente preparamos a solução de glicose a 0.010g de glicose para 10 ml de água deionizada. Para a preparação do reagente antrona utilizamos 0.10g de antrona em 45ml de ácido sulfúrico ($H_2SO_4$).

Antes da quantificação do amido fizemos uma curva padrão, posteriormente adicionamos 2000µl de antrona a 1000µl de água + amostra e colocamos em banho-maria em ebulição por 3 minutos. Quando as amostras esfriaram realizamos a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 620nm, em triplicatas para cada amostra e a quantidade de amido foi representada em miligramas por grama de massa seca (mg $g^{-1}$ MS).

*Análise dos dados*

Submetemos todas as médias à análise de variância ANOVA e posteriormente realizamos o teste Tukey com valor de significância a 5% entre as médias e erro padrão. Nos gráficos de curva de luz utilizamos a função de decaimento exponencial com dois parâmetros, para se ajustar a curva da ΦPSII e qP (RITCHIE, 2008; IACONO; SOMMER, 2000) com diferentes DFFF. Para ajustar a curva de crescimento de ETR e NPQ vs. PPFD utilizamos a hipérbole retangular com dois parâmetros (THORNLEY, 1998; IACONO; SOMMER, 2000). Posteriormente realizamos o teste Tukey com valor de significância a 5% entre as médias e erro padrão. Os valores máximos de cada função foram comparados entre os tratamentos dos dias 27/03 e 16/04. Nos valores de enriquecimento relativo natural $^{13}C$ também utilizamos a análise de variância ANOVA: fatorial axb onde a representa os tratamentos controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação e b representa os blocos folhas, gemas caulinares, raiz lateral, raiz principal, óleo essencial e resíduo (óleo – folha), açúcares folhas, açúcares gemas caulinares, açúcares raiz lateral, açúcares raiz principal, lipídios folhas, lipídios gemas caulinares, lipídios raiz lateral e lipídios raiz principal.

**Resultados**

*Relações hídricas*

As características de relações hídricas, representados pela figura 1, possibilita a visão geral do experimento. A figura 1 indica os valores do tratamento de déficit hídrico o qual é representado pelo final do período de déficit hídrico (valores representados entre os dias 11/03 a 27/03) e a outra parte é representada pelo final do período de reidratação (valores representados entre os dias 31/03 a 16/04). Os dados são representados dessa forma para a representação e compreensão do balanço hídrico da *C. langsdorffii* ocorrido durante todo o experimento.

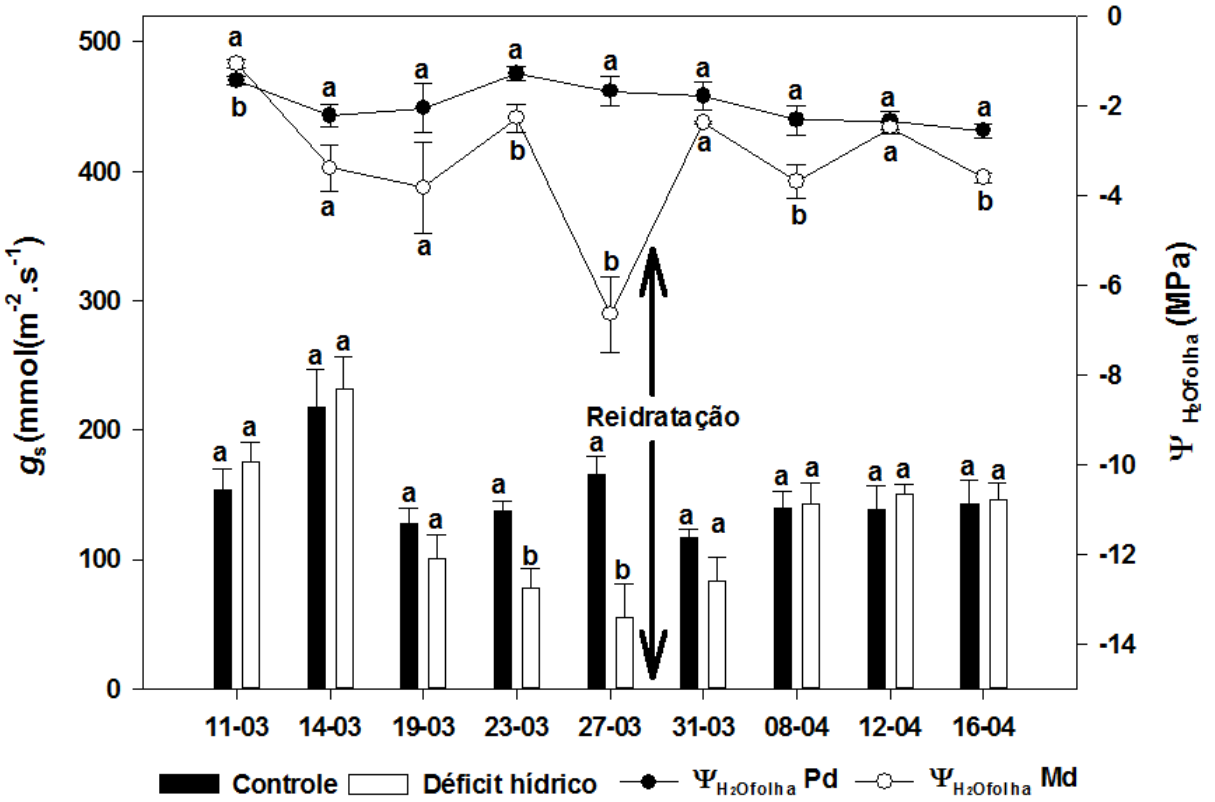



**Figura 1**. Características de relações hídricas; condutância estomática ($g_s$) e potencial da água na folha avaliados em Predawn 5:30 h ($\Psi_{H2Ofolha}$ Pd) e *Midday* 12:00 h ($\Psi_{H2Ofolha}$ Md). Os dados de déficit hídrico são representados pelos valores do final período de déficit hídrico e os demais dias são representados pelos valores do final do período de reidratação. Valores referentes às médias e desvio padrão. Dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e posterior teste Tukey com nível de significância a 5%. As letras diferentes referentes à condutância estomática ($g_s$) representam diferenças estatísticas entre os tratamentos. Já as letras diferentes referentes ao potencial da água na folha ($\Psi_{H2Ofolha}$) representam diferenças estatísticas entre os períodos dos dias (Predawn e Midday).

Oito dias após a suspensão da irrigação (19/03) os valores de $g_s$ no déficit hídrico começaram a reduzir drasticamente. Estes valores de $g_s$ continuaram reduzindo até o dia 27/03 com redução de 78% em $g_s$. Nos dias 23/03 e 27/03 observamos alterações entre os valores de $\Psi_{H2Ofolha}$ Pd e $\Psi_{H2Ofolha}$ Md. No dia 27/03 o valor de $\Psi_{H2Ofolha}$ Md foi 75% menor que o valor de $\Psi_{H2Ofolha}$ Pd. Tal redução pode indicar interferência na recuperação da perda de água da planta ao longo do dia em decorrência dos efeitos da deficiência hídrica.

Para evitar que as plantas chegassem ao PMP iniciamos a reidratação no dia 29/03. Encerramos as análises no dia 16/04, quando os valores das características de relações hídricas do déficit hídrico se igualaram aos valores das plantas do controle. Ao compararmos os valores de $g_s$ no déficit hídrico entre os dias 27/03 (último dia de déficit hídrico) e 16/04 (último dia de reidratação) notamos o aumento de 37%. A diferença entre os entre os valores de $\Psi_{H2Ofolha}$ Pd e $\Psi_{H2Ofolha}$ Md reduziram para 25%.

