

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR



**Efeitos da intensidade de luz em variantes morfológicas de pau-brasil:
respostas anatômicas, fotossintéticas, bioquímicas
e moleculares em nível foliar**

TAINÃ FERNANDA OLIVEIRA ALVES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2014

TAINÃ FERNANDA OLIVEIRA ALVES

**Efeitos da intensidade de luz em variantes morfológicos de pau-brasil:
respostas anatômicas, fotossintéticas, bioquímicas
e moleculares em nível foliar**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2014

A474

Alves, Tainã Fernanda Oliveira.

Efeitos da intensidade de luz em variantes morfológicas de pau-brasil: respostas anatômicas, fotossintéticas, bioquímicas e moleculares em nível foliar / Tainã Fernanda Oliveira Alves. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

xvii, 85f. : Il.; Anexos.

Orientador: Aex-Alan Furtado de Almeida.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Pau-brasil. 2. Plantas – Efeito da luz. 3. Análise foliar. 4. Stress oxidativo. 5. Fluorescência.
I. Título.

CDD 583.749

TAINÃ FERNANDA OLIVEIRA ALVES

**Efeitos da intensidade de luz em variantes morfológicos de pau-brasil:
respostas anatômicas, fotossintéticas, bioquímicas
e moleculares em nível foliar**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida

APROVADA:

Dr. Rogério Ferreira Ribas
UFRB

Dr. Fábio Pinto Gomes
UESC

Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa
UESC

Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida
UESC - Orientador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dione e César, os grandes amores da minha vida. Obrigada por sempre estarem ao meu lado nas horas que chorei e sorri, nos meus momentos de lamentação e de alegria. Obrigada pelo amor, cuidado e confiança que sempre me dedicam, por me amparar e compreender. Por mais palavras que eu use, jamais serei capaz de expressar todo o meu amor e gratidão, amo vocês.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir concluir mais uma etapa em minha vida. Agradeço por ter colocado anjos em meu caminho, que me apoiaram em minhas angústias e tristezas, que me fizeram sorrir ou que simplesmente me deram um sorriso, sem os quais tudo teria sido mais difícil. Agradeço por ter me dado sabedoria, discernimento e equilíbrio.

À minha família pelo apoio e amor incondicional. Meus pais, Dione e César, motivos maiores de alegria, minhas irmãs (Thais e Tarcila), parte essencial de mim, por compreenderem os meus momentos de estresse e me fazerem sorrir, meu cunhado Thiago, além de tudo, amigo, irmão. Obrigada por me incentivarem, por não permitirem que eu desistisse e por acreditar em mim mesmo quando nem eu mesma acreditei. Amo muito vocês!

Ao Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida pela orientação, paciência, compreensão, por compartilhar os seus conhecimentos e me ensinar que somos eternos aprendizes.

Ao grupo da Fisiologia Vegetal (Márcia, Ivanildes, Romária, Joedson, Andressa, Gracielle, Tessio e Liliane) e em especial à Márcia e Ivanildes por estarem sempre dispostas a me auxiliar e dividir comigo os suas experiências.

Ao Dr. Carlos Priminho Pirovani e Dr. Ronan Xavier Corrêa por aceitarem me co-orientar e pela disposição e contribuição sempre que necessário.

À Dra. Delmira da Silva Costa pelo auxílio e suporte em minhas análises anatômicas.

À Pós-Doc Aurizângela Oliveira de Sousa e à Doutoranda Márcia Christina Branco, agradecimentos são poucos por tudo que fizeram por mim. Muito obrigada pelo auxílio mais que fundamental na conclusão deste trabalho, devo muito a colaboração, paciência e amizade de vocês.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Rogério Ferreira Ribas, Dr. Fábio Gomes Pinto e Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

O meu maior presente, uma grande amiga, com quem pude contar e compartilhar cada momento desse mestrado, Luana Pereira (marido). Amo você.

Aos amigos conquistados Diana, Dani Scotton, Milena Dória, Regina, Ana Camila, Horlei, os colegas da turma 2012.1, pessoas tão queridas que tornaram os meus dias, sem sombra de dúvidas, mais leves. Nossos momentos de trabalho e descontração na sala mais movimentada do CBG foram mais que divertidos.

Aos queridos do Centro de Microscopia Eletrônica pela companhia, amizade e paciência.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao colegiado de Genética, Fabrícia, Mara e Kátia, pela paciência e boa vontade em solucionar nossos problemas e ao Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa, por ser uma pessoa extremamente atenciosa e gentil, por se preocupar com as nossas aflições.

Ao Centro de Biotecnologia e Genética e de Microscopia Eletrônica pelo suporte ao meu trabalho.

Meus sinceros e emocionados agradecimentos, a todos que de algum modo ou em algum momento, seja com uma palavra, um abraço, uma oração, contribuíram para que mais esta etapa da minha vida fosse concluída.

ÍNDICE

EXTRATO	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.....	3
2.1.1. Características morfológicas de <i>C. echinata</i>	4
2.1.2. Estabelecimento e crescimento de <i>C. echinata</i>	9
2.2. Luz	10
2.2.1. Estresse por irradiância e plasticidade fenotípica	10
2.2.2. Luz e estresse oxidativo	12
2.2.3. Peroxidação lipídica	16
2.3. Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i>	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	20
3.2. Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i>	22
3.3. Anatomia foliar	22
3.4. Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	23
3.5. Metabolismo antioxidativo	23
3.5.1. Preparo do extrato bruto	23
3.5.2. Dismutase do superóxido (SOD)	24
3.5.3. Catalase (CAT)	24
3.5.4. Peroxidase do ascorbato (APX).....	25
3.5.5. Peroxidase do guaiacol (GPX).....	25
3.5.6. Oxidase do polifenol (PPO)	26
3.6. Peroxidação lipídica	26
3.7. Análise de expressão gênica por qPCR.....	27

3.7.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	27
3.7.2. qPCR	28
3.8. Análise estatística	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Radiação fotossinteticamente ativa.....	32
4.2. Plasticidade foliar	33
4.3. Curva OJIP.....	34
4.4. Anatomia foliar	37
4.5. Teste histoquímico com DAB-HCl.....	41
4.6. Peroxidação lipídica	43
4.7. Metabolismo antioxidativo	44
4.8. Transferibilidade de <i>primers</i> e avaliação da expressão gênica induzida pela luz	47
5. DISCUSSÃO	51
5.1. Fluorescência transiente	51
5.2. Plasticidade anatômica foliar	54
5.3. Peróxido de hidrogênio	55
5.4. Peroxidação lipídica	56
5.5. Metabolismo antioxidativo	57
5.6. Transferibilidade de <i>primers</i>	59
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO	84

EXTRATO

ALVES, Tainã Fernanda Oliveira, MSc, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, fevereiro de 2014. **Efeitos da intensidade de luz em variantes morfológicas de pau-brasil: respostas anatômicas, fotossintéticas, bioquímicas e moleculares em nível foliar.** Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-orientadores: Carlos Priminho Pirovani e Ronan Xavier Corrêa.

Caesalpinia echinata Lam., espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, de importância cultural e histórica, ameaçada de extinção, devido a intensa exploração desde o período do descobrimento do Brasil, exibe grande variedade intermorfológica, apresentando três variantes - identificados como pequeno (VP), médio (VM) e grande (VG), sendo este último endêmico do sul da Bahia. A radiação luminosa é um dos fatores ambientais que mais influencia o crescimento e a distribuição das espécies vegetais em diversos ecossistemas. As respostas das plantas a diferentes intensidades de luz são diversas, podendo levar a alterações em todos os níveis funcionais. No presente trabalho, avaliaram-se as respostas morfológicas, fotossintéticas, bioquímicas e moleculares de três variantes morfológicas de *C. echinata* (VP, VM e VG) sob diferentes níveis de luz, a fim de subsidiar, futuramente, projetos de recomposição destes variantes em diferentes ecossistemas, antropizados ou não, do bioma Mata Atlântica, a exemplo de clareiras, fragmentação de matas e em condições de sub-bosque. Plantas dos três variantes, com dois anos de idade, foram submetidas a 15, 25, 35, 60 e 100% de luz por um período de 10 meses. As variações nos níveis de luz promoveram mudanças na cinética de emissão da fluorescência transiente de clorofila e alterou a morfológica foliar de VP, VM e VG. Evidenciou-se, a partir de teste histoquímico, acúmulo de H₂O₂ em nível foliar, com o incremento da intensidade de luz, principalmente para VP e VG. Por outro lado, verificou-se também atividade diferencial para enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX), envolvidas no metabolismo antioxidativo, e para a enzima oxidase do polifenol (PPO) associada à morte celular programada. VP e VG apresentaram maior atividade de SOD em 25 e 35% de luz, respectivamente. Dentre as enzimas que utilizam H₂O₂ como substrato, APX apresentou maior atividade, principalmente para VP em 25% e 35% de luz. Por outro lado, para PPO, observou-se um aumento de atividade com o incremento dos níveis de luz para VG, ao passo que para VP as maiores atividades se verificaram em 25 e 60% de luz; e para VM se manteve

relativamente constante. Evidenciou-se também um aumento na peroxidação lipídica de membranas celulares, com o incremento dos níveis de luz, principalmente para VM, enquanto que para VG o maior aumento se verificou em 60% de luz. As análises de qPCR demonstraram maior expressão do gene *psbA* para VM e dos genes *tiorredoxina* e *corismato* para VG no nível de 60% de luz. Em suma, com a variação da intensidade de luz, os variantes morfológicos de *C. echinata* ajustaram seu aparato fotossintético, no sentido de maximizar os ganhos de energia, por meio de plasticidade fenotípica, promovendo mudanças no metabolismo antioxidativo, na expressão gênica, cinética de emissão de fluorescência da clorofila e morfologia em nível foliar. Verificou-se que VG se aclimatou melhor nos maiores níveis de luz, ao passo que os VP e VM se aclimataram nos ambientes mais sombreados. Logo, plantas VG apresentam potencialidades para serem utilizadas na recomposição de ecossistemas antropizados, como clareiras e fragmentação de matas; ao passo que as plantas de VP e VM podem ser usadas na recomposição do bioma Mata Atlântica, em condições de sub-bosque.

Palavras-chave: Análise qPCR, *Caesalpinia echinata*, estresse oxidativo, fluorescência transiente, irradiância, metabolismo antioxidativo, plasticidade fenotípica.

ABSTRACT

ALVES, Tainã Fernanda Oliveira, MSc, State University of Santa Cruz , Ilhéus, BA, February 2014. **Effects of light intensity on morphological variants of brazilwood: anatomical, photosynthetic, biochemical and molecular responses in leaf level.** Advisor: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-advisors: Carlos Priminho Pirovani e Ronan Xavier Corrêa.

Caesalpinia echinata Lam, a native tree species of the Atlantic Forest, cultural and historical importance, endangered, due to intense exploitation since the period of the discovery of Brazil, intermorphotopic displays great variety and have three variants - identified as small (VP), medium (VM) and large (VG), being the latter endemic to southern Bahia. The light radiation is one of the environmental factors that influence the growth and distribution of plant species in different ecosystems. The responses of plants to different light intensities are diverse and may lead to changes in all functional levels. In this study, we assessed the morphological, photosynthetic, biochemical and molecular responses of three morphological variants of *C. echinata* (VP, VM and VG) under different light levels, in order to aid in future restoration projects of these variants in different ecosystems, anthropogenic or not, the Atlantic Rain Forest biome, like gaps, fragmentation of forests and conditions understory. Plants of the three variants, two years old, were submitted to 15, 25, 35, 60 and 100% light for a period of 10 months. The variations in light levels made changes in the emission kinetics of chlorophyll fluorescence and altered leaf morphology of VP, VM and VG. It was evident from histochemical test, accumulation of H₂O₂ in the leaf level, with increasing light intensity, especially for VP and VG. Moreover, it was also found differential activity for superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX), involved in antioxidant metabolism, and the polyphenol oxidase (PPO), associated with programmed cell death. VP and VG showed higher SOD activity by 25 and 35% light, respectively. Among the enzymes that utilize H₂O₂ as substrate showed higher APX activity, especially for VP in 25% and 35% light. On the other hand, for PPO, there was an increase in activity with increasing levels of light to VG, while for VP the highest activities were observed in 25 and 60% light; and for VM remained relatively constant. Also evidenced an increment of lipid peroxidation in cell membranes with increasing of the light levels, particularly to VM, while for VG the greatest increase was at 60% of light. The qPCR analysis demonstrated increased expression of the *psbA* gene for VM and *thioredoxin* genes and *chorismate* to VG at level of 60% of

light. In summer, with the variation of light intensity, the morphological variants of *C. echinata* adjusted their photosynthetic apparatus, in order to maximize energy gains through phenotypic plasticity, promoting changes in antioxidant metabolism, gene expression, kinetics of fluorescence emission of chlorophyll and morphology in leaf level. VG was better acclimatized to higher levels of light, while VM and VP acclimated better in the shadowed environments. Therefore, VG plants have the potential for use in the restoration of anthropogenic ecosystems, such as slash and fragmentation of forests, while the plants of VP and VM can be used in the restoration of the Atlantic Rain Forest biome in conditions of understory.

Keywords: Antioxidant metabolism, *Caesalpinia echinata*, irradiance, transient fluorescence, oxidative stress, phenotypic plasticity, qPCR analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Detalhes da árvore e do tronco de *C. echinata*. A - caule de um indivíduo adulto com ausência de acúleos. B - presença de acúleos nos caules jovens. C - interior do tronco evidenciando o cerne (parte mais interna e escura) e o alborno (parte mais externa e clara).....6
- Figura 2 - A – folhas. B - ramo com inflorescência. C - flor de *C. echinata*.6
- Figura 3 - A - Fruto de *C. echinata* em estágio imaturo. B - Sementes de *C. echinata*.6
- Figura 4 - Morfologia foliar dos variantes morfológicos de *C. echinata*: A - variante grande (VG); B - variante médio (VM); e C - variante pequeno (VP).7
- Figura 5 - Áreas de concentração de *C. echinata* no Brasil (■) Variante pequeno, (■) Variante médio e (■) Variante grande . Fonte: LOBÃO (2007), com modificações. ...8
- Figura 6 - Equilíbrio entre metabolismo antioxidativo (AOX) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (GILL; TUTEJA, 2010). 13
- Figura 7 - Espécies reativas de oxigênio (ROS) e mecanismos de defesa antioxidativos (GILL; TUTEJA, 2010). 15
- Figura 8 - Relação dos processos fotossintéticos com a curva de indução da fluorescência da clorofila a (OJIP) (adaptada STRASSER et al., 2004). 18
- Figura 9 - Visão geral do experimento. Plantas de *C. echinata* submetidas a diferentes níveis de luz. A – a pleno sol; B – a 15% de luz; C – a 25% de luz; D – a 35% de luz; e E – a 60% de luz.....21
- Figura 10 - Gel de agarose de RNA de variantes morfológicos de *C. echinata* submetidas aos níveis de 15, 60 e 100% de luz.27

Figura 11 - Plasticidade fenotípica foliar de variantes morfológicas de <i>C. echinata</i> pequeno (VP), médio (VM) e grande (VG), submetidos a diferentes níveis de luz (15, 25, 35, 60 e 100%).	33
Figura 12 - Transiente da fluorescência da clorofila a para os variantes morfológicos de <i>C. echinata</i> , (A) - pequeno (VP), (B) – médio (VM) e (C) – grande (VG), crescidos nos ambientes de 15 (■), 25 (■), 35 (■), 60 (■) e 100% (■) de luz. (n=6).	35
Figura 13 - Fotomicrografia de secções transversais de folhas de <i>C. echinata</i> submetidas a diferentes níveis de luz. Barra = 50 µm.	38
Figura 14 - Espessura da epiderme nas faces adaxial (A) e abaxial (B) em folhas de três variantes de <i>C. echinata</i> submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).	39
Figura 15 - Espessura dos parênquimas paliçádico (A) e lacunoso (B) em folhas de três variantes de <i>C. echinata</i> submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).	40
Figura 16 - Espessura do mesofilo em folhas de três variantes de <i>C. echinata</i> submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).	41
Figura 17 - Atividade de TBARS em folhas de plantas de <i>C. echinata</i> submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o	

mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), ($n=6$).

.....43

Figura 18 - Atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) em folhas de plantas de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), ($n=6$).....45

Figura 19 - Atividade das enzimas catalase (CAT) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e peroxidase do guaiacol (GPX) (C) em folhas de plantas de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), ($n=6$).

.....46

Figura 20 - Atividade da enzima oxidase do polifenol (PPO) em folhas de plantas de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), ($n=6$).....47

Figura 21 - Amplificação e curva de dissociação dos genes (A) *psbA* e (B) *Gapdh* de *Theobroma cacao* e (C) *Tiorredoxina* e (D) *Corismato* de *Eucalyptus grandis*.49

Figura 22 - Expressão relativa dos genes *psbA* de *T. cacao* (A) e dos genes *Tiorredoxina* (B) e *Corismato* de *E. grandis* (C) em folhas maduras de três variantes morfológicas de *C. echinata* [(■) = Variante pequeno (VP); (■) = Variante médio (VM); (■) = Variante grande (VG)] submetidos a três níveis de luz (15, 60 e 100%).

.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise físico-química do solo utilizado no experimento.	21
Tabela 2 - Primers gene-específicos utilizados nas análises de expressão gênica por qPCR para <i>C. echinata</i>	29
Tabela 3 - Radiação fotossinteticamente ativa (RAF). Valores médios, máximos e mínimos, e porcentagem em relação ao pleno sol, para os diferentes ambientes de sombreamento. Dados coletados em Ilhéus, BA, Brasil, entre agosto de 2011 e abril 2012.	32
Tabela 4 - Fluorescências inicial (Fo), máxima (Fm) e variável (Fv) e razão Fv/Fm de três variantes morfológicas de <i>C. echinata</i> , pequeno (VP), médio (VM) e grande (VG), submetidos a diferentes níveis de luz.	36
Tabela 5 - Discos foliares coletados de folíolos de pinas da região mediana de folhas de diferentes variantes morfológicas [variante pequeno (VP), variante médio (VM) e variante pequeno (VP)] de <i>C. echinata</i> , demonstrando dano oxidativo detectado pelo acúmulo H ₂ O ₂ (cor marrom) pelo uso de DAB-HCl.	42

1. INTRODUÇÃO

Caesalpinia echinata Lam., popularmente denominada pau-brasil, é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, de importância histórica e cultural para o país, que se encontra em risco de extinção (IBAMA, 2008), devido a intensa exploração desde o período colonial, em função da qualidade da madeira e da extração da brasilina, corante utilizado, principalmente, na indústria têxtil (LEWIS, 1998; ROCHA, 2004; GARCIA et al., 2006). Atualmente, sua madeira é utilizada, especialmente, na fabricação de arcos de instrumentos de corda (ANGYALOSSY et al., 2005). Ocorre, naturalmente, desde o estado do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro (LEWIS, 1998). Esta espécie apresenta três variantes morfológicas identificados como pau-brasil (i) variante pequeno (VP); (ii) médio (VM); e (iii) grande (VG), nomenclatura baseada no tamanho dos seus folíolos (JUCHUM et al., 2008).

A luz solar é a fonte de energia indispensável para a fotossíntese, contudo, níveis altos ou baixos de luz podem causar danos às plantas, influenciando no seu crescimento e desenvolvimento (LAMBERS et al., 1998; VALLADARES; NIINEMETS, 2008; LI et al., 2009). Diferenças na morfologia, anatomia e fisiologia da folha têm sido documentadas para espécies adaptadas a ambientes sombreados ou a pleno sol (BOARDMAN, 1977; BJÖRKMAN, 1981; GIVNISH, 1988). Diversos atributos morfofisiológicos podem estar associados à aclimação em irradiâncias elevadas, como (i) o aumento na densidade estomática (CAI et al., 2005); (ii) as mudanças na fotossíntese e na respiração (GIVNISH, 1988; CHAZDON et al., 1996); (iii) as mudanças nos padrões de crescimento ou de alocação de biomassa (POPMA; BONGERS, 1991; POORTER et al., 2003); (iv) a diminuição da área foliar específica; (v) a presença de cutícula mais espessa (VOLTAN et al., 1992; FAHL et al., 1994), com maior quantidade de cera epicuticular (AKUNDA et al., 1979); (vi) os cloroplastos com pouca grana e menor quantidade de tilacóides por granum (FAHL et al., 1994); (vii) os aumentos na concentração e atividade da Rubisco (KANECHI et al., 1996; RAMALHO et al., 1999); (viii) e a recuperação relativamente rápida da fotoinibição (DA MATTA; MAESTRI, 1997). As mudanças estruturais da folha podem

também ser adaptáveis, por exemplo, a uma inativação do centro de reação do fotossistema 2 (ÖQUIST et al., 1992). As alterações na fisiologia da folha já existentes e a produção de novas folhas com morfologia e fisiologia apropriadas ao ambiente de luz são componentes de resposta à aclimatação (WYKA et al., 2007).

As plantas, quando submetidas a condições estressantes, intensificam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais, em excesso, são altamente tóxicas e resultam em estresse oxidativo (RIZHSKY et al., 2002). Sob condições estáveis, as moléculas de ROS são eliminadas por vários mecanismos de defesa antioxidativos. Esses mecanismos de proteção podem ser enzimáticos, envolvendo a dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX), catalase (CAT), dentre outras enzimas (FOYER; NOCTOR, 2005; DOUPIS et al., 2013), e não-enzimáticos, em processos de oxidorredução, envolvendo ácido ascórbico (vitamina C), glutatona, prolina, α -tocoferol (vitamina E), e flavonoides (MITTLER *et al.*, 2004), que vão agir para controlar as cascatas de oxidação descontroladas e proteger as plantas contra os danos oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010).

Devido às poucas e contraditórias informações a respeito da aclimatação do pau-brasil a estresses abióticos, estudos sobre as respostas desta espécie a variação da intensidade de luz é de fundamental interesse devido a sua variação morfológica e importância como espécie pertencente a vários ecossistemas da floresta Atlântica.

