

FILIFE BRUNO DE OLIVEIRA

**A APLICAÇÃO FOLIAR DE Mn E Zn ALIVIA EFEITOS NEGATIVOS DA HIPÓXIA
EM PLANTAS DE EUCALIPTO?**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

Orientador: Samuel Vasconcelos Valadares
Coorientadores: Nairam Félix de Barros
Ivo Ribeiro da Silva
Fábio Murilo da Matta

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

O48a
2022 Oliveira, Filipe Bruno de, 1990-
A aplicação foliar de Mn e Zn alivia efeitos negativos da
hipóxia em plantas de eucalipto? / Filipe Bruno de Oliveira. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (62 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Samuel Vasconcelos Valadares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Solos, 2022.

Referências bibliográficas: f. 49-55.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufv/bbt.2022.478>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Eucalipto. 2. Hipóxia. 3. Estresse hídrico. I. Valadares,
Samuel Vasconcelos, 1987-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Solos. Programa de Pós-Graduação em Solos e
Nutrição de Plantas. III. Título.

CDD 22. ed. 634.973766

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

FILIFE BRUNO DE OLIVEIRA

**A APLICAÇÃO FOLIAR DE MN E ZN ALIVIA EFEITOS NEGATIVOS DA HIPÓXIA
EM PLANTAS DE EUCALIPTO?**

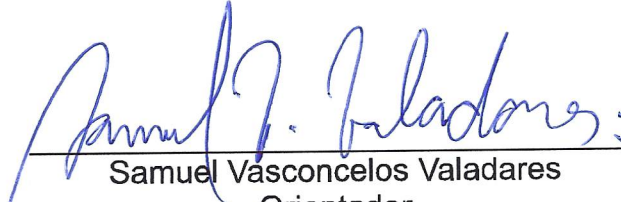
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Filipe Bruno de Oliveira
Autor



Samuel Vasconcelos Valadares
Orientador

Sua mente tem um poder de fabricar a realidade. O que você pensa, você sente, o que você sente, você vibra, o que você vibra, você atrai para si. Somos seres vibracionais que interagem com o universo.

Rhonda Byrne

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Geraldo Magela de Oliveira e Ancler Alves Pedrosa de Oliveira por todo o apoio e suporte durante essa jornada;

A Gabriela, por todo o amor e companheirismo;

Ao professor Samuel, pela excelente orientação e pela amizade;

Aos meus estagiários Santiago e ao Murillo, pela amizade e suporte ao longo do projeto;

Ao meu amigo Sergio, por toda a ajuda e apoio;

A pesquisadora Auxiliadora, pela coorientação e apoio no projeto;

Aos servidores do DPS, principalmente ao Marcus Vinicius

Ao Departamento de Solos, por todas as oportunidades oferecidas durante o estágio e mestrado;

À Universidade Federal de Viçosa, por todas as oportunidades e vivência oferecidas e vivenciadas;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À SIF e ao Nutree pelo suporte técnico ao longo do experimento;

E a todos que de alguma forma auxiliaram na confecção desse estudo, muito obrigado.

RESUMO

OLIVEIRA, Filipe Bruno de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **A aplicação foliar de Mn e Zn alivia efeitos negativos da hipóxia em plantas de eucalipto?** Orientador: Samuel Vasconcelos Valadares. Coorientadores: Samuel Vasconcelos Valadares. Coorientadores: Nairam Félix de Barros, Ivo Ribeiro da Silva e Fábio Murilo da Matta.

O cultivo de eucalipto em regiões sujeitas a alagamentos pode gerar significativas perdas de produtividade. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de compreender e avaliar o efeito da aplicação foliar de Zn e Mn na mitigação dos efeitos negativos da hipóxia em plantas de eucalipto. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com 5 repetições. Os tratamentos foram combinados em arranjo fatorial (2^3) com dois níveis de disponibilidade de oxigênio (com e sem hipóxia), com e sem a aplicação de Zn (0,1 g/L) e Mn (0,5 g/L). Foram cultivadas duas plantas por vaso contendo areia lavada, esterilizada e umedecida com solução nutritiva. Nos tratamentos submetidos à hipóxia, os vasos foram mantidos saturados com a solução de cultivo (a concentração de O_2 foi mantida abaixo de 4 mg L^{-1}). Para os tratamentos sem hipóxia, as plantas receberam aeração normal. Após a imposição da hipóxia, foram quantificadas as trocas gasosas e variáveis de fluorescência da clorofila *a* de todos os tratamentos. Após 77 dias de experimento, folhas das plantas foram coletadas para quantificação da atividade de enzimas (SOD, catalase e peroxidases) e foi determinado o conteúdo de compostos do metabolismo primário e secundário (teores de clorofilas, açúcares solúveis, amido, proteínas solúveis totais e aminoácidos totais). Foi também colhida uma planta em cada parcela experimental, para determinação de massa seca da parte aérea e quantificação de Mn e Zn na biomassa. Em seguida, a aeração dos vasos foi reestabelecida e, após 69 dias de recuperação, as plantas restantes foram cortadas e tiveram seu crescimento avaliado. As plantas submetidas à hipóxia apresentaram maior teor de Mn e menor teor de Zn quando comparadas às plantas cultivadas em condições normais. Ao final do período de alagamento, as plantas que receberam aplicações foliares com Mn (principalmente) e Zn apresentaram maiores taxas fotossintéticas, quando comparadas àquelas dos tratamentos sem Mn e Zn. Embora a aplicação de Zn tenha promovido aumento das taxas fotossintéticas ao fim do período de hipóxia,

o crescimento das plantas (nos tratamentos com e sem hipóxia) foi reduzido ao fim do experimento, indicando ter havido fitotoxidez na fase inicial do experimento. Após o período de recuperação, as plantas que receberam aplicação foliar com Mn apresentaram melhor crescimento.

Palavras-chave: Hipóxia. Estresse hídrico. Eucalipto.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Filipe Bruno de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Does foliar application of Mn and Zn alleviate negative effects of hypoxia in eucalyptus plants?** Orientador: Samuel Vasconcelos Valadares. Adviser: Coorientadores: Nairam Félix de Barros, Ivo Ribeiro da Silva e Fábio Murilo da Matta.

Flooding events are expected to increase in frequency and intensity with climate change. Yield losses caused by reduced oxygen availability, due to flooding events, are expected to increase in agriculture and forestry. Studies on the effect of mineral nutrition on plant responses to low oxygen availability are still scarce. In the present study we conducted a pot experiment to understand and evaluate the effect of foliar application of micronutrients (Mn and Zn) in mitigating the effects of low oxygen availability in eucalypt. The experiment was conducted in greenhouse conditions at Universidade Federal de Viçosa, Brazil. Treatments were combined in a factorial arrangement, with and without hypoxia, with and without foliar application of Zn (0.1 g/L) and Mn (0.5 g/L). The randomized blocks design was used, with five replicates. Each experimental unit consisted of 1 pot, containing washed sand and 2 eucalyptus plants (*Eucalyptus urochphyla* x *Eucalyptus grandis* hybrid). In the treatments with hypoxia, O₂ concentration was kept below 4 mg L⁻¹. In the treatments without hypoxia the pots were maintained unsaturated. During the experiment, gas exchange (photosynthetic rate, stomatal conductance and internal CO₂ concentration) and chlorophyll A fluorescence variables were quantified using an infrared gas analyzer (IRGA – Infrared Gas Analyzer). After 77 days of experiment, plant leaves were collected to quantify the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and peroxidases) and compounds of the primary and secondary metabolism (contents of chlorophylls, soluble sugars, starch, total soluble proteins and total amino acids). One plant was also harvested in each experimental plot, for determination of shoot dry mass and quantification of Mn and Zn in the biomass. Aeration of the pots was reestablished and, after 69 days of recovery, the remaining plants were cut and their growth was evaluated. Plants submitted to hypoxia had a higher Mn content and a lower Zn content when compared to plants grown under normal aeration. At the end of the flooding period, seedlings that received foliar applications with Mn and Zn showed a higher photosynthetic rate when compared to treatments without Mn and Zn.

Although Zn application contributed to increase plant photosynthetic rates at the end of the experiment, plant growth was reduced (treatments with and without hypoxia), indicating a possible phytotoxic effect in the initial phase of the experiment. Plants that received foliar application of Mn had higher growth after the period of hypoxia (i.e., during the recovery period).

Keywords: Hypoxia. Water stress. Eucalyptus.

SUMÁRIO

| | | |
|------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 2.1- | <i>Determinação de teores de nutrientes nas plantas</i> | 15 |
| 2.2- | <i>Determinação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a</i> | 16 |
| 2.3- | <i>Avaliação da atividade de enzimas e compostos do complexo antioxidativo</i> | 16 |
| 2.4- | <i>Análise de pigmentos fotossintéticos, aminoácidos, proteínas, ascorbato, dehidroascorbato, fenóis totais, prolina, malato, açúcares solúveis e amido</i> | 17 |
| 2.5- | <i>Análise estatística</i> | 20 |
| 3. | RESULTADOS | 21 |
| 3.1- | <i>Teor de Mn e Zn nas plantas 77 dias após a instalação do experimento</i> | 21 |
| 3.2- | <i>A aplicação foliar de Mn e Zn reduziu alguns dos efeitos negativos da hipóxia sobre as trocas gasosas das plantas</i> | 24 |
| 3.3- | <i>Fluorescência da clorofila a</i> | 26 |
| 3.4- | <i>Extravasamento de eletrólitos</i> | 27 |
| 3.5- | <i>Teores de clorofilas, açúcares solúveis, amido, proteínas solúveis totais e aminoácidos totais</i> | 28 |
| 3.6- | <i>Avaliação da atividade de enzimas e compostos do complexo antioxidativo</i> | 36 |
| 3.7- | <i>Produção de matéria seca dos componentes das plantas</i> | 38 |
| 4. | DISCUSSÃO | 43 |
| 4.1- | <i>Teor de nutriente na planta</i> | 43 |
| 4.2- | <i>Crescimento da planta, taxa fotossintética, condutância estomática e carboidratos</i> | 44 |
| 4.3- | <i>Fluorescência da clorofila a</i> | 45 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.4- | <i>Teores de clorofilas, carotenoides, aminoácidos totais, proteínas solúveis totais, ascorbato, dehidroascorbato, prolina e malato</i> | 46 |
| 4.5- | <i>Avaliação da atividade de enzimas e compostos do complexo antioxidativo</i> | 47 |
| 4.6- | <i>Extravasamento de eletrólitos</i> | 48 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |
| | MATERIAL SUPLEMENTAR | 56 |

1. INTRODUÇÃO

As florestas plantadas no Brasil ocupam cerca de 9,98 milhões de hectares. Estas florestas, em sua maioria formadas por plantios de eucalipto (76 %), são as mais produtivas do mundo (IBGE, 2020; IBÁ, 2019).

Perdas expressivas de produtividade causadas por elevadas precipitações e restrita drenagem do solo, associadas à redução da disponibilidade de oxigênio no solo, têm ocorrido em florestas plantadas de eucalipto no Brasil em importantes regiões produtoras (ALMEIDA; RIBEIRO; FERNANDO LEITE, 2013; COSTA et al., 2009; MASCHIO; ANDRADE; AUER, 2000).

Sob hipóxia, plantas de eucalipto sensíveis a esse tipo de estresse podem sofrer fortes alterações fisiológicas e anatômicas. Entre outros problemas, plantas sensíveis à hipóxia podem apresentar: necrose foliar; seca de ponteiros nos galhos e haste principal; brotações adventícias no fuste e nos galhos; estreitamento do limbo foliar, do lenho e das raízes e intumescimentos nas regiões basais do caule (FERREIRA, 1989 citado por Maschio et al., 2000; TORRES; MONTEIRO; SOUZA, 2013). Outros efeitos comumente observados em diferentes espécies de plantas são: clorose nos tecidos foliares e murchamento prematuro de folhas produtividade (REHEM et al., 2009; ZHANG et al., 2000)

O adequado suprimento dos nutrientes pode melhorar a tolerância de algumas espécies de plantas à hipóxia. São reportados na literatura, por exemplo, efeitos positivos da aplicação de nutrientes como o cálcio, fosforo e nitrogênio, bem como nutrientes benéficos, como o silício, na redução dos efeitos da hipóxia em diferentes espécies de plantas (GAO et al., 2011; HE et al., 2012; IQBAL et al., 2021; LANZA; ROSSI; SODEK, 2013; SANTOS, 2014; TOPA; CHEESEMAN, 1992; TORRACA, 2020).

O Zinco (Zn) e o Manganês (Mn) têm papéis importantes para a redução de estresses abióticos (FAIZAN et al., 2021; LI et al., 2012; TAVANTI et al., 2021; YE et al., 2019). Esses nutrientes são importantes cofatores de enzimas (ex.:superóxido dismutase, malato desidrogenase, álcool desidrogenase, nitrato redutase, catalase e peroxidases), que atuam na redução dos danos causados pelo estresse oxidativo (BROADLEY et al., 2007; BURNELL, 1988). São também necessários para síntese proteica, de reguladores de crescimento, dentre outras funções importantes do

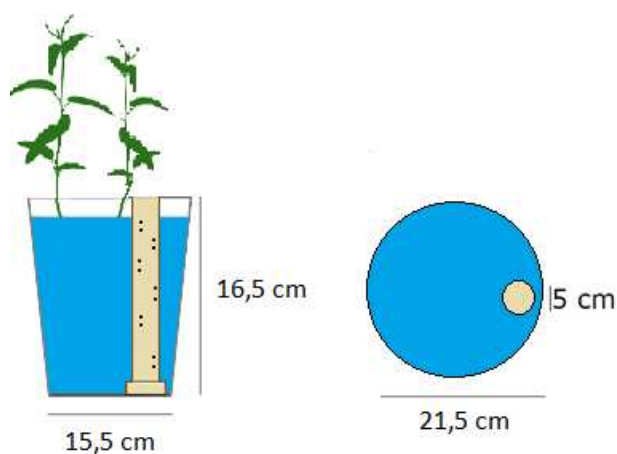
metabolismo vegetal (BROADLEY et al., 2012; WU et al., 2015), que são alteradas direta e indiretamente em plantas sob hipóxia. No entanto, embora deficiências de Mn e Zn sejam relativamente frequentes em florestas de eucalipto no Brasil (inclusive em áreas sujeitas à hipóxia), ainda são escassos estudos que relacionem o suprimento desses nutrientes com a mitigação dos efeitos deletérios da hipóxia.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de compreender e avaliar o efeito da aplicação foliar de Zn e Mn na mitigação dos efeitos da hipóxia em plantas de eucalipto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de 14 de abril a 6 de julho de 2021 na Universidade Federal de Viçosa (coordenadas geográficas: latitude - 20.75828063261015 e longitude 42.8701021576351950), em casa de vegetação, com plantas de *Eucalyptus* (clone I144 – *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus Urophylla*) em delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições. Os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial (2^3) com dois níveis de disponibilidade de oxigênio (com hipóxia e aeração normal) com e sem a aplicação foliar de Zn (0,1 g/L) e Mn (0,5 g/L). Após a submissão das plantas à hipóxia, foi realizada aplicação foliar de Mn e Zn (Sulfato de Mn e/ou Sulfato de Zn). A unidade experimental consistiu em um vaso preenchido com aproximadamente 3 L de areia, contendo 2 plantas de eucalipto (clone AEC I144) e cinco repetições. Os vasos foram cobertos com isopor e papel alumínio para evitar a entrada de luz. Para a aferição da oxigenação da solução nutritiva foi inserido um tubo de PVC com perfurações laterais, em cada uma das unidades experimentais, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1. Esquema ilustrativo da unidade experimental contendo duas plantas de eucalipto e um tubo de acesso perfurado para aferição da concentração de O_2 na solução de cultivo



As plantas foram cultivadas em vasos preenchidos com areia lavada, esterilizada e umedecida com solução nutritiva de Clark modificada por LOCATELLI et al., (1984) e com adaptações realizadas também no presente trabalho (Tabela 1).