*Taxa de assimilação de $CO_2$, potencial da água do solo e eficiência quântica máxima do PSII*

Além das características $g_s$ e $\Psi_{H2Ofolha}$, utilizamos a A, o $\Psi_{H2Osolo}$ e Fv/Fm para monitorar a influência do final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação nas respostas fisiológicas da *C. langsdorffii.* Na tabela 2 utilizamos os dados das avaliações de dias específicos para representar os valores nos tratamentos controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação.

**Tabela 2.** Características fisiológicas avaliadas nos tratamentos controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação. Taxa de assimilação de $CO_2$ (A), o potencial da água no solo ($\Psi_{H2Osolo}$) e eficiência quântica do PSII (Fv/Fm)

| | Fv/Fm | A (µmol $CO_2$ $m^{-2}s^{-1}$) | $\Psi w_s$ (Mpa) |
|---|---|---|---|
| **Controle** | **0.7027±0.0499 a** | **6.38±2.37 a** | **-0.205±0.14 a** |
| **Final do período de déficit hídrico** | **0.5380±0.1963 b** | **-0.21±1.81 b** | **-2.27±1.54 b** |
| **Final do período de reidratação** | **0.7166±0.0597 a** | **6.27±2.01 a** | **-0.215±0.19 a** |

Valores referentes às médias e desvio padrão. Dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e posterior teste Tukey com nível de significância a 5%. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (controle, final do período de déficit hídrico, final do período de reidratação).

No final do período de déficit hídrico observamos redução de 23% nos valores de Fv/Fm, 96% na A e 90% no $\Psi_{H2Osolo}$ os baixos valores dessas características indicam que as plantas desse tratamento estão submetidas á deficiência hídrica (devido aos baixos valores de $\Psi_{H2Osolo}$), não estão assimilando $CO_2$, ou seja estão apenas respirando e possivelmente fotoinibidas. No controle os valores das três características aumentam em 24% na Fv/Fm, 96% na A e 90% no $\Psi_{H2Osolo}$, indicando recuperação pós deficiência hídrica, os testes estatísticos comprovam este fato.

*Características de fluorescência da clorofila a*

Na figura 2 utilizamos os mesmos dias das características Fv/Fm, A e $\Psi_{H2Osolo}$ para representar o controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação. O NPQ apresentou diferença significativa apenas no final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação (Figura 2a). No controle e final do período de déficit hídrico os valores se mantiveram constantes, porém no final do período de reidratação houve aumento de 28% em relação ao final do período de déficit hídrico. O aumento da dissipação de calor no final do período de reidratação indica recuperação dos parâmetros fotoquímicos após danos ocasionados pelo déficit hídrico.

O ETR apresentou diferença significativa apenas no final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação (Figura 2b). O padrão de resposta foi semelhante ao NPQ ocorrendo constância nos valores do controle e final do período de déficit hídrico. No final do período de reidratação houve aumento de 43% em relação ao final do período de déficit hídrico. O aumento nos valores de ETR pode indicar aumento na eficiência fotossintética em resposta a baixa disponibilidade hídrica durante a deficiência hídrica.

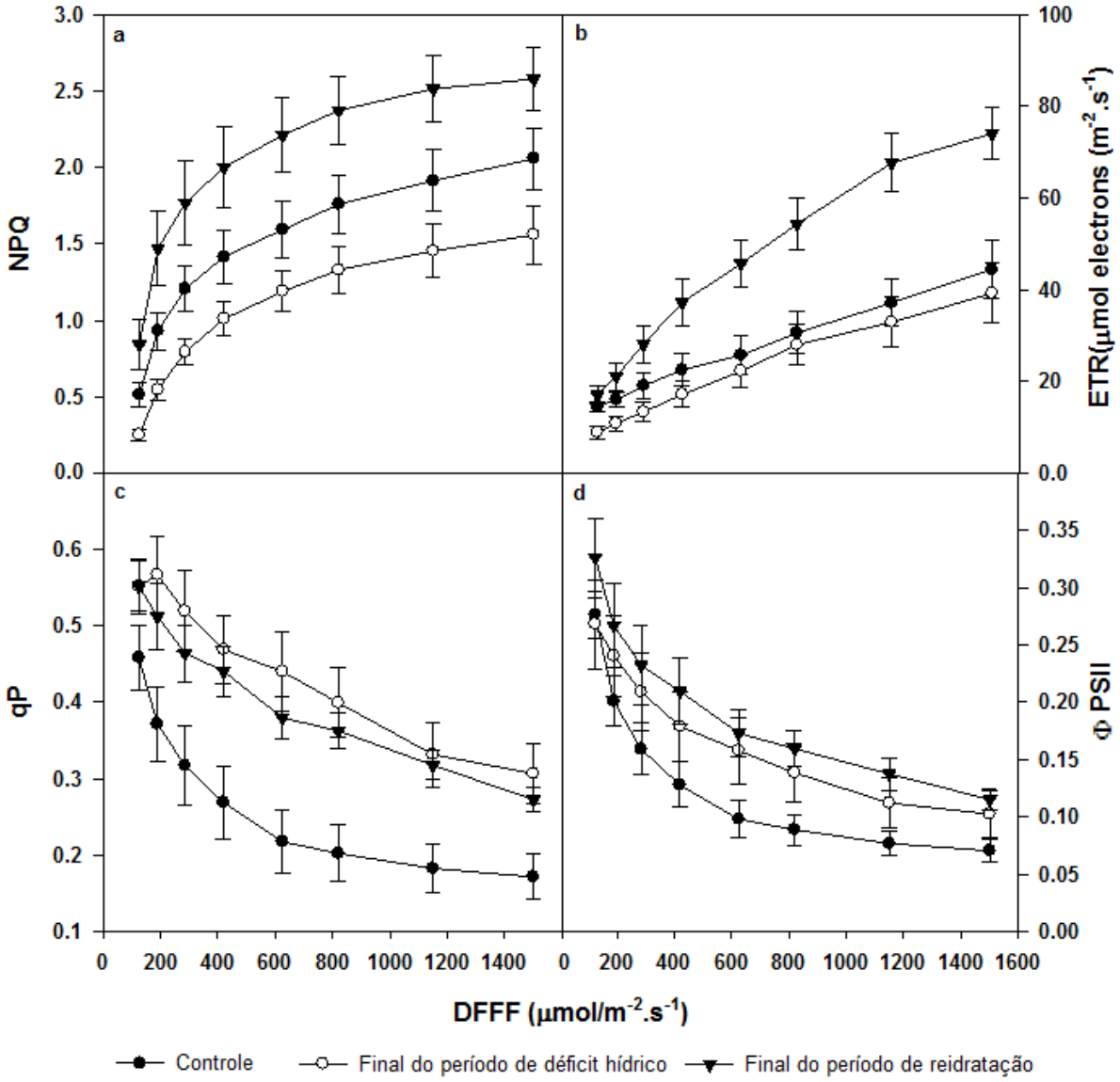



**Figura 2**. Curva de luz da dissipação fotoquímica (NPQ), taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação fotoquímica (qP) e rendimento quântico efetivo do ΦPSII (ΦPSII). Os testes estatísticos foram realizados entre os tratamentos controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação utilizamos a função de decaimento exponencial com dois parâmetros, para ajustar a curva da ΦPSII (Fig d) e qP (Fig c) e a hipérbole retangular com dois parâmetros para ajustar a curva do ETR (Fig b) e NPQ (Fig a), posteriormente realizamos o teste Tukey com valor de significância a 5% entre as médias e erro padrão.