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar as respostas morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares de três variantes morfológicas de pau-brasil submetidos à diferentes níveis de luz, por meio de medições da emissão de fluorescência da clorofila *a*, da atividade de enzimas envolvidas do metabolismo antioxidativo, da peroxidação lipídica, do acúmulo de peróxido de hidrogênio e de alterações anatômicas em nível foliar; afim de subsidiar, futuramente, projetos de recomposição destes morfotipos em diferentes ecossistemas, antropizados ou não, do bioma Mata Atlântica, a exemplo de clareiras, fragmentação de matas e em condições de sub-bosque.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Caesalpinia echinata* Lam.

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), espécie símbolo do Brasil, foi descrito em 1789 pelo naturalista francês Jean Baptiste Lamarck (1744 a 1829), que estudou e descreveu a espécie cientificamente, denominando-a por *Caesalpinia echinata*. O nome do gênero *Caesalpinia* foi dado em homenagem ao botânico e médico Andreas Caesalpinus, que viveu entre 1519 a 1603, e o nome específico *echinata* por ser uma árvore que possui acúleos, semelhantes aos encontrados nos troncos e galhos de roseiras (CARVALHO, 2003).

Antes do descobrimento do Brasil, o pau-brasil era explorado pelos índios para a fabricação de armas e obtenção de lenha (CARDOSO et al., 2001; BARBEDO et al., 2002). Após o descobrimento, por se tratar de uma região muito rica em recursos naturais, principalmente em pau-brasil, o interesse da coroa portuguesa voltou-se imediatamente à sua exploração econômica (LOBÃO, 2007). Logo, tornou-se a primeira grande riqueza explorada, procurada e disputada por várias nações (CASTRO, 2002), em decorrência do corante vermelho brasilina que servia para tingir tecidos, pintar ovos de páscoa e era utilizado como base para cosméticos, como o “rouge”. Além disso, devido a alta qualidade de sua madeira, foi empregada também em construções, fabricação de móveis de luxo e, atualmente, na fabricação de arcos para instrumentos de corda (ANGYALOSSY et al., 2005).

A espécie *C. echinata* é encontrada principalmente em regiões semiáridas, típico de floresta primária densa, sendo raro nas formações secundárias e próximos do litoral (CARVALHO, 2003). Ocorre, naturalmente, desde o estado do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro (LEWIS, 1998). Na região sul da Bahia, *C. echinata* pode ser encontrada em condições de ‘*Cabruca*’, um sistema agroecológico de cultivo onde o *Theobroma cacao* é cultivado na floresta atlântica raleada, sob sombra de

espécies arbóreas de grande porte, responsável pela manutenção dos maiores e bem mais distribuídos remanescentes de pau-brasil (LOBÃO et al., 2007).

No início do século XVII, o pau-brasil foi quase erradicado de suas áreas naturais devido a intensa exploração (LOBÃO et al., 1997; BARBEDO et al., 2002; CASTRO, 2002). Atualmente, *C. echinata* se encontra na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008). Segundo Carvalho (2003), ainda restam, na área de ocorrência natural, pequenos fragmentos da espécie, que persistem em alguns pontos da Bahia, como na Reserva Ecológica do pau-brasil, em Porto Seguro, e no Planalto da Conquista, BA; em Pernambuco e no Rio de Janeiro. (CARVALHO, 2003).

2.1.1. Características morfológicas de *C. echinata*

C. echinata é uma planta lenhosa nativa da Mata Atlântica brasileira, pertencente a família das leguminosas, subfamília Caesalpinioideae, semidecídua, podendo alcançar até 30 m de altura em seu habitat natural e de 80 cm a 1m de diâmetro em indivíduos adultos (FONTES, 1995) (Figura 1 A). Possui tronco reto com casca cor cinza escura, coberta por acúleos (Figura 1 B), o que originou o epíteto específico, *echinus* especialmente nos ramos mais jovens. No interior do tronco, na parte mais interna encontra-se o cerne (Figura 1 C) – parte mais valiosa, é a fonte do corante brasilina – que na planta adulta varia sua tonalidade de castanho-alaranjado ao vermelho-escuro. Mais externamente, encontra-se o alburno, parte mais clara e menos densa do lenho (LIMA et al., 2002). Quando jovem, o alburno (Figura 1 C) é espesso e apresenta coloração branco-amarelada, diminuindo com a idade, cedendo lugar ao cerne (Figura 1 C), que é de cor vermelha intensa, mais resistente à umidade. As folhas (Figura 2 A) são compostas e alternadas e, na grande maioria, bipinadas, apresentam coloração verde-escura e brilhante, são ovais e subdivididas em pinas e estas em folíolos (LEWIS, 1998). Suas flores são hermafroditas e pentâmeras (Figura 2 B) aromáticas, de coloração amarela ouro com a pétala mediana destacando-se pela presença de uma mancha central vermelho-escuro (FONTES, 1995; LEWIS, 1998; LIMA et al., 2002) formando um cacho cônico

(CARVALHO, 2003). Os frutos são em forma de vagem de coloração verde (Figura 3 A), quando imaturos e de cor marrom (Figura 3 B), quando maduros e as sementes (Figura 3 C) são castanhas e achatadas e apresentam dispersão autocórica, ou seja, a dispersão da semente ocorre por explosão espontânea do fruto (AGUIAR et al., 2005).



Figura 1 - Detalhes da árvore e do tronco de *C. echinata*. A - caule de um indivíduo adulto com ausência de acúleos. B - presença de acúleos nos caules jovens. C - interior do tronco evidenciando o cerne (parte mais interna e escura) e o alburno (parte mais externa e clara).



Figura 2 - A – folhas. B - ramo com inflorescência. C - flor de *C. echinata*.



Figura 3 - A - Fruto de *C. echinata* em estágio imaturo. B - Sementes de *C. echinata*.

De acordo com Lewis (1998), *C. echinata* não apresenta táxons infraespecíficos, embora muitas populações mostrem diferenças marcantes no tamanho e na forma dos folíolos, na cor da madeira e no hábito de crescimento. Esta espécie possui três

variantes morfológicas (Figura 4) popularmente denominados folha-de-café, folha-de-laranja e folha-de-arruda, porém, ainda não classificados botanicamente. Portanto, passaremos a identificá-los como pau-brasil variante pequeno (VP), médio (VM) e grande (VG), baseados no tamanho do folíolo, de acordo com Juchum et al. (2008).



Figura 4 - Morfologia foliar dos variantes morfológicos de *C. echinata*: A - variante grande (VG); B - variante médio (VM); e C - variante pequeno (VP).

O variante morfológico VP é popularmente o mais conhecido, encontrado com maior frequência e possui maior distribuição geográfica (Figura 5). Tem como característica folhas pequenas, alternas, compostas bipinadas, com área média de 1,20 cm², constituída normalmente de 7 a 11 pinas e de 9 a 22 folíolos e cerne de cor alaranjada (CURVELO et al., 2008). Segundo estes autores, o variante morfológico VM, mais comumente encontrado nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia (Figura 5) (ANGYALOSSY et al., 2005), possui folha de tamanho médio, com área de 9 cm², constituída de 3 a 6 pinas e de 7 a 12 folíolos e com cerne de coloração laranja avermelhado. Por outro lado, o variante VG, é um variante endêmico da Bahia (Figura 5), de ocorrência em área restrita na região cacauera, no sudeste do estado, possui folha grande com área foliar média de 73 cm², 2 a 4 pinas e 4 a 6 folíolos e cerne vermelho escuro. Isoladamente, esta árvore

atinge a altura de 8 a 12 m. Na mata pode alcançar o dossel florestal com até 30 m (CURVELO et al., 2008).

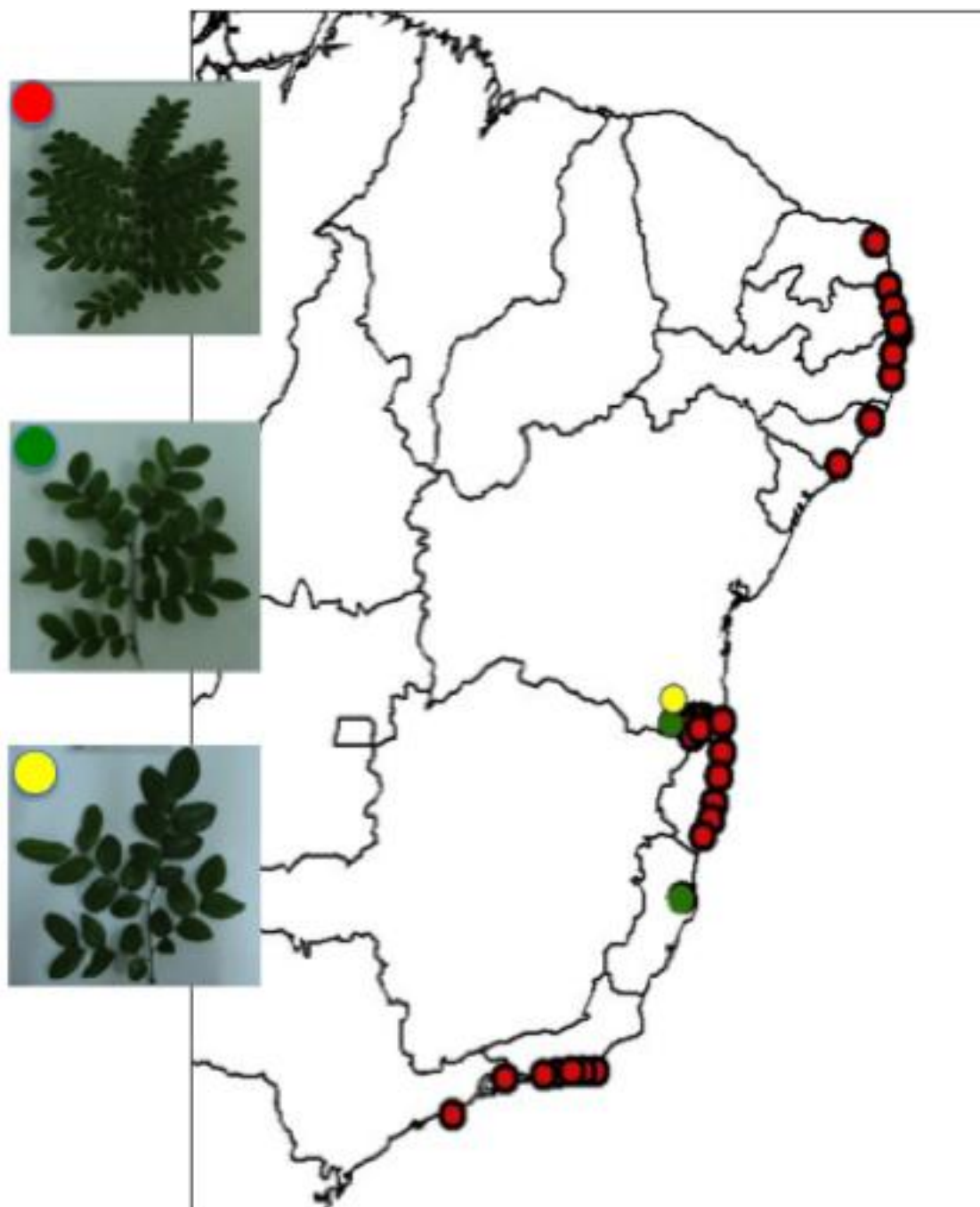


Figura 5 - Áreas de concentração de *C. echinata* no Brasil (■) Variante pequeno, (■) Variante médio e (■) Variante grande . Fonte: LOBÃO (2007), com modificações.

2.1.2. Estabelecimento e crescimento de *C. echinata*

Informações a respeito do comportamento ecofisiológico do pau-brasil são bastante contraditórias. É classificada como uma espécie de floresta pluvial e semidecídua, (LIMA, 1992; LORENZI, 2002). Para Budowski (1965), *C. echinata* Lam. é uma espécie semi-heliófila, classificada como clímax, e Baroni (2005) a classificam como heliófila. Rocha (2004) concluiu que a espécie tem grande capacidade de adaptação em áreas abertas e de clima seco.

Há indicações que a espécie possa ser um exemplo de arbórea que necessite de um sombreamento moderado na fase juvenil, e que seu desenvolvimento é completado quando ocorre a formação de clareiras (CARVALHO, 1994). Aguiar et al. (2005) constaram que a espécie se desenvolve melhor com a redução do sombreamento, de intenso para moderado. O pau-brasil também é considerado uma espécie de meia sombra, bastante resistente a extremos de luz e que, ao menos quando jovem, apresenta grande plasticidade fenotípica em resposta à variação na intensidade de luz (ZAIDAN et al., 2008).

Há um consenso de que disponibilidade de luz é um importante fator ambiental para o estabelecimento de florestas (SOUZA; VÁLIO, 2003; DUZ et al., 2004; GONÇALVES et al., 2005a). A luz influencia diretamente o crescimento e o porte de *C. echinata*. Em condições naturais, competindo por luz, a espécie apresenta crescimento lento, com caule retilíneo e diâmetro reduzido. Por conseguinte, se não há competição por luz, há formação mais rápida da copa, seguida de um maior diâmetro do caule e um aumento no número de ramificações (LIMA et al., 2002; JUCHUM, 2008). Além disso, apresenta crescimento lento e irregular, brotação após o corte (RIZZINI, 1971; CARVALHO, 2003).

Atualmente, há um grande interesse em relação à conservação e repovoamento desta espécie, seja por motivo histórico ou cultural. Na estratégia de conservação de *C. echinata*, é importante dispor de informações sobre a estrutura genética populacional dos remanescentes protegidos, especialmente quanto à diversidade genética, pois atualmente, as poucas reservas existentes são áreas limitadas e com pequeno número de indivíduos. Uma possível forma de conservação desta espécie

seria o seu uso em ambientes urbanos para fins de arborização e paisagismo, tendo em vista seu potencial ornamental (LIMA et al.,2002; ROCHA 2004).

2.2. Luz

A luz é um dos fatores abióticos que mais influencia o crescimento e a distribuição das espécies vegetais em diversos ecossistemas (VALLADARES; NIINEMETS, 2008) e constitui um recurso inevitável para a fotossíntese (LI et al., 2009). A disponibilidade de luz é altamente variável em todos os ambientes naturais, e mudanças rápidas na intensidade de luz podem ocorrer em condições de sub-bosque (*sunflex*), onde as espécies devem ser capazes de lidar com a heterogeneidade para este fator ambiental (VALLADARES, NIINEMETS, 2008). Tanto a quantidade como a qualidade da luz regulam a atividade e a composição do maquinário fotossintético (BALDI et al., 2012).

2.2.1. Estresse por irradiância e plasticidade fenotípica

As plantas estão constantemente submetidas a condições estressantes. Esse estresse pode ser causado por diversos fatores, bióticos ou abióticos, que exercem influência desvantajosa sobre as plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013). O estresse é considerado como um desvio significativo das condições ótimas que podem causar mudanças em todos os níveis funcionais do organismo, os quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes (LARCHER, 2000). Pode ser causado tanto pela falta quanto pelo excesso de um fator estressor e vai depender principalmente da sua intensidade e duração.

Por serem organismos sésseis, as plantas são mais susceptíveis a diferentes estresses ambientais. Como forma de aclimação, as plantas desenvolvem mecanismos de resposta ao estresse (RAO et al., 2006), que dependem da severidade e duração, e da interação entre os fatores ambientais, bem como do

órgão e tecido afetado e da espécie, genótipo ou variedade submetida à condição estressante.

Dentre os fatores abióticos que afetam as plantas, a radiação luminosa, que embora seja a fonte de energia para a fotossíntese, em condições de alta ou baixa intensidade, pode limitar o crescimento e o desenvolvimento da planta (VALLADARES; NIINEMETS, 2008). As plantas, crescendo em um ambiente heterogêneo, apresentam uma grande capacidade de exibir respostas variáveis a uma condição específica de luz, por meio da aclimação e mais amplamente por plasticidade fenotípica (VALLADARES; NIINEMETS, 2008; BARROS et al., 2010; EGEE et al., 2012).

Plasticidade fenotípica pode ser definida como a capacidade de um determinado genótipo em formar fenótipos alternativos em diferentes condições ambientais (SULTAN, 2003; GONZÁLEZ; GIANOLI, 2004). Esta plasticidade difere entre espécies, características e tipo de fator ambiental considerado (VALLADARES et al., 2007) e, em resposta à diferentes níveis de luz, promove alterações que podem ocorrer em nível fisiológico, morfológico, anatômico, ultraestrutural, histológico e bioquímico. Dependendo da luz ambiente, as plantas podem se diferenciar em plantas de sol e de sombra (VOLTAN et al., 1992). Diferenças na morfologia, anatomia e fisiologia da folha têm sido documentadas para espécies adaptadas a ambientes sombreados ou a pleno sol (BOARDMAN, 1977; BJÖRKMAN, 1981; GIVNISH, 1988).

Em nível foliar, a aclimação pode ser expressa via morfoanatômica e ajustes fisiológicos, de modo que as plantas diferenciem folhas de sol e de sombra (MATOS et al 2009). As folhas de sol são geralmente mais espessas (devido ao alongamento e, ou adição de células do parênquima paliçádico) e com menor área foliar, com um maior parênquima paliçádico e aumento na densidade estomática (CAI et al., 2005), a presença de cutícula mais espessa (VOLTAN et al., 1992; FAHL et al., 1994; BOEGER et al., 2009; MATOS et al., 2009), com maior quantidade de cera epicuticular (AKUNDA et al., 1979), maior concentração de nitrogênio por área foliar e mudanças nas taxas de fotossíntese e respiração (GIVNISH, 1988, CHAZDON et al., 1996); e há mudanças nos padrões de crescimento ou de alocação de biomassa

(POPMA; BONGERS, 1991; POORTER et al., 2003). Além disso, se apresentam com cloroplastos com poucos *grana* e menor quantidade de tilacóides por *granum* (FAHL et al., 1994), com aumento na concentração e atividade da Rubisco (KANECHI et al., 1996; RAMALHO et al., 1999); com menor teor de clorofila por unidade de massa foliar e teores reduzidos de clorofila b, maiores taxas de respiração no escuro e luz saturante da fotossíntese, aumento de pigmentos fotoprotetores, bem como a diminuição da suscetibilidade à fotoinibição da fotossíntese (MATOS et al., 2009).

Já nas folhas expostas a baixas intensidades de radiação luminosa, pode ocorrer aumento significativo de células coletoras de luz, há um incremento de área foliar, redução da espessura, com menor razão entre os parênquimas paliçádico e lacunoso; bem como redução da massa foliar específica (VOLTAN, et al., 1992). Além disso, ocorre um aumento na síntese de pigmentos fotossintéticos acessórios, como a clorofila b e os carotenóides, intensificando a capacidade de absorção de luz no ambiente sombreado, em comprimentos de onda diferentes daqueles absorvidos pela clorofila a (TAIZ; ZEIGER, 2013). Tais alterações otimizam a sobrevivência dos vegetais e proporcionam uma captação mais eficiente da radiação solar, contribuindo assim para uma melhor absorção da luz disponível e aumentando a eficiência fotossintética da planta (PEARCY, 2000; VALLADARES; NIINEMETS, 2008).

2.2.2. Luz e estresse oxidativo

Mudanças nos níveis de radiação luminosa levam a diversas alterações no metabolismo geral das plantas, principalmente nas atividades fotossintéticas bem como em sua atividade respiratória (FOYER; NOCTOR, 2005). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são formas reduzidas do oxigênio molecular, altamente reativas e tóxicas quando em excesso nas células vegetais (SÁNCHEZ-PARDO et al., 2012). Um aumento repentino dos níveis intracelulares de ROS podem causar danos às células, afetando suas funções por danificar os ácidos nucléicos, promover oxidação

de proteínas e causar peroxidação lipídica, bem como iniciar respostas como a expressão de novos genes (GILL; TUTEJA, 2010).

Estima-se que cerca de 1 a 2% do consumo de O_2 provoca a formação de ROS em tecidos vegetais (BHATTACHARJEE, 2005). Assim, quando o equilíbrio entre a síntese e a remoção de ROS (Figura 6) são rompidos, ocasiona-se uma condição de estresse oxidativo (SCANDALIOS, 2005). Em situações normais, o equilíbrio redox celular é mantido pela ação de mecanismos de defesa antioxidantes que evoluíram para remover as ROS (BHATTACHARJEE, 2005; GILL, TUTEJA, 2010).

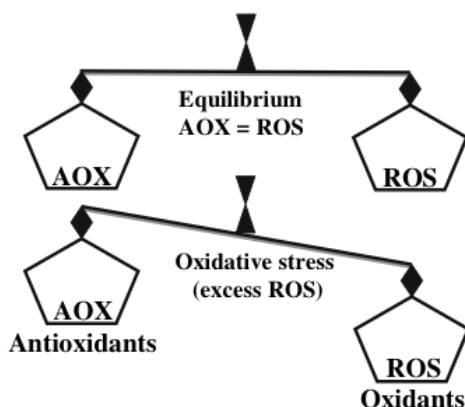


Figura 6 - Equilíbrio entre metabolismo antioxidativo (AOX) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (GILL; TUTEJA, 2010).

ROS compreendem tanto radicais livres ($O_2^{\cdot-}$, radicais superóxido; OH^{\cdot} , radical hidroxila; HO_2^{\cdot} , radical peridroxil; e RO^{\cdot} , radicais alcoxi) e formas não radicais ou moleculares (H_2O_2 , peróxido de hidrogênio e 1O_2 , oxigênio singleto) (SCANDALIOS, 2005; ASADA, 2006; GILL; TUTEJA, 2010; SÁNCHEZ-PARDO et al., 2012) que são altamente reativas, e, na ausência de um mecanismo de proteção, podem perturbar gravemente o metabolismo normal, causando danos oxidativos (FAVARETTO et al., 2011) e podendo levar a morte celular.

