



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
MESTRADO E DOUTORADO EM AGRONOMIA**



**PRISCILA ANDRADE SILVA**

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE DOIS HÍBRIDOS DE PALMA  
DE ÓLEO AO DÉFICIT HÍDRICO**

**BELÉM  
2016**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
MESTRADO E DOUTORADO EM AGRONOMIA



**PRISCILLA ANDRADE SILVA**

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE DOIS HÍBRIDOS DE PALMA DE ÓLEO AO  
DÉFICIT HÍDRICO**

FS  
2016/006  
SIL

**BELÉM**

**2016**

**PRISCILLA ANDRADE SILVA**

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE DOIS HÍBRIDOS DE PALMA DE ÓLEO AO  
DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado e Doutorado em Agronomia: área de concentração Produção Vegetal em Sistemas Agrícolas, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Murilo DaMatta

Co-orientador: Dr. Roberto Lisboa Cunha

**BELÉM**

**2016**

---

Silva, Priscilla Andrade

Respostas fisiológicas de dois híbridos de palma de óleo ao déficit hídrico / Priscilla Andrade Silva. - Belém, 2016.

85 f.

Tese (Doutorado em Agronomia / Área de Concentração Produção Vegetal) – Universidade Federal Rural da Amazônia/Embrapa Amazônia Oriental, 2016.

Orientador: Hugo Alves Pinheiro

1. Dendê híbrido – déficit hídrico 2. Dendê – crescimento vegetativo 3. Estresse oxidativo 4. Metabolismo do carbono 5. Trocas gasosas I. Pinheiro, Hugo Alves, (Orient.) II. Título

CDD - 631.5230724

---

**PRISCILLA ANDRADE SILVA**

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE DOIS HÍBRIDOS DE PALMA DE ÓLEO AO  
DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado e Doutorado em Agronomia: área de concentração Produção Vegetal em Sistemas Agrícolas, para obtenção do título de Doutor.

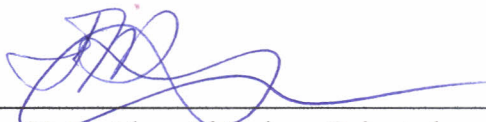
Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Murilo DaMatta

Co-orientador: Dr. Roberto Lisboa Cunha

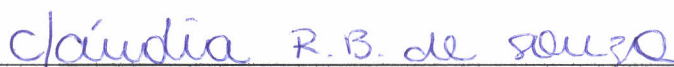
Aprovada em 11 de fevereiro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**



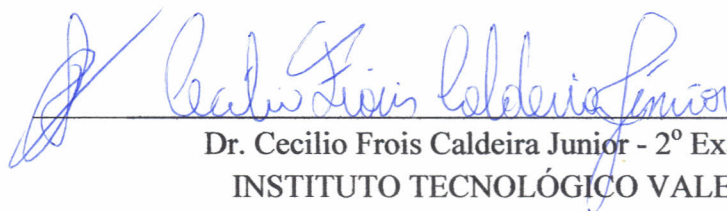
Dr. Hugo Alves Pinheiro - Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



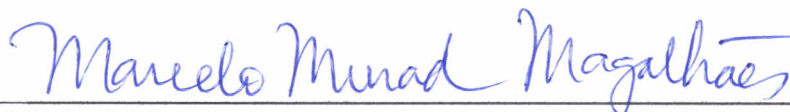
Dr.ª. Claudia Regina Batista de Souza – 1º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA



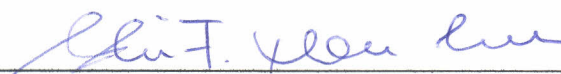
Dr. Cecilio Frois Caldeira Junior - 2º Examinador

INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE – ITV



Dr. Marcelo Murad Magalhães - 3º Examinador

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA



Dr.ª. Elisa Ferreira Moura Cunha – 4º Examinador

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

## AGRADECIMENTOS

A JESUS Maravilhoso, pelas bênçãos infinitas e amor sem fim, bem como a força que me é concedida para trilhar os caminhos, caso contrário não chegaria até aqui.

À minha família, mãe Enilde, Pai Raimundo, Pai Fernando, Irmã Kelly, Sobrinha Yasmin, Tia Inó, Vó Sabá (*in memoriam*), Sogra Maria Ely, Sérgio, Wellington e Fábio pela força, compreensão e ajuda incondicional ao longo de minha trajetória. Ao meu esposo Orlando pelo amor e paciência durante a jornada. Aos Pastores Alex, Edson e Elaine pela força e fé. Amo vocês!

Ao prof. Hugo Pinheiro, pela inigualável sabedoria repassada durante o desenvolvimento da tese, bem como os conselhos de um excelente profissional. Aos co-orientadores Roberto Lisboa, pela amizade e bondade durante minha jornada acadêmica, e Fábio DaMatta, pela genialidade em profissionalismo e acolhida cordial em seu laboratório top em Viçosa. Vocês moram em meu coração!

Aos “braços direito e esquerdo, e duas pernas” Igor Vinícius, Vanessa, Kátia, Abel, Syane Penha, Priscila Raquel, Rodrigo, Amanda, Walter, Arthur, Jean, Kelly, Leandro Elias, Dalton, Sérgio Páfia; sem os quais não existiria esta tese. Sem palavras!

Aos queridos e preciosíssimos professores da UFRA Mário Lopes, Elisa Moura, Jessivaldo, Cândido Neto, Everton, Edson Ramos, Rosa, Izildinha, Lázaro, Benedito, Itabirici, Gisele e Herdjânia pelos conhecimentos, conselhos e orientações profissionais dadas ao longo do meu doutorado e presente graduação! Rsrrsrsr.

Aos amigos da EMBRAPA, Solange, Ivanildo, Neuza, Marcus, Edson, Igor, pelo total suporte dado para a realização de algumas análises no laboratório. Valeu mesmo!!!

Aos amigos da UFRA Pamela, Francisca, Núbia, Ingrid, Marcos Paulo, Possidônio, Saime, Rodolfo, Hellen, Daynara, Rafael Guedes, Fernanda, Christine, Victor, Aline, Débora, Rômulo, Diego que, de alguma forma, colaboraram, mesmo que com palavras de apoio e incentivo, para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada queridos!

A UFRA pela formação e titulação concedida. Ao programa de Pós Graduação em Agronomia e ao corpo docente, pela oportunidade e formação oferecida. Bem como a Capes pela concessão de bolsa e ao CNPq pelo projeto financiado.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho!!!