Na característica qP houve diferença significativa no final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação somente em relação ao controle. No final do período de

déficit hídrico houve aumento de 26% em relação ao controle, no final do período de reidratação os valores de qP se mantiveram constantes (Figura 2c). O ΦPSII não apresentou diferença significativa entre os três tratamentos (Figura 2d).

*Enriquecimento relativo natural $^{13}C/^{12}C$ e quantificação de açúcares solúveis, amido e lipídios*

Na tabela 3 podemos observar a variação do δ $^{13}C$ em diferentes órgãos vegetativos, OE e resíduo da extração do OE (folha – óleo) da *C. langsdorffii.* O aumento dos valores de δ $^{13}C$ indica aumento de $^{13}C$ na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$, a redução nos valores de δ $^{13}C$ indica aumento de $^{12}C$ na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$.

**Tabela 3.** Enriquecimento relativo natural (δ $^{13}C$) das estruturas vegetativas, óleo essencial das folhas e resíduo da extração do óleo essencial (folha - óleo) da *C. langsdorffii* em diferentes tratamentos.

| | Controle | Final do período de déficit hídrico | Final do período de reidratação |
|---|---|---|---|
| **Folhas** | **-28.93±1.20 Aa** | **-27.57±1.16 Ab** | **-29.36±0.67 Aa** |
| **Gemas caulinares** | **-28.15±1.34 Aa** | **-27.81±0.48 Aa** | **-28.05±0.71 Ba** |
| **Raiz lateral** | **-28.21±1.22 Aa** | **-27.54±0.77 Aa** | **-27.99±0.75 Ba** |
| **Raiz Principal** | **-28.18±1.17 Aa** | **-27.26±0.61 Aa** | **-28.06±0.90 Ba** |
| **Óleo essencial** | **-27.63±0.31 Aab** | **-28.16±0.23 Aa** | **-27.41±0.3 Bb** |
| **Resíduo (folha - óleo)** | **-28.97±0.03 Aa** | **-28.44±0.08 Bb** | **-29.56±0.07 Ac** |

Valores referentes às médias e desvio padrão. Dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e posterior teste Tukey com nível de significância a 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (controle, final do período de déficit hídrico, final do período de reidratação) e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre as estruturas vegetativas. Fatorial axb tratamentos (controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação) blocos (folhas, gemas caulinares, raiz lateral, raiz principal e óleo essencial e resíduo (folha - óleo)) F (Tratamentos)=5.3184, p (Tratamento)=0.0095, F (Blocos)=6.0003, p (Blocos)=0.0006, F (Interação)=1.6698 e p (Interação)= 0.1264.

Quando comparamos o δ $^{13}C$ das estruturas vegetativas entre os tratamentos (letras minúsculas nas linhas) observamos que nas folhas houve aumento de -1.36 ‰ no δ $^{13}C$ no final do período de déficit hídrico em relação ao controle e no final do período de reidratação há redução de -2 ‰ no δ $^{13}C$ em relação ao final do período de déficit hídrico. Ao observamos estes valores notamos o aumento na proporção de $^{13}C$ na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ durante a deficiência hídrica e a diminuição do mesmo na reidratação. Nas gemas caulinares e nas raízes laterais não houve diferença significativa entre os tratamentos em nenhuma das características. Na raiz principal não houve diferença significativa.

O δ $^{13}C$ do OE no final do período de déficit hídrico reduziu -0.53 ‰ em relação ao controle e no final do período de reidratação aumentou -0.75‰ em relação ao final do período de déficit hídrico. O resíduo (folha - óleo) apresentou aumento de -0.53‰ no final do período

de déficit hídrico em relação ao controle e redução de -1.12‰ no final do período de reidratação em relação ao final do período de déficit hídrico. O OE apresentou taxa aumento de $^{12}C$ na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ durante o déficit hídrico e a diminuição do mesmo na reidratação. Já resíduo (folha - óleo) apresentou redução de $^{12}C$ na razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ no déficit hídrico e aumento do mesmo na reidratação.

Porém quando compararmos o $\delta\ ^{13}C$ entre as estruturas vegetativas notamos que no final do período de déficit hídrico o resíduo (folha - óleo) apresenta valores mais baixos de $\delta\ ^{13}C$ (-28.44‰) indicando menor proporção de $^{13}C$ entre as estruturas vegetativas. No final do período de reidratação o resíduo (folha – óleo) mantem os valores mais baixos de $\delta\ ^{13}C$ (-29.56‰) no entanto as folhas reduzem os valores de $\delta\ ^{13}C$ (-29.36‰) indicando juntamente com o resíduo (folha - óleo) as menores proporções de $^{13}C$ entre as estruturas vegetativas.

A quantidade de açúcares solúveis e lipídios não variam entre os tratamentos, porém nas folhas a quantidade de amido no final do período de déficit hídrico diminui 63% em relação ao controle, os valores aumentam 56% quando comparamos os tratamentos de final do período de déficit hídrico com o final do período de reidratação (Tabela 4). Na raiz principal a quantidade de açúcares solúveis diminuiu 17% no final do período de déficit hídrico em relação ao controle e aumenta 28% no final do período de reidratação em relação ao final do período de déficit hídrico. A quantificação de amido apresentou o mesmo padrão que os açúcares solúveis, houve redução de amido no final do período de déficit hídrico e aumento no final do período de reidratação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Quantificação do amido, açúcares solúveis e lipídios extraídos das estruturas vegetativas da *C.langsdorffii* em diferentes tratamentos.

| **Folhas** | | | |
|---|---|---|---|
| | **Açúcar mg.g$^{-1}$MS** | **Amido mg.g$^{-1}$ MS** | **Lípídio mg.g-1 MS** |
| **Controle** | **6.61±0.15 a** | **18.05±0.40 a** | **0.03±0.02 a** |
| **Final do período de déficit hídrico** | **6.19±0.24 a** | **6.64±1.68 b** | **0.05±0.02 a** |
| **Final do período de reidratação** | **6.51±0.01 a** | **15.31±0.80 a** | **0.06±0.01 a** |
| **Gemas caulinares** | | | |
| | **Açúcar mg.g$^{-1}$ MS** | **Amido mg.g$^{-1}$ MS** | **Lípídio mg.g-1 MS** |
| **Controle** | **6.94±0.29 a** | **14.06±2.12 a** | **0.06±0.01 a** |
| **Final do período de déficit hídrico** | **5.85±0.95 a** | **13.05±4.82 a** | **0.04±0.01 a** |
| **Final do período de reidratação** | **6.61±0.15 a** | **18.5±1.17 a** | **0.03±0.01 a** |
| **Raiz lateral** | | | |
| | **Açúcar mg.g$^{-1}$ MS** | **Amido mg.g$^{-1}$ MS** | **Lípídio mg.g-1 MS** |
| **Controle** | **9.6±0.36 a** | **17.93±1.48 a** | **0.08±0.01 a** |
| **Final do período de déficit hídrico** | **7.99±2.79 a** | **12.46±2.64 a** | **0.19±0.12 a** |
| **Final do período de reidratação** | **9.77±0.31 a** | **12.65±2.21 a** | **0.05±0.01 a** |
| **Raiz principal** | | | |
| | **Açúcar mg.g$^{-1}$ MS** | **Amido mg.g$^{-1}$ MS** | **Lípídio mg.g-1 MS** |
| **Controle** | **9.32±0.09 ab** | **29.79±0.24 ab** | **0.08±0.04 a** |
| **Final do período de déficit hídrico** | **7.73±0.71 a** | **6.69±1.83 a** | **0.04±0.01 a** |
| **Final do período de reidratação** | **10.84±0.13 b** | **18.21±5.96 b** | **0.07±0.05 a** |

Valores referentes às médias e desvio padrão. Dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e posterior teste Tukey com nível de significância a 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (controle, final do período de déficit hídrico, final do período de reidratação).