Como subprodutos de diversas vias metabólicas, ROS são também produzidos de forma contínua, localizados em diferentes compartimentos celulares, tais como cloroplastos, mitocôndrios e peroxissomos. Estes organelos apresentam alta taxa

metabólica oxidativa e uma intensa taxa de fluxo de elétrons, sendo então uma importante fonte de ROS nas células vegetais (ASADA, 2006; BHATTACHARJEE, 2010). A ação como fatores prejudiciais, de proteção ou sinalização vai depender do delicado equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS no local e no tempo apropriado (GILL; TUTEJA, 2010).

A expressão de vários genes pode também ser influenciada por ROS, e, portanto, controlar diversos processos como crescimento, ciclo celular, morte celular programada (MCP), em respostas ao estresse abiótico (GILL; TUJETA, 2010). Os resultados recentes indicam que ROS nem sempre são subprodutos metabólicos prejudiciais, mas, também podem desempenhar um papel significativo no funcionamento da célula, participando numa grande variedade de processos fisiológicos associados com o crescimento e desenvolvimento da planta (FOYER; NOCTOR; 2005, DOUPIS et al., 2013).

O estresse induzido pelo acúmulo de ROS é combatido pelo sistema enzimático antioxidante (Figura 7) (GILL; TUJETA, 2010). O sistema de defesa é compreendido por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os mecanismos enzimáticos têm-se, importantes enzimas como: dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX), catalase (CAT) dentre outras (FOYER; NOCTOR, 2005; DOUPIS et al., 2013). Este sistema de defesa age conjuntamente para controlar as cascatas de oxidação descontroladas e proteger as plantas contra os danos oxidativos (GILL; TUTEJA, 2010). Por outro lado, os mecanismos não enzimáticos, importantes na proteção das células vegetais contra ROS, envolvem várias substâncias como o ácido ascórbico (vitamina C), a glutathiona, a prolina, o α -tocoferol (vitamina E) e os flavonoides em sistemas de oxidorredução (MITTLER et al., 2004).

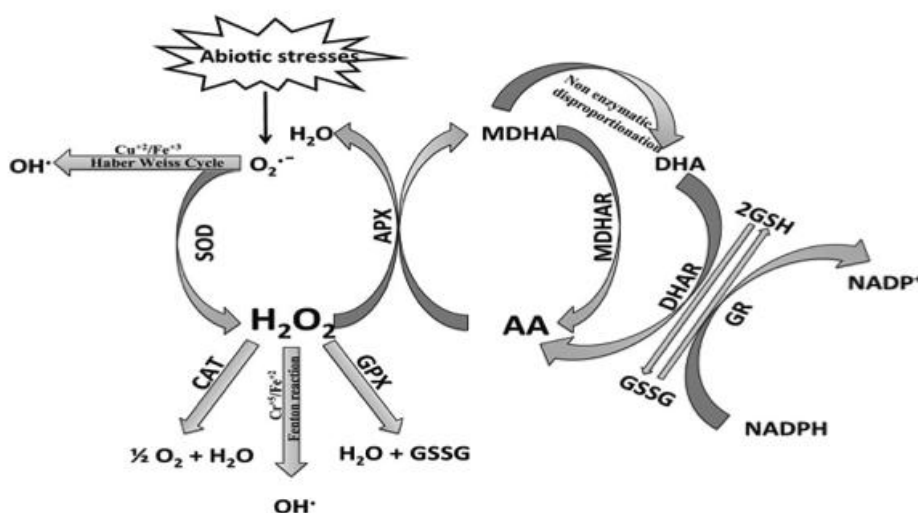


Figura 7 - Espécies reativas de oxigênio (ROS) e mecanismos de defesa antioxidativos (GILL; TUTEJA, 2010).

A enzima SOD é um dos antioxidantes intracelular mais efetivo, logo tem sido proposto como enzima-chave na tolerância ao estresse em plantas, pois fornece a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de níveis elevados de ROS (ALSCHER et al., 2002). Esta enzima remove O_2^- , catalisando a sua dismutação, onde um O_2^- é reduzido a H_2O_2 e outro oxidado a O_2 (MITTLER et al., 2011). É uma metaloenzima que possui diferentes metais como cofatores, sendo esta característica que permite a classificação desta enzima em três tipos conhecidos: (i) Fe - SOD, que é encontrada no cloroplasto; (ii) Mn - SOD, presente nos mitocôndrios e peroxissomos; e (iii) Cu/Zn - SOD, localizada no cloroplasto e no citosol (GILL; TUTEJA, 2010).

A catalase (CAT) é outra enzima do sistema antioxidativo responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 e também indispensável na remoção de ROS (MITTLER et al., 2011). CAT apresenta uma das maiores taxas de recuperação de todas as enzimas, sendo capaz de converter aproximadamente 6.000.000 (seis milhões) de moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 por minuto e não utiliza um substrato redutor (GILL; TUTEJA, 2010). As plantas apresentam várias isoformas de CAT, que podem responder diferencialmente à luz (SKADSEN et al., 1995; GILL; TUTEJA, 2010). Vários trabalhos demonstram que o aumento na atividade desta enzima tem

conferido tolerância às plantas, quando submetidas a estresses abióticos, como estresse por metal, temperatura, seca, excesso de luz, dentre outros (YANG et al., 2008).

O peróxido de hidrogênio também pode ser transformado pelas peroxidases gerando H₂O e utilizando um substrato como redutor. A enzima APX utiliza o ascorbato como receptor de elétrons e possui cinco isoformas conhecidas, dentre as quais existem formas presentes em membranas tilacóides do cloroplasto e em membranas dos glioxissomos; e formas solúveis no estroma do cloroplasto (LOGAN et al., 2006; HONG et al., 2007). Por outro lado, a enzima GPX utiliza o guaiacol como receptor de elétrons e possui importante papel na biossíntese de lignina (BULBOVAS et al., 2005; ASADA, 2006; FAVARETTO et al., 2011).

Os polifenóis são muito importantes para o controle e prevenção de danos no tecido provocados por ROS, devido aos seus efeitos antioxidantes. A concentração de polifenóis encontrados nas plantas pode ser influenciada por condições ambientais como a variação da intensidade de luz (IBRAHIM; JAAFAR, 2012). A enzima PPO, atua na oxidação de substâncias fenólicas, localizada nos plastídeos, enquanto os polifenóis se localizam nos vacúolos. Além disso, PPO está envolvida na rota de biossíntese de lignina e outros composto fenólicos e na deposição de suberina (OKEY, et al., 1997). Dada a sua localização, a PPO pode ter alguma relação com a fotossíntese, mas seu papel fisiológico nas células vivas não está devidamente elucidada (KUWABARA; KATOH, 1999).

2.2.3. Peroxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica pode ser definido como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, com falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). Constitui-se em um evento citotóxico primário que desencadeia sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras

substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e, ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas da célula, nas alterações do DNA, dentre outros (VACA et al., 1988; BABER; HARRIS, 1994; LIMA; ABDALLA, 2001).

Tem-se reconhecido que, durante a peroxidação, os produtos são formados a partir de precursores de poliinsaturados, que incluem fragmentos de pequenos hidrocarbonetos, tais como cetonas, malondialdeído (MDA), etc., e compostos relacionados (GARG; MANCHANDA, 2009). Alguns destes compostos reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), para formar produtos coloridos chamados substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (GILL; TUTEJA, 2010).

2.3. Fluorescência transiente da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* é um parâmetro largamente utilizado para a avaliação da capacidade fotossintética alterada por estresses bióticos e, ou abióticos. Uma das vantagens do uso deste método é o fato de a medição não ser destrutiva (*in vivo*), não causando nenhum dano a planta, podendo ser realizada tanto em laboratório quanto em condições de campo. Vários estudos avaliaram a relação da fluorescência da clorofila com a fotossíntese e o estado fisiológico das plantas (LICHTENTHALER, 1992; FRANKART et al., 2003; BAKER, 2008; YUSUF et al., 2010). Pois, avalia a eficiência fotossintética e fornece informações importantes sobre a relação estrutural e funcional dos centros de reação do fotossistema 2 (PS2) (OLIVEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010).

Os pigmentos cloroplastídicos, após receberem a energia dos fótons, dissipam a energia proveniente da luz por três vias de dissipação (desexcitação) do estado excitado (estado de elevada energia): (i) dissipação fotoquímica – utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese; (ii) dissipação não fotoquímica – produção de calor na forma de radiação infravermelha, representada pelo extintor não-fotoquímico (q_N); e (iii) fluorescência – emissão da radiação na região do visível (vermelho e vermelho distante) (BAKER, 2008). Os três processos são competitivos, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação de calor causarão alterações complementares na emissão da fluorescência. Sendo

assim, alterações na emissão de fluorescência podem mostrar a ausência ou a presença de comprometimentos no processo fotossintético (MAXWELL; JOHNSON, 2000; BAKER, 2008). Os métodos atuais fornecem informações rápidas não destrutivas acerca da conversão, transferência e dissipação da energia luminosa em nível de PS2 (BAKER, 2008). Uma das formas utilizadas para estudar a fotoquímica de PS2 seria a adaptação da folha ao escuro, permitindo a oxidação total dos aceptores primários de elétrons, tornando-os disponíveis para a redução com um pulso de luz saturante, cujo estado é referido como centro de reação de PS2 aberto (BAKER, 2008).

A cinética transiente da fluorescência da clorofila *a* (o teste OJIP) fornece informações detalhadas sobre a estrutura e a função do maquinário fotossintético, especialmente de PS2 (STRASSER et al., 1995; LAZÁR, 2006; TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008).

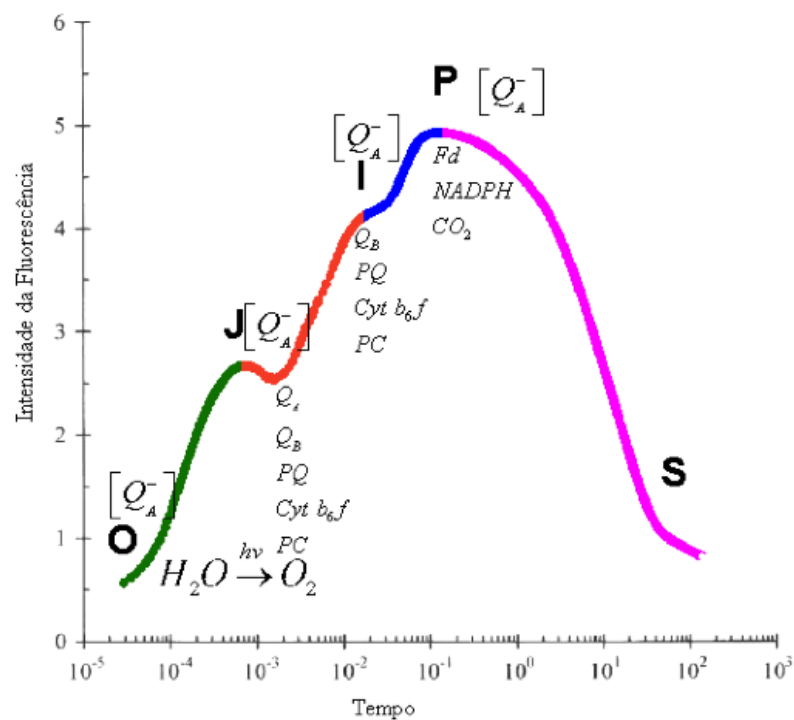


Figura 8 - Relação dos processos fotossintéticos com a curva de indução da fluorescência da clorofila *a* (OJIP) (adaptada STRASSER et al., 2004).

A curva OJIP está dividida em quatro transientes (O, J, I e P), que correspondem a fluorescência a 50 μ s, 5 ms, 30 ms e 300 ms, respectivamente. A fluorescência emitida entre os transientes O-J (Figura 8) contem informações relacionadas com o processo de absorção (captura de fótons) e o aprisionamento dessa energia; a emitida entre os transientes J-I descreve o processo de transporte de elétrons; e a emitida entre os transiente I-P oferece informações sobre os eventos que ocorrem na redução dos aceptores finais de PS2, os quais estão relacionados com o funcionamento inicial do fotossistema 1 (PS1) (LAZAR, 2004; STRASSER, 2004; LAZÁR, 2006; TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008; YUSUF et al., 2010). A cinética da fluorescência após o pico P é complexa e está relacionada com a fase bioquímica da fotossíntese (fixação de CO₂) (STRASSER et al., 2004).

Outra maneira de avaliação da curva OJIP é associando os seus eventos diretamente com o processo redox da fotossíntese. A curva mostra que cada um desses processos é denominado “quenching” e está ocorrendo em função do estado de oxidação de Q_A (Plastoquinona A). Cada vez que o *pool* de Q_A se reduz a banda aumenta, e cada vez que se oxida a banda diminui e se forma um transiente da curva *O-J-I-P*. O valor de P indica quando todo o sistema está saturado e chegando ao “máximo”. Neste ponto, Q_A está parcialmente oxidada e ocorre a transferência de elétrons para PS1, via complexo citocromo b₆f e plastoquinona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido entre agosto de 2011 a abril de 2012, no *Campus* Soane Nazaré de Andrade, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho, localizado no município de Ilhéus, BA, nas coordenadas 39°13'59" de longitude oeste e 14°45'15" de latitude sul.

Foram utilizadas plantas jovens, com dois anos de idade, de três variantes morfológicas de *C. echinata* [pequeno (SV), médio (MV) e grande (LV)], nativos da Mata Atlântica brasileira, obtidos de sementes, coletadas de árvores da floresta atlântica do sul da Bahia, na Estação Ecológica Pau-Brasil – ESPAB/CEPLAC, localizada no município de Porto Seguro, BA. As sementes foram germinadas em tubetes plásticos pretos cônicos de 235 cm³, contendo composto orgânico (casca de Pinus e fibra de coco, na proporção de 1:1) e adubo peletizado (Osmocote®). Posteriormente, as mudas, com um ano de idade, foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 20 L, contendo solo como substrato, e transportadas para o viveiro da UESC, onde permaneceram por 60 dias. Posteriormente, parte das plantas jovens dos diferentes variantes morfológicas foi mantida no viveiro, com 60% de luz, e parte transferida para casas de sombra, com intensidades de luz correspondentes a 15%, 25% e 35%, e para a condição de pleno sol (tratamento controle), onde permaneceram por 10 meses (Figura 9). Durante o experimento foram realizadas adubações com fosfato mono-amônio (MAP) purificado (NH₄H₂PO₄), uréia [CO(HN₂)₂] e nitrato de potássio (KNO₃), na dosagem de 4; 3 e 3 g L⁻¹, respectivamente, a cada 15 dias, até o final do experimento, de acordo com a análise físico-química do solo (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise físico-química do solo utilizado no experimento.

pH	Al	Ca	Mg	Ca + Mg	K	P
[CaCl ₂]	[cmol _c dm ⁻³]					[mg dm ⁻³]
4,7	0,4	7	3,5	10,4	0,16	63

Os valores de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) medidos na extremidade superior das plantas, submetidas aos diversos tratamentos de irradiância, foram obtidos com sensor de radiação luminosa S-LIA-M003, acoplado a uma estação climatológica Hobo Micro Station Data Logger (Onset, EUA).



Figura 9 - Visão geral do experimento. Plantas de *C. echinata* submetidas a diferentes níveis de luz. A – a pleno sol; B – a 15% de luz; C – a 25% de luz; D – a 35% de luz; e E – a 60% de luz.

3.2. Fluorescência transiente da clorofila a

A emissão fluorescência transiente da clorofila a foi medida usando um fluorômetro portátil *Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter* – v 1.10 (*Hansatech Instruments, Norfolk, UK*) em folhas completamente maduras e em boas condições fitossanitárias. Os dados foram coletados em abril de 2012 entre 9 e 11 h, usando 6 plantas de cada variante morfológico por tratamento de luz. As folhas selecionadas foram submetidas a um período de adaptação ao escuro por 20 min, suficiente para a oxidação completa dos centros de reação. Após este período, as folhas foram expostas a um pulso saturante de luz com intensidade de $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, comprimento de onda 650 nm, por 1s. Os sinais de emissão de fluorescência foram registrados no sistema de aquisição de dados do *Pocket PEA*, utilizando um *software* específico. Dentre os parâmetros obtidos, foram avaliados a curva OJIP, as fluorescências inicial (F_0), máxima (F_m) e variável (F_v) e o rendimento quântico máximo de PS2 (F_v/F_m).

3.3. Anatomia foliar

Para as análises anatômicas foliares, a parte mediana da terceira folha madura, a partir do ápice do ramo, foi coletada em grupos de três plantas por tratamento. O material vegetal foi fixado em FAA a 50% até o momento de inclusão. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etanólica (50, 70, 80, 90 e 100%), 1 h em cada concentração alcoólica; e, posteriormente, foi feito os processos de pré-infiltração e infiltração em historesina (Leica®). Logo após, foi realizado os cortes transversais, com 10 μm de espessura, utilizando micrótomo rotativo Leica RM 2145. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas de vidro com lamínula, seguido da coloração com azul de toluidina a 1%. As análises dos cortes transversais foram feitas em microscópio óptico e a documentação dos resultados obtidos em fotomicroscópio *Olympus BX40*. A espessura do mesofilo, da epiderme nas faces abaxial e adaxial, e dos parênquimas paliçádico e lacunoso foram

calculadas com auxílio do programa computacional Anati Quant, versão 2.0, disponibilizado pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.4. Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O acúmulo de peróxido de hidrogênio em tecidos foliares dos morfotipos de *C. echinata*, submetidas aos diferentes tratamentos de luz, foi avaliado usando discos foliares de 0,78 cm², coletados de folíolos de pina localizada na região mediana de folhas maduras, submetidos ao ensaio de coloração histoquímica com DAB-HCl (3,3' – diaminobenzidina tetraclorada) de acordo com os procedimentos metodológicos descritos por Šnyryshová et al. (2009). As coletas foram realizadas entre as 8 e 10h. Foram utilizadas três plantas de cada variante por tratamento.

3.5. Metabolismo antioxidativo

3.5.1. Preparo do extrato bruto

Para realização dos ensaios enzimáticos em nível foliar, o tecido vegetal foi submetido a maceração em nitrogênio líquido. Logo após, foram pesados, em balança analítica, 40 mg do macerado, que, em seguida, foi acondicionado em microtubos *ependorf* de 2 mL. Logo após, adicionou-se 0,028 g de PVP (Polivinilpirrolidona) (0,7 g de PVP/g de tecido) para evitar a oxidação do macerado. Imediatamente após, o macerado foi ressuspenso em 800 µL de tampão de extração, que variou de acordo com o tipo de enzima envolvida no metabolismo antioxidativo (tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0, para as atividades das enzimas CAT, GPX e PPO e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, para a atividade das enzimas SOD, APX), seguido de agitação em vórtex. Posteriormente, foi submetido à sonicação, em ultrassonicador de sonda (Gex 130, 130 W), sob amplitude de 70%, 8 pulsos de 5 s, com intervalos de 10 s, seguido de centrifugação (10.000 x g) por 10 min a 4°C. Em seguida, coletou-se o sobrenadante, considerado como extrato bruto, e fez-se a sua transfência para um novo microtubo de 2 mL, que

foi mantido em isopor com gelo, para uso imediato. As coletas foram realizadas entre as 8 e 10h. Foram utilizadas seis plantas de cada variante por tratamento.

3.5.2. Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade de SOD foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977), com algumas modificações. Uma unidade de atividade (UA) foi determinada para medir a capacidade da enzima de inibir 50% da fotorredução de nitroazul de tetrazólio (NBT) à formazana azul. Ao extrato bruto, foi adicionado o tampão de extração (fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,0), EDTA (1mM) e metionina (13 mM). A atividade enzimática foi iniciada com a adição de riboflavina (1mM). A leitura inicial ocorreu após a placa ter ficado no escuro por 5 min, e a segunda leitura realizada após a placa ter sido submetida à luz fluorescente de 15 W por mais 5 min. Foram considerados como brancos os poços que não continham extrato vegetal. As leituras foram realizadas a 560 nm e as amostras lidas em espectrofotômetro de microplacas Spectramax Paradigm (Molecular Devices).

3.5.3. Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi realizada de acordo com o método descrito por Havir e Mchale (1987), com algumas modificações. A atividade foi medida pela velocidade do consumo do H₂O₂ na reação, conforme mostra a equação abaixo:



A atividade ocorreu a 30°C, utilizando-se tampão de reação (tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0) com adição de 1µL do extrato vegetal. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ a 30 mM e as leituras foram feitas calculando-se o decaimento a 240 nm por 300 s, contra um branco livre de extrato vegetal e expressa em mmol H₂O₂ g MS⁻¹ min⁻¹, usando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹. A

atividade foi realizada no espectrofotômetro de microplacas *Spectramax Paradigm* (Molecular Devices).

3.5.4. Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade de APX foi determinada pelo procedimento metodológico descrito por de Nakano e Asada (1981) com algumas modificações. Durante a reação, a presença de APX no extrato vegetal diminui a concentração de H₂O₂ do meio, de acordo com a redução de ácido ascórbico adicionado. Foi acrescentado ao extrato vegetal devidamente diluído o tampão de reação (fosfato de potássio a 50mM, ascorbato a 0,5mM, EDTA a 0,1mM e H₂O₂ a 0,1mM). A reação foi iniciada após adição do ascorbato. O decaimento foi acompanhado a 290 nm por 300s, com leituras a cada 30s. A atividade foi realizada no espectrofotômetro de microplacas *Spectramax Paradigm* (Molecular Devices).