*Em cada etapa da vida, Deus coloca  
pessoas chaves e nos momentos mais difíceis  
constrói grandes tesouros em nossos corações!*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Principais categorias de genes envolvidos na resposta de plantas ao déficit hídrico.....	13
<b>Figura 2</b> - Plantio comercial com 8 anos de idade e frutos de BRS Manicoré e plantas jovens de com 10 meses de idade de BRS C 2501.....	16
<b>Figura 3</b> - Potencial hídrico foliar na antemanhã, taxa de assimilação líquida de CO <sub>2</sub> , condutância estomática ao vapor d'água, transpiração, eficiência estantânea do uso da água e razão entre a concentração intercelular e atmosférica de CO <sub>2</sub> em dois híbridos de palma de óleo sob plena irrigação e déficit hídrico.....	31
<b>Figura 4</b> Potencial hídrico foliar na antemanhã, taxa de assimilação líquida de CO <sub>2</sub> , condutância estomática ao vapor d'água, transpiração, eficiência estantânea do uso da água e razão entre a concentração intercelular e atmosférica de CO <sub>2</sub> em dois híbridos de palma de óleo sob plena irrigação, déficit hídrico e após a retomada da irrigação.....	33
<b>Figura 5</b> - Concentração foliar de amido, glicose, frutose, proteínas e aminoácidos em dois híbridos de palma de óleo sob plena irrigação, déficit hídrico e reirrigação.....	36
<b>Figura 6</b> - Atividades da rubisco (inicial e total), glicolato oxidase e catalase em dois híbridos de palma de óleo sob plena irrigação, déficit hídrico e reirrigação.....	38
<b>Figura 7</b> - Atividade da pirofosforilase do ADP-glicose, sintase da sacarose, sintase da sacarose-fosfato, invertase alcalina e invertase ácida em dois híbridos de palma de óleo sob plena irrigação, déficit hídrico e reirrigação.....	39
<b>Figura 8</b> - Atividade da malato desidrogenase dependente de NAD <sup>+</sup> e concentração de malato em dois híbridos de palma de óleo sob plena irrigação, déficit hídrico e reirrigação.....	41
<b>Figure 9</b> - Changes in leaf water potential at predawn, net CO <sub>2</sub> assimilation rate, stomatal conductance to water vapor and intercellular to ambient CO <sub>2</sub> concentration in two oil palm hybrids subjected to progressive drought.....	66
<b>Figure 10</b> - Concentrations of chlorophyll <i>a</i> , chlorophyll <i>b</i> , total carotenoids, and total chlorophyll to total carotenoids ratio in two oil palm hybrids subjected to progressive drought.....	68
<b>Figure 11</b> - Activities of Rubisco, glycolate oxidase, and NAD <sup>+</sup> -Malate dehydrogenase in two oil palm hybrids subjected to progressive drought.....	69
<b>Figure 12</b> - Activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase and catalase in two oil palm hybrids subjected to progressive drought.....	71
<b>Figure 13</b> - Total ascorbate, ascorbate redox state, total glutathione, and glutathione redox state in two oil palm hybrids subjected to progressive drought.....	72
<b>Figure 14</b> - Hydrogen peroxide and lipid peroxidation assessed as malondialdehyde equivalents in two oil palm hybrids subjected to progressive drought.....	74

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Teste - *F* estatístico e níveis de significância associados aos efeitos dos híbridos (H) e regimes de hídricos (RH) com as interações entre os tempos de avaliação experimental (T) sobre as variáveis fisiológicas em dois híbridos de *E. Guineensis* aos 57 dias de imposição do déficit hídrico..... 32
- Tabela 2** - Teste - *F* estatístico e níveis de significância associados aos efeitos dos híbridos (H) e regimes de hídricos (RH) com as interações entre os tempos de avaliação experimental (T) sobre as variáveis fisiológicas em dois híbridos de *E. guineensis* aos 40 dias de reidratação..... 34
- Tabela 3** - Altura, número de folhas, número de folíolos e avaliação de biomassa em dois híbridos de palma de óleo sob plena irrigação (Irigado) e déficit hídrico (Déficit Hídrico), após 57 dias..... 42
- Table 4.** *F* – statistics and associated significance levels for the effect of hybrids (H) and watering regimes (WR) and its interaction with times of experimental evaluation (T) on physiological variables in two oil palm hybrids..... 75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A* - Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>
- ABS* – Absorbância
- A/E* – Eficiência instantânea do uso da água
- AFE* – Área foliar específica
- AFT* – Área foliar total
- AGPase* – ADP-glicose pirofosforilase
- APX* – Peroxidase do ascorbato
- CAT* – Catalase
- Chl* - Clorofila
- C<sub>i</sub>* - Concentração intercelular de CO<sub>2</sub>
- E* – Transpiração
- GLO<sub>x</sub>* – Oxidase do glicolato
- GR* – Redutase da glutationa
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* – Peróxido de hidrogênio
- g<sub>s</sub>* - Condutância estomática ao vapor d'água
- MDA* – Aldeído malônico
- MD-NAD<sup>+</sup>* - Malato desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup>
- MS* – Massa seca
- O<sub>2</sub><sup>-•</sup>* – Ânion superóxido
- ROS* – Espécies reativas de oxigênio
- Rubisco* – Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase – oxigenasse
- SOD* – Dismutase do superóxido
- SuSy* – Sintase da sacarose-fosfato
- T<sub>ar</sub>* - Temperatura do ar
- T<sub>fol</sub>* - Temperatura foliar
- UR* – Umidade relativa do ar
- Ψ<sub>am</sub>* - Potencial hídrico foliar na antemanhã

## RESUMO

A seca é um dos mais importantes fatores de estresse ambiental que limita o cultivo comercial da palma de óleo em áreas tropicais. Portanto, a identificação de híbridos de palma de óleo tolerantes ao déficit hídrico é uma estratégia que pode permitir o cultivo da espécie em regiões tropicais com baixas taxas anuais de precipitação. Assim, esta pesquisa foi realizada a fim de quantificar a magnitude das alterações nas variáveis fisiológicas (potenciais hídrico e de trocas gasosas), bioquímicas (sistema antioxidante e metabolismo primário do carbono) e morfológicas (biometria e biomassa) em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) submetidos a seca prolongada (potencial hídrico foliar em torno de  $-4,0$  MPa) e após a retomada da irrigação, procurando inferir sobre os seus potenciais de tolerância à seca. Os efeitos globais da seca sobre as trocas gasosas, as concentrações foliares de carboidratos e proteínas solúveis totais e atividades de enzimas associadas à fixação de  $\text{CO}_2$  e síntese de amido e sacarose foram mais expressivos em plantas estressadas de BRS C 2501 do que em plantas do BRS Manicoré. O BRS Manicoré também apresentou um sistema antioxidante mais eficiente para proteger as células contra um estresse oxidativo aos lipídeos de membrana que o BRS C 2501. Os efeitos do déficit hídrico sob o crescimento global não diferiu entre plantas estressadas de ambos os híbridos, no entanto, é digno de nota ressaltar que o BRS Manicoré apresenta crescimento de um sistema radicular mais denso que o BRS C 2501. Tomando em conjunto, o BRS Manicoré apresenta um conjunto de respostas morfofisiológicas e bioquímicas que devem permitir que este híbrido tolere a seca de forma mais satisfatória do que o BRS C 2501.