Quando comparamos o δ $^{13}$C dos açúcares solúveis entre os tratamentos (letras minúsculas nas linhas) e comparamos o δ $^{13}$C dos açúcares solúveis entre as estruturas vegetativas (letras maiúsculas nas colunas) não observamos diferenças significativas (Tabela 5). No entanto nos lipídios (Tabela 6) só é possível observar diferença significativa entre as estruturas vegetativas (letras maiúsculas nas colunas). No controle os lipídios das raízes laterais apresentam os maiores valores de δ $^{13}$C (-27.28‰) indicando maior proporção de $^{13}$C entre as estruturas vegetativas. No final do período de déficit hídrico os lipídios das folhas apresentaram os menores valores de δ $^{13}$C (-28.77‰) indicando menor proporção de $^{13}$C entre as estruturas vegetativas.

**Tabela 5.** Enriquecimento relativo natural (δ $^{13}C$) dos açúcares solúveis extraídos das estruturas vegetativas da *C.langsdorffii* em diferentes tratamentos.

| | Controle | Final do período de déficit hídrico | Final do período de reidratação |
|---|---|---|---|
| **Açúcares folhas** | **-28.27±0.38 Aa** | **-27.88±0.09 Aa** | **-29.12±0.30 Aa** |
| **Açúcares gemas caulinares** | **-28.06±0.13 Aa** | **-27.63±0.64 Aa** | **-28.66±0.12 Aa** |
| **Açúcares raiz lateral** | **-27.87±0.77 Aa** | **-28.13±0.12 Aa** | **-28.29±0.30 Aa** |
| **Açúcares raiz principal** | **-28.42±0.74 Aa** | **-27.81±0.41 Aa** | **-28.63±0.23 Aa** |

Valores referentes às médias e desvio padrão. Dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e posterior teste Tukey com nível de significância a 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (controle, final do período de déficit hídrico, final do período de reidratação) e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre as estruturas vegetativas. Fatorial axb tratamentos (controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação) blocos (açúcares folhas, açúcares gemas caulinares, açúcares raiz lateral e açúcares raiz principal) F (Tratamentos)=4.4017, p (Tratamento)=0.023, F (Blocos)=0.466, p (Blocos)=0.7122, F (Interação)=0.4724 e p (Interação)= 0.8227.

**Tabela 6.** Enriquecimento relativo natural (δ $^{13}C$) dos lipídios extraídos das estruturas vegetativas da *C.langsdorffii* em diferentes tratamentos.

| | Controle | Final do período de déficit hídrico | Final do período de reidratação |
|---|---|---|---|
| **Lipídios folhas** | **-28.60±0.21 Aa** | **-28.77±0.23 Aa** | **-29.12±0.41 Aa** |
| **Lipídios gemas caulinares** | **-28.06±0.04 Aa** | **-27.59±0.03 Ba** | **-29.02±1.52 Aa** |
| **Lipídios raiz lateral** | **-27.28±0.17 Ba** | **-27.18±0.26 Ba** | **-27.26±0.09 Aa** |
| **Lipídios raiz principal** | **-28.19±0.15 Aa** | **-27.06±0.25 Bb** | **-28.61±0.02 Aa** |

Valores referentes às médias e desvio padrão. Dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e posterior teste Tukey com nível de significância a 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (controle, final do período de déficit hídrico, final do período de reidratação) e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre as estruturas vegetativas. Fatorial axb tratamentos (controle, final do período de déficit hídrico e final do período de reidratação) blocos (lipídios folhas, lipídios gemas caulinares, lipídios raiz lateral e lipídios raiz principal) F (Tratamentos)=18.8318, p (Tratamento)=0.0001, F (Blocos)=37.0879, p (Blocos)=0.0001, F (Interação)=3.9406 e p (Interação)= 0.0072.

## Discussão

*Características fisiológicas*

As respostas fisiológicas à variação hídrica permitem o rápido ajuste metabólico e levam a alterações no δ $^{13}C$. *C. langsdorffii* submetida ao curto período de déficit hídrico apresenta mecanismos de recuperação hídrica. A eficiência fotoquímica durante o déficit hídrico reduz os danos no aparato fotossintético como um mecanismo de fotoproteção.

A figura 1 indica o estado hídrico da *C. langsdorffii* frente a deficiência hídrica e posterior reidratação. Na medida em que a duração da deficiência hídrica aumenta as características referentes a relações hídricas se alteram no sentido de restringir a saída de água. O decréscimo do $\Psi_{H2Ofolha}$ entre Pd e Md indica redução na quantidade de água nas células do mesofilo e na turgescência das células guarda consequentemente ocorre

fechamento estomático e decréscimo da taxa de assimilação de $CO_2$ (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

O fechamento estomático gradual evita perda de água pela transpiração proporcionando o controle dos níveis de água nas células do mesofilo. Tal fato evita danos no aparato fotossintético e matem a capacidade fotossintética constante. O aumento da intensidade do estresse hídrico proporciona deficiência nas reações do mesofilo ocasionando danos mais complexos que a limitação estomática (QUICK *et al*., 1992; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004; GRASSI; MAGNANI, 2005; MULLER *et al*., 2011).

Os baixos valores de $\Psi_{H2Ofolha}$ Pd e $\Psi_{H2Ofolha}$ Md durante o déficit hídrico tem influência indireta na assimilação de carbono de *Copaifera langsdorffii Desf*. (RONQUIM; PRADO; SOUZA, 2009). A queda dos valores do $\Psi_{H2Ofolha}$ no decorrer do dia ($\Psi_{H2Ofolha}$ Pd e Md) não afeta o *continum* solo – planta -atmosfera, pois o aumento no gradiente de potencial água entre solo e planta resulta no estímulo da entrada de água pelas raízes favorecendo o transporte de água pela planta (KUDOYAROVA; KHOLODOVA; VESELOV, 2013).

Após a reidratação observamos a recuperação gradual das características de relações hídricas. O tempo de resposta à irrigação foi curto; oito dias após a reidratação a gs e o $\Psi_{H2Ofolha}$ já apresentavam valores mais altos. Após 19 dias de irrigação as características de relações hídricas aumentaram até igualar aos valores do controle comprovando a eficiência da dinâmica do estado hídrico de *C.langsdorffii.*

Gimenez; Gallardo e Thompson, (2005), relacionaram a lenta recuperação do $g_s$ com a dinâmica hormonal. A produção de ABA durante o período de deficiência hídrica mantem o controle do fechamento estomático devido a impossibilidade de reversão dos ajustes hormonais (CORREIA et al., 1995; SOCIAS et al., 1997). Em nossos resultados observamos respostas rápidas do $g_s$ após a reidratação.