Previamente à aplicação dos tratamentos, as plantas foram aclimatadas por 67 dias. Nos primeiros 37 dias do período de aclimação, foi realizada a aplicação de todos os nutrientes (tabela 1). Nos últimos 30 dias do período de aclimação, as plantas não receberam aplicações de Mn e Zn, via solução nutritiva.

Tabela 1. Solução nutritiva utilizada no trabalho*

| Reagentes | Concentração |
|------------------------------------|--------------|
| (mMol.L ⁻¹) | |
| Mg (NO ₃) ₂ | 0,6 |
| KNO ₃ | 0,53 |
| Ca (NO ₃) ₂ | 0,5975 |
| NH ₄ Cl | 2,925 |
| CaCl ₂ | 0,7025 |
| K ₂ SO ₄ | 0,3 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,138 |
| (μMol.L ⁻¹) | |
| Fe-EDTA | 40 |
| MnCl ₂ | 7 |
| H ₃ BO ₃ | 19 |
| ZnSO ₄ | 2 |
| CuSO ₄ | 0,5 |
| NH ₄ MoO ₄ | 0,086 |

*Fonte: Solução de Clark modificada por LOCATELLI et al., (1984); LOCATELLI et al., (1984) com adaptações. As fontes de Mn e Zn foram aplicadas apenas durante a fase de aclimação das mudas e retiradas 30 dias antes da aplicação dos tratamentos.

Nos tratamentos submetidos à hipóxia, a concentração de O₂ foi mantida em valores inferiores a 4 mg L⁻¹ de solução. Para tanto, o substrato foi mantido saturado e os níveis de oxigenação da solução foram determinados diariamente utilizando oxímetro microprocessado (marca Alfakit®, modelo AT -160). Nos tratamentos sem hipóxia, os vasos foram mantidos não saturados.

Foram realizadas amostragens de folhas para avaliação do extravasamento de eletrólitos (86 dias após imposição dos tratamentos). Para a análise, doze discos

foliares foram retirados da quarta ou quinta folha de ramos presentes, no terço médio da planta, em cada uma das unidades experimentais utilizando perfurador de cobre ($\varnothing = 8$ mm). Os discos coletados foram então imersos em 20 mL de água deionizada e mantidos por 12 horas à temperatura de 25 °C. Em seguida, quantificou-se a condutividade inicial do meio (X_i), utilizando um condutímetro (Orion, model 115) e as placas foram transferidas para estufa de secagem onde foram mantidas por 2 horas a uma temperatura de 90 °C. Após seu resfriamento, foi aferida a condutividade elétrica do meio (condutividade final - X_f). O extravasamento de eletrólitos foi calculado pela seguinte fórmula: EE %: $[(X_i/X_f) \times 100]$ (CAMPOS; PHAM THI, 1997).

Após 77 dias do período de imposição da hipóxia, foi realizada a coleta de amostras de folha para avaliação da atividade de enzimas (superóxido dismutase (SOD), catalase, peroxidases (POX), ascorbato peroxidase), concentração de pigmentos, aminoácidos, prolina, fenóis totais, açúcares solúveis, amido e glicose. Para tanto, amostras de folha totalmente expandidas foram coletadas no intervalo entre 11:00 e 12:00h, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

Ao fim do período de hipóxia (77 dias após a aplicação dos tratamentos), a parte aérea de uma das plantas de cada parcela foi cortada em região próxima ao substrato. Em seguida, a parte aérea das plantas foi dividida em três componentes (folhas, caule e ramos). Todo o material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar (60 °C) até atingir massa constante, para determinação da massa seca de cada componente. Após a coleta, os vasos foram drenados. As plantas restantes foram mantidas nos vasos sob aeração normal, por 69 dias, quando foram cortadas e avaliadas a massa seca do material vegetal foi determinada.

2.1- Determinação de teores de nutrientes nas plantas

Após a secagem, o material vegetal foi triturado em moinho tipo Willey e digerido em solução nitroperclórica (4:1, v:v), na relação 1:10 (material vegetal: solução extratora). Em seguida, os teores de Zn e Mn foram determinados por espectroscopia de emissão atômica (Agilent Technologies 200 Series AA e modelo 240FS AA, USA) (JACKSON, 1956).

2.2- Determinação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Durante a condução do experimento foram determinadas avaliações das taxas de assimilação líquida de carbono (A_n), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i) e variáveis de fluorescência da clorofila a. As análises foram realizadas por meio de analisador de gás a infravermelho (IRGA, LI-COR Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA) com fluorômetro acoplado (LI-COR Inc LI-6400-40, Lincoln, EUA).

Foram utilizadas a terceira ou quarta folha completamente expandida a partir do ápice do ramo central das plantas. As avaliações de A_n , g_s , e C_i foram realizadas entre 7:00 e 12:00h (horário local) sob luz saturante artificial ($1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para a quantificação foi utilizado intensidade luminosa artificial de $1400 \mu\text{mol}$ de fótons e concentração de CO_2 em torno de 400 ppm com umidade entre 40 e 70 %. A atmosfera referencial foi captada e direcionada para um recipiente homogeneizador (buffer) antes de alcançar a câmara foliar (CAVATTE et al., 2012).

A avaliação de variáveis da fluorescência da clorofila a foi realizada após as 19:00h (horário local) sob completa escuridão utilizando a metodologia descrita por DA MATTA et al, (1997).

2.3- Avaliação da atividade de enzimas e compostos do complexo antioxidativo

Para a quantificação da atividade das enzimas antioxidativas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX), foi preparado extrato enzimático (extrato enzimático bruto) a partir de 5 mg de tecido foliar liofilizado e macerado em moinho de bolas por 4 minutos à 27 Hz. Em seguida, 50 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) e 450 μL da solução tampão de extração contendo 0,1 M fosfato de potássio a pH= 6,8, 0,1 mM de EDTA de sódio e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonil foram adicionados ao material, que foi centrifugado por 15 min, a 15000 g (4 °C). O sobrenadante obtido foi utilizado para a análise da atividade enzimática (procedimento adaptado de GIANNOPOLITIS; RIES, 1977; HAVIR; MCHALE, 1987; KWAK et al., 1996; PEIXOTO et al., 1999) e proteínas totais (BRADFORD, 1976).

A atividade da SOD foi determinada por meio da reação de 10 μL de extrato enzimático bruto acrescido de 200 μL do tampão (fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo EDTA 0,1 mM e metionina 19,5 mM), 60 μL de riboflavina 10 μM e 30 μL de azul de p-nitro tetrazólio (NBT). A reação foi conduzida em leitor de microplaca de ELISA em uma câmara de reação iluminada com luz fluorescente de 15 watts por 10 minutos. Para o branco, outra placa contendo o mesmo material foi mantida no escuro pelo mesmo período. Ao fim do período de exposição à luz, a atividade da SOD foi determinada a partir da quantificação de formazana azul, formada pela inibição da redução do NBT. A absorbância do extrato foi quantificada em leitor de microplacas ELISA a 560 nm. Definiu-se uma unidade (1U) de SOD como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % da fotorredução do NBT (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

A atividade da CAT foi determinada por meio da reação de 5 μL de extrato enzimático bruto acrescido de 295 μL de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo H_2O_2 20 mM. A atividade da CAT foi determinada por meio do consumo de H_2O_2 determinado pelo decréscimo da absorbância a 240 nm em leitor de ELISA (Multiskan Go Thermo Scientific) com 1 min de incubação a 30 °C e realizando 70 leituras em intervalos de 8 segundos (HAVIR; MCHALE, 1987).

A quantificação da atividade POX foi realizada por meio da reação de 5 μL do extrato enzimático bruto acrescido 195 μL de fosfato de potássio 25 mM, pH = 6,8, contendo 20mM de H_2O_2 e 5 μL de pirogalol 20 mM. A determinação foi realizada com o auxílio do leitor microplacas ELISA no comprimento de onda de 470 nm de absorvancia, por 1 min de incubação a 25 °C, 70 leituras a intervalo de 8s. A atividade foi calculada baseada na extinção do coeficiente molar de 2,47 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e expresso em μmol de purpurogallina min^{-1}mg proteína $^{-1}$ (KWAK et al., 1996).

2.4- Análise de pigmentos fotossintéticos, aminoácidos, proteínas, ascorbato, dehidroascorbato, fenóis totais, prolina, malato, açúcares solúveis e amido

Para realização da extração metanólica, adicionou-se em 10 mg de tecido foliar liofilizado e 700 μL de metanol 100 %. Em seguida, foi realizada a agitação em vórtex do material. Posteriormente, as amostras foram levadas ao Thermomixer

Confort (Eppendorf®) por 20 minutos a 80 °C e 750 rpm. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 4 °C e 13300 rpm. O material sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo eppendorf (2 mL), para quantificação de clorofilas e carotenoides. Ao restante do sobrenadante adicionou-se 375 µL de clorofórmio (100 %) e em seguida agitou-se em vórtex e acrescentou-se 750 µL de H₂O antes de realizar nova agitação em vortex. Posteriormente, o material obtido foi centrifugado por 10 minutos a 4 °C e 13300 rpm. A fase superior (transparente) foi recolhida e transferida para outro eppendorf, que foi armazenado a -20 °C para quantificação de glicose, frutose, sacarose, aminoácidos totais, prolina e malato. Ao final, o pellet foi lavado com etanol 70 % para posteriores quantificações de proteínas solúveis totais e amido.

A determinação dos teores de clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides, foi realizada em leitor de microplacas de ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan™), conforme descrito por (WELLBURN, 1994), utilizando-se uma alíquota de 100 µL de extrato metanólico

Os aminoácidos totais foram determinados como descrito por YEMM; COCKING; RICKETTS, (1955). Para tanto, foi preparado um mix contendo 50 µL de extrato metanólico, 50 µL de tampão citrato de sódio 1 M (pH 5,2) com 0,2 % de ácido ascórbico e 100 µL de nihidrina 1 % em etanol 70 %. O material foi vedado em placa com fita alumínica termorresistente e levado ao termomixer por 20 minutos a 95 °C. A reação foi quantificada em leitor de microplacas ELISA a 570 nm e a absorbância comparada à curva padrão de leucina (1 mM).

A determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais foi realizada conforme descrito por BRADFORD, (1976). Para tanto foi utilizado o pellet remanescente do tubo após lavagem com metanol 400 µL de NaOH 0,1 M. O material foi homogeneizado por meio de um vórtex e incubado por uma hora a 95 °C sob agitação de 750 rpm. Os tubos foram centrifugados a 13500 rpm por 5 min e 4 °C. Posteriormente, coletou-se uma alíquota de 5 µL do sobrenadante e adicionou-se a uma microplaca contendo 250 µL de reagente Bradford. A determinação do teor de proteína foi realizada em leitor de microplacas ELISA no comprimento de onda de 595 nm e por meio de uma curva de calibração contendo albumina de soro bovino (BSA), como padrão.

A quantificação dos teores de ascorbato (ASA) e dehidroascorbato (DHA), foi realizada conforme descrito por ARAKAWA et al, (1981). Para tanto 10 mg de material liofilizado foram adicionados a 400 µL de tampão de extração gelado (HCl 100 mM + EDTA 1 mM). Posteriormente o material foi agitado em vortex e centrifugado por 5 minutos a 12.000 G e 4 °C. Para a montagem da placa, em 10 µL do material obtido (padrão) foi adicionado 10 µL de DTT 10 mM em tampão fosfato de Na 400 mM, pH 7,4 e também foi adicionado 10 µL de tampão fosfato de Na 400 mM, pH 7,4. A placa foi vedada e levada ao termomixer a 42 °C por 20 minutos. Uma segunda placa foi montada com 10 µL de extrato padrão, 10 µL de H₂O, 20 µL tampão fosfato de Na 400 mM, pH 7,4 e 80 µL de reagente de cor (A:TCA 0,6 %, H₃PO₄, 15,3 % e FeCl₃ 0,6 % e B: 2,2-dipyridyl 4 % em etanol 70 %). A placa foi vedada e levada ao termomixer a 42 °C por 45 minutos. A quantificação foi realizada em leitor de microplacas ELISA a 520 nm.

A atividade da prolina foi determinada como descrito por CARILLO; GIBON, (2011). Para tanto, adicionou-se em 50 µL de extrato metanólico 100 µL de nihidrina 1 % contendo etanol 20 % e ácido acético 60 %. O material foi vedado em placa com plástico de vedação de placas para RT-PCR e levado ao termomixer por 20 minutos a 95 °C. A reação foi quantificada por leitor de microplacas ELISA no comprimento de onda de 520 nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas à curva padrão de prolina (1 mM).

O malato foi determinado de acordo com a metodologia de NUNES-NESI et al, (2007). Para tanto, adicionou-se a uma alíquota de 50 µL de extrato metanólico, 25 µL de tampão Tricina (KOH 0,4 M + MgCl₃ 20 mM) a pH = 9, 10 µL de MTT (methylthiazoyldiphenyl-tetrazolium bromide) 10 mM, 5 µL de NAD⁺ 60 mM, 2 µL de PES (Phenazine ethosulfate) 20 mM, 5 µL de Triton 10 % e 3 µL de H₂O. A reação foi quantificada em leitor de microplacas ELISA no comprimento de onda de 570 nm.

As concentrações de glicose, frutose e sacarose foram determinadas seguindo a metodologia de FERNIE et al, (2001). Para tanto, foi adicionada a uma alíquota de 50 µL de extrato metanólico, 160 µL de tampão quantificado (150 µL de tampão Hepes/KOH 0,1 M, 3 mM MgCl₂ pH 7,0, 4,65 µL de ATP 109 mM (60 mg/mL) 4,65 µL de NADP⁺ 48,4 mM (36 mg/mL) 0,77 µL de Glicose-6P desidrogenase (G6-PDH) (700 U/mL)). A determinação foi realizada com leitor de microplacas Elisa e determinada no comprimento de onda de 340 nm até estabilização da densidade

optica (OD). Posteriormente, foram adicionados 1,5 U de Hexocinase (HK: 1,5 U/5 μ L), 0,7 U de phosphoglucose isomerase (PGI: 0,7 U/5 μ L), 5 U de Invertase (5 U/5 μ L). As determinações foram realizadas em intervalos de 40 minutos entre aplicações e 1 minuto de intervalo entre cada leitura.

O amido foi determinado seguindo protocolo proposto FERNIE et al, (2001). Para tanto foram adicionados em 40 μ L de extrato, 60 μ L de mix (59 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,9; 1 μ L de amiloglicosidase (170 U/mL); 0,012 μ L α -amilase (325 U/mL)). As amostras foram incubadas em pernoite 37° C. Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 50 μ L do extrato obtido e adicionou-se 160 μ L de mix (150 μ L de tampão Hepes/KOH 1 M + 30 mM MgCl₂, pH 7,0 + 4,65 μ L de ATP 109 mM (60 mg/mL) 4,65 μ L de NADP⁺ 48,4 mM (36 mg/mL) e 0,77 μ L de Glicose-6P desidrogenase (G6-PDH) (700 U/mL). Realizou-se uma primeira medição da reação em leitor de microplacas ELISA no comprimento de onda de 340 nm, até estabilização da densidade ótica (OD), e após, foi adicionado hexocinase (2 U/5 μ L reação). Em seguida, a reação foi novamente quantificada por 60 minutos em intervalos de 1 minuto entre as leituras. A concentração do amido foi determinada a partir da quantidade de glicose considerando-se a lei de Lambert-Beer:

2.5- Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($P < 0,1$). Para a avaliação das premissas de normalidade dos resíduos e aditividade foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (versão 4.1.1) (RSTUDIO TEAM, 2021).

3. RESULTADOS

3.1- Teor de Mn e Zn nas plantas 77 dias após a instalação do experimento

Houve aumento dos teores de Mn e redução dos teores de Zn nos tecidos das plantas conduzidas sob hipóxia (tabela 2 e 3 respectivamente). Em média, nesses tratamentos, os teores de Mn aumentaram 59,0 % nas folhas e 58,2 % nos componentes lenhosos da parte aérea das plantas (caule + ramos). Para os mesmos tratamentos, os teores de Zn reduziram 20,2 % nas folhas e 26,2 % nos tecidos de caule e ramos.

A aplicação foliar de Mn teve efeito positivo no teor desse micronutriente nos tecidos das folhas das plantas (aumento médio de 52,5 %) e não afetou sua concentração nos tecidos do caule e ramos.

Tabela 2. Teores médios de Mn nas folhas e caule + ramos de plantas de eucalipto 77 dias após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e com aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

| <i>Tratamento</i> | | <i>Folha - Mn</i> | | <i>Caule + Ramo - Mn</i> | |
|---|------------------------------------|---------------------------------|----------|--------------------------|---------|
| | | ----- mg kg ⁻¹ ----- | | | |
| <i>S/ Hipóxia</i> | | | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 408,94 | (100,43) | 202,55 | (51,81) |
| | <i>C/ Zn</i> | 470,89 | (139,24) | 205,43 | (40,24) |
| | <i>Média</i> | 439,92 | (119,02) | 203,99 | (43,76) |
| <i>C/ Mn</i> | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 623,72 | (124,85) | 195,25 | (46,33) |
| | <i>C/ Zn</i> | 705,94 | (312,70) | 344,34 | (69,43) |
| | <i>Média</i> | 664,83 | (228,61) | 195,16 | (55,65) |
| | <i>Média Geral</i> | 552,37 | (211,61) | 199,58 | (48,93) |
| <i>C/ Hipóxia</i> | | | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 673,62 | (132,50) | 291,23 | (79,55) |
| | <i>C/ Zn</i> | 784,30 | (256,98) | 301,29 | (83,32) |
| | <i>Média</i> | 735,11 | (207,38) | 296,26 | (76,98) |
| <i>C/ Mn</i> | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 792,51 | (57,20) | 331,49 | (61,34) |
| | <i>C/ Zn</i> | 1222,2 | (417,46) | 344,34 | (48,28) |
| | <i>Média</i> | 1007,3 | (360,83) | 337,20 | (52,93) |
| | <i>Média Geral</i> | 878,39 | (322,05) | 315,66 | (68,18) |
| <i>Resultados da Análise de Variância</i> | | | | | |
| | <i>hipoxia</i> | ** | | ** | |
| | <i>adub Zn</i> | * | | ns | |
| | <i>adub Mn</i> | ** | | ns | |
| | <i>hipoxia x adub Zn</i> | ns | | ns | |
| | <i>hipoxia x adub Mn</i> | ns | | ns | |
| | <i>adub Zn x adub Mn</i> | ns | | ns | |
| | <i>hipoxia x adub Zn x adub Mn</i> | ns | | ns | |
| | <i>CV (%)</i> | 34,96 | | 25,18 | |

**, ** e * indicam efeitos significativos (P < 0,01, P < 0,05 e P < 0,1, respectivamente); ns indicam efeitos não significativos. CV - Coeficiente de variação. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média de cada tratamento.

Nos tratamentos com aplicação foliar de Zn, o teor desse nutriente aumentou, em média, 62,3 % e 30,5 % nos tecidos das folhas e caules + ramos respectivamente. É válido destacar ainda que os maiores incrementos nos teores foliares de Zn em resposta à sua aplicação foliar foram observados nos tratamentos com hipóxia.

Tabela 3. Teores médios de Zn nas folhas e caule + ramos de plantas de eucalipto 77 dias após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e com aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

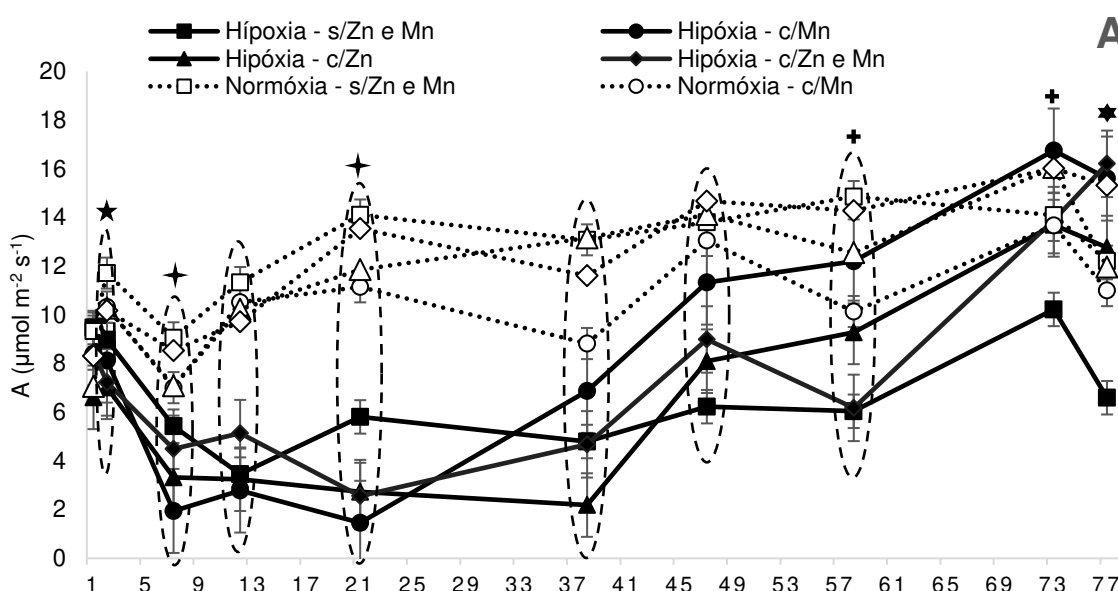
| <i>Tratamento</i> | | <i>Folha - Zn</i> | | <i>Caule + Ramo - Zn</i> | |
|---|--------------|---------------------------------|--------|--------------------------|--------|
| | | ----- mg kg ⁻¹ ----- | | | |
| <i>S/ Hipóxia</i> | | | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 14,61 | (1,95) | 9,65 | (0,54) |
| | <i>C/ Zn</i> | 18,86 | (4,34) | 10,14 | (1,60) |
| | <i>Média</i> | 16,74 | (3,88) | 9,92 | (1,21) |
| <i>C/ Mn</i> | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 17,24 | (4,76) | 9,05 | (1,77) |
| | <i>C/ Zn</i> | 23,13 | (5,57) | 10,80 | (1,00) |
| | <i>Média</i> | 20,19 | (5,79) | 9,93 | (1,64) |
| <i>Média Geral</i> | | 18,46 | (5,11) | 9,92 | (1,41) |
| <i>C/ Hipóxia</i> | | | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 9,57 | (2,04) | 5,74 | (1,48) |
| | <i>C/ Zn</i> | 15,53 | (4,36) | 7,49 | (1,58) |
| | <i>Média</i> | 12,88 | (4,58) | 6,61 | (1,72) |
| <i>C/ Mn</i> | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 11,71 | (3,63) | 7,68 | (1,64) |
| | <i>C/ Zn</i> | 21,13 | (5,69) | 8,66 | (1,53) |
| | <i>Média</i> | 16,42 | (6,70) | 8,11 | (1,58) |
| <i>Média Geral</i> | | 14,74 | (5,92) | 7,32 | (1,78) |
| <i>Resultados da Análise de Variância</i> | | | | | |
| <i>hipoxia</i> | | ** | | ** | |
| <i>adub Zn</i> | | ** | | ** | |
| <i>adub Mn</i> | | ** | | * | |
| <i>hipoxia x adub Zn</i> | | ns | | ns | |
| <i>hipoxia x adub Mn</i> | | ** | | ns | |
| <i>adub Zn x adub Mn</i> | | ns | | ns | |
| <i>hipoxia x adub Zn x adub Mn</i> | | ns | | ns | |
| <i>CV (%)</i> | | 27 | | 17,1 | |

*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente); ns indicam efeitos não significativos. CV - Coeficiente de variação. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média de cada tratamento. O desdobramento dos efeitos das interações significativas é apresentado no material suplementar.

3.2- A aplicação foliar de Mn e Zn reduziu alguns dos efeitos negativos da hipóxia sobre as trocas gasosas das plantas

Dois dias após aplicação dos tratamentos, houve forte redução da taxa fotossintética (A_n) nas plantas submetidas à hipóxia (Figura 2). Tratamentos que receberam aplicação de Zn e Mn apresentaram redução da taxa fotossintética. No entanto, após 43 dias, tratamentos que receberam Mn passaram a apresentar maior taxa fotossintética comparativamente aos demais. As taxas fotossintéticas das plantas que receberam Zn também aumentaram 47 dias após a aplicação dos tratamentos.

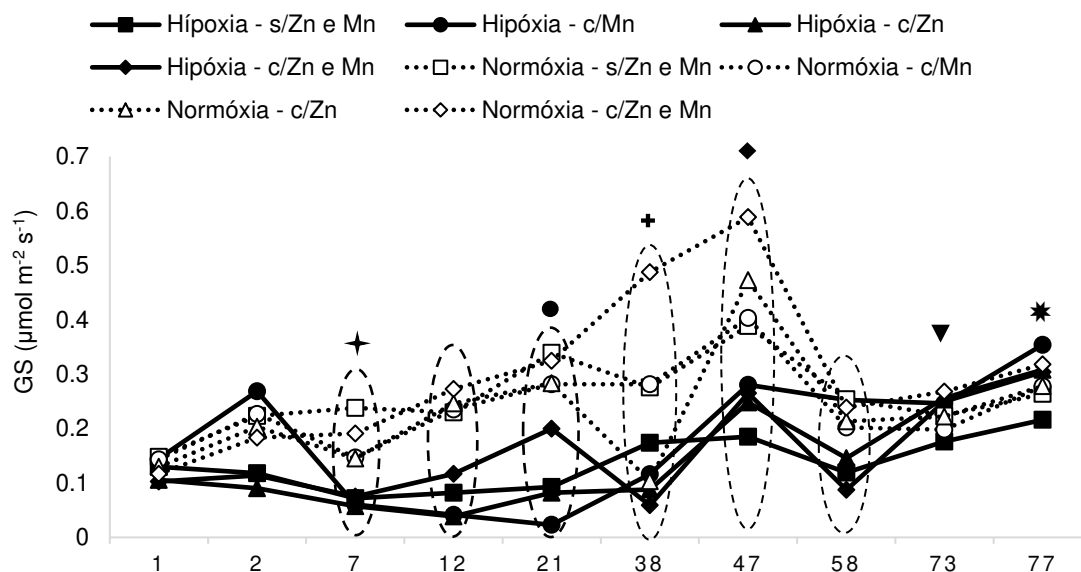
Figura 2. Taxa fotossintética em mudas de eucalipto 77 dias após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)



Os pontos circulados no gráfico indicam efeito significativo para hipóxia ($P < 0,01$). Os símbolos indicam efeito significativo para as variáveis assinaladas em parêntesis de acordo com o teste F. ★: Zn ($P < 0,1$), ◆: adub Zn x adub Mn ($P < 0,1$), +: Hipóxia*Mn ($P < 0,1$), *:adub Zn, adub Mn, hipóxia*adub Mn, hipóxia*adub Zn*adub Mn ($P < 0,01$). O desdobramento dos efeitos das interações significativas é apresentado no material suplementar.

Foi constatada queda da condutância estomática das plantas após 7 dias da hipóxia (Figura 3) e detectados aumentos dos valores de condutância estomática dos tratamentos com Mn 43 dias após a aplicação dos tratamentos.

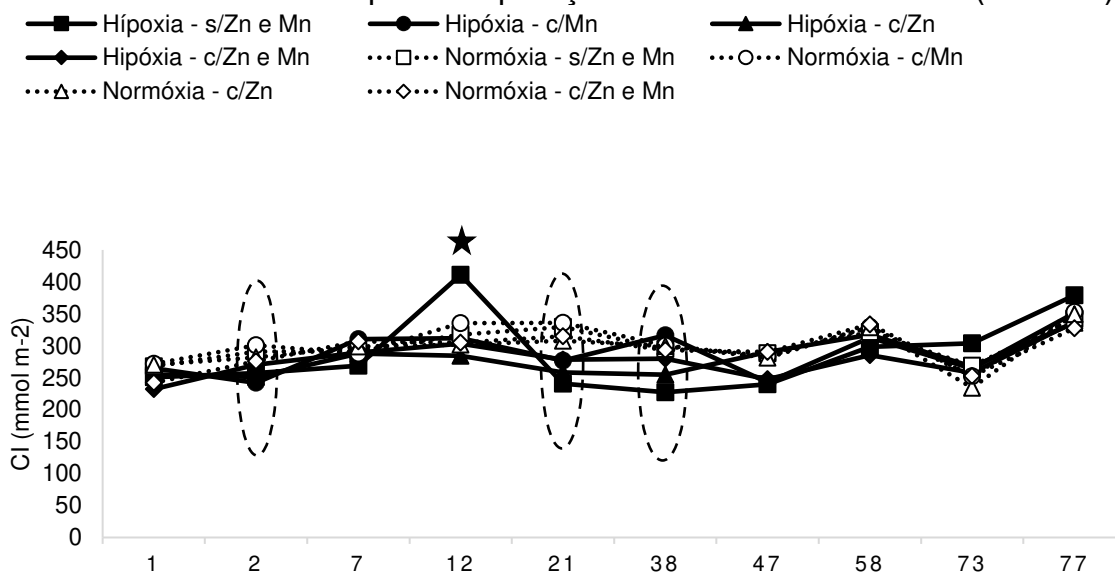
Figura 3. Condutância estomática de mudas de eucalipto 77 dias após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxica e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)



Os pontos circulados no gráfico indicam efeito significativo para hipóxica ($P < 0,01$). Os símbolos indicam o efeito significativo assinalados em parênteses de acordo com o teste F. ◆: adub Zn x adub Mn ($P < 0,1$), +: Hipóxica*Mn ($P < 0,1$), ● (Mn; hipoxia*adub Mn), ◆: adub Mn; adub Zn*adub Mn ($P < 0,1$), ▼: hipoxia*adub Zn*adub Mn ($P < 0,01$), *: hipoxia*adub Mn, adub Zn*adub Mn ($P < 0,05$). O desdobramento dos efeitos das interações significativas é apresentado no material suplementar.

Houve queda da concentração de carbono interno (Ci) aos 2 e 26 dias após a aplicação dos tratamentos com hipóxica (Figura 4). Adicionalmente, 12 dias após a aplicação dos tratamentos, foi observado efeito negativo da aplicação de Zn nos valores de Ci.

Figura 4. Carbono interno em mudas de eucalipto 77 dias após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)



Os pontos circulados no gráfico indicam efeito significativo para hipóxia ($P < 0,1$). Os pontos estrelados no gráfico indicam efeito significativo para Zn ($P < 0,1$). Os símbolos indicam o efeito significativo assinalados em parênteses de acordo com o teste F. ★: Zn ($P < 0,1$).

3.3- Fluorescência da clorofila a

Após 21 dias de indução a hipóxia, foram quantificados os valores de fluorescência inicial (F_o), fluorescência máxima (F_m), Eficiência Fotoquímica (F_v/F_m) e razão (F_v/F_o), sem efeito dos tratamentos para as variáveis F_o , F_v/F_m e F_v/F_o (Tabela 4). Houve redução apenas dos valores de F_m (2,9 %) em plantas submetidas à hipóxia.

Tabela 4. Fluorescência basal (Fo); fluorescência máxima (Fm); eficiência quântica potencial do PS II (Fv/Fm) e razão Fv/Fo em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipoxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

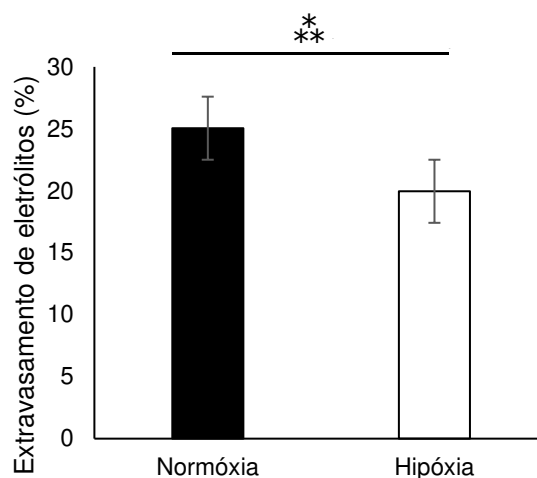
| Tratamento | Fo | | Fm | | Fv/Fm | | Fv/Fo | | |
|---|--------|----------|---------|----------|--------|--------|-------|--------|--|
| <i>S/ Hipoxia</i> | | | | | | | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | | | | | | |
| <i>S/ Zn</i> | 639,90 | (97,02) | 3174,26 | (154,19) | 0,80 | (0,02) | 4,03 | (0,55) | |
| <i>C/ Zn</i> | 602,01 | (82,97) | 3101,99 | (180,73) | 0,81 | (0,02) | 4,20 | (0,45) | |
| <i>Média</i> | 623,06 | (87,68) | 3142,14 | (159,96) | 0,80 | (0,02) | 4,10 | (0,49) | |
| <i>C/ Mn</i> | | | | | | | | | |
| <i>S/ Zn</i> | 659,38 | (71,96) | 3227,90 | (154,22) | 0,80 | (0,02) | 3,93 | (0,42) | |
| <i>C/ Zn</i> | 641,56 | (93,47) | 3146,70 | (165,80) | 0,80 | (0,02) | 3,97 | (0,58) | |
| <i>Média</i> | 650,47 | (79,20) | 3187,30 | (156,90) | 0,80 | (0,02) | 3,95 | (0,48) | |
| <i>Média Geral</i> | 637,49 | (82,16) | 3165,91 | (155,62) | 0,80 | (0,02) | 4,02 | (0,48) | |
| <i>C/ Hipoxia</i> | | | | | | | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | | | | | | |
| <i>S/ Zn</i> | 669,66 | (197,26) | 3095,43 | (475,77) | 0,78 | (0,06) | 3,82 | (1,00) | |
| <i>C/ Zn</i> | 687,71 | (46,33) | 2894,34 | (417,68) | 0,76 | (0,04) | 3,24 | (0,81) | |
| <i>Média</i> | 678,68 | (79,20) | 2994,89 | (156,90) | 0,77 | (0,02) | 3,53 | (0,48) | |
| <i>C/ Mn</i> | | | | | | | | | |
| <i>S/ Zn</i> | 637,59 | (64,55) | 3284,52 | (185,11) | 0,81 | (0,01) | 4,18 | (0,39) | |
| <i>C/ Zn</i> | 632,75 | (89,57) | 3016,21 | (327,98) | 0,79 | (0,04) | 3,84 | (0,79) | |
| <i>Média</i> | 635,17 | (73,65) | 3150,37 | (288,16) | 0,80 | (0,03) | 4,01 | (0,61) | |
| <i>Média Geral</i> | 656,93 | (108,42) | 3072,63 | (367,96) | 0,78 | (0,04) | 3,77 | (0,79) | |
| <i>Resultados da Análise de Variância</i> | | | | | | | | | |
| <i>hipoxia</i> | ns | | * | | ns | | ns | | |
| <i>adub Zn</i> | ns | | ns | | ns | | ns | | |
| <i>adub Mn</i> | ns | | ns | | ns | | ns | | |
| <i>hipoxia x adub Zn</i> | ns | | ns | | ns | | ns | | |
| <i>hipoxia x adub Mn</i> | ns | | ns | | ns | | ns | | |
| <i>adub Zn x adub Mn</i> | ns | | ns | | ns | | ns | | |
| <i>hipoxia x adub Zn x adub Mn</i> | ns | | ns | | ns | | ns | | |
| <i>CV (%)</i> | 21,5 | | 18,44 | | 584,04 | | 23,28 | | |

**, * e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.

3.4- Extravasamento de eletrólitos

Houve redução do extravasamento de eletrólitos nas folhas das plantas cultivadas com hipoxia (86 dias após imposição do estresse), sem efeito dos tratamentos com micronutrientes sobre essa variável (Figura 5).

Figura 5. Extravasamento de eletrólitos em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxica e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

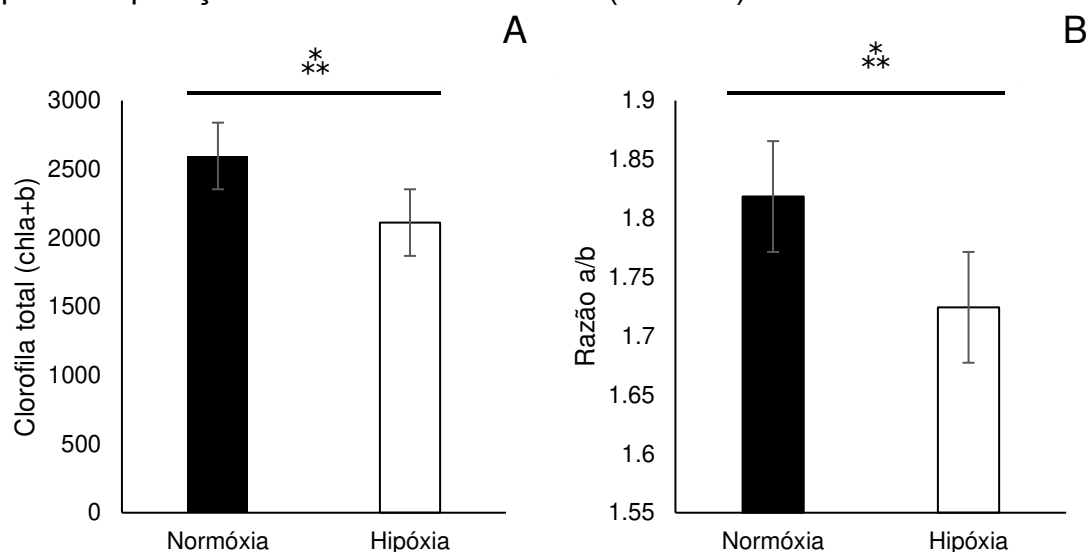


*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.

3.5- Teores de clorofilas, açúcares solúveis, amido, proteínas solúveis totais e aminoácidos totais

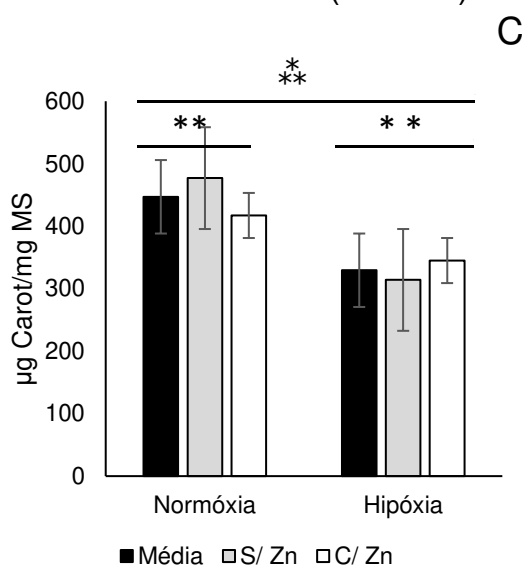
Diminuições significativas foram observadas nas clorofilas totais e na razão clorofila a/b entre as plantas submetidas à hipóxica e as que permaneceram em normóxica (Figura 6). No entanto, não houve efeito dos tratamentos com Mn e Zn sobre essas variáveis. A concentração de carotenoides reduziu na presença de hipóxica e apresentou aumento nos tratamentos com Zn (Figura 7).

Figura 6. Concentração total média de clorofila em mg/g matéria seca (A) e razão clorofila a/b (B) em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)



*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.

Figura 7. Carotenoides em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

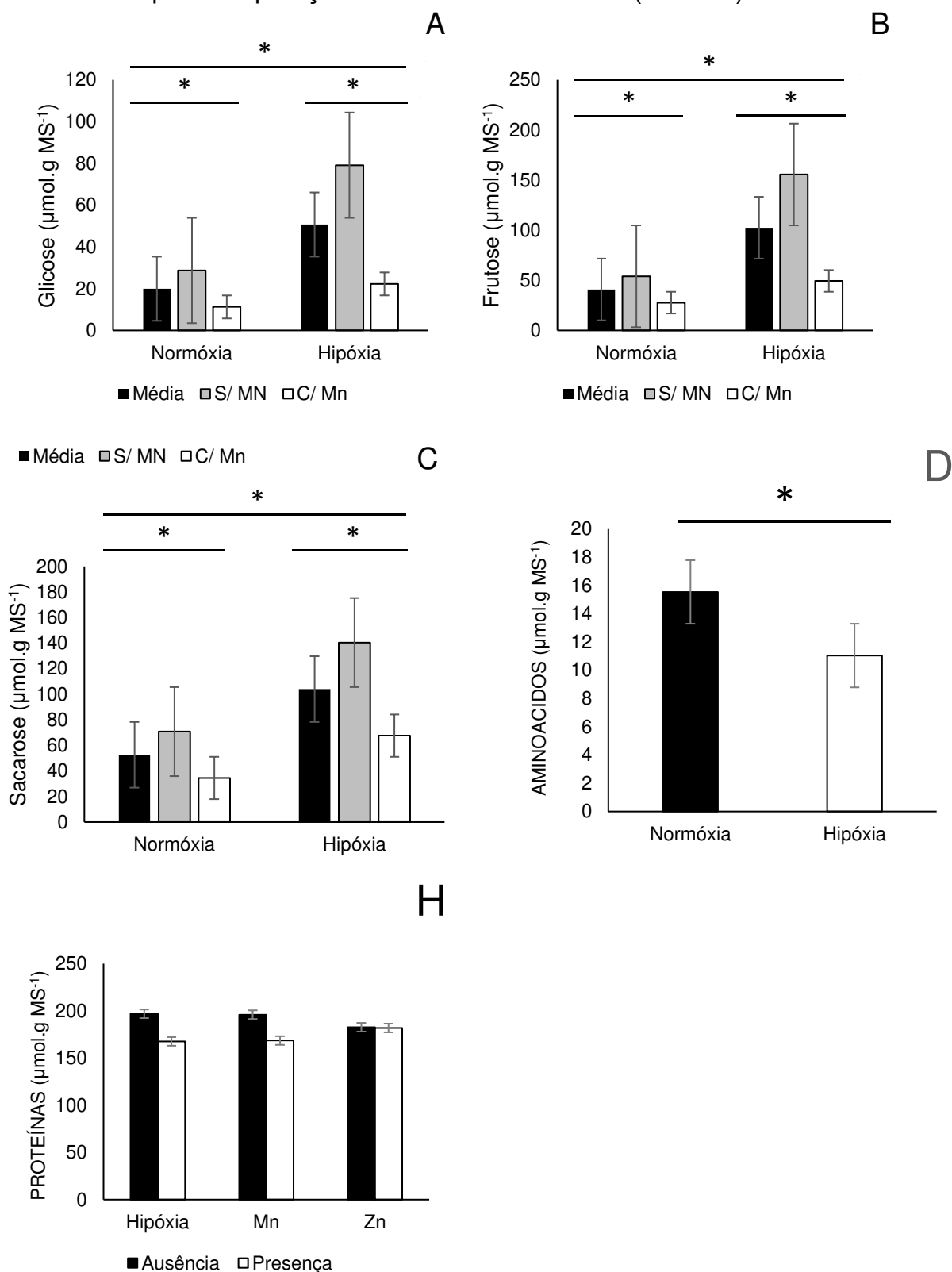


*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.

Maiores concentrações de glicose, frutose e sacarose foram observadas nos tratamentos com hipóxia. Em geral, os tratamentos que receberam a aplicação foliar de Mn apresentaram menores teores desses açúcares.

O estresse hídrico reduziu os teores de aminoácidos na planta, contudo, não houve efeito da aplicação de Zn e Mn. Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao teor total de proteínas.

Figura 8. Glicose (A), frutose (B), sacarose (C), aminoácidos solúveis totais (D) e proteínas solúveis totais (E) em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)



**, * e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.

Houve efeito da disponibilidade de oxigênio, da aplicação de Mn e Zn e da interação entre hipóxia x adubação com Zn no teor de amido das plantas (tabela 5). Houve também efeito da interação adubação com Zn x adubação com Mn sobre essa variável. As plantas submetidas à hipóxia acumularam menos amido nos tratamentos sem aplicação de micronutrientes e tiveram um elevado acúmulo desse carboidrato de reserva nos tratamentos com aplicação foliar de Mn e Zn. As plantas que receberam aplicação foliar de Mn e Zn também apresentaram maiores teores de amido nos tratamentos com hipóxia comparativamente aos tratamentos mantidos em normóxia.

Tabela 5. Teores de amido em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

| <i>Tratamento</i> | | <i>Amido</i> | |
|---|--------------|---------------------------------------|----------|
| | | ----- $\mu\text{mol.g MS}^{-1}$ ----- | |
| <i>S/ Hipóxia</i> | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 81,65 | (15,41) |
| | <i>C/ Zn</i> | 101,59 | (18,37) |
| <i>C/ Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 128,35 | (53,17) |
| | <i>C/ Zn</i> | 110,26 | (45,60) |
| <i>Média</i> | | 105,46 | (38,09) |
| <i>C/ Hipóxia</i> | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 70,82 | (19,66) |
| | <i>C/ Zn</i> | 242,25 | (100,85) |
| <i>C/ Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 165,29 | (51,39) |
| | <i>C/ Zn</i> | 252,62 | (57,62) |
| <i>Média</i> | | 182,75 | (95,24) |
| <i>Resultados da Análise de Variância</i> | | | |
| <i>Hipoxia</i> | | | * |
| <i>adub Zn</i> | | | * |
| <i>adub Mn</i> | | | ** |
| <i>hipoxia x adub Zn</i> | | | * |
| <i>hipoxia x adub Mn</i> | | | ns |
| <i>adub Zn x adub Mn</i> | | | ** |
| <i>hipoxia x adub Zn x adub Mn</i> | | | ns |
| <i>CV (%)</i> | | | 36.06 |

*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente); ns indicam efeitos não significativos. CV – Coeficiente de variação. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão da media de cada tratamento.

Os teores de prolina aumentaram em plantas submetidas à hipóxia (aumento de 38,6 %) (Tabela 6). No entanto, houve redução do teor desse metabólito nas plantas sob estresse que receberam aplicação de Mn (redução de 39,57 %).

Tabela 6. Teores de prolina em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

| Tratamento | | Prolina | |
|------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|---------|
| <i>S/ Hipóxia</i> | | ----- $\mu\text{mol.g MS}^{-1}$ --- | |
| --- | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 3,72 | (0,46) |
| | <i>C/ Zn</i> | 2,01 | (0,22) |
| | <i>Média</i> | 2,86 | (0,97) |
| <i>C/ Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 3,43 | (1,18) |
| | <i>C/ Zn</i> | 2,97 | (1,02) |
| | <i>Média</i> | 3,20 | (1,07) |
| | <i>Média Geral</i> | 3,03 | (10,68) |
| <i>C/ Hipóxia</i> | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 4,74 | (1,21) |
| | <i>C/ Zn</i> | 5,71 | (2,36) |
| | <i>Média</i> | 5,23 | (1,84) |
| <i>C/ Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 3,09 | (0,78) |
| | <i>C/ Zn</i> | 3,24 | (0,63) |
| | <i>Média</i> | 3,16 | (0,67) |
| | <i>Média Geral</i> | 4,20 | (1,71) |
| <i>hipoxia</i> | | * | |
| <i>adub Zn</i> | | ns | |
| <i>adub Mn</i> | | ** | |
| <i>hipoxia x adub Zn</i> | | ** | |
| <i>hipoxia x adub Mn</i> | | ns | |
| <i>adub Zn x adub Mn</i> | | * | |
| <i>hipoxia x adub Zn x adub Mn</i> | | ns | |
| <i>CV (%)</i> | | 31,46 | |

*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente); ns indicam efeitos não significativos. CV – Coeficiente de variação. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média de cada tratamento. O desdobramento dos efeitos das interações significativas é apresentado no material suplementar.

Nos tratamentos com hipóxia houve aumento do teor de malato (aumento de 57,5 %) nas plantas (Tabela 7). No entanto, nas plantas que receberam a aplicação de Mn e Zn houve redução do teor desse metabólito, nos tratamentos com e sem estresse (redução de 26,5 % e 41,14 % em normóxia e 18,8 % e 4,32 % em hipóxia para Mn e Zn respectivamente).

Tabela 7. Teores de malato em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

| Tratamento | | Malato | |
|------------------------------------|--------------|---------------------------------------|---------|
| | | ----- $\mu\text{mol.g MS}^{-1}$ ----- | |
| <i>S/ Hipóxia</i> | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 88,49 | (25,05) |
| | <i>C/ Zn</i> | 43,51 | (20,69) |
| | <i>Média</i> | 66,00 | (32,11) |
| <i>C/ Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 107,62 | (15,19) |
| | <i>C/ Zn</i> | 71,92 | (31,68) |
| | <i>Média</i> | 89,77 | (30,04) |
| <i>Média Geral</i> | | 77,88 | (33,96) |
| <i>C/ Hipóxia</i> | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 164,06 | (23,33) |
| | <i>C/ Zn</i> | 138,12 | (15,68) |
| | <i>Média</i> | 151,09 | (23,20) |
| <i>C/ Mn</i> | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 86,74 | (33,91) |
| | <i>C/ Zn</i> | 101,83 | (32,09) |
| | <i>Média</i> | 94,28 | (32,13) |
| <i>Média Geral</i> | | 122,69 | (39,91) |
| <i>hipoxia</i> | | * | |
| <i>adub Zn</i> | | ** | |
| <i>adub Mn</i> | | ** | |
| <i>hipoxia x adub Zn</i> | | ** | |
| <i>hipoxia x adub Mn</i> | | * | |
| <i>adub Zn x adub Mn</i> | | ns | |
| <i>hipoxia x adub Zn x adub Mn</i> | | ns | |
| <i>CV (%)</i> | | 27.04 | |

*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente); ns indicam efeitos não significativos. CV – Coeficiente de variação. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão da media de cada tratamento. O desdobramento dos efeitos da interações significativas é apresentado no material suplementar.

Não foram detectados efeitos dos tratamentos nos valores de ASA. As plantas que receberam aplicação foliar de Zn apresentaram aumento nos teores de DHA (aumento de 214 % sob hipóxia e 47,7 % em hipóxia) (Tabela 8).

Tabela 8. Teores de ascorbato, dehidro ascorbato em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

| Tratamento | ASA | | DHA | |
|---|---------------------------------------|---------|-------|--------|
| <i>S/ Hipóxia</i> | ----- $\mu\text{mol.g MS}^{-1}$ ----- | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | |
| <i>S/ Zn</i> | 96,09 | (6,30) | 6,49 | (3,46) |
| <i>C/ Zn</i> | 69,63 | (9,55) | 20,39 | (1,72) |
| <i>Média</i> | 82,86 | (15,90) | 13,44 | (7,76) |
| <i>C/ Mn</i> | | | | |
| <i>S/ Zn</i> | 75,45 | (17,97) | 13,20 | (4,34) |
| <i>C/ Zn</i> | 78,41 | (9,24) | 16,23 | (6,50) |
| <i>Média</i> | 76,93 | (13,56) | 14,72 | (5,31) |
| <i>Média Geral</i> | 79,89 | (14,70) | 14,08 | (3,88) |
| <i>C/ Hipóxia</i> | | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | |
| <i>S/ Zn</i> | 91,51 | (25,69) | 10,05 | (3,26) |
| <i>C/ Zn</i> | 99,71 | (32,01) | 14,84 | (5,29) |
| <i>Média</i> | 95,61 | (27,70) | 12,45 | (4,85) |
| <i>C/ Mn</i> | | | | |
| <i>S/ Zn</i> | 94,00 | (34,90) | 13,50 | (3,20) |
| <i>C/ Zn</i> | 87,45 | (26,09) | 12,09 | (4,10) |
| <i>Média</i> | 90,73 | (29,25) | 12,79 | (3,54) |
| <i>Média Geral</i> | 93,17 | (27,84) | 12,62 | (4,14) |
| <i>Resultados da Análise de Variância</i> | | | | |
| <i>hipoxia</i> | ns | | ns | |
| <i>adub Zn</i> | ns | | * | |
| <i>adub Mn</i> | ns | | ns | |
| <i>hipoxia x adub Zn</i> | ns | | ** | |
| <i>hipoxia x adub Mn</i> | ns | | ns | |
| <i>adub Zn x adub Mn</i> | ns | | ** | |
| <i>hipoxia x adub Zn x adub Mn</i> | ns | | ns | |
| <i>CV (%)</i> | 73.77 | | 16.34 | |

*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente); ns indicam efeitos não significativos. CV – Coeficiente de variação. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão da media de cada tratamento. O desdobramento dos efeitos da interações significativas é apresentado no material suplementar.

3.6- Avaliação da atividade de enzimas e compostos do complexo antioxidativo

Os valores de SOD (medidos ao fim do experimento) não foram afetados pela hipóxia, e, reduziram com a aplicação de Mn (redução de 7,76 % nos tratamentos com hipóxia e Mn) (Tabela 9).

Não foram constatados efeitos dos tratamentos sobre a atividade da catalase ao fim do experimento. Para a POX, também não houve diferenças entre os tratamentos com hipóxia e que receberam aeração normal, no entanto, tratamentos que receberam aplicação foliar de Zn e Mn apresentaram aumento na atividade dessa enzima (aumentos de 60 % e 245 % em normóxia e, 20 % e 13,6 % em hipóxia para aplicações de Mn e Zn respectivamente).

Tabela 9. Valores da SOD, CAT e POX em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

| <i>Tratamento</i> | <i>SOD</i> | <i>CAT</i> | <i>POX</i> |
|-------------------|------------|------------|------------|
|-------------------|------------|------------|------------|

| <i>S/ Hipóxia</i> | | $--U\ mg^{-1}\ proteína\ min^{-1}$ | | $----\mu mol\ H_2O_2\ mg\ 38roteína^{-1}\ min^{-1}----$ | | | |
|--------------------|--------------|------------------------------------|---------|---|--------|------|--------|
| <i>S/Mn</i> | | | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 21,50 | (5,31) | 0,44 | (0,18) | 0,05 | (0,01) |
| | <i>C/ Zn</i> | 24,33 | (7,77) | 0,60 | (0,49) | 0,10 | (0,05) |
| | <i>Média</i> | 22,92 | (6,45) | 0,52 | (0,36) | 0,07 | (0,04) |
| <i>C/ Mn</i> | | | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 23,53 | (7, 59) | 0,80 | (1,30) | 0,06 | (0,01) |
| | <i>C/ Zn</i> | 34,75 | (9,40) | 1,41 | (1,29) | 0,28 | (0,08) |
| | <i>Média</i> | 29,14 | (9,99) | 1,11 | (1,26) | 0,17 | (0,13) |
| <i>Média Geral</i> | | 26,03 | (8,79) | 0,81 | (0,95) | 0,12 | (0,11) |
| <i>C/ Hipóxia</i> | | | | | | | |
| <i>S/Mn</i> | | | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 26,41 | (6,66) | 0,54 | (0,18) | 0,06 | (0,02) |
| | <i>C/ Zn</i> | 32,36 | (11,75) | 0,75 | (0,73) | 0,14 | (0,06) |
| | <i>Média</i> | 28,84 | (13,59) | 0,66 | (0,54) | 0,10 | (0,06) |
| <i>C/ Mn</i> | | | | | | | |
| | <i>S/ Zn</i> | 28,16 | (8,73) | 1,03 | (1,06) | 0,16 | (0,06) |
| | <i>C/ Zn</i> | 25,03 | (6,30) | 0,66 | (0,35) | 0,11 | (0,06) |
| | <i>Média</i> | 26,60 | (7,36) | 0,84 | (0,77) | 0,13 | (0,06) |
| <i>Média Geral</i> | | 27,99 | (8,41) | 0,76 | (0,66) | 0,12 | (0,06) |

Resultados da Análise de Variância

| | | | |
|------------------------------------|-------|----|----|
| <i>Hipoxia</i> | ns | ns | Ns |
| <i>adub Zn</i> | ns | ns | * |
| <i>adub Mn</i> | ns | ns | * |
| <i>hipoxia x adub Zn</i> | ns | ns | * |
| <i>hipoxia x adub Mn</i> | ** | ns | ** |
| <i>adub Zn x adub Mn</i> | ns | ns | ns |
| <i>hipoxia x adub Zn x adub Mn</i> | ns | ns | * |
| <i>CV (%)</i> | 30,98 | 10 | 10 |