3.5.5. Peroxidase do guaiacol (GPX)

Para a determinação da atividade de GPX, preparou-se, para o ensaio enzimático, microplacas de 96 poços contendo 140 µL de tampão de reação GPX 2x [guaiacol 40 mmol L⁻¹, H₂O₂ a 0,06% e fosfato de sódio (20 mmol L⁻¹, pH 6,0)], 139 µL de tampão fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 6,0) e 1 µL de extrato enzimático. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (VERSAmax), em comprimento de onda de 470 nm. A atividade de GPX foi expressa com o aumento do consumo de guaiacol em µmol s⁻¹ g⁻¹ de biomassa seca. A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância a 470 nm min⁻¹ g⁻¹ MS para consumo de guaiacol em mmol h⁻¹ g⁻¹ MS foi feita com o uso da equação $y=0,1284x + 0,0189$ (R²= 0,99), originada a partir de uma curva padrão para POD-guaiacol (Rehem et al., 2011).

3.5.6. Oxidase do polifenol (PPO)

Para determinação da atividade de PPO, coletou-se uma alíquota de 10 µL do extrato bruto, onde se diluiu em 90 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Posteriormente, foram preparadas microplacas de 96 poços contendo 200 µL de tampão PPO (epicatequina 5 mmol L⁻¹, de ácido cítrico 100 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7,5), 60 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, e 20 µL de extrato enzimático diluído (1:10). As leituras foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de microplacas (VERSAmax). A atividade de PPO foi expressa com o aumento do consumo de epicatequina em mg g MS⁻¹ min⁻¹. A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância a 444 nm em min⁻¹ g MS⁻¹, para consumo de epicatequina em mg g MS⁻¹ min⁻¹, foi feita com o uso da equação $y = - 0,091 + 50,657x$, originada a partir de uma curva padrão para PPO-epicatequina.

3.6. Peroxidação lipídica

O dano oxidativo aos lípidos nas membranas das células dos tecidos foliares foram estimadas como substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente malondialdeído (MDA), de acordo com os procedimentos descritos por Cakmak e Horst (1991), com algumas modificações. Para cada um dos diferentes tratamentos, 20 mg de folhas liofilizados foram homogeneizados num almofariz com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (p/v). Após centrifugação a 10.000 xg durante 5 min, uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (0,5% em 20% de TCA). As amostras foram incubadas a 90°C durante 20 min. Após o aquecimento, a reação foi interrompida em banho de gelo. Após centrifugação a 10000 xg durante 4 min, a absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm e corrigida para turvação não-específica por subtração da absorvância a 600 nm. A concentração de TBARS foi calculada a partir do seu coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

3.7. Análise de expressão gênica por qPCR

3.7.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Folhas maduras, dos três variantes morfológicos avaliados, foram coletadas nos níveis de 100%, 60% e 15% de luz. Inicialmente, as amostras foliares foram congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em ultrafreezer a -80°C e, posteriormente, liofilizadas e armazenadas em freezer a -20°C . A extração de RNA das amostras foliares foi realizada utilizando o *kit Quick-RNATM MiniPrep* (Zymo Research), segundo as instruções do fabricante. A integridade e a concentração das amostras extraídas foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 11) e espectrofotometria de ultravioleta (260 e 280nm), respectivamente.

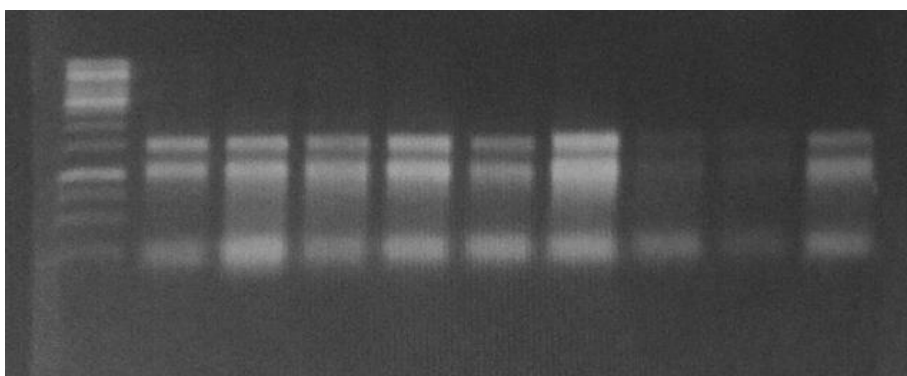


Figura 10 - Gel de agarose de RNA de variantes morfológicas de *C. echinata* submetidas aos níveis de 15, 60 e 100% de luz.

Para remoção de possível contaminação por DNA genômico nas amostras, o RNA total obtido ($1\mu\text{g}$) foi tratado com DNase I RNase-free (Fementas). Este material tratado foi usado para a síntese do cDNA com o *Revertaid H-Minus Reverse Transcriptase* (Fermentas) utilizando o oligo d(T)15, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi quantificado por espectrofotometria de ultravioleta (260 e 280nm) e diluído de modo a obter a concentração adequada ($10\text{ng}/\mu\text{L}$) para o experimento de qPCR.

3.7.2. qPCR

Devido a falta de sequências gênicas anotadas e depositadas em banco de dados para *C. echinata*, as análises de expressão por qPCR foram realizadas utilizando *primers* gene-específicos de três diferentes espécies lenhosas (*Theobroma cacao*, *Citros sinensis* e *Eucalyptus grandis*), os quais foram delineados utilizando o *Primer Express Software 3.0* (Tabela 2). Para as análise de qPCR foram utilizadas amostras de três tratamentos (15%, 60% e 100% de luz).

Tabela 2 - Primers gene-específicos utilizados nas análises de expressão gênica por qPCR para *C. echinata*.

Gene	Espécie	Primer
PsbA	<i>Theobroma cacao</i>	Forward: 5'-GGTTTGCACCTTTACCCGA-3' Reverse: 5'-CTCATAAGGACCGCCATT-3'
PsbO	<i>T. cacao</i>	Forward: 5'-GCAAACGCTGAAGGAGTT-3' Reverse: 5'-GGCTTGAAGGCAAATGAGTC-3'
hsp70	<i>T. cacao</i>	Forward: 5' CGATGGCTGCCCTCAATC 3' Reverse: 5' GATGAATCTGAAGGCCCACTTT 3'
β -Tubulina	<i>T. cacao</i>	Forward: 5'-TGCAACCATGAGTGGTGTTC- 3' Reverse: 5'-CAGACGAGGGAAGGGAATGA- 3'
GAPDH	<i>T. cacao</i>	Forward: 5'- GATGCTCCTATGTTTGTGTGG - 3' Reverse: 5'- TCTTCTCCTCTCCAGTCCTT - 3'
Actina	<i>T. cacao</i>	Forward: 5'- TCCTCTCCAGCCATCTCTC - 3' Reverse: 5'- TCTCCTTGCTCATTCCGGTCT - 3'
GAPDH	<i>Citrus sinensis</i>	Forward: 5'- TCTTGCCTGCTTTGAATGGA - 3' Reverse: 5'- TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT - 3'
SOD	<i>C. sinensis</i>	Forward: 5'-TAGGCTTGGGTAAATCCGTAGGA-3' Reverse: 5'-CTAATCGCCGGCTCAAAG-3'
CAT	<i>C. sinensis</i>	Forward: 5'-CCGATCACGAGGACCAATTT-3' Reverse: 5'-TTCAAGACCAAGCGTCCAAC-3'
APX	<i>C. sinensis</i>	Forward: 5'-TATTGCCGTTAGGCTTTTGGGA-3' Reverse: 5'-GGTAACCTCAACGCCAACAAC-3'
GPX	<i>C. sinensis</i>	Forward: 5'- GCTTGGAGATTCTGGCCTTTC-3' Reverse: 5'- TCAGCCTTAAAGCGAGTGCAT-3'
PPO	<i>C. sinensis</i>	Forward: 5'- GCTAACGTTTATTGTGCTTATTGTG-3' Reverse: 5'- GAAATGGGAAAAATAGCCATGAGT-3'
Caucineurina	<i>Eucalyptus grandis</i>	Forward: 5'- TTGAAGATTGTGCCGAGAAA-3' Reverse: 5'- GAATCCATCTCACATTCCAACA -3'
Tioredoxina	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- CGAGGCAATGCCAACTTT -3' Reverse: 5'- CAGTCGCTTGTATC -3'
Inver/pectina	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- GGAACGCGATACTGACCATT -3' Reverse: 5'- CGTAGCTGGCTAGGTATGATTG -3'

Gene	Espécie	Primer
Pip-I	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- GGTATCTCTGGTGGACACATCA -3' Reverse: 5'- CACTGCATGACCATGTAGAACA -3'
F3-5H	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- CCCTAGACATCAACTTCTCCAA -3' Reverse: 5'- AACTTCCACCTCAGGCCATA -3'
PoliGal	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- GCAGACGTCGAACACCAA -3' Reverse: 5'- GCCACTCCGTCATGTCCT -3'
Aquaporina	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- GTGGTGGCCGTGATGATA -3' Reverse: 5'- GATCGGACAACGGTGATGT -3'
Corismato	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- GATCACGAGAGCAAGACCAC -3' Reverse: 5'- CCCTCCCTCCTCCTTCTT -3'
Citocromo450	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- CTCGTTGACTGGAAGCTG -3' Reverse: 5'- GGTACATATGCGCTAACGGAA -3'
NOD-Like	<i>E. grandis</i>	Forward: 5'- GATAGAGAAAGTGCGGTTGGA -3' Reverse: 5'- GCTTCGGGTTGTATATGACG -3'

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o *Stratagene MX3005P qPCR System* com o *MxPro QPCR software (Agilent Technologies)*. Os dados obtidos neste experimento foram normalizados com base nos valores de expressão do gene *GAPDH* de *T. cacao*, que foi testado e usado como endógeno para *C. echinata*. Ao término da amplificação, a especificidade dos primers utilizados foi verificada pela dissociação (60°C – 95°C) dos amplicons gerados a partir dos *primers* que amplificaram. Para as análises dos dados foram considerados apenas as amplificações cujos primers apresentaram a formação de pico único durante a dissociação. Os valores de expressão relativa de foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), tendo as plantas controle (100% de luz) como calibrador dos dados. As reações foram realizadas em triplicata experimental e consistiram de 100 ng de cDNA, 10 µM de cada par de primers (forward/reverse) e 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) totalizando 22 µL de volume final. O programa utilizado foi: 95°C por 10 min, após isto foram realizados 40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min. Reações desprovidas de cDNA template (NTC) foram incluídas como controle negativo para cada par de *primers*.

3.8. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5, sendo 3 variantes morfológicas de *C. echinata* [Pequena (VP), Média (VM) e Grande(VG)] e 5 níveis de luz (15, 25, 35, 60 e 100%), com 5 repetições e 10 plantas jovens por unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), para comparação de médias.

4. RESULTADOS

4.1. Radiação fotossinteticamente ativa

Durante o período de agosto de 2011 e abril de 2012, a radiação fotossinteticamente ativa (RAF) foi medida nos diferentes ambientes de luz, onde os três variantes morfológicos foram cultivados, na extremidade superior das plantas, e corresponderam a 15, 25, 35 e 60% do controle (100% de luz ou pleno sol) (Tabela 3).

Tabela 3 - Radiação fotossinteticamente ativa (RAF). Valores médios, máximos e mínimos, e porcentagem em relação ao pleno sol, para os diferentes ambientes de sombreamento. Dados coletados em Ilhéus, BA, Brasil, entre agosto de 2011 e abril 2012.

	Pleno sol	90%	75%	50%	25%
	[mol m ⁻² dia ⁻¹]				
Média	30,3	18,4	10,5	8,0	4,8
Máximo	46,6	28,2	16,1	12,3	7,3
Mínimo	5,7	3,5	2,0	1,5	0,9
% Luz	100%	60%	35%	25%	15%

4.2. Plasticidade foliar

Os variantes morfológicos de *C. echinata* apresentaram plasticidade fenotípica em nível foliar nos diferentes níveis de luz. As folhas de sol, comparadas às de sombra, apresentaram uma menor área de folíolos e uma lâmina com coloração verde mais clara, para todos os variantes morfológicos avaliados (Figura 11).

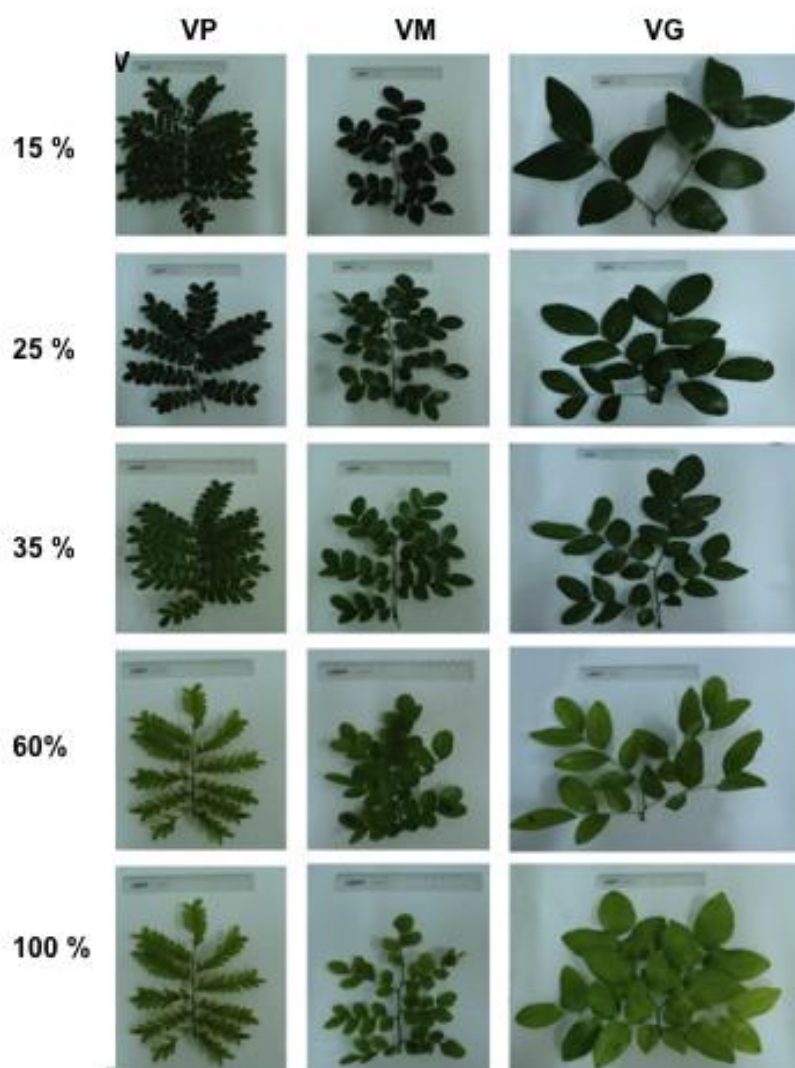


Figura 11 - Plasticidade fenotípica foliar de variantes morfológicas de *C. echinata* pequeno (VP), médio (VM) e grande (VG), submetidos a diferentes níveis de luz (15, 25, 35, 60 e 100%).

4.3. Curva OJIP

Observaram-se variações inter e intramorfotípicas em relação à cinética do transiente típico da fluorescência da clorofila a (OJIP), com elevação normalmente distribuída de F_0 a F_m . Os três variantes morfológicos exibiram curva típica do transiente OJIP de emissão de fluorescência da clorofila a. Observou-se no tratamento 100% de luz (pleno sol) uma redução na elevação da curva para os três variantes morfológicos (Figura 12), em consequência da diminuição dos valores de F_m (Tabela 4). Para o variante SV, além da redução na elevação da curva OJIP com o incremento de luz, houve também uma sobreposição de curvas nos tratamentos de 15 e 25% de luz (Figura 12 A). Para MV a sobreposição ocorreu em 15, 25, 35 e 60% de luz (Figura 12 B); ao passo que para LV houve sobreposição em 15, 25 e 35% de luz (Figura 12 C).

Observou-se, para o rendimento quântico máximo de PS2 (F_v/F_m) (Tabela 4), que os três variantes morfológicos estudados exibiram padrões similares de resposta, exceto nos maiores níveis de luz, onde se verificou os menores valores de F_v/F_m . Para o variante SV, os valores de F_v/F_m variaram de 0,77 a 0,81 nas menores intensidades de luz; enquanto que em 60 e 100% de luz foi de 0,68 e 0,63, respectivamente. Para MV, F_v/F_m variou de 0,75 a 0,81 entre as menores intensidades e 60% de luz, ao passo que em 100% de luz foi de 0,63. Para LV, a razão F_v/F_m variou de 0,76 a 0,82 nos menores níveis de luz, enquanto que em 60% e 100% os valores foram de 0,63 e 0,70 respectivamente.

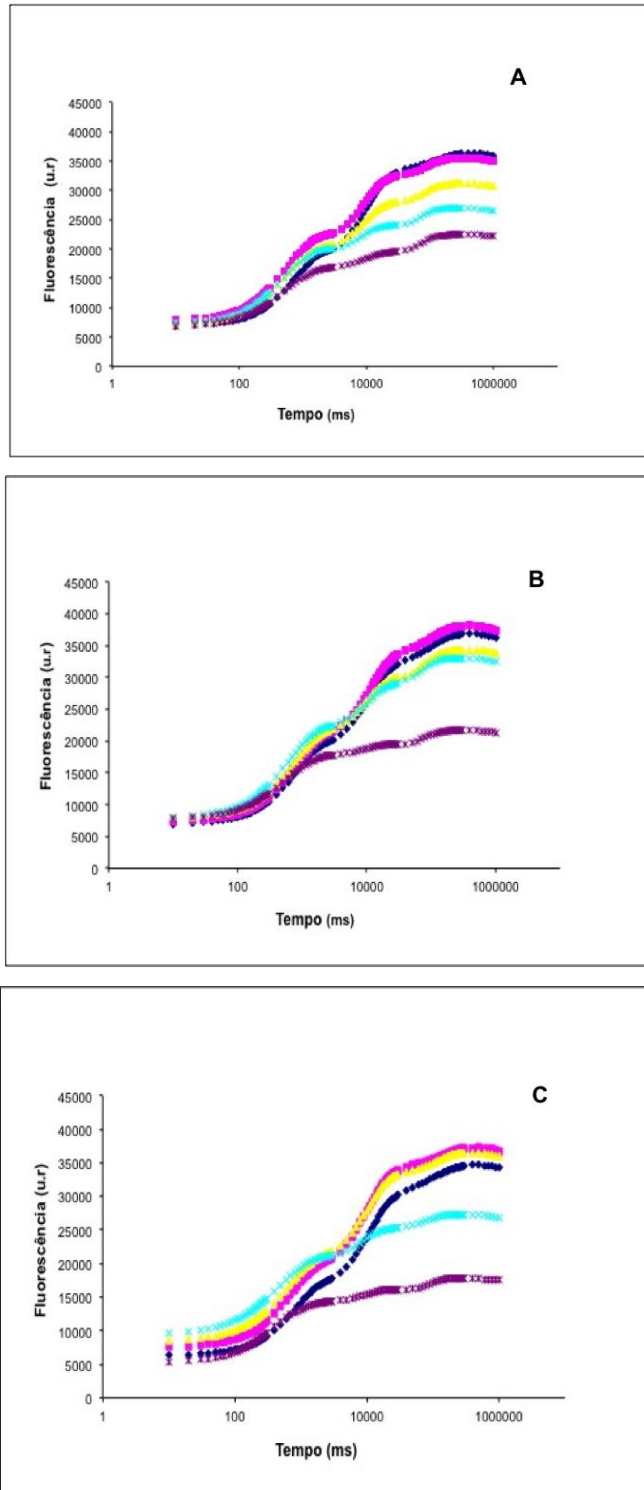


Figura 12 - Transiente da fluorescência da clorofila a para os variantes morfológicos de *C. echinata*, (A) - pequeno (VP), (B) – médio (VM) e (C) – grande (VG), crescidos nos ambientes de 15 (■), 25 (■), 35 (■), 60 (■) e 100% (■) de luz. (n=6).

Tabela 4 - Fluorescências inicial (Fo), máxima (Fm) e variável (Fv) e razão Fv/Fm de três variantes morfológicas de *C. echinata*, pequeno (VP), médio (VM) e grande (VG), submetidos a diferentes níveis de luz.

Variante	Nível de luz (%)	(Unidade relativa)											
		Fo			Fm			Fv			Fv/Fm		
VP	15	6775 ± 210	Aa	36369 ± 1711	Aa	29593 ± 1681	Aa	0,81 ± 0,01	Aa				
	25	7630 ± 546	Aa	35598 ± 1309	Aa	27967 ± 1088	Aa	0,79 ± 0,01	Aa				
	35	6993 ± 157	Aa	31239 ± 2129	Aa	24245 ± 2084	Aa	0,77 ± 0,01	Aa				
	60	7223 ± 610	Aa	26970 ± 4588	Ba	19747 ± 4195	Ba	0,68 ± 0,06	Ba				
	100	6772 ± 600	Aa	22525 ± 4550	Ba	15754 ± 4433	Ba	0,63 ± 0,08	Ba				
VM	15	6917 ± 261	Aa	36890 ± 272	Aa	29972 ± 431	Aa	0,81 ± 0,01	Aa				
	25	7277 ± 574	Aa	38129 ± 635	Aa	30853 ± 723	Aa	0,81 ± 0,01	Aa				
	35	7819 ± 608	Aa	34324 ± 1484	Aa	26505 ± 1811	Ba	0,77 ± 0,02	Aa				
	60	7977 ± 407	Aa	33041 ± 2162	Aa	25064 ± 2210	Ba	0,75 ± 0,02	Ba				
	100	7730 ± 319	Aa	21674 ± 1799	Aa	13944 ± 1856	Ca	0,63 ± 0,03	Ab				
VG	15	6277 ± 289	Aa	34681 ± 2209	Aa	28404 ± 2024	Aa	0,82 ± 0,01	Aa				
	25	7510 ± 496	Aa	37257 ± 1612	Aa	29747 ± 1600	Aa	0,80 ± 0,01	Aa				
	35	8534 ± 1380	Aa	36538 ± 472	Aa	28005 ± 1709	Aa	0,76 ± 0,04	Aa				
	60	9580 ± 2021	Aa	27361 ± 2909	Ba	17781 ± 3351	Ba	0,63 ± 0,07	Bb				
	100	5189 ± 384	Ab	17806 ± 1753	Ca	12617 ± 1459	Ba	0,70 ± 0,01	Bb				

Médias intramorfotípicas, seguidas pelas mesmas letras minúsculas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de seis repetições (\pm EP).

4.4. Anatomia foliar

Ao avaliar a espessura da epiderme, nas faces adaxial (AD) e abaxial (AB); dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL) e do mesofilo (M); em secções transversais de folíolos de pinas, coletados na região mediana das folhas dos diferentes variantes morfológicos (Figura 13), verificou-se que a variação da intensidade de luz promoveu mudanças significativas ($p < 0,05$) na morfologia foliar (Figura 14, 15 e 16). Observou-se variação intermorfotípica para a espessura da epiderme AD, cujo maior e o menor valor foram apresentados por VM e VG em 60% de luz, ao passo que para a epiderme AB houve variação intramorfotípica para VM nos diferentes níveis de luz avaliados (Figura 14 A e B). Em relação às espessuras de PP e PL, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) inter e intramorfotípicas, cujas maiores variações foram observadas para VP e VG com as mudanças dos níveis de luz (Figura 15 A e B). O maior valor da espessura de PP foi verificado para o morfotipo VP em 60% de luz, ao passo que para a espessura de PL os maiores valores foram observados para VM e VG. Houve, também, diferenças significativas ($p < 0,05$) inter e intramorfotípicas para M (Figura 16). O menor valor da espessura de M foi obtido por VP em 25% de luz, e o maior valor por VM em 100% de luz.

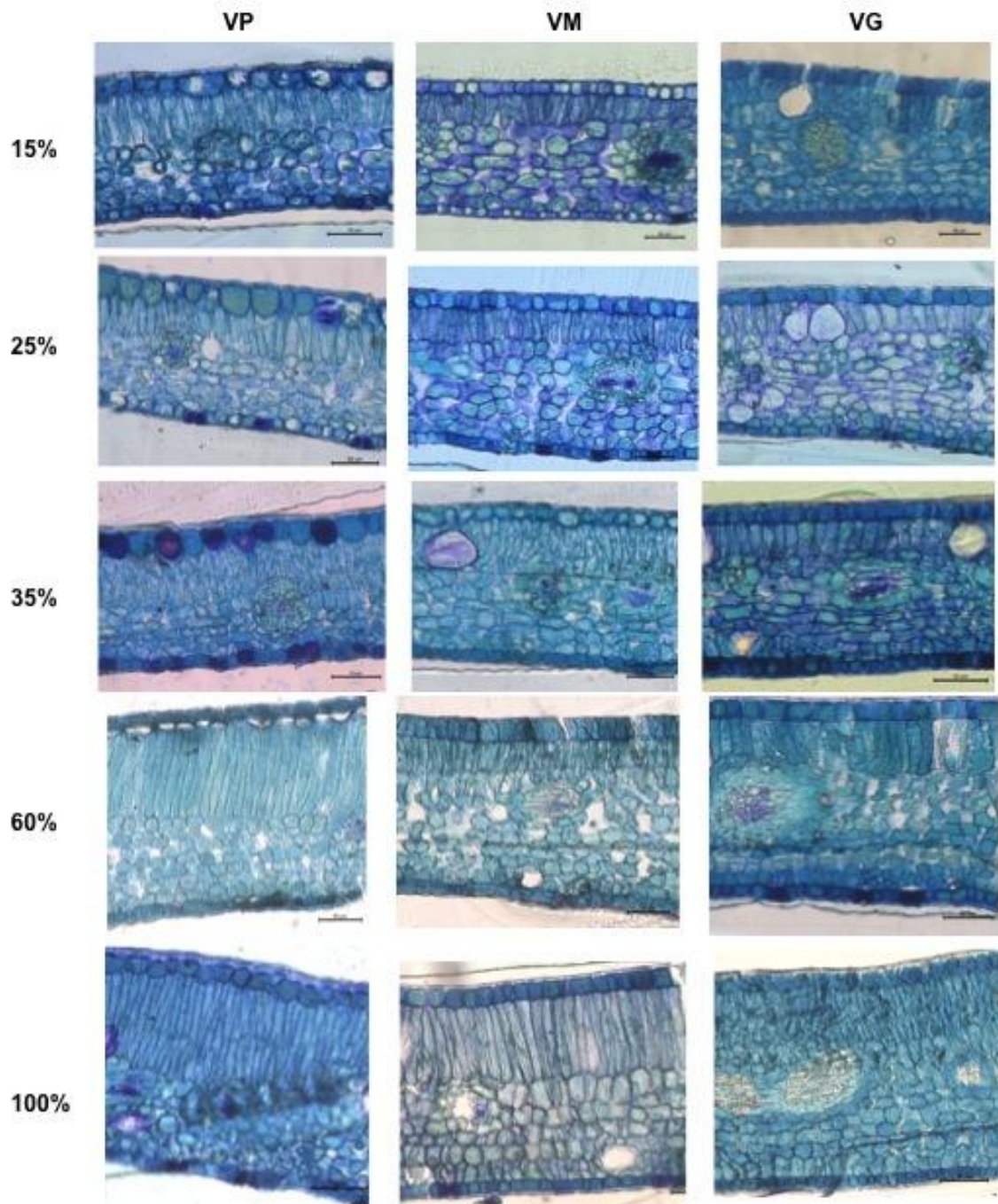


Figura 13 - Fotomicrografia de secções transversais de folhas de *C. echinata* submetidas a diferentes níveis de luz. Barra = 50 μ m.

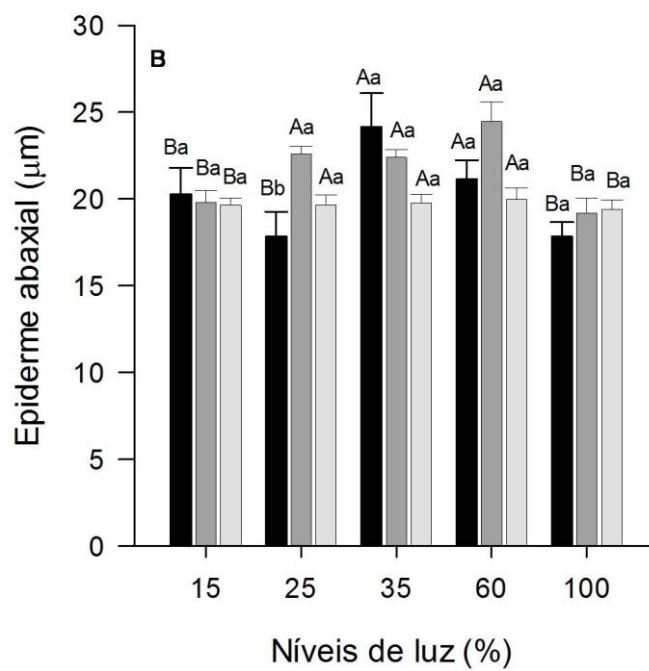
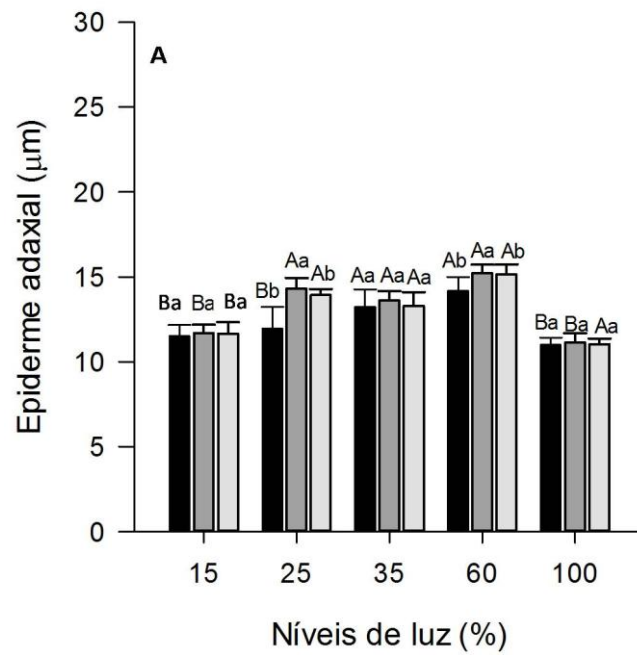


Figura 14 - Espessura da epiderme nas faces adaxial (A) e abaxial (B) em folhas de três variantes de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (▒) e variante grande (□). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

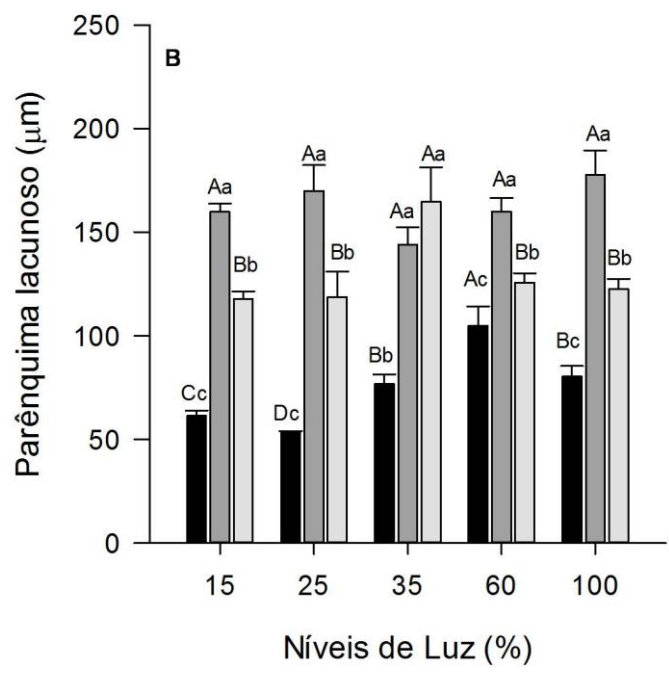
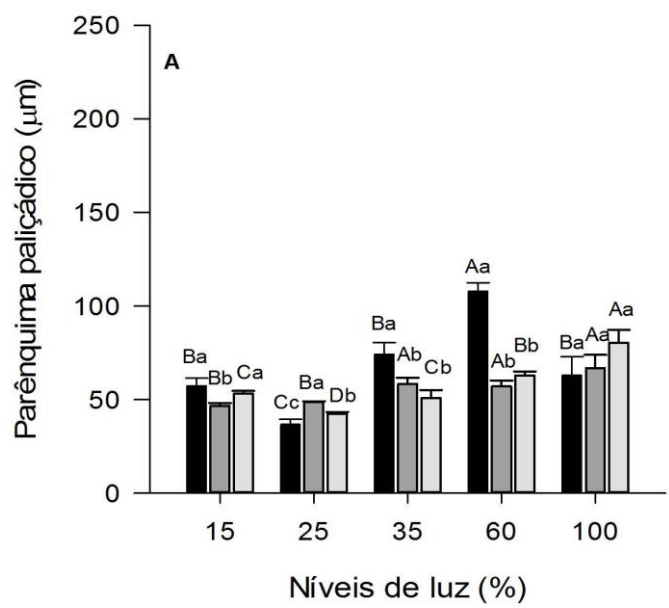


Figura 15 - Espessura dos parênquimas paliçádico (A) e lacunoso (B) em folhas de três variantes de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

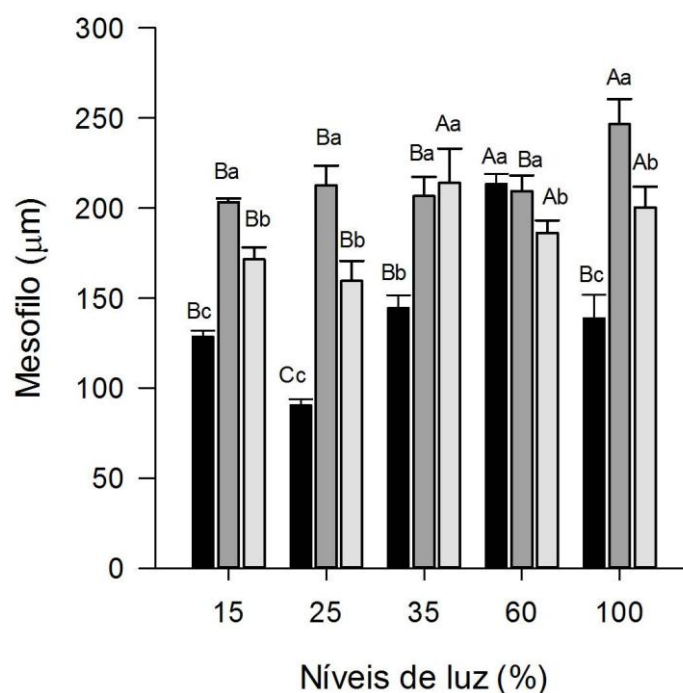
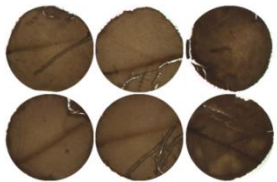


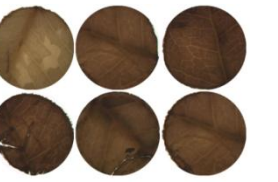
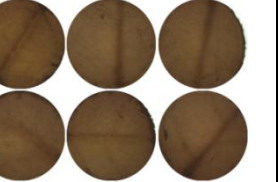

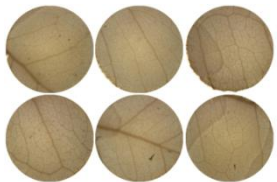

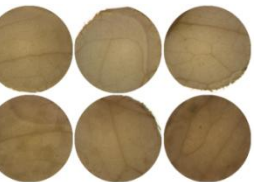


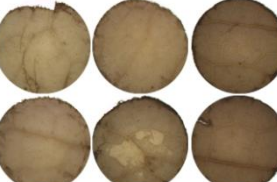

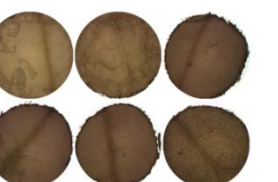



Figura 16 - Espessura do mesofilo em folhas de três variantes de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4.5. Teste histoquímico com DAB-HCl

A partir do teste histoquímico com o corante 3,3' diaminobenzidina tetraclorada (DAB-HCl), evidenciou-se um acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em discos foliares coletados de folíolos de pinas da região mediana de folhas de diferentes variantes morfológicas, com o incremento da intensidade de luz, exceto para VP no nível de 15% luz, cujo acúmulo de H_2O_2 foi mais pronunciado em relação aos níveis 25 e 35% de luz, e assemelhou-se ao de 60% de luz (Tabela 4).

Tabela 5 - Discos foliares coletados de folíolos de pinas da região mediana de folhas de diferentes variantes morfológicas [variante pequeno (VP), variante médio (VM) e variante pequeno (VP)] de *C. echinata*, demonstrando dano oxidativo detectado pelo acúmulo H_2O_2 (cor marrom) pelo uso de DAB-HCl.

<i>Caesalpinia echinata</i>	Nível de luz (%)				
	15	25	35	60	100
VP					
VM					
VG					

4.6. Peroxidação lipídica

A partir da análise da atividade de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), pode-se verificar um aumento na peroxidação lipídica de membranas celulares, com o incremento dos níveis de luz, principalmente para VM (Figura 17). Por outro lado, VG apresentou a maior peroxidação lipídica, principalmente em 60% de luz (183,7 nmol g⁻¹ MS), ao passo que para VP esse dano às membranas foi mais acentuado no tratamento 100% de luz (143 nmol g⁻¹ MS). A diferença entre o maior e o menor valor de TBARS para VG e VP (57,6 nmol g⁻¹ MS), evidenciada em 60% de luz, foi de 68,6% (Figura 19).

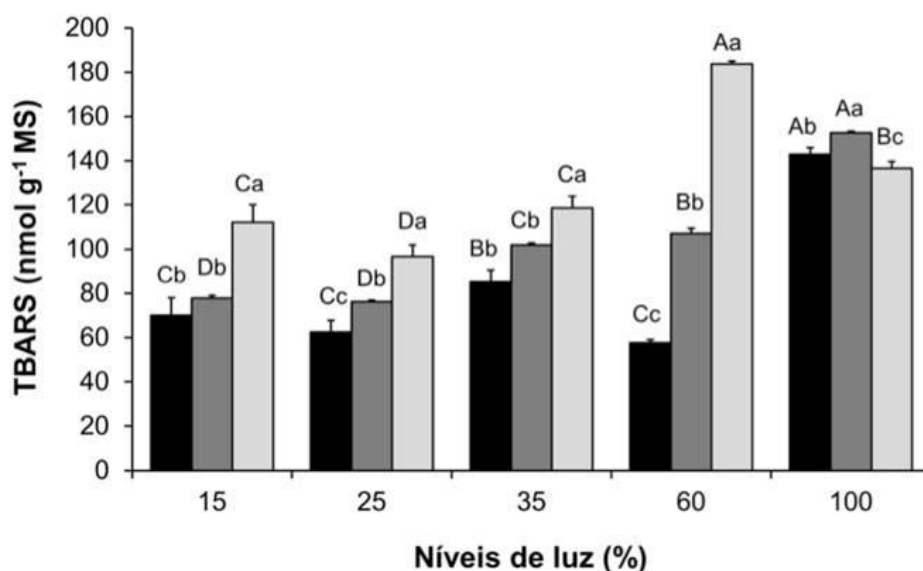


Figura 17 - Atividade de TBARS em folhas de plantas de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), ($n=6$).

4.7. Metabolismo antioxidativo

Não se observou um padrão de atividade para as enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo, em relação às variações dos níveis de luz, para os três variantes morfológicos de *C. echinata*. Em relação à atividade de SOD (Figura 18), houve variações entre os variantes apenas em 35% de luz. O maior valor de atividade de SOD foi verificado para VG ($4,0 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) em 35% de luz, ao passo que o menor valor foi evidenciado para VP ($1,6 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) em 60% de luz, cuja variação foi de 60% (Figura 20).

Para a enzima CAT (Figura 19 A), observaram-se variações significativas ($p < 0,05$), em relação às mudanças nos níveis de luz, para os três variantes morfológicos. VM apresentou maior atividade de CAT em 35 ($11,38 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) e 60% ($14,2 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) de luz. Entretanto, para VG, a maior atividade foi no nível de 35% ($10,12 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) de luz. Em contrapartida, VP não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), em relação à atividade de CAT, entre os diferentes níveis de luz. O maior e o menor valor da atividade de CAT foram observados para VM a 60% e 15% de luz, cuja diferença foi de 75% (Figura 19 A).

Em relação a APX (Figura 19 B), as maiores atividades ocorreram para VP, em 25% ($131,1 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$), 35% ($107 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) e 100% ($91,5 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) de luz, e para VM em 60% ($83,7 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) de luz. Entretanto, para VG, a atividade de APX se manteve praticamente constante com o incremento dos níveis de luz. Houve uma diferença de 85% entre a maior e a menor atividade de APX, para VP em 25% e para VM ($19,8 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) a 35% de luz.

Ao avaliar a atividade de GPX (Figura 19 C), verificou-se, para VP, um aumento em 25% ($14,5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) e um decréscimo acentuado em 100% ($0,5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) de luz. Entretanto, para VG, este aumento foi em 15% ($11,9 \text{ mmol g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) e 25% ($12,8 \text{ mmol g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) de luz. Em contrapartida, para VM houve uma redução da atividade de GPX com o aumento da intensidade de luz. Para VP, a redução da atividade de GPX entre 25% e 100% foi de 96 %.

Por outro lado, para a atividade PPO (Figura 20), observou-se um aumento com o incremento dos níveis de luz para VG, ao passo que para VP as maiores

atividades se verificaram em 25% ($1,3 \text{ mmol g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) e 60% ($1,6 \text{ mmol g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) de luz. Em contrapartida, a atividade de PPO para VM se manteve relativamente constante.

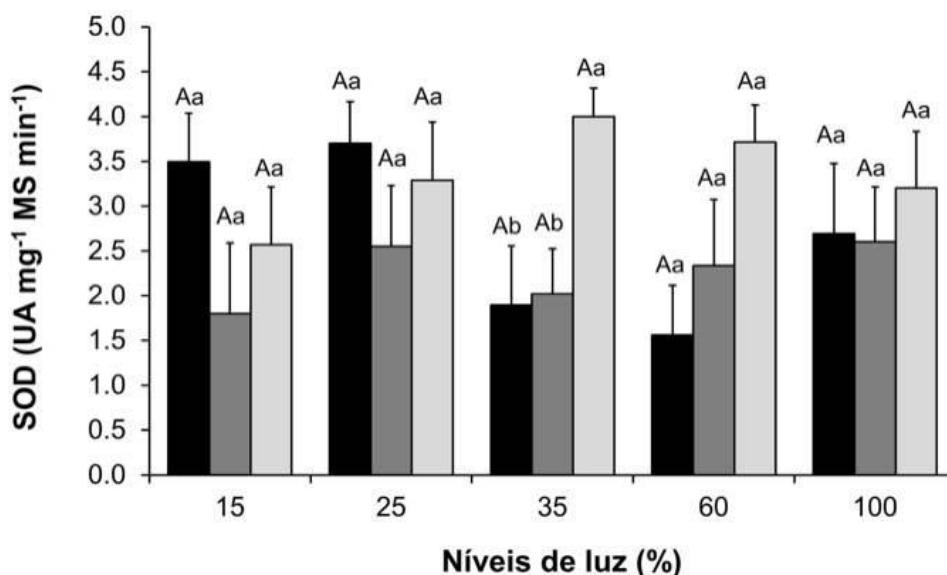


Figura 18 - Atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) em folhas de plantas de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), ($n=6$).

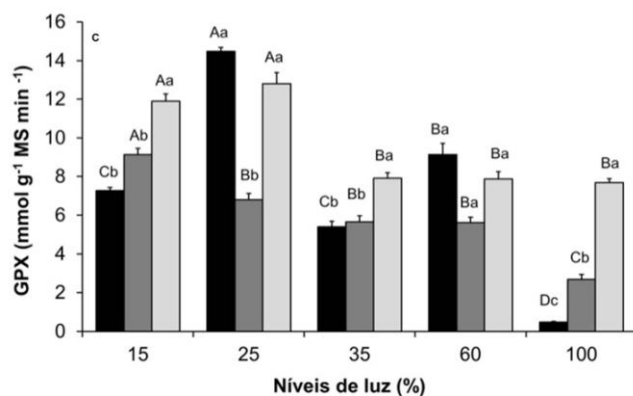
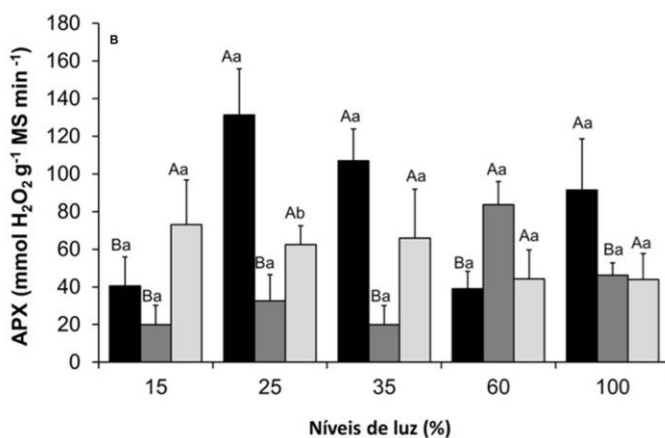
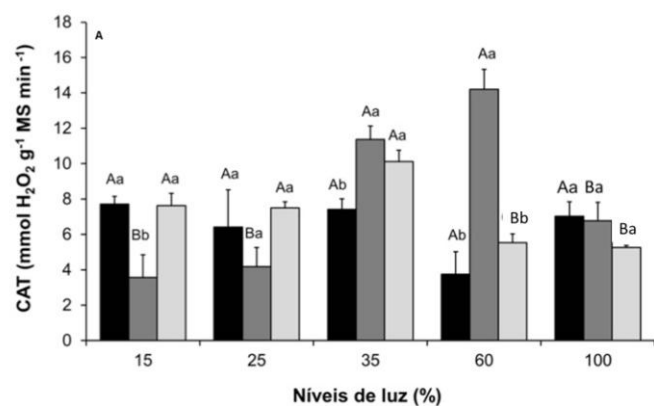


Figura 19 - Atividade das enzimas catalase (CAT) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e peroxidase do guaiacol (GPX) (C) em folhas de plantas de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), ($n=6$).

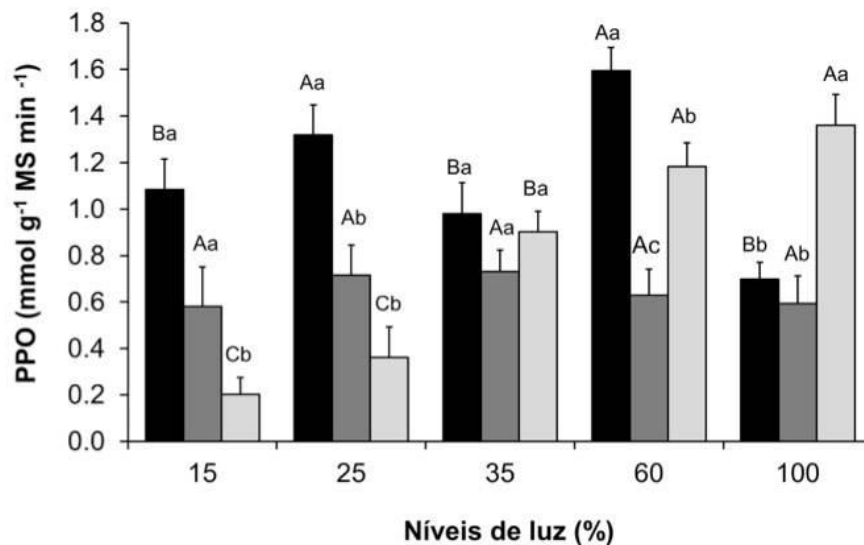


Figura 20 - Atividade da enzima oxidase do polifenol (PPO) em folhas de plantas de *C. echinata* submetidas a cinco níveis de luz. Variante pequeno (■), variante médio (■) e variante grande (■). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, para o mesmo variante morfológico, e médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o mesmo nível de luz, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), ($n=6$).

4.8. Transferibilidade de *primers* e avaliação da expressão gênica induzida pela luz

Inicialmente foi realizada uma busca nos bancos de dados de sequências gênicas com o intuito de delinear *primers* específicos para *C. echinata*. Entretanto, como não foram encontradas sequências específicas anotadas para a espécie, genes alvos e endógenos de três diferentes espécies lenhosas (*T. cacao*, *C. sinensis* e *E. grandis*) foram selecionados e tiveram a expressão em *C. echinata* avaliada por qPCR. Os *primers* utilizados amplificam genes que estão relacionados à fase fotoquímica da fotossíntese (*psbA*, *psbO*, *F3-5H* e *Citocromo450*), às respostas do metabolismo antioxidativo (*SOD*, *CAT*, *APX*, *GPX* e *PPO*), a diferenciação de parede celular secundária (*Caucineurina*, *Tiorredoxina*,

Inver/pectina, *PoliGal*, *corismato* e *NOD-Like*), ao transporte de água (aquaporinas e *PIP-1*) e ao choque térmico (*hsp-70*).

A transferibilidade entre os *primers* das espécies lenhosas para *C. echinata* foi avaliada considerando dois importantes fatores: amplificação específica e a formação de pico único para a curva de dissociação. Diante destes critérios, dos 22 *primers* utilizados para as qPCR's apenas os *primers psbA* e *GAPDH* (normalizador) oriundos de sequências de *T. cacao*, e os *primers Tiorredoxina* e *Corismato* provenientes de *E. grandis* apresentaram características que permitiram seguir com a análise de expressão gênica relativa (Figura 21). Os demais *primers* não amplificaram ou geraram produtos inespecíficos a partir das reações de amplificação (Anexo 1). Embora os produtos amplificados neste experimento ainda necessitem ser sequenciados para confirmação dos produtos gerados, pode-se considerar que houve um êxito de 18% considerando a transferibilidade dos *primers* utilizados.

Para o gene *psbA*, a maior expressão em nível foliar foi verificada para VM nos níveis de luz correspondentes a 15 e 60%, considerando o nível de 100% de luz (pleno sol) como controle (Figura 22 A). A variação observada para VM no nível de luz 60% foi 45 vezes superior, enquanto que foi aproximadamente 30 vezes maior para VM no nível de luz 15%. Ainda para a expressão do *psbA*, foi possível notar um aumento no acúmulo de transcritos para VP nos níveis de luz correspondentes a 15 e 60%, este aumento foi cerca de seis e três vezes maior, respectivamente (Figura 22 A).

A variação de expressão observada para o gene *Tiorredoxina* foi maior para VG no nível de luz 60% (Figura 22 B). Neste nível de luz, o aumento observado para VG foi de 475 vezes para o acúmulo deste transcrito, quanto comparado com o controle 100%. No nível de luz 60%, ainda foi possível observar que para VP houve uma redução da expressão deste gene. O nível de luz 15% também induziu aumento de expressão da *tiorredoxina* apenas para VG (3 vezes), enquanto que para VP e VM houve redução da expressão (Figura 22 B).

Os níveis de luz 15 e 60% promoveram maior variação de expressão dos transcritos de *Corismato* para VG (Figura 22 C). Este variante apresentou aumento de 520 vezes a 60% de luz, enquanto que a 15% o aumento foi de 5 vezes. Para VM

também foi verificado aumento da expressão no nível de luz 60%, contudo este aumento foi mais discreto (3 vezes), em relação ao controle 100%. Neste mesmo nível de luz VP praticamente não apresentou variação da expressão dos transcritos de *corismato*. Já para o nível de luz 15%, VP e VM apresentaram redução da expressão (Figura 22 C).

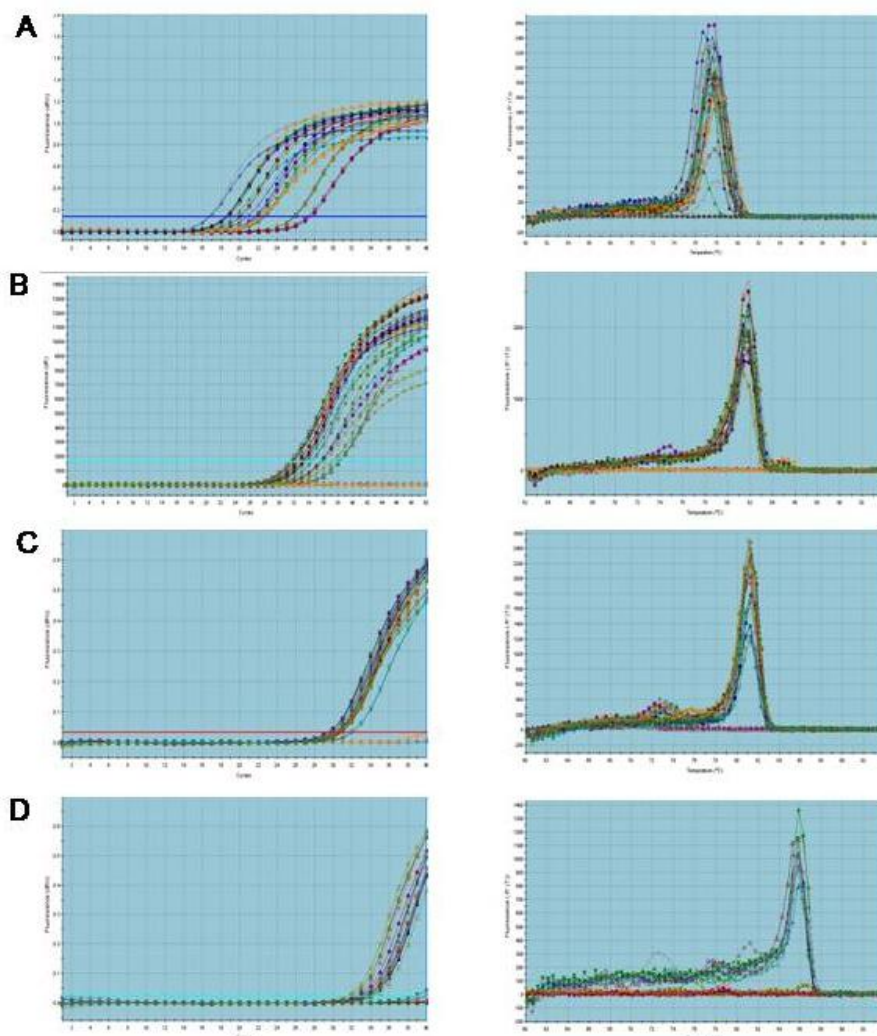


Figura 21 - Amplificação e curva de dissociação dos genes (A) *psbA* e (B) *Gapdh* de *Theobroma cacao* e (C) *Tiorredoxina* e (D) *Corismato* de *Eucalyptus grandis*.

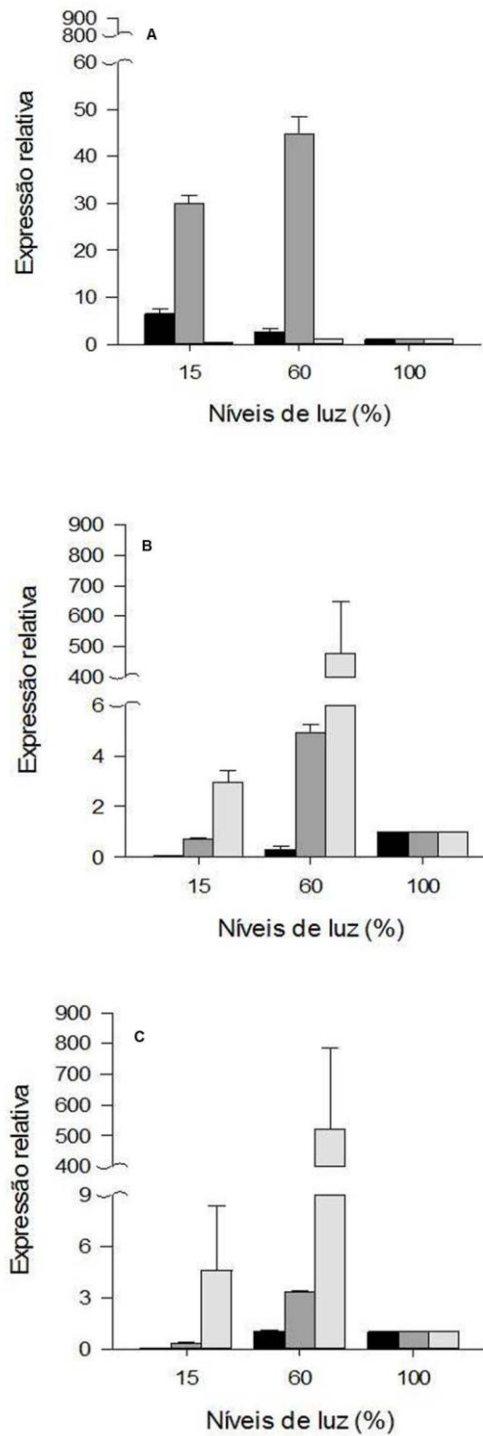


Figura 22 - Expressão relativa dos genes *psbA* de *T. cacao* (A) e dos genes *Tiorredoxina* (B) e *Corismato* de *E. grandis* (C) em folhas maduras de três variantes morfológicas de *C. echinata* [(■) = Variante pequeno (VP); (■) = Variante médio (VM); (■) = Variante grande (VG)] submetidos a três níveis de luz (15, 60 e 100%).

5. DISCUSSÃO

5.1. Fluorescência transiente

Por meio da análise da cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* (curva OJIP) pôde-se obter informações sobre os parâmetros estruturais e funcionais, que quantificam o desempenho do maquinário fotossintético durante a fase fotoquímica (STRASSER, 2004; LAZÁR, 2006; TSIMILLI-MICHAEL, 2008). O comportamento diferencial da cinética da emissão de fluorescência para VP, VM e VG, entre os ambientes mais e menos sombreados, permitiu inferir a existência de possíveis danos em nível de PS 2, nas células dos tecidos foliares destes variantes de *C. echinata* (Figura 12 A, B e C).

Para os três variantes de *C. echinata* avaliados, houve pouca variação nos valores de F_0 com o incremento dos níveis de luz, ao passo que para F_m observou-se maiores valores nos menores níveis e um menores valores em níveis mais elevados de luz (Tabela 4). Os valores de F_m e F_0 são bons indicadores dos efeitos dos estresses ambientais sobre o maquinário fotossintético (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Seus valores podem aumentar se o centro de reação de PS2 estiver comprometido ou se a transferência de energia de excitação do complexo antena, para o centro de reação, estiver danificado (BAKER; ROSENQVST, 2004). Os valores de F_m indicam a intensidade máxima de fluorescência que ocorre quando praticamente toda quinona A (Q_A) está reduzida e os centros de reação são incapazes de aumentar as reações fotoquímicas, atingindo sua capacidade máxima (KRAUSE; WEIS, 1991), ao passo que os valores de F_0 indicam a fluorescência emitida quando Q_A está totalmente oxidado e o centro de reação de PS2 está aberto (BAKER; ROSENQVIST, 2004). Em condições de baixa intensidade de luz há diminuição da capacidade de reoxidação de Q_A (OUKARROUM, 2007) e,

consequentemente, redução no transporte de elétrons até o lado acceptor de PS 1 (YUSUF et al., 2010).

A invariabilidade dos valores de F_0 e F_m implica na existência de uma perfeita distribuição de energia no interior do complexo coletor de luz de PS2 (STUHLFAUTH et al., 1988). Além disso, indica que as moléculas de clorofila de PS2 estão intactas e que sua capacidade para absorção de fótons permanece constante (STUHLFAUTH et al., 1988). O aumento nos valores de F_0 implica no decréscimo na transferência da energia de excitação para os centros de reação de PS2 (DEMMIG; WINTER, 1988). Provavelmente, este aumento é devido a um dano no centro de reação de PS2 (KRAUSE et al., 1988).

A queda nos valores de F_m , com o aumento da intensidade de luz, pode ser atribuída a alterações na distribuição de energia no interior do complexo coletor de luz e a redução da absorção de RAF pelos pigmentos cloroplastídicos (STUHLFAUTH et al., 1988). Em contrapartida, o aumento dos valores de F_m pode ser atribuído à fosforilação de proteínas nas membranas tilacóides (HORTON; BLACK, 1983). Ademais, os valores de F_m são proporcionais a quantidade de moléculas de clorofila *a* no tecido foliar (MIRANDA et al., 1981). Barazetti (2013), ao avaliar estes três variantes de *C. echinata*, nos mesmos níveis de luz, verificou que houve um aumento dos teores de clorofilas *a*, *b* e total nas plantas cultivadas em ambientes mais sombreados.

O rendimento de F_v é determinado principalmente por reações de oxidorredução do acceptor primário de elétrons (Q_A) e pelo grau de energização de membranas tilacóides (ÖGREN; BAKER, 1985). O decréscimo de F_v pode indicar a existência de danos no centro de reação de PS2 associados com a redução do transporte fotossintético de elétrons para PS2 (KRAUSE; BEHREND, 1986). As respostas dos valores de F_v revelam o nível de excitação e energia dos pigmentos e são dependentes no balanço entre RFA e a soma dos valores da taxa de transporte de elétrons e dissipação de calor, os quais podem ser estimados pela razão das extinções fotoquímica (q_p) e não fotoquímica (q_N) (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Os valores de F_v/F_m variaram de 0,6 a 0,8 para os variantes morfológicos de *C. echinata* nos diferentes níveis de luz (Tabela 4). Para os variantes estudados, as

plantas expostas a pleno sol e a 60% de luz exibiram valores menores de F_v/F_m quando comparado com as plantas sob condições sombra; a exceção de VM, cujo decréscimo ocorreu somente a pleno sol (100% de luz). A razão F_v/F_m estima a eficiência quântica máxima de PS2, sendo quase constante para a maioria das espécies vegetais sob condições não limitantes (BJÖRKMAN; DEMMIG-ADAMS, 1987). Geralmente, os valores de F_v/F_m variam de 0,75 a 0,85 e são indicativos de uma eficiente conversão de energia luminosa em nível de PS2 para a produção de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989; BAKER, 2008).

Há uma relação linear entre o decréscimo de F_v/F_m e o rendimento quântico fotossintético ótimo (KRAUSE; WEIS, 1991). Baixos valores de F_v/F_m , evidenciados para os variantes de *C. echinata* cultivados em 60 e 100% de luz, implica na redução da eficiência fotoquímica de PS2 (DEMMIG; BJÖRKMAN, 1987). A exposição de plantas jovens a altas intensidades de luz podem intensificar os efeitos causados pela fotoinibição (VALLADARES; PEARCY, 1997). Embora as causas que alteram F_v/F_m sejam complexas, a razão F_v/F_m é um bom indicador de dano fotoinibitório, quando plantas estão sujeitas a estresses do ambiente (BAKER et al., 1983). Deste modo, pode-se afirmar que os variantes morfológicos de *C. echinata*, submetidos a altas intensidades de luz, apresentaram uma maior tendência a fotoinibição, principalmente VP e VG, ao passo que para VM a fotoinibição ocorreu somente a pleno sol. Resultados semelhantes foram também encontrados por Mengarda et al. (2012) para VP de *C. echinata*. Em contrapartida, Barazetti (2013) verificou que mesmo em pleno sol, VP obteve um maior acúmulo de biomassa seca em relação a VG e VM, respectivamente. Além disso, este autor também encontrou, para os três variantes de *C. echinata*, um maior acúmulo de carotenóides nos níveis mais elevados de luz. O aumento do teor de carotenóides pode atuar na aclimação a alta intensidade de luz por desempenharem um papel relevante na dissipação de energia sob a forma de calor, exercendo, desta forma, uma ação fotoprotetora do maquinário fotoquímico e prevenindo danos fotooxidativos às moléculas de clorofilas (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 2006). Provavelmente, esta fotoinibição, observada nos maiores níveis de luz, seja reversível, não chegando a comprometer a produção de biomassa.

5.2. Plasticidade anatômica foliar

As plantas, em geral, apresentam capacidade de aclimatar-se, em maior ou menor grau, em função dos diferentes níveis de luz ao qual estão submetidas (GIVNISH, 1988; VALLADARES et al., 2000). Segundo Larcher (2000), as mudanças fenotípicas às condições de radiação do ambiente ocorrem principalmente durante a diferenciação do órgão assimilador. A plasticidade anatômica foliar em função da intensidade de luz é amplamente relatada em espécies arbóreas tropicais e favorece a distribuição das plantas em ambientes florestais variados (JUSTO et al., 2005). A capacidade de alterar a estrutura das folhas em resposta a diferentes níveis de luz é um atributo comum das espécies que apresentam amplo potencial de aclimação (BJÖRKMAN, 1981). Estudos a respeito da morfologia e anatomia vegetal podem fornecer informações a respeito da modificação nas características em função de variáveis ambientais, tais como alteração na disponibilidade de luz, sendo amplamente utilizados para estudos ecológicos e taxonômicos (SULTAN, 2001). Tais alterações variam entre as espécies e dependem do gradiente de luz que as espécies recebem (POORTER et al., 2003) ou de seu estágio sucessional (STRAUSS-DEBENEDETTI; BAZZAZ 1991).

As folhas de sol geralmente apresentam uma lâmina foliar mais espessa, com um maior desenvolvimento da epiderme e da espessura da parede, assim como o aumento da cutícula, que funcionam como uma superfície refletora que permite a planta reduzir a perda de água além de permitir a redução do aumento da temperatura foliar (ASHTON; BERLYN, 1992). Em contrapartida, as folhas aclimatadas as condições de sombra exibem, de modo geral, uma lâmina foliar menos espessa, devido ao consumo de fotoassimilados para a expansão da área foliar (FAHL et al., 1994) e, deste modo, aumentam a superfície de absorção da radiação luminosa e, assim, a maximização do ganho fotossintético (VOLTAN, et al., 1992; LAMBERS, et al., 2008).

Os resultados encontrados para os três variantes de *C. echinata* estão de acordo com os observados por vários autores sobre as diferenças anatômicas entre folhas de sol e sombra (CAMPOS; UCHIDA 2002; GIVNISH et al., 2004;

MONTANARI et al., 2004; MORAIS et al., 2004). Em virtude da capacidade de transmissão de luz para regiões mais internas do mesofilo, várias camadas de PP geralmente ocorrem em conjunto com folhas mais espessas que estão em condições de alta intensidade de luz (SMITH et al., 1997). De acordo com Larcher (2000), o aumento da intensidade de luz proporciona um incremento na espessura foliar devido ao alongamento e, ou adição de células de PP. A especialização de PP, que torna a fotossíntese mais eficiente, não está relacionada apenas a um maior número de cloroplastos por célula, mas também com as dimensões de suas áreas de superfície livre (COSTA et al., 1998). Em plantas cultivadas a pleno sol, a camada paliçádica é mais diferenciada, com a área de superfície livre mais elevada, apesar de que o volume de espaços intercelulares de PL seja muito maior, quando comparado a camada paliçádica. No entanto, o aumento da espessura das folhas a pleno sol traz elevado custo energético, com consequente investimento de biomassa (OGUCHI et al., 2003). No presente trabalho, o maior valor da espessura da camada de PP e, portanto, de M em pleno sol (Figura 14) está relacionado com o aumento na espessura e, ou tamanho das células da camada paliçádica.

As alterações que ocorrem no mesofilo foliar, principalmente no PP, garantem uma absorção uniforme da radiação luminosa do ambiente (TAIZ; ZEIGER, 2013). O formato característico das células de PP permite a penetração mais profunda dos feixes de luz e sua distribuição uniforme para os cloroplastos (VOLTAN et al., 1992). A luz que não é absorvida pelas células de PP passa para PL, onde será redistribuída (ASHTON; BERLYN, 1992). A grande quantidade de espaço e o formato irregular das células deste tecido favorecem a distribuição da luz e aumenta a área de superfície celular para a difusão do CO₂ e de outros gases nas folhas (JUSTO, 2005).

5.3. Peróxido de hidrogênio

O maior acúmulo foliar de H₂O₂, em função do aumento da irradiância, evidenciado pela intensidade da cor castanha na presença DAB-HCl, em consequência da formação de polímeros insolúveis (ŠNYRYCHOVÁ et al., 2009), foi verificado principalmente para VP e VG (Tabela 5). A intensa produção de espécies

reativas de oxigênio (ROS), tais como H_2O_2 em plantas, também conhecido como explosão oxidativa, é um evento precoce da resposta da planta a diferentes níveis de estresse, e atua como um sinal para a produção de metabolismo secundário (LOW; MERIDA, 1996). A formação de H_2O_2 é o fenômeno mais importante da transdução de sinal induzido por situações de estresse, que altera o conteúdo dos agentes redox e o estado redox de células (JABS et al., 1997). Grande parte de H_2O_2 é eliminada pelas peroxidases localizadas no vacúolo, parede celular e citosol (ZHANG et al., 2010). H_2O_2 é moderadamente reativo e possui meia-vida relativamente longa (1 ms), quando comparado a outros ROS, tais como $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} e 1O_2 , que possuem meia-vida curta (2-4 μ s) (BHATTACHARJEE, 2005). Já é bem estabelecido que o excesso de H_2O_2 nas células leva à ocorrência de estresse oxidativo. H_2O_2 pode inativar proteínas por oxidar seus grupos tióis. Além disso, desempenha um duplo papel nas plantas, pois, quando em baixas concentrações, atua como molécula sinalizadora no processo de aclimatação, induzindo tolerância a diversos estresses bióticos e abióticos; e, quando em altas concentrações pode levar a morte celular programada (QUAN et al., 2008).

5.4. Peroxidação lipídica

Os maiores índices de peroxidação lipídica (TBARS) de membranas celulares de tecidos foliares de variantes de *C. echinata* foram observados nos maiores níveis de luz e nos quais foram evidenciados os maiores acúmulos de H_2O_2 . A peroxidação lipídica é considerada como um dos processos mais prejudiciais para os organismos vivos. Os danos causados às membranas às vezes é tomado como um único parâmetro para determinar o nível de destruição de lipídios em várias situações de estresse (GARG; MANCHANDA, 2009). Na presença de ROS e na ausência de mecanismos de proteção, pode ocorrer oxidação de proteínas e lipídeos nas membranas celulares, a qual pode levar a um aumento no extravazamento de eletrólitos, com o concomitante incremento do teor de malondialdeído (MDA) (MITTLER, 2002). Os índices de TBARS, principalmente MDA – um produto de decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, têm sido utilizados, muitas vezes, como um biomarcador adequado para o estresse oxidativo

(LIMA; ABDALLA, 2001). A peroxidação lipídica está ligada à atividade de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo (SOD, APX, GPX e CAT); portanto, o aumento da atividade destas enzimas indica uma boa atuação do mecanismo de defesa na detoxificação de ROS e, deste modo, uma redução aos danos da membrana (ESFANDIARI et al., 2007; MITTLER, 2002).

5.5. Metabolismo antioxidativo

O estudo das enzimas do metabolismo antioxidativo vem sendo utilizado para identificar possíveis estresses em plantas submetidas a condições adversas (KNIGHT; KNIGHT, 2001; APEL; HIRT, 2004). Em condições normais, ROS são produzidos pelas células (ALSCHER et al., 2002), porém, em condições de estresse, como altas ou baixas intensidades de luz, as plantas estão sujeitas ao aumento da produção de ROS (KNIGHT; KNIGHT, 2001), podendo acarretar sobrecarga ao metabolismo celular (ALSCHER et al., 2002) levando ao estresse oxidativo.

Os efeitos deletérios, resultantes do dano oxidativo, podem ser minimizados pela atuação do metabolismo antioxidativo (CHAOUÏ; EL FERJANI, 2005), fenômeno complexo e altamente compartimentalizado, que inclui tanto mecanismos enzimáticos como não enzimáticos (MITTLER, 2002). Importantes enzimas tais como SOD, CAT, GPX, APX e PPO atuam em diversos compartimentos celulares, e de forma conjunta, para eliminar o excesso de ROS produzido (SCANDALIOS, 2005).

Os variantes morfológicos *C. echinata* apresentaram diferentes respostas, quando cultivados em diversas intensidades de luz, em relação às atividades das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo. Observou-se pouca variação na atividade de SOD, com o incremento da intensidade de luz, para os três variantes morfológicos de *C. echinata*, cujas maiores diferenças foram encontradas no tratamento de 35% de luz. Em contrapartida, Gama (2013) verificou, para VM de *C. echinata*, que a atividade de SOD foi maior nas plantas sombreadas em relação às de pleno. Por outro lado, Bulbovas et al. (2005) verificaram que a atividade de SOD foi estimulada diferentemente com a mudança de temperatura.

A SOD é o antioxidante intracelular mais eficaz, é onipresente em todos os organismos aeróbicos e em todos os compartimentos subcelulares propensos ao estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010). Tem sido proposto por vários autores como uma importante enzima na tolerância ao estresse em plantas, por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados de ROS (ALSCHER et al., 2002; GILL; TUTEJA, 2010). A atividade de SOD é crucial para a remoção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), logo esta enzima é a primeira a atuar no ciclo ascorbato-glutationa (BRAY et al. 2000), e pode exercer um papel importante na defesa das plantas contra o estresse oxidativo induzido por fatores ambientais.

As enzimas CAT, APX e GPX são as que mais atuam detoxificando o excesso de H_2O_2 em plantas, cujas atividades consistem na conversão de H_2O_2 (ZHANG et al., 2010). Entretanto, as peroxidases catalisam a oxidação de H_2O_2 com o auxílio de agentes redutores (FAVARETTO et al., 2011; ASADA, 2006; BULBOVAS et al., 2005). Além disso, CAT apresenta uma das maiores taxas de detoxificação de H_2O_2 , em relação a APX e GPX, sendo capaz de converter milhares de moléculas por minuto sem necessitar de um substrato redutor (GILL; TUTEJA, 2010). Entretanto, no presente trabalho, a atividade de CAT foi reduzida em todos os variantes morfológicos de *C. echinata* avaliados. Alguns autores relacionam a redução da atividade de CAT a uma maior sensibilidade dessa enzima à inativação ou à degradação, em virtude da intensidade de luz (ELSTNER; OSWALD, 1994). Muitos estudos demonstram que CAT apresenta uma diminuição em sua atividade, quando submetida a altas intensidades de luz (FAVARETTO et al., 2011). Normalmente, as reações de CAT tornam-se mais importantes quando há um grande acúmulo de H_2O_2 nas células, pois, em concentrações normais, o H_2O_2 é reduzido pela redutase da glutatona e pelas peroxidases (GILL; TUTEJA, 2010). Verificou-se, neste trabalho, que os variantes de *C. echinata* utilizaram, principalmente, a enzima APX para eliminar o excesso de H_2O_2 produzido. De acordo com Gill e Tuteja (2010), APX é a peroxidase mais importante na eliminação do excesso de H_2O_2 . Além disso, esta enzima apresenta maior afinidade por H_2O_2 do que CAT e GPX, e pode ter um papel mais importante na detoxificação de ROS durante o estresse (NOCTOR; FOYER 1998; GILL; TUTEJA, 2010). Deste modo, em ambientes naturais, as respostas do mecanismo antioxidativo às variações ambientais vão depender da

capacidade da planta de se aclimatar a uma maior ou menor exposição à radiação solar (BULBOVAS et al., 2005). Isso se deve ao aumento na concentração de ROS, em condições ambientais extremas, e, conseqüentemente, ao estímulo do mesmo modo do metabolismo antioxidativo (BRAY et al., 2000; KUK et al., 2003).

Houve, para VG, um aumento da atividade de PPO com o incremento da intensidade de luz. Entretanto, para VP, este aumento ocorreu principalmente em 25% e 60% de luz, ao passo que para VM a atividade se manteve constante. A localização de PPO nas células vegetais depende da espécie e idade, sendo que uma parte considerável de sua atividade está localizada nos cloroplastos (DOGAN et al., 2005). Segundo estes autores, tripsina e luz são necessárias para ativação de PPO em nível de cloroplasto. PPO também atua no controle e prevenção dos danos causados por ROS, além de ser importante no processo de oxidação de compostos fenólicos, lignificação e deposição suberina (IBRAHIM; JAAFAR, 2012).

5.6. Transferibilidade de *primers*

A expressão relativa para os genes *psbA*, *corismato* e *tiorredoxina* foi diferente para os três variantes morfológicos de *C. echinata* avaliados (Figura 22 A, B e C). A expressão gênica de *psbA* foi maior para VM em 60% de luz, ao passo que as expressões gênicas de *corismato* e *tiorredoxina* foram maiores para VG também em 60% de luz.

O gene *psbA* está localizado no genoma cloroplastídico, logo de herança citoplasmática, e codifica a proteína PSBA ou D1 intrínseca de PS2 (NELSON; YOCUM, 2006). A regulação da expressão deste gene pela luz acontece principalmente em níveis pós-transcricionais e traducionais, de maneira que os cloroplastos mantêm um *pool* estável de RNA_m de *psbA* (DWIVEDI; BHARDWAJ, 1994). A proteína D1 faz parte do centro de reação de PS2 e é responsável pela redução da plastoquinona e pelo complexo de evolução do oxigênio (NIXON et al., 1991). Além disso, a proteína D1 é facilmente danificada por meio do excesso de luz, logo deve ser removida das membranas tilacóides e substituída por uma cópia recentemente sintetizada, ao passo que as outras partes do centro de reação de PS2 são projetadas para serem recicladas (ARO et al., 1993). Muitos dos efeitos do

excesso de luz estão localizados em PS2 e pode induzir fotoinibição crônica. A fotoinibição crônica pode, em parte, resultar do desequilíbrio entre degradação e síntese da proteína D1, cuja vida média é de aproximadamente 2 h (GOH et al., 2011). Segundo estes autores, o estresse por irradiância promove aumento na produção de ROS, caracterizando o estresse oxidativo, que, em última análise, inibe a síntese de novas proteínas D1, atuando no processo traducional; aumentando, desta forma, os danos fotooxidativos. Logo, a maior expressão de psbA para VM a 60% de luz pode ter contribuído pela não ocorrência de fotoinibição neste nível de luz, ao contrário dos variantes VP e VG que apresentaram fotoinibição tanto em 60% quanto em 100% de luz.

A maior expressão dos genes tiorredoxina e corismato foi para VG em 60% de luz (Figura 24 B e C). As tiorredoxinas são bissulfeto redutases que regulam o estado redox de proteínas-alvo. Seu principal papel nos sistemas vegetais é o de aumentar a tolerância das plantas ao estresse oxidativo (MEYER et al., 2005). Algumas tiorredoxinas apresentam funções altamente específicas como, por exemplo, a HCF164, envolvida na biogênese do complexo da citocromo b6f em *Arabidopsis*, presente nas membranas tilacóides de plantas superiores, e possuindo uma posição central no transporte de elétrons (LENNARTZ et al., 2001). As tiorredoxinas presentes no cloroplasto regulam a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono (RUELLAND; MIGINIAC-MASLOW, 1999). Além disso, as tiorredoxinas são preferencialmente expressas em folhas em resposta à variação da intensidade e qualidade da luz, o que provavelmente indica uma função no balanço redox relacionado ao metabolismo fotossintético (MEYER et al., 2005). Por outro lado, o gene corismato codifica para a proteína mutase do corismato, a primeira enzima da rota do ácido xiquímico, que leva à biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina (EBERHARD et al., 1993). Os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano possuem um duplo papel nas plantas, pois são requeridos na biossíntese de proteínas e precursores de metabólitos aromáticos secundários, incluindo o hormônio auxina (ácido 3-indolacético, AIA), que é um regulador de crescimento da planta; alcalóides antimicrobianos, flavonóides; e compostos polifenólicos tais como as ligninas que são requeridas para a estrutura das paredes celulares vegetais. Diferentemente dos metabólitos primários, os

metabólitos secundários não são considerados necessários para a sobrevivência celular, mas são essenciais ao desenvolvimento normal da planta (MOBLEY et al., 1999). Logo, a maior expressão dos genes tiorredoxina e corismato para VG, em altas intensidades de luz, potencializou o seu metabolismo antioxidativo, em nível de cloroplasto e de mitocôndrio, ativando tanto os mecanismos de defesa enzimáticos como não enzimáticos, aumentando assim a sua tolerância ao estresse oxidativo em condições de alta irradiância.

6. CONCLUSÕES

Com a variação da intensidade de luz, os variantes morfológicos pequeno (VP), médio (VM) e grande (VG) de *C. echinata* ajustaram seu maquinário fotossintético, no sentido de maximizar os ganhos de energia, por meio de plasticidade fenotípica, promovendo mudanças no metabolismo antioxidativo, na expressão gênica, cinética de emissão de fluorescência da clorofila e morfologia em nível foliar.

As plantas de VG se aclimataram melhor nos maiores níveis de luz, ao passo que as de VP e VM se aclimataram nos ambientes mais sombreados. Logo, plantas VG apresentam potencialidades para serem utilizadas na recomposição de ecossistemas antropizados, como clareiras e fragmentação de matas; enquanto que as plantas de VP e VM podem ser usadas na recomposição do bioma Mata Atlântica e em condições de sub-bosque. Além disso, os três variantes morfológicos de pau-brasil podem ser usados, também, em programas de recomposição de matas, mesclando espécies com diferentes exigências de luz, no intuito de acelerar a dinâmica da vegetação.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. et al. Germinação de sementes e produção de mudas de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil): efeito de sombreamento. **Árvore**, v. 29, n. 6, p. 871-875, 2005.
- AKUNDA, E. M. W., IMBAMBA, S. K., KUMAR, D. High density planting of coffee. II. Adaptive changes in some plant characteristics. **East Afr. Agric. For. J.**, 45: 133-136, 1979.
- ALMEIDA, S. M. Z.; SOARES, A. M.; CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; GAJEGO, E. B. Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. **Revista Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 63, 2005.
- ALSCHER, R. G. ; ERTHUK, N. HEATH, L.S. Role os superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 53 (372): 1331-1341, 2002.
- ALVES, P.L.; MAGALHÃES, A.C.N.; BARJA, P.R. The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. **The Botanical Review**, v. 68, n. 2, p. 193- 208, 2002.
- AMANO, E. Pau-brasil, madeira e casca: formação, desenvolvimento e estrutura. **Tese de doutorado**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

ANGYALOSSY, V.; AMANO, E.; ALVES, E. S. Madeiras utilizadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: aspectos anatômicos. **Acta Botanica Brasilica**. v. 19, n. 4, p. 819-834, 2005.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**. v. 55, p. 373-399, 2004.

ARO, E., MCCAFFERY, S. & ANDERSON, J.M. Photoinhibition and D1 protein degradation in Peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiology*, 103: 835-843, 1993.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiol.**, 141: 391-396, 2006.

ASHTON, P.M.S.; OLANDER, L.P.; BERLYN, G.P.; THADANI, R. & CAMERON, I.R. Changes in leaf structure in relation to crown position and tree size of *Betula papyrifera* within fire-origin stands of interior cedar-hemlock. **Canadian Journal of Botany** 76(7): 1180-1187, 1998.

ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, Â. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de Biomassa e características anatômicas de plantas Jovens de *bauhinia forficata* link submetidas à diferentes condições de sombreamento. **Ciências agrotécnica**, Lavras, v.25, n.4, p.853-862 , jul./ago., 2001.

BAKER, N.R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annu. Rev. Plant Biol.** n. 59, pp.89–113, 2008

BAKER N.R. & ROSENQVIST E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**. 55, 1607–1621, 2004.

BALDI, P. MUTHUCHELIAN, K. LA PORTA, N. Leaf plasticity to light intensity in Italian cypress (*Cupressus sempervirens* L.): Adaptability of a Mediterranean conifer cultivated in the Alps. **Journal of Photochemistry and Photobiology** v. 117, p. 61-69, 2012.

BARAZETTI, V. M. Respostas fisiológicas de plantas jovens variantes de pau-brasil a diferentes níveis de irradiância. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, 2013.

BARBEDO, C.J.; BILIA, D.A.C.; RIBEIRO, R.C.L.F. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Rev. Bras. Bot.**, v. 25, n. 4, p. 431-439, Dez. 2002.

BARBER, A.D., HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Amer. Pharm.** 34 (9), 26-35, 1994.

BARONI, A. M. Caracterização do sistema fotossintético em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). 67 f. **Dissertação de Mestrado**, Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo. 2005.

BARROS, F. DE V.; GOULART, M. F.; SÁ TELLES, S. B.; LOVATO, M. B.; VALLADARES, F. e LEMOS-FILHO, J. P. Phenotypic plasticity to light of two congeneric trees from contrasting habitats: Brazilian Atlantic Forest versus cerrado (savanna). **Plant Biology**, 14: 208–215, 2011.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut**, 47, 233-261, 1996.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, 89 (7), 1113-1121, 2005.

BJÖRKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: **Encyclopedia of Plant Physiology**. Vol. I. New Series. Eds. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler. Springer-Verlag, Berlin, p. 57-107, 1981.

BJORKMAN, O.; DEMMIG-ADAMS, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 k among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504, 1987.

BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 28: 355-377, 1977.

BOEGER, M. R. T.; ESPÍNDOLA JÚNIOR, A.; MACARI JÚNIOR, A.; REISSMANN, C. B.; ALVES, A. C. A.; RICKLI, F. L. Variação estrutural foliar de espécies medicinais em consórcio com erva-mate, sob diferentes intensidades luminosas. **Floresta**, v. 39, n. 1, p. 215-225, 2009.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; ÖQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E. G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol.* 3: 497-514, 1989.

BRAY, E. A., BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. *In Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (B.B. Buchanan, W. Gruissen, & R.L. Jones, eds.). **American Society of Plant Physiologists**, New York, p.1158-1203, 2000.

BUDOWSKI, A. Distribution of tropical rain forest species in the light of. Successional progress. **Turrialba**, v. 15, p. 40-42, 1965.

BULBOVAS P., RINALDI, M. C. S., DELITTI, W. B. C., Domingos M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica**. vol. 28 no 4. 2005.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 83 (3): 463–468, 1991.

CAMPOS, M.A., UCHIDA, T.: [Influence of shade on the growth of seedlings of three Amazon species. **Pesq. Agropec. Bras.** 37: 281-288, 2002. [In Portuguese.

CHAOUIA,; EL FERJANI E. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. **C. R. Biol.** 328:23-31, 2005.

CARDOSO, M.A.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G. Protegendo os remanescentes de pau-brasil. **Ciência Hoje**. v. 29, n. 174, p. 65-68, 2001.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras - recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: EMBRAPA- CNPF/SPI, 1994.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa, 1039 p. 2003.

CASTRO, C. F. A. **Gestão florestal no Brasil Colônia**. 199 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável) - Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade Nacional de Brasília, Brasília, 2002.

CAI, Z.Q.; RIJKERS, T.; BONGERS, F. Photosynthetic acclimation to light changes in tropical monsoon forest woody species differing in adult stature. **Tree Physiol.**, 25: 1023–1031, 2005.

CHAZDON, R. L. et al. Photosynthetic responses of tropical Forest plants to contrasting light environments. In: **Tropical Forest Plant Ecophysiology**. Eds. S.S. Mulkey, R.L. Chazdon and A.P. Smith. Chapman and Hall, New York, p. 555, 1996.

COSTA, L.C.B., ALMEIDA, A-A.F., VALLE, R.R. Growth, chlorophyll content and anatomical structure in seedlings of *Theobroma cacao* under different irradiances and nitrogen levels.] **Agrotrópica 10**: 21-30, 1998. [In Port.]

CURVELO, K. B. et al. **Manual de plantio e indicações técnicas para manutenção de mudas de Pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) no campo**. Ilhéus: CEPLAC, 26 p, 2008.

DA MATTA, F. M.; MAESTRI, M. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. **Photosynthetica**, 34: 439-446, 1997.

DEMMING-ADAMS, B; ADAMS, W.W. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. **New Phytol.**172: 11-21, 2006.

DEMMIG, B.; BJÖRKMAN, O. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77k) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171: 171-184, 1987.

DEMMIG, B.; WINTER, K. Light response of CO₂ assimilation, reduction state of Q, and radiationless energy dissipation in intact leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 15: 151-162, 1988.

DIAS, D. P.; MARRENCO, R. A. Fotossíntese e fotoinibição em mogno acariquara em função da luminosidade e temperatura foliar. **Pesq. Agropec. Bras.** 42: 305-311, 2007.

DOGAN, S., ARSLAN, O., OZEN, F. Polyphenol oxidase activity of oregano at different stages. **Food Chem.** 91:341-345, 2005.

DOUPIS, G.; BERTAKI, M.; PSARRAS, G.; KASAPAKIS, I.; CHARTZOULAKIS, K. Water relations, physiological behavior and antioxidant defence mechanism of olive plants subjected to different irrigation regimes. *Scientia Horticulturae*, 153: 150-156, 2013.

DUZ, S.R.; SIMINSKI, A.; SANTOS, M.; PAULILO, MTS. Crescimento inicial de três espécies arbóreas da floresta atlântica em resposta a variação na quantidade de luz. **Rev. bras. Bot.** 27: 587-596, 2004.

DWIVEDI, U., BHARDWAJ, R. D1 protein of photosystem II: The light sensor in chloroplasts. **J. Biosci.**, n.1, pp. 35–47, 1995.

EBERHARD J, RAESECKE H, SCHMID J, AMRHEIN N (1993) Cloning and expression in yeast of a higher plant chorismate mutase: Molecular cloning, sequencing of the cDNA and characterization of the *Arabidopsis thaliana* enzyme expressed in yeast. *FEBS* 334 (2): 233-236, 1993.

EGEA, G.; GONZÁLEZ-REAL, M. M.; BAILLE, A.; NORTES, P. A.; CONESA, M. R. E RUIZ-SALLERES. Effects of water stress on irradiance acclimation of leaf traits in almond trees. **Tree Physiology** 32, 450-463, 2012.

ELSTNER, E.F.; OSSWALD, W. Mechanisms of oxygen activation during plant stress. In: CRAWFORD, R.M.M.; HENDRY, G.A.F.; GOODMAN, B.A. (Ed.). Oxygen and environmental stress in plants. Edinburgh: Biological Sciences, **Royal Society of Edinburgh**, p. 131-154, 1994.

ESFANDIARI, E.; SHAKIBA, MR.; MAHBOOB, S.; ALYARI, H.; TOORCHI, M. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. **J Food Agric Environ** 5:149–153, 2007.

FAHL, J. I. et al. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). **J. Hort. Sci.**, 69: 161-169, 1994.

FAVARETTO, V. F. et al. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. **Environmental and Experimental Botany**. v.70; p. 20–28, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA, 220p. 1998.

FONTES, R.S. **Pau-Brasil, um sonho de resgate**. Recife: FUNBRASIL, 217p, 1995.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic link between stress perception and physiological responses. **Plant Cell** 17, 1866–1875, 2005.

FRANKART, C.; EULLAFFROY, P.; VERNET, G. “Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*”, **Environmental and Experimental Botany**, 49: 159, 2003.

GACHON, C. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.402, p.1445-1454. 2004.

GAMA, V.N. **Análises morfofisiológicas de plantas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) cultivadas em pleno sol e em sombreamento natural**. 90 F. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

GARCIA, I. S., SOUZA, A., BARBEDO, C. J., DIETRICH, S. M. C. e FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic forest. **Braz. J. Biol.**, 66(2B): 739-745, 2006.

GARG, N., MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosys.** 143: 8-96, 2009.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59 (2): 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol. Biochemistry** 48: 909 – 930, 2010.

GIVNISH, T. J. Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. **Aust. J. Plant Physiol.**, 15: 63-92, 1988.

GIVNISH, T.J., MONTGOMERY, R.A., GOLDSTEIN, G.: Adaptive radiation of photosynthetic physiology in the *Hawaiian lobeliads*: light regimes, static light responses and whole-plant compensation points. **Amer. J. Bot.** 91: 228-246, 2004.

GONÇALVES, J.F.C.; SANTOS JUNIOR, U. M. Utilization of the chlorophyll a fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. **Braz. J. Plant Physiol.**, 17(3): 307-313, 2005a.

GONÇALVES, J.F.C.; BARRETO, D.C.S.; SANTOS JUNIOR, U.M.; FERNANDES, A.V.; SAMPAIO; P.T.B.; BUCKERIDGE, M.S. 2005. Growth, photosynthesis and stress indicators in young rosewood plants (*Aniba rosaeodora* Ducke) under different light intensities. **Braz. J. Plant Physiol.**, 17(3): 325-334, 2005b.

GONÇALVES, J.F.C.; SILVA, C. E.; GUIMARÃES, D. G.; BERNARDES, R. S. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica** 40(1): 89-98, 2010

GONZÁLEZ, A. V.; GIANOLLI, E. Morphological plasticity in response to shading in three *Convolvulus* species of different ecological breadth. **Acta oecologica**, 26: 185-190, 2004.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol.**, 84: 450-455, 1987.

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

HONG, C.Y.; HSU, Y. T.; TSAI, C.; KAO, C.H. Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. **J.Exp.Bot.**, n.58, pp. 3273-3283, 2007.

HORTON, P.; BLACK, M. T. A comparison between cation and protein phosphorylation effects on the fluoresce induction curve in chloroplasts treated with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. *Biochim. Biophys. Acta* 722: 214-218, 1983.

IBAMA, 2008, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Brasil). Portaria 37N, de 3 de abril de 1992 (www.ibama.gov.br). Acesso em: 14/01/2014.

IBRAHIM, M. H. e JAAFAR, H. E. Primary, Secondary Metabolites, H₂O₂, Malondialdehyde and Photosynthetic Responses of *Orthosiphon stamineus* Benth. to Different Irradiance Levels. **Molecules**, 17, 1159-1176, 2012.

JABS, T.; TSCHOPE, M.; COLLING, C.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94, 4800-4805, 1997.

JUCHUM, F. S.; COSTA, M. A.; AMORIM, A. M.; CORRÊA, R. X. Phylogenetic relationships among morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (Caesalpinioideae: Leguminosae) evidenced by trnL intron sequences. **Naturwissenschaften**. v. 95, p.1085–1091. 2008.

JUSTO, C. F.; SOARES, A. M.; GAVILANES, M.L.; CASTRO, E. M. Plasticidade anatômica das folhas de *Xylopia brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). **Acta bot. bras.** 19(1): 111-123. 2005

KANECHI, M.; UCHIDA, N.U.; YASUDA, T.; YAMAGUCHI, T. Nonstomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, p. 455-460, 1996.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 6, p. 262-267, 2001.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal. Editora Universidade Rural, Seropédica. 1997.

KRAUSE, G. H.; BEHREND, U. Δ pH-dependent chlorophyll fluorescence quenching indicating a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts, **FEBS, lett.** 200(2): 298-302, 1986.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.** 42: 313-349, 1991.

KRAUSE, G. H.; LAASCH, H.; WEIS, E. Regulation of thermal dissipation of absorbed light energy in chloroplasts indicated by energy-dependent fluorescence quenching. **Plant Physiol. Biochem.** 26: 445-452, 1988.

KUK, Y. I., SHIN, J. S., BURGOS, N. R., HWANG, T. E., HAN, O., CHO, B. H., JUNG, S.Y., GUH, J.O. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop Science** 43:2109-2117. 2003.

KUWABARA, T.; KATOH, Y. Involvement of the Binuclear Copper Site in the Proteolytic Activity of Polyphenol Oxidase. **Plant Cell Physiol.** 40(10): 1029-1035, 1999.

LAMBERS, H.; CHAPIM III, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology.** 2 ed. Berlin: Springer, 2008.

LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal.* São Carlos: RiMa, 2006.

LAZAR, D. The O-K-J-I-P chlorophyll a fluorescence transient: Theory and experiments” .62p. Habilitation **Thesis.** 2004.

LAZÁR, D. “The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light”, **Functional Plant Biology**, **33**: 9, 2006.

LENNARTZ K, PLÜCKEN H, SEIDLER A, WESTHOFF P, BECHTOLD N, MEIERHOFF K. HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b6f complex in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 2539–2551, 2001.

LEWIS, G. P. C. **A Revision of the Poincianella – Erytostemon Group.** Royal Botanic Gardens, Kew. Ed. J.M; Lock. 1998.

LI, Z.; Wakao, S.; Fischer, B. B.; Niyogi, K. K. Sensing and Responding to Excess Light. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 60:239–60, 2009.

LICHTENTHALER, H. K. “The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics.”, *Photosynt.*, **27**: 45, 1992.

LIMA, H.C., LEWIS, G.P. & BUENO E. Pau-brasil: uma biografia. *In* Pau-Brasil (E. Bueno, ed.). Axis Mundi Editora, São Paulo, p.39-76, 2002.

LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 37, n. 3, 2001.

LIMA, H.C. Aspectos botânicos do pau-brasil. In: CUNHA, M.W.; LIMA, H.C. (eds). **Viagem a terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, 23-38, 1992.

LIVAK, K. J.; SCHITTEGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. 25(4): 402-408, 2001.

LOBÃO, D. E. V.P. **Agroecossistema cacauero da Bahia: Cacau-cabruca e fragmentos florestais na conservação de espécies arbóreas**. 109 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

LOBÃO D. E.; CARVALHO A. M.; CARVALHO D. L. Ecossistemas e agroecossistemas do Sudeste da Bahia - Bioma Mata Atlântica. In: Universidade Federal da Bahia. **Revista dos Mestrados em Direito Econômico da UFBA: edição especial, 5 - Direito Ambiental**. Salvador, p. 32-45. 1997.

LOBÃO, D. E. et al. Cacau Cabruca – sistema agrossilvicultural tropical. In: VALLE, R. R. (Ed.). **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacauero**. Itabuna: Gráfica e Editora Vital, p. 290-323, 2007.

LOGAN, B. A.; KORNIEYEV, D.; JUSTIN HARDISON, J. e HOLADAY, A. S. The role of antioxidant enzymes in photoprotection. **Photosynthesis Research**. 88: 119–132, 2006.

LONG, S.P., HUMPHRIES, S. & FALKOWSKI, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 45: 633-662, 1994.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. 4 ed, v. 1. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LOW, P.S.; MERIDA, J.R. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. **Physiol. Plant**, 96, 533-542, 1996.

MATOS, F. S.; MOREIRA, C. V.; MISSIO, R. F.; DIAS, L. A. S. Caracterização fisiológica de mudas de *Jatropha curcas* L. produzidas em diferentes níveis de irradiância. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 3, n. 1, p. 126- 134, 2009.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MENGARDA, L. H. G.; SOUZA, R. L. F.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, F. O.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL R. R. F. Light as an indicator of ecological succession in brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 21:55 - 64. 2009.

MENGARDA, L. H. G.; MILANEZ, C. R. D.; SILVA, D. M.; AGUILAR, M. A. G.; CUZZUOL, G. R. F. Morphological and physiological adjustments of Brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.) to direct solar radiation. **Braz. J. Plant Physiol.**, 24(3): 161-172, 2012.

MEYER Y, REICHHELD JP, VIGNOLS F. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynthesis Research* 86: 419–433, 2005..

MIRANDA, V.; BAKER, N. R.; LONG, S. P. Limitation of photosynthesis in different regions of the *Zea mays* leaf. **New Phytol.** 89: 179-190, 1981.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. **Trends Plant Science**, 7:405–410, 2002.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, n. 9, pp. 490 – 498, 2004.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., SUZUKI, N., MILLER, G., TOGNETTI, V. B., VANDEPOELE, K., GOLLERY, M., SHULAEV, V., VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, 6: 300-309, 2011.

MOBLEY EM, KUNKEL BN, KEITH B. Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 240: 115–123, 1999.

MONTANARI, R.M., SOUSA, L.A., LEITE, M.N., COELHO, A.D., VICCINI, L.F., STEFANINI, M.B. Phenotypical plasticity of the external morphology in *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britt. & Wilson in response to level of luminosity and fertilization. **Rev. Bras. Plant. Med.** 6: 96-101, 2004. [In Portuguese.]

MORAIS, H., MEDRI, M.E., MARUR, C.J., CARAMORI, P.H., RIBEIRO, A.M., GOMES, J.C. Modifications on leaf anatomy of *Coffea arabica* caused by shade of Pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Braz. Arch. Biol. Techn.** 47: 863-871, 2004.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, 22 (5): 867-880, 1981.

NELSON, N.; YOCUM, C. F. Structure and function of photosystems I and II. **Annu Rev Plant Biol** 57:521–65, 2006.

NIELSEN, S. L.; SIMONSEM, A.-M. Photosynthesis and photoinhibition in two differently coloured varieties of *Oxalis triangularis* – the effect of anthocyanin content. **Photosynthetica**, 49: 346-352, 2011.

NIXON, P. J., ROGNER, M., DINER, B. A. Expression of a higher plant *PsbA* gene in *Synechocystis* 6803 yields functional hybrid photosystem II reaction center complex. **The Plant Cell**, n.3., pp. 383-395, 1991.

NOCTOR G, FOYER CH. Ascorbate and glutathione keeping active oxygen under control. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 49:249–79, 1998.

OGUCHI, R., HIKOSAKA, K., HIROSE, T.: Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy. **Plant Cell Environ.** 26: 505-512, 2003.

ÖGREN, E.; BAKER, N. R. Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. **Plant Cell Environ.** 8: 539-547, 1985.

OKEY, E. N.; DUNCAN, J. E.; SIRJU CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T. N. *Phytophthora* canker resistance in cacao: role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. **Journal of Phytopathology.** 145, 295-299, 1997.

OLIVEIRA, L. C.; et al. “Fluorescência transiente da clorofila a (O-J-I-P) em orquídeas infectada por *Planococcus citris*”, *Anais do IX Congresso de ecologia do Brasil (SEB)*, São Lourenço-MG, 2009.

ÖQUIST, G.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of PS II. **Planta**, 186: 450-463, 1992.

OUKARROUM, A.; EL MADIDI, S.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence

OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 438–446, 2007.

PEARCY, R. W. Acclimation to sun and shade. **Photosynthesis**, Cambridge University Press, pp.250-263, 2000.

POORTER, L.; BONGERS, F.; STERCK, F.J.; WÖLL; H. Architecture of 53 rainforest tree species differing in adult stature and shade tolerance. **Ecology**, v. 84, p. 602-608, 2003.

POPMA, J.; BONGERS, F. Acclimation of seedlings of three Mexican tropical rainforest tree species to a change in light availability. **J. Trop. Ecol.**, 7: 85-97, 1991.

QUAN, L-J.; ZHANG, B.; SHI, W-W.; LI, H-Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integrat. Plant. Biol.* 50: 2-18, 2008.

RAO, M.K.V., RAGHAVENDRA, A.S., REDDY, K. J. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. **Springer**, 2006.

RAMALHO, J.D.C., CAMPOS, P.S., QUARTIN, V.L., SILVA, M.J., NUNES, M.A. High irradiance impairments on photosynthetic electron transport, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as a function of N availability in *Coffea arabica* L. plants. *J. Plant Physiology*, v. 154, p. 319-326, 1999.

REHEM, B.C., et al. Photosynthesis, chloroplast ultrastructure, chemical composition and oxidative stress in *Theobroma cacao* hybrids with the lethal gene *Luteus-Pa* mutant. *Photosynthetica* 49 (1), p. 127-139, 2011.

RIZZINI, Carlos Toledo. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: Manual de Dendrologia Brasileira**. Ed 1. São Paulo: Edgard Blücher, 294 p, 1971.

RIZHSKY, L.; HALLAK-HERR, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J. E.; RODERMEL, S.; INZE, D, E MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant Journal**, 32, 329–342, 2002.

ROCHA, Y.T. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam. Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RUELLAND E & MIGINIAC-MASLOW M Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends in Plant Science* 4 (4): 136-141, 1999.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; ZORNOZA, P. Copper microlocalisation, ultrastructural alterations and antioxidant responses in the nodules of white lupin and soybean plants grown under conditions of copper excess. **Environ. Exp. Bot.**, 84: 52 – 60, 2012.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHREIBER, U.; KUHL, M.; KLIMANT, I.; REISING, H. "Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe", **Photosynthesis Research**, 47: 103, 1996.

SKADSEN, R.W.; SCHULZ-LEFERT, P.; HERBT, J.M. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two classes of catalase isozyme genes in barley, *Plant Mol. Biol.* 29:1005-1014, 1995.

ŠNYRYCHOVÁ I., AYAYDIN F., HIDEG É. Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo – a comparison of methods. **Physiol. Plantarum** 135:1-18, 2009

SMITH, W.K., VOGELMANN, T.C., DELUCIA, E.H., BELL, D.T., SHEPHERD, K.A.: Leaf form and photosynthesis: Do leaf structure and orientation interact to regulate internal light and carbon dioxide? **Bioscience** 47: 785-793, 1997.

SOUSA, A. O. et al. Comparative transcriptome analysis reveals key gene expression differences between the xylems of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis*. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz 2011.

SOUZA Jr. J.O. **Substratos e adubação para mudas clonais de cacauero**. Piracicaba, Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, DSc. **Thesis**. 2007.

SOUZA, R. P.; VÁLIO, IFM. Seedling growth of fifteen Brazilian tropical tree species differing in successional status. **Rev. Bras. Bot.** 26: 35-47, 2003.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. “Polyphasic chlorophyll a fluorescence transients in plants and cyanobacteria”, *Photochem Photobiol*, 61: 32, 1995.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. “Analysis of the Chlorophyll a fluorescence transient.” In: Papageorgiou, C., Govindjee, (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer, Netherlands, p. 321–362, 2004.

STRAUSS-DEBENEDETTI, S. & BAZZAZ, F.A. Plasticity and acclimation in tropical Moraceae of different successional positions. *Oecologia* 87: 377-387, 1991

STUHLFAUTH, T.; SÜLTEMEYER, D. F.; WEINZ, S.; FOCK, H. P. Fluorescence Quenching and Gas Exchange in a Water Stressed C₃ Plant, *Digitalis lanata*. **Plant Physiology**, 86(1): 246-250, 1988.

SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. **Evolution & Development**, 5 (1): 25-33, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiología vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918p, 2013.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. "In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants", In: Mycorrhiza: Genetics and Molecular Biology, Eco-fuction, Biotechnonology, Eco-physiology, and Struture and Systematic, Varma, A. 3 ed, *Springer*, Berlin, Germany, pp. 679-703, 2008.

VACA, C.E., WILHEM, J., HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mut. Res.**, 195: 137-149, 19

VALLADARES, F. ; WRIGHT, S. J.; LASSO, E.; KITAJIMA, K.; PEARCY, R. W. Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a panamanian rainforest. **Ecology** 81:1925–1936, 2000.

VALLADARES, F.; NIINEMETS, U. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, 39: 237-257, 2008.

VALLADARES, F.; GIANOLI, E.; GÓMEZ, J. M. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. **New Phytologist**, 176: 749–763, 2007.

VALLADARES F., GUZMAÍN B. Canopy structure and spatial heterogeneity of understory light in abandoned Holm oak woodlands. **Annals of Forest Science**, 63, 749–761, 2006.

VALLADARES. F.; PEARCY, R.W. Interations between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibiton in the selerophyll *Heteromeles arbutifolia*. **Plant Cell Environ.** 20: 25-36, 1997.

VOLTAN, R. B. Q.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, 4: 99-105, 1992.

WYKA, T.; ROBAKOWSKI, P.; YTKOWIAK, R. Acclimation of leaves to contrasting irradiance in juvenile trees differing in shade tolerance. **Tree Physiol.**, 27: 1293–1306, 2007.

YANG, Y., HAN, C., LIU, Q., LIN, B., WANG, J. Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings, **Acta Physiol. Plant.**, 30: 433 - 440, 2008.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. “Overexpression of α -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements”, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1797: 1428, 2010.

ZAIDAN, L. B. P. et al. Crescimento e propagação de plantas de pau-brasil. In:2008.

ZHANG X, LI C, NAN Z. Effects of cadmium stress on growth and anti-oxidative systems in *Achnatherum inebrians* symbiotic with *Neotyphodium gansuense*. *J. Haz. Mat.*, 175(1-3):703-709, 2010.

ANEXO

Curvas de amplificação e dissociação obtidas em testes de transferibilidade de primers de espécies lenhosas para *Caesalpinia echinata* via PCR em Tempo Real.

A – *psbO*, B – *hsp70*, C – *Tubulina*, D – *Actina* de *Theobroma cacao*, E – *Gapdh*, F – *SOD*, G – *CAT*, H – *APX*, I – *GPX*, J – *PPO* de *Citrus sinensis*, L – *Caucineurina*, M – *Invert/Pec*, N – *Pip-I*, O – *F3-5H*, P – *PoliGal*, Q – *Aquaporina*, R – *Citocromo450*, S – *NOD-Like*.