**Palavras-chave:** Crescimento vegetativo, dendê, estresse oxidativo, metabolismo do carbono, trocas gasosas.

## ABSTRACT

Drought is one of the most important environmental stress factors limiting commercial cultivation of oil palm in tropical areas. Therefore, the identification of drought tolerant hybrids of oil palm is an important strategy to enable the cultivation of the species in areas marked by low annual rainfall rates. This research was conducted in order to quantify the magnitude of changes in physiological variables (water potential and gas exchange), biochemical (antioxidant system and primary carbon metabolism) and morphological (biometrics and biomass) in two hybrid oil palm (BRS Manicoré and BRS C 2501) submitted to prolonged drought (leaf water potential around -4.0 MPa) and after resumption irrigation, inferring about its potential tolerance to drought. The overall effects of drought on gas exchange, concentrations of leaf carbohydrates, total soluble proteins and activities of enzymes associated with CO<sub>2</sub> fixation and starch and sucrose synthesis were more expressive in stressed plants of BRS C 2501 than in BRS Manicoré. The BRS Manicoré presented more efficient antioxidant system to protect cells against oxidative stress to membrane lipids than BRS C 2501. The effects of drought on overall growth did not differ among hybrids, however, it was noteworthy that BRS Manicoré grew more dense root system than BRS C 2501. Altogether, the BRS Manicoré presented a set of morpho-physiological and biochemical responses that should allow this hybrid tolerate drought more satisfactorily than BRS C 2501.

**Keywords:** carbon metabolism, gas exchange, oil palm, oxidative stress, vegetative growth.

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b>	
	<b>ABSTRACT</b>	
<b>1</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>12</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E METABOLISMO PRIMÁRIO DO CARBONO EM DOIS HÍBRIDOS DE PALMA DE ÓLEO SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO PROLONGADO E SUCESSIVA REIDRATAÇÃO.....</b>	<b>20</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>23</b>
2.2.1	Material Vegetal.....	23
2.2.2	$\Psi_{am}$ e trocas gasosas.....	25
2.2.3	Determinação de hexoses, aminoácidos, malato, proteína e amido.....	25
2.2.4	Atividades enzimáticas.....	27
2.2.5	Variáveis de crescimento.....	28
2.2.6	Análises estatísticas.....	29
<b>2.3</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
2.3.1	Potencial hídrico foliar e trocas gasosas durante o período de estresse e recuperação.....	29
2.3.2	Metabólitos primários.....	34
2.3.3	Atividades da Rubisco, GLOx e CAT.....	37
2.3.4	Enzimas responsáveis pela síntese de amido e sacarose.....	38
2.3.5	Atividade da malato desidrogenase dependente de $NAD^+$ e concentração de malato.....	41
2.3.6	Variáveis de crescimento.....	41
<b>2.4</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>43</b>
<b>2.5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>LEAF GAS EXCHANGE AND MULTIPLE ENZYMIC AND NON-ENZYMIC ANTIOXIDANT STRATEGIES RELATED TO DROUGHT TOLERANCE IN TWO OIL PALM HYBRIDS.....</b>	<b>57</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>57</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2</b>	<b>Material and Methods.....</b>	<b>61</b>
3.2.1	Plant material, experimental design and sampling procedures.....	61
3.2.2	Leaf gas exchange.....	62
3.2.3	Biochemical assays.....	62
3.2.4	Chlorophylls and total carotenoids.....	63
3.2.5	Enzymatic assays.....	63
3.2.6	Ascorbate and glutathione pools.....	64
3.2.7	Hydrogen peroxide.....	64
3.2.8	Lipid peroxidation.....	64
3.2.9	Statistical analyses.....	64
<b>3.3</b>	<b>Results</b>	<b>65</b>
3.3.1	Leaf water potential and leaf gas exchange.....	65
3.3.2	Chlorophylls and total carotenoids.....	67

3.3.3	Activities of enzymes related to carbon metabolism.....	69
3.3.4	Activities of antioxidant enzymes.....	70
3.3.5	Non-enzymatic antioxidant compounds.....	72
3.3.6	Hydrogen peroxide and lipid peroxidation.....	73
3.4	<b>Discussion</b> .....	75
3.5	<b>Conclusion</b> .....	75
	<b>REFERENCES</b> .....	79
	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	85

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Os plantios comerciais de palma de óleo no Brasil são encontrados nos estados do Amazonas, Bahia e Pará, sendo este último o maior produtor brasileiro, contribuindo com cerca de 83% da produção nacional de palma de óleo em toneladas de cacho de coco (IBGE, 2014). Esta cultura é de grande importância econômica dada a grande variedade de aplicações dos principais produtos obtidos da prensagem da polpa de seus frutos (óleos de palma) e das sementes (óleos de palmiste). Ambos são largamente utilizados nas indústrias de alimentos, cosméticos, sabões e para fins de produção de bioenergia (TRINDADE et al., 2005; BOARI, 2008).

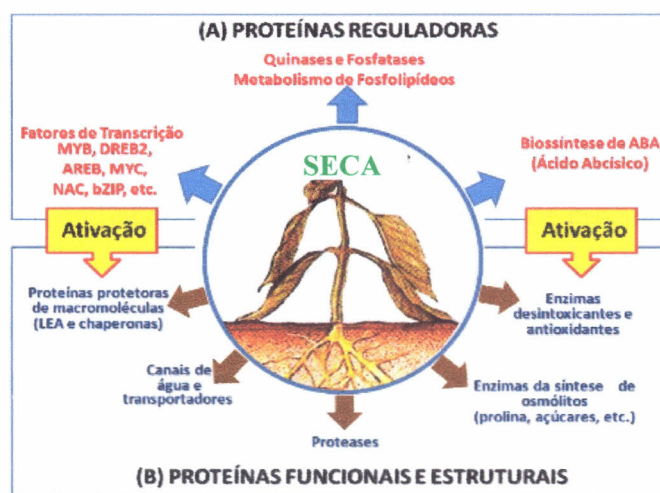
A disponibilidade hídrica é o principal fator limitante da produção de palma de óleo. Segundo Bastos et al. (2001), o estado do Pará (maior produtor de palma de óleo do Brasil) apresenta três diferentes áreas de aptidão para o desenvolvimento da cultura: (i) área com boa aptidão – corresponde a apenas 0,13% do território do estado do Pará, não apresenta estação seca durante o ano e a deficiência hídrica é menor que 100 mm; (ii) área com aptidão moderada - corresponde a apenas 72,05% do território do estado do Pará, apresenta estação seca de curta duração (dois ou três meses) e ocorrência de deficiência hídrica anual moderada entre 100 mm e 350 mm; e (iii) área sem aptidão - corresponde a apenas 27,82% do território do estado do Pará, apresenta estação seca de com duração de três ou mais meses e ocorrência de deficiência hídrica anual acentuada (maior que 350 mm).

Várias pesquisas para implementação de sistemas de irrigação para grandes áreas de plantio vêm sendo utilizadas como alternativa para evitar ou minimizar os efeitos do déficit hídrico em palma de óleo (VEIGA et al., 2001; AZEVEDO et al., 2008; ANTONINI et al., 2015). Porém a utilização de irrigação esbarra em limitações econômicas e técnicas, logo, muitos plantios comerciais não utilizam sistema de irrigação e dependem das chuvas, como é o caso do estado do Pará (VEIGA et al., 2001; AZEVEDO et al., 2008; ANTONINI et al., 2015). Portanto, a verificação de diferenças genotípicas no comportamento de cultivares e híbridos de palma de óleo sob condições de seca constitui uma alternativa para identificar materiais genéticos com elevado desempenho sob déficit hídrico, como averiguado por diversos autores ao estudarem a seca em alguns híbridos (LEGROS et al., 2009; SURESH; NAGANAMI., 2006; SURESH et al., 2010; CAO et al., 2011; SURESH et al., 2012) e constitui estratégia importante visando programas de melhoramento genético da espécie.

Como exemplo da variabilidade genotípica da palma de óleo relacionada ao déficit hídrico, Suresh et al. (2012) verificaram diferenças no comportamento fisiológico de cinco híbridos tenera (913X1988, 1425X2277, 748X1988, 7418X1988 e 690X1988) em uma província da Índia. Méndez et al (2012) avaliaram o comportamento de quatro híbridos (U 1273, U 1859, U 1914 e U 1937) de palma de óleo sob déficit hídrico na Colômbia. Recentemente, Jazayeri et al. (2015) verificaram diferenças nas magnitudes fisiológicas nos híbridos IRHO 7010 e IRHO 1001, na Colômbia.

Várias alterações nas enzimas da fase bioquímica da fotossíntese, bem como das enzimas do metabolismo dos carboidratos foram observadas em plantas sob déficit hídrico de diversas espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas (ATKINS, 2009; NUNES-NESI et al., 2011; SCHEFFER et al., 2011) (Figura 1). O acúmulo de açúcares solúveis, as variações nos níveis de carboidratos, alterações nas atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do carbono como, por exemplo, a Ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), Sintase da sacarose-fosfato (SPS) e Sintase da sacarose (SuSy) são quantificadas afim de verificar a magnitude das alterações sofridas pelas rotas metabólicas das plantas ao sofrerem o estresse (PRAXEDES et al., 2006).

**Figura 1** - Principais categorias de genes envolvidos na resposta de plantas ao déficit hídrico.



**Fonte:** Benko-Iseppon et al., 2011.

A tolerância à seca não depende exclusivamente das variáveis fisiológicas (SURESH; NAGAMI, 2006; SURESH et al., 2010; SURESH et al., 2012), mas, sobretudo, da contribuição relativa dos vários mecanismos bioquímicos (rotas metabólicas) de tolerância que podem operar em diferentes fases do desenvolvimento da planta, tais como ajustamento

osmótico, estratégias antioxidantes e ajustes no metabolismo foliar primário e secundário (LEGROS et al., 2009; CAO et al., 2011; MÉNDEZ et al., 2012; CHA-UM et al., 2013).

Um estudo realizado na Colômbia com quatro híbridos (U 1273, U 1859, U 1914 e U 1937) de palma de óleo, Méndez et al (2012) verificaram diferenças no comportamento de metabólitos primários (Carboidratos) entre os híbridos avaliados sob diferentes potenciais hídricos do solo (-0,04; -0,5; -1,0 e -2,0 MPa). Legros et al. (2009) também verificaram diferenças significativas nos metabólitos primários do carbono (glicose, sacarose e amido) na espécie, quando houve variações climáticas em diferentes regiões da Indonésia.

Em se tratando de tolerância diferencial ao crescimento vegetativo, Méndez et al (2012) ao estudarem o comportamento de quatro híbridos (U 1273, U 1859, U 1914 e U 1937) de palma de óleo sob déficit hídrico, verificaram diferenças nas respostas das variáveis de crescimento (diâmetro do bulbo, área foliar, massa seca total, altura e número de folhas) entre os híbridos avaliados sob potencial hídrico do solo a -2,0 MPa. Cha-Um et al. (2013) ao estudar as respostas morfofisiológicas em um híbrido-F1 de palma de óleo (*E. guineenses* Jacq.), constatou alterações nas variáveis de crescimento (altura da planta, área foliar total e massa seca total) quando integradas aos pigmentos das clorofilas. Jazayeri et al. (2015) também verificaram diferenças nas magnitudes morfológicas, quando integradas aos parâmetros fisiológicos, nos híbridos IRHO 7010 e IRHO 1001, sob potencial hídrico do solo de -2,0 MPa.

Além de alterações no metabolismo primário do carbono, o déficit hídrico pode induzir alterações no metabolismo oxidativo, alterando o estado de oxiredução de certos componentes celulares, resultando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS podem se acumular nos tecidos vegetais, atingindo níveis tóxicos capazes de levar as células à morte. (MITLER, 2002; NOCTOR et al., 2014). As plantas podem ativar sistemas de defesa antioxidativos para evitar a formação e/ou acúmulo de ROS. Esses sistemas de defesa podem envolver mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para eliminação das ROS produzidas sob condições de estresse oxidativo. As principais enzimas envolvidas no controle homeostático das ROS são a dismutase do superóxido (SOD), a peroxidase do ascorbato (APX), a catalase (CAT), a redutase da glutathiona (GR) e a peroxidase (POX) (SUZUKI et al., 2012). Já os principais sistemas de defesa não enzimáticos são os metabólitos ascorbato (AA) e glutathiona (GS), ambos alternando entre estados oxidados e reduzidos (NOCTOR et al., 2014; SUZUKI et al., 2012).

Como exemplo de resposta diferencial ao déficit hídrico relacionada a defesa antioxidante, Cao et al. (2011) demonstraram que alterações no metabolismo antioxidante da espécie africana *E. guineensis* Jacq. sob déficit hídrico esta relacionada a uma maior proteção celular em resposta a um aumento nas atividades da SOD e POX, bem como aumento nas concentrações de aldeído malônico (MDA), aos 21 dias de suspensão da irrigação. Cha-Um et al. (2013) também verificaram incrementos nas concentrações dos pigmentos cloroplastídicos (clorofilas) em um híbrido-F1 de *E. guineensis* Jacq., ao longo de dezoito dias de imposição de déficit hídrico.

No estado do Pará, os primeiros plantios comerciais de palma de óleo datam dos anos 80 e foram iniciados pela utilização de híbridos do tipo Tenera (*E. guineenses* cv. pisífera – La Mé x *E. guineenses* cv. Dura – Deli, CORLEY; TINKER, 2003). Com o passar dos anos e com a ocorrência da anomalia conhecida como amarelecimento fatal (AF); cuja causa é ainda desconhecida e dizima muitas plantações em todo mundo, os programas de melhoramento genético da palma de óleo tem priorizado a busca por materiais vegetais com alta produtividade e mais resistentes ao AF em detrimento de outras características agronomicamente interessantes, como a própria tolerância ao déficit hídrico, já que; em tese, os plantios de palma de óleo não são implantados em áreas sujeitas a períodos secos definidos e relativamente prolongados conforme já mencionado. Por outro lado, com as perspectivas de mudanças climáticas globais, inclusive no contexto amazônico, em que se prevê cenários de incremento no aumento da temperatura e períodos de estiagem/seca cada vez mais expressivos (JAZAYERI et al., 2015), então a busca por materiais genéticos mais tolerantes ao déficit hídrico deve ser também tratada como estratégia prioritária em programas de melhoramento genético da espécie.

A palma de óleo apresenta um gênero de apenas duas espécies, sendo uma mais frequente nas Américas e a outra no continente africano. A espécie americana é o caiaué (*Elaeis oleífera* H. B. K. Cortês) e a africana é a palma ou dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq) (SANTOS, 2010). A palma de óleo americana ou caiaué (Do tupi, *Kaá ou cae* = mato e *auwee* = que anda, que movimenta) não é muito utilizada em plantios comerciais devido ao seu baixo teor de óleo. No entanto, os seus híbridos com *E. guineensis* são uma opção promissora, uma vez que possuem boa produtividade de óleo e um grau variado de tolerância e resistência á algumas doenças (RAMALHO FILHO et al., 2010). A partir dessas espécies, diversos híbridos intraespecíficos (*E. guineensis* x *E. guineensis*; *E. oleífera* x *E. oleífera*) e interespecíficos (*E. guineensis* x *E. oleífera*) vêm sendo utilizados no melhoramento da palma

de óleo com a finalidade de elevar o potencial produtivo, bem como conferir resistência/tolerância contra fatores bióticos e abióticos (CUNHA; LOPES, 2010). O híbrido interespecífico *E. oleífera* x *E. guineensis* (O x G) ganhou importância na indústria de palma de óleo da América Latina, uma vez que apresenta um elevado potencial produtivo de cacho de coco e uma melhor composição de óleo em termos de concentrações de antioxidantes e índice de iodo (CUNHA et al., 2007; CUNHA; LOPES, 2010).

A fim de atender a necessidade dos produtores brasileiros por um material genético de palma de óleo que agregue alta produtividade e resistência ao AF, a Embrapa Amazônia Ocidental desenvolveu dois híbridos de palma de óleo, o interespecífico BRS Manicoré (*E. guineensis* Jacq. x *E. oleífera* (Kunth) Cortés; CUNHA; LOPES, 2010) (Figura 2a) e o híbrido intraespecífico BRS C 2501 (*E. guineenses* cv. pisífera – La Mé x *E. guineenses* cv. Dura – Deli, CUNHA et al., 2007) (Figura 2b). Considerando-se a variabilidade genética existente dentre diferentes híbridos de palma de óleo ao déficit hídrico e considerando-se que a tolerância diferencial a esse estresse pode ser alcançada por meio de respostas morfológicas e fisiológicas, englobando vertentes biofísicas e bioquímicas/moleculares (CAO et al. 2011; MÉNDEZ et al., 2012; SURESH et al., 2012; CHA-UM et al., 2013; JAZAYERI et al., 2015;) e considerando-se a própria diferença de origem dos híbridos BRS Manicoré (interespecífico) e BRS C 2501 (intraespecífico), considera-se nesta pesquisa a hipótese de que estes materiais vegetais melhorados para resistência ao AF possam diferir em termos de tolerância ao déficit hídrico. Isto posto, os objetivos desta pesquisa foram verificar se uma possível diferença na tolerância dos híbridos BRS Manicoré e BRS C 2501 ao déficit hídrico prologando está relacionada as alterações no metabolismo primário do carbono e nas magnitudes de respostas ao sistema antioxidante enzimático e não-enzimático.

**Figura 2** - Plantio comercial com 8 anos de idade e frutos de BRS Manicoré (2a) e plantas jovens de com 10 meses de idade de BRS C 2501 (2b).



**Fonte:** Cunha; Lopes, 2010; Ferro, 2012.

## REFERÊNCIAS

- ANTONINI, J. C. A. dos; VELOSO, R. F.; MALAQUIAS, J. V. **Evapotranspiração e coeficiente de cultivo na fase produtiva da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) nas condições de clima tropical de savana**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 22p., 2015. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 325).
- AZEVEDO, J. A. de; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; SÁ, M. A. C. de. **Parâmetros de irrigação durante o período seco em plantas jovens de dendê cultivado no cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 4p., 2008. (Comunicado Técnico; 146).
- BASTOS T. X.; MÜLLER A. A.; PACHECO N. A.; SAMPAIO S. M. N.; ASSAD E. D.; MARQUES A. F. S. Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do dendezeiro no estado do Pará. **Revista Brasileira Agrometeorologia**, v. 9, p. 564-570, 2001.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; CAVALCANTI, N. M. S.; BELARMINO, L. C.; BEZERRA NETO, J. P.; AMORIM, L. L. B.; FERREIRA NETO, J. R. C.; PANDOLFI, V.; AZEVEDO, H. M. A.; SILVA, R. L. O.; SANTOS, M. G. dos; ALVES, M. V. S.; KIDO, E. A. Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p.1112-1134, 2011.
- BOARI, A. de J. **Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis*) no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 66 p., 2008. (Documentos; 348).
- CAO, H. X.; SUN, C. X.; SHAO, H. B.; LEI, X. T. Effects of low temperature and drought on the physiological and growth changes in oil palm seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2630-2637, 2011.
- CHA-UM, S.; YAMADA, N.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Physiological features and growth characters of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to reduced water-deficit and rewatering, **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, p. 432-439, 2013.
- CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. **The oil palm**. 4. ed. World Agricultural Series. Great Britain: Blackwell Science United, UK, 562 p., 2003.
- CUNHA, R. N. V.; LOPES, R. **BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o Caiuá e o Dendezeiro Africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento fatal**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 4 p., 2010. (Comunicado Técnico 85).
- CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; DANTAS, J. C. R.; ROCHA, R. N. C. **Procedimentos para produção de sementes comerciais de dendezeiro na Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 34 p., 2007. (Documentos; 54).
- IBGE. Indicadores por Estados Brasileiros de 2014. Disponível no link canais do site <http://www.ibge.gov.br/estadosat/> (Último acesso em 05 de janeiro de 2015).
- JAZAYERI, S. M.; RIVERA, Y. D.; CAMPEROS-REYES, J. E.; ROMERO, H. M. Physiological effects of water deficit on two oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genotypes. **Agromía Colombiana**, v. 33, p. 164-173, 2015.

LEGROS, S.; MIALET-SERRA, I.; CLEMENT-VIDAL, A.; CALIMAN, J. P.; SIREGAR F. A.; FABRE, D.; DINGKUHN, M. Role of transitory carbon reserves during adjustment to climate variability and source-sink imbalances in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Tree Physiology*, v. 29, p. 1199-1211, 2009.

MÉNDEZ, Y. D. R.; CHACÓN, L. M.; BAYONA, C. J.; ROMERO, H. M. Physiological response of oil palm interspecific hybrids (*Elaeis oleifera* H.B.K. Cortes versus *Elaeis guineensis* Jacq.) to water deficit. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 24, p. 273-280, 2012.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*, v. 9, p. 405-410, 2002.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology*, v. 164, p. 1636-1648, 2014.

NUNES-NESE, A.; ARAÚJO, W. L.; FERNIE, A. R. Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, v. 155, p. 101-107, 2011.

PRAXEDES, S. C.; DAMATTA, F. M.; LOUREIRO, M. E.; FERRÃO, M. A. G.; CORDEIRO, A. T. Effects of long term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, v. 56, p. 253-263, 2006.

RAMALHO FILHO, A.; MOTTA, P. E. F. da; NAIME, U. J. E; BACA, J. F. M. Avaliação da Aptidão das Terras. In: **Zoneamento Agroecológico do Dendezeiro para as Áreas Desmatadas da Amazônia Legal**. Rio de Janeiro: Embrapa - CNPS, 2010. 44p.

SANTOS, E. A. dos. **Caracterização de dendezeiros subespontâneos com base na produção de frutos e cachos**. Ilhéus, BA: UESC, 74 p. 2010.

SCHEFFER, M.; CARPENTER, S.; FOLEY, J. A.; FOLKE, C.; WALKER, B. Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*, v. 413, p. 591-596, 2011.

SURESH, K.; NAGAMANI, C. Variations in photosynthetic rate and associated parameters with age of oil palm leaves grown under irrigation. *Photosynthetica*, v. 44, p. 309-311, 2006.

SURESH, K.; NAGAMANI C.; KANTHA, D. L.; KUMAR, M. K. Changes in photosynthetic activity in five common hybrids of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under water deficit. *Photosynthetica*, v. 50, p. 549-556, 2012.

SURESH, K.; NAGAMANI, C.; RAMACHANDURU, K.; MATHUR, R. K. Gas-exchange characteristics, leaf water potential and chlorophyll a fluorescence in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under water stress and recovery. *Photosynthetica*, v. 48, p. 430-436, 2010.

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*, v. 35, p. 259-270, 2012.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; FURLAN JÚNIOR, J. Abordagem sobre o estado atual das pesquisas para a identificação do agente causal do amarelecimento fatal do dendezeiro. In: POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; SANTOS, I. P. (Orgs.). **Pragas e doenças de cultivos amazônicos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, p.439-450, 2005.

VEIGA, A. S.; SINIMBU, S. E. S.; RAMOS, E. J. A. **Irrigação em dendezeiro na região do Acará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 32 p., 2001. (Revista Técnica).

## 2 ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E METABOLISMO PRIMÁRIO DO CARBONO EM DOIS HÍBRIDOS DE PALMA DE ÓLEO SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO PROLONGADO E SUCESSIVA REIDRATAÇÃO

### RESUMO

Os efeitos do déficit hídrico nas trocas gasosas e no metabolismo primário do carbono e seus reflexos no crescimento vegetativo foliar foram investigados em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) com o objetivo de averiguar uma possível tolerância diferencial ao estresse entre esses materiais vegetais. Para isso, as plantas foram submetidas a um prolongado período de déficit hídrico (57 dias) seguido de reidratação. O potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\Psi_{am}$ ), a taxa de assimilação líquida do  $CO_2$  ( $A$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ), a eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ) e a razão entre concentração intercelular e ambiente de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ) foram significativamente diminuídos em resposta ao déficit hídrico progressivo do solo. Entretanto, foi observado que as diminuições no  $\Psi_{am}$ , na  $A$ , na  $g_s$ , na  $E$  e na  $A/E$  foram maiores expressivas para as plantas estressadas do BRS C 2501 que no BRS Manicoré em vários dias de medição ao longo do período de estresse. Este resultado indica uma maior estabilidade do aparato fotossintético e maior eficiência do uso da água nas plantas estressadas do BRS Manicoré. As variáveis bioquímicas, avaliadas no momento da diferenciação da irrigação (dia 0) e quando o  $\Psi_{am}$  das plantas estressadas diminuíram para aproximadamente -2 MPa (dia 21), -3 MPa (dia 34), -4 MPa (dia 57) indicaram que o metabolismo do carbono foi significativamente alterado pelo estresse ambos os híbridos. Os carboidratos primários (amido, glicose e frutose) foram diminuídos em função do estresse, porém, efeitos mais expressivos do déficit hídrico foram observados no BRS C 2501, o qual também apresentou menor concentração de proteínas solúveis totais e maior concentração de aminoácidos totais que o BRS Manicoré. A atividade inicial e final da Rubisco foi mais reduzida no BRS C 2501 que no BRS Manicoré, enquanto este último apresentou um pico maior de atividade da oxidase do glicolato e catalase no dia 57. As plantas estressadas do BRS C 2501 apresentaram maiores perdas de atividade da pirofosforilase da ADP-glicose, sintase da sacarose-fosfato, sintase da sacarose, invertases e desidrogenase do malato-NAD<sup>+</sup>. Durante a reidratação, uma melhor recuperação bioquímica foi observada para as plantas do BRS Manicoré. As diminuições nas trocas gasosas e no metabolismo primário do carbono resultaram em menor crescimento da planta. No entanto, as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram maiores reduções no crescimento da parte aérea (número de folíolos e massa seca de bulbo) que o BRS C 2501, mas por outro lado as primeiras apresentaram menor redução na massa seca do sistema radicular (42%) que as segundas (59%). Uma vez que as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentam menores efeitos globais nas trocas gasosas, nas concentrações de carboidratos e proteínas solúveis totais e nas atividades de enzimas associadas à fixação do  $CO_2$  e síntese de amido e sacarose que as plantas estressadas do BRS C 2501 e que essas alterações garantiram às primeiras uma maior disponibilidade de fotoassimilados preferencialmente dirigidos para o crescimento do sistema radicular em detrimento ao crescimento da parte aérea, conclui-se que as plantas do BRS Manicoré devem tolerar mais satisfatoriamente ao déficit hídrico que as plantas do BRS C 2501.

**Palavras-chave:** crescimento vegetativo, dendê, fotossíntese, seca, trocas gasosas

## 2.1 Introdução

O déficit hídrico em palma de óleo afeta a fotossíntese por mecanismos estomáticos e não estomáticos em diferentes materiais genéticos estudados (CHA-UM et al., 2010; SURESH et al., 2010; CHA-UM et al., 2012; MÉNDEZ et al., 2012; SURESH et al., 2012). Para um grande número de espécies, à medida em que o déficit hídrico se torna mais prolongado e o potencial hídrico do solo se torna mais negativo, os estômatos se fecham e um aumento na resistência mesofílica à difusão de CO<sub>2</sub> é observado. São também observadas alterações nas reações fotoquímicas e nas atividades de enzimas relacionadas à fixação e redução do CO<sub>2</sub> e enzimas relacionadas ao metabolismo primário de carboidratos e nitrogênio (FOYER et al., 1994; LAWLOR; CORNIC, 2002, NUNES-NESI et al., 2011; SCHEFFER et al., 2011). Em conjunto, tais alterações ocasionam modificações nos níveis foliares de açúcares solúveis (hexoses e sacarose) e de amido e nas atividades das enzimas de síntese (bisfosfatase da frutose 1,6 bisfosfato– FBPase e sintase da sacarose fosfato – SPS) e degradação (invertase ácida e sintase da sacarose – SuSy) da sacarose e de síntese (pirofosforilase da ADP-glicose AGPase) e degradação (fosforilase do amido – PPIase) do amido (FOYER et al., 1994; PRAXEDES et al., 2006). Conseqüentemente, a produção e o consumo de fotoassimilados são restringidos, levando a alterações na partição do carbono na folha e na planta como um todo as quais podem afetar o crescimento vegetativo/reprodutivo (LAWLOR; CORNIC, 2002; NUNES-NESI et al., 2011; SCHEFFER et al., 2011).

O acúmulo de açúcares solúveis induzido pela seca tem sido relatado como fenômeno associado à inibição da fotossíntese em várias culturas (FLEXAS et al., 2009; GALLÉ et al., 2011). As hexoses, ou açúcares solúveis, agem como um potente inibidor da fotossíntese e seu nível elevado nas folhas ou seu aparecimento transiente pode iniciar uma retroinibição de enzimas do ciclo de Calvin (SHEEN, 1990; NUNES-NESI et al., 2011). Uma maior inibição da taxa fotossintética foi observada nas plantas de soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e pepino (*Cucumis sativus*) submetidas a condições saturantes de CO<sub>2</sub>, mas que também apresentaram alta atividade da invertase ácida nas folhas (GOLDSCHMIDT; HUBER, 1992). Essa correlação levou os autores a sugerirem que a inibição da fotossíntese pode envolver a ciclagem de sacarose e hexoses nas folhas, o que resultaria em regulação negativa do ciclo de Calvin. Todavia, o mecanismo de inibição da fotossíntese pelo acúmulo de açúcares ainda não está bem estabelecido. O acúmulo de carboidratos é muito variável entre as espécies quando da inibição da fotossíntese e pode ser regulado pelos níveis dos

metabólitos intermediários e não necessariamente pela ação dos produtos finais propriamente dito (GOLDSCHMIDT; HUBER, 1992; GALLÉ et al., 2011).

A produção de assimilados nas folhas, bem como a sua translocação para regiões em crescimento, é regulada pela partição entre a biossíntese de amido e sacarose. Plantas C3 sob deficiência hídrica acumulam menos amido e mais sacarose que plantas em condições hídricas normais, o que pode ser atribuído a uma síntese reduzida de amido ou à sua degradação, como resposta aclimativa ao estresse hídrico (FOYER et al., 1994; NUNES-NESI et al., 2011).

Geralmente, é aceito que os pontos de controle da síntese de sacarose nas folhas residiriam na sintase da sacarose-fosfato (SPS) e na frutose 1,6-bifosfatase (FBPase) citoplasmática. A atividade da SPS é fortemente reduzida em plantas submetidas ao déficit hídrico, sendo que, muitos trabalhos, apresentam evidências de que essa redução está associada à diminuição da concentração subestomática de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) (NUNES-NESI et al., 2013). No entanto, verifica-se uma maior atividade da SPS em algumas espécies submetidas ao déficit hídrico sob concentração saturante de CO<sub>2</sub>, (LI et al., 2002; WIDODO et al., 2003; PRAXEDES et al., 2006).

O acúmulo de carboidratos pode sugerir que a fotossíntese, de forma geral, é menos afetada que a demanda total por assimilados (LAWLOR; CORNIC, 2002), indicando, mais uma vez, que o acúmulo de açúcares solúveis não resultaria em inibição da fotossíntese. A capacidade de exportação das folhas provavelmente não é afetada pela redução no conteúdo de água, mas pode diminuir quando a síntese de sacarose é muito limitada (TAIZ; ZEIGER, 2009). Tal acúmulo de carboidratos também pode ser uma forma de a planta se adaptar às condições hídricas desfavoráveis do solo, por meio de osmoregulação, sendo que, nesse caso, o acúmulo de açúcares solúveis geralmente é acompanhado por um aumento na atividade da invertase ácida, a qual quebra sacarose em hexoses disponibilizando carbono e energia para o processo de respiração celular, bem como energia para a síntese de numerosos compostos diferenciados (PELLESCHI et al., 1997; LAWLOR; CORNIC, 2002; NUNES-NESI et al., 2011).

Alterações no metabolismo são observadas em palma de óleo (*Elaeis guineenses*; Arecaceae) sob déficit hídrico, destacando-se as reduções na fotossíntese, no balanço hídrico da planta, absorção de nutrientes, taxas de transpiração, fechamento estomático, redução de carbono interno e aumento de fotorrespiração (DUFRENE et al., 1992; NI; PALLARDY, 1992; FLEXAS et al., 2006; SURESH et al., 2012). Em paralelo, outras estratégias colaboram

para elevação de compostos não enzimáticos (aminoácidos, glutatonas e ascorbato), os quais contribuem para o funcionamento do aparato fotossintético sob seca (LEGROS et al., 2009; SURESH; NAGANAMI., 2006; SURESH et al., 2010; CAO et al., 2011; SURESH et al., 2012).

A fim de se desenvolver materiais genéticos de palma de óleo que agreguem alta produtividade e resistência ao AF, a Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Brasil) desenvolveu dois híbridos de palma de óleo, o interespecífico BRS Manicoré (*E. guineensis* Jacq. x *E. oleífera* (Kunth) Cortés; CUNHA; LOPES, 2010) e o híbrido intraespecífico BRS C 2501 (*E. guineenses* cv. pisífera – La Mé x *E. guineenses* cv. Dura – Deli, CUNHA et al., 2007). Considerando-se a variabilidade genética existente dentre diferentes híbridos de palma de óleo ao déficit hídrico e considerando-se que a tolerância diferencial a esse estresse pode ser alcançada por meio de respostas morfológicas e fisiológicas, englobando vertentes biofísicas e bioquímicas/moleculares (CAO et al. 2011; MÉNDEZ et al., 2012; SURESH et al., 2012; CHA-UM et al., 2013; JAZAYERI et al., 2015;) e considerando-se a própria diferença de origem dos híbridos BRS Manicoré (interespecífico) e BRS C 2501 (intraespecífico), considera-se nesta pesquisa a hipótese de que estes materiais vegetais melhorados para resistência ao AF possam diferir em termos de tolerância ao déficit hídrico. Isto posto, os objetivos desta pesquisa foram verificar se uma possível diferença na tolerância dos híbridos BRS Manicoré e BRS C 2501 ao déficit hídrico prologando está relacionada as alterações no metabolismo primário do carbono e nas magnitudes de respostas ao sistema antioxidante enzimático e não-enzimático.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Material Vegetal

O experimento foi instalado em casa de vegetação na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), em Belém-PA (01°28'03"S, 48°29'18"W), norte do Brasil. Sementes de palma de óleo do híbrido interespecífico BRS Manicoré [*E. guineensis* Jacq. x *E. oleífera* (Kunth) Cortés; CUNHA; LOPES, 2010] e o híbrido intraespecífico BRS C 2501 [*E. guineenses* cv. pisífera – La Mé x *E. guineenses* cv. Dura – Deli, CUNHA et al., 2007] foram semeadas em bandejas de polietileno preenchidas com solo. Trinta dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para vasos de polietileno de 50 L, preenchidos com 40 kg de solo

coletado na camada superficial de 0 a 20 cm de profundidade de um Latossolo Amarelo Distrófico tipicamente encontrado na região norte. O pH do substrato foi ajustado para aproximadamente 6,0 pela aplicação de 30 g de calcário dolomítico por vaso e a fertilização complementar das plantas foi realizada aplicando-se 5 g de NPK 20-20-20 (p/p) por vaso em intervalos de 15 dias; 2,5 g de sulfato de magnésio por vaso em intervalos de 30 dias e 1 grama de borato de sódio por vaso aplicado uma única vez após 180 dias do transplântio para os vasos definitivos (FRANZINI; SILVA, 2012). Após o transplântio e durante todo o período experimental as mudas foram cultivadas em casa de vegetação sob médias de umidade relativa ( $UR_{ar}$ ) e temperatura do ar ( $T_{ar}$ ) e temperatura da folha ( $T_{fol}$ ); tomadas entre 7:40 e 8:40 h, respectivamente de 79,8%; 27,5°C e 28,4 °C. A  $UR_{ar}$  e a  $T_{ar}$  foram registradas por meio de um termohigrômetro (m5203, Incoterm Ind., Porto Alegre, Brazil) instalado no interior da casa de vegetação. A temperatura da folha ( $T_{fol}$ ) foi determinada por meio de um sensor de temperatura acoplado à câmara do analisador de gases a infravermelho (LCpro+, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). O controle das plantas daninhas foi realizado manualmente. A irrigação das plantas até a diferenciação dos regimes hídricos foi realizada diariamente a fim de manter o solo próximo à capacidade de campo, repondo-se a água evapotranspirada, cujo volume foi estimado pela pesagem dos vasos antes do fornecimento hídrico (KLAR et al., 1966).

Quando as plantas apresentaram 12 meses de idade, as mesmas foram divididas em dois grupos: (i) plantas permanentemente irrigadas (tratamento Irrigado, IRR) e (ii) plantas submetidas à suspensão completa da irrigação (tratamento Déficit Hídrico, DH), no qual o déficit hídrico se desenvolveu naturalmente em função do esgotamento da água remanescente no solo. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso. O efeito do déficit hídrico sob as variáveis de potencial hídrico na antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) e trocas gasosas foi verificado aos 0, 7, 14, 21, 28, 34, 42, 50 e 57 dias após a diferenciação da irrigação. O efeito da retomada da irrigação na recuperação do  $\Psi_{am}$  e trocas gasosas das plantas estressadas foi avaliado a cada quatro dias (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 dias após a retomada da irrigação). Os efeitos do estresse nas variáveis bioquímicas foram avaliados em quatro tempos, três deles durante o período de estresse representando condições de déficit hídrico progressivo, caracterizados por  $\Psi_{am}$  de aproximadamente -2,0 MPa, -3,0 MPa e -4,0 MPa; e uma última medição realizada após período de reidratação completa de pelo menos um dos híbridos. Os efeitos do estresse nas variáveis de crescimento foram avaliados apenas ao final do período de estresse (Dia 57), portanto, em um só tempo. Todas as avaliações foram sempre

realizadas com seis repetições por tratamento (combinação de híbrido x regime hídrico x tempo), sendo uma planta por vaso considerada repetição experimental. Ressalta-se que o experimento foi instalado com dois grupos de plantas diferentes manejadas de igual maneira e submetidas aos mesmos regimes hídricos simultaneamente, sendo um grupo de plantas (Grupo 1) utilizado para análises fisiológicas e um segundo grupo (Grupo 2), o qual foi mantido intacto durante todo o experimento, foi utilizado para as análises de crescimento, evitando-se erros experimentais em razão das coletas de amostras para análises fisiológicas/bioquímicas. A avaliação da recuperação fisiológica foi realizada avaliando-se as mesmas plantas previamