

LOANE VAZ FERNANDES

**ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS, FISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM
CLONES DE EUCALIPTO SUBMETIDOS À OMISSÃO E AO
RESSUPRIMENTO DE N OU P**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F363a
2013

Fernandes, Loane Vaz, 1986-

Alterações nutricionais, fisiológicas e moleculares em clones de eucalipto submetidos à omissão e ao ressuprimento de N ou P / Loane Vaz Fernandes. – Viçosa, MG, 2013.
x, 100f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nairam Félix de Barros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas - Nutrição. 2. Eucalipto. 3. Fertilidade do solo.
4. Regulação da expressão gênica. 5. Eucalipto - Nutrição.
6. Enzimas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Solos. Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. II. Título.

CDD 22. ed. 631.81

LOANE VAZ FERNANDES

**ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS, FISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM
CLONES DE EUCALIPTO SUBMETIDOS À OMISSÃO E AO
RESSUPRIMENTO DE N OU P**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de outubro de 2013.

Cléberson Ribeiro
(Coorientador)

Haroldo Nogueira de Paiva

Herminia Emilia Prieto Martinez

Lafayette Gonçalves Campelo Martins

Nairam Félix de Barros
(Orientador)

*À minha mãe, meu maior estímulo e orgulho,
e a quem devo tudo o que sou e o que conquistei;
Ao meu irmão, pelo apoio;
Ao Júlio, pelo amor*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Solos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à Fapemig pelo financiamento deste trabalho.

Ao professor Nairam Félix de Barros, pela orientação e apoio na execução deste trabalho e durante todo meu tempo no DPS.

Ao professor Júlio César Lima Neves, pela coorientação e auxílio imprescindível em todas as fases deste trabalho.

Ao professor Cléberson Ribeiro pela coorientação, sugestões e apoio em diversas análises.

Ao professor Sergio Brommoshenckel pelas valiosas sugestões a este trabalho.

Aos estagiários e amigos Giulia, Robson, Daniel e, especialmente à Lilian, que foram essenciais em todas as etapas do projeto.

Aos amigos que auxiliaram nas coletas: Nathalia Silva, Alex, Túlio, Vinicius, Maria e Júlio.

Aos amigos das análises: Júlio Delvaux, Fernandinha Freitas, Bárbara, Alice, Carol, Julenice, Fernandinha Schulthais, Cristiane, Regiane, Renato e Ignácio.

Aos professores e funcionários dos laboratórios que utilizei: Solos Florestais (Profs. Nairam e Leonardus; técnicos Cardoso, Beto e Poliane); Fertilidade do Solo (Prof. Mattiello; técnico Carlos Fonseca); Laboratório de Isótopos Estáveis (Prof. Ivo; técnico Reginaldo e Geraldo; Eng. José Luiz); Biofísica (Profs. Cléberson, Juraci e Cambraia; técnico Behring); Fisiologia Molecular (Profs. Marcelo Loureiro e Marcelo Rogalski); Microbiologia do solo (Prof. Maurício; técnico Júlio).

Aos viveiros florestais Esteio (Celso e Maria Luíza) e Clonar (José Mauro Gomes) pela doação das mudas utilizadas neste experimento.

Aos funcionários do Departamento de Solos, sempre dispostos a ajudar: Luciana, Claudinha, Geraldo Robésio, Carlinhos, Edmaldo, Leiliane e Tatiana.

Ao professor Roberto Ferreira de Novais e Victor Hugo Alvarez V. pelas grandes contribuições na minha formação como pesquisadora em Fertilidade do Solo.

Aos professores Ivo Ribeiro da Silva, Reinaldo B. Cantarutti, João Carlos Ker, Hugo A. Ruiz, Leonardus Vergutz e Renildes Lúcio F. Fontes, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos professores Haroldo Paiva Nogueira, Herminia Emilia P. Martinez e Lafayette Campelo Martins pelas sugestões no momento da defesa.

Aos amigos de Viçosa e do DPS, muito importantes nos momentos de dificuldades e cansaço, e claro nos momentos de descontração.

Ao Júlio, que, com seu amor, torna-se cada vez mais importante e presente na minha vida.

BIOGRAFIA

LOANE VAZ FERNANDES, filha de João Braga Fernandes (*sempre presente*) e Maria José Vaz Fernandes, natural de Patos de Minas, Minas Gerais, nasceu no dia 08 de Janeiro de 1986.

Em março de 2004 iniciou o curso de graduação em Engenharia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa, onde se graduou em julho de 2008. Durante a graduação foi estagiária de pesquisa na área de Ecologia Florestal e Solos Florestais e monitora da disciplina de Fertilidade do Solo.

Em agosto de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2010, com título "Normas e determinação de faixas de suficiência para diagnose foliar com base no crescimento relativo de eucalipto".

Em março de 2010 iniciou seu doutorado no Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo a defesa de sua tese em outubro de 2013.

ÍNDICE

	Página
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	4
Capítulo 1- Atividade de enzimas e expressão de genes associadas à remobilização de N e P em clones de eucalipto submetidos à omissão e ao ressuprimento de N e P.....	7
Resumo.....	7
Introdução.....	9
Materiais e Métodos.....	13
Resultados.....	21
Discussão.....	30
Conclusão.....	35
Referências Bibliográficas.....	36
Capítulo 2-Crescimento, teores nutricionais e de pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> em clones de eucaliptos submetidos à omissão e ressuprimento de N ou P.....	46
Resumo.....	46
Introdução.....	58
Materiais e Métodos.....	52
Resultados.....	58
Discussão.....	83
Conclusões.....	89
Referências Bibliográficas.....	90
Conclusões Gerais.....	100

RESUMO

FERNANDES, Loane Vaz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2013.
Alterações nutricionais, fisiológicas e moleculares em clones de eucalipto submetidos à omissão e ao ressuprimento de N ou P. Orientador: Nairam Félix de Barros. Coorientadores: Cléberon Ribeiro e Júlio César Lima Neves

O eucalipto é cultivado no Brasil em solos em que a pobreza química leva à necessidade fertilização, por isso materiais genéticos com maior eficiência nutricional (EN) são muito desejados. A maior EN é atribuída à maior aquisição (EA) e/ou maior utilização (EU) dos nutrientes, processos intermediados por proteínas transportadoras, que respondem de forma diferencial ao suprimento de nutrientes. Além das proteínas, diversas rotas são alteradas em função do suprimento nutricional e em diferentes velocidades. Assim, alterações na coloração, teor nutricional e crescimento são mais lentas do que alterações fisiológicas, que, por sua vez, são mais lentas que as moleculares. Essas diferentes velocidades de alteração, aliadas ao controle genético dessas rotas, unem a nutrição de plantas ao melhoramento genético e podem subsidiar a escolha de materiais genéticos mais eficientes nutricionalmente, bem como indicar biomarcadores nutricionais. Este trabalho visou avaliar as alterações de crescimento, teores nutricionais, variáveis fisiológicas (trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e teores de pigmentos), atividade de enzimas chave e expressão de genes candidatos relacionados à maior eficiência de utilização de N ou de P por eucalipto. Mudanças de quatro clones (386, I-144, I-042 e VM 01) de eucalipto cresceram em solução nutritiva por 60 dias, quando foram aplicados os tratamentos, constituídos pela omissão de N ou P, por 21 dias, seguido pelo ressuprimento dos mesmos por 14 d e tratamento controle (solução nutritiva sempre completa). Semanalmente foram feitas avaliações de crescimento, fisiológicas e nas semanas 1, 3, 4 e 5 foram coletadas amostras de folhas diagnósticas (folhas jovens totalmente expandidas) para análise do teor total de N e P, atividade das enzimas nitrato redutase (NR – EC 1.0.0.1) e glutamina sintetase (GS – EC 6.3.1.2), para os tratamentos de N, e fosfatase ácida (APase – EC 3.1.3.2) e ribonuclease (RNase – EC 3.1.4.22), para os tratamentos referentes a P. Nas semanas 1, 3, 4 e 5 também foram retiradas amostras para determinação do teor dos pigmentos fotossintéticos e realizada leitura de clorofila por clorofilômetro. Na semana 3, período de maior omissão de N ou P, foram coletadas amostras para determinação da expressão dos genes, por PCR- RT (reação de transcriptase reversa em cadeia de polimerase em

tempo real) GS2;1, Gln1;3, NR1 e TIP2;1 para N e RNS1 e PHO1;H1 para P. Ao final do ressuprimento foi calculada a massa da matéria seca das plantas, o conteúdo dos nutrientes e as eficiências nutricionais. A omissão/ressuprimento de N causou a menor produção de matéria seca, aumento da EU e queda da EA. Para P houve aumento da EU e queda da EA, embora apenas o clone 386 tenha apresentado menor crescimento, indicando maior adaptação das plantas à falta de P. A omissão levou à queda nos teores de N e aumento na atividade de todas as enzimas e expressão de todos os genes, especialmente o GS2;1 e Gln1;3. A queda na taxa de fotossíntese líquida (A), na omissão de N, pode ser explicada por menores teores de pigmentos e danos na etapa fotoquímica da fotossíntese, pela oxidação do fotossistema II (FS_{II}), além da possível queda no teor da rubisco. Houve queda no teor de P na primeira semana de omissão, e na semana 3, ainda sob a omissão, o teor se igualou ao do tratamento controle, em virtude da alta ciclagem interna, comprovada pelo aumento da atividade das fosfohidrolases e expressão dos genes (PHO1;H1 e RNS1). A queda em A pode ser explicada por danos ao FS_{II} em virtude de menor teor de P inorgânico para a formação de ATP e NADPH, diminuindo a taxa de transporte de elétrons (ETR) e, com isso, a A. A enzima com maior atividade relativa para N foi a GS no clone I-144 (73,6 vezes), reflexo do aumento da expressão do GS2;1. Para P, o maior aumento (16,2 vezes) foi observado para enzima RNase, também para o clone I-144 e comprovado pelo aumento da expressão do RNS1, mostrando controle transcricional deste gene. O ressuprimento tendeu a reestabelecer o status nutricional, variáveis do aparato fotossintético e enzimas relacionadas a N (NR e GS) das plantas, evidenciando grande resiliência do eucalipto. Este padrão se repetiu para P, com exceção das enzimas APase e RNase, cujas atividades ainda eram relativamente altas na semana 5. A resistência/resiliência de clones de eucalipto em resposta à omissão/ressuprimento de N ou P envolve alterações em diversas variáveis, e as que apresentam maior potencial como biomarcadores em eucalipto são: o coeficiente de dissipação fotoquímica ($\hat{Y}_{II}$), taxa de transporte de elétrons, a atividade da enzima GS e expressão dos genes GS2;1 e Gln1;3 quanto ao status de N; taxa fotossintética, enzima RNase e o gene RNS1 quanto ao status de P.

ABSTRACT

FERNANDES, Loane Vaz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october, 2013.
Nutritional, physiological and molecular modifications in eucalyptus clones submitted to the omission and the resupply of N or P. Adviser: Nairam Félix de Barros. Co-advisers: Cléberson Ribeiro and Julio César Lima Neves

The eucalyptus is cultivated in Brazil in soil where chemical poverty makes fertilization necessary, therefore genetic material with bigger nutritional efficiency is very desired. Bigger EN is attributed to a larger acquisition (EA) and/or greater use (EU) of the nutrients and processes intermediated by transporting proteins, that answer in a different way to the supply of nutrients. Beyond proteins, many routes are modified in function of the nutritional supply and in different speeds. Thus, modifications in the coloration, nutritional content and growth are slower than physiological modifications, that, in turn, are slower than molecular ones. These different speeds of modification, united with the genetic control of these routes, join the nutrition of plants to genetic improvement, and can subsidize the choice of more e nutritionally efficient genetic materials, as well as indicating nutritional biomarkers. The objective of this study was to evaluate growth modifications, nutritional, physiological variables (gaseous exchanges, fluorescence of the chlorophyll and the pigment content), activity of key enzymes and expression of candidate genes associated with bigger efficiency of N or P in eucalyptus. Seedling of four clones (386, I-144, I-042 and VM 01) of eucalyptus grew in nutritional solution for 60 days, when the treatments, consisting of the omission of N or P, were applied for 21 days, followed by the resupply of the same for 14 days and controls (always with complete nutritional solution). Weekly, the growth of the plants was evaluated. On weeks 1, 3, 4 e 5, samples of diagnostic leaves were collected (young leaves totally expanded) to analyze the total content of P and N, the activity of reductase nitrate enzymes (NR - EC 1.0.0.1) and glutamine synthetase (GS - EC 6.3.1.2), for the treatments of N, and acid fosfate (APase - EC 3.1.3.2) and ribonuclease (RNase - EC 3.1.4.22) for the treatments of P. In weeks 1, 3, 4 and 5, samples were also taken to determine the content of photosynthetic pigments. Reading of the chlorophyll was also realized with a chlorophyll meter. In week 3, period of the largest omission of N or P, samples were collected to determine the expression of genes, with PCR-RT (reaction of reverse transcriptase in a chain of polymerase in real time) GS2;1, Gln1;3, NR1 e TIP2;1 for N and RNS1 e PHO1;H1 for P. At the end of the resupply, the mass of the

dry matter of the plants, the content of the nutrients and the nutritional efficiencies were calculate. The omission/resupply of N caused a smaller production of dry matter, increase of EU and decrease of the EA. For P, there was an increase of EU and fall of EA, even though only clone 386 had presented lesser growth, indicating bigger adaptation of the plants due to the lack of P. The omission led to the fall of levels of N and increase in the activity of all the enzymes and expression of all the genes, especially the GS2; 1 and Gln1; 3. The fall in the level of liquid photosynthesis (A), omitting N, can be explained by lesser levels of pigments and damages in the photochemical stage of the photosynthesis, by the oxidation of photosystem II (FSII), and the possible fall in the level of rubisco. There was a fall in the level of P in the first week of omission. In week 3, still under the omission, the level was equal to the controls, in virtue of the high internal cycling, proven by the increase of the activity of phosphohidrolases and expression of the genes (PHO1;H1 and RNS1). The fall of A can be explained by damages to the FSII because of the lesser level of inorganic P for the formation of ATP and NADPH, diminishing the level of electron transport (ETR) and, with this A. The enzyme with bigger relative activity, for N, was the GS in the I-144 clone (73,6 times), because of the increase of the expression of the GS2; 1. For P, the biggest increase (16,2 times) was observed for RNase enzyme, also for the I-144 clone and proven by the increase of the RNS1, showing transcriptional control of this gene. The resupply tended to reestablish the nutritional status, variable of the photosynthetic apparatus and enzymes related to N (NR and GS) of the plants, evidencing great resilience of the eucalyptus. This pattern happened again for P, with exception of the enzymes APase and RNase, whose activities still were relatively high in week 5. The resistance/resilience of the eucalyptus clones against the omission/resupply of N or P involves alterations in many variables, and those that presented greater potential such as biomarkers in eucalyptus are: the coefficient of photochemical dissipation (Y_{II}); level of transportation of electrons; activity of the enzyme GS; and expression of the genes GS2;1 and Gln1;3 as to the status of N; photosynthetic level; RNase enzyme and the gene RNS1 as to the status of P.

1. Introdução Geral

O eucalipto, principal essência florestal cultivada no País (ABRAF, 2011) ocupa solos de baixa fertilidade, que pode ser superada via fertilização. Porém em virtude do alto custo destes insumos aliado à preocupação ambiental, visto que muitos destes advêm de fontes não renováveis ou são potenciais poluidores, estudos que busquem identificar materiais genéticos mais eficientes nutricionalmente devem ser realizados (McDonald et al., 2013).

A eficiência nutricional (EN) abrange a eficiência de absorção e a eficiência de utilização dos nutrientes e integra diversos processos fisiológicos e moleculares que ocorrem com a planta durante o seu crescimento. Assim, a EN é amplamente utilizada como uma medida da planta obter e utilizar os nutrientes, convertendo-os em biomassa (Gourley et al., 1994). Rose & Wissuwa (2012) e McDonald et al. (2013) mencionam que embora existam variações genéticas quanto à eficiência no uso dos nutrientes, suas implicações na produtividade das principais culturas são muito pequenas. Apontam como uma das causas para isto a pouca consideração da interação genótipo x ambiente na variação das eficiências nutricionais, visto que a grande maioria dos experimentos é realizada em condições ideais de nutrição mineral, não sendo possível avaliar as respostas do genótipo ao estresse. McDonald et al. (2013) afirmam também que a multidisciplinaridade dos estudos, unindo fisiologia, melhoramento de plantas e nutrição/fertilidade do solo permitirão à agricultura moderna aumentar sua produtividade com maior sustentabilidade, especialmente ambiental. Neste sentido, a busca por estratégias que resultem em maior eficiência nutricional constitui a nova fronteira de estudos envolvendo nutrição mineral e melhoramento genético, unindo as diversas técnicas moleculares num interesse comum, denominada de "*Nutriomica*", (Yan et al., 2006). Estas estratégias abordam maiores eficiências de absorção, maior retranslocação dos nutrientes e menores estoques dos nutrientes em formas não ativas (Veneklaas et al., 2012).

Os estudos sobre a determinação das frações ativas dos nutrientes se iniciaram com Bar-Akiva (1961), que investigou o uso de biomarcadores para diferenciar a deficiência de Fe e Mn em citrus. Desde então, busca-se desenvolver esta técnica, cujos estudos para N são os mais comuns na literatura, dado o dinamismo do nutriente no solo, muito dependente da mineralização da matéria orgânica, dificulta definir sua

disponibilidade no solo (Hirel et al., 2005; 2007). Além do N, há na literatura diversos estudos para P, especialmente relacionado à ciclagem interna do nutriente, em que foram identificados diversos biomarcadores potenciais (Wasaki et al., 2003; Hammond et al., 2004; Plaxton & Tran, 2011).

O uso dos biomarcadores é um avanço em relação à análise foliar e eles podem ser enzimas, identificadas como chave no controle de rotas metabólicas, a expressão de genes alvo e variáveis relacionadas ao aparato fotossintético das plantas (Bar-Akiva, 1961; Vasconcelos & Raghothama, 2006; Srivastava & Singh, 2006; Hirel et al., 2005;2007). Estas vias de estudo são fundamentais para entender os mecanismos que relacionam nutrição ao controle genético, especialmente sob condições de estresses, o que no futuro subsidiaria a escolha precoce de materiais genéticos com maior eficiência nutricional, visto que estas alterações ocorrem em diferentes velocidades.

A velocidade das alterações difere em função do tipo de alteração e do material genético em estudo, sendo as moleculares mais precoces que as alterações fisiológicas, estas mais precoces que as de teor, que por sua vez ocorrem mais rapidamente que as alterações de crescimento (Huang et al., 2008;2011). Este gradiente de velocidade indica onde devem ser buscados os biomarcadores precoces, especialmente os que se correlacionam com alterações futuras de crescimento. Assim, a escolha de biomarcadores precoces, sensíveis à variação do suprimento nutricional, pode subsidiar a diagnose nutricional do eucalipto, bem como a escolha de variedades mais eficientes nutricionalmente.

Para eucalipto, assim como nas demais culturas, há influência do material genético na eficiência nutricional (Santana et al., 2002;2008; Lima et al., 2005; Pinto et al, 2011) e essas diferenças devem ser melhor utilizadas na identificação de genótipos mais eficientes. Quando se trabalha com espécies florestais, o longo tempo de cultivo apresenta-se como empecilho para determinação das variáveis da EN. Assim, biomarcadores de caráter precoce são altamente desejados, desde que cuidadosamente escolhidos e validados em diferentes materiais. Muitos destes biomarcadores, especialmente os referentes à absorção de nutrientes, estão relacionados ao sistema radicular. Porém, a folha constitui o órgão central quanto às alterações metabólicas e é também o local onde ocorre a maioria das alterações em função dos tratamentos nutricionais, fato este que motivou sua escolha como órgão diagnóstico neste trabalho.

A título de exemplo, foi observado que a deficiência de P no curto prazo, pouco afetou seu teor nas folhas, entretanto mais de 50 % dos genes responsivos a P tiveram sua expressão alterada, justificando o uso deste órgão (Wu et al., 2003; Misson et al., 2005).

Uma vez identificado o órgão a ser analisado, é necessário entender o efeito dos nutrientes no metabolismo da planta, para assim identificar e validar os biomarcadores potenciais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos em alterações fisiológicas, moleculares e nutricionais em clones de eucalipto submetidos à omissão e ao ressuprimento de N ou P, identificando biomarcadores sensíveis ao material genético e quanto à nutrição com N ou P.

Referências Bibliográficas

ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário Estatístico da ABRAF: ano base 2010. Brasília, 2011, 130p.

BAR-AKIVA, A. Biochemical indications as a means of distinguishing between iron and manganese deficiency symptoms in citrus plants. *Nature*, 190:647–648, 1961.

GOURLEY, C. J. P.; ALLAN, D. L. & RUSSELLE, M. P. Plant nutrient efficiency: A comparison of definitions and suggested improvement. *Plant and Soil*, 158:29-37, 1994.

HAMMOND, J.P.; BROADLEY, M.R. & WHITE, P.J. Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. *Ann Bot*, 94: 323-332, 2004.

HIREL, B.; ANDRIEU, B.; VALADIER, M.H.; RENARDA, S.; QUILLERE, I.; CHELLEB, M.; POMMEL, B.; FOURNIER, C. & DROUET, J. L. Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. *Physiol. Plant.*, 124:178–188, 2005.

HIREL, B.; GOUIS, J.; NEY, B. & GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J. Exp. Bot.*, 58:2369-2387, 2007

HUANG, C.Y.; ROESSNER, U.; EICKMEIER, I.; GENC, Y.; CALLAHAN, D.L.; SHIRLEY, N.; LANGRIDGE, P. & BACIC, A. Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate-deficient barley plants (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Cell Physiol.*, 49:691–703, 2008.

HUANG, C. Y.; SHIRLEY, N.; GENC, Y. & SHI, B.; LANGRIDGE, P. Focus issue on phosphorus plant physiology: Phosphate Utilization Efficiency Correlates with Expression of Low-Affinity Phosphate Transporters and Noncoding RNA, IPS1, in Barley. *Plant Physiol*, 156:1217-1229, 2011.

LIMA, A.M.N.; NEVES, J.C.L.; SILVA, I.R. & LEITE, F.P. Cinética de absorção e eficiência nutricional de K, Ca e Mg em plantas jovens de quatro clones de eucalipto. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:903-909, 2005.

MCDONALD, G.; BOVILL, W.; HUANG, C. & LIGHTFOOT, D. Nutrient Use Efficiency. In: KOLE, C., ed. Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops, vol. 2. Springer, Berlin, 2013. p. 333-393.

MISSION, J.; RAGHOTHAMA, K.G.; JAIN, A.; JOUHET, J.; BLOCK, M.A.; BLIGNY, R.; ORTET, P.; CREFF, A.; SOMERVILLE, S. & ROLL, A. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. Proc Natl Acad Sci 102:11934–11939, 2005

PINTO, S.I.; FURTINI NETO, A.E.; NEVES, J.C.L.; FAQUIN, V. & MORETTI, B.S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivados em solução nutritiva. R. Bras. Ci. Solo., 35:523-533, 2011.

PLAXTON, W.C. & TRAN, H.T. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. Plant Physiol. 156 1006–1015, 2011.

ROSE, T.J. & WISSUWA, M. Rethinking internal phosphorus utilization efficiency: a new approach is needed to improve PUE in grain crops. Advances in Agronomy, 116:185, 2012.

SANTANA, R. C.; BARROS, N.; NOVAIS, R. F.; LEITE, H. G. & COMERFORD, N. B. Alocação de nutrientes em plantios de eucalipto no Brasil. R. Bras. Ci. Solo, 32:2723-2733, 2008.

SANTANA, R. C.; BARROS, N.F. & NEVES, J.C.L. Eficiência de utilização de nutrientes e sustentabilidade da produção em procedências de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna* em sítios florestais do Estado de São Paulo. R. Árv., 26:447-457, 2002.

SRIVASTAVA, A.K. & SINGH, S. Biochemical markers and nutrient constraints diagnosis in citrus: a perspective. J. Plant Nutr., 29:827-855, 2006.

VASCONCELOS, M.J.V. & RAGHOTHAMA, K.G. Análise da expressão de genes induzidos por fósforo em genótipos contrastantes de milho, selecionados para eficiência do uso de fósforo. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 26; 2006. Anais. Belo Horizonte, ABMS, 2006. CD-ROM.

VENEKLAAS, E.J.; LAMBERS, H.; BRAGG, J.; FINNEGAN, P.M.; LOVELOCK, C.E.; PLAXTON, W.C.; PRICE, C.A.; SCHEIBLE, W.R.; SHANE, M.W.; WHITE, P.J. & RAVEN, J.A. Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phyt.*, 195:306–320, 2012

WASAKI, J.; YONETANI, R.; KURODA, S.; SHINANO, T.; YAZAKI, J.; FUJII, F.; SHIMBO, K.; YAMAMOTO, K.; SAKATA, K.; SASAKI, T.; KISHIMOTO, N.; KIKUCHI, S. & YAMAGISHIM, O.M. Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant, Cell & Environment* 26:1515–1523, 2003.

WU, P.; MA, L.; HOU, X.; WANG, M.; WU, Y.; LIU, F. & DENG, X.W. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol.*, 132:1260-1271, 2003.

YAN, X.; WU, P.; LING, H.; XU, G.; XU, F. & HANG, Q. Plant nutriomics in China: an overview. *Ann Bot*, 98:473–482, 2006.

Capítulo 1

Atividade de enzimas e expressão de genes associadas à remobilização de N e P em clones de eucalipto submetidos à omissão e ao ressuprimento de N e P

Resumo:

A maior eficiência de utilização dos nutrientes pelo eucalipto é necessária para a obtenção de altas produtividades com menor uso de recursos minerais, especialmente os não renováveis. Este trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade de enzimas e expressão de genes relacionadas à eficiência de utilização de N ou de P pelo eucalipto. Mudanças de quatro clones de eucalipto cresceram em solução nutritiva por 60 dias, quando se iniciou a omissão de N ou P por 21 d, seguida pelo ressuprimento dos mesmos, com duração de 14 d. Todas as avaliações foram feitas em folhas jovens totalmente expandidas, denominadas de folhas diagnósticas. Nas semanas 1, 3, 4 e 5 foram feitas coletas de amostras para análise da atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), para os tratamentos de N, e fosfatase ácida (APase) e ribonuclease (RNase), para os tratamentos referentes a P. Na semana 3, período de maior omissão de N ou P, foram coletadas amostras para determinação da expressão dos genes GS2;1, Gln1;3, NR1 e TIP2;1 para N e RNS1 e PHO1;H1, para P. Também foram coletadas folhas para análise dos teores totais de N e P nas semanas 1, 3, 4 e 5. Nas semanas 3 e 5 foram coletadas folhas velhas para determinação dos teores totais de N e P. Observou-se queda nos teores de N e P e aumento da atividade de todas as enzimas e da expressão de todos os genes quando as plantas foram submetidas à omissão do nutriente em estudo. A enzima que teve maior aumento em sua atividade, comparativamente ao tratamento controle, foi a GS no clone I-144 (73,6 vezes), após três semanas de omissão. Para P, o maior aumento (16,2 vezes) foi observado para enzima RNase, também para o clone I-144, após três semanas de omissão de P. Quanto aos genes, observou-se resposta diferencial entre os clones, sendo o 386 o clone que apresentou maior alteração nos genes relacionados a P. Para N, os genes GS2;1 e Gln1;3 apresentam grande potencial como biomarcadores, visto que suas expressões foram diferentes para os clones analisados. Após o período de omissão, o teor de P nas folhas diagnósticas se igualou ou foi superior ao das folhas diagnósticas do tratamento controle, como resultado da retranslocação de P, mediada pelas enzimas

fosfohidrolases. Para N em função do maior teor e, possivelmente, da menor retranslocação quando comparada a de P, o teor de N só se aproximou daquele do tratamento controle duas semanas após o ressuprimento. Conclui-se que a enzima GS e os genes GS2;1 e Gln1;3 constituem bons marcadores do status de N na planta, com sensibilidade ao material genético e suprimento de N. Para P, a enzima RNase mostrou-se mais sensível, bem como o gene RNS1 que a codifica.

Introdução

O eucalipto é a principal espécie florestal cultivada no Brasil (ABRAF, 2012), ocupando solos onde a pobreza química leva à necessidade de adubação. Por isso, materiais genéticos com maior eficiência nutricional são muito desejados para cultivo nestas condições. A maior eficiência nutricional é atribuída à maior aquisição ou maior utilização dos nutrientes, processos estes intermediados por proteínas transportadoras. Estes transportadores, presentes nas raízes e na parte aérea, são sensíveis ao status nutricional ao qual a planta está submetida e são controlados geneticamente (Srisvatava & Singh 2006; Hirel et al., 2007). Pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos no controle da eficiência nutricional do eucalipto, e os estudos dos mesmos, especialmente sob condições de estresses, são fundamentais no manejo nutricional e na escolha precoce de materiais genéticos com maior eficiência nutricional. Neste aspecto inserem-se os biomarcadores nutricionais, relacionados ao controle da absorção e da utilização de nutrientes.

Estudos nessa linha foram iniciados por Bar-Akiva (1969), que investigou o uso de biomarcadores para diferenciar a deficiência de Fe e Mn em citrus e desde então se busca desenvolver a técnica para outras culturas e nutrientes, avançando para as técnicas de expressão gênica na última década. Com o avanço das técnicas de análise, surgiu uma nova fronteira de estudos envolvendo nutrição mineral e melhoramento genético, unindo as técnicas de genômica, metabolômica, transcriptômica e proteômica num interesse comum, denominada de "Nutriômica". Estas estratégias abordam maiores eficiências de absorção, maior retranslocação dos nutrientes e menores estoques dos nutrientes em formas não ativas (Veneklaas et al., 2012; Yan et al., 2006), cabendo identificar os mecanismos responsáveis pela maior eficiência nutricional para cada nutriente.

O N pode ser absorvido como NO_3^- ou NH_4^+ , sendo o primeiro a forma mais absorvida pelas culturas em geral. Entretanto, estudos indicam maior crescimento do eucalipto quando o N é fornecido em maior proporção como NH_4^+ (Locatelli et al., 1984). O NH_4^+ absorvido pode ser assimilado nas raízes ou translocado para a parte aérea, onde pode ser assimilado ou armazenado no vacúolo. No armazenamento no vacúolo está envolvido o gene TIP2;1, que codifica aquaporina localizada no tonoplasto e atua no transporte de NH_4^+ e água, sendo o teor de NH_4^+ um dos reguladores de sua

expressão (Rawat et al., 1999). A aparente preferência do eucalipto por N-NH_4^+ (Costa, 1986; Ferreira, 1986) não exclui a absorção de NO_3^- (Vale et al., 1984), justificando a necessidade de estudar a enzima nitrato redutase (NR), visto ser sua atividade importante no ciclo do N nas plantas (Srivastava & Singh, 2006).

A NR é a primeira enzima envolvida no processo de redução do NO_3^- em plantas. Acredita-se que ela limita a assimilação do N em muitas plantas (Campbell, 1999; Heldt, 2005), e sua atividade seria regulada em nível de transcrição ou pós-tradução (Genenger et al., 2003). A atividade da NR depende da disponibilidade de NO_3^- no meio de crescimento, do equilíbrio de NO_3^- e glutamina no citoplasma, da disponibilidade de cofatores e íons metálicos, luminosidade e água (Meguro & Magalhães, 1982; Kawachi et al., 2002; Srivastava & Singh, 2006). Após a redução do nitrato a nitrito, este é reduzido pela nitrito redutase (NiR), tendo o NH_4^+ como produto final da reação. As reações que se seguem fazem parte do processo de assimilação do N- NH_4^+ , seja ele advindo da redução do nitrato, fotorespiração ou absorção diretamente do meio de cultivo. Essa assimilação depende da enzima glutamina sintetase (GS), cujo produto glutamina é o principal doador do grupamento amino para outros compostos orgânicos. A GS catalisa a reação glutamato, oriundo do ciclo de Calvin, e NH_4^+ em glutamina (Epstein & Bloom, 2006). Assim, juntamente com a NR, a atividade da GS é tida como chave para que as plantas expressem seu potencial produtivo. Hirel et al. (2007) relatam correlações significativas entre atividades de NR, GS, teor de nitrato e caracteres agronômicos, como produtividade da cultura, permitindo o uso das atividades destas enzimas na diagnose nutricional.

Maiores eficiências nutricionais apresentam duas linhas de controle: uma refere-se à absorção e outra à remobilização de nutriente entre os órgãos (Hilrel et al., 2007). Nesse sentido, Lemaire et al. (1996), estudando a capacidade de utilização de N em milho e sorgo, em situações de limitação ou não de N, concluíram que o controle genético da absorção de N das duas culturas é semelhante, porém o sorgo apresenta maior adaptação a baixos teores de N, explicada pela maior remobilização interna do nutriente. Os genes que atuam nesse controle já foram identificados em arroz (Tabuchi et al., 2005) e em milho (Martin et al., 2006) e exercem importante papel na regulação do ciclo de N em planta, visto que qualquer forma de N deve passar pela enzima GS antes do nutriente ser incorporado em proteínas (Hirel et al., 2007). Diversos genes

atuam na síntese desta enzima e são também induzidos pelo NH_4^+ e, dentre estes, citam-se os GS2;1 e Gln1;3 (Hirel et al., 2007; Bi et al., 2007).

O P, absorvido e assimilado preferencialmente como H_2PO_4^- , é o nutriente mineral limitante da produção agrícola em mais de 30 % das terras aráveis em todo mundo, especialmente em solos ácidos (Vance et al., 2003). Por isso, a obtenção de plantas mais eficientes em sua utilização é muito relevante, sendo o melhoramento genético uma forma eficaz de se atingir este propósito (Yan et al., 2006). As plantas apresentam diversas adaptações à falta de P, que incluem alterações morfológicas, metabólicas e fisiológicas. Dentre as alterações metabólicas, o aumento na expressão de proteínas transportadoras e na atividade das enzimas que atuam na transformação do P ligado a compostos orgânicos (Po) em P inorgânico (Pi), como as fosfohidrolases, tem sido registrado (Hammond et al., 2004).

As proteínas transportadoras podem ser expressas nas raízes, modulando a absorção para situação de baixa disponibilidade de P, por meio dos transportadores de alta afinidade, e nas folhas, sendo diferencialmente expressos (Schachtman et al., 1998). Os transportadores da superfamília PHO1 são amplamente estudados, tanto em raízes quanto na parte aérea, e estão relacionados com o carregamento e descarregamento de Pi no xilema e floema (Wang et al., 2004; Stefanovic et al., 2007; Wang & Porier, 2008; He et al., 2013). Stefanovic et al. (2007) observaram que a expressão deste gene foi fortemente induzida na deficiência de P. A expressão dos PHO1 já foi avaliada em *Arabidopsis*, arroz, soja e *Brassica* (Wang & Porier, 2008; Stefanovic et al., 2007; Wang et al., 2010; Secco et al., 2010; He et al., 2013; Rouached et al., 2011). Acredita-se que espécies que apresentem maior atividade de enzimas fosfohidrolases, aliada à maior expressão de transportadores, possuam maior eficiência de utilização de P, dada a maior remobilização deste (Vasconcelos & Raghothama, 2006a; 2006b). Estes processos são catalisados por enzimas do grupo das fosfohidrolases (Plaxton et al., 2011), das quais a fosfatase ácida e as ribonucleases são as mais estudadas. O P livre no citosol (Pi) pode ser transportado para as regiões de maior dreno para P, intermediado por transportadores, explicando, assim, a associação das fosfohidrolases com os transportadores acima citados (Duff et al., 1994; Nanamori et al., 2004; Plaxton, 2004).