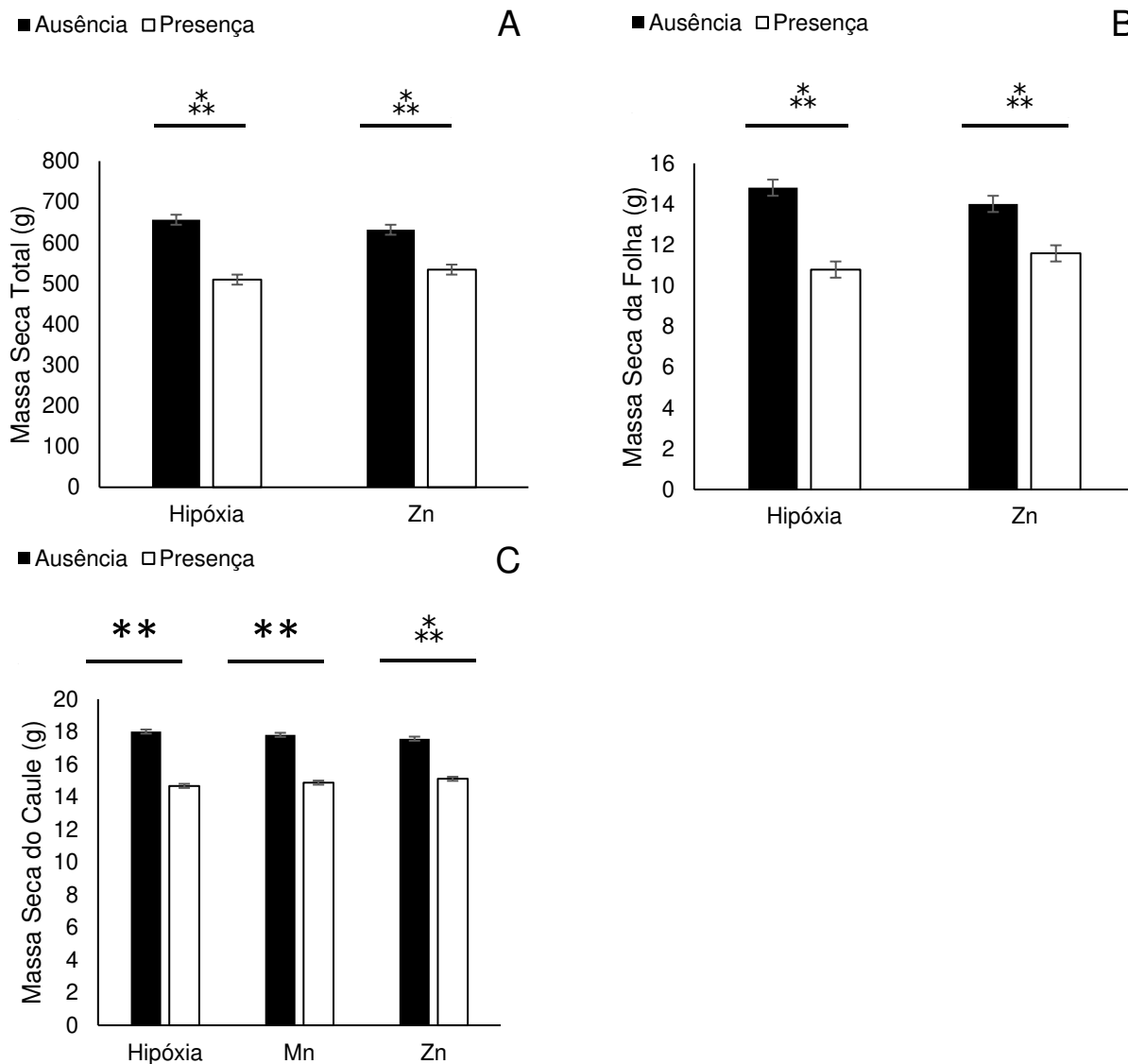
*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente); ns indicam efeitos não significativos. CV – Coeficiente de variação. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão da media de cada tratamento. O desdobramento dos efeitos da interações significativas é apresentado no material suplementar.

3.7- Produção de matéria seca dos componentes das plantas

Plantas submetidas à hipóxia apresentaram redução significativa na massa seca total (Figura 9) e foram também influenciadas negativamente pela aplicação foliar de Zn durante a primeira fase do experimento. Os mesmos resultados puderam ser observados para massa seca das folhas.

Para os caules e ramos tratamentos com Mn e Zn apresentaram menores valores de massa seca.

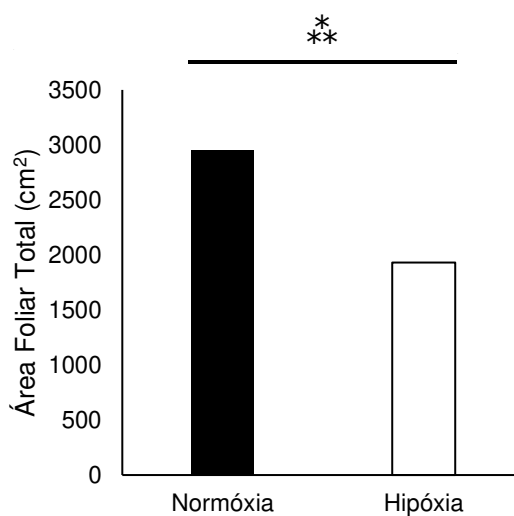
Figura 9. Massa seca dos componentes (A) Total, (B) Folha, (C) caule + ramo em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)



*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente); de acordo com o teste F.

A área foliar também foi negativamente afetada pelo estresse hídrico, (Figura 10) sem efeitos dos tratamentos com Mn e Zn nessa variável.

Figura 10. Valores de área foliar em mudas de eucalipto após a aplicação de tratamentos com e sem hipóxia e aplicação foliar de micronutrientes (Zn e Mn)

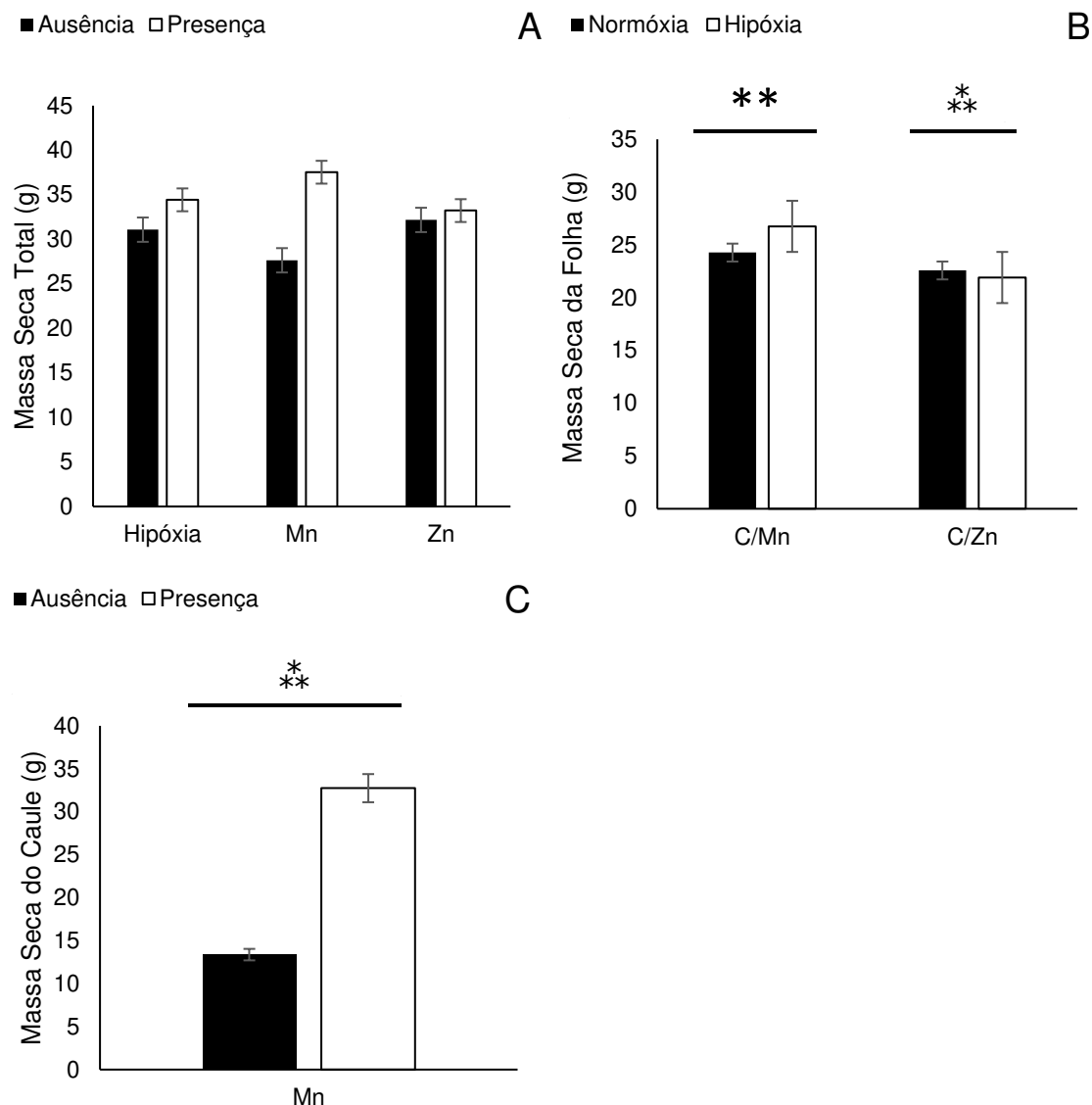


*, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.

Após 69 dias de recuperação do período de alagamento, as plantas remanescentes foram cortadas para avaliação da massa seca e a área foliar. Após a recuperação, mudas que haviam sido submetidas a hipóxia não apresentam diferença significativa na massa seca total com o tratamento controle (Figura 11).

Para o caule, tratamentos com Mn apresentaram os maiores incrementos de massa seca após o período de recuperação.

Figura 11. Massa Seca dos componentes (A) Total, (B) Folha, (C) caule + ramo em mudas de eucalipto após a recuperação ao período de hipóxia

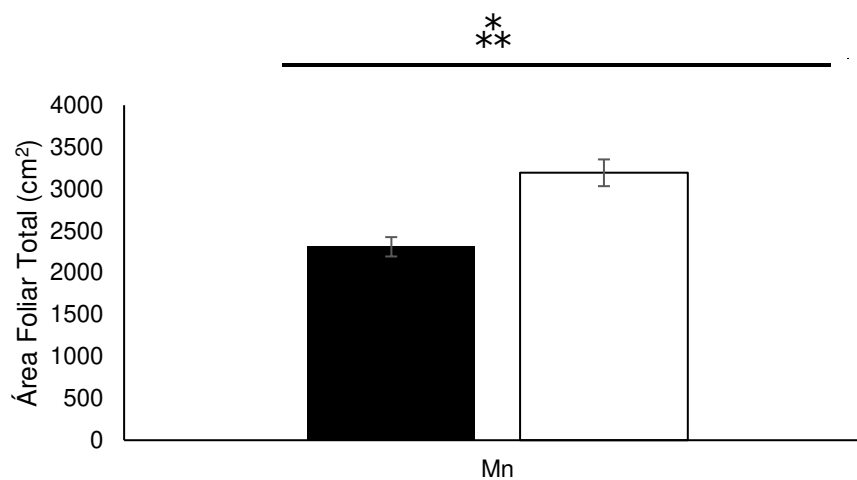


As médias seguidas pelo símbolo *, **, e *** indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $< 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.

Quanto a área foliar das mudas após a recuperação, não houve diferença significativa entre as mudas submetidas a hipóxia e as que receberam aeração normal (Figura 12). Tratamentos que receberam aplicação de Mn apresentaram maior área foliar.

Figura 12. Valores de área foliar em mudas de eucalipto após a recuperação ao período de hipóxia

■ Ausência □ Presença



As médias seguidas pelo símbolo **, ** e * indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $< 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.

4. DISCUSSÃO

4.1- Teor de nutriente na planta

A hipóxia provocou aumento dos teores de Mn e reduziu os teores de Zn nas plantas (Tabela 2 e 3). Nessas condições há aumento da atividade de formas reduzidas de Mn em solução, passíveis de serem absorvidas pelas plantas, o que explica a maior absorção desse nutriente (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1984; SILVA; SOUSA; BOHNEN, 2003). Não obstante, em ambientes pobres em Mn, a aplicação desse nutriente pode ser necessária. A propósito, deficiências desse nutriente têm sido comuns em áreas florestais, em locais sujeitos a alagamentos (Dados não publicados – NUTREE).

Diferentemente do que ocorre com o Mn, a disponibilidade de Zn em solução normalmente reduz em condições de hipóxia (CAMARGO; SANTOS; ZONTA, 1999). Adicionalmente, dentre outros problemas metabólicos desencadeados pela baixa disponibilidade de O₂ para as plantas, sua capacidade de absorção e transporte de nutrientes é reduzida (TROUGHT; DREW, 1980), inclusive com redução da expressão de importantes transportadores de metais (PARENT et al., 2008). Em conjunto, esses efeitos explicam, pelo menos em parte, os menores teores de Zn em plantas submetidas à hipóxia.

As plantas que receberam aplicação foliar de Zn e Mn apresentaram maiores concentrações desses nutrientes. A aplicação foliar de micronutrientes é uma estratégia de adubação importante para complementação da fertilização via solo (NACHTIGALL; NAVA, 2010). Em situações em que a planta tem sua capacidade de absorção de nutrientes via raízes comprometida, esse tipo de prática pode ser chave para a redução de problemas nutricionais. Contudo, a adubação foliar, comum na eucaliptocultura em ambientes secos (ex.: aplicação foliar de B durante períodos de estiagem), ainda é pouco estudada para o alívio de problemas nutricionais em situações de hipóxia.

4.2- Crescimento da planta, taxa fotossintética, condutância estomática e carboidratos

A deficiência de O₂ está associada a múltiplas modificações metabólicas nas plantas (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008). A redução da condutância estomática é uma das primeiras respostas fisiológicas das plantas à hipóxia, com forte efeito negativo na aquisição de CO₂ e fotossíntese (BRADFORD; HSIAO, 1982). Estes efeitos também foram observados neste trabalho, em todos os tratamentos em que as plantas foram submetidas à hipóxia, com e sem pulverização com micronutrientes. As plantas que receberam aplicação foliar de Mn, no entanto, apresentaram um considerável aumento nas taxas fotossintéticas, ainda durante o período em que estavam submetidas à hipóxia. É válido destacar ainda, que ao final do experimento, as plantas que receberam Mn e Zn apresentaram taxas fotossintéticas semelhantes àquelas observadas nas plantas conduzidas em normóxia.

A aplicação de Mn e Zn tem efeito em vários processos metabólicos que podem influenciar direta e indiretamente na recuperação de plantas sob estresse por excesso de água/deficiência de O₂. Dentre as funções metabólicas vitais, o Mn e o Zn participam da síntese proteica, hormonal, de carboidratos, além de seu papel como cofatores de enzimas antioxidantes, que controlam reações de oxirredução essenciais ao correto funcionamento da atividade fotossintética e síntese de clorofila (BROADLEY et al., 2012; WU et al., 2015). Contudo, os efeitos desses nutrientes no metabolismo de plantas sob estresse hídrico (por falta e excesso de água) ainda não estão totalmente compreendidos e mais trabalhos são necessários para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos nas respostas fisiológicas aqui observadas.

As plantas sob hipóxia apresentaram aumento nos teores de açúcares solúveis e amido nas folhas (Figura 8 e tabela 5) e menor acúmulo de biomassa (Figura 9 e 10).

Em altas concentrações, o acúmulo de açúcares solúveis pode limitar a atividade fotossintética (retroinibição da fotossíntese) (FRANCK et al., 2006; ARAYA; NOGUCHI; TERASHIMA, 2006). Nas plantas que receberam aplicação de Mn (principalmente) e Mn+Zn, observou-se maior acúmulo de amido, o que deve estar associado às maiores taxas fotossintéticas das plantas observadas nestes tratamentos durante o período de estresse (redução do efeito de retroinibição), a

despeito do baixo crescimento, contribuindo para a redução dos efeitos negativos da hipóxia e melhor recuperação das plantas quando a aeração dos vasos foi reestabelecida (Figura 11 e 12). É válido destacar, no entanto, que o acúmulo excessivo de amido pode reduzir a capacidade fotossintética das plantas, por efeito físico, o que aparentemente não ocorreu neste trabalho.

O efeito negativo do Zn no crescimento das plantas (nos tratamentos com e sem hipóxia) indica que houve fitotóxicidade e menores doses desse nutriente podem alterar as respostas aqui obtidas, embora alguns efeitos positivos tenham também sido observados para esse nutriente notadamente ao fim do período de estresse.

4.3- Fluorescência da clorofila *a*

Plantas submetidas a estresses hídricos podem sofrer alterações no status funcional das membranas dos tilacoides, que estão associadas a alterações na fluorescência dos tecidos vegetais (KONRAD et al., 2005).

A hipóxia não influenciou a fluorescência inicial (F_o), mas reduziu a fluorescência máxima (F_m) medida nas folhas das plantas. Os valores de F_o relacionam-se com a emissão de fluorescência a partir das moléculas de clorofila que compõe o complexo coletor de luz do fotossistema II (KRAUSE; WEIS, 1991) e a fluorescência máxima permite inferir sobre a completa redução da Quinona A, em sua condição de máxima redução (SILVA et al., 2015).

As razões F_v/F_m e F_v/F_o também não foram influenciadas pelos tratamentos aplicados neste trabalho. Alterações nos valores de F_v/F_m , que indicam a eficiência quântica potencial do fotossistema II, podem estar associadas à ocorrência de processos de inibição do fotossistema II, ou à presença de danos nos complexos do FSII (LIMA; VIRGENS; BERTOLDE, 2019). A relação F_v/F_o , por sua vez, amplifica as variações detectadas pelos valores de F_v/F_m e permite inferir sobre a eficiência máxima do processo fotoquímico e sobre a atividade fotossintética potencial (BRITO et al., 2014).

4.4- Teores de clorofilas, carotenoides, aminoácidos totais, proteínas solúveis totais, ascorbato, dehidroascorbato, prolina e malato

Neste trabalho os teores de clorofila total e a razão clorofila a/b reduziram nas plantas submetidas à hipóxia e as aplicações foliares de Mn e Zn não influenciaram essas variáveis.

Sob hipóxia, os teores de clorofilas são afetados pela redução do metabolismo, que afetam a sua síntese, e oxidação das clorofilas durante a senescência das folhas (DREW, 1997). Reduções na relação clorofila a/b indicam a existência de desajustes na proporção e na atividade da fase fotoquímica da fotossíntese (TAIZ et al., 2017).

Os teores de carotenoides nas folhas reduziram nas plantas submetidas à hipóxia e aumentaram nos tratamentos com aplicação foliar de Zn, sem efeito da aplicação de Mn (Figura 7). Os carotenoides são pigmentos fotoprotetores, essenciais para evitar fotooxidação por meio da dissipação do excesso de energia (MITTLER, 2002). Além disso, são eficientes antioxidantes na eliminação de EROs como oxigênio singleto e o radical peróxil (STAHL; SIES, 2003). A redução dos teores de carotenoides em plantas submetidas a hipóxia provavelmente ocorreu devido aos efeitos negativos do aumento da concentração de EROs nos períodos de maior intensidade do estresse hídrico sob a planta. No entanto, a medida foi realizada ao fim do experimento e pode não refletir o que ocorreu durante todo o período do ensaio.

Os teores de aminoácidos totais reduziram nos tratamentos com hipóxia, o que pode ser resultado, dentre outros processos, da redução na capacidade de importação de aminoácidos a partir da raiz principal das plantas bem como de alterações no metabolismo do N nas plantas sob hipóxia (ALAOUI-SOSSÉ et al., 2005). Adicionalmente, esse efeito pode ser explicado pela manutenção da síntese de proteínas em plantas mantidas em hipóxia. Logo, níveis mais baixos de aminoácidos podem indicar sua utilização na síntese de compostos relacionados ao aumento da tolerância ao estresse.

Maior conteúdo de prolina foi encontrado nas folhas de plantas sob hipóxia e os menores teores desse metabolito foram observados em tratamentos com Mn. O aumento da concentração de prolina é uma resposta comum em situações de estresse hídrico. Além do papel na remoção de radicais livres e, conseqüentemente, redução do estresse oxidativo, a prolina também atua na proteção de membranas e proteínas,

além de agir como osmoprotetor na estabilização de estruturas celulares (HOSSAIN; FUJITA, 2010).

Tratamentos que receberam a aplicação de Zn apresentaram maiores valores de dehidroascorbato, sem efeito para indução da hipóxia para ascorbato e dehidroascorbato. O ascorbato é um antioxidante não enzimático que atua como coenzima da ascorbato peroxidase, e seu teor, assim como a do dehidroascorbato pode ser afetado pelo estresse hídrico (ASADA, 1999). A ascorbato peroxidase reage com o H₂O₂ pelo ciclo ascorbato/glutationa e produz dehidroascorbato (JIAO; WANG, 2000).

A hipóxia aumentou a concentração de malato nas plantas. O acúmulo desse metabolito é esperado nessas condições (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008; DREW, 1997) e acontece devido a adoção de diferentes rotas metabólicas de modo a favorecer a produção energética e reduzir a fitotoxicidade, contribuindo para redução da concentração de etanol e/ou lactato nos tecidos de plantas sob hipóxia (JOLY, 1994; ROBERTS et al., 1992; ROGGE et al., 1998).

4.5- Avaliação da atividade de enzimas e compostos do complexo antioxidativo

Após 77 idas de indução a hipóxia, foram realizadas avaliações da atividade de enzimas do complexo antioxidativo e foi constatada redução da atividade da SOD e da POX, nos tratamentos com Mn e Mn + Zn respectivamente, sem efeito dos demais tratamentos.

Estes resultados, tomados em conjunto com as demais avaliações realizadas neste trabalho, indicam que houve efeito positivo da aplicação de Mn e Mn+Zn no metabolismo das plantas, com redução da formação de espécies reativas de oxigênio ao fim do período de estresse. No entanto, para uma melhor compreensão do papel do Mn e Zn no metabolismo antioxidativo das plantas do presente estudo, seriam necessarias mais avaliações durante o experimento.

4.6- Extravasamento de eletrólitos

Após 75 dias da imposição da hipóxia, observou-se redução nos valores de extravasamento de eletrólitos das plantas submetidas a esse estresse, sem efeito das aplicações foliares de Mn e Zn. Esse tipo de resultado indica maior integridade das membranas celulares, que pode estar associada à maior deposição de substâncias osmoticamente ativas (prolina e açúcares solúveis), que conferem o aumento da tolerância por meio do ajustamento osmótico (TAIZ et al., 2017), o que também foi constatado neste trabalho. Adicionalmente, como forma de tolerância ao estresse oxidativo, há um aumento na atividade de peroxidases, que desencadeará processos fisiológicos que culminarão no desenvolvimento da oxidação de compostos fenólicos, lignificação da parede celular e na manutenção das membranas (TAIZ et al., 2017).

5. CONCLUSÃO

Demonstrou-se, neste trabalho, que plantas mais bem nutridas com Mn e Zn conseguem apresentar maior tolerância aos efeitos da hipóxia e sustentar maiores taxas fotossintéticas em condições de menor disponibilidade de O₂ para as raízes

A nutrição com Mn pode aumentar as taxas de crescimento na fase de recuperação. Os resultados deste trabalho indicam que aplicação foliar de Zn e Mn (principalmente) contribui para a redução de alguns dos efeitos negativos da hipóxia em plantas de eucalipto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAOUI-SOSSÉ, B. et al. Influence of flooding on growth, nitrogen availability in soil, and nitrate reduction of young oak seedlings (*Quercus robur* L.). **Annals of Forest Science**, v. 62, n. 6, p. 593–600, set. 2005.

ALMEIDA, A. Q.; RIBEIRO, A.; FERNANDO LEITE, P. **RELAÇÃO ENTRE A SECA DOS PONTEIROS DO EUCALIPTO E O CLIMA NO VALE DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO DOCE. 2013.** [s.l: s.n.].

ARAKAWA, N. et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1289–1290, 1981.

ARAYA, T.; NOGUCHI, K.; TERASHIMA, I. Effects of Carbohydrate Accumulation on Photosynthesis Differ between Sink and Source Leaves of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 5, p. 644–652, 1 maio 2006.

ASADA, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 601–639, jun. 1999.

BAILEY-SERRES, J. et al. Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 3, mar. 2012.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. **Flooding stress: Acclimations and genetic diversity.** **Annual Review of Plant Biology**, 2008.

BRADFORD, K. J.; HSIAO, T. C. Stomatal Behavior and Water Relations of Waterlogged Tomato Plants. **Plant Physiology**, v. 70, n. 5, 1 nov. 1982.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BRITO, K. Q. D. et al. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA a EM GENÓTIPOS DE GERGELIM SOB ESTRESSE SALINO EM ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO. 2014.

BROADLEY, M. et al. Function of nutrients: micronutrients. In: **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 191–248.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, n. 4, p. 677–702, 7 mar. 2007.

BURNELL, J. N. The Biochemistry of Manganese in Plants. In: **Manganese in Soils and Plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1988. p. 125–137.

CAMARGO, F. A.; SANTOS, G. DE A.; ZONTA, E. **ALTERAÇÕES ELETROQUÍMICAS EM SOLOS INUNDADOS ELECTROCHEMICAL CHANGES IN WETLAND SOILS**. [s.l: s.n.].

CAMPOS, P. S.; PHAM THI, A. T. Effects of an abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subjected to osmotic stress. **Plant Science**, v. 130, n. 1, p. 11–18, 1997.

CARILLO, P.; GIBON, Y. Protocol: extraction and determination of proline. **PrometheusWiki**, 2011.

CAVATTE, P. C. et al. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. **Physiologia plantarum**, v. 144, n. 2, p. 111–122, 2012.

COSTA, A. M. et al. Avaliação do risco de anoxia para o cultivo do eucalipto no Rio Grande do Sul utilizando-se levantamento de solos Anoxic risk evaluation for Eucalyptus in Rio Grande do Sul State, through soils survey. **Scientia Forestalis**, v. v. 37, n. n. 84, p. 367–375, 2009.

DA MATTA, F. M. et al. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. **Plant Science**, v. 128, n. 1, p. 43–50, set. 1997.

DREW, M. C. OXYGEN DEFICIENCY AND ROOT METABOLISM: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1, p. 223–250, jun. 1997.

FAIZAN, M. et al. Zinc Oxide Nanoparticles Help to Enhance Plant Growth and Alleviate Abiotic Stress: A Review. **Current Protein & Peptide Science**, v. 22, n. 5, p. 362–375, maio 2021.

FERNIE, A. R. et al. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling heterotrophic cells. **Planta**, v. 212, n. 2, 2001.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal-principais doenças florestais no Brasil**. [s.l.] SIF Viçosa, 1989. v. 1

FRANCK, N. et al. Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. **Tree Physiology**, v. 26, n. 4, p. 517–525, 1 abr. 2006.

GAO, H. et al. Exogenous calcium affects nitrogen metabolism in root-zone hypoxia-stressed muskmelon roots and enhances short-term hypoxia tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 11, p. 1217–1225, 2011.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GRISI, F. A. et al. MORFOANATOMIA FOLIAR EM MUDAS DE *Schinus terebinthifolius* SOB DIFERENTES NÍVEIS DE SATURAÇÃO HÍDRICA. **FLORESTA**, v. 41, n. 4, 19 dez. 2011.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, 1 jun. 1987.

HE, L. et al. Proteomic analysis of the effects of exogenous calcium on hypoxic-responsive proteins in cucumber roots. **Proteome Science**, v. 10, n. 1, 12 dez. 2012.

HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 16, n. 1, p. 19–29, 13 jan. 2010.

IBÁ. **IBA - Relatório Anual. Ano base 2018. 2019**. [s.l.: s.n.].

IBGE. Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística (IBGE) 2020. As Florestas Plantadas, Painel Interativo. <http://snif.florestal.gov.br/pt-br/conservacao-das-florestas/86-florestas-e-recursosflorestais/452-painel-interativo-1a?tipo=tableau&modal=1>.

IQBAL, Z. et al. Silicon Alleviate Hypoxia Stress by Improving Enzymatic and Non-enzymatic Antioxidants and Regulating Nutrient Uptake in Muscadine Grape (*Muscadinia rotundifolia* Michx.). **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 10 fev. 2021.

JACKSON, M. L. **Soil chemical analysis advanced course**. [s.l.: s.n.].

JIAO, H.; WANG, S. Y. Correlation of Antioxidant Capacities to Oxygen Radical Scavenging Enzyme Activities in Blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5672–5676, 1 nov. 2000.

JOLY, C. A. Flooding tolerance: a reinterpretation of Crawford's metabolic theory. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences**, v. 102, p. 343–354, 5 dez. 1994.

KONRAD, M. L. F. et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 64, p. 339–347, 2005.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. Effect of flooding on water, carbohydrate, and mineral relations. **Flooding and plant growth**, p. 165–193, 1984.

KRAUSE, A G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual review of plant biology**, v. 42, n. 1, p. 313–349, 1991.

KWAK, S.-S. et al. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 565–568, 1996.

LANZA, L. N. M.; ROSSI, S. C.; SODEK, L. Adubação nitrogenada beneficia soja alagada. **Bragantia**, v. 72, n. 1, 22 mar. 2013.

LI, J. M. et al. Combined effects of hypoxia and excess Mn²⁺ on oxidative stress and antioxidant enzymes in tomato seedlings. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 59, n. 5, p. 670–678, 16 set. 2012.

LIMA, A. D. G.; DAS VIRGENS, M. B.; BERTOLDE, F. Z. EFEITOS DO ALAGAMENTO DO SOLO NA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA a

EM PLANTAS JOVENS DE *Inga laurina*. **ANAIS DA SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA E SEMINÁRIO DE PESQUISA E EXTENSÃO**, 2019.

LOCATELLI, M. et al. Efeito de formas de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de eucalipto. **Agrotrópica**, v. 8, p. 53–69, 1984.

MASCHIO, L. M. A.; ANDRADE, F. M.; AUER, C. G. **CONTRIBUIÇÃO DE FATORES CLIMÁTICOS NA OCORRÊNCIA DA SECA DE PONTEIROS DE *Eucalyptus grandis* EM ARAPOTI-PR**Bol. Pesq. FI. [s.l: s.n.].

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, set. 2002.

NACHTIGALL, G. R.; NAVA, G. **Adubação foliar: fatos e mitos**. Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso (ALICE). **Anais...Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 23, n. 2, p. 87-97, 2010 ..., 2010.

NUNES-NESI, A. et al. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**, v. 50, n. 6, p. 1093–1106, 25 abr. 2007.

PARENT, C. et al. An overview of plant responses to soil waterlogging. **Plant stress**, v. 2, n. 1, p. 20–27, 2008.

PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.

ROBERTS, J. K. M. et al. Contribution of Malate and Amino Acid Metabolism to Cytoplasmic pH Regulation in Hypoxic Maize Root Tips Studied Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Plant Physiology**, v. 98, n. 2, p. 480–487, 1 fev. 1992.

ROGGE, G. D. et al. Metabolismo respiratório de raízes de espécies arbóreas tropicais submetidas à inundação. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 2, p. 153–158, ago. 1998.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated development environment for R (Version 1.4.1106)**. **The Journal of Wildlife Management**, 2021.

SANTOS, G. C. V. DOS. Relação do nitrogênio com a tolerância à hipoxia em clones de eucalipto. 2014.

SILVA, F. G. DA et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de berinjela sob lâminas de irrigação. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 19, p. 946–952, 2015.

SILVA, L. S. DA; SOUSA, R. O. DE; BOHNEN, H. Alterações no teores de nutrientes em dois solos alagados, com e sem plantas de arroz. **Ciência Rural**, v. 33, p. 487–490, 2003.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345–351, dez. 2003.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l.] Artmed Editora, 2017.

TAVANTI, T. R. et al. Micronutrient fertilization enhances ROS scavenging system for alleviation of abiotic stresses in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 160, p. 386–396, mar. 2021.

TOPA, M. A.; CHEESEMAN, J. M. Carbon and phosphorus partitioning in Pinus serotina seedlings growing under hypoxic and low-phosphorus conditions. **Tree Physiology**, v. 10, n. 2, 1 mar. 1992.

TORRACA, D. S. M. **SILÍCIO E ÁCIDO SALICÍLICO NA ECOFISIOLOGIA DE MUDAS DE Schinus terebinthifolia Raddi SOB ALAGAMENTO**. [s.l.: s.n.].

TORRES, F. T. P.; MONTEIRO, V. S.; SOUZA, C. **AVALIAÇÃO DE CAVITAÇÃO E EMBOLIA EM EUCALIPTO COM PREDISPOSIÇÃO A SECA DO PONTEIRO DO VALE DO RIO DOCE**. II Reunião Oeste de Ciência do Solo 3, Rio Verde. “Desafios para a Ciência do Solo na fronteira agrícola brasileira”. IF Goiano e SBCS. ISSN 2318-2520. **Anais...**2013.

TROUGHT, M. C. T.; DREW, M. C. The development of waterlogging damage in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, v. 54, n. 1, p. 77–94, fev. 1980.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, set. 1994.

WU, S. et al. Drought stress tolerance mediated by zinc-induced antioxidative defense and osmotic adjustment in cotton (*Gossypium Hirsutum*). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 8, p. 167, 4 ago. 2015.

YE, Y. et al. Can abiotic stresses in plants be alleviated by manganese nanoparticles or compounds? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, p. 109671, nov. 2019.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **The Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209, 1955.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Suplemento 1. Demonstração de parcelas e subparcelas de mudas submetidas ao tratamento controle em normóxia (1, 9, 17, 25 e 33) e hipóxia (2, 10, 18, 26 e 34) ao final do experimento



Suplemento 2. Demonstração de parcelas e subparcelas de mudas submetidas ao tratamento com Mn em normóxia (3, 11, 19, 27 e 35) e hipóxia (4, 12, 20, 28 e 36) ao final do experimento



Suplemento 3. Demonstração de parcelas e subparcelas de mudas submetidas ao tratamento com Zn em normóxia (5, 13, 21, 29 e 37) e hipóxia (6, 14, 22, 30 e 38) ao final do experimento



Suplemento 4. Demonstração de parcelas e subparcelas de mudas submetidas ao tratamento com Zn em normóxia (7, 15, 23, 31 e 39) e hipóxia (8, 16, 24, 32 e 40) ao final do experimento



Suplemento 5. Tabela com o desdobramento dos efeitos das interações significativas

Folha - Zn**Resultados da Análise de Variância**

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn e adubação com Mn

| | |
|--|----|
| <i>hipoxia 1: adubação com Mn</i> | * |
| <i>hipoxia 2: adubação com Mn</i> | ns |
| <i>Desdobrando adubação Mn dentro de cada nível de hipoxia</i> | |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 1</i> | ns |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 2</i> | * |

Taxa fotossintética**21/abr****Resultados da Análise de Variância**

Desdobrando adubação com Zn dentro de cada nível de adubação com Mn

| | |
|---|----|
| <i>adubação com Zn: adubação com Mn 1</i> | ns |
| <i>adubação com Zn: adubação com Mn 2</i> | ** |

Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de adubação com Zn

| | |
|---|----|
| <i>adubação com Mn: adubação com Zn 1</i> | ** |
| <i>adubação com Mn: adubação com Zn 2</i> | ns |

05/mai**Resultados da Análise de Variância**

Desdobrando adubação com Zn dentro de cada nível de adubação com Mn

| | |
|---|----|
| <i>adubação com Zn: adubação com Mn 1</i> | ** |
| <i>adubação com Zn: adubação com Mn 2</i> | ns |

Desdobrando adub Mn dentro de cada nível de adubação Zn

| | |
|---|----|
| <i>adubação com Mn: adubação com Zn 1</i> | * |
| <i>adubação com Mn: adubação com Zn 2</i> | ns |

22/mai**Resultados da Análise de Variância**

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação Mn

| | |
|-----------------------------------|----|
| <i>hipoxia: adubação com Mn 1</i> | * |
| <i>hipoxia: adubação com Mn 2</i> | ns |

Desdobrando adubação Mn dentro de cada nível de hipoxia

| | |
|-----------------------------------|----|
| <i>adubação com Mn: hipoxia 1</i> | ** |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 2</i> | ns |

26/jun**Resultados da Análise de Variância**

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn e adubação com Mn

| | |
|---------------------|----|
| <i>hipoxia: 1 1</i> | ** |
| <i>hipoxia: 1 2</i> | ns |

| | |
|--|----|
| hipoxia: 2 1 | ns |
| hipoxia: 2 2 | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Zn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Mn</i> | |
| adubação com Zn: 1 1 | Ns |
| adubação com Zn: 1 2 | ns |
| adubação com Zn: 2 1 | ** |
| adubação com Zn: 2 2 | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Zn</i> | |
| adubação com Mn: 1 1 | ns |
| adubação com Mn: 1 2 | ns |
| adubação com Mn: 2 1 | * |
| adubação com Mn: 2 2 | ns |

30/jun

Resultados da Análise de Variância

| | |
|--|----|
| <i>Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn e adubação com Mn</i> | |
| hipoxia: 1 1 | * |
| hipoxia: 1 2 | * |
| hipoxia: 2 1 | * |
| hipoxia: 2 2 | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Zn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Mn</i> | |
| adubação com Zn: 1 1 | Ns |
| adubação com Zn: 1 2 | * |
| adubação com Zn: 2 1 | * |
| adubação com Zn: 2 2 | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Zn</i> | |
| adubação com Mn: 1 1 | ns |
| adubação com Mn: 1 2 | ** |
| adubação com Mn: 2 1 | * |
| adubação Mn: 2 2 | ** |

Condutância estomática

22/mai

Resultados da Análise de Variância

| | |
|--|----|
| <i>Desdobrando adubação com Zn dentro de cada nível de adubação com Mn</i> | |
| adubação Zn: adubação Mn 1 | ns |
| adubação Zn: adubação Mn 2 | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de adubação com Zn</i> | |
| adubação Mn: adubação Zn 1 | ns |
| adubação Mn: adubação Zn 2 | ns |

30/jun

Resultados da Análise de Variância

| | |
|--|----|
| <i>Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn e adubação com Mn</i> | |
| hipoxia: 1 1 | ns |
| hipoxia: 1 2 | ** |

| | |
|--|----|
| <i>hipoxia: 2 1</i> | ns |
| <i>hipoxia: 2 2</i> | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Zn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Mn</i> | |
| <i>adubação com Zn: 1 1</i> | ns |
| <i>adubação com Zn: 1 2</i> | ns |
| <i>adubação com Zn: 2 1</i> | ** |
| <i>adubação com Zn: 2 2</i> | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Zn</i> | |
| <i>adubação com Mn: 1 1</i> | ns |
| <i>adubação com Mn: 1 2</i> | ns |
| <i>adubação com Mn: 2 1</i> | * |
| <i>adubação com Mn: 2 2</i> | Ns |

Glicose

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Mn

| | |
|--|----|
| <i>hipoxia: adubação com Mn 1</i> | * |
| <i>hipoxia: adubação com Mn 2</i> | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia</i> | |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 1</i> | * |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 2</i> | * |

Frutose

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Mn

| | |
|--|----|
| <i>hipoxia: adubação com Mn 1</i> | * |
| <i>hipoxia: adubação com Mn 2</i> | ns |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia</i> | |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 1</i> | ** |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 2</i> | * |

Sacarose

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Mn

| | |
|--|---|
| <i>hipoxia: adubação com Mn 1</i> | * |
| <i>hipoxia: adubação com Mn 2</i> | * |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia</i> | |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 1</i> | * |
| <i>adubação com Mn: hipoxia 2</i> | * |

Amido

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn

| | |
|--|----|
| <i>hipoxia: adubação com Zn 1</i> | ns |
| <i>Hipoxia :adubação com Zn 2</i> | * |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia</i> | |
| <i>adubação com Zn: hipoxia 1</i> | ns |
| <i>adubação com Zn: hipoxia 2</i> | * |

Prolina

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn

| | |
|----------------------------|----|
| Hipoxia: adubação com Zn 1 | ns |
| hipoxia: adubação com Zn 2 | * |

Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia

| | |
|----------------------------|----|
| adubação com Zn: hipoxia 1 | ** |
| adubação com Zn: hipoxia 2 | ns |

Malato

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Mn

| | |
|----------------------------|----|
| hipoxia: adubação com Mn 1 | ** |
| hipoxia: adubação com Mn 2 | * |

Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia

| | |
|----------------------------|----|
| adubação com Mn: hipoxia 1 | * |
| adubação com Mn: hipoxia 2 | ns |

DHA

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn

| | |
|----------------------------|----|
| hipoxia: adubação com Zn 1 | ns |
| hipoxia: adubação com Zn 2 | ** |

Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia

| | |
|----------------------------|----|
| adubação com Zn: hipoxia 1 | * |
| adubação com Zn: hipoxia 2 | ns |

POX

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn e adubação com Mn

| | |
|--------------|----|
| hipoxia: 1 1 | ns |
| hipoxia: 1 2 | ** |
| hipoxia: 2 1 | ns |
| hipoxia: 2 2 | ns |

Desdobrando adubação com Zn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Mn

| | |
|----------------------|----|
| adubação com Zn: 1 1 | ns |
| adubação com Zn: 1 2 | * |
| adubação com Zn: 2 1 | ns |
| adubação com Zn: 2 2 | ns |

Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Zn

| | |
|----------------------|----|
| adubação com Mn: 1 1 | ns |
| adubação com Mn: 1 2 | * |
| adubação com Mn: 2 1 | ** |
| adubação com Mn: 2 2 | ns |

SOD

Resultados da Análise de Variância

Desdobrando hipoxia dentro de cada nível de adubação com Zn e adubação com Mn

| | |
|--------------|----|
| hipoxia: 1 1 | Ns |
|--------------|----|

| | | |
|--|--|----|
| <i>hipoxia: 1 2</i> | | Ns |
| <i>hipoxia: 2 1</i> | | Ns |
| <i>hipoxia: 2 2</i> | | * |
| <i>Desdobrando adubação com Zn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Mn</i> | | |
| <i>adubação com Zn: 1 1</i> | | ns |
| <i>adubação com Zn: 1 2</i> | | ** |
| <i>adubação com Zn: 2 1</i> | | ns |
| <i>adubação com Zn: 2 2</i> | | Ns |
| <i>Desdobrando adubação com Mn dentro de cada nível de hipoxia e adubação com Zn</i> | | |
| <i>adubação com Mn: 1 1</i> | | ns |
| <i>adubação com Mn: 1 2</i> | | * |
| <i>adubação com Mn: 2 1</i> | | ns |
| <i>adubação com Mn: 2 2</i> | | ns |

*, ** e *^{*}, indicam efeitos significativos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,1$, respectivamente) de acordo com o teste F.