A rápida recuperação de $\Psi_{H2Ofolha}$ Pd e $\Psi_{H2Ofolha}$ Md ocorre em decorrência da diminuição do déficit hídrico. Os danos causados pela deficiência hídrica não afetam a capacidade de absorção de água pelas raízes e o transporte de água para a parte aérea (GIMENEZ; GALLARDO; THOMPSON, 2005; ALBUQUERQUE et al., 2013). A rápida recuperação de $\Psi_{H2Ofolha}$ foi observado em plantas jovens de *Schizolobium macrophylla*, cujos valores de $\Psi_{H2Ofolha}$ aumentaram de ‑3.52 MPa para ‑0.07 MPa após 12 horas do início da irrigação (CORDEIRO et al., 2009).

Com as características $\Psi_{H2Osolo,}$ A e Fv/Fm pudemos monitorar as respostas da *C. langsdorffii* sob influência da deficiência hídrica e posterior reidratação. A redução gradativa

do $\Psi_{H2Osolo}$ no final do período de déficit hídrico (Tabela 2) dificulta a absorção de água pelas plantas, pois o aumento da força de retenção diminui a disponibilidade de água no solo para as plantas. A condição hídrica adequada exige que a absorção radicular de água disponível no solo atue nos processos de transpiração e consequentemente na A (GIMENEZ; GALLARDO; THOMPSON, 2005). Os baixos valores do $\Psi_{H2Osolo}$ afetam o continum solo – planta - atmosfera a turgescência das células guardas e a condutância estomática diminuem consequentemente a A reduz (Tabela 2).

Os baixos valores da A no final do período de déficit hídrico refletem na redução dos valores de Fv/ Fm. Consequentemente o acesso de $CO_2$ aos sítios de carboxilação da RuBisCo é comprometido assim a dissipação de energia luminosa se intensifica resultando em fotoinibição. Quando toda a energia absorvida pelos pigmentos fotossintéticos não é utilizada no processo fotoquímico os centros de reação do fotossistema II podem ser destruídos. O estresse hídrico potencializa o efeito fotoinibitório sobre o PSII (GLAZ et al., 2004) e a baixa taxa de A evita o acesso de $CO_2$ aos sítios de carboxilação da RuBisCo afetando a capacidade de dissipação de energia luminosa causando danos no PSII e redução em Fv/Fm.

A recuperação dos valores de Fv/Fm após a reidratação indica fotoinibição dinâmica, ou seja, fotoproteção. A combinação de altos ou moderados níveis de intensidade de luz e outros estresses ambientais (como a deficiência hídrica) podem levar a fotoinibição dinâmica (reduções reversíveis de Fv/Fm) não afetando o desenvolvimento da planta (FARQUHAR et al.,1989). A estratégia de fotoproteção da *C. langsdorffii* também é observada em espécies de Cerrado submetidas a deficiência hídrica (VEIGA; HABERMANN, 2013).

As características de fluorescência da clorofila *a* apresentaram respostas significativas na deficiência hídrica. Os indivíduos submetidos à reidratação apresentaram aumento nos valores de ETR (Figura 2b). A reidratação após o estresse hídrico aumentou a eficiência da captura de energia de excitação nos centros de reação PSII e a proporção de centros de reação "abertos" foi maior ($Q_a$ reduzida) consequentemente a capacidade de transporte de elétrons foi potencializada (ZHAO, DENG, SHAN, 2007; POTEET, MACDONNELL, 2013).

Os valores da característica qP aumentaram no final do período de déficit hídrico porém após a reidratação esses valores se mantiveram constantes (Figura 2c). A constância nos valores de qP atua na separação da carga elétrica no centro de reação beneficiando o ETR e o rendimento da eficiência do PSII (GUO, LIU; SHI, 2006). No final do período de reidratação observamos constância nos valores de qP e o aumento dos valores de ETR isto indica maior eficiência fotossintética e potencialização da "abertura" dos centros de reação do PSII. Consequentemente a demanda da energia da luz estimula o transporte de elétrons na

fotossíntese e a capacidade fotossintética de transporte de elétrons diminui a fotoinibição da planta (WU; BAO, 2011)

Os altos valores de qP também estão relacionados com o metabolismo fotossintético do carbono (CAMPOSTRINI 1998). Plantas com estômatos fechados devido a deficiência hídrica podem apresentar altos valores de qP devido à reciclagem interna de $CO_2$. Nesta condição, a fluorescência pode fornecer informações sobre o ΦPSII, o fluxo de elétrons e sobre o estado de energia dos cloroplastos (WINTER; DEMMIG, 1987), mesmo que nenhuma fixação do $CO_2$ ou liberação do oxigênio ocorra. Nesse caso os altos valores de qP estão relacionados com a disponibilidade de dissipação de energia para o metabolismo do carbono. Os valores de ΦPSII não se alteraram nos três tratamentos, esta resposta indica manutenção da eficiência operacional do PSII no aparato fotossintético.

O NPQ é o decréscimo do rendimento quântico da fluorescência associado à dissipação termal da energia de excitação (POSPISIL, 1997). Para que ocorra a proteção do aparato fotossintético a energia luminosa absorvida é desviada para a reação fotoquímica. O NPQ apresentou aumento apenas nos valores do final do período de reidratação. No controle e final do período de déficit hídrico os valores se mantiveram constantes (Figura 2a) esta constância proporciona a manutenção da dissipação de calor durante a deficiência hídrica.

Observamos que as características NPQ, qP e ETR atuam na redução dos danos no aparato fotossintético em períodos de deficiência hídrica. A reidratação após o estresse hídrico potencializou a captura da energia de excitação nos centros de reação PSII. Consequentemente a proporção dos centros de reação "abertos" foi maior aumentando a capacidade de transporte de elétrons e o rendimento da eficiência do PSII. Os valores constantes de NPQ ocasionaram a manutenção da dissipação de calor durante a deficiência hídrica. Tais respostas confirmam a capacidade de fotoproteção da *C. langsdorffii* após a reidratação mesmo havendo fotoinibição durante o déficit hídrico.

*Enriquecimento relativo natural $^{13}C$ e a síntese e translocação dos compostos orgânicos*

A diminuição do conteúdo de carboidratos de reserva (amido) nas folhas, durante a deficiência hídrica, resulta na translocação de carbono para a raiz principal. As alterações nas razões isotópicas de $^{13}C/^{12}C$, em diferentes órgãos vegetais e compostos orgânicos, durante o déficit hídrico sugere a movimentação majoritária de $^{12}C$ nas folhas para a produção do óleo essencial e lipídios.

Na tabela 3 é possível observarmos a dinâmica do enriquecimento relativo natural de $^{13}C/^{12}C$ entre os órgãos vegetativos da *C. langsdorffii* em condições de déficit hídrico e reidratação. Dentre os órgãos vegetativos analisados, as folhas maduras foram as únicas estruturas que apresentaram diferenças significativa entre os tratamentos. Inicialmente no controle as folhas apresentaram a média de -28.93‰ nos valores de $\delta\ ^{13}C$, ou seja, os indivíduos em condições favoráveis apresentaram maior proporção de $^{12}C$. A ocorrência do $^{13}C$ no material vegetal de plantas $C_3$ é baixa, pois durante a carboxilação a RuBisCo favorece fortemente o $^{12}C$, discriminando o $^{13}C$ (GILBERT et al., 2012).