A atividade da fosfatase ácida (APase) aumenta em resposta à deficiência de P, pois está ligada à ciclagem interna do nutriente, que é translocado de tecidos mais

velhos para tecidos mais jovens, cujas atividades metabólicas e fisiológicas são maiores. Esta enzima atua na transformação de P ligado a compostos orgânicos (Po) em Pi. Sinais de deficiência de P induzem a hidrólise de ésteres orgânicos, liberando Pi como produto final da reação. Esse Pi pode vir da degradação dos fosfolipídeos e de sua substituição por sulfolipídios em membranas de tecidos fotossintéticos (Hammond et al., 2004). A fosfatase ácida recebe essa denominação por apresentar atividade ótima em valores de baixo pH (aproximadamente 5,0) e tem sua expressão aumentada à medida que se diminui o teor de Pi na planta (Nanamori et al., 2004). Esta enzima foi caracterizada em diversas plantas (Antibus & Lesica, 1990; Silva & Basso 1993; Fernandes et al., 1998; 2000; Basso et al., 2007; Nunes et al., 2008; Martins, 2010), e sua maior atividade se reflete em maior eficiência de utilização de P.

A enzima ribonuclease (RNase) atua na lise do RNA em ácidos nucleicos, levando à liberação de Pi (Wilson, 1975). A ação desta enzima é de grande importância, visto que o RNA é o principal reservatório de P orgânico nas plantas em geral, valor este próximo a 60 % (Veneklaas et al., 2012) e sua hidrólise pode ser de até 75 %, liberando, portanto, quantidades significativas de Pi. Estes autores, utilizando dados compilados, concluíram que há "consumo de luxo" de P na síntese do RNA, sendo esta rota de alto potencial de estudos no melhoramento genético. Esta enzima tem sua atividade relacionada à expressão do gene RNS1, que também é fortemente induzido na deficiência de P (Bariola et al., 1999; Benschop et al., 2007). Nunes et al. (2008) avaliaram as enzimas APase e RNase em gramíneas forrageiras e concluíram que a idade da planta também influencia a atividade das mesmas, pois houve diminuição em suas atividades com aumento da idade da planta. Este fato foi atribuído à menor demanda de P pela planta com avanço da idade. Os autores constataram também que a RNase foi mais sensível nessa redução que APase.

Os potenciais biomarcadores avaliados neste trabalho estão relacionados ao metabolismo de N ou P e são fortemente induzidos pela deficiência destes nutrientes, como constatado em outras culturas, e a carência de pesquisas nessa linha para o eucalipto motivou este trabalho. Considerando essas informações essenciais para se entender os mecanismos que regulam a eficiência nutricional do eucalipto, este trabalho objetivou avaliar o efeito da omissão e do ressuprimento de N ou P na atividade de enzimas relacionadas à utilização ou retranslocação destes nutrientes e na expressão de genes relacionados à síntese destas enzimas ou de transportadores.

Materiais e Métodos

Mudas de quatro clones de eucalipto (I-042, I-144, VM-01 e 386), com idade aproximada de 45 dias foram utilizadas nos estudos. O clone VM-01 é híbrido de *Eucalyptus urophylla* vs *E. camaldulensis*, e os demais são híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs *E. grandis*. A escolha destes clones, todos de larga utilização em plantios comerciais, se deu com base nos resultados obtidos por Pinto et al. (2011), que os classificou quanto à eficiência de absorção (EA) e utilização (EU) de N e P:

N - EU: 386=I-144>I-042=VM-01 EA:386=I-144=I-042=VM-01;

P - EU: 386>I-144>I-042 =VM-01 EA:386=I-144=VM-01>I-042

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura média de 29° C. As mudas de eucalipto tiveram seu substrato inicial (vermiculita e casca de arroz carbonizada) retirado e foram acomodadas em vasos de polietileno com 12 litros de solução nutritiva e aeração constante. A solução nutritiva utilizada foi a de Clark (1982), adaptada por Locatelli et al. (1984), de modo a suprir 50 % do N como NH_4^+ 50 % como NO_3^- . Decorridos 60 dias de crescimento das mudas nessa solução, foram aplicados os tratamentos referentes aos dois níveis de N ou P, por meio da omissão e posterior reposição do nutriente (tabela 1). Os períodos de omissão e de ressuprimento tiveram duração de três e de duas semanas, respectivamente. O pH da solução foi monitorada diariamente utilizando HCl ou NaOH 1 mol L⁻¹, ajustando entre 5,0 e 6,0. As trocas da solução nutritiva foram feitas semanalmente. Foram adotadas três repetições por tratamento, totalizando 36 unidades experimentais, constituídas por um vaso com três plantas. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados.

Foram realizadas quatro coletas de material vegetal, para todos os tratamentos (controle, N e P), em que foram retiradas folhas jovens totalmente expandidas (folha diagnóstico) para determinação da atividade enzimática, expressão gênica e teores totais dos nutrientes. Duas coletas ocorreram no período de omissão (primeira e terceira semana após omissão de N ou P e tratamento controle) e duas no período de ressuprimento (primeira e segunda semana após a reposição de P ou N e tratamento controle). As amostras para atividade enzimática e expressão gênica foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -82° C. Nas semanas 3 e 5, finais da omissão e

ressuprimento de N ou P, foram coletadas amostras das folhas mais velhas para a determinação dos teores totais de N ou P.

Tabela 1: Composição da solução nutritiva de Clark (1982), adaptada por Locatelli et al., (1985)

Reagente	Completa	Omissão de N ¹	Omissão de P ¹
----- mmol L ⁻¹ -----			
NH ₄ NO ₃	2,925	-	2,925
CaCl ₂	1,30	1,30	1,30
K ₂ SO ₄	0,30	0,30	0,30
MgSO ₄	0,30	0,30	0,30
KCl	0,53	0,53	0,668
KH ₂ PO ₄	0,138	0,138	-
----- µmol L ⁻¹ -----			
Fe-EDTA	40,00	40,00	40,00
MnCl ₂	7,00	7,00	7,00
H ₃ BO ₃	19,00	19,00	19,00
ZnSO ₄	2,00	2,00	2,00
CuSO ₄	0,50	0,50	0,50
Na ₂ MoO ₄	0,086	0,086	0,086

¹As soluções de omissão de N e P foram utilizadas durante o período de omissão dos respectivos nutrientes, e a solução completa foi utilizada no tratamento controle e no período de ressuprimento de N ou P.

Teores totais de N e P

As amostras de folhas para determinação dos teores totais de N e P foram secas em estufa de circulação forçada de ar, a 65° C até que se atingisse massa constante. O material foi moído, submetido à digestão nitro-perclórica e no extrato determinado o teor de P via colorimetria, a 725 nm, com base em curva de calibração (Braga & Defelipo, 1974). Para determinação do N total foi utilizado o método de Kjeldhal (Nelson & Sommers, 1973), com digestão sulfurosa seguida de destilação e titulação.

Atividade enzimática

Meio de Extração - NR e GS

A extração foi realizada segundo protocolo proposto por Radin (1974), adaptado por Cambraia et al. (1989), e com modificações para otimizar a atividade destas

enzimas para folhas de eucalipto. Amostras contendo 0,4 g de tecido foliar foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, com 0,2 g de PVPP (Polivinilpirrolidona). Em seguida foram adicionados 2 mL de um meio de extração constituído de tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 8,1, NiSO₄ 4 mmol L⁻¹, glutathione reduzida 20 mmol L⁻¹ e 20 µmol L⁻¹ de PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride). Os extratos brutos foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 15.000 g durante 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (extrato) foi utilizado para determinação da atividade das enzimas NR e GS e para determinação de proteína total.

Nitrato Redutase (NR - EC 1.0.0.1)

A atividade da NR foi determinada *in vitro* (Radin, 1974; Cambraia et al., 1989) Alíquotas de 0,1 mL do extrato enzimático foram adicionadas a 1,8 mL de um meio de reação constituído de 200 mmol L⁻¹ de tampão tris-HCl, pH 7,5, 20 mmol L⁻¹ de KNO₃, 0,1 mmol L⁻¹ de NADH e de triton X-100 1 % (v/v), sendo a mistura incubada à temperatura de 37° C durante 5 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de sulfanilamida 1 % (v/v) em mistura com N-naftil etilenodiamino 0,01 % (v/v) em HCl 1,0 mol L⁻¹. O nitrito produzido foi determinado por espectrofotometria do visível a 540 nm. Os teores de NO₂⁻ nas amostras foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões de NO₂⁻ e a atividade enzimática foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Glutamina Sintetase (GS - EC 6.3.1.2)

A atividade da enzima GS foi determinada pelo método proposto por Elliott (1953), que se baseia na formação de λ-glutamilhdroxamato. A atividade da GS foi avaliada pela adição de 0,3 mL do extrato a 0,7 mL do meio de reação constituído de 100 mmol L⁻¹ de tampão Tris-HCl, pH 7,5, 10 mmol L⁻¹ de 2-mercaptoetanol, 40 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 10 mmol L⁻¹ de NH₂OHCl, 10 mmol L⁻¹ de ATP e 50 mmol L⁻¹ de glutamato. O meio foi incubado em banho-maria por 5 minutos a 37° C. Em seguida, a reação foi paralisada com a adição de 1,0 mL da solução contendo 370 mmol L⁻¹ de FeCl₃, 370 mmol L⁻¹ de HCl e 200 mmol L⁻¹ de ácido tricloro-acético (TCA). Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 16.000 g. O quelato Fe-L-glutamyl-y-hidroamato (GHA) produzido foi quantificado por espectrofotometria a 540 nm e estimado com base em curva de calibração preparada com padrões de GHA. Os resultados foram expressos em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína .

Meio de Extração - APase e RNase

As atividades das enzimas Fosfatase ácida e Ribonuclease foram avaliadas utilizando um mesmo extrato (Ozawa et al.,1995). Este foi obtido pela maceração de aproximadamente 0,3 g de tecido foliar em almofariz, com N₂ líquido e 0,2 g de PVPP. Em seguida, foram adicionados 2 mL do meio de extração, constituído de PMSF 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparado em tampão acetato de sódio 100 mmol L^{-1} , pH 5,6. As amostras foram filtradas, utilizando quatro camadas de gaze. Após, o extrato foi centrifugado a 17.000 g a 4 °C, por 20 min. O sobrenadante (extrato) foi coletado e utilizado para análises enzimáticas e de proteína solúvel total.

Fosfatase Ácida (APase - E.C. 3.1.3.2)

A atividade da enzima APase foi determinada segundo metodologia proposta por Ozawa et al. (1995). Para esta análise 100 μL do extrato foram adicionados a 400 μL de acetato de sódio 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, pH 5,6, e incubados com 200 μL do substrato, constituído por 2 mmol L^{-1} de p-nitrofenilfosfato dissódico e 150 mmol L^{-1} de tampão acetato de sódio pH 5,6, a 37 °C durante 5 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 300 μL de solução saturada de Na₂CO₃. A atividade da enzima APase foi determinada a 400 nm pela formação de p-nitrofenol oriundo da hidrólise do p-nitrofenilfosfato e expressa com base no teor de proteína. O resultado foi expresso em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, tendo-se como base curva de calibração preparada com p-nitrofenol.

Ribonuclease (RNase - E.C. 3.1.4.22)

A atividade da enzima RNase foi determinada segundo Abel & Glund (1986), adaptado a partir de Wilson (1975). Para esta análise, 100 μL do extrato foram adicionados a 50 μL de meio de reação, constituído de 250 μg de RNA em 50 mmol L^{-1} tampão acetato de sódio em pH 5,6. As amostras foram incubadas por 10 min a 37 °C. Após este tempo, foram adicionados 1,35 mL de uma solução constituída de etanol (50 %), 48 mmol L^{-1} de tampão acetato de sódio pH 5,6, 12,5 mmol L^{-1} de acetato de magnésio e 0,850 mmol L^{-1} de nitrato de lantânio, para interromper a reação e precipitar o RNA remanescente. Em seguida, as amostras foram levadas ao freezer, a -20° C por 45 minutos e, centrifugadas a 23.000 g por 5 min e as absorbâncias avaliadas a 260 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima no

extrato que promoveu acréscimo de uma unidade na absorbância por minuto por grama de proteína (unidade RNase min⁻¹ g⁻¹ proteína)

Proteína total

As atividades enzimáticas foram expressas tendo como base o teor de proteína total, obtido pelo método proposto por Bradford (1976). O teor de proteína total foi calculado utilizando curva de calibração, tendo a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

A partir dos dados de atividade das enzimas NR, GS, APase e RNase foi calculada a atividade relativa, em número de vezes de aumento da atividade do tratamento em que houve a omissão/ressuprimento de N ou P, em relação ao tratamento controle.

Expressão Gênica

Genes Analisados

Os primers utilizados (tabela 2) são de genes identificados como responsivos à restrição por N ou P, e atuam em processos metabólicos ou transporte de nutrientes. Não foram selecionados genes de sinalização, em função do longo período de estresse.

Tabela 2: Primers utilizados para o PCR em Tempo Real

Gene	Função	Acesso NCBI	Referência
TIP2;1	aquaporinas controladoras do influxo de NH ₄ ⁺ nos tonoplastos	AT3G16240.1	Rawat et al., 1999
NR1	Síntese da Nitrato Redutase	AT2G15620.1	Cai et al. (2012)
GLn1;3	Síntese da Glutamina Sintetase	AT3G17820.1	Hirel et al. (2007)
GS2;1		AT1G66200.2	Bi et al. (2007)
PHO1;H1	Proteínas transportadoras de Pi e atua na homeostase	AT1G68740.1	Huang et al. (2008; 2011)
RNS1	Síntese da enzima Ribonuclease	AT2G02990.1	Bariola et al (1999); Benschop et al. (2007)

Extração do RNA

A expressão gênica foi avaliada por meio da técnica de *Real time* quantitativo (RT-qPCR). Amostras de folhas (diagnóstico), compostas por oito folhas por repetição, foram coletadas, congeladas imediatamente em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C até a extração do RNA. As amostras foram maceradas em N₂ líquido e retirado aproximadamente 0,5 g que foi acondicionado em tubos de microcentrífuga (2,0 mL). Em seguida, adicionou-se 1,2 mL de solução tampão de extração (*RNA plant Extraction-Invitrogen*). A amostra foi homogeneizada com auxílio de *vórtex* e deixada a 5 °C por 10 min. Na sequência, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e repetiu-se este processo de centrifugação. Em seguida, foi transferido 1,0 mL do sobrenadante para um novo tubo, adicionando 150 µL de NaCl 5 mol L⁻¹ e 450 µL de clorofórmio P.A. O material foi centrifugado à 13.000 rpm por 10 min a 4 °C, coletando-se o sobrenadante, em seguida, para um novo tubo, com igual volume de isopropanol P.A. (~ 800 µL). O material foi novamente centrifugado à 13.000 rpm por 10 min a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e preservado o *pelet* de RNA formado. Após, o material foi centrifugado com álcool 75 % a 13.000 rpm por 1 min a 4 °C. Em seguida, secou-se o *pelet* em concentrador por 10 min. Feito isso, o *pelet* foi resuspendido em 40 µL de água DEPC (dietil-pirocarbonato) autoclavada.

A quantificação do RNA total foi feita utilizando o fluorímetro QuBit. A concentração de RNA foi calibrada para 200 µg mL⁻¹ e sua integridade física avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (Wilson e Walker, 2000).

Síntese de cDNA

Nesta etapa, visando eliminar o DNA contaminante, foi utilizado *Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen)*. O RNA foi tratado com DNase I em reação contendo os reagentes: 1 µL de DNase I, 1 µL de tampão de reação (DNase buffer 10 x) e 8 µL de RNA. Após, o material foi incubado por 15 min a temperatura ambiente. A inativação da DNase se deu pela adição de 1,0 µL EDTA 25 mmol L⁻¹ e aquecimento a 65 °C, por 10 min.

Para síntese de cDNA foi utilizado kit Superscrip II (*Invitrogen*), segundo instruções do fabricante. Para cada reação foram utilizados os 10 µL do material tratado

com DNase do produto de tratamento com *DNase I*, adicionando-se 500 ng de oligo-dT (1 μ L) e 1 μ L de dNTPs (10 mmol L⁻¹), incubando a 65 °C por 10 min e em gelo por 1 min. Seguiu-se adicionando 7 μ L da mistura composta por: 4 μ L de tampão de reação 5 x, 2 μ L de ditioneitol 100 mmol L⁻¹ e 1 μ L de RNaseOUT inibitor (*Invitrogen*). Após rápida agitação, a solução foi incubada a 42 °C por 2 min, em seguida, adicionando 1 μ L da enzima *transcriptase reversa II* (200 unidades). O material foi incubado a 42 °C por 50 min. A inativação da enzima foi a 72 °C por 15 min e, posteriormente, colocada em gelo.

Análise da expressão diferencial dos fragmentos transcritos por RT-qPCR

Os genes candidatos selecionados (tabela 2) tiveram suas sequências obtidas no Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), que contém o genoma do eucalipto, e os *primers* elaborados com auxílio do programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), para tamanho aproximado de 19 a 20 bases, T_m (*temperature melting*) entre 54 e 60 °C. A validação dos primers foi realizada pela curva padrão relativa utilizando amostra do cDNA diluída em 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 624 vezes, com três repetições para cada diluição, e a especificidade foi avaliada pela T_m dos produtos da reação de amplificação. Foram utilizados os *primers* de equação linear com R² > 98 %, coeficiente de variação <10 %, eficiência de amplificação entre 90 e 110 % e *Sloop* de aproximadamente -3. Foram avaliados quatro primers para genes constitutivos, sendo escolhido, por meio do programa *NormFinder* os *primers* da histona, o Hist1 como gene de referência. Todos *primers* foram utilizados em concentração final de 0,48 pmol L⁻¹ de cada em reações. As reações de PCR foram compostas por 1 μ L de cDNA, 0,8 μ L de *primer* 2,5 mmol L⁻¹, 3,2 μ L de água e 5 μ L de FAST SYBR® GREEN MASTER MIX, totalizando 10 μ L. O equipamento utilizado foi Bio-Rad 100. As análises foram realizadas em triplicatas e o cálculo por meio de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), comparando o C_t (*threshold cycle*) de cada tratamento com o seu controle e os dois com o gene constitutivo.

Análises Estatísticas

Para as variáveis obtidas ao longo do experimento (atividades enzimáticas e teores nutricionais), foi feita análise de variância, com desdobramento dos graus de liberdade da interação clone vs tempo, e para cada tempo os dados do tratamento

referente a N ou P foram comparados ao tratamento controle, pelo teste F. Para o teor na folha velha foi feita a mesma análise, porém em dois tempos.

Para a variável atividade enzimática relativa foi feita análise de variância e teste Tukey, comparando as médias entre si dentro de cada clone em estudo. Para a variável expressão gênica relativa foi feita análise de variância e teste Tukey comparando o aumento da expressão de cada gene, para todos os clones.

Resultados

Atividade das enzimas e expressão de genes relacionadas ao N

A omissão de N resultou no aumento da atividade das enzimas NR e GS com respostas diferenciais entre os clones (figuras 1 e 2). Após o ressuprimento a atividade destas enzimas diminuiu, assemelhando-se às atividades enzimáticas nas amostras do tratamento controle, com exceção do clone I-144, cuja atividade relativa foi a maior observada na semana 5. Houve aumento na atividade da NR, porém a atividade desta enzima foi cerca de 62 vezes menor que a atividade da GS.

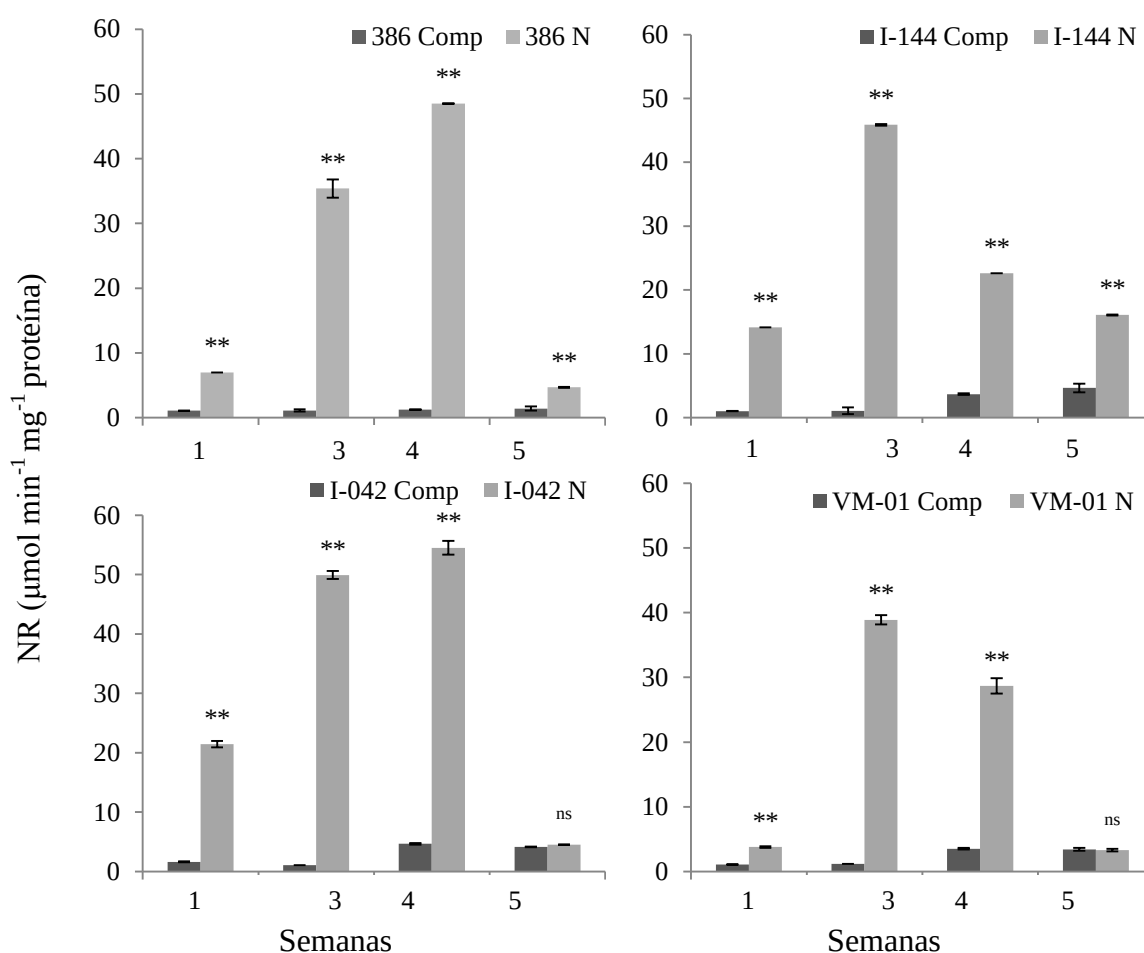


Figura 1: Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR) em folhas diagnóstico de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ao ressuprimento de N (semanas 4 e 5) e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média. ns, **: não significativo e significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

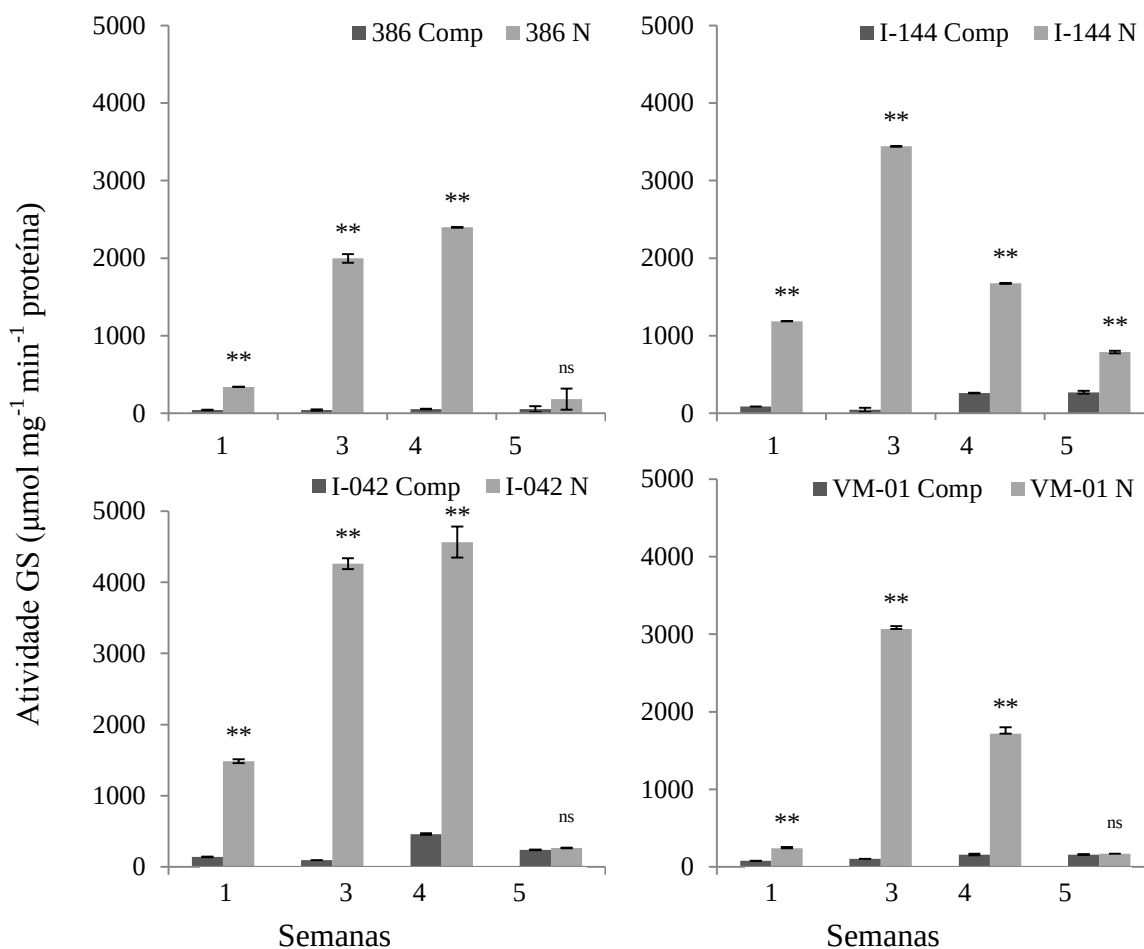


Figura 2: Atividade da enzima Glutamina Sintetase (GS) em folhas diagnóstico de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ao ressuprimento de N (semanas 4 e 5) e tratamento controle (Comp.). Barras de erro indicam o erro padrão da média. ^{ns}, **: não significativo e significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

Tendo como base os dados das atividades para o tratamento de omissão e ressuprimento de N e o controle equivalente, foi calculada a atividade relativa em cada tempo das enzimas NR e GS (figura 3).

Os genes analisados se mostraram sensíveis à omissão de N de forma diferencial. A maior alteração em relação ao controle foi observada para o gene Gln1;3 no clone I-042, seguido do gene GS2;1 no clone I-144 (figura 4).

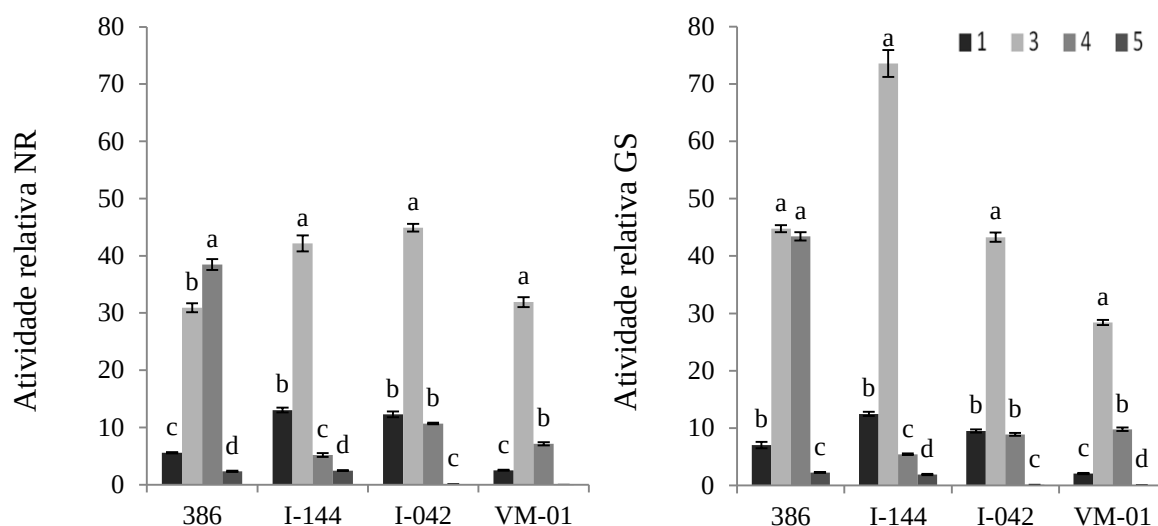


Figura 3: Atividade relativa (número de vezes de aumento) das enzimas Nitrato Redutase (NR) e Glutamina Sintetase (GS) em comparação ao tratamento controle para clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras distintas indicam diferença, pelo teste Tukey a 1 % de probabilidade, para cada clone.

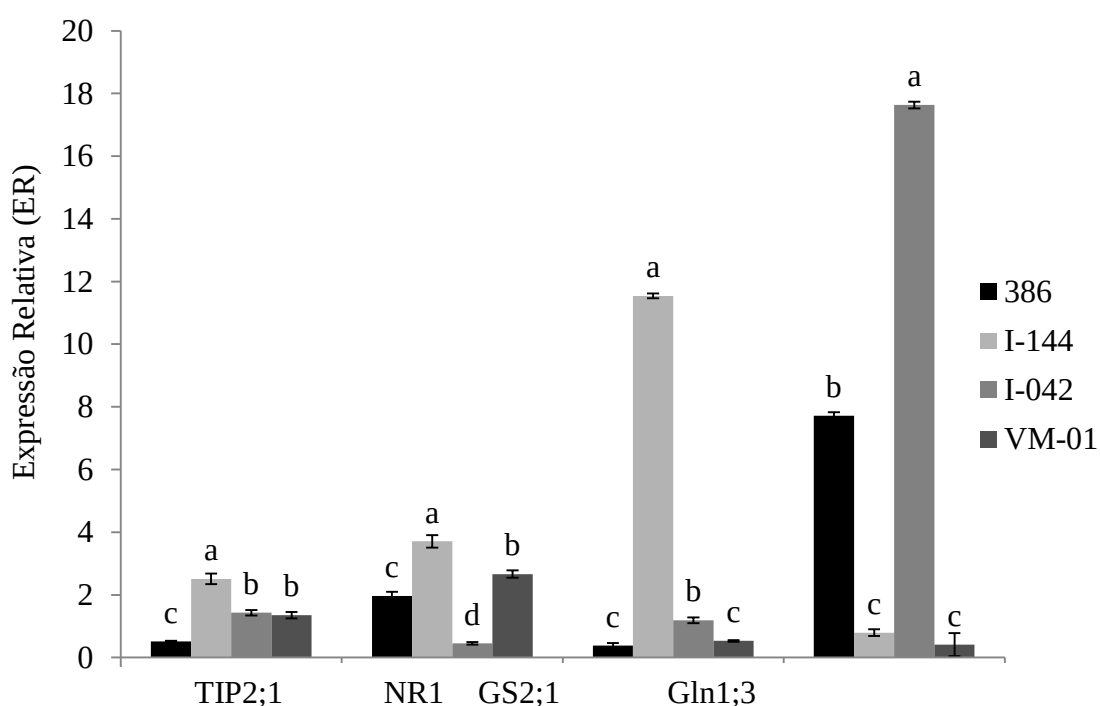


Figura 4: Expressão relativa (ER) de genes relacionados ao metabolismo de N (TIP2;1, NR1, GS2;1, Gln1;3) em folhas de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão de N por três semanas. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras distintas indicam diferença, pelo teste Tukey a 1 % de probabilidade, para cada clone.

As alterações nas atividades das enzimas e expressão de genes estão de acordo com os teores totais de N na folha diagnóstico e na folha velha (figura 5 e 6).

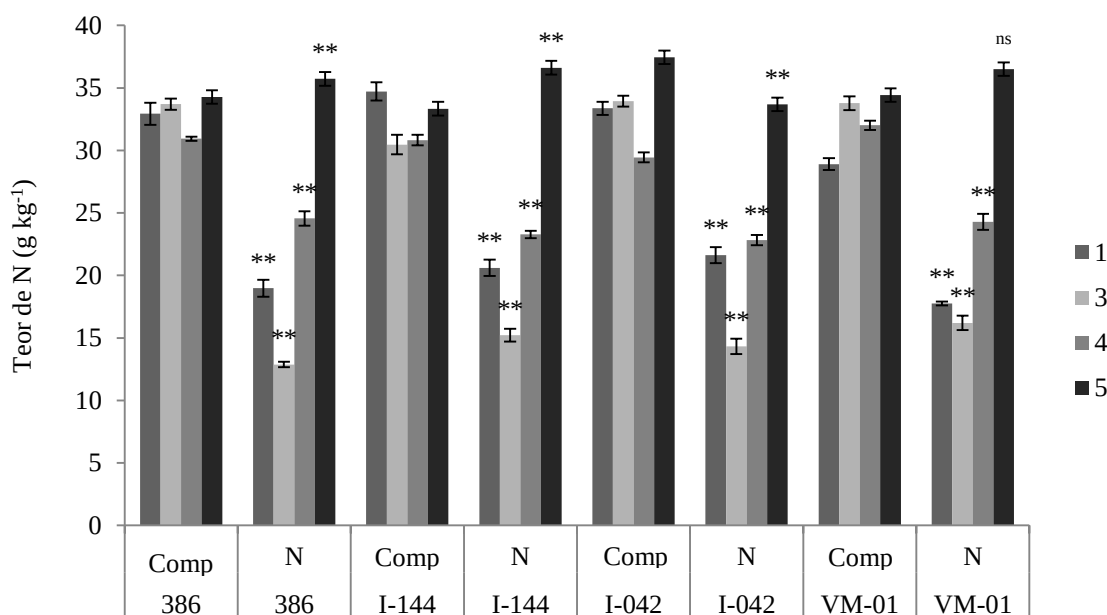


Figura 5: Teor total de N em folhas diagnóstico de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ressuprimento de N (semanas 4 e 5) e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média. ^{ns}, **: não significativo e significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

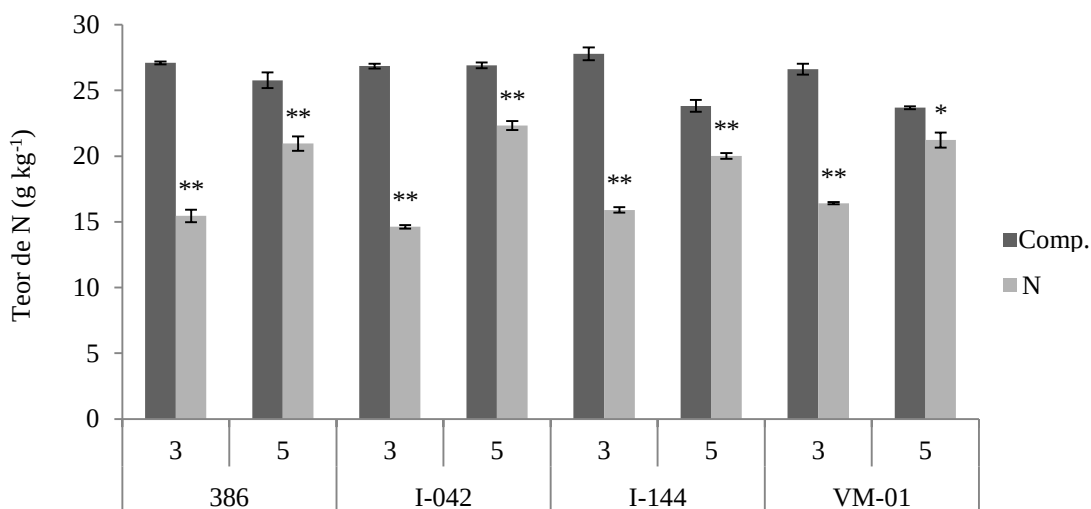


Figura 6: Teor total de N em folhas velhas de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semana 3) e ressuprimento de N (semana 5) e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média. *, **: significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

Atividade das enzimas e expressão de genes relacionados ao P

A omissão de P, semana 1, resultou em expressivo aumento da atividade das enzimas fosfatase ácida e ribonuclease (figuras 7 e 8). Os clones apresentaram respostas diferentes, embora haja tendência de queda da atividade destas enzimas com o ressuprimento de P para os clones I-042 e VM-01, demonstrando a recuperação das plantas destes clones.

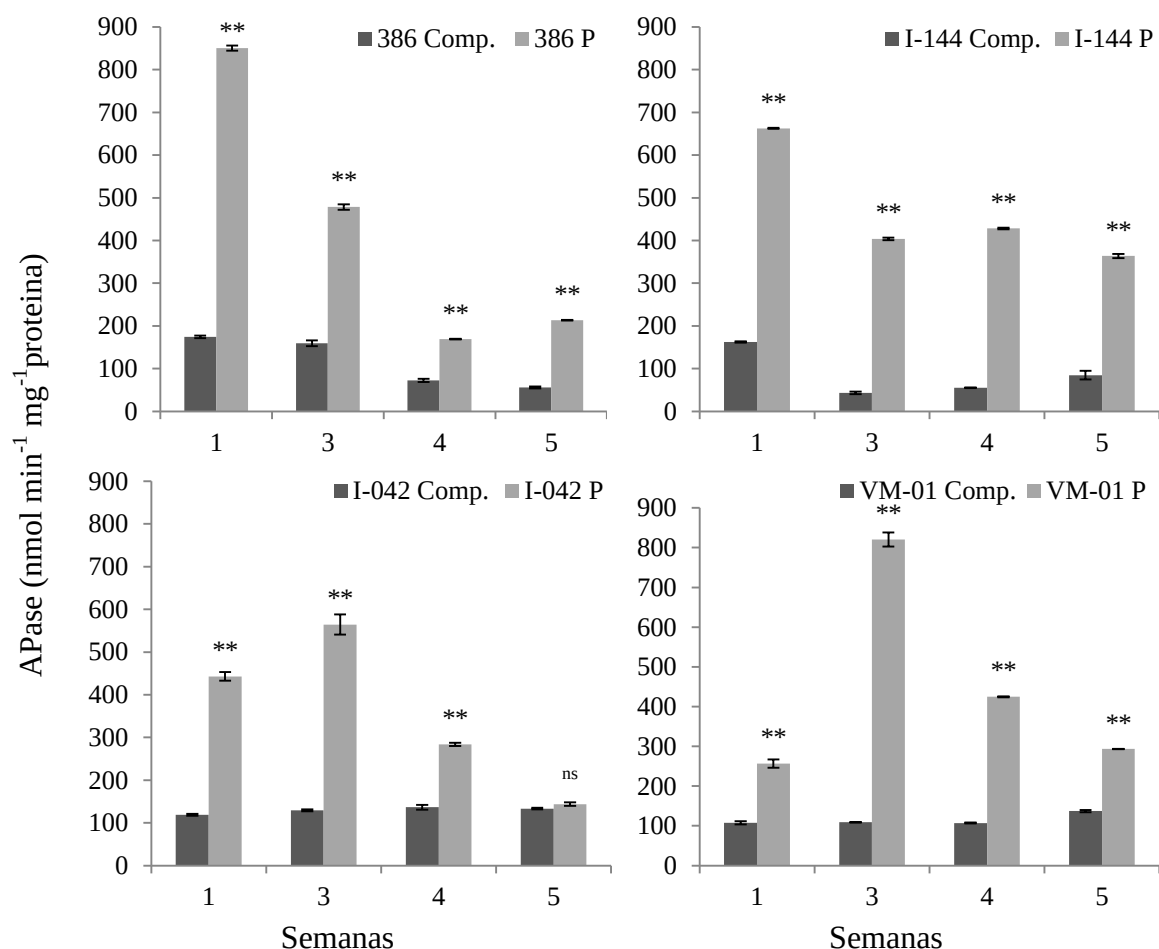


Figura 7: Atividade da enzima fosfatase ácida (APase) em folhas de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ao ressuprimento de P (semanas 4 e 5) e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média. ^{ns}, **: não significativo e significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

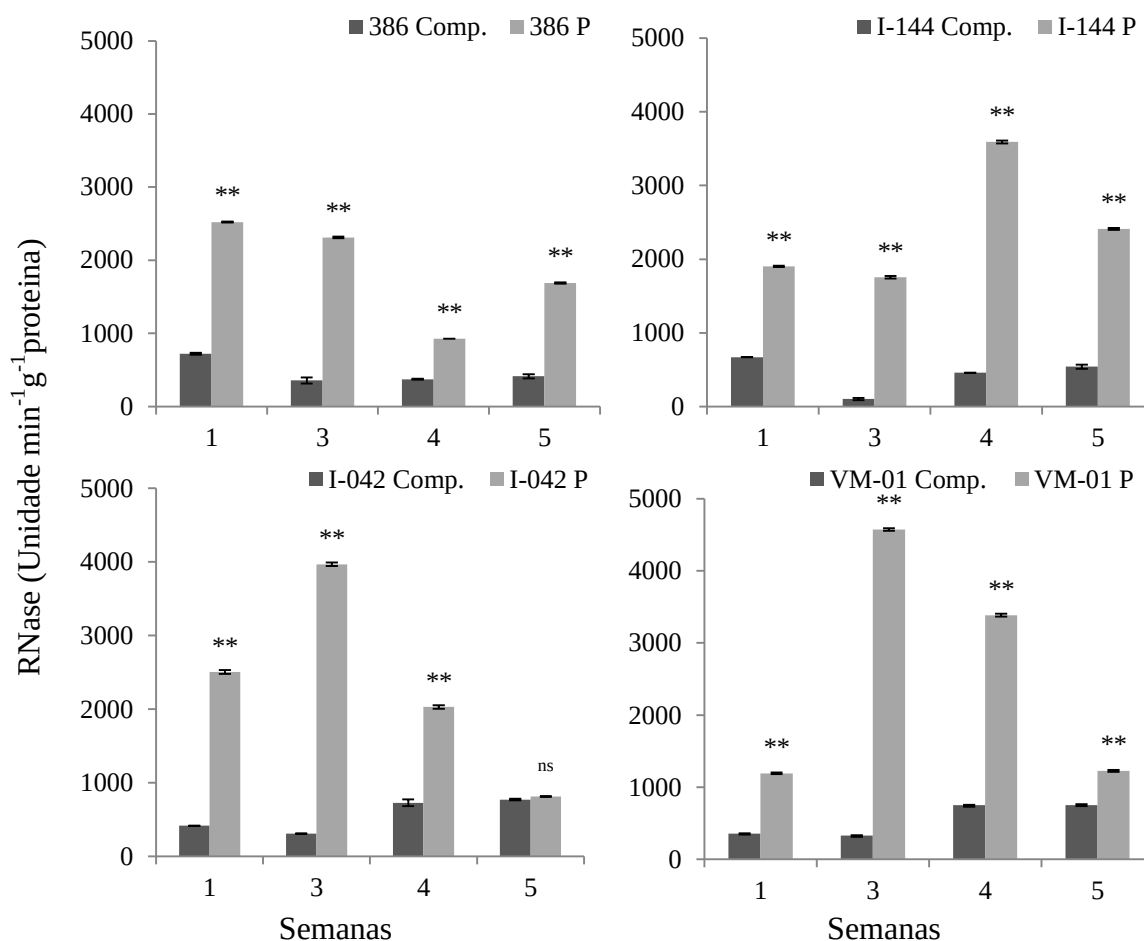


Figura 8: Atividade da ribonuclease (RNase) em folhas de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ao ressuprimento de P (semanas 4 e 5) e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média. ^{ns}, ^{**}: não significativo e significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

A atividade relativa das enzimas APase e RNase foi maior quando as plantas foram submetidas à omissão de P, especialmente na semana 3, e reduziu assim que o P foi ressuprido (figura 9). A magnitude dessas variações, para mais ou para menos, é dependente do clone. Por exemplo, para o clone I-042 a atividade relativa de ambas as enzimas praticamente zerou na avaliação feita aos 15 dias ao se ressuprir o nutriente.

A expressão relativa dos genes PHO1;H1 e RNS1 foi bastante distinta entre os clones (figura 10). Os maiores valores de expressão relativa foram observados para o clone 386.

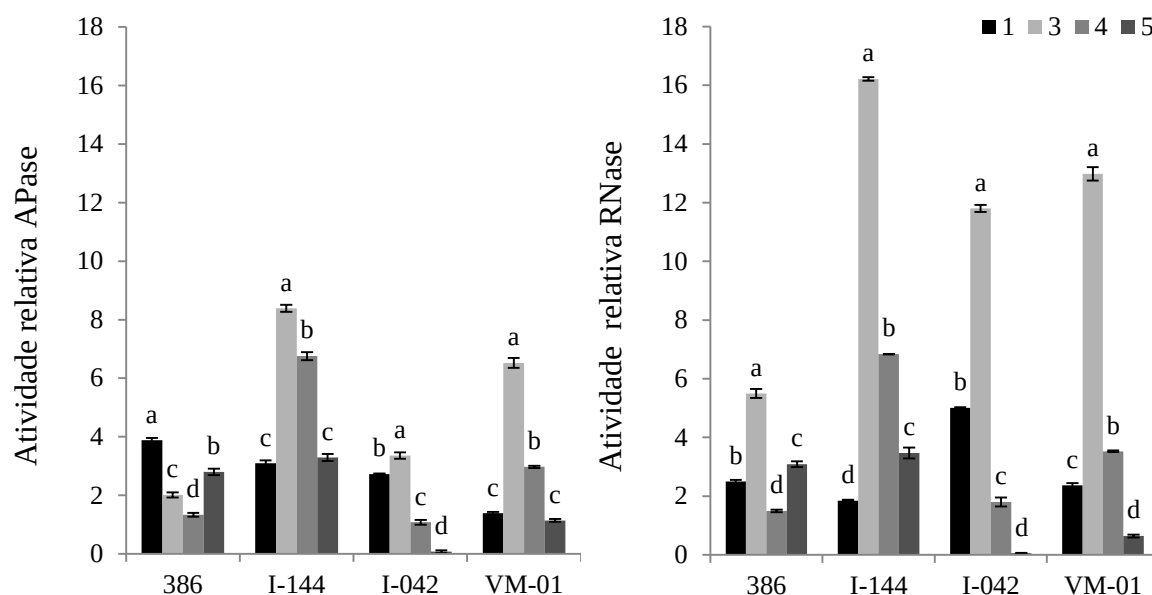


Figura 9: Atividade relativa (número de vezes de aumento) da enzima fosfatase ácida (Apase) e ribonucleases (RNase) em relação ao tratamento controle em clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de P. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras distintas indicam diferença, pelo teste Tukey a 1 % de probabilidade, para cada clone.

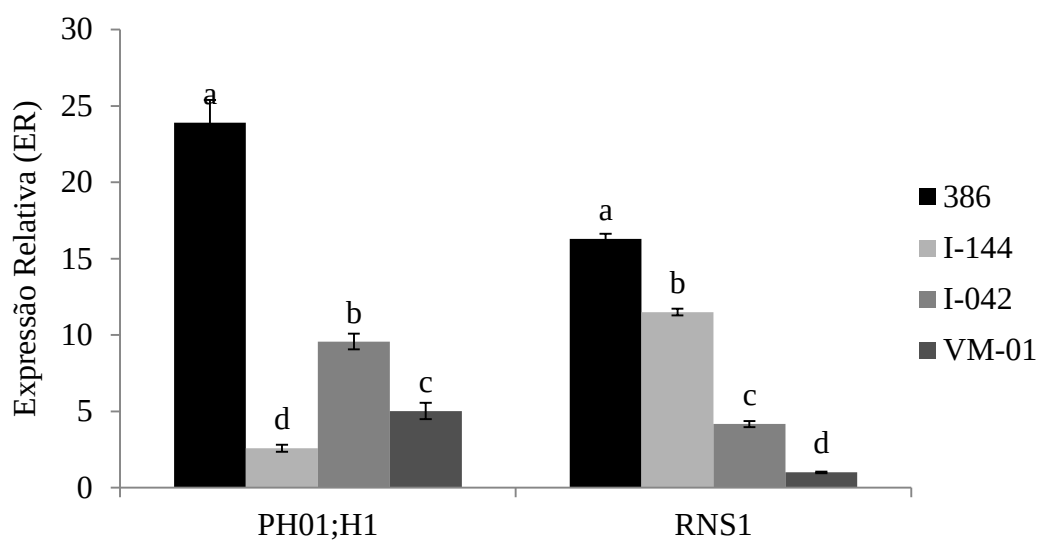


Figura 10: Expressão relativa (ER) de genes relacionados ao metabolismo de P (PHO1;H1; RNS1) em folhas de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão de P por 3 semanas. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras distintas indicam diferença, pelo teste Tukey a 1 % de probabilidade, para cada clone.

O aumento na atividade das enzimas fosfohidrolases e da atividade de genes transportadores contribuiu para a retranslocação de P nas plantas, visto que as folhas diagnóstico avaliadas se desenvolveram durante o período correspondente à ausência de P. Assim, todo o P desta folha advém da ciclagem interna. Na primeira semana de omissão o teor de P nesta folha foi o menor em todos os clones, exceto o VM-01. Já na última avaliação o teor de P na folha diagnóstico foi, em geral, mais alto que aquele das folhas das plantas para as quais não houve omissão de P (controle) (figura 11). As folhas velhas (Figura 12) foi um dos tecidos fontes de P para os tecidos em desenvolvimento.

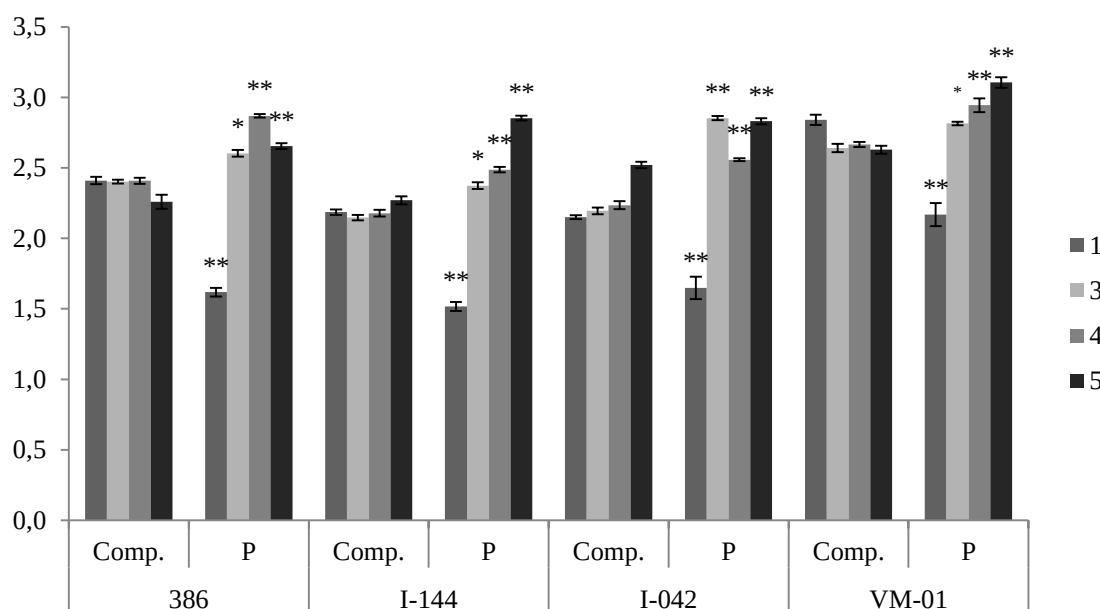


Figura 11: Teor de P em folhas diagnóstico de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ressuprimento de P (semanas 4 e 5) e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média. *, **: significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

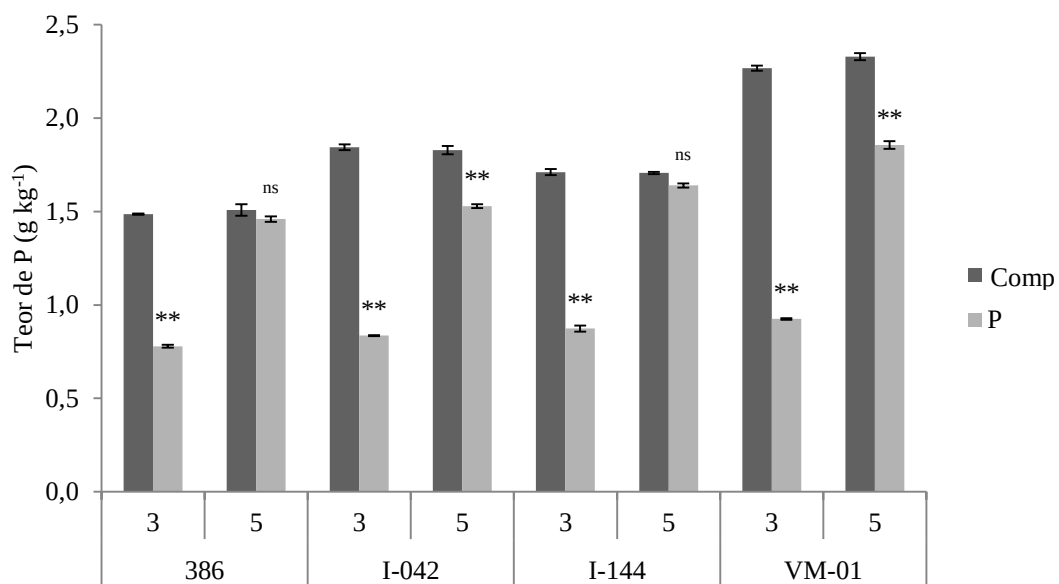


Figura 12: Teor de P em folhas velhas de clones de eucalipto (386, I-042, I-144 e VM-01) ao final do período de omissão (tempo 3) e de ressuprimento (tempo 5) de P e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média. ^{ns}, **: não significativo e significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

DISCUSSÃO

Nitrogênio

A omissão de N aumentou a atividade das enzimas NR e da GS e a expressão dos genes NR1, GS2;1 e Gln1;3, que atuam na síntese destas enzimas, revelando controle transcricional e pós-traducional destas enzimas pelo teor de N das plantas (Lian et al., 2005). A enzima GS apresentou atividade, em média, 62 vezes maior que a NR, reforçando sua grande importância como principal enzima relacionada com a remobilização de N em plantas, visto que este aumento ocorreu principalmente no período de omissão de N. Assim, a principal ação da GS nas semanas 1 e 3 foi a remobilização de N, pois não havia suprimento de N via solução nutritiva, diminuindo sua ação na assimilação do N-NH_4^+ .

A atividade da NR pode ser abordada de duas formas: primeiramente, maiores atividades desta enzima podem estar relacionadas a maiores absorções de NO_3^- e, consequentemente, maiores teores de N ativo nas folhas (Hirel et al., 2005; 2007). Esta abordagem é muito utilizada e acreditou-se durante mais de uma década que se tratava de uma excelente característica de uso no melhoramento de plantas (Beevers & Hageman, 1969). Entretanto, esse NO_3^- pode ser absorvido e estocado nos vacúolos, constituindo uma reserva para períodos de menor disponibilidade de N, sem apresentar toxicidade. Assim, atividades menores da NR podem estar relacionadas a cultivares com maior eficiência na utilização de N e resistência à deficiência de N. Corroborando com esta ideia, foi observado em *Arabidopsis* baixa atividade da enzima NR, resultado que pode refletir uma adaptação à baixa disponibilidade de N (North et al., 2009). Assim, neste trabalho, observa-se que no clone 386, tratamento controle, a atividade da NR pouco se alterou durante as semanas de avaliações. Já no tratamento referente à omissão/ressuprimento N, a atividade da NR diminuiu após duas semanas de ressuprimento para os clones 386 e 1-144 e se igualou à do tratamento controle para os clones I-042 e VM-01. Isto pode indicar que o aumento da atividade na omissão se deu pelo uso do NO_3^- dos vacúolos celulares, e, uma vez ressuprido o N, a diminuição da atividade se deu por estar a planta recompondo suas reservas e utilizando preferencialmente o NH_4^+ no seu metabolismo, visto que a atividade da GS foi muito maior que a da NR. Nos clones 386 e I-042 a maior atividade da NR ocorreu após uma semana de ressuprimento de N, em função da disponibilidade do substrato - NO_3^- , e

traduziu em menor velocidade de recuperação do estresse nutricional. Maior velocidade de retorno da atividade da NR está associada à tolerância à baixa disponibilidade de N (North et al., 2009; Chardon et al., 2010). Assim, os clones 386, I-042 e VM-01 apresentariam essa adaptação, visto que na semana 5 a atividade da NR se aproximou ou se igualou à do tratamento controle.

Quanto ao gene NR1, a maior expressão foi observada para o clone I-144 e a menor para o clone I-042, clones estes que também apresentaram a maior atividade da NR. Isto indica que este gene, identificado como responsivo ao status de N e à atividade da NR (Cai et al., 2012), não é um bom marcador para o clone I-042, pois não foi sensível nem ao estresse e nem à atividade da enzima que ele codifica. Assim, para este clone outros genes, já identificados para outras culturas (North et al., 2009; Cai et al., 2012), podem atuar na síntese desta enzima. Para os demais clones, VM-01 e 386, também houve aumento da atividade da NR e da expressão do NR1; assim, o NR1 controla a síntese da enzima NR para os clones 386, VM-01 e , principalmente, para o I-144.

A enzima GS, responsável pela assimilação do NH_4^+ e relacionada à remobilização de N, foi estudada em diversas culturas (Hirel e Lea, 2001; Martin et al., 2006; Unno et al., 2006; Kichey et al., 2005; Tabuchi et al., 2007) nas quais foram observados que aumentos na atividade da GS se relacionaram com a maior eficiência nutricional quanto a N. Assim, maiores atividades de GS estão associadas a variedades mais eficientes nutricionalmente na utilização de N, no que tange sua absorção e utilização . O efeito na absorção é explicado, de forma indireta, visto que a diminuição na concentração de glutamina aumenta a síntese de transportadores de alta afinidade, na raiz, modulando assim essa absorção (Sivasankar et al., 1997). Já a eficiência de utilização está relacionada com a maior capacidade de assimilação do N-NH_4^+ , evitando possíveis intoxicações, e a retranslocação de N na planta, aumentando a EUN (Hirel e Lea, 2001).

Os maiores aumentos na atividade da GS foram observados após três semanas de omissão de N (tempo 3). Nessa ocasião, houve maior aumento relativo da atividade da GS no clone I-144, que também apresentou maior expressão do gene GS2;1. Este clone foi o único a apresentar alterações consideráveis neste gene, ao passo que os clones I-042 e 386 apresentaram maiores expressões do gene Gln1;3. Este fato indica que o gene

GS2;1 é um bom biomarcador para o status de N para o clone I-144, conhecido pela sua alta eficiência nutricional (Pinto et al., 2011). O clone VM-01 apresentou pequena variação na expressão destes genes, GS2;1 e Gln1;3, e também foi o clone de menor aumento da atividade da GS na terceira semana. Estes genes também responderam ao suprimento de N e relacionaram-se a com a GS em outros trabalhos (Lian et al. 2006; Bi et al., 2007 e Hirel et al., 2007), corroborando com os resultados aqui apresentados. A busca do entendimento da regulação da GS e seu estudo em diferentes materiais genéticos foram objetos de estudo de diversas pesquisas (Hirel et al., 2007; Swarbreck et al., 2011; Ayadi et al., 2012), dada a grande importância da enzima, como comprovado neste trabalho. Assim, Lea et al. (2004) abordam que o estudo e manipulação desta enzima podem elucidar processos envolvidos na maior eficiência de utilização de N, visto que o aumento da atividade da mesma pode ser responsável por variações significativas no teor deste nutriente, mesmo que sua disponibilidade esteja em níveis estáveis (Hirel et al., 2007).

O aumento da expressão do gene TIP2;1, observado para todos os clones está relacionado com a capacidade da planta em acumular NH_4^+ sem efeitos tóxicos, relacionados à perda do gradiente eletroquímico, visto que este gene codifica aquaporinas controladoras do influxo de NH_4^+ nos tonoplastos. Este NH_4^+ , estocado nos vacúolos e utilizado pela GS, advém, principalmente, dos mecanismos de degradação de compostos orgânicos, que é seguida pela retranslocação do N-NH_4^+ e pelo processo de fotorrespiração. Rawat et al. (2007) observaram que este gene participa da compartimentalização do NH_4^+ em raízes e brotações em *Arabidopsis* e é de grande importância no eucalipto, que tolera altos níveis de NH_4^+ .

Fósforo

A interrupção no fornecimento de P aumentou a atividade das enzimas fosfohidrolases, como já observado para outras culturas (Ozawa et al., 1995; Yun & Kaeppler, 2001; Nanamori et al., 2004; Bozzo et al., 2006; Nunes et al., 2008) e por Basso et al. (2007) para eucalipto. Estas enzimas atuam na geração de Pi a partir de compostos orgânicos, colaborando então para a reciclagem de P (Anand e Srivastava, 2012), e maiores atividades estão relacionadas a maiores EUP. Assim, variedades com substituição dos fosfolípidos da membrana plasmática por sulfolípidos, maior

degradação de P-monoésteres e menor acúmulo de RNA ribossomal tendem a apresentar maior EUP (Van Mooy et al., 2006; 2009; Byrne et al., 2011; Rouached et al., 2011; Plaxton e Tran, 2011). O controle da atividade destas enzimas se dá, principalmente, pela concentração de Pi, sendo que maiores atividades das fosfohidrolases são observadas para menores suprimentos de P (Raghothama, 1999; Hammond et al., 2003; Nanamori et al., 2004; Tran & Plaxton, 2008; Tran et al., 2010a; 2010b), o que corrobora com os dados obtidos neste trabalho. Aliado ao aumento da atividade da fosfohidrolases, houve alterações na expressão dos genes RNS1 e PHO1;H1, visto que o RNS1 atua diretamente na síntese da RNase e o PHO1;H1 está relacionado ao transporte de P e a ação das duas enzimas.

Embora a elevação da atividade das fosfohidrolases na falta de P tenha sido observada para todos os clones, houve respostas diferenciais entre estes. A remobilização de P foi capaz de garantir que seu teor da folha diagnóstico, quando se omitiu o nutriente superasse ou se igualasse no caso do clone 386 ao mesmo tipo de folha do tratamento controle, ainda no período de omissão de P. Observou-se, para este clone, a maior expressão relativa dos genes PHO1;H1 e RNS1, embora a atividade relativa das fosfohidrolases tivessem sido as menores observadas na ocasião, indicando a ação de outros genes no controle destas enzimas ou a inativação das mesmas, por controle pós-traducional.

A remobilização de P é comprovada mediante a queda de seus teores nas folhas velhas, na avaliação realizada após o período de omissão (tempo 3), quando houve queda, em média, de 60 % em relação ao tratamento controle. Este P foi remobilizado de forma a suprir os drenos preferenciais no momento. Estima-se que cerca de 50 % do P possa ser remobilizado nas plantas, em decorrência da senescência das folhas ou do baixo suprimento de P (Aerts, 1996), que controlam a síntese das enzimas fosfohidrolases nos níveis transcricionais (Taylor et al., 1993; Bariola et al., 1999). Nesta retranslocação atua o gene PHO1;H1, cuja expressão aumentou para todos os clones avaliados. Huang et al. (2008; 2011) também observaram aumento da expressão deste gene em *A. thaliana* e *Phaseolus vulgaris* quando as plantas foram submetidas a omissão de Pi.

Com o ressuprimento, a atividade das enzimas APase e RNase diminuiu para os clones I-042 e VM-01. Esta queda pode ser explicada pelo controle pós-traducional

destas enzimas, que impede a tradução do RNAr em proteínas que não sejam necessárias no momento, implicando economia energética. Embora a atividade das enzimas tenha diminuído nas semanas 4 e 5, com exceção do clone 386, ela ainda manteve-se mais elevada nas plantas com omissão e ressuprimento de P do que no tratamento controle, por possível estímulo à síntese destas enzimas, visto que foi este o clone que apresentou a maior expressão do gene RNS1 (Tran et al., 2010a; Plaxton e Tran, 2011). Essa maior atividade das fosfohidrolases na presença de P pode explicar o fato de o teor de P nas folhas das plantas com alteração nutricional terem superado aquelas do tratamento controle na semana 5, com exceção do clone 386.

Foram observadas diferenças nas atividades das fosfohidrolases para o tratamento controle, nos diferentes tempos, para os materiais genéticos em estudo. Estas variações podem ser explicadas por efeito da idade fisiológica ou mudanças ambientais, como radiação e temperatura. Tal variação pode, então, ser atribuída ao comportamento do clone na ausência de estresse nutricional. O aumento da atividade das enzimas fosfohidrolases com avanço da idade da planta está atribuído à maior eficiência de uso do P (Tran et al., 2010b; Veneklass et al, 2012), o que foi observado nos clones I-042 e VM-01 para a enzima RNase. Já para os clones 386 e I-144 observou-se que a maior atividade das fosfohidrolases ocorreu na primeira avaliação e decresceu, não linearmente, com a idade da planta. Esta tendência já fora observada por Bosse e Kock (1998) e Nunes et al. (2008) e atribuída à menor demanda de P com aumento da idade da planta. Porém a atividade das fosfohidrolases é estimulada pelo suprimento não adequado de Pi ou pela senescência foliar, e, em ambos os casos, maiores atividades estão relacionadas a maior EUP (Bariola et al., 1999; Tran et al., 2010a; Wang et al., 2010; Robinson et al., 2012).

Conclusão

Os clones apresentaram respostas diferenciais ao estresse nutricional, pela omissão e ressuprimento de N ou P, indicando enzimas e genes como biomarcadores potenciais para uso na diagnose e melhoramento.

A enzima GS e a expressão dos genes GS2;1 e Gln1;3 foram os biomarcadores mais responsivos ao estresse de N.

A retranslocação de P durante a omissão do nutriente foi capaz de recompor o teor de P das folhas diagnóstico do tratamento controle, demonstrando a grande habilidade das plantas em otimizar o uso deste nutriente.

A enzima RNase e o gene que a codifica, o RNS1, foram os biomarcadores mais responsivos ao estresse de P.

Referências Bibliográficas

- ABEL, S. & GLUND, K. Localization of RNA-degrading enzyme activity within vacuoles of tomato cells. *Physiol. Plant.*, 66:79-86, 1986.
- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário Estatístico da ABRAF: ano base 2011. Brasília, 2012, 150p.
- AERTS, R. Nutrient resorption from senescing leaves of perennials: are there general patterns? *J. Ecol.* 84:597–608, 1996.
- ANAND, A. & SRIVASTAVA, P.K. A Molecular Description of Acid Phosphatase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167:2174-2197, 2012.
- ANTIBUS, R.K. & LESICA, P. Root surface acid phosphatase activities of vascular epiphytes of a Costa Rican rain forest. *Plant Soil*, 128:233-240, 1990.
- AYADI, S.; KARMOUS, C.; HAMMAMI, Z; TAMANI, N.; TRIFA, Y.; ESPOSITO, S. & REZGUI, S. Genetic variability of Nitrogen Use Efficiency components in Tunisian improved genotypes and landraces of durum wheat. *Agric. Sci. Res.J.* 2:591-601, 2012.
- BAR-AKIVA, A. & LAVON, R. Carbonic anhydrase as an activity of zinc deficiency in citrus leaves. *J.Hortic. Sci.* 44:359–362, 1969.
- BARIOLA, P.; MACINTOSH, G. & GREEN, P. Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*: Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiol.*, 119:331–342, 1999.
- BASSO, L.H.M.; LIMA, G.P.P.; GONÇALVES, A.N.; VILHENA, S.M.C. & PADILHA, C.C.F. Effect of aluminum on the free polyamines content and acid phosphatase activity during the growth of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated in vitro. *Sci. Forest.*, 75:9-18, 2007.
- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. H. Nitrate reduction in higher plants. *Annu. Rev. Plant*, 20:495-522, 1969.

- BENSCHOP, J. J.; MOHAMMED, S.; O'FLAHERTY, M.; HECK, A. J.; SLIJPER, M. & MENKE, F.L. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol. & Cel. Proteom.*, 6: 1198-1214, 2007.
- BI, Y.M.; WANG, R.L.; ZHU, T. & ROTHSTEIN, S.J. Global transcription profiling reveals differential responses to chronic nitrogen stress and putative nitrogen regulatory components in Arabidopsis. *BMC*, 8:281-298, 2007.
- BOSSE, D. & KÖCK, M. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant Cell Environ.*, 21:325-332, 1998.
- BOZZO, G.G.; DUNN, E.L. & PLAXTON, W.C. Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant Cell Environ.*, 29:303-313, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação esprectrofométrica de P em extratos de solo e planta. *R. Ceres*, 21:73-85, 1974.
- BYRNE, L.S.; FOITO, A.; HEDLEY, P.E.; MORRIS, J.A.; STEWART, D. & BARTH, S. Early response mechanisms of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) to phosphorus deficiency. *Ann. Bot.* 107:243-254, 2011.
- CAI, H., XIE, W. & LIAN, X. Comparative Analysis of Differentially Expressed Genes in Rice Under Nitrogen and Phosphorus Starvation Stress Conditions. *Plant Mol. Biol.R.*, 6:1-14, 2012.
- CAMBRAIA, J., PIMENTA, J.A., ESTEVÃO, M.M. & SANT'ANNA, R. Aluminum effects on nitrate uptake and reduction in sorghum. *J. Plant Nutr.*, 12:1435-1445.1989
- CAMPBELL, W.H. Nitrate redutase: structure, function and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:277–303, 1999
- CHARDON, F.; BARTHÉLÉMY, J.; DANIEL-VEDELE, F. & MASCLAUX-DAUBRESSE C. Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in

Arabidopsis thaliana cultivated with limiting and ample nitrogen supply. J. Exp. Bot., 61:2293-2302, 2010.

CLARK, R.B. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. J. Plant Nutr., 5:1039-1057, 1982.

COSTA, E.M. Efeitos do alumínio, nitrato e amônio sobre a nutrição nitrogenada em *Eucalyptus grandis* Hill (Maiden). Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1986. 50p. (Tese de Mestrado).

DUFF, S.M.G.; SARATH, G. & PLAXTON, W.C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. Plant Physiol., 90:791-800, 1994.

ELLIOTT, W.H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. J. Biol. Chem., 201:661-672, 1953.

EPSTEIN, E. & BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina, Editora Planta, 2006. 403p.

FERNANDES, L.A.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. & CURI, N. Frações de fósforo e atividade da fosfatase ácida em plantas de feijoeiro cultivadas em solos de várzea. R. Bras. Ci. Solo, 24:561-571, 2000.

FERNANDES, L.A.; FURTINI NETO, A.E.; CURI, N.; GUEDES, G.A.A. & LIMA J.M. Fósforo e atividade da fosfatase ácida em plantas de feijoeiro. Pesq. Agropec. Bras., 33:769-778, 1998.

FERREIRA, F.A.S. A interação nitrato, fosfato e sulfato na absorção de fosfato e de sulfato, no crescimento de eucalipto e no seu metabolismo de nitrato e sulfato. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1986. 95p. (Tese de Mestrado)

GENENGER, M.; ZIMMERMANN, S.; FROSSARD, E. & BRUNNER, I. The effects of fertilizer or wood ash on nitrate reductase activity in *Norway spruce* fine roots. For. Ecol. Manage., 175:413-423, 2003.

HAMMOND, J.P.; BROADLEY, M.R. & WHITE, P.J. Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. Ann Bot, 94: 323-332, 2004.

HE, L.; ZHAO, M.; WANG, Y.; GAI, J. & HE, C. Phylogeny, structural evolution and functional diversification of the plant PHOSPHATE1 gene family: a focus on *Glycine max*. BMC evol. Biol., 13:103, 2013.

HELDT, H.W. Plant Biochemistry, San Diego, USA, Elsevier, 2005. 656p.

HIREL, B. & LEA, P.J. Ammonia assimilation, In: Lea, P.J., Morot-Gaudry J.F. (Eds.), Plant Nitrogen, INRA-Springer, Berlin, Heidelberg, New York, p. 79-99, 2001.

HIREL, B.; ANDRIEU, B.; VALADIER, M.H.; RENARDA, S.; QUILLERE, I.; CHELLEB, M.; POMMEL, B.; FOURNIER, C. & DROUET, J. L. Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. Physiol. Plant., 124:178–188, 2005.

HIREL, B.; GOUIS, J.; NEY, B. & GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. J. Exp. Bot., 58:2369-2387, 2007

HUANG, C. Y.; SHIRLEY, N.; GENC, Y. & SHI, B.; LANGRIDGE, P. Focus issue on phosphorus plant physiology: Phosphate Utilization Efficiency Correlates with Expression of Low-Affinity Phosphate Transporters and Noncoding RNA, IPS1, in Barley. Plant Physiol, 156:1217-1229, 2011.

HUANG, C.Y.; ROESSNER, U.; EICKMEIER, I.; GENC, Y.; CALLAHAN, D.L.; SHIRLEY, N.; LANGRIDGE, P. & BACIC, A. Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate-deficient barley plants (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Physiol., 49:691–703, 2008.

KAWACHI, T.; SHOJI, Y.; SUGIMOTO, T.; OJI, Y.L.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L.; OHTAKE, N.; OHYAMA, T. & SUEIOSHI, K. Role of xylem sap nitrate in regulation of nitrate reductase gene expression in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. Soil Sci. Plant Nutr., 48:79-85, 2002.

KICHEY, T.; LE GOUIS, J.; HIREL, B. & DUBOIS, F. Evolution of the cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during flag leaf senescence in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Physiol., 46:964-974, 2005.

LEA, U.S.; TEN HOOPEN, F.; PROVAN, F.; KAISER, W.M.; MEYER, C. & LILLO, C. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf to root tissue. *Planta* 219: 59-65, 2004

LEMAIRE, G.; CHARRIER, X. & HE´BERT, Y. Nitrogen uptake capacities of maize and sorghum crops in different nitrogen and water supply conditions. *Agronomie*, 16:231–246, 1996.

LIAN, X.; XING, Y.; XU, H.Y.C.; LI, X.; ZHANG, Q. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. *Theor. Appl. Genet.* 112:85–96, 2005.

LOCATELLI, M.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L. & NOVAIS, R.F. Efeito de formas de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de eucalipto. *R. Árv.*, 8:53-69, 1984.

MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DAVANTURE, M.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; QUILLERÉ, I.; COQUE, M.; GALLAIS, A.; GONZALEZ-MORO, M.B.; BETHENCOURT, L.; HABASH, D.Z.; LEA, P.J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K.J. & HIREL, B. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize (*Zea mays* L.) are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell*, 18:3252–3274, 2006.

MARTINS, L.E.C. Respostas fisiológicas, metabólicas, estruturais e produtivas do capim-marandu às disponibilidades de fósforo e zinco. Piracicaba, SP, ESALQ, 2010, 53p. (Dissertação de Mestrado)

MEGURO, N.E. & MAGALHÃES, A.C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 17:249-257, 1982.

NANAMORI, M.; SHIMANO, T.; WASAKI, J.; YAMAMURA, T.; RAO, I.M. & OSAKI, M. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in the tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with rice. *Plant Cell Physiol.*, 45:460-469, 2004.

NELSON, D.W. & SOMMERS, L.E. Determination of total nitrogen in plant material. *Agron. J.* 65:109-112, 1973.

NORTH, K.A.; EHLTING, B.; KOPRIVOVA, A.; RENNENBERG, H. & KOPRIVA, S. Natural variation in *Arabidopsis* adaptation to growth at low nitrogen conditions. *J. Exp. Bot.*, 47:912-918, 2009.

NUNES, F.N.; CANTARUTTI, R.B.; NOVAIS, R.F.; SILVA, I.R.; TÓTOLA, M.R. & RIBEIRO, B.N. Atividade de fosfatases em gramíneas forrageiras em resposta à disponibilidade de fósforo no solo e à altura de corte das plantas. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1899-1909, 2008.

OZAWA, K.; OSAKI, M.; MATSUI, H.; HSNMS, M. & TADANO, T. Purification and properties of acid phosphatase secreted from lupin roots under phosphorus deficiency conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 41:461-469, 1995.

PINTO, S.I.; FURTINI NETO, A.E.; NEVES, J.C.L.; FAQUIN, V.; MORETTI, B.S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivados em solução nutritiva. *Rev. Bras. Ci. Solo.*, 35:523-533, 2011.

PLAXTON WC, TRAN HT. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiol.*, 156:1006–1015, 2011.

RADIN, J.W. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 53:458-463, 1974.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 50:665-693, 1999.

RAWAT, S.R.; SILIM, S.N.; KRONZUCKER, H.; SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana* : evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J.* , 19:143–152, 1999.

ROBINSON, W.D.; CARSON, I.; YING, S.; ELLIS, K. & PLAXTON, W.C. Eliminating the purple acid phosphatase AtPAP26 in *Arabidopsis thaliana* delays leaf senescence and impairs phosphorus remobilization. *New Phytol.*, 196:1024-1029, 2012.

ROUACHED, H.; STEFANOVIC, A.; SECCO, D.; ARPAT, A.B.; GOUT, E.; BLIGNY, R. & POIRIER, Y. Uncoupling phosphate deficiency from its major effects on growth and transcriptome via *pho1* expression in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 65:557–570, 2011.

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J. & AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.*, 116:447-453, 1998.

SECCO, D.; BAUMANN, A. & POIRIER, Y. Characterization of the rice *PHO1* gene family reveals a key role for *OsPHO1; 2* in phosphate homeostasis and the evolution of a distinct clade in dicotyledons. *Plant Physiol.*, 152:1693–1704, 2010.

SILVA, F.C. & BASSO, L.C. Avaliação da atividade in vivo da fosfatase ácida na folha na diagnose da nutrição fosfórica em cana-de-açúcar. *R. Bras. Ci. Solo*, 17:371-375, 1993.

SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S. & OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. *Plant Physiol.* 114: 583-589, 1997.

SRIVASTAVA, A.K. & SINGH, S. Biochemical markers and nutrient constraints diagnosis in citrus: a perspective. *J. Plant Nutr.*, 29:827-855, 2006.

STEFANOVIC, A.; RIBOT, C.; ROUACHED, H.; WANG, Y.; CHONG, J.; BELBAHRI, L.; DELESSERT, S. & POIRIER, Y. Members of the *PHO1* gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant J.*, 50:982-994, 2007.

SWARBRECK, S.M.; LINDQUIST, E.A.; ACKERLY, D.D.; ANDERSEN, G.L. Analysis of leaf and root transcriptomes of soil-grown *Avena barbata* plants. *Plant Cell Physiol.* 52:317-332, 2011

TABUCHI, M.; ABIKO, T. & YAMAYA, T. Assimilation of ammonium-ions and re-utilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 8: 2319-2327, 2007.

- TABUCHI, M.; SUGIYAMA, T.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H. & YAMAYA, T. Severe reduction in growth and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase. *Plant J.*, 42:641–655, 2005.
- TAYLOR, C.B.; BARIOLA, P.A.; DEL CARDAYRÉ, S.B.; RAINES, R.T. & GREEN P.J. RNS: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the RNases before speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5118–5122, 1993.
- TRAN, H. T. & PLAXTON, W.C. Proteomic analysis of alterations in the secretome of *Arabidopsis thaliana* suspension cells subjected to nutritional phosphate deficiency. *Proteomics*, 20:4317-4326, 2008.
- TRAN, H.T.; HURLEY, B.A. & PLAXTON, W.C. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Sci.*, 179:14–27, 2010b.
- TRAN, H.T.; QIAN, W.; HURLEY, B.A.; SHE, Y.; WANG, D. & PLAXTON, W.C. Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Env.* 33:1789–1803, 2010a.
- UNNO, H.; UCHIDA, T.; SUGAWARA, H.; KURISU, G.; SUGIYAMA, T.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H.; HASE, T. & KUSUNOKI, M. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J. Biol. Chem.*, 281:29287-29296, 2006.
- VALE, F. R.; NOVAIS, R. F. ; BARROS, N. F. ; SANT'ANNA, R. . Efeito de alumínio sobre a cinética de absorção de amônio e nitrato em raízes intactas de *Eucalyptus alba*. *R. Árv.*, 8:123-132, 1984.
- VAN MOOY, B.A.; FREDRICKS, H.F.; PEDLER, B.E.; DYHRMAN, S.T.; KARL, D.M. & KOBLÍ&ZCARON, M. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, 458: 69-72, 2009;
- VAN MOOY, B.A.S.; ROCAP G.; FREDRICKS H.F.; EVANS C.T. & DEVOL A.H. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc. Nat. Acad.Sci.*,103: 8607–8612, 2006

VANCE C.P.; UHDE-STONE, C. & ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.*, 157:423–447, 2003.

VASCONCELOS, M.J.V. & RAGHOTHAMA, K.G. Análise da expressão de genes induzidos por fósforo em genótipos contrastantes de milho, selecionados para eficiência do uso de fósforo. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 26; 2006. Anais. Belo Horizonte, ABMS, 2006a. CD-ROM.

VASCONCELOS, M.J.V. & RAGHOTHAMA, K.G. Análise de expressão do gene A1 induzido por estresse de fósforo em genótipos de milho eficiente e ineficiência ao uso de fósforo. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 26; 2006. Anais. Belo Horizonte, ABMS, 2006b. CD-ROM.

VENEKLAAS, E. J.; LAMBERS, H.; BRAGG, J.; FINNEGAN, P. M.; LOVELOCK, C. E.; PLAXTON, W. C.; PRICE, C. A.; SCHEIBLE, W.-R.; SHANE, M. W.; WHITE, P. J. & RAVEN, J. A. Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phyt.*, 195: 306–320, 2012

WANG Y, R.C.; REZZONICO, E. & POIRIER, Y. Structure and expression profile of the Arabidopsis PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiol*, 135:400–411, 2004.

WANG Y, S.D. & POIRIER, Y. Characterization of the PHO1 gene family and the responses to phosphate deficiency of *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.*, 146:646–656, 2008.

WANG, X.; SHEN, J. & LIAO, H. Acquisition or utilization, which is more critical for enhancing phosphorus efficiency in modern crops? *Plant Sci.*, 179:302–306, 2010

WILSON, C.M. Plant nucleases. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26:187-208, 1975.

WILSON, K. & WALKER, K. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. 5a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 784 p.

YAN, X.; WU, P.; LING, H.; XU, G.; XU, F. & HANG, Q. Plant nutriomics in China: an overview. *Ann. Bot.*, 98:473–482, 2006.

YUN, S.J.; & KAEPPLER, S.M. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. *Plant Soil*, 237:109-115, 2001.

Capítulo 2

Crescimento, teores nutricionais e de pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em clones de eucaliptos submetidos à omissão e ao ressuprimento de N ou P

Resumo

O eucalipto é a principal essência florestal cultivada no País ocupando, em geral, solos de baixa fertilidade natural ou degradados, onde a fertilização mineral é necessária para obter altas produtividades. Estudos que busquem identificar mecanismos responsáveis pela maior eficiência nutricional e a resposta de materiais genéticos à restrição nutricional são necessários para o uso racional de fertilizantes. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da omissão e do ressuprimento de N ou P no crescimento, teores e eficiência nutricional, teores de pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* de clones de eucalipto. Foram utilizadas mudas de quatro clones de eucalipto, 386, I-042, I-144 e VM-01, que cresceram por 60 dias em solução nutritiva completa. Os tratamentos consistiram da omissão (3 semanas) e ressuprimento (2 semanas) de N ou P e tratamento controle. Neste período foram feitas coletas semanais, não destrutivas (crescimento em altura e diâmetro, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*), nas semanas 1, 3, 4 e 5 foram feitas coletas destrutivas de folhas diagnóstico (folhas jovens totalmente expandidas) para determinação do teor total de N e P e teores dos pigmentos fotossintéticos e nas semanas 3 e 5 foram coletadas folhas velhas para análise do teor de N e P total. Ao final, foram determinados a massa de folhas, caule e raiz e o teor total de N, P, S, K, Ca e Mg. A partir destes dados, foi calculada a eficiência de absorção, de utilização e a retranslocação de N e P. A omissão de N ou P levou à queda dos seus teores nas folhas diagnóstico, o que resultou na queda da taxa fotossintética. A alta retranslocação de P em plantas submetidas à sua omissão foi capaz de suprir a folha diagnóstico, igualando ou superando ao teor de P do tratamento controle. O clone VM-01, pouco eficiente nutricionalmente quanto a P no tratamento controle, se diferenciou dos demais, aumentando sua eficiência de utilização (EU), possivelmente em virtude da alta retranslocação deste nutriente. O clone 386 foi o que apresentou maior crescimento no tratamento controle, porém foi também o que apresentou os maiores efeitos da omissão/ressuprimento de N ou P, que culminaram em

expressiva redução de crescimento. A EU de N diminuiu na omissão de N e a EU de P aumentou na omissão de P, mostrando uma maior adaptação das plantas à falta de P. As quedas fotossintéticas foram associadas a menores taxas de transporte de elétrons (ETR) e a menores taxas de dissipação fotoquímica ($\dot{Y}_{II}$). O ressuprimento de N e P foi capaz de reestabelecer os teores de Ne de pigmentos fotossintéticos nas folhas diagnóstico, a taxa fotossintética e as variáveis da clorofila *a* nos tratamentos referentes à omissão/ressuprimento de N ou P, mostrando o potencial de recuperação destas plantas após o estresse imposto.

Introdução

O eucalipto é a principal essência florestal cultivada no País ocupando solos que são, geralmente, marginais e de baixa fertilidade natural ou degradados, onde a pobreza química é superada via adubação. O adequado manejo com adoção de boas práticas silviculturais, dentre as quais a adubação merece destaque, é fundamental para a expressão do potencial genético dos plantios quanto à produtividade, primariamente limitada pelas condições climáticas e fisiográficas do sítio florestal. Observa-se, no eucalipto e também em outras culturas, correlação positiva e estreita entre a taxa de acúmulo de nutrientes e a de crescimento, e as exigências nutricionais dependem de diversos fatores, como idade da planta, material genético e sítio florestal (Barros & Novais, 1990). O acúmulo de nutrientes se correlaciona com a produtividade e varia com o material genético, idade e manejo adotado (Evenhuis & Waard, 1980), traduzindo em diferentes eficiências nutricionais.

A eficiência nutricional (EN) apresenta dois componentes: o primeiro, que se refere à absorção dos nutrientes (eficiência de absorção - EA) e se relaciona com o sistema radicular, especialmente à arquitetura (massa, área, volume e proporção de raízes finas) e presença de transportadores de alta e baixa afinidade. O segundo componente é a eficiência de utilização (EU), que indica a produção de massa por unidade do nutriente. Assim, a EN é de alta complexidade, pois integra todos os fatores que afetam o desenvolvimento das plantas e o entendimento desses processos requer abordagem interdisciplinar (McDonald et al., 2013), visto que a EN apresenta controle genético e responde a diferentes tipos de estresse, especialmente o nutricional. Assim, estudos que busquem a avaliação conjunta do status nutricional, crescimento e variáveis fisiológicas são de grande utilidade para o melhoramento, subsidiando a escolha de materiais genéticos mais eficientes (McDonald et al., 2013). O gênero *Eucalyptus* apresenta grande número de espécies e híbridos de interesse comercial ou científico e esta variabilidade genética deve ser melhor aproveitada buscando de materiais mais eficientes quanto ao uso dos nutrientes.

Diversos trabalhos identificaram respostas diferenciais quanto à nutrição em nível de espécie ou clone, em diferentes ambientes fisiográficos (Santana et al., 2002; 2008), imposição de estresse hídrico (Lima, 1996; Mattiello et al., 2009, Pulito et al., 2008; Nunes, 2010; Reis, 2011, Muller et al., 2012) ou caracterização do material

quanto à absorção e/ou utilização dos nutrientes (Furtini Neto et al., 1996; Neves, 2000; Lima et al., 2005; Pinto et al., 2011). Os trabalhos de Lima (1996), Nunes (2010), Mattiello et al., (2009), Reis (2011) e Muller et al. (2012) utilizaram análises ecofisiológicas ou moleculares no entendimento das respostas do eucalipto frente a estresses hídricos e/ou nutricionais.

As variáveis fisiológicas comumente utilizadas são as trocas gasosas - taxa fotossintética líquida, condutância estomática e a razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (Ci/Ca), avaliação da fluorescência da clorofila *a* e teores dos pigmentos fotossintéticos. Estas variáveis estão relacionadas com a capacidade fotossintética das plantas, cuja queda ocorre por redução na condutância estomática e na relação Ci/Ca e/ou por redução na taxa de assimilação do C por danos ao aparato fotossintético e aumento da relação Ci/Ca.

O aparato fotossintético, composto por dois fotossistemas, apresenta moléculas de clorofila nos seus centros de reação, que são responsáveis pela absorção e conversão da energia luminosa (fótons) em química (ATP, NADPH). Além da clorofila *a* (Chl *a*), os centros de reação apresentam moléculas de clorofila *b* e carotenoides (carotenos e xantofilas), que atuam como pigmento auxiliar à Chl *a*, evitando sua degradação em caso de estresse oxidativo. Assim, os teores e relações entre estes pigmentos estão diretamente relacionados à capacidade fotossintética das plantas, bem como são indicadores de situações de estresse (Hendry & Price, 1993). Entretanto, a determinação destes pigmentos envolve análises destrutivas e ainda não rotineiras, o que motivou o desenvolvimento de medidores de clorofila portáteis, que determinam o índice da cor verde das folhas. Esses clorofilômetros são amplamente estudados e utilizados em diversas culturas, cujos relacionamentos entre as leituras, teor de clorofila e de N foram estabelecidos para diversas culturas (Turner & Jund, 1991; Guimarães et al., 1999; Argenta et al., 2001; Gil et al., 2002; Ferreira et al., 2006; Pinkard et al., 2006). Considerando que o N é o nutriente que mais influencia no teor das clorofilas, pois até 80 % do N encontram-se nos cloroplastos (Langsdorf et al., 2000), o uso dos clorofilômetros se propagou como método de diagnose foliar de N e pode fornecer bons resultados desde que calibrado para as condições de uso (Marenco & Lopes, 2005).

A fluorescência da chl *a* informa sobre a capacidade fotoquímica do FS_{II}, quanto à capacidade de absorção e transferência de energia luminosa e danos foto-oxidativos

decorrentes de estresses (Lichtenthaler & Miehe, 1997; Maxwell e Johnson 2000). Aliado a isso, cabe mencionar que a fluorescência da chl *a* é uma análise relativamente rápida e não destrutiva (Murchie & Lawson, 2013). Os danos foto-oxidativos ocorrem devido a queda da etapa bioquímica não acompanhada da etapa fotoquímica, onde os fotossistemas continuam a absorver energia luminosa, não havendo demanda suficiente pelos compostos redutores gerados. Este descompasso entre as etapas pode resultar em danos foto-oxidativos e as plantas apresentam diversos mecanismos para evitá-los ou minimizá-los.

Para mensurar os danos foto-oxidativos são obtidas medições no escuro (F_0 e F_m), onde quinona A está completamente oxidada, e os centros de reação são capazes de realizar a redução fotoquímica. A folha recebe um feixe de luz de baixa intensidade e mede-se o F_0 , que é a quantidade de luz emitida pelas moléculas de chl *a* excitadas, antes da energia ser dissipada para o FS_{II} . Em seguida, a folha é submetida a um rápido pulso de luz actínia, de alta intensidade, quando a quinona A reduzida atingirá seu nível máximo de fluorescência (F_m), levando ao fechamento dos centros de reação do FS_{II} . A diferença entre F_m e F_0 será a fluorescência variável (F_v) e a razão F_v/F_m estima a eficiência fotoquímica potencial do FS_{II} , medindo quanto da luz incidente pode ser absorvida pelos centros de reação do FS_{II} (Baker & Rosenqvist, 2000). Em plantas saudáveis esta relação varia de 0,75 a 0,85 (Bolhar-Nordenkamp et al., 1989).

Uma vez absorvida, há três caminhos para a energia luminosa, que pode ser convertida em energia química (Y_{II} - rendimento quântico efetivo do FS_{II}), dissipada na forma de fluorescência (Y_{NPQ} - rendimento quântico da dissipação de energia regulada no FS_{II}) ou na forma de calor (Y_{NO} - rendimento quântico da dissipação de energia não regulada no FS_{II}) (Klughammer & Schreiber, 2008). Assim, quedas no Y_{II} e aumentos no Y_{NO} e Y_{NPQ} indicam situações de estresse com queda da capacidade fotossintética, visto que a conversão de energia luminosa em química será menor (Murchie & Lawson, 2013)

O metabolismo e a fotossíntese estão fortemente relacionados ao status de N na planta, dada a grande alocação de N na clorofila e sua presença em proteínas, como a enzima rubisco (Field & Mooney, 1986). Assim, deficiências de N levam a queda fotossintética, seja pelo menor teor de clorofila e rubisco ou pela menor capacidade da planta em resistir a estresses oxidativos (Bungard et al., 1997). Com isso, são observadas

fortes correlações entre o conteúdo de N, área foliar e na taxa fotossintética líquida (Field & Mooney, 1986; Smethurst et al., 2004; Hirel et al., 2007)

O P, nutriente mais limitante da produtividade agrícola em solos ácidos (Vance et al., 2003), também se relaciona com a fotossíntese, e, consequentemente, produção vegetal. Este nutriente é constituinte de membranas celulares, ácidos nucleicos e compostos energéticos (NADPH e ATP), sendo estes últimos gerados na fase fotoquímica da fotossíntese e utilizados em diversas reações que necessitam de energia na planta. As plantas apresentam diversas adaptações à falta de P, que incluem alterações morfológicas, metabólicas e fisiológicas. As alterações morfológicas incluem sinalizações hormonais e diferenciação na partição de assimilados, aumentando a relação raiz/parte aérea, decorrente do maior aporte de fotoassimilados na raiz (Hammond et al., 2004; Huang et al., 2008; 2011; Byrne et al., 2011). Quanto às fisiológicas, citam-se a menor taxa de transporte de elétrons, em função da menor produção de ATP, e a menor atividade e taxa de regeneração da rubisco (Warren, 2011). Alterações metabólicas incluem o aumento da atividade de enzimas associadas à retranslocação de P e à síntese de metabólitos secundários, como antocianinas e compostos fenólicos (Hammond et al., 2004). Assim, a avaliação destas alterações, especialmente em conjunto, colabora na diferenciação de materiais genéticos quanto a eficiência do uso do P.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da omissão e seguida por ressuprimento de N ou P no crescimento, teores e eficiências nutricionais, trocas gasosas, teores de pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a* para materiais genéticos pré-identificados quanto ao uso de N e P.

Materiais e Métodos

Instalação e condução do experimento:

Mudas de quatro clones de eucalipto (I-042, I-144, VM-01 e 386), com aproximadamente 45 dias de idade, foram utilizadas no estudo. A escolha desses materiais genéticos, todos de larga utilização em plantios comerciais, se deu com base nos resultados obtidos por Pinto et al. (2011), que os classificou quanto à eficiência de absorção e utilização de N e P, conforme abaixo:

EUN: 386=I-144>I-042=VM-01

EAN:386=I-144=I-042=VM-01

EUP: 386>I-144>I-042 =VM-01

EAP:386=I-144=VM-01>I-042

O clone VM-01 é híbrido de *Eucalyptus urophylla* vs *E. camaldulensis*, e os demais são híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs *E. grandis*.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura média de 29° C. As mudas tiveram seu substrato inicial retirado e foram acomodadas em vasos de polietileno com 14 litros de solução nutritiva e aeração constante. A solução nutritiva utilizada foi a de Clark (1982), adaptada por Locatelli et al. (1984), de modo a suprir 50 % do N como NH_4^+ e 50 % como NO_3^- (tabela 1). Decorridos 60 dias de crescimento das mudas nessa solução, foram aplicados os dois tratamentos: 1) solução com presença continuada (controle) de N e P e 2) solução com omissão e posterior ressuprimento de N ou P (tabela 1). Os períodos de omissão e de ressuprimento tiveram duração de três e de duas semanas, respectivamente. O pH da solução foi monitorado e ajustado diariamente utilizando HCl ou NaOH 1 mol L⁻¹, de modo que ficasse entre 5,0 a 6,0, e as trocas da solução nutritiva foram feitas semanalmente. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com três repetições por tratamento, totalizando 36 unidades experimentais, constituídas por um vaso com três plantas.

Tabela 1: Composição da solução nutritiva de Clark (1982), adaptada por Locatelli et al. (1984)

Reagente	Completa	Omissão de N ¹	Omissão de P ¹
----- mmol L ⁻¹ -----			
NH ₄ NO ₃	2,925	-	2,925
CaCl ₂	1,30	1,30	1,30
K ₂ SO ₄	0,30	0,30	0,30
MgSO ₄	0,30	0,30	0,30
KCl	0,53	0,53	0,668
KH ₂ PO ₄	0,138	0,138	-
----- μmol L ⁻¹ -----			
-			
Fe-EDTA	40,00	40,00	40,00
MnCl ₂	7,00	7,00	7,00
H ₃ BO ₃	19,00	19,00	19,00
ZnSO ₄	2,00	2,00	2,00
CuSO ₄	0,50	0,50	0,50
Na ₂ MoO ₄	0,086	0,086	0,086

¹As soluções de omissão de N e de P foram utilizadas durante o período de omissão de N e P, respectivamente, e a solução completa foi utilizada no tratamento controle e no período de ressuprimento de N ou P.

Semanalmente ocorreram coletas destrutivas e não destrutivas. Os tempos, com 7 dias de intervalo entre eles, são referentes à omissão (semanas 1, 2 e 3) e ressuprimento do nutriente (semanas 4 e 5). As medições de altura da planta e diâmetro do coleto foram feitas nas semanas de 1 a 5. As avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) foram feitas em cinco momentos (semanas 1 a 5) e em folhas jovens totalmente expandidas (folha diagnóstico). Nas coletas destrutivas, realizadas em quatro momentos (semanas 1, 3, 4 e 5), foram retiradas folhas diagnóstico, as quais foram postas em estufa para secagem e posterior determinação do teor total de N e de P. Também nas semanas de 1, 3 4 e 5 foram coletados discos foliares para a extração de pigmentos fotossintéticos e realizada a leitura indireta de clorofila com clorofilômetro portátil. Nas semanas 3 e 5 foram coletadas folhas velhas para a determinação do teor total de N e P. Na coleta referente à semana a planta foi separada em folhas (nova, diagnóstico, intermediária e velha), caule e raiz. Esses órgãos foram levados à estufa, e, após atingirem massa constante, foram pesados. Em seguida, o material foi moído e submetido à análise dos teores totais de N, P, S, K, Ca e Mg.

Avaliação do crescimento

Para as medições da altura da planta e diâmetro do coleto foram utilizados paquímetro digital (divisões de 0,01 mm) e régua (divisão de 0,1 cm), respectivamente. Foram medidas as três plantas de cada vaso e obtida a média.

A massa de cada órgão (raiz, caule, folhas) foi obtida ao final do experimento, após o corte, separação e secagem das partes. Foram somadas à massa final as massas das folhas coletadas para determinação dos teores dos nutrientes nas coletas das semanas 1, 3 e 4.

A partir das massas das folhas, caule e raízes foi calculada a relação entre a massa da parte aérea (folhas e caule) e a massa das raízes, em g g^{-1} .

Teores totais e conteúdo dos nutrientes

Para a extração de P, S, Ca, Mg e K foi feita digestão nitroperclórica, na proporção 3,5:1 de ácido nítrico para ácido perclórico. No extrato foi retirada alíquota para determinação de P por colorimetria (Braga e Defelipo, 1974). Neste mesmo extrato foram feitas as determinações dos teores de S (turbidimetria - Alvarez V. et al., 2001), Ca e Mg (Espectrômetro de absorção atômica) e K (Emissão de chama). Para N foi feita digestão sulfurosa, seguida de destilação e titulação (Nelson & Sommers, 1973).

A partir dos teores e da massa dos órgãos foram calculados os conteúdos dos nutrientes nas plantas. Calculou-se também a alocação relativa de N e P na raiz, caule e folha. Para isto, o conteúdo do nutriente em cada órgão foi dividido pelo conteúdo do nutriente em toda a planta.

Eficiências Nutricionais

Foram calculadas as eficiências de absorção (E.A.), utilização (E.U.) e índice de retranslocação (IRet) dos nutrientes, segundo as fórmulas seguintes:

E.A. (mg g^{-1}): conteúdo do nutriente na planta (em mg) / massa da matéria seca da raiz (em g) - (Swiader et al., 1994)

E.U. ($\text{g}^2 \text{g}^{-1}$): (massa da matéria seca por vaso)² (em g^2) / conteúdo do nutriente (em g) - (Siddiqui & Glass, 1981).

IRet (%): (teor na folha velha do tratamento controle - teor na folha velha do tratamento -N ou -P (g/kg)) / teor na folha velha do tratamento controle [$(\text{g/kg}) \times 100$]

O cálculo da retranslocação adotado neste trabalho compara o teor da folha velha do tratamento controle com o teor da folha velha do tratamento de N ou P. As folhas denominadas "velhas" não eram senescentes e sim as de idade fisiológica mais avançada na planta. Além disso, devido ao crescimento da planta durante o período experimental, as folhas utilizadas na avaliação da terceira semana tiveram todo o seu crescimento, desde o surgimento da gema até a coleta para a análise, sob omissão de N ou P, de modo que o conteúdo de N ou P ali detectado resultou da ciclagem interna destes. Portanto, o IRet aqui apresentado é o aumento da retranslocação resultante da omissão de N ou P em relação ao tratamento controle.

Trocas Gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas na parte da manhã, de 8:00 às 11:00 horas. Foram medidas as variáveis taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s) e a razão entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), utilizando-se analisador de gás por infravermelho (IRGA; modelo LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA).

A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) utilizada foi constante e de $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pré-determinada em curvas lumínicas para estes clones, concentração atmosférica de CO_2 (C_a) ($\sim 390 \mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ambiente ($25 - 29^\circ\text{C}$) e da folha de 25°C e umidade ambiente ($45 - 58\%$).

A partir dos dados de A , foi calculada a redução na taxa fotossintética em decorrência da omissão/ressuprimento de N ou P, em relação ao tratamento controle, a partir das equações de regressão ajustadas para A . Essa perda relativa foi calculada para os quatro clones nos períodos de omissão, ressuprimento e todo o período.

Fluorescência da clorofila a

As medições da fluorescência da clorofila a foram realizadas utilizando aparelho IRGA (LI-6400xt, LI-COR), com fluorômetro acoplado, e na mesma folha em que foram realizadas as medições das trocas gasosas e a determinação dos teores dos pigmentos.

As variáveis de indução da fluorescência, obtidas no escuro, foram: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m). A partir desses valores foi obtido o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FS_{II}), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$

(Genty et al., 1989), sendo F_v a fluorescência variável entre F_m e F_0 . As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência (obtidas no claro) foram obtidas sequencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir destes, foi calculada a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado, $F_0' = F_0 / [((F_m - F_0)/F_m) + (F_0/F_m')]$ (Oxborough & Baker, 1997), que foi utilizado para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, que fornece uma estimativa de centros de reações abertos do FS_{II} , pela fórmula: $q_L = (F_m' - F) / (F_m' - F_0') * (F_0'/F)$ (Kramer et al., 2004).

Para as formas de dissipação de energia, foram utilizadas as seguintes fórmulas, propostas por Genty et al. (1989) e Hendrickson et al. (2004):

$\hat{Y}_{II} = (F_m' - F) / F_m'$ - rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FS_{II} ;

$\hat{Y}_{NPQ} = (F/F_m') - (F/F_m)$ - rendimentos quântico da dissipação de energia regulada;

$\hat{Y}_{NO} = F/F_m$ - dissipação de energia não regulada.

O $\hat{Y}_{II}$ calculado foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = \hat{Y}_{II} \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$ (Bilger & Björkman, 1990), em que onde PAR é a radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha, no caso $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FS_{II} (Laisk & Loreto, 1996); e 0,84 o valor de referência correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981).

Teores de Pigmentos Fotossintéticos

Para os pigmentos (clorofilas e carotenoides) foi utilizado método proposto por Wellburn (1994), em que um disco, de 10 mm de diâmetro e massa conhecida, foi submetido à extração, no escuro e a quente, utilizando dimetilsulfoxido (DMSO) saturado com CaCO_3 , por 2 h. As leituras foram feitas por espectroscopia de absorção molecular (Thermo Scientific Evolução 60) e para o cálculo foram utilizadas as equações:

Clorofila *a* (Chl *a*): $12,47 \cdot A_{665,1} - 3,62 \cdot A_{649,1}$ (Wellburn, 1997)

Clorofila *b* (Chl *b*): $25,06 \cdot A_{649,1} - 6,5 \cdot A_{665,1}$ (Wellburn, 1997)

Carotenoides totais: $(1000 \cdot A_{480} - 1,29 \cdot \text{Chl } a - 53,78 \cdot \text{Chl } b) / 220$ (Wellburn, 1997)

Clorofila *a + b*: teor de Chl *a* + teor de Chl *b*

IF (Índice de Feofinização): A_{435} / A_{415} (Ronen e Galun, 1984)

Clorofila *a/b*: teor de Chl *a* / teor de Chl *b*

Clorofila *a + b*/carotenoides: teor de Chl *a* + teor de Chl *b* / teor de carotenoides

A leitura de clorofila por SPAD foi obtido utilizando o aparelho SPAD-502 (Konica Minota). As medições foram feitas pela manhã, em seis folhas do tipo diagnóstico, para cada unidade experimental, calculando a média destas leituras.

Análises Estatísticas

Para as variáveis obtidas ao longo do experimento (crescimento em altura e diâmetro, teores de N, P e pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas e variáveis da fluorescência da clorofila *a*), foi feita análise de variância, com desdobramento dos graus de liberdade da interação clone vs tempo e análise de regressão destes dados em função do tempo (semana).

Para as variáveis obtidas no tempo final, massa, conteúdo, eficiência de absorção e utilizado de N e P foi feita análise de variância e teste F comparando os tratamentos de omissão/ressuprimento de N ou P com o controle, para cada clone.

Os índices de retranslocação de N e P dos clones foram comparados entre si por teste Tukey.

Resultados

Crescimento:

A omissão seguida por ressuprimento de N reduziu a quantidade de matéria seca acumulada dos clones 386, I-042 e I-144, com maior queda para o clone 386, de 50,3 %, em relação ao seu controle. Já a omissão e o ressuprimento de P diminuíram apenas o crescimento do clone 386, em 25,2 %. Cabe ressaltar que o clone 386 foi o que mais cresceu no tratamento controle e também o que mais sofreu o efeito da restrição nutricional. O clone VM-01 não teve sua massa afetada pela omissão de N e aumentou sua massa em 20 % com a omissão de P (Figura 1). Quanto à partição da biomassa, o caule apresentou a maior redução de massa, média de 32,8 % para N e 9,3 % para P.

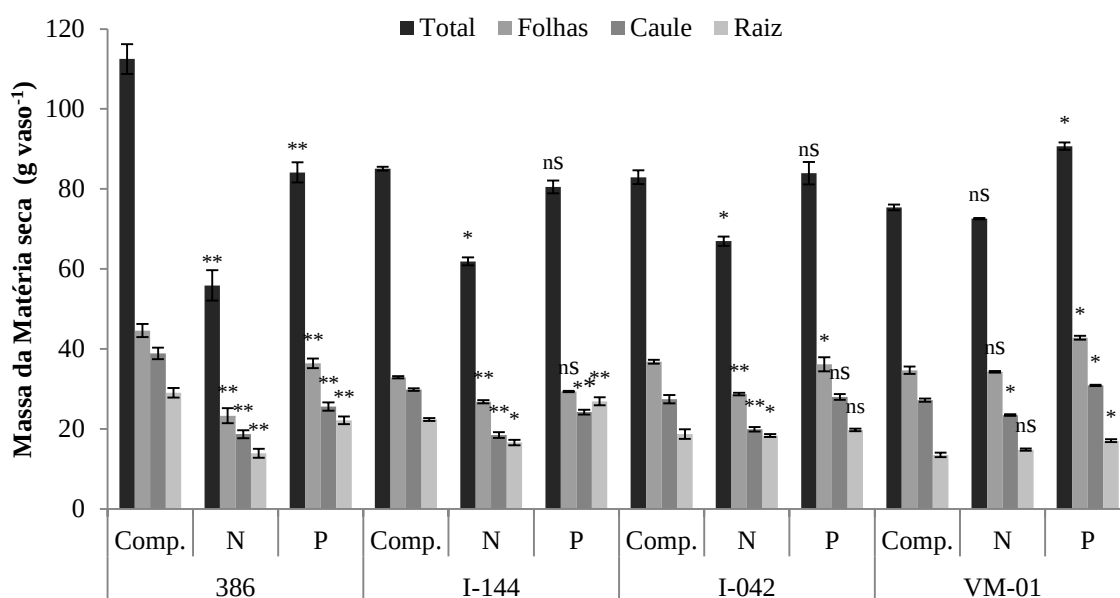


Figura 1: Massa de matéria seca (g/vaso;) de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão e ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.), cultivados em solução nutritiva. Barras na vertical indicam o erro padrão da média. ^{ns}, *, **: não significativo e significativo a 5 e a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

O clone 386 manteve a relação parte aérea/sistema radicular (Figura 2) estável, ao passo que o clone I-144 aumentou a alocação de fotoassimilados para raízes, em 20,4 %, em detrimento da parte aérea, quando da omissão de P. O clone VM-01 apresentou a maior relação parte aérea/sistema radicular, independente do tratamento, com raízes de menor espessura, resultando em menor massa radicular quando comparado com os demais (Figura 3).

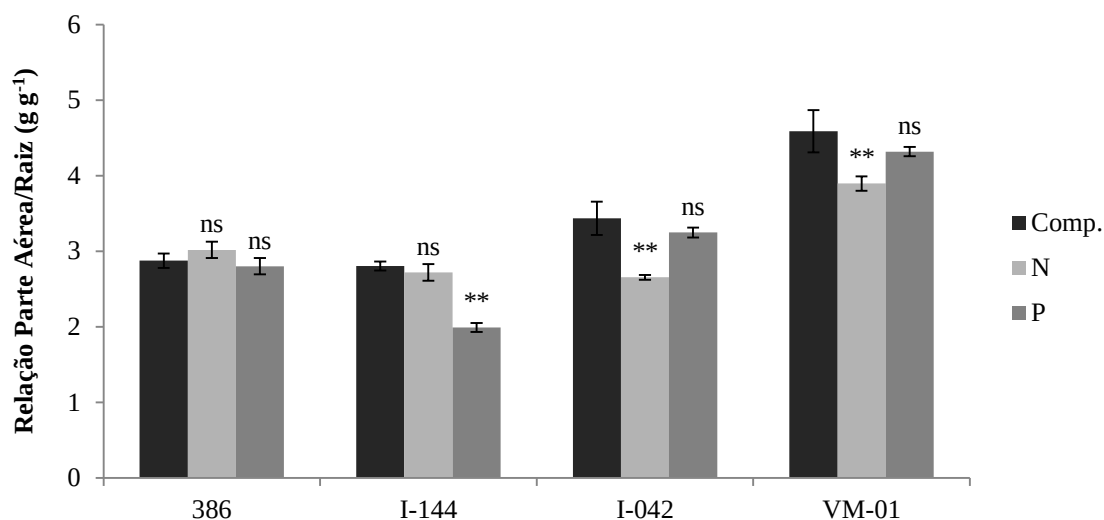


Figura 2: Relação parte aérea/sistema radicular de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão e ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.) Barras na vertical indicam o erro padrão da média. ^{ns}, ^{**}: não significativo e significativo pelo teste a 1 % de probabilidade, em relação ao controle .

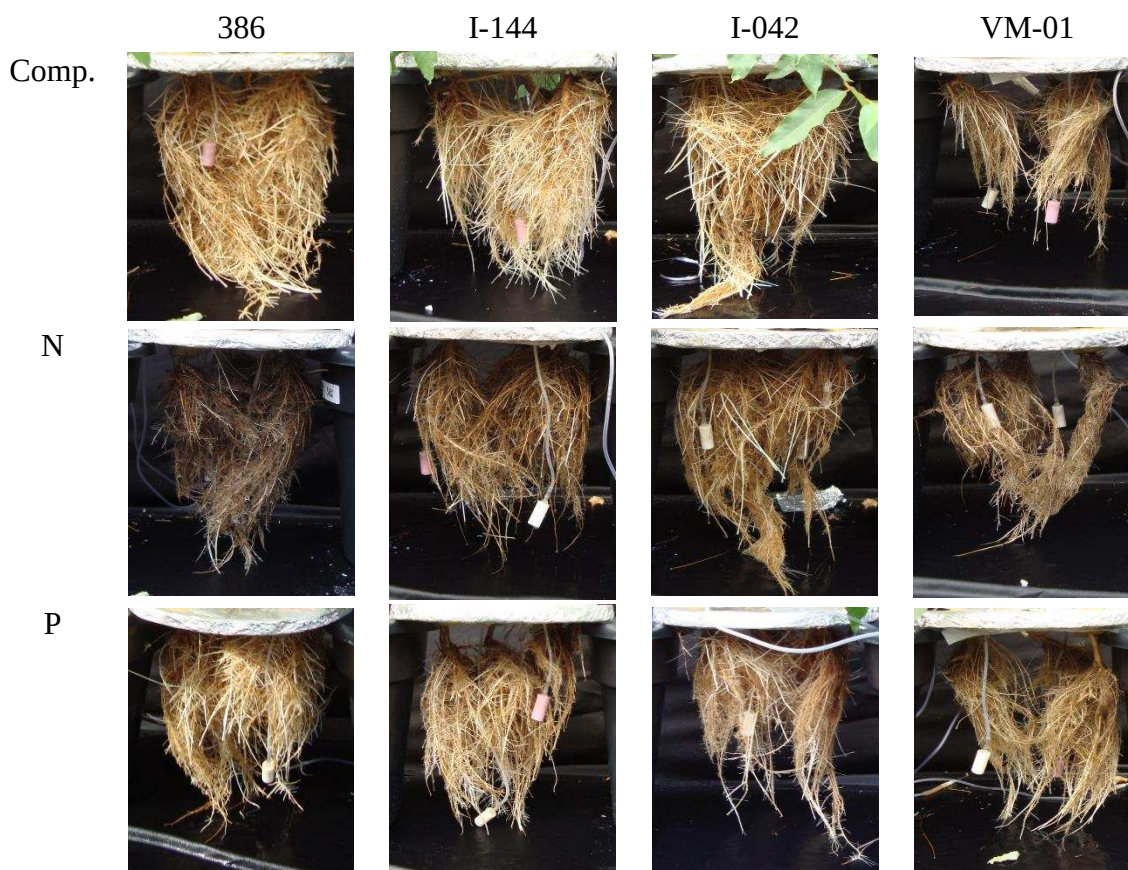


Figura 3: Sistema radicular de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01), no tratamento controle (Comp.) e submetidos à omissão seguido do ressuprimento de N ou P, cultivados em solução nutritiva, ao final do experimento.

A omissão/ressuprimento de N resultou em menor diâmetro do coleto (figura 4) e altura (figura 5), para todos os clones, quando comparada ao seu controle. Nos tratamentos correspondentes à omissão e ressuprimento de P apenas o clone I-042 apresentou menor diâmetro, no entanto maior altura que o controle. Já os clones 386 e I-144 apresentaram menor altura que tratamento controle.

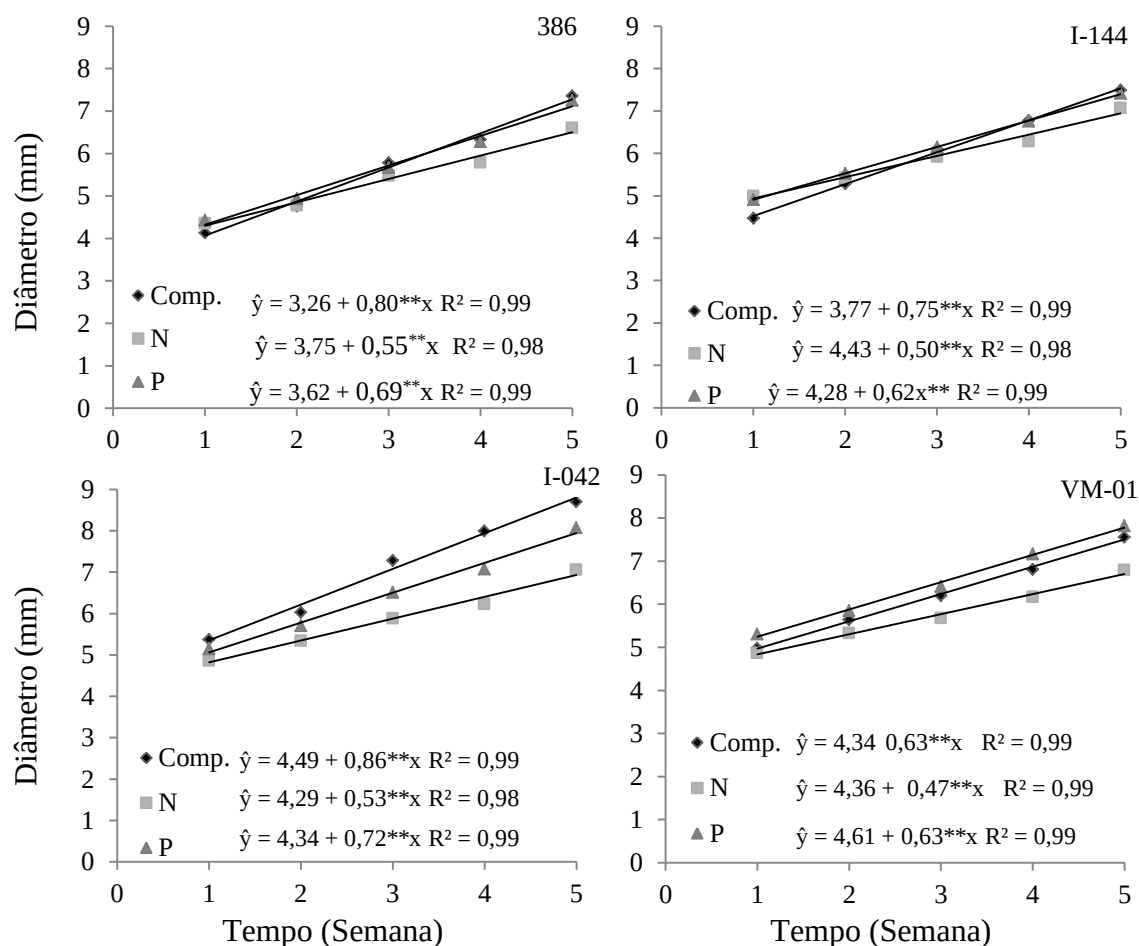


Figura 4: Diâmetro do coleto de plantas de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão e ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.), cultivados em solução nutritiva. ^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

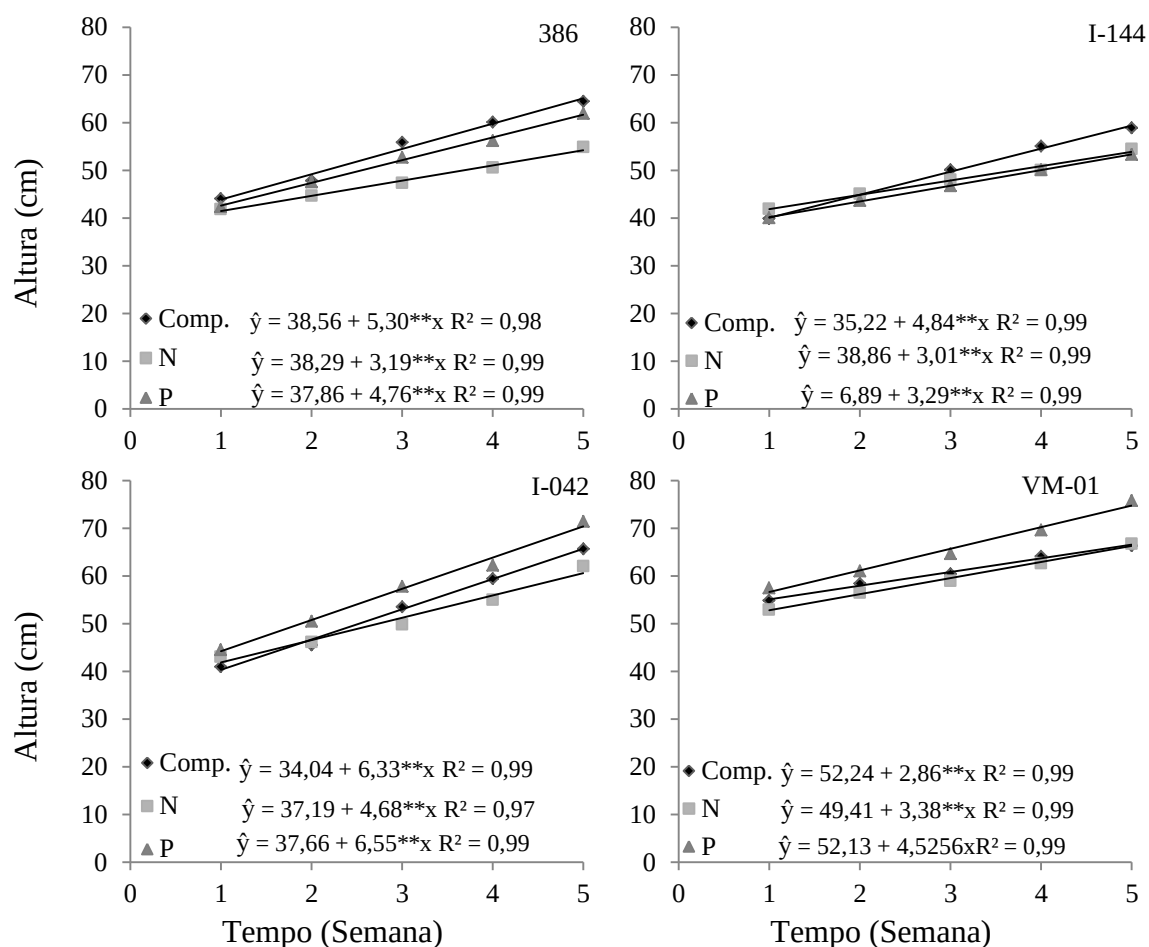


Figura 5: Altura de plantas de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão e ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.). ^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Teores dos nutrientes

Os valores dos teores de N e P nas folhas diagnóstico, obtidos em quatro momentos do experimento, sendo dois durante o período de omissão (semanas 1 e 3) e dois no período de ressuprimento (semanas 4 e 5), encontram-se na figura 6 (tratamento referente a N) e na figura 7 (tratamento referente a P).

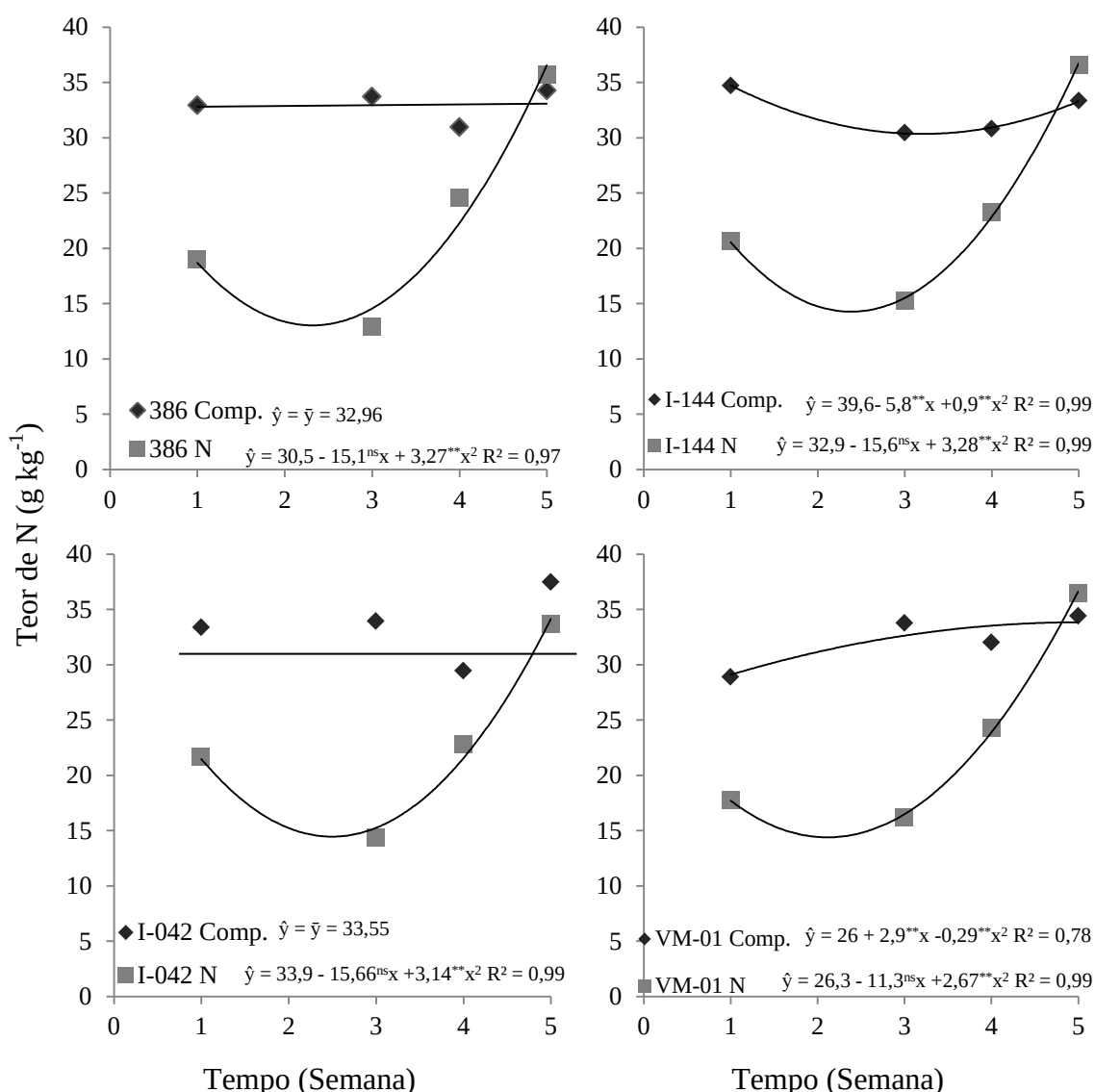


Figura 6: Teor de N em folhas diagnóstico de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N e tratamento controle (Comp.)^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

A omissão de N na solução promoveu redução de 39,2 % do teor do nutriente nas folhas diagnóstico, quando comparado ao padrão equivalente, já na primeira semana de ausência do nutriente (figura 6). Na terceira semana, segunda coleta referente ao período de omissão, a queda média foi de 55,4 %, sendo mais acentuada no clone 386, nos dois períodos. Nas semanas 4 e 5, após o ressuprimento de N, houve aumento nos teores nas folhas diagnóstico, e para todos os clones o teor de N no tratamento referente ao estresse foi superior ao do tratamento controle.

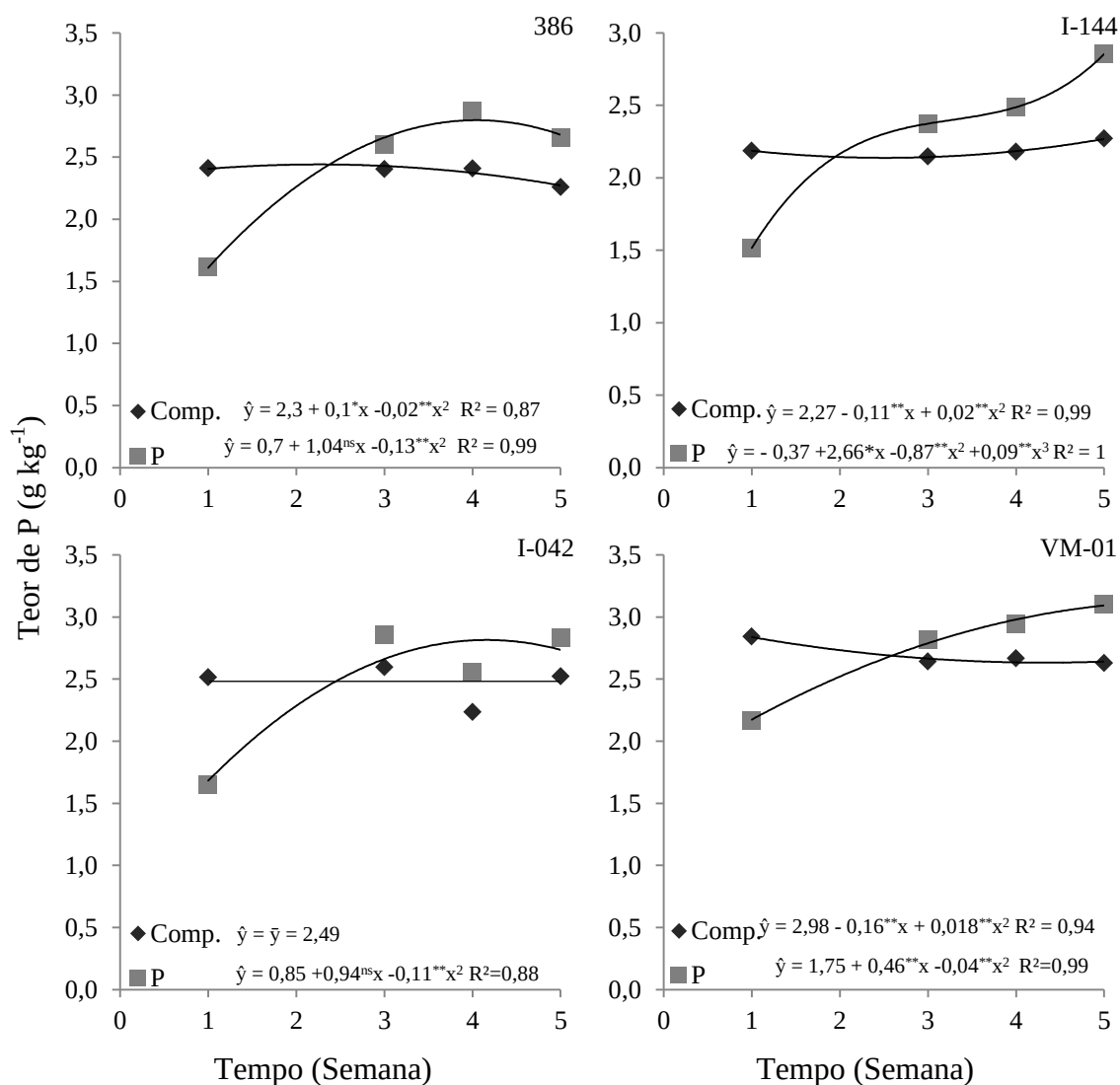


Figura 7: Teor de P em folhas diagnóstico de clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ao ressuprimento (semanas 4 e 5) de P e tratamento controle (Comp.). ^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

A redução no teor de P foi em média de 27,6 % nas folhas diagnóstico na primeira semana, em relação ao controle. Porém, na segunda semana, o teor do nutriente no tratamento sob a omissão de P foi superior ao do tratamento controle, em média 13,8 %, suplantando até mesmo o teor correspondente à primeira semana de omissão, em 55%, indicando que houve retranslocação de P.

Nas semanas 3 e 5, respectivamente após a omissão e o ressuprimento de P, foram coletadas as folhas velhas, visando avaliar a retranslocação, visto que não houve coleta intermediária de plantas inteiras. Observa-se queda nos teores de N em 42,4 % e

de P em 52,6 % nos tratamentos referentes à omissão desses nutrientes (figura 8). Após o ressuprimento, em avaliação feita na semana 5, o teor dos nutrientes nas folhas velhas aumentou em relação ao teor da semana 3, e no clone 386, no tratamento P, o teor se igualou ao do tratamento controle (figura 8).

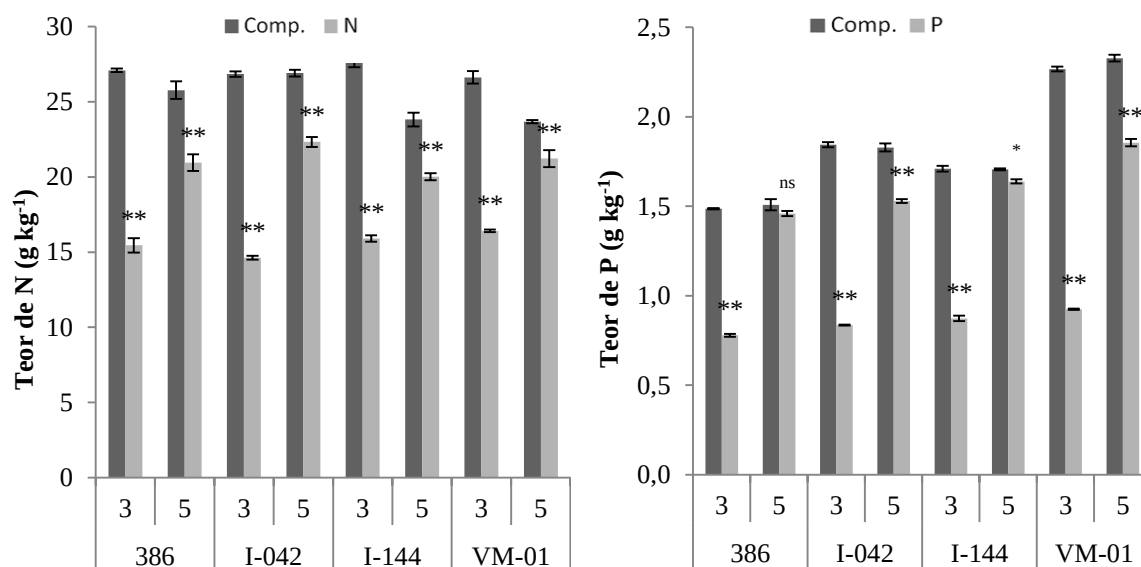


Figura 8 : Teor de N e P em folhas velhas de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão (semana 3) e ressuprimento (5) de N ou P e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média. ^{ns}, **: não significativo e significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle, em cada clone.

A omissão seguida do ressuprimento de N ou P resultou em menor conteúdo destes nutrientes nas plantas (tabela 2). A omissão de N levou ao menor conteúdo de P e S e a omissão de P também diminuiu o conteúdo de N e S, com exceção do clone VM-01, em que a queda foi não significativa. Para K e Mg também houve queda dos conteúdos, com exceção do clone VM-01.

O índice de alocação de N e P nas folhas, caule e raízes, nos tratamentos referentes a omissão/ressuprimento de N e P, respectivamente (figura 9), indica que o clone I-144 é o que menos aloca N nas folhas, compensando essa diferença pelo maior acúmulo de N nas raízes. O clone VM-01 é o que mais aloca N e P no caule. Já o clone I-042 é o que mais aloca P nas folhas e o que menos aloca nas raízes. Na omissão de N, o clone I-144 aumentou em 18 % o índice de alocação de N nas folhas, devido a queda de 12 e 21 % dessa alocação no caule e raízes, respectivamente. Para VM-01 também

foi observado este padrão, porém foi o caule que apresentou maior variação, com queda de 19 % na alocação de N. Para P, houve aumento da alocação de P na parte aérea, embora para I-042 a variação tenha sido muito pequena. Esse P advém, principalmente, do caule, cuja alocação diminuiu em 30 %. O clone VM-01 foi o que apresentou a maior alteração na alocação, visto que este índice aumentou em 36 % nas folhas, em detrimento da alocação no caule que apresentou queda de 48 % no caule. Houve aumento de 6 % na alocação de P nas raízes em resposta ao ressuprimento. Já o clone I-042, cuja variação nas folhas foi pequena, apresentou aumento na alocação de P nas raízes.

Tabela 2: Conteúdo de N, P, K, Ca, Mg e S de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01), submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N ou P e tratamento controle (Comp.), cultivados em solução nutritiva

Clone	Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
----- g vaso ^{-1@} -----							
386	Comp.	2,27	0,22	1,55	0,58	0,198	0,155
	N	1,05**	0,12**	0,81**	0,47**	0,103**	0,070**
	P	1,64**	0,14**	1,13**	0,57 ^{ns}	0,156**	0,113**
I-144	Comp.	1,82	0,19	1,46	0,45	0,173	0,116
	N	1,12**	0,13**	0,81**	0,43 ^{ns}	0,121**	0,069**
	P	1,53**	0,13**	1,24**	0,46 ^{ns}	0,152**	0,096**
I-042	Comp.	1,93	0,16	1,55	0,38	0,144	0,115
	N	1,31**	0,13**	0,93**	0,44*	0,109**	0,080**
	P	1,66**	0,14**	1,47 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,137 ^{ns}	0,097**
VM-01	Comp.	1,69	0,21	1,29	0,36	0,159	0,095
	N	1,38**	0,20*	1,46*	0,51**	0,138*	0,077**
	P	1,78*	0,17**	1,42*	0,52**	0,188**	0,094 ^{ns}

@- conteúdo de três plantas; ^{ns}, **: não significativo e significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F em relação ao controle (Comp.), em cada clone.

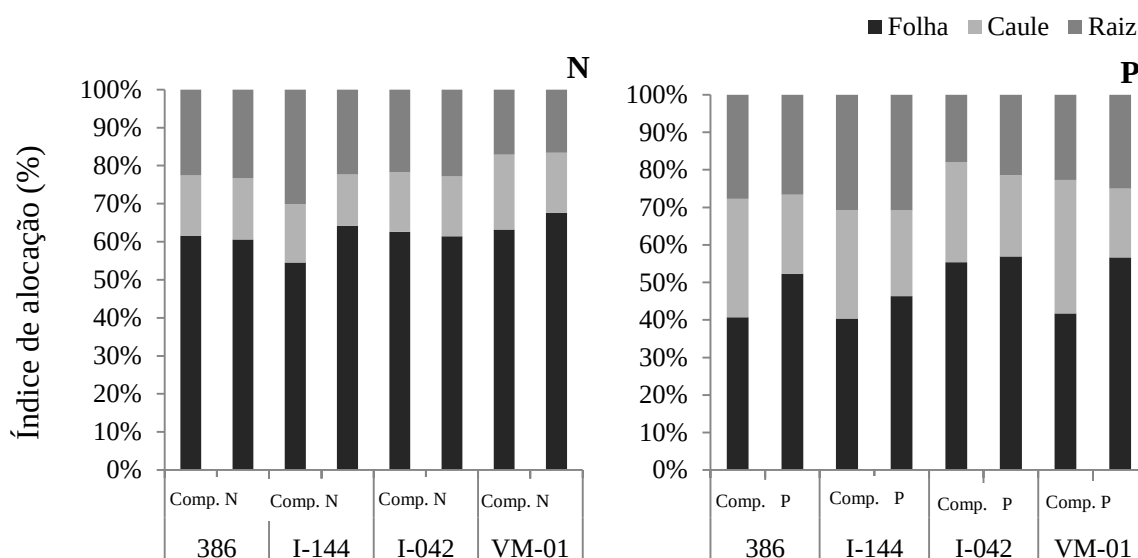


Figura 9: Índice de alocação (%) de N e P em diferentes órgãos de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão e ao ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.), cultivados em solução nutritiva.

Eficiências Nutricionais

A eficiência de absorção (EA) diminuiu com a omissão/ressuprimento de N ou P, para todos os materiais genéticos, com exceção do clone 386 tratamento referente a N, cuja EA foi de 2,9 % menor em relação ao seu controle e não significativa (figura 10). Assim, houve modulação no crescimento radicular no período da omissão de N ou P. Para N, a maior queda relativa na EA foi observada para o clone I-042, em 31,4 %, e para P, foi a do clone I-144, em 40,1 %.

A maior EUN das plantas do tratamento controle foi observada no clone 386, que também apresentou a menor EUN quando submetido à omissão/ressuprimento de N, com queda de 46,8 % (figura 11). O I-144 também apresentou queda na EUN enquanto que no clone VM-01 houve aumento de 13,1 % na EUN. Nesta variável os clones 386 e VM-01 apresentaram respostas opostas, visto que o VM-01 mostrou menor EUN no tratamento controle, passando a maior EUN quando submetido a omissão/ressuprimento de N. Para P apenas o clone 386 apresentou maior EUP no tratamento controle; a maior diferença em relação ao controle foi observada para o clone VM-01, no qual a omissão/ressuprimento de P aumentou em 81,7 % a EUP. O estresse tendeu a igualar as EUP, visto que a diferença entre a maior e menor EUP foi de 6 %, enquanto que a EUN foi de 28,8 %.

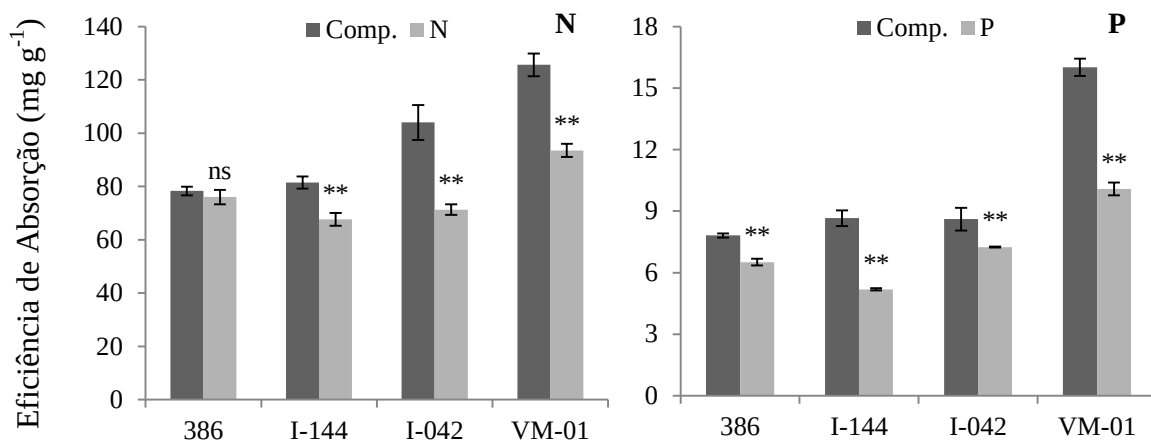


Figura 10: Eficiência de absorção (conteúdo do nutriente/massa seca de raiz) de N e P por quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão e ressuprimento de N ou P e o tratamento controle (Comp.)^{ns}, *, **: não significativo, significativo a 5 % e significativo a 1 % pelo teste F, respectivamente, em relação ao tratamento controle.

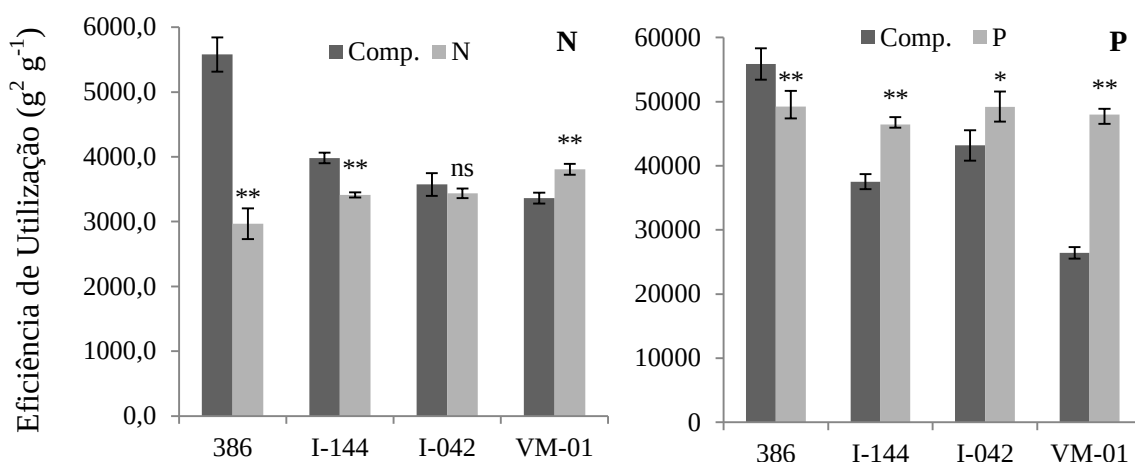


Figura 11: Eficiência de utilização (massa da matéria seca²/conteúdo do nutriente) de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão e ressuprimento de N ou P e o tratamento controle (Comp.).^{ns}, *, **: não significativo, significativo a 5 % e significativo a 1 % pelo teste F, respectivamente, em relação ao tratamento controle.

Os Índices de Retranslocação (IRet) de N, nos tratamento submetidos à omissão seguida do ressuprimento de N, apresentaram pequena diferença entre os clones, sendo o menor valor observado para o VM-01. As diferenças nos IRet de P foram maiores que

as de N, em média 52,6 %, e diferiram mais entre os clones. O maior valor foi observado para o clone VM-01 e os menores para 386 e I-144 (Figura 12).

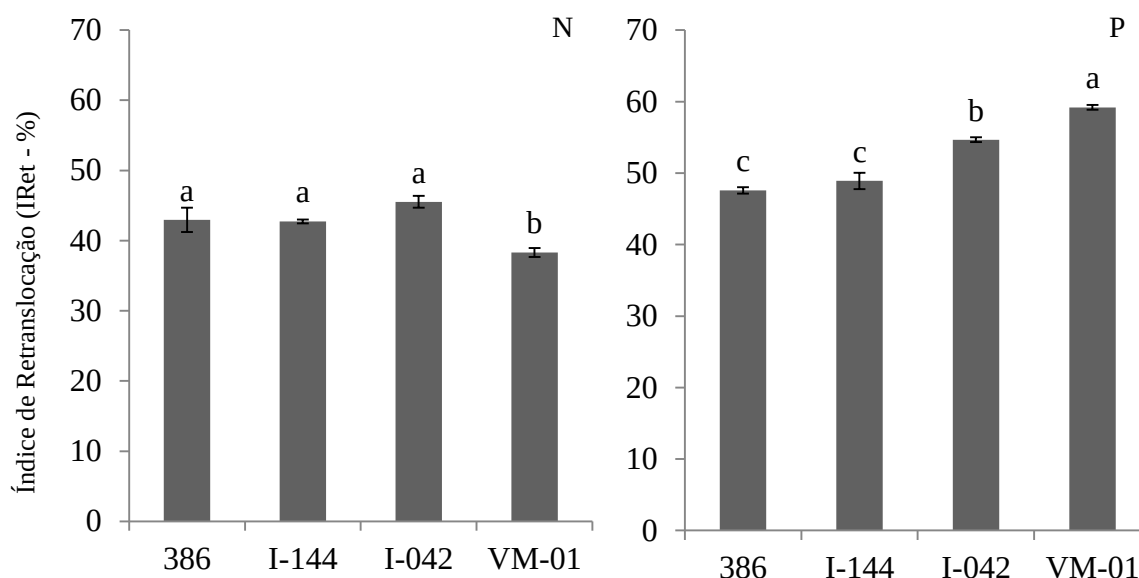


Figura 12: Índice de retranslocação de N e P em clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) submetidos à omissão destes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Trocas Gasosas

A omissão de N e P diminuiu a taxa fotossintética líquida (A) de forma diferente dependendo do nutriente e do clone (figura 13). Em geral, o efeito do N foi maior que o do P na queda da taxa fotossintética, tanto em termos absolutos (figura 13) como em termos relativos (figura 14). O clone VM-01 foi o menos afetado pela falta de N e o mais afetado pela falta de P, indicando estratégias diferenciadas de tolerância à restrição nutricional. Já o clone I-144 foi o que teve a taxa fotossintética menos afetada pela falta de P, especialmente durante o período de omissão. Por outro lado, o clone 386 foi o que apresentou a maior queda da A com a omissão de N, fato condizente com os dados de crescimento observados.

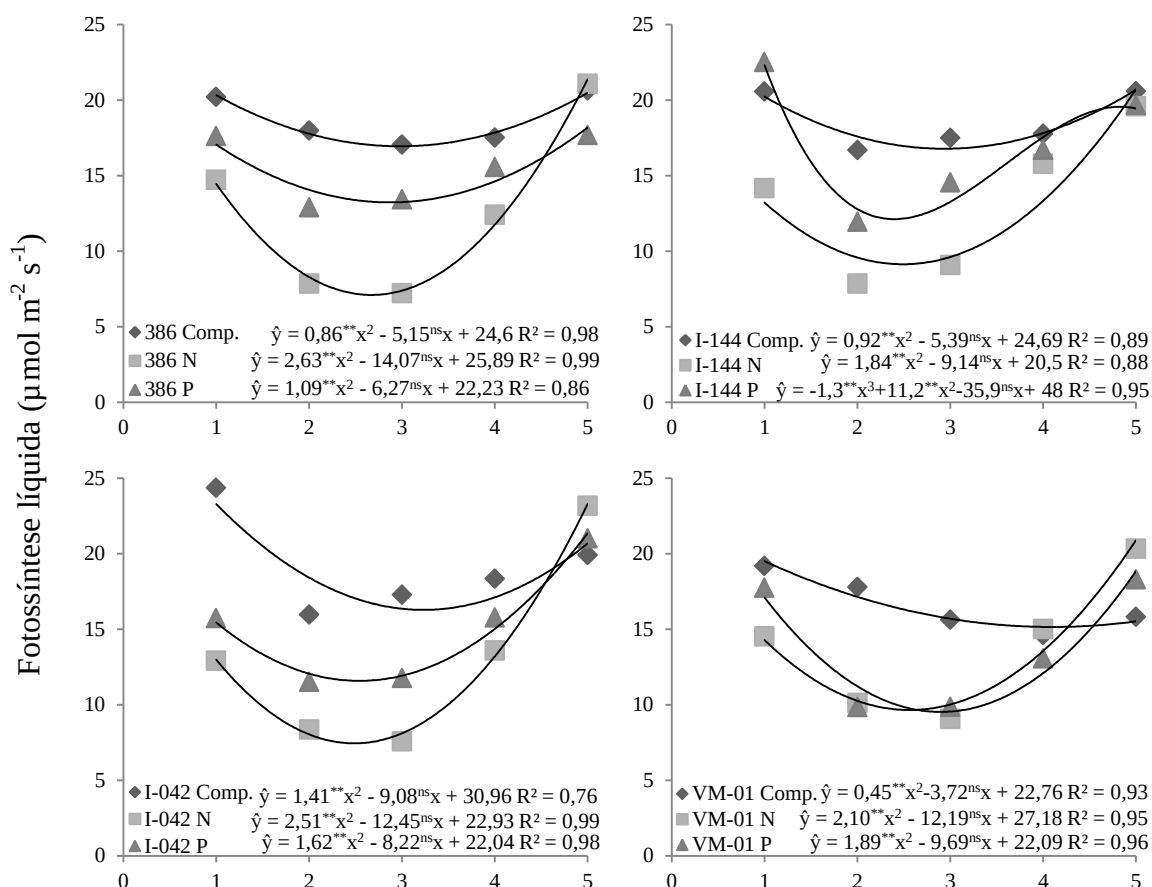


Figura 13: Fotossíntese líquida (A) de clones de eucalipto submetidos à omissão (semanas 1, 2 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N ou P e tratamento controle (Comp). ^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

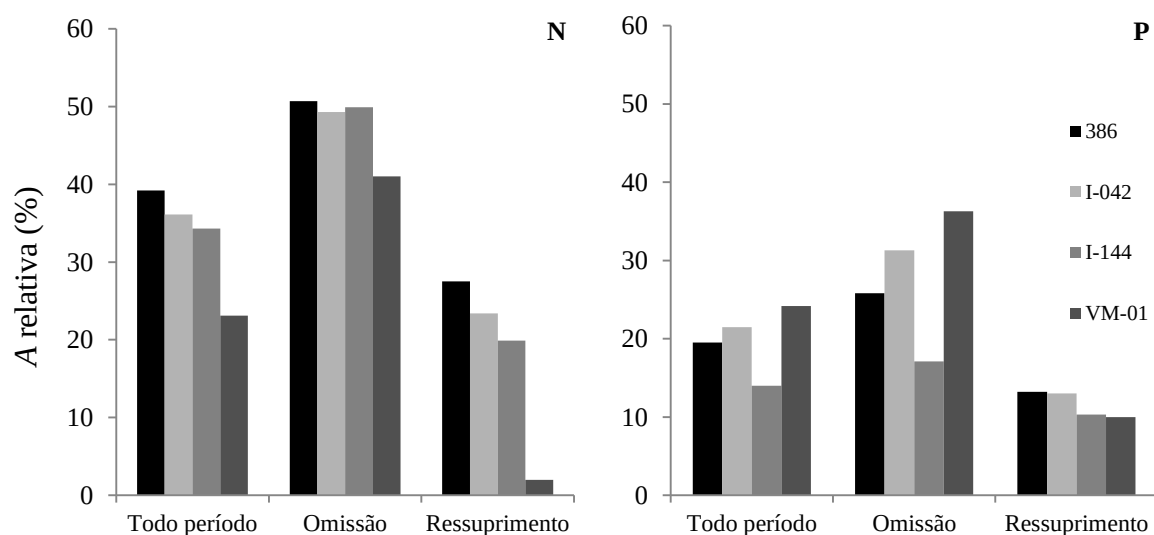


Figura 14: Perdas relativas ao tratamento controle na taxa de fotossíntese líquida (A relativa - %) em clones de eucalipto (386, I-042, I-144 e VM-01) submetidos à omissão (semanas 1, 2 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N e P.

A queda na taxa fotossintética não pode ser explicada por limitação estomática, visto que, embora tenha ocorrido fechamento estomático na omissão dos nutrientes, com média de 7 % para N e de 7,9 % para P, houve aumento da relação C_i/C_a , em 9,6 % para N e 3,12 % para P (figura 15 e tabela 3). Este aumento da C_i/C_a indicaria uma limitação não estomática e sim na etapa fotoquímica ou bioquímica da fotossíntese.

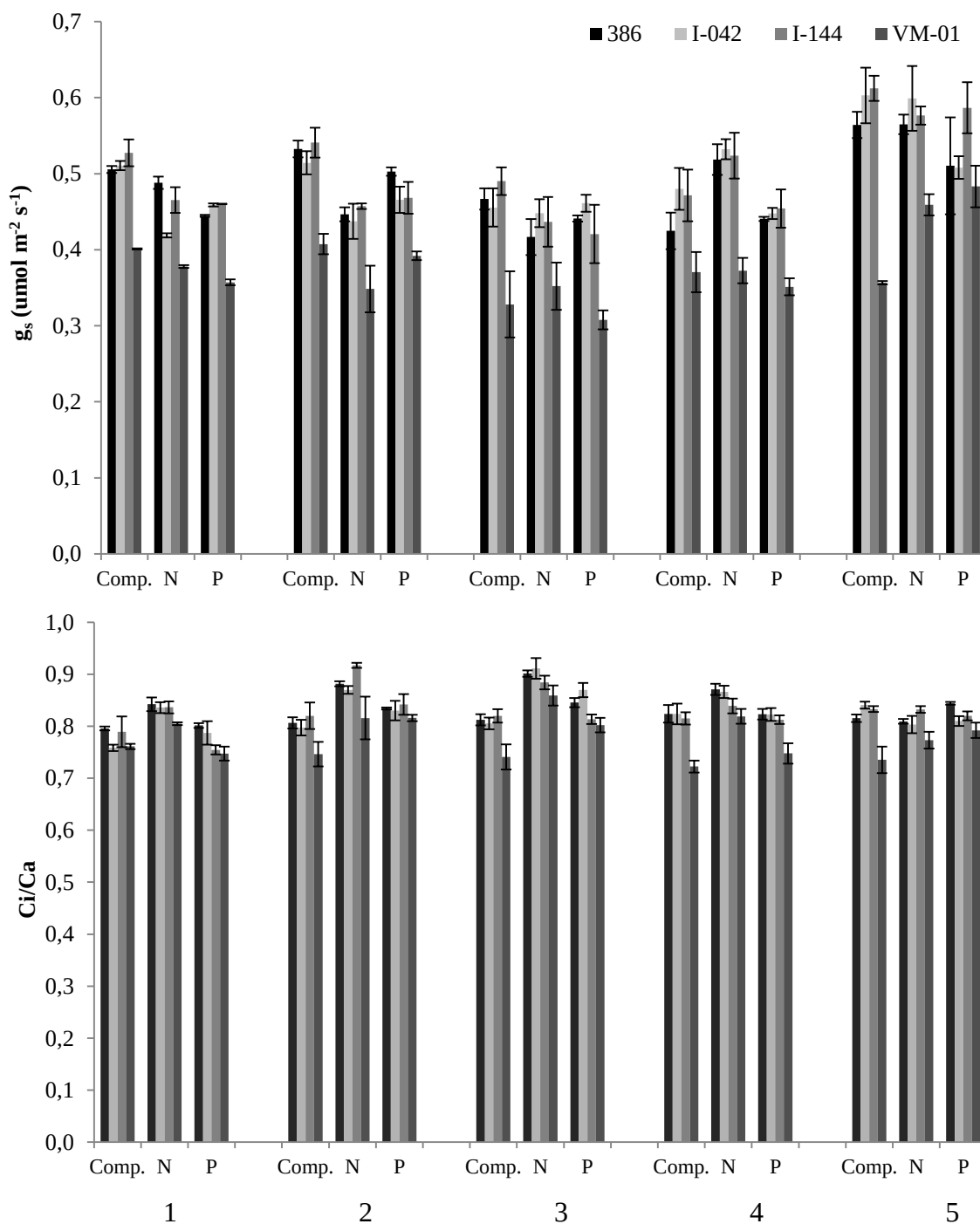


Figura 15: Condutância estomática (g_s) e razão entre a concentração intercelular de CO_2 na câmara subestomática e a concentração externa de CO_2 (C_i/C_a) em clones de eucalipto submetidos à omissão (semanas 1, 2 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N ou P e tratamento controle (Comp). Barras de erro indicam o erro padrão da média.

Tabela 3- Equações de regressão referentes à condutância estomática (g_s) e razão entre a concentração de CO_2 na câmara subestomática e a concentração externa (C_i/C_a), em função do tempo (semanas), em clones de eucalipto submetidos à omissão e ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.)

Variável	Clone	Tratamento	Equação	R ²
g_s	386	Comp	$\hat{y} = 0,0228^{**}x^3 - 0,1878^{*}x^2 + 0,4333^{ns}x + 0,2366$	R ² = 0,99
		N	$\hat{y} = 0,022^{**}x^2 - 0,1091^{ns}x + 0,5728$	R ² = 0,87
		P	$\hat{y} = 0,0158^{**}x^3 - 0,1366^{*}x^2 + 0,3448^{ns}x + 0,2229$	R ² = 0,92
	1042	Comp	$\hat{y} = 0,0134^{**}x^3 - 0,0976^{*}x^2 + 0,1934^{ns}x + 0,4033$	R ² = 0,98
		N	$\hat{y} = 0,0121^{**}x^2 - 0,0273^{ns}x + 0,4355$	R ² = 0,98
		P	$\hat{y} = 0,0071^{**}x^3 - 0,057^{*}x^2 + 0,1337^{ns}x + 0,374$	R ² = 0,96
	I144	Comp	$\hat{y} = 0,0186^{**}x^3 - 0,1472^{*}x^2 + 0,3267^{ns}x + 0,3288$	R ² = 0,99
		N	$\hat{y} = \bar{y} = 0,5519$	
		P	$\hat{y} = 0,0236^{**}x^2 - 0,1175^{ns}x + 0,5712$	R ² = 0,84
	VM01	Comp	$\hat{y} = 0,0026^{**}x^2 - 0,0622^{ns}x + 0,4893$	R ² = 0,72
		N	$\hat{y} = 0,0178^{**}x^2 - 0,0881^{ns}x + 0,4506$	R ² = 0,98
		P	$\hat{y} = 0,034^{**}x^3 - 0,2755^{*}x^2 + 0,6318^{ns}x - 0,0347$	R ² = 0,99
C_i/C_a	386	Comp	$\hat{y} = -0,002^{**}x^2 + 0,02^{ns}x + 0,78$	R ² = 0,91
		N	$\hat{y} = -0,018^{**}x^2 + 0,1005^{ns}x + 0,7578$	R ² = 0,99
		P	$\hat{y} = 0,0054^{**}x^3 - 0,0527^{*}x^2 + 0,1594^{ns}x + 0,6879$	R ² = 0,91
	1042	Comp	$\hat{y} = -0,0024^{**}x^2 + 0,0336^{ns}x + 0,7308$	R ² = 0,97
		N	$\hat{y} = -0,0201^{**}x^2 + 0,1135^{ns}x + 0,7374$	R ² = 0,93
		P	$\hat{y} = 0,0031^{**}x^3 - 0,0424^{*}x^2 + 0,1626^{ns}x + 0,661$	R ² = 0,84
	I144	Comp	$\hat{y} = 0,0045^{**}x^3 - 0,0423^{*}x^2 + 0,1265^{ns}x + 0,7006$	R ² = 0,99
		N	$\hat{y} = 0,0126^{**}x^3 - 0,1272^{*}x^2 + 0,3699^{ns}x + 0,5815$	R ² = 0,99
		P	$\hat{y} = 0,0103^{**}x^3 - 0,1025^{*}x^2 + 0,311^{ns}x + 0,538$	R ² = 0,91
	VM01	Comp	$\hat{y} = 0,003^{**}x^2 - 0,0257^{ns}x + 0,7849$	R ² = 0,86
		N	$\hat{y} = -0,0141^{**}x^2 + 0,0785^{ns}x + 0,7338$	R ² = 0,82
		P	$\hat{y} = 0,0151^{**}x^3 - 0,1423^{*}x^2 + 0,3966^{ns}x + 0,4767$	R ² = 0,97

^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Fluorescência da Clorofila a

Houve queda na relação Fv/Fm média de 5,8 %, porém apenas na semana 3, para os clones I-144, I-042 e VM-01, este valor foi inferior a 0,75, que é considerado como referencial para limitação. Portanto, essa variável não foi sensível aos danos no FS_{II}. A omissão de N levou à queda de 43 %, em média, nos valores ETR, enquanto que na omissão de P a queda foi de 17 %, no período de omissão de N ou P (figura 16, tabela 4). Esta queda na ETR nem sempre esteve associada a quedas nos valores de qL (valores não apresentados), indicando que os centros de reação do FS_{II} não se oxidaram em todos os tratamentos. Após o ressuprimento de N, os valores de ETR aumentaram, tendendo a aproximar-se dos valores do tratamento controle.

A omissão de N levou a queda média de 45 % no $\hat{Y}_{II}$, que mede a quantidade de energia utilizada na fotossíntese (Figura 17). A energia não utilizada nos processos fotoquímicos foi dissipada, principalmente, na forma de fluorescência, como observado

pelo aumento do $\hat{Y}_{NPQ}$. Não houve consistência nas variações do $\hat{Y}_{NO}$, que é a dissipação não modulada da energia, na forma de calor. Na omissão de P também observou-se aumento da $\hat{Y}_{II}$, mas não de forma consistente como foi observado para N. Maiores variações foram observadas para o $\hat{Y}_{NPQ}$, cujo aumento médio foi de 43 % em relação ao controle. O clone I-042 apresentou o maior aumento do $\hat{Y}_{NPQ}$ e o I-144 os menores valores. Após o ressuprimento de N ou P as variáveis de trocas gasosas e fluorescência da chl *a* se recuperaram, aproximando-se do controle e, em alguns casos, até superando-o.

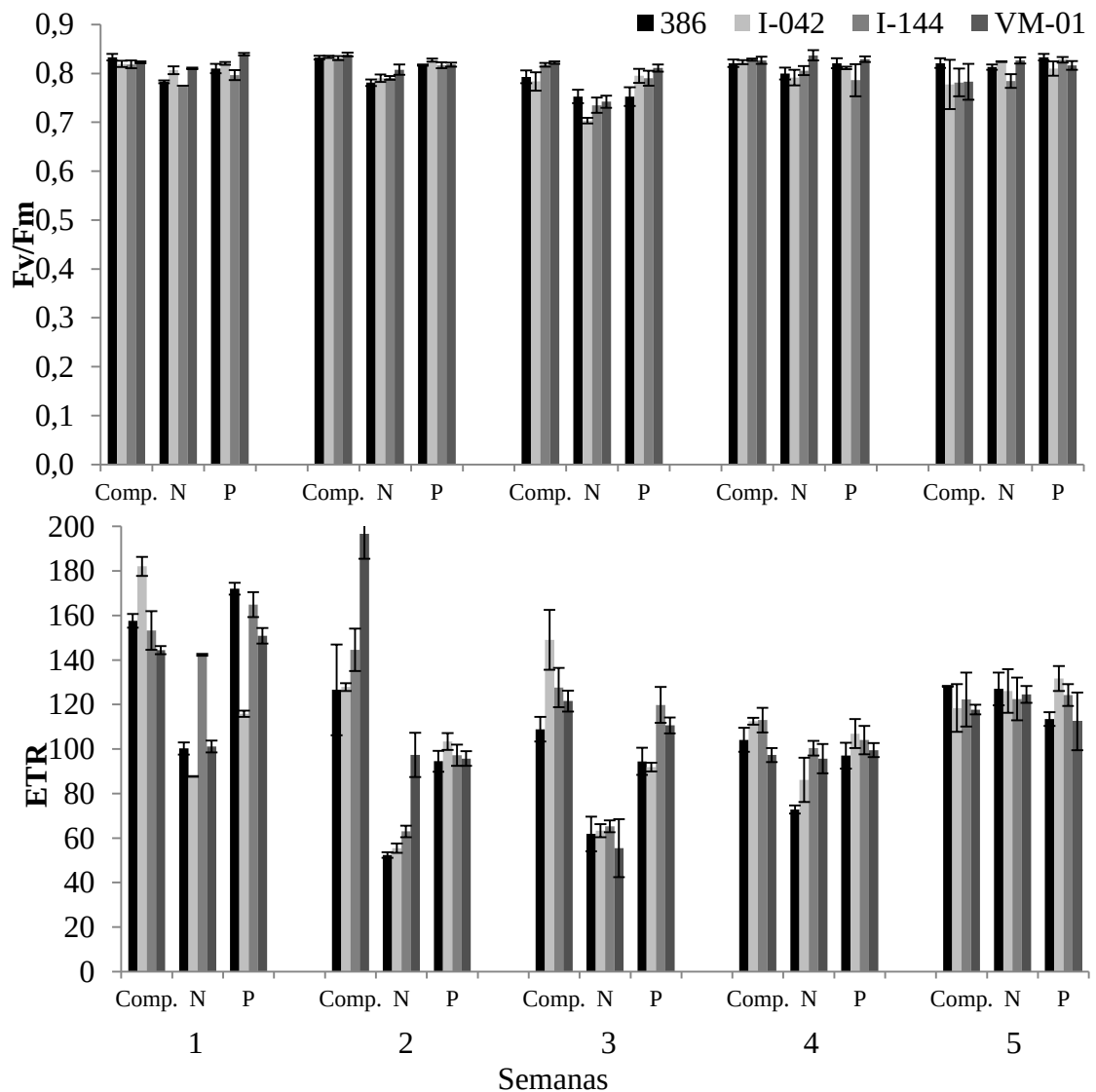


Figura 16: Rendimento quântico potencial do FS_{II} (F_v/F_m) e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) em clones de eucalipto submetidos à omissão (semanas 1, 2 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N ou P e tratamento controle (Comp.). Barras de erro indicam o erro padrão da média.

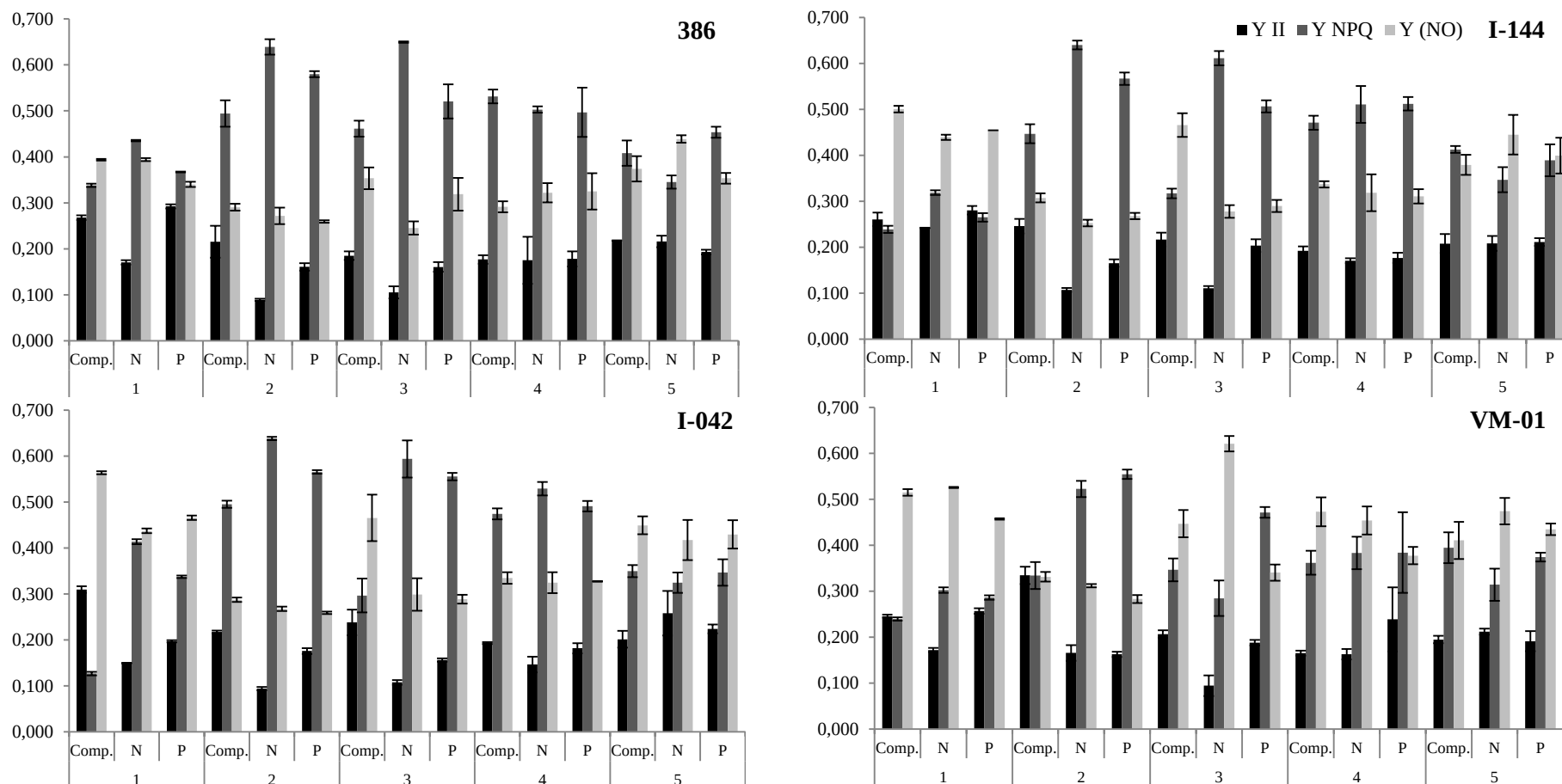


Figura 17: Rendimentos quânticos: efetivo do fluxo linear de elétrons pelo FS_{II} ($\hat{Y}_{II}$), da dissipação de energia regulada ($\hat{Y}_{NPQ}$), e da dissipação de energia não regulada ($\hat{Y}_{NO}$) em clones de eucalipto submetidos à omissão (semanas 1, 2 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N e P e tratamento controle (Comp.). Barras de erro indicam o erro padrão da média.

Tabela 4- Equações de regressão referentes ao rendimento quântico potencial do FS_{II} (Fv/Fm), taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), rendimento quântico efetivo do fluxo linear de elétrons pelo FS_{II} (Ŷ_{II}), da dissipação de energia regulada (Ŷ_{NPQ}), e da dissipação de energia não regulada (Ŷ_{NO}), em função do tempo (semana), em clones de eucalipto submetidos à omissão e ao ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.)

Variável	Clone	Tratamento	Equação	R ²
Fv/Fm	386	Comp	$\hat{y} = \bar{y} = 0,820$	
		N	$\hat{y} = \bar{y} = 0,787$	
		P	$\hat{y} = \bar{y} = 0,807$	
	1042	Comp	$\hat{y} = \bar{y} = 0,808$	
		N	$\hat{y} = \bar{y} = 0,783$	
		P	$\hat{y} = \bar{y} = 0,813$	
	I144	Comp	$\hat{y} = -0,0026^{**}x^3 + 0,0163^{*}x^2 - 0,0278^{ns}x + 0,8343$	R ² = 0,84
		N	$\hat{y} = \bar{y} = 0,785$	
		P	$\hat{y} = 0,0077^{**}x^3 - 0,0646^{*}x^2 + 0,1566^{ns}x + 0,6975$	R ² = 0,98
	VM01	Comp	$\hat{y} = -0,007^{**}x^2 + 0,0329^{ns}x + 0,7968$	R ² = 0,86
		N	$\hat{y} = \bar{y} = 0,824$	
		P	$\hat{y} = -0,0038^{**}x^3 + 0,0368^{*}x^2 - 0,1102^{ns}x + 0,9173$	R ² = 0,87
ETR	386	Comp	$\hat{y} = 8,7819^{*}x^2 - 60,813^{ns}x + 210,91$	R ² = 0,98
		N	$\hat{y} = 12,531^{*}x^2 - 64,782^{ns}x + 145,4$	R ² = 0,85
		P	$\hat{y} = 13,062^{*}x^2 - 89,044^{ns}x + 239,29$	R ² = 0,84
	1042	Comp	$\hat{y} = 5,6831^{*}x^2 - 48,26^{ns}x + 218,65$	R ² = 0,81
		N	$\hat{y} = 15,048^{**}x^2 - 74,427^{ns}x + 146,59$	R ² = 0,99
		P	$\hat{y} = 7,2042^{**}x^2 - 39,692^{ns}x + 149,76$	R ² = 0,96
	I144	Comp	$\hat{y} = 2,7447^{**}x^2 - 25,831^{ns}x + 179,44$	R ² = 0,90
		N	$\hat{y} = 16,837^{*}x^2 - 101,26^{ns}x + 217,26$	R ² = 0,82
		P	$\hat{y} = -4,5254^{*}x^3 + 50,547^{*}x^2 - 173,15^{ns}x + 289,11$	R ² = 0,79
	VM01	Comp	$\hat{y} = 14,079^{**}x^3 - 128,07^{*}x^2 + 324,5^{ns}x - 63,409$	R ² = 0,91
		N	$\hat{y} = 2,2284^{*}x^3 - 9,524^{*}x^2 - 6,0854^{ns}x + 117,59$	R ² = 0,74
		P	$\hat{y} = -10,637^{**}x^3 + 100,69^{*}x^2 - 284,04^{ns}x + 345,15$	R ² = 0,99
Ŷ _{II}	386	Comp	$\hat{y} = 0,0111^{**}x^2 - 0,0859^{ns}x + 0,3427$	R ² = 1
		N	$\hat{y} = 0,0373^{**}x^2 - 0,221^{ns}x + 0,4704$	R ² = 0,95
		P	$\hat{y} = 0,0378^{**}x^2 - 0,1861^{ns}x + 0,3166$	R ² = 0,98
	1042	Comp	$\hat{y} = 0,0118^{*}x^2 - 0,092^{ns}x + 0,3809$	R ² = 0,79
		N	$\hat{y} = 0,0117^{**}x^2 - 0,0649^{ns}x + 0,2523$	R ² = 0,89
		P	$\hat{y} = 0,0234^{**}x^2 - 0,1166^{ns}x + 0,2402$	R ² = 0,96
	I144	Comp	$\hat{y} = -0,0025^{**}x^2 - 0,011^{ns}x + 0,2751$	R ² = 0,99
		N	$\hat{y} = -0,0365^{**}x^3 + 0,2959^{*}x^2 - 0,7473^{ns}x + 0,7683$	R ² = 1
		P	$\hat{y} = 0,0487^{**}x^2 - 0,2643^{ns}x + 0,4536$	R ² = 0,97
	VM01	Comp	$\hat{y} = -0,0156^{**}x^3 + 0,1534^{*}x^2 - 0,4446^{ns}x + 0,5635$	R ² = 1
		N	$\hat{y} = 0,0505^{**}x^3 - 0,4116^{**}x^2 + 0,97^{ns}x - 0,3633$	R ² = 1
		P	$\hat{y} = 0,0341^{**}x^3 - 0,2367^{**}x^2 + 0,4652^{ns}x - 0,0906$	R ² = 1
Ŷ _{NPQ}	386	Comp	$\hat{y} = -0,0325^{*}x^2 + 0,213^{ns}x + 0,1658$	R ² = 0,78
		N	$\hat{y} = -0,0628^{**}x^2 + 0,3453^{ns}x + 0,1697$	R ² = 0,95
		P	$\hat{y} = 0,021^{**}x^3 - 0,2232^{*}x^2 + 0,7091^{ns}x - 0,1345$	R ² = 0,92
	1042	Comp	$\hat{y} = \bar{y} = 0,347$	
		N	$\hat{y} = -0,0627^{**}x^2 + 0,3476^{ns}x + 0,147$	R ² = 0,95
		P	$\hat{y} = -0,0571^{**}x^2 + 0,3368^{ns}x + 0,0764$	R ² = 0,94
	I144	Comp	$\hat{y} = \bar{y} = 0,377$	
		N	$\hat{y} = 0,0239^{**}x^3 - 0,2894^{ns}x^2 + 1,003^{ns}x - 0,4149$	R ² = 0,99
		P	$\hat{y} = 0,0195^{**}x^3 - 0,2313^{ns}x^2 + 0,8149^{ns}x - 0,3292$	R ² = 0,90
	VM01	Comp	$\hat{y} = -0,0086^{**}x^2 + 0,0854^{ns}x + 0,1737$	R ² = 0,92
		N	$\hat{y} = \bar{y} = 0,414$	
		P	$\hat{y} = 0,0357^{**}x^3 - 0,361^{**}x^2 + 1,0829^{ns}x - 0,4674$	R ² = 0,98
Ŷ _{NO}	386	Comp	$\hat{y} = \bar{y} = 0,341$	
		N	$\hat{y} = 0,0415^{**}x^2 - 0,2352^{ns}x + 0,5831$	R ² = 0,98
		P	$\hat{y} = -0,0098^{*}x^3 + 0,1003^{ns}x^2 - 0,2936^{ns}x + 0,5395$	R ² = 0,80
	1042	Comp	$\hat{y} = \bar{y} = 0,421$	
		N	$\hat{y} = -0,0111^{**}x^3 + 0,1373^{ns}x^2 - 0,4838^{ns}x + 0,7908$	R ² = 0,95
		P	$\hat{y} = -0,0144^{**}x^3 + 0,1748^{ns}x^2 - 0,61^{ns}x + 0,9115$	R ² = 0,97
	I144	Comp	$\hat{y} = \bar{y} = 0,398$	
		N	$\hat{y} = 0,0458^{**}x^2 - 0,2672^{ns}x + 0,6442$	R ² = 0,92
		P	$\hat{y} = -0,0118^{**}x^3 + 0,1453^{ns}x^2 - 0,5205^{ns}x + 0,8376$	R ² = 0,96
	VM01	Comp	$\hat{y} = \bar{y} = 0,461$	
		N	$\hat{y} = \bar{y} = 0,402$	
		P	$\hat{y} = -0,0176^{**}x^3 + 0,19^{ns}x^2 - 0,5999^{ns}x + 0,8804$	R ² = 0,98

^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Pigmentos fotossintéticos

A omissão de N diminuiu o teor de clorofila *a* + *b* (figura 18), de chl *a* e chl *b*, carotenoides e clorofila total (tabela 5 e 6). As maiores reduções foram observadas na semana 3, para todos os clones, quando detectou-se também o menor teor de N total, maiores reduções na taxa fotossintética e maiores danos ao FS_{II} (variáveis da fluorescência da chl *a*). Para P os menores teores de pigmentos foram observados na semana 4, após o ressuprimento de P.

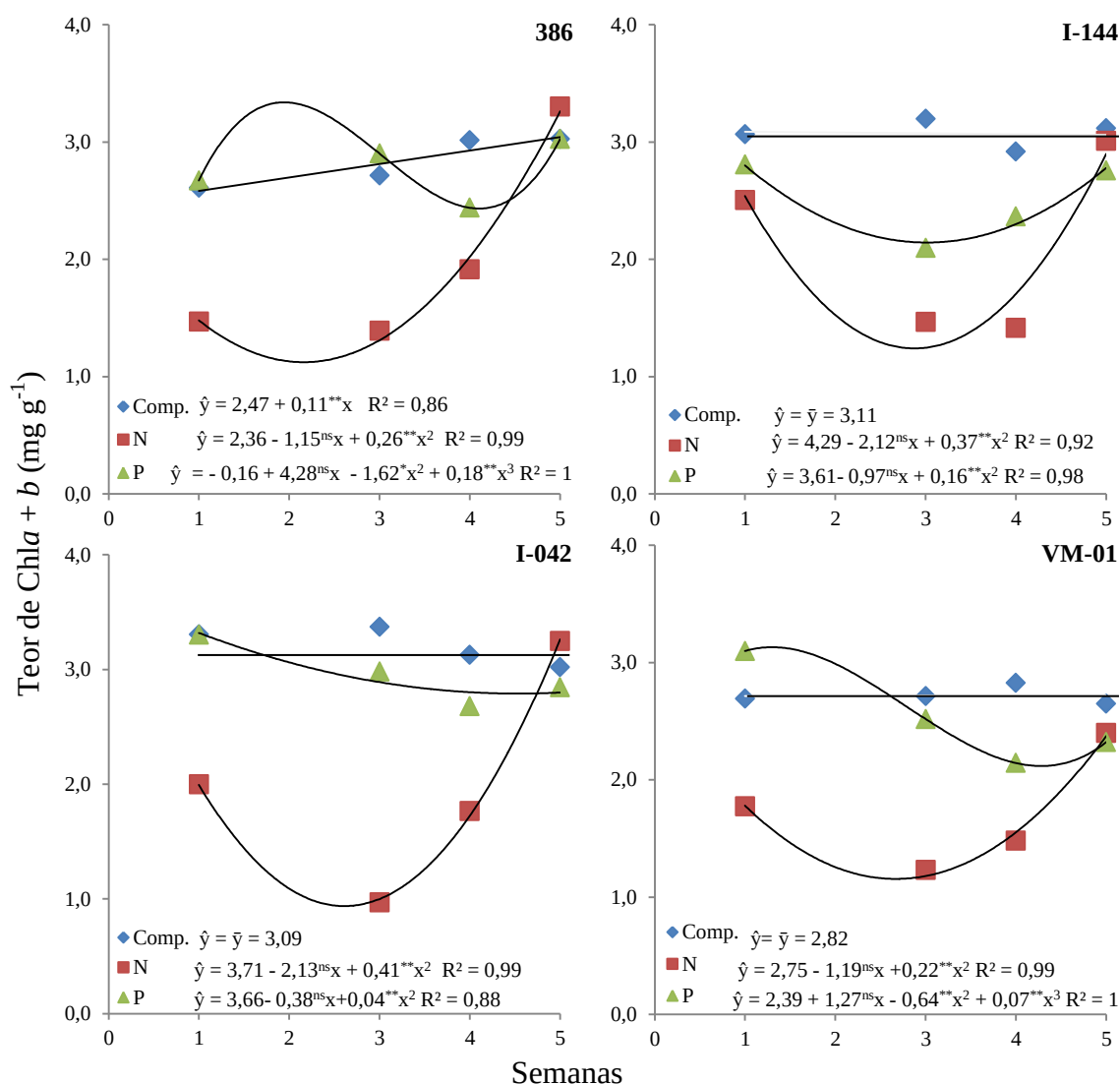


Figura 18: Teor de clorofila *a* + *b* (mg g⁻¹) em folhas de quatro clones de eucalipto (386, I-144, I-042 e VM-01) de eucalipto submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ressuprimento (semanas 4 e 5) de N, P e tratamento controle (Comp.), cultivados em solução nutritiva. ^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela5-Teores dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a* (chl *a*), clorofila *b* (chl *b*) e carotenoides (cart.), relação da chl*a*/*b* e chl*a*+*b*/cart.e clorofila total (SPAD) em folhas de clones de eucalipto submetidos à omissão (semanas 1 e 3) e ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.)

Clone	Tempo	Trat. Nutricional	Chla	Chlb	Cart.	Chla/b	Chla+b/cart.	SPAD
	semana		----- mg g ⁻¹ -----					unidades
386	1	Comp.	1,834	0,776	0,385	2,364	6,78	33,4
		N	1,013	0,455	0,327	2,230	4,48	26,0
		P	1,943	0,728	0,532	2,670	5,02	32,4
I-144		Comp.	2,566	0,739	0,567	3,475	5,84	35,2
		N	1,437	0,563	0,434	2,553	4,61	31,6
		P	2,470	0,833	0,614	2,967	5,38	35,8
I-042		Comp.	2,350	0,715	0,568	3,288	5,40	37,1
		N	1,848	0,656	0,516	2,815	4,86	30,5
		P	2,109	0,699	0,534	3,020	5,26	34,0
VM-01		Comp.	2,018	0,673	0,500	2,998	5,38	29,6
		N	1,292	0,481	0,355	2,686	4,99	25,5
		P	2,332	0,766	0,636	3,047	4,87	30,8
386	3	Comp.	2,184	0,529	0,550	4,130	4,94	34,2
		N	1,189	0,202	0,351	5,900	3,96	20,4
		P	2,329	0,572	0,627	4,074	4,62	30,7
I-144		Comp.	2,715	0,655	0,677	4,143	4,98	33,7
		N	0,846	0,122	0,327	6,949	2,96	23,8
		P	2,375	0,606	0,502	3,922	5,94	31,6
I-042		Comp.	2,500	0,695	0,605	3,595	5,28	35,4
		N	1,288	0,177	0,330	7,296	4,44	20,9
		P	1,742	0,353	0,467	4,935	4,48	31,0
VM-01		Comp.	2,180	0,534	0,554	4,084	4,90	30,3
		N	1,063	0,170	0,326	6,256	3,78	18,8
		P	2,075	0,443	0,536	4,681	4,70	27,4
386	4	Comp.	2,247	0,767	0,569	2,929	5,30	33,3
		N	1,465	0,448	0,394	3,270	4,86	29,4
		P	1,875	0,564	0,463	3,326	5,27	30,8
I-144		Comp.	2,385	0,743	0,634	3,212	4,93	32,6
		N	1,392	0,373	0,365	3,731	4,84	27,7
		P	2,049	0,631	0,530	3,246	5,06	32,7
I-042		Comp.	2,218	0,699	0,519	3,174	5,62	34,7
		N	1,086	0,327	0,318	3,324	4,45	30,6
		P	1,799	0,564	0,470	3,189	5,03	34,2
VM-01		Comp.	2,288	0,538	0,518	4,255	5,46	29,4
		N	1,172	0,310	0,325	3,784	4,56	23,0
		P	1,631	0,512	0,414	3,184	5,17	28,9
386	5	Comp.	2,267	0,757	0,549	2,996	5,51	35,7
		N	2,468	0,833	0,547	2,961	6,04	39,0
		P	2,254	0,771	0,544	2,923	5,56	34,7
I-144		Comp.	2,254	0,765	0,569	2,947	5,31	37,0
		N	2,451	0,796	0,545	3,079	5,96	38,7
		P	2,172	0,672	0,437	3,234	6,51	34,8
I-042		Comp.	2,339	0,776	0,479	3,016	6,51	35,5
		N	2,261	0,748	0,488	3,025	6,17	35,8
		P	2,109	0,646	0,427	3,265	6,46	36,2
VM-01		Comp.	1,985	0,662	0,441	2,999	6,01	34,8
		N	1,836	0,563	0,425	3,261	5,64	31,5
		P	1,765	0,556	0,398	3,173	5,84	31,6

Tabela6-Equações de regressão referentes ao teores dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, leitura de clorofila total (SPAD) e relação entre clorofila *a/b* e clorofila *a+b*/carotenoides, em função do tempo (semana), em clones de eucalipto submetidos à omissão e ao ressuprimento de N ou P e tratamento controle (Comp.)

Clone	Trat		R ²		R ²
Clorofila <i>a</i>				Clorofila <i>b</i>	
386	Comp	$\hat{y} = 0,03^{**}x^2 - 0,30^{ns}x + 1,57$	R ² = 0,99	$\hat{y} = 0,107^{**}x^2 - 0,54^{ns}x + 0,89$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,16^{**}x^2 - 0,60^{ns}x + 1,47$	R ² = 0,98	$\hat{y} = 0,05^{**}x^2 - 0,29^{ns}x + 0,98$	R ² = 0,99
	P	$\hat{y} = 0,15^{**}x^3 - 1,4801^{**}x^2 + 4,06^{ns}x - 0,79$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,019^{**}x^3 + 0,19^{**}x^2 - 0,57^{ns}x + 1,13$	R ² = 0,93
I144	Comp	$\hat{y} = 0,06^{**}x^3 - 0,6042^{**}x^2 + 1,73^{ns}x + 1,38$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,13^{**}x^2 - 0,74^{ns}x + 1,17$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = -0,006^{**}x^3 + 0,32^{**}x^2 - 1,53^{ns}x + 2,64$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,034^{**}x^2 - 0,24^{ns}x + 1,04$	R ² = 1
	P	$\hat{y} = 0,079^{**}x^3 - 0,72^{**}x^2 + 1,83^{ns}x + 1,29$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,015^{**}x^2 - 0,07^{ns}x + 0,78$	R ² = 1
1042	Comp	$\hat{y} = 0,08^{**}x^3 - 0,76^{**}x^2 + 2,07^{ns}x + 0,96$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,13^{**}x^2 - 0,77^{ns}x + 1,29$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,17^{**}x^3 - 1,30^{**}x^2 + 2,76^{ns}x + 0,22$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,067^{**}x^2 - 0,40^{ns}x + 1,02$	R ² = 1
	P	$\hat{y} = 0,012^{**}x^3 - 0,014^{**}x^2 - 0,28^{ns}x + 2,39$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,036^{**}x^2 - 0,22^{ns}x + 0,86$	R ² = 1
VM01	Comp	$\hat{y} = -0,053^{**}x^3 + 0,44^{**}x^2 - 0,97^{ns}x + 2,6$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,085^{**}x^2 - 0,49^{ns}x + 0,88$	R ² = 0,98
	N	$\hat{y} = 0,14^{**}x^2 - 0,71^{ns}x + 1,87$	R ² = 0,96	$\hat{y} = 0,048^{**}x^2 - 0,34^{ns}x + 1,05$	R ² = 0,99
	P	$\hat{y} = 0,099^{**}x^3 - 0,89^{**}x^2 + 2,16^{ns}x + 0,96$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,107^{**}x^2 - 0,54^{ns}x + 0,89$	R ² = 0,98
Carotenoides				SPAD	
386	Comp	$\hat{y} = -0,02x^2 + 0,16^{ns}x + 0,24$	R ² = 0,99	$\hat{y} = 0,42^{**}x^3 - 3,62^{**}x^2 + 9,37^{ns}x + 27,2$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,02x^2 - 0,09^{ns}x + 0,40$	R ² = 0,98	$\hat{y} = 2,72^{**}x^2 - 12,97^{ns}x + 36,267$	R ² = 0,85
	P	$\hat{y} = 0,05x^3 - 0,45x^2 + 1,2453x - 0,31$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,66^{**}x^3 - 5,33^{**}x^2 + 12,17^{ns}x + 24,97$	R ² = 1
I144	Comp	$\hat{y} = -0,026x^2 + 0,15^{ns}x + 0,44$	R ² = 0,98	$\hat{y} = 0,60^{**}x^3 - 4,78^{**}x^2 + 10,45^{ns}x + 28,89$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,04x^2 - 0,23^{ns}x + 0,62$	R ² = 0,98	$\hat{y} = -0,11^{**}x^3 + 4,006^{**}x^2 - 18,7^{ns}x + 46,27$	R ² = 0,98
	P	$\hat{y} = -0,02x^3 + 0,20x^2 - 0,59^{ns}x + 1,02$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,015^{**}x^3 + 0,99^{**}x^2 - 5,82^{ns}x + 40,71$	R ² = 1
1042	Comp	$\hat{y} = 0,014x^3 - 0,15x^2 + 0,43^{ns}x + 0,27$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,29^{**}x^2 - 2,14^{ns}x + 38,85$	R ² = 0,87
	N	$\hat{y} = 0,047x^2 - 0,29^{ns}x + 0,76$	R ² = 0,96	$\hat{y} = -0,71^{**}x^3 + 8,9^{**}x^2 - 30,5^{ns}x + 53,11$	R ² = 0,98
	P	$\hat{y} = 0,001x^2 - 0,029^{ns}x + 0,56$	R ² = 0,93	$\hat{y} = 0,206^{**}x^3 - 1,15^{**}x^2 + 1,11^{ns}x + 34,07$	R ² = 1
VM01	Comp	$\hat{y} = -0,02x^2 + 0,11^{ns}x + 0,41$	R ² = 1	$\hat{y} = 1,19^{**}x^3 - 10,38^{**}x^2 + 26,63^{ns}x + 12,27$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,019x^2 - 0,09^{ns}x + 0,44$	R ² = 0,89	$\hat{y} = 0,17^{**}x^3 + 0,81^{**}x^2 - 8,55^{ns}x + 33,13$	R ² = 0,98
	P	$\hat{y} = 0,005x^2 - 0,067^{ns}x + 0,71$	R ² = 0,95	$\hat{y} = 0,28^{**}x^3 - 1,75^{**}x^2 + 2,04^{ns}x + 30,3$	R ² = 1
Clorofila <i>a/b</i>				Clorofila <i>a + b</i> /carotenoides	
386	Comp	$\hat{y} = 0,33^{**}x^3 - 3,35^{**}x^2 + 9,97^{ns}x - 4,59$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,13^{**}x^3 + 1,44^{**}x^2 - 5,05^{ns}x + 10,52$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,66^{**}x^3 - 6,78^{**}x^2 + 20,37^{ns}x - 12,01$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,06^{**}x^3 + 0,89^{**}x^2 - 3,01^{ns}x + 6,66$	R ² = 1
	P	$\hat{y} = 0,16^{**}x^3 - 1,79^{**}x^2 + 5,75^{ns}x - 1,45$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,11^{**}x^3 + 1,18^{**}x^2 - 3,47^{ns}x + 7,42$	R ² = 1
I144	Comp	$\hat{y} = 0,08^{**}x^3 - 0,84^{**}x^2 + 2,45^{ns}x + 1,59$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,04^{**}x^3 - 0,15^{**}x^2 + 0,09^{ns}x + 5,42$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,98^{**}x^3 - 9,89^{**}x^2 + 29,08^{ns}x - 17,3$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,19^{**}x^3 - 1,49^{**}x^2 + 3,22^{ns}x + 2,93$	R ² = 1
	P	$\hat{y} = 0,45^{**}x^3 - 4,52^{**}x^2 + 13,17^{ns}x - 6,08$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,03^{**}x^3 + 0,06^{**}x^2 - 1,04^{ns}x + 6,21$	R ² = 1
1042	Comp	$\hat{y} = 0,19^{**}x^3 - 1,93^{**}x^2 + 5,61^{ns}x - 0,39$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,02^{**}x^3 - 0,03^{**}x^2 - 0,57^{ns}x + 6,41$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,77^{**}x^3 - 7,98^{**}x^2 + 24,09^{ns}x - 14,32$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,32^{**}x^3 + 3,47^{**}x^2 - 10,5^{ns}x + 12,1$	R ² = 1
	P	$\hat{y} = 0,18^{**}x^3 - 1,82^{**}x^2 + 5,4^{ns}x - 0,81$	R ² = 1	$\hat{y} = 0,39^{**}x^3 - 3,48^{**}x^2 + 9,17^{ns}x - 0,69$	R ² = 1
VM01	Comp	$\hat{y} = -0,15^{**}x^3 + 1,06^{**}x^2 - 1,76^{ns}x + 3,85$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,07^{**}x^3 + 0,82^{**}x^2 - 2,62^{ns}x + 7,25$	R ² = 1
	N	$\hat{y} = 0,59^{**}x^3 - 6,2^{**}x^2 + 18,8^{ns}x - 10,53$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,07^{**}x^3 + 1,07^{**}x^2 - 3,89^{ns}x + 7,88$	R ² = 1
	P	$\hat{y} = 0,38^{**}x^3 - 3,80^{**}x^2 + 11,1^{ns}x - 4,62$	R ² = 1	$\hat{y} = -0,02^{**}x^3 + 0,37^{**}x^2 - 1,28^{ns}x + 5,80$	R ² = 1

^{ns}, *, **: efeito não significativo e significativo a 5 ou a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F, em relação ao tratamento controle

A partir dos dados obtidos nos tempos de coleta intermediário e final, semanas 1, 3, 4 e 5, foram calculados os coeficientes de correlação para os dados referentes à omissão e ressuprimento de N e tratamento controle (tabela 7) e para omissão e ressuprimento de P e tratamento controle (tabela 8). Foram utilizados também os dados das atividades enzimáticas (capítulo 1). Observam-se correlações fortes e significativas entre a atividade das duas enzimas, nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS).

Para P as duas enzimas avaliadas, fosfatase ácida (APase) e ribonuclease (RNase), apresentaram bom relacionamento entre si, porém apresentaram relacionamento menor, e muitas vezes não significativo, com as demais variáveis.

A matriz de correlação para as variáveis finais ou acumuladas (tabela 9 e 10) evidencia que a eficiência de retranslocação apresentou forte e significativo relacionamento com a perda relativa da fotossíntese, para os tratamentos referentes à omissão de N e P. Para N as correlações foram, em geral, mais fortes e significativas que as observadas para P, para as demais variáveis.

Tabela 7: Coeficiente de correlação de Pearson para variáveis avaliadas em clones de eucalipto submetidos à omissão (semanas 1 e 3) seguida do ressuprimento de N (semanas 4 e 5) e tratamento controle

	GS	Spad	Chla	Chlb	Car.	Chla+b	N	P	S	A	g _s	Ci/Ca	Ŷ _{II}	Ŷ _{NPQ}	ETR	Fv/Fm
NR	0,97**	-0,64**	-0,74**	-0,79**	-0,69**	-0,78**	-0,72**	-0,63**	-0,59**	-0,75**	-0,03 ^{ns}	0,68**	-0,73**	0,59**	-0,73**	-0,51**
GS		-0,63**	-0,73**	-0,80**	-0,68	-0,77**	-0,72**	-0,69**	-0,62**	-0,73**	-0,04 ^{ns}	0,66**	-0,69**	0,54**	-0,69**	-0,55**
Spad			0,82**	0,90**	0,73**	0,87**	0,86**	0,57**	0,53**	0,83**	0,46**	-0,43**	0,71**	-0,388**	0,70**	0,43**
Chla				0,86**	0,93**	0,98**	0,86**	0,46**	0,56**	0,74**	0,24*	-0,51**	0,64**	-0,45**	0,64**	0,42**
Chlb					0,77**	0,92**	0,83**	0,73**	0,56**	0,85**	0,37**	-0,50**	0,74**	-0,49**	0,74**	0,51**
Car.						0,91**	0,71**	0,38**	0,49**	0,61**	0,17 ^o	-0,43**	0,57**	-0,37**	0,57**	0,37**
Chla+b							0,88**	0,55**	0,58**	0,79**	0,28*	-0,52**	0,69**	-0,47**	0,69**	0,45**
N								0,56**	0,67**	0,85**	0,26 ^{ns}	-0,61**	0,69**	-0,47**	0,69**	0,50**
P									0,58**	0,69**	0,18 ^{ns}	-0,49**	0,64**	-0,48**	0,63**	0,45**
S										0,57**	0,14 ^{ns}	-0,38**	0,41**	-0,40**	0,41**	0,24 ^{ns}
A											0,46**	-0,56**	0,83**	-0,62**	0,83**	0,57**
g_s												0,41**	0,25 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,04 ^{ns}
Ci/Ca													-0,61**	0,58**	-0,61**	-0,49**
Ŷ_{II}														-0,69**	0,99**	0,48**
Ŷ_{NPQ}															-0,69**	-0,34**
ETR																0,47**
Fv/Fm																

GS: atividade da enzima glutamina sintetase; NR: atividade da enzima nitrato redutase; SPAD: leitura de clorofila total por clorofilometro SPAD; Chl *a*: teor de clorofila *a*; Chl *b*: teor de clorofila *b*; Cart: teor de carotenoides totais; Chla + b: soma dos teores de clorofila *a* e *b*; N, P e S: teor de N, P e S; A: taxa de fotossíntese líquida; g_s: condutância estomática; Ci/Ca: razão entre a concentração de CO₂ na câmara subestomática e no ambiente; Ŷ_{II}: rendimento quântico efetivo do fotossistema II; Ŷ_{NPQ}: dissipação de energia regulada; ETR: taxa aparente de transporte de elétrons; Fv/Fm: eficiência fotoquímica do Fotossistema II; ^{ns}, ^o, *, **: não significativo e significativo a 10, 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 8: Coeficiente de correlação de Pearson para variáveis avaliadas nas semanas 1 e 3 (omissão de P) e 4 e 5 (ressuprimento de P) e tratamento controle

	Apase	SPAD	Chl a	Chl b	Cart	Chla+b	N	P	S	A	g _s	Ci/Ca	Ŷ _{II}	Ŷ _{NPQ}	ETR	Fv/Fm
Rnase	0,85**	-0,42**	-0,44**	-0,48**	-0,21 ^{ns}	-0,51**	-0,58**	-0,16 ^{ns}	-0,46 ^{ns}	-0,57**	-0,21 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,27 ^o	0,39**	-0,27 ^o	-0,09 ^{ns}
Apase		-0,35**	-0,31 ^o	-0,30 ^o	-0,07 ^{ns}	-0,34 ^o	-0,51 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,37**	-0,41**	-0,184 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,13 ^{ns}
SPAD			0,36**	0,61**	0,10 ^{ns}	0,49**	0,44**	0,43*	0,34**	0,72**	0,63**	0,17 ^{ns}	0,38**	-0,30 ^o	0,38**	-0,06 ^{ns}
Chl a				0,49**	0,78**	0,95**	0,27 ^o	-0,51**	0,18 ^{ns}	0,35**	0,27 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,30 ^o	-0,38**	0,30 ^o	-0,09 ^{ns}
Chl b					0,31 ^o	0,73**	0,42**	-0,64**	0,28 ^o	0,75**	0,45**	-0,05 ^{ns}	0,56**	-0,45**	0,56**	0,09 ^{ns}
Cart.						0,72**	0,00 ^{ns}	-0,59**	0,06 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,09 ^{ns}
Chla+b							0,36**	-0,32*	0,24 ^{ns}	0,53**	0,36**	-0,01 ^{ns}	0,43**	-0,45**	0,43**	-0,04 ^{ns}
N								-0,18 ^{ns}	0,62**	0,48**	0,16 ^{ns}	-0,28 ^o	0,27 ^o	-0,52**	0,27 ^o	0,10 ^{ns}
P									0,08 ^{ns}	0,37**	0,23*	0,04 ^{ns}	0,52**	-0,35**	0,52**	0,02 ^{ns}
S										0,32 ^o	0,24 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,26 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,03 ^{ns}
A											0,59**	-0,11 ^{ns}	0,66**	-0,65**	0,66**	0,13 ^{ns}
g_s												0,61**	0,23 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,23 ^{ns}	-0,06 ^{ns}
Ci/Ca													-0,31 ^o	0,47**	-0,31 ^o	-0,14 ^{ns}
Ŷ_{II}														-0,76**	0,99**	0,16 ^{ns}
Ŷ_{NPQ}															-0,76**	-0,16 ^{ns}
ETR																0,16 ^{ns}
Fv/Fm																

Apase: atividade da enzima fosfatase ácida; RNase: atividade da enzima ribonuclease; SPAD: leitura de clorofila total por clorofilmetro SPAD; Chla: teor de clorofila *a*; Chlb: teor de clorofila *b*; Cart: teor de carotenoides totais; Chla + b: soma dos teores de clorofila *a* e *b*; N, P e S: teor de N, P e S; A: taxa de fotossíntese líquida; g_s: condutância estomática; Ci/Ca: razão entre a concentração de CO₂ na câmara subestomática e no ambiente; Ŷ_{II}: rendimento quântico efetivo do fotossistema II; Ŷ_{NPQ}: dissipação de energia regulada; ETR: taxa aparente de transporte de elétrons; Fv/Fm: eficiência fotoquímica do Fotossistema II; ^{ns}, ^o, *, **, : não significativo e significativo a 10, 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 9: Coeficiente de correlação de Pearson para variáveis com efeito acumulativo da omissão, por três semanas, e ressuprimento por duas semanas, de N e tratamento controle, em quatro clones de eucalipto

	Massa Total	Massa Folha	Massa Caule	Massa Raiz	Massa PA	PA/R	Conteúdo Total	Conteúdo Folha	Conteúdo Caule	Conteúdo Parte Aérea	Conteúdo Raiz	EU	EU PA	EA	IRET
A relativa	-0,78 [*]	-0,81 [*]	-0,85 ^{**}	-0,49 ^{ns}	-0,85 ^{**}	-0,39 ^{ns}	-0,91 ^{**}	-0,87 ^{**}	-0,93 ^{**}	-0,90 ^{**}	-0,74 [*]	-0,53 ^{**}	0,73 [*]	-0,62 ^{**}	-0,86 ^{**}
Massa Total		0,95 ^{**}	0,98 ^{**}	0,87 ^{**}	0,98 ^{**}	-0,02 ^{ns}	0,96 ^{**}	0,94 ^{**}	0,86 ^{**}	0,93 ^{**}	0,81 [*]	0,93 ^{**}	-0,51 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,69 ^o
Massa Folha			0,93 ^{**}	0,69 [*]	0,98 ^{**}	0,24 ^{ns}	0,94 ^{**}	0,98 ^{**}	0,89 ^{**}	0,97 ^{**}	0,64 [*]	0,85 ^{**}	-0,44 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,61 ^o
Massa Caule				0,80 [*]	0,98 ^{**}	0,09 ^{ns}	0,96 ^{**}	0,93 ^{**}	0,91 ^{**}	0,94 ^{**}	0,82 [*]	0,88 ^{**}	-0,54 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,75 [*]
Massa Raiz					0,76 [*]	-0,51 ^{ns}	0,76 [*]	0,68 [*]	0,55 ^{ns}	0,66 ^{**}	0,85 [*]	0,91 ^{**}	-0,45 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	0,55 ^{ns}
PA						0,17 ^{ns}	0,97 ^{**}	0,97 ^{**}	0,92 ^{**}	0,97 ^{**}	0,74 ^o	0,88 ^{**}	-0,50 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,70 [*]
PA/R							0,13 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,28 ^{ns}	-0,3 ^{ns}	-0,20	0,03 ^{ns}	0,93 ^{**}	0,08 ^{ns}
Conteúdo Total								0,97 ^{**}	0,94 ^{**}	0,98	0,84 ^{**}	0,79 ^{**}	-0,70 ^o	0,35 ^{ns}	0,84 ^{**}
Conteúdo Folha									0,94 ^{**}	1,00 ^{**}	0,70 ^o	0,78 ^{**}	-0,59 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,74 [*]
Cont. Caule										0,96 ^{**}	0,68 ^o	0,64 ^{**}	-0,67 ^o	0,59 ^o	0,83 ^{**}
Cont. PA											0,70 ^o	0,76 ^{**}	-0,62 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,77 [*]
Cont. Raiz												0,68 ^{**}	-0,77 ^o	-0,03 ^{ns}	0,82 ^{**}
EU													-0,22 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,42 ^{ns}
EUPA														-0,33 ^{ns}	-0,91 ^{**}
EA															0,40 ^{ns}

A relativa: perda acumulada da taxa fotossintética líquida em relação ao tratamento controle; Massa Total: massa da matéria seca de toda a planta; Massa Folha: massa da matéria seca de folhas; Massa Caule: massa da matéria seca de caule; Massa Raiz: massa da matéria seca da raiz; massa PA: massa da matéria seca de folha e caule ; PA/R: relação entre a massa da parte aérea e massa do sistema radicular; Conteúdo Total: conteúdo total de N; Conteúdo Folha: conteúdo de N nas folhas; Cont. Caule: conteúdo de N no caule; Cont. PA: conteúdo de N nas folhas e caule; Cont. Raiz: conteúdo de N na raiz; EU: eficiência de utilização de N; EUPA: eficiência de utilização de N para a parte aérea; EA: eficiência de absorção de N; IRET: eficiência de retranslocação de N em relação ao tratamento controle. ^{ns}, ^o, ^{*}, ^{**}: não significativo e significativo a 10, 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 10: Coeficiente de correlação de Pearson para variáveis com efeito acumulativo da omissão, por três semanas, e ressuprimento por duas semanas, de P e tratamento controle, em quatro clones de eucalipto

	Massa Total	Massa Folha	Massa Caule	Massa Raiz	Massa PA	PA/R	Conteúdo Total	Conteúdo Folha	Conteúdo Caule	Conteúdo Parte Aérea	Conteúdo Raiz	EU	EU PA	EA	ET
A relativa	-0,13 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,69 [*]	-0,16 ^{ns}	-0,82 [*]	-0,69 ^o	-0,49 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,78 [*]	-0,38 ^{ns}	-0,75 [*]
Massa Total		0,78 [*]	0,93 ^{**}	0,62 ^o	0,90 ^{**}	-0,18 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,70 [*]	0,14 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	0,09 ^{ns}
Massa Folha			0,81 [*]	0,04 ^{ns}	0,96 ^{**}	0,40 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,82 [*]	0,19 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,11 ^{ns}
Massa Caule				0,37 ^{ns}	0,95 ^{**}	0,10 ^{ns}	0,72 [*]	0,62 ^o	0,53 ^{ns}	0,66 ^o	0,64 ^o	0,41 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,25 ^{ns}
Massa Raiz					0,20 ^{ns}	-0,87 ^{**}	-0,02 ^{ns}	-0,45 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,22 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,68 ^o	0,14 ^{ns}	-0,76 [*]	-0,13 ^{ns}
PA						0,27 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,76 ^{**}	0,37 ^{ns}	0,60	0,44 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,19 ^{ns}
PA/R							0,39 ^{ns}	0,80 ^{**}	0,32 ^{ns}	0,57 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,50 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,87 ^{**}	0,15 ^{ns}
Conteúdo Total								0,59 ^{ns}	0,94 ^{**}	0,96 ^{**}	0,79 [*]	-0,29 ^{ns}	-0,73 [*]	0,62 ^o	0,31 ^{ns}
Conteúdo Folha									0,41 ^{ns}	0,72 [*]	0,12 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,39 ^{ns}
Cont. Caule										0,92 ^{**}	0,70 [*]	-0,46 ^{ns}	-0,85 ^{**}	0,65 ^o	0,30 ^{ns}
Cont. PA											0,58 ^{ns}	-0,36 ^{ns}	-0,67 [*]	0,74 [*]	0,35 ^{ns}
Cont. Raiz												-0,07 ^{ns}	-0,65 ^o	0,19 ^{ns}	0,14 ^{ns}
EU													0,75 [*]	-0,78 [*]	-0,24 ^{ns}
EUPA														-0,65 [*]	-0,31 ^{ns}
EA															0,16 ^{ns}

A relativa: perda acumulada da taxa fotossintética líquida em relação ao tratamento controle; Massa Total: massa da matéria seca de toda a planta; Massa Folha: massa da matéria seca de folhas; Massa Caule: massa da matéria seca de caule; Massa Raiz: massa da matéria seca da raiz; massa PA: massa da matéria seca de folha e caule ; PA/R: relação entre a massa da parte aérea e massa do sistema radicular; Conteúdo Total: conteúdo total de P; Conteúdo Folha: conteúdo de P nas folhas; Cont. Caule: conteúdo de P no caule; Cont. PA: conteúdo de P nas folhas e caule; Cont. Raiz: conteúdo de P na raiz; EU: eficiência de utilização de P; EUPA: eficiência de utilização de P para a parte aérea; EA: eficiência de absorção de P; IRET: eficiência de retranslocação de P em relação ao tratamento controle. ^{ns}, ^o, ^{*}, ^{**}: não significativo e significativo a 10, 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Discussão

A omissão de N resultou no decréscimo dos seus teores totais nas folhas diagnóstico, na taxa de crescimento e de fotossíntese líquida, nos teores dos pigmentos fotossintéticos e em danos ao FS_{II}. O ressuprimento de N recuperou o valor destas variáveis, evidenciando a grande resiliência dos clones avaliados. Para P foram observadas quedas na taxa de crescimento, especialmente no crescimento relativo em diâmetro e altura, na taxa fotossintética líquida, nos teores de P das folhas diagnóstico (semana 1) e danos ao FS_{II}. Estas alterações ocorreram de formas diferentes de acordo com o clone em questão.

O clone 386 foi o clone que apresentou maior crescimento no tratamento controle, corroborando com o resultado obtido por Pinto et al. (2011). Entretanto, o 386 também apresentou o maior efeito da omissão de N ou P no crescimento em massa. Seu menor crescimento final na omissão e ressuprimento de N foi coerente com os menores valores de fotossíntese líquida, visto que ele apresentou a maior redução relativa na fotossíntese na omissão de N. Estes resultados indicam que as altas taxas de crescimento e eficiência nutricional alcançados no tratamento controle dependem de um perfeito suprimento nutricional que, se não ocorrer, levará a drásticas diminuições do crescimento. Portanto, o clone 386 não apresenta bons mecanismos de resistência ao estresse nutricional.

O clone VM-01 apresentou o menor crescimento no tratamento controle, como observado por Pinto et al. (2011). Já na omissão/ressuprimento de N ou P se distinguiu dos demais, pois o estresse nutricional não resultou em redução no crescimento em massa ao final do experimento, embora tenha ocorrido redução da taxa fotossintética e da taxa de crescimento em diâmetro durante a omissão. Para o tratamento de omissão/ressuprimento de P houve maior crescimento, que pode ser explicado pela maior translocação de P, visto que este clone apresentava os maiores teores quando da omissão, e por crescimento compensatório após o ressuprimento, recuperando o teor inicial de P com maior velocidade.

O clone VM-01 foi o que apresentou a menor EUP no tratamento controle e o maior acréscimo desta eficiência quando submetido à omissão e ressuprimento de P, além de apresentar a maior EA para o tratamento controle e o referente à P. Estes resultados indicam que as mudanças frente à omissão e ressuprimento de P conferem ao

clone maior resistência ao estresse nutricional, visto que é capaz de manter o seu crescimento sob limitado suprimento de P. Essa habilidade pode ser explicada pelo maior acúmulo de nutrientes nos vacúolos e em outros órgãos, como o caule, que serve de reserva para possíveis situações de disponibilidade restrita de P. A capacidade de alocação de nutriente no caule foi relatada por Lima (1996), que observou este mesmo padrão quando avaliou *E. camaldulensis*, um dos materiais que compõe o híbrido VM-01. No presente trabalho, o clone VM-01, que apresentou a maior retranslocação de P, foi também o de maior queda na alocação de P no caule, corroborando com os resultados obtidos por Lima (1996). Para N, o clone VM-01 foi o que apresentou a menor perda relativa em A, quando submetido a omissão/ressuprimento de N, fato que é atribuído à rápida recuperação da taxa fotossintética após o ressuprimento de N. Foi também o único clone em que EUN aumentou com a omissão e ressuprimento de N, apresentando os maiores valores de EUN e de EAN.

Os teores relativamente elevados de N ou P das folhas diagnóstico, na terceira semana de omissão, resultam da ciclagem interna destes nutrientes, visto que estas folhas tiveram todo o seu crescimento no período de omissão. Assim, os teores de N ou P nestas folhas indicam a grande capacidade de retranslocação, especialmente de P, que na terceira semana apresentou teor igual ou superior ao do tratamento controle. Estudos indicam que, como média geral, a capacidade de retranslocação de P é de 50 % e pode ocorrer devido a senescência foliar ou estimulado pelo baixo suprimento de P_i (Aerts, 1996). Para culturas perenes essa retranslocação tende a ser maior e é capaz de suprir em até 66 % a demanda por nutrientes móveis (Miller, 1995). Utilizando a fórmula proposta por Vitousek e Sanford (1986), e considerando como tecido senescente folhas recém-descartadas, Silva (2011) encontrou que a retranslocação de N e P em eucalipto foi de 70 e 38 % respectivamente, quando não foi feita a fertilização mineral. Esse resultado comprova a grande importância da ciclagem interna em eucalipto, tornando desnecessárias as adubações de manutenção, especialmente de N em determinadas situações, justificando a não resposta a adubação muitas vezes observadas em condições de campo (Miller, 1995; Santos, 2001). A maior retranslocação de P foi observada no clone VM-01, que apresentava o maior teor de P nas folhas velhas, e está de acordo com observado por Saur et al. (2000) e Silva (2011). Esta alta ciclagem interna, observada para todos os clones, é uma das estratégias adotadas pelas plantas para garantir maior eficiência nutricional e é essencial para a sustentabilidade do plantio.

Maiores valores de EAN e EAP foram observados no clone VM-01, para o tratamento controle e de omissão/resuprimento de N ou de P. Seu sistema radicular apresentava raízes com menores diâmetros, possivelmente com maior área radicular específica, característica visualmente observada, resultando na maior EA entre os clones estudados. O clone 386 apresentou acoplamento do crescimento da parte aérea e do sistema radicular e absorção dos nutrientes, especialmente N, que resultou na igualdade da relação parte aérea/sistema radicular e efeito não significativo do tratamento de omissão/ressuprimento na EAN. Para o clone I-144, no tratamento de P, e I-042 e VM-01, no tratamento de N, houve aumento da alocação de fotoassimilados na raiz, que é um dos sinais mais tardios de desbalanço nutricional (Huang et al., 2008). Aumento na alocação de biomassa na raiz pode ser uma boa estratégia, especialmente na baixa disponibilidade de P, em razão da menor taxa de difusão deste nutriente (Liao et al., 2004). Estudos desenvolvidos com eucalipto (Mello et al., 1998; Gonçalves e Mello, 2000; Reis et al., 2006) indicam que em sítios com maior disponibilidade dos recursos água e nutrientes, menor será o índice de alocação de fotoassimilados na raiz e, conseqüentemente, maior será a relação parte aérea/sistema radicular.

A produtividade das plantas depende da sua taxa fotossintética que, por sua vez, integra diversas variáveis fisiológicas. Dentre estas variáveis, foi observado que o teor de clorofila *a*, *b* e total diminuiu na omissão de N e esta redução se correlacionou, de forma positiva e significativa, com A , $\hat{Y}_{II}$, F_m e ETR. Assim, quedas nos teores dos pigmentos fotossintéticos estão associadas à menores dissipações fotoquímicas, no FS_{II} ($\hat{Y}_{II}$), e, conseqüentemente, maiores $\hat{Y}_{NPQ}$ e $\hat{Y}_{NO}$, como observado para todos os clones.

As quedas no $\hat{Y}_{II}$ resultam na geração de menor quantidade de compostos redutores e, conseqüentemente, queda na ETR e, em conjunto, tais alterações explicam, em parte, as quedas em A , visto que essas não podem ser explicadas por limitação estomática (Damour et al., 2010; Warren, 2011). Este efeito do N já foi observado em outras culturas, e pode ser explicado pela grande associação do N (50-80 %) ao aparato fotossintético (Morita, 1980; Langsdorf et al., 2000). Esta queda em A também pode ser atribuída a menores teores da rubisco, enzima que atua na fotossíntese e apresenta N em sua estrutura. Cerca de 90 % da rubisco é sintetizada em até duas semanas após a expansão foliar, período em que as folhas diagnóstico eram avaliadas e coletadas, e a falta de N afeta síntese desta enzima (Makino et al., 1992; Bungard et al., 1997). Para girassol, o teor de rubisco aumentou em 5,2 vezes quando a concentração de NO_3^-

passou de 2,0 para 10,0 mmol L⁻¹ e este aumento resultou no aumento da fotossíntese (Pankovic et al., 2010). Dos até 80 % do N presentes nos cloroplastos, 30 a 50 % estão na estrutura da rubisco (Evans, 1996). Assim, este forte relacionamento entre N e fotossíntese já foi observado em diversas culturas (Farquhar et al., 1980; Field & Mooney 1986; Evans, 1996; Grassi et al., 2002).

Grande parte do N dos cloroplastos encontra-se nos pigmentos fotossintéticos, o que explica a grande queda observada nos teores dos pigmentos, especialmente clorofila *a* e *b*. Assim, reduções na taxa fotossintética e no teor de N se correlacionaram, forte e significativamente, com os teores dos pigmentos seja por extração ou por determinação com o SPAD. Além da diminuição do teor dos pigmentos, houve aumento da relação de chl *a/b*, especialmente na omissão de N, indicando degradação relativamente maior da chl*b*. Aumentos relativos de chl *a* indicam predominância de centros de reação (FS_{II}) e da ETR, em detrimento de chl *b*, que é acessória à chl*a* e está associada ao complexo coletor de radiação (Anderson, 1986; Terashima & Hikosaka, 1995). Esta é uma estratégia que ajusta a capacidade de absorção da radiação à sua demanda atual. O aumento no teor de carotenoides em relação ao teor de clorofilas, medido pela relação chl *a+b*/carotenoides, é forte indicador de estresse. Os carotenoides são pigmentos acessórios que têm como função prevenir a oxidação das clorofilas (fotoproteção) e também atuam na captação da luz, e no caso de estresse a principal função está relacionada a evitar danos fotooxidativos (Hendry & Price, 1993).

Foi observado queda na relação Fv/Fm, que mede a eficiência fotoquímica do FS_{II}, embora apenas na semana 3, quando era mais longo o tempo de omissão de N, este valor foi inferior a 0,75, indicando perda da capacidade fotossintética (Bolhar-Nordenkamp et al., 1989). Assim, mesmo com a redução na eficiência fotoquímica potencial, esta não foi limitante às reações fotossintéticas e a Fv/Fm não foi uma variável sensível ao estresse. Continuando a investigação da limitação fotoquímica, foi observado que o estresse por falta de N levou a menor dissipação fotoquímica ($\hat{Y}_{II}$) da radiação absorvida, compensado pelo aumento na dissipação na forma de calor ou fluorescência. Estas alterações, especialmente o aumento do $\hat{Y}_{NPQ}$, estão associadas a estresses abióticos (Muller, 2011; Golding & Johnson, 2003; Joliot & Joliot, 2006). Por isso, estas relações são amplamente utilizadas na escolha de novos materiais genéticos (Murchie & Lawson, 2013). A inibição da fotossíntese gera um gradiente de pH, com acidificação do lume do tilacoide, que acaba por ativar a conversão de violaxantina em

zexantina, responsável pela dissipação da energia na forma de calor (Golding e Johnson, 2003; Logan, 2005; Smirnoff, 2005), evitando danos foto-oxidativos ao FS_{II} (Ort e Baker, 2002).

A energia luminosa absorvida pelas clorofilas é transferida para os centros de reação, que são unidos pela cadeia transportadora (ETR), onde serão gerados os compostos redutores e o gradiente transmembrana de prótons, necessário para a síntese de ATP. Isto explica a forte correlação entre A, ETR e $\hat{Y}_{NPQ}$ observada neste trabalho. Diminuições na ETR indicam perda na capacidade fotossintética ou uma regulação para se evitar danos foto-oxidativos no caso de queda da capacidade assimilatória de CO₂. Resultados semelhantes foram obtidos por Lu & Zhang, 2000; Lu et al. 2001) para milho e por Torres Netto et al. (2005) para café. DaMatta et al. (2005), também trabalhando também com café, observaram queda na ETR e aumento de dissipação não fotoquímica em plantas sob deficiência de N, corroborando os resultados deste trabalho.

Os efeitos de P na fotossíntese foram em geral, relativamente, menos acentuados que os de N, e são mais relacionados aos compostos fosforados ATP e NADPH (Lambers et al., 2011; Warren, 2011; Veneklaas et al., 2012). Não há evidências de que o teor de P interfira na fotossíntese por meio da limitação estomática. Assim, as respostas observadas neste trabalho na omissão de P, para g_s e aumento da relação C_i/C_a encontram respaldo na literatura (Kirschbaum & Tompkins 1990; Lewis et al. 1994; Turnbull et al. 2007; Bown et al. 2009; Warren, 2008; 2011), pela qual os efeitos da limitação de Pi na fotossíntese se dão pela redução da taxa de carboxilação máxima da rubisco e da sua regeneração (Fredeen et al., 1989; Jacob & Lawlor, 1992; Plesnicar, 1994), pela menor síntese de ATP, dado ao baixo Pi, e danos nos FS_{II} (Sawada et al., 1992; Anwaruzzaman et al., 1995; Niinemets et al., 1999). Quanto às variáveis do FS_{II}, avaliadas neste trabalho, os maiores efeitos do estresse por omissão de P foram observados na semana 2 (2 semanas após a omissão de P), quando a queda do $\hat{Y}_{II}$ se correlacionou com a queda de A e ETR, indicando a oxidação do FS_{II}. A queda da ETR é relatada na literatura como forte indicadora da deficiência de Pi (Niinemets et al., 1999; Turnbull et al., 2007) e explica as alterações nas demais variáveis da fase fotoquímica. A queda da ETR ocorre pela menor disponibilidade de Pi para síntese de ATP e NADPH, explicando a alta correlação entre ETR e $\hat{Y}_{NPQ}$ aqui registradas. Quanto aos pigmentos, foi observada queda nos seus teores no período de omissão, embora com

intensidade menor do que a observada para a omissão de N. Na literatura há relatos de que a deficiência de P não resultou na queda dos teores de pigmentos fotossintéticos (Sawada et al., 1983; Fredeen et al., 1989; Crafts-Brandner, 1992; Usuda & Shimogawara, 1991). Entretanto, as maiores quedas dos teores dos pigmentos foram observadas na semana 4, uma semana após o ressuprimento de P, indicando que a planta utilizou o P fornecido em outras rotas alteradas pelo estresse, visto que estes pigmentos foram relativamente pouco alterados. Uma destas rotas podem ser as reações da fase bioquímica da fotossíntese, relatadas na literatura, em que a queda *A_{max}* estava acoplada à taxa máxima de carboxilação da rubisco e à baixa regeneração desta, comprovando as hipóteses levantadas para outras culturas (Turnbull et al., 2007).

Conclusões

A omissão de N e P alterou os seus teores foliares, a taxa fotossintética (A) e a eficiência fotoquímica (Y_{II}), que se recuperaram após o ressuprimento de N ou P.

A alta retranslocação de P foi capaz de suprir P à folha diagnóstico, em teor igual ou superior ao teor detectado no tratamento controle, quando havia omissão do nutriente.

O clone 386 foi o que apresentou maior crescimento no tratamento controle, porém, foi também o que sofreu os maiores efeitos da omissão/ressuprimento de N ou P. Já o clone VM-01, que apresentou menor crescimento no tratamento controle, foi também o clone em que a omissão/ressuprimento de N não afetou o crescimento e a de P resultou em maior crescimento.

A redução na taxa fotossintética está associada ao menor transporte de elétrons e menor rendimento quântico do fotossistema II, causadas pela omissão de N e P.

O teor total de N e de pigmentos fotossintéticos (chl a , chl b e leitura SPAD), taxa fotossintética e rendimento efetivo do FSII foram sensíveis ao suprimento nutricional e são bons marcadores quanto ao status de N.

Referências Bibliográficas

- AERTS, R. Nutrient resorption from senescing leaves of perennials: are there general patterns? *J. Ecol.*, 84:597–608, 1996.
- ALVAREZ V., V.H.; DIAS, L.E.; RIBEIRO, F.S.; SOUZA, R.B. & FONSECA, C.A. Métodos de análises de enxofre em solos e plantas. Viçosa, MG, Editora UFV, 2001. 131p.
- ANDERSON, J.M. Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37:93–136, 1986.
- ANWARUZZAMAN, M.; SAWADA, S.; USUDA, H. & YOKOTA, A. Regulation of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation by inorganic phosphate through stimulating the binding of the activator CO₂ to the activation sites. *Plant Cell Physiol.*, 36:425–433, 1995.
- ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F. da; BARTOLINI, C.G.; FORSTHOFER, E.L. & STRIEDER, M.L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e nitrogênio nas folhas de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 13:158-167, 2001.
- BAKER, N. R. & ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.*, 55:1607-1621, 2004.
- BARROS, N. F. & NOVAIS, R. F. Relação solo-eucalipto. Viçosa, MG, Folha de Viçosa, 1990, 430p.
- BILGER, W. & BJÖRKMAN, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photos. Res.*, 25:173-185, 1990.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R.; OQUIST, G.; SCHREIBER, U.L.E.G. & LECHNER, E.G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol.*, 4:497-514, 1989.
- BOWN, H.E.; WATT, M.S.; MASON, E.G.; CLINTON, P.W. & WHITEHEAD D. The influence of nitrogen and phosphorus supply and genotype on mesophyll conductance limitations to photosynthesis in *Pinus radiata*. *Tree Physiol.*, 29:1143-1151, 2009.

BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofométrica de P em extratos de solo e planta. R. Ceres, 21:73-85, 1974.

BUNGARD, R.A.; MCNEIL, D. & MORTON, J.D. Effects of nitrogen on the photosynthetic apparatus of *Clematis vitalba* grown at several irradiances. Aust. J. Plant Physiol. 24:205-214, 1997.

BYRNE, L.S.; FOITO, A.; HEDLEY, P.E.; MORRIS, J.A.; STEWART, D. & BARTH, S. Early response mechanisms of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) to phosphorus deficiency. Ann. Bot., 107:243-254, 2011.

CLARK, R.B. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. J. Plant Nutr., 5:1039-1057, 1982.

CRAFTS-BRANDNER, S. J. Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean. Plant physiol., 98:1128-1132, 1993.

DAMATTA, F. M.; LOOS, R. A.; DUCATTI, C.; SILVA, E.A.D.; & LOUREIRO, M.E. Efeitos do nitrogênio e do déficit hídrico sobre as trocas gasosas, composição isotópica do carbono e emissão de fluorescência em *Coffea canephora*. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. In: Resumos expandidos, Embrapa Café, 2000.

DAMOUR, G.; SIMONNEAU, T.; COCHARD, H. & URBAN, L. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. Plant Cell Env., 33:1419-1438, 2010

Ehleringer, J. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. Oecologia 102:366-370, 1981.

EVANS, J.R. Developmental constraints on photosynthesis: Effects of light and nutrition. In Photosynthesis and the Environment, ed. N.R.Baker, pp. 281–304. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 1996.

EVENHUIS, B. & WAARD, P.W.F. Principles and practices in plant analysis. In: FAO, Soils. Rome, p.152-163, 1980.

FARQUHAR, G. D.; VON CAEMMERER, S. von & BERRY, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. Planta, 149:78-90, 1980.

FERREIRA, M.M.M.; FERREIRA, G.B.; FONTES, P.C.R. & DANTAS, J.P. Índice SPAD e teor de clorofila no limbo foliar do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica, em duas épocas de cultivo. Rev. Ceres, 53:83-92, 2006.

- FIELD, C. & MOONEY, H.A. The photosynthesis–nitrogen relationship in wild plants. In: On the Economy of Form and Function. Ed. Givinish, T.J. Cambridge University Press, Cambridge, p25–55. 1986.
- FREDEEN, A.L.; RAO, I.M.& TERRY, N. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. Plant Physiol.89-225-230, 1989.
- FURTINI NETO, A. E.; BARROS, N. F.; GODOY, M. F.; NOVAIS, R. F. Eficiência nutricional de mudas de Eucalyptus em relação a fósforo. Revista Árvore, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 17-28, jan./mar. 1996.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M. & BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys., 990:87-92, 1989.
- GIL, P.T.; FONTES, P.C.R.; CECON, P.R. & FERREIRA, F.A. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio e para o prognóstico da produtividade da batata. Hort. Bras., 20:611-615, 2002.
- GOLDING, A.J. & JOHNSON, G.N. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. Planta, 218:107-114, 2003.
- GONÇALVES, J.L.M. & MELLO, S.L.M. O sistema radicular das árvores. In: Nutrição e Fertilização de Florestas. Piracicaba, 2000. p.221-267.
- GRASSI, G.; MEIR, P.; CROMER, R.; TOMPKINS, D. & JARVIS, P.G. Photosynthetic parameters in seedlings of *Eucalyptus grandis* as affected by rate of nitrogen supply. Plant Cell Env., 25:1677-1688, 2002.
- GUIMARÃES, T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G.; ALVAREZ V., V.H. & MONNERAT, P.H. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo. Bragant.,58:209-216, 1999.
- HAMMOND, J.P.; BROADLEY, M.R. & WHITE, P.J. Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. Ann Bot, 94:323-332, 2004.
- HENDRICKSON, L.; FURBANK, R.T. & CHOW, W.S. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. Photosynt. R., 82:73-81, 2004.

HENDRY, G.A.F. & PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G.A.F. and Grime J.P. (Eds.) Methods in comparative plant ecology. Chapman & Hall, London, 1993, 148-152p.

HIREL, B.; GOUIS, J.; NEY, B. & GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. J. Exp. Bot., 58:2369-2387, 2007

HUANG, C. Y.; SHIRLEY, N.; GENC, Y. & SHI, B.; LANGRIDGE, P. Focus issue on phosphorus plant physiology: Phosphate Utilization Efficiency Correlates with Expression of Low-Affinity Phosphate Transporters and Noncoding RNA, IPS1, in Barley. Plant Physiol, 156:1217-1229, 2011.

HUANG, C.Y.; ROESSNER, U.; EICKMEIER, I.; GENC, Y.; CALLAHAN, D.L.; SHIRLEY, N.; LANGRIDGE, P. & BACIC, A. Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate-deficient barley plants (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Physiol., 49:691–703, 2008.

JACOB, J. & LAWLOR, D.W. Dependence of photosynthesis of sunflower and maize leaves on phosphate supply, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity, and ribulose-1,5-bisphosphate pool size. Plant Physiol., 98:801-807, 1992

JOLIOT, P. & JOLIOT, A. Cyclic electron flow in C3 plants. BBA Bioenerg., 6:362-368, 2006.

KIRSCHBAUM, M.U.F. & TOMPKINS, D. Photosynthetic responses to phosphorus-nutrition in *Eucalyptus grandis* seedlings. Aust. J. Plant Physiol. 17:527–535. 1990.

KLUGHAMMER, C. & SCHREIBER, U. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. PAM applic., 1:27-35, 2008.

KRAMER, D.M.; JOHNSON, G.; KIIRATS, O & EDWARDS, G.E. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. Photosynthesis Research, 79, 209-218, 2004.

LAISK, A. & LORETO, F. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. Plant Physiol. 110:903-912. 1996.

LAMBERS, H.; FINNEGANP, M.; LALIBERTÉ, E.; PEARSE, S.J.; RYAN, M.H.; SHANE, M.J. & VENEKLAAS, E.J. Phosphorus nutrition of Proteaceae in severely

phosphorus-impooverished soils: are there lessons to be learned for future crops? *Plant Physiol.* 156:1058-1066, 2011;

LANGSDORF, G.; BUSCHMANN, M.; SOWINSKA, M.; BANBANI, F.; MOKRY, F.; TIMMERMANN, F. & LICHTENTHALER, H.K. Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynt.*, 38:539-551, 2000.

LEWIS, J.D.; GRIFFIN, K.L.; THOMAS, R.B. & STRAIN, B.R. Phosphorus supply affects the photosynthetic capacity of loblolly-pine grown in elevated carbon-dioxide. *Tree Physiol.*, 14:1229–1244, 1994.

LIAO, H.; YAN, X.; RUBIO, G.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W. & LYNCH, J. P. Genetic mapping of basal root gravitropism and phosphorus acquisition efficiency in common bean. *Funct. Plant Biol.*, 31:959-970, 2004.

LICHTENTHALER, H.K. & MIEHE, J.A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.*, 2:316-320, 1997.

LIMA, A.M.N.; NEVES, J.C.L.; SILVA, I.R.; LEITE, F.P. Cinética de absorção e eficiência nutricional de K, Ca e Mg em plantas jovens de quatro clones de eucalipto. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:903-909, 2005

LIMA, P.C. Acúmulo e distribuição de matéria seca, carboidratos e macronutrientes em mudas de *Eucalyptus* spp em solos com diferentes potenciais hídricos. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1996. 106p. (Tese de Doutorado).

LOCATELLI, M.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L. & NOVAIS, R.F. Efeito de formas de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de eucalipto. *R. Árv.*, 8:53-69, 1984.

LOGAN, B.A. Reactive oxygen species and photosynthesis. In: N. Smirnoff ed., *Antioxidants and reactive oxygen in plants*, Oxford, Blackwell Publishing, 2005, p. 250–267.

LU, C. & ZHANG, J. Photosynthesis CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. *Plant Science*. 151: 135 – 143, 2000.

LU, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Q. & KUANG, T. Modification of photosystem II photochemistry in nitrogen deficient maize and wheat plants. *J. Plant Physiol.*, 158: 1423-1430, 2001.

- MAKINO, A.; SAKASHITA, H.; HIDEMA, J.; M.A.E; OJIMA, K. & OSMOND, B. Distinctive responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to CO₂ transfer resistance. *Plant Physiol.*, 100:1737-1743, 1992.
- MARENCO, R.A. & LOPES, N.F. Fisiologia vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2005. 451p
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot*, 51:659-668, 2000.
- MATTILELLO, E.M.; RUIZ, H.A.; SILVA, I.R.; SARKIS, J.E.S.; NEVES, J.C.L. & PUCCI, M.M. Phloem mobility of boron in two eucalypt clones. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:1695-1704, 2009.
- MCDONALD, G. & BOVILL, W. Nutrient Use Efficiency. In: KOLE, C., ed. *Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops*, vol. 2. Springer, Berlin, 2013. p. 333-393.
- MELLO, S. L.M.; GONÇALVES, J.L. M. & OLIVEIRA, L.E.G. Características do sistema radicular em povoamentos de eucaliptos propagados por sementes e estacas. *Sci. Florest.*, 54:16-26, 1998.
- MILLER, H.G. The influence of stand development on nutrient demand, growth and allocation. *Plant Soil*. 169:225-232, 1995.
- MORITA, K. Release of Nitrogen from chloroplasts during leaf senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot.*, 46:297-302, 1980.
- MÜLLER, C. Resposta fotossintética à toxidez de ferro em diferentes cultivares de arroz. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2011. 124f. (Tese de Doutorado)
- MÜLLER, C.; DETMANN, K.S.C.; PEREIRA, G.L.; BATISTA, H.C.S.; FIGUEIREDO, A.C.; MARINHO, A.F. & BARROS, N.F. Alterações fisiológicas e de crescimento em clones de eucalipto em resposta ao déficit hídrico e suprimento de boro. *Fertbio*, 2012. Maceio, AL. Cd-rom.
- MURCHIE, E. H. & LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.*, 64:3983-3998, 2013.
- NELSON, D.W. & SOMMERS, L.E. Determination of total nitrogen in plant material. *Agron. J.* 65:109-112, 1973.

NETTO, A.T.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J.G.D. & BRESSAN-SMITH, R.E. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll *a* fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Sc. Hortic.*, 104:199-209, 2005.

NEVES, J. C. L. Produção e partição de biomassa, aspectos nutricionais e híbridos em plantios clonais de eucalipto na região litorânea do Espírito Santo. 2000. 191 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes.

NIINEMETS, U.; TENHUNEN, J.D.; CANTA, N.R.; CHAVES, M.M.; FARIA, T.; PEREIRA, J.S. & REYNOLDS, J.F. Interactive effects of nitrogen and phosphorus on the acclimation potential of foliage photosynthetic properties of cork oak, *Quercus suber*, to elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Glob. Change Biol.* 5:455–470, 1999.

ORT, D. R. & BAKER, N. R. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current op. plant biol.*, 5:193-198, 2002.

OXBOROUGH, K. & BAKER, N.R. An instrument capable of imaging chlorophyll *a* fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and subcellular levels of organization. *Plant, Cell Environm.* 20:1473-1483, 1997.

PANKOVIČ, D.; PLESNIČAR, M.; ARSENIJEVIČ-MAKSIMOVIČ, I.; PETROVIČ, N.; SAKAČ, Z. & KASTORI, R. Effects of nitrogen nutrition on photosynthesis in Cd-treated sunflower plants. *Ann. Bot.*, 86:841-847, 2000.

PINKARD, E.A.; PATEL, V. & MOHAMMED, C. Chlorophyll and nitrogen determination for plantation-grown *Eucalyptus nitens* and *E. globulus* using a non-destructive meter. *For. Ecol. Manag.*, 223:211–217, 2006.

PINTO, S.I.; FURTINI NETO, A.E.; NEVES, J.C.L.; FAQUIN, V.; MORETTI, B.S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivados em solução nutritiva. *Rev. Bras. Ci. Solo.*, 35:523-533, 2011.

PLESNICAR, M.E. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves as affected by phosphorus nutrition. *J. of Experim. Botany*, 45:919-924, 1994.

PULITO, A. P. ; GOMES, S. S. ; GONÇALVES, J. L. M. ; SMETHURST, P. ; KAMOGAWA, M. Y. ; MASETTO, A. V. ; SILVA, C. R. ; GAVA, J. L. ; CHAVES,

R. . Soil and fertilizer nitrogen in relation to productivity of eucalypt plantations in São Paulo state, Brazil. In: International Conference on Process Controlling Productivity in Tropical Plantations - IUFRO, 2008, Porto Seguro-BA. International Conference on Process Controlling Productivity in Tropical Plantations - IUFRO, 2008.

REIS, B.E. Expressão de genes relacionados à tolerância do eucalipto à seca influenciada pelo boro. Universidade Federal de Viçosa. 2011. 32f. (Dissertação de Mestrado)

REIS, G.G.; REIS, M.G.F.; FONTAN, I. C.I.; MONTE, M.A.; GOMES, A.N. & OLIVEIRA, C.H.R. Crescimento de raízes e da parte aérea de clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e de *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus* spp submetidos a dois regimes de irrigação no campo. R. Árvore., 30:921-931, 2006.

SANTANA, R.C.; BARROS, N.F. & NEVES, J.C.L. Eficiência de utilização de nutrientes e sustentabilidade da produção em procedências de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna* em sítios florestais do Estado de São Paulo. R. Árvore, 26:447-457, 2002.

SANTANA, R. C.; BARROS, N.; NOVAIS, R. F.; LEITE, H. G. & COMERFORD, N. B. Alocação de nutrientes em plantios de eucalipto no Brasil. R. Bras. Ci. Solo, 32:2723-2733, 2008.

SANTOS, M.L. Crescimento e alocação de biomassa e de nutrientes em eucalipto, decorrentes da aplicação de nitrogênio e potássio. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 62p. (Dissertação de Mestrado)

SAUR, E.; NAMBIAR, E.K.S. & FIFE, D.N. Foliar nutrient retranslocation in *Eucalyptus globulus*. Tree Physiol. 20:1105–1112. 2000.

SAWADA, S.; USUDA, H. & TSUKUI, T. Participation of inorganic orthophosphate in regulation of temperature treatment of single-rooted soybean plants: The ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activity in response to changes in the photosynthetic source-sink balance. Plant Cell Physiol. 33: 943–949, 1992.

SIDDIQUI, M.Y. & GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. J. Plant Nutr., 4,:289-302, 1981.

- SILVA, P.H.M. Impactos das doses e do parcelamento da fertilização na produtividade, lixiviação e ciclagem de nutrientes em plantações de eucalipto . Piracicaba, SP. Universidade de São Paulo, 2011. 119p. (Tese de doutorado)
- SMETHURST, P.; HOLZ, G.; MORONI, M. & BAILLIE, C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. For. Ecol. Manag., 193:63-80,2004.
- SMIRNOFF, N. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions In: N. Smirnoff ed., Antioxidants and reactive oxygen in plants, Oxford, Blackwell Publishing, 2005, pp. 1–24.
- SWIADER, J.M.; CHYAN, Y. & FREIJI, F.G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. J. Plant Nutrit., 7:1687-1699, 1994.
- TERASHIMA, I. & HIKOSAKA, K. Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. Plant Cell Environm., 18:1111-1128.
- TURNBULL, T.L.; WARREN, C.R. & ADAMS, M.A. Novel mannose-sequestration technique reveals variation in subcellular orthophosphate pools do not explain the effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Eucalyptus globulus* seedlings. New Phytol. 176:849–861, 2007.
- TURNER, F.T. & JUND, M.F. Chlorophyll meter to predict nitrogen topdress requeriment for semidwarf rice. Agron. J., 83:926-928, 1991
- USUDA, H. & SHIMOGAWARA, K. Phosphate deficiency in maize. II. Enzyme activities. Plant and cell physiology, 32: 1313-1317, 1991.
- VANCE C.P.; UHDE-STONE, C. & ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytol.,157:423–447, 2003.
- VENEKLAAS, E.J.; LAMBERS, H.; BRAGG, J.; FINNEGAN, P.M.; LOVELOCK, C.E.; PLAXTON, W.C.; PRICE, C.A.; SCHEIBLE, W.R.; SHANE, M.W.; WHITE, P.J. & RAVEN, J.A. Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. New Phyt., 195:306–320, 2012
- VITOUSEK, P.M. & SANFORD, R.L. Nutrient cycling in moist tropical forest. Rev. Ecology Systemat.,17:137-167, 1986.

WARREN, C.R. How does P affect photosynthesis and metabolite profiles of *Eucalyptus globulus*? Tree Phys. 7:727-739.2011.

Conclusões Gerais

Os clones avaliados apresentaram comportamento diferencial quanto ao estresse nutricional imposto, revelando diferentes mecanismos de resistência ao estresse por falta de N ou de P e de recuperação após o ressuprimento do nutriente. Dentre os clones, os mais contrastantes são o clone 386 e VM-01, sendo o primeiro de alta exigência e eficiência nutricional e maior crescimento, porém de baixa tolerância à restrição de N ou P. Já o clone VM-01, menos eficiente nutricionalmente, mostrou-se mais tolerante à restrição, visto que a omissão/ressuprimento de N ou P não diminuiu seu crescimento em massa.

O teor de N total mostrou-se como bom indicador do status de N da planta, visto que apresentou alta e significativa correlação com diversas variáveis avaliadas, como A, atividade da NR e GS, teores de chl *a*, chl *b* e total (SPAD), ETR e $\dot{Y}_{II}$. O conteúdo de N total na planta apresentou bom relacionamento com a perda acumulada de A, massa da matéria seca, eficiência de utilização e de translocação de N. Já o teor de P se correlacionou apenas com o teor de carotenoides total, e, embora significativa, a correlação foi baixa, indicando que o teor de P não é um bom indicador do status de P, nestas condições. Das outras variáveis avaliadas, os melhores relacionamentos foram para A e atividade da RNase.

Dentre os genes avaliados, os mais sensíveis à variação clonal foram o GS2;1 e Gln1;3, para o status de N, e RNS1 e PHO1;H1 para o status de P.