No final do período de déficit hídrico os valores do $\delta\ ^{13}C$ aumentaram para -27.57‰ nesse caso as folhas apresentaram maior quantidade de $^{13}C$, ou seja, houve o enriquecimento natural de $^{13}C$ nas folhas sob estresse hídrico. A alteração dos valores de $\delta\ ^{13}C$ entre o controle e final do período de déficit hídrico indica alterações na alocação de carbono. Indivíduos de *Lavandula angustifólia* submetidos ao estresse salino também apresentaram redução do $\delta\ ^{13}C$ somente nas folhas (CORDOVILLA et al., 2014). Em Barthel et al (2011) o deslocamento de C em condições de deficiência hídrica em indivíduos de *Fagus sylvatica* L. apresentaram deslocamento de C para as raízes e caule. Tal resposta é conhecida como teoria do particionamento ideal (BLOOM; CHAPIN; MOONEY, 1985) ou seja plantas submetidas a escassez de água ou nutrientes translocam C e nutrientes para estruturas abaixo do solo.

Em condições de deficiência hídrica ocorre o ajuste do padrão de alocação do carbono, ou seja, o aumento de carbono nas raízes proporciona aumento na superfície de absorção. (POGGIANI 1971; POGGIANI; SIMÕES; MENDES-FILHO, 1981; HSIAO; XU 2000). Em nossos resultados não houveram alterações nos valores de $\delta\ ^{13}C$ nas raízes laterais e principal, consequentemente não ocorreu crescimento das raízes no final do período de déficit hídrico. Essa resposta pode ter ocorrido em decorrência do tempo de duração da deficiência hídrica ou pela idade dos indivíduos a alocação de recursos em condições desfavoráveis se difere em árvores adultas e jovens (STEPPE; NIINEMETS; TESKEY, 2011; VOELKER, 2011)

Somente a raiz principal apresentou redução nas concentrações de açúcares solúveis no final do período de déficit hídrico (Tabela 4). Essa diminuição pode indicar baixo potencial osmorregulatório. Os açúcares solúveis podem ter sido utilizados durante a manutenção dos processos fotossintéticos no decorrer da deficiência hídrica (HUMMEL et al., 2010). A degradação do amido foi semelhante nas folhas e na raiz principal durante o déficit hídrico (Tabela 4) a partição do amido é estimulada em condições de deficiência hídrica consequentemente ocorre aumento na concentração de sacarose (açúcar solúvel).

O processo inicial para a utilização da sacarose é a clivagem por meio das enzimas invertases, resultando na produção de hexoses – glicose ou UDP-glicose estas atuam como fontes de energia para a síntese de diferentes produtos de reserva e para atender à demanda de crescimento dos tecidos. (WINTER & HUBER, 2000). Assim a sacarose oriunda da quebra do amido pode ser consumida a fim de controlar os baixos índices de potencial osmótico e reduzir os danos no aparato fotossintético (ZRENNER; STITT, 1991). O consumo da sacarose em condições de deficiência hídrica explica a redução de açúcares solúveis encontrado em nossos resultados.

Os baixos teores de carboidratos não estruturais nas plantas sob estresse hídrico estão relacionados à baixa assimilação de $CO_2$ e à mobilização de reservas para o crescimento. A disponibilidade e armazenamento desses compostos dependem do tempo de duração do déficit hídrico. Se a deficiência hídrica perdurar por muito tempo a taxa respiratória irá superar a taxa fotossintética e a redução nas concentrações totais dos hidratados solúveis de carbono ocasionará a morte da planta (MCDOWELL; ALLEN; MARSHALL, 2010).

No final do período de reidratação houve aumento na concentração de açúcares solúveis e amido nas folhas e raiz lateral (Tabela 4), porém tais valores não se igualaram aos valores do controle. A dinâmica de translocação de açúcares solúveis entre diferentes estruturas vegetativas de *C. langsdorffii* não alterou a razão isotópica $^{12}C/^{13}C$ dos açúcares solúveis (Tabela 5) possivelmente o tempo de exposição à deficiência hídrica não foi suficiente para alteração da proporção isotópica dos açúcares solúveis.

O aumento dos valores de $\delta\ ^{13}C$ nas folhas no final do período de déficit hídrico e redução no final do período de reidratação (Tabela 3) pode indicar influência da disponibilidade hídrica nos mecanismos de translocação de carbono nas folhas de *C. langsdorffii*. Essa estrutura vegetativa podem atuar como órgão fonte ou dreno dependendo da intensidade da deficiência hídrica. Espécies de *Pinus* também apresentaram aumento nas concentrações dos carboidratos não estruturais após pulsos de chuva. A reidratação proporciona aumento de $g_s$ e A consequentemente a taxa respiratória diminui e a taxa fotossintética aumenta. A produção de fotoassimilados é retomada e as concentrações de carboidratos não estruturais aumentam. Esse processo retrata a dinâmica de translocação de carbono entre órgãos vegetativos fonte e dreno (DICKMAN et al., 2014).

A quantidade de lipídios não alterou em decorrência da disponibilidade hídrica (Tabela 4) porém houve diferença significativa no $\delta\ ^{13}C$ principalmente entre as estruturas vegetativas no final do período de déficit hídrico. Neste tratamento os lipídios das folhas apresentaram os menores valores de $\delta\ ^{13}C$ (Tabela 6) indicando empobrecimento de $^{13}C$. Sob

condições de deficiência hídrica o aumento de espécies reativas de oxigênio e a ativação de enzimas hidrolíticas induz danos as membranas celulares das folhas (PERLIKOWSKI et al., 2014) ocasionando o remodelamento dos níveis de lipídios das membranas celulares (LARSSON et al 2006) esta alteração resulta em sinalizações ocasionadas pela ação de fosfolipases e mensageiros lipídicos atuando no metabolismo de recuperação das folhas após a deficiência hídrica (MEIJER; MUNNIK, 2003). O empobrecimento de $^{13}C$ nos lipídios das folhas pode estar relacionado com a ocorrência das sinalizações lipídicas durante o déficit hídrico. Além da relação fonte e dreno o empobrecimento de $^{13}C$ nas folhas no final do período de déficit hídrico (Tabela 3) também pode ter ocorrido por influência das sinalizações lipídicas ocorridas nas membranas celulares das folhas.

Para monitorar as vias de alocação de carbono na *C. langsdorffii* analisamos o $\delta\ ^{13}C$ dos compostos voláteis do OE. Observamos que os valores de $\delta\ ^{13}C$ (-27.63‰) no controle apresentaram queda acentuada no final do período de déficit hídrico (-28.16‰). Esse decréscimo aponta aumento de $^{12}C$ ou empobrecimento de $^{13}C$ no óleo essencial (Tabela 3). No final da reidratação o $\delta\ ^{13}C$ do OE aumenta para -27.41‰ indicando enriquecimento em $^{13}C$.

Para avaliarmos as substâncias não voláteis presentes no óleo analisamos o $\delta\ ^{13}C$ do resíduo da extração (folha - óleo). No final do período de déficit hídrico o resíduo (folha - óleo) apresenta resposta contrária ao óleo essencial os valores do $\delta\ ^{13}C$ aumentam para -28.44‰ em relação ao controle (-28.97‰) indicando enriquecimento natural de $^{13}C$. No final do período de reidratação os valores de $\delta\ ^{13}C$ reduzem para -29.56‰ indicando empobrecimento de $^{13}C$.

Quando compararmos as respostas do $\delta\ ^{13}C$ das folhas e do OE nos três tratamentos podemos sugerir a ocorrência de alterações na alocação de $^{12}C$ nas folhas e no óleo essencial. Durante a deficiência hídrica ocorre empobrecimento de $^{12}C$ nas folhas e simultaneamente enriquecimento de $^{12}C$ no óleo essencial após a reidratação essa alocação se inverte. O mesmo padrão é observado nos componentes voláteis (OE) e não voláteis do OE (resíduo da extração do OE). No final do período de déficit hídrico houve enriquecimento natural de $^{12}C$ no OE e no resíduo (folha - óleo) houve empobrecimento de $^{12}C$. A partir dos resultados de $\delta\ ^{13}C$ sugerimos a ocorrência de translocação de $^{12}C$ entre as folhas e o OE durante a deficiência hídrica e após a reidratação.

A dinâmica de translocação de $^{12}C$ entre folhas e óleo essencial durante o déficit hídrico ocorreu em resposta às alterações do estado hídrico e atividades fotoquímicas da espécie. A diminuição de carboidratos de reserva indica a ocorrência de translocação de

carbono para órgãos vegetativos, nesse caso, para o sistema radicular. Tal fato foi o responsável pelas alterações na razão isotópica em diferentes partes da planta. Portanto, curtos períodos de déficit hídrico ocasionam alterações na razão isotópica de tecidos e compostos vegetais.

**Referências**

**Adiredjo AL, Navaud O, Lamaze T, Grieu P. 2014** Leaf carbon isotope discrimination as an accurate indicator of water-use efficiency in sunflower genotypes subjected to five stable soil water contents. *Journal of Agronomy and Crop Science* 1-9.

**Albacetea A, Martínez-Andújar C, Pérez-Alfocea F. 2014** Hormonal and metabolic regulation of source–sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability. *Biotechnology advances* **32**: 12-30.

**Albuquerque MPF, Moraes, FKC, Santos RIN, Castro GLS, Ramos EMLS, Pinheiro, HA 2013**. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno africano submetidas a déficit hídrico e reidratação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **48**: 9-16.

**Baker NR. 2008** Chlorophyll Fluorescence a Probe of Photosynthesis In Vivo Review of Plant Biology, *Annual Review of Plant Biology* **59**: 89-113.

**Barthel M, Hammerle A, Sturm P, Baur T, Gentsch L, Knohl A. 2011** The diel imprint of leaf metabolism on the $\delta^{13}C$ signal of soil respiration under control and drought conditions. *New Phytologist* **192**: 925-938.

**Bloom AJ, Chapin FS, Mooney HA. 1985** Resource limitation in plants – an economic analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 363–392.

**Campostrini E. 1998** *Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas*. UENF.

**Castro AAJF, Martins FR, Tamashiro JY, Sheperd GJ. 1999** How rich is the flora of Brazilian Cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden.* **86**: 192-224.

**Chaves, M.M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. 2009** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**: 551–560.

**Cordeiro YEM, Pinheiro HA, Santos-Filho BG, Corrêa SS, Dias-Filho MB. 2009** Physiological and morphological responses of young mahogany (*Swietenia macrophylla* King) plants to drought. *Forest Ecology and Management* **258**: 1449-1455

**Cordovilla MP, Bueno M, Aparicio C, Urrestarazu M. 2014** Effects of Salinity and the Interaction between *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* on Growth, Ethylene Production and Essential Oil Contents. *Journal of Plant Nutrition* **37**: 875-888.

**Correia MJ, Pereira JS, Chaves MM, Rodrigues ML, Pacheco CA. 1995** ABA xylem concentrations determine maximum daily leaf conductance of field-grown *Vitis vinifera* L. plants. *Plant Cell and Environment* **18**: 511–521.

**Dickman LT, Mcdowell NG, Sevanto S, Pangle RE, Pockman WT. 2014.** Carbohydrate dynamics and mortality in a piñon-juniper woodland under three future precipitation scenarios. *Plant, cell and environment*.

**Dubois M, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956** Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-355.

**Ducatti C. 2007** *Isótopos estáveis ambientais*, Botucatu, Instituto de Biociências, [apostila]

**Ebdon JS, Kopp KL. 2004** Relationships between water use efficiency, carbon isotope discrimination, and turf performance in genotypes of Kentucky bluegrass during drought. *Crop Science* **44**: 1754–1762

**Farquhar GD, Lloyd J. 1993** Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In: Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD. (eds) *Stable Isotopes and Plant Carbon – Water Relations*, Academic Press, San Diego, CA, USA. 47–70.

**Farquhar GD, Wong SC, Evans JR, Hubick KT. 1989** Photosynthesis and gas exchange. In: Jones HG, Flowers TJ, Jones MB (Eds.), *Plants Under Stress*.

**Garcia IS, Souza A, Barbedo CJ, Dietrich SMC, Figueiredo-Ribeiro RCL. 2006** Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biology* **66**: 739-745.

**Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochimica et Biophysica Acta* **990**: 87-92.

**Gilbert A, Robins RJ, Remaud GS, Tcherkez GG. 2012**. Intramolecular $^{13}C$ pattern in hexoses from autotrophic and heterotrophic $C_3$ plant tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 18204-18209.

**Gimenez C, Gallardo M, Thompson RB. 2005**. Plant–water relations. *Encyclopedia of Soils in the Environment* 231-238.

**Glaz B, Morris DR, Daroub SH. 2004**. Sugarcane photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance due to flooding and water table. *Crop Science* **44**: 1633-1641.

**Gottlieb OR, Magalhães MT. 1960** Modified distillation trap. *Chemist Analyst* 49-114.

**Grassi G, Magnani F. 2005.** Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment* **28**: 834 –849.

**Guo HX, Liu WQ, Shi YC. 2006** Effects of different nitrogen forms on photosynthetic rate and the chlorophyll fluorescence induction kinetics of flue-cured tobacco. *Photosynthetica* **44**: 140–142.

**Hsiao TC, Xu L. 2000** Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1595-1616.

**Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, Gibon Y. 2010** Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol* **154**: 357–372.

**Iacono F, Sommer KJ. 2000** Response of electron transport rate of water stress- affected grapevines: Influence of leaf age. *Vitis* **39**: 137-144.

**Kudoyarova GR, Kholodova VP, Veselov DS. 2013** Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. *Russian Journal of Plant Physiology* **60**: 165–175.

**Larsson KE, Nystrom B, Liljenberg C. 2006** A phosphatidylserine decarboxylase activity in root cells of oat (*Avena sativa*) is involved in altering membrane phospholipid composition during drought stress acclimation. *Plant Physiol Biochem,* **44**: 211–219.

**Leavitt SW, Wright WE. 2002** Spatial expression of ENSO, drought, and summer monsoon in seasonal d13C of ponderosa pine tree rings in southern Arizona and New Mexico. *Journal of Geophysical Research* **107**: 1–10.

**Maxwell K, Johnson GN. 2000** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659 – 668.

**Mccready RM, Guggolz J, Silviera V, Owens HS. 1950** Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. *Analytical Chemistry* **22**: 1156-1158.

**Mcdowell NG. 2011** Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiology* **155**: 1051–1059.

**Mcdowell N, Allen CD, Marshall L. 2010** Growth, carbon-isotope discrimination, and drought-associated mortality across a *Pinus ponderosa* elevational transect. *Global Change Biology* **16**: 399-415.

**Meijer HJG, Munnik T. 2003** Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**:265-306.

**Morris DL. 1948** Quantitative determination of carbohydrates with dray woods anthrone reagent. *Science* **107**: 254-255.

**Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y. 2011** Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1715–1729.

**Nate GM, Craig DA, Laura M. 2010** Growth, carbon-isotope discrimination, and drought-associated mortality across a *Pinus ponderosa* elevational transect. *Global Change Biology* **16**: 399–415.

**Newell EA, Mulkey SS, Wright SJ. 2002** Seasonal patterns of carbohydrate storage in four tropical tree species. *Oecologia* **131**: 333–342.

**Perlikowski D, Kosmala A, Rapacz M, Kościelniak J, Pawłowicz I, Zwierzykowski Z. 2014** Influence of short-term drought conditions and subsequent re-watering on the physiology and proteome of *Lolium multiflorum/Festuca arundinacea* introgression forms, with contrasting levels of tolerance to long-term drought. *Plant Biology* **16**: 385-394.

**Poggiani F. 1971** Estudo do crescimento e da atividade AIA-oxidásica em algumas espécies do cerrado. In: FERRI, M.G. *III Simpósio sobre o cerrado*. Ed. Edgar Blucher e EDUSP, São Paulo 201-211.

**Poggiani F, Simões IW, Mendes-Filho IMA. 1981** Utilização de espécies florestais de rápido crescimento na recuperação de áreas degradadas. Piracicaba ESALQ, Instituto

de Pesquisas e Estudos Florestais, Departamento de Silvicultura. *Série Técnica* **2**: 1-25. 1981.

**Pospisil P. 1997** Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants. *Photosynthetica*, **34**: 343-355.

**Poteet SA, Macdonnell FM. 2013** Water detection by "turn on" fluorescence of the quinone-containing complexes [Ru (phen) 2 (1, 10-phenanthroline-5, 6-dione) 2+] and [Ru (phenanthroline-5, 6-dione) 3] 2+.*Dalton Transactions* **42**: 13305-13307.

**Quick WP, Chaves MM, Wendler R, David M, Rodrigues ML, Passarinho JA, Pereira JS, Adcock MD, Leegood RC, Stitt M. 1992** The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell and Environment* **15**: 25–35.

**Raij B, Andrade JC, Cantarella H, Quaggio JA. 2001** *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais.* Campinas, Instituto Agronômico de Campinas 285.

**Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. 2004** Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* **161**: 1189–1202.

**Ritchie RJ. 2008** Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. *Photosynthesis Research* **96**: 201-215.

**Ronquim CC, Prado CHBDA, Paula NFD. 2003** Growth and photosynthetic capacity in two woody species of cerrado vegetation under different radiation availability. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **46**: 243-252.

**Ronquim CC, Prado CHBA, Souza JD. 2009** Growth, photosynthesis and leaf water potential in young plants of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae) under contrasting irradiances. *Brazilian Society of Plant Physiology* **21**: 197-208.

**Socias X, Correia MJ, Chaves M, Medrano H. 1997** The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *Journal of Experimental Botany* **48**:1281–1288.

**Steppe K, Niinemets Ü, Teskey RO. 2011** Tree size-and age-related changes in leaf physiology and their influence on carbon gain. In *Size-and age-related changes in tree structure and function*. Springer Netherlands. 235-253.

**Thameur A, Lachiheb B, Ferchichi A. 2012** Drought effect on growth, gas exchange and yield, in two strains of local barley Ardhaoui, under water deficit conditions in southern Tunisia. *Journal of Environmental Management* **113**: 495 – 500.

**Thornley JHM. 1998** Dynamic model of leaf photosynthesis with acclimation to light and nitrogen. Ann. Bot. **81**: 421-430.

**Veiga EB, Habermann G. 2013** Instantaneously measured traits may detect non-plastic ecophysiological performances in response to drought, explaining distributions of *Styrax* species in the Cerrado. *Trees* **27**: 1737- 1745.

**Voelker SL. 2011** Age-dependent changes in environmental influences on tree growth and their implications for forest responses to climate change. In *Size-and Age-Related Changes in Tree Structure and Function*, Springer Netherlands 455-479.

**Winter H, Huber SC. 2000** Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 253-289.

**Winter K, Demmig B. 1987** Reduction state of Q and nonradiative energy dissipation during photosynthesis in leaves of a crassulacean acid metabolism plant, *Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perr. *Plant physiology* **85**: 1000-1007.

**Woodruff DR, Meinzer FC. 2011** Water stress, shoot growth and storage of non-structural carbohydrates along a tree height gradient in a tall conifer. *Plant, cell & environment* **34**:1920-1930.

**Wu X, Bao W. 2011** Leaf growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in response to different water deficits in wheat cultivars. *Plant Production Science* 3: 254-259.

**Yemm EW, Willis AJ. 1954** The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, Colchester **57**: 508-514.

**Zhao LY, Deng XP, Shan L. 2007** Effects of altered water condition on some chlorophyll fluorescence parameters of flag leaves of winter wheat. *Chinese Journal of Eco-Agriculture* **15**: 63-66.

**Zrenner R, Stitt M. 1991** Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell and Environment* **14**: 939-346.

## 6. Considerações finais

No final do período de déficit hídrico os baixos valores de $\Psi_{H_2O solo}$ e a redução da porcentagem de água no solo indicaram a ocorrência de déficit hídrico. Os baixos valores de condutância estomática e aumento da diferença entre os $\Psi_{H_2O solo}$ Pd e $\Psi_{H_2O solo}$ Md indicam a manutenção do estado hídrico da planta em decorrência da deficiência hídrica. Possivelmente a deficiência hídrica afetou a permeabilidade das membranas celulares das folhas remodelando os lipídios e ativando os sinalizadores lipídicos. Tais respostas podem ter alterado a proporção isotópica $^{12}C/^{13}C$ dos lipídios das folhas ocasionando empobrecimento em $^{12}C$.

A taxa de assimilação e as características de fluorescência da clorofila *a* indicaram a ocorrência de fotoinibição e destruição do aparato fotossintético. A redução da atividade fotossintética afetou a produção de fotoassimilados prejudicando a produção de carboidratos não estruturais. Para suprir o déficit de carboidratos não estruturais substâncias de reserva das folhas como o amido foram degradadas e direcionadas para estruturas deficitárias da planta. O empobrecimento de $^{12}C$ nas folhas e enriquecimento de $^{12}C$ no OE pode indicar a translocação de $^{12}C$ na planta. O empobrecimento de $^{12}C$ no resíduo (folha -óleo) confirma a existência de maior proporção de $^{12}C$ no OE apoiando a hipótese da possível atuação do óleo como fonte durante o período de deficiência hídrica. A translocação não foi observada nas demais estruturas vegetativas possivelmente devido o período de exposição ao estresse.

No final do período da reidratação houve recuperação das características fisiológicas igualando-se aos valores do grupo controle. O $\delta\ ^{13}C$ das folhas apresentou enriquecimento em $^{12}C$ e o OE apresentou empobrecimento em $^{12}C$. A alteração da razão isotópica $^{12}C/^{13}C$ após a reidratação pode indicar a atuação das folhas como órgão fonte confirmando a ocorrência de translocação de $^{12}C$ observada no final do período de déficit hídrico.

A partir dos resultados obtidos podemos utilizar a técnica de $\delta\ ^{13}C$ como eficiente indicador de estresse hídrico. Pois com a utilização do $\delta\ ^{13}C$ foi possível observar a influência de curtos períodos de déficit hídrico na razão isotópica de órgãos vegetativos e compostos orgânicos da *C. langsdorffii*. Os resultados obtidos nesse experimento contribuirão para a realização de futuros trabalhos relacionados com os efeitos do déficit hídrico no particionamento de carbono em substâncias orgânicas de origem vegetal compostas predominantemente por $^{12}C$ ou $^{13}C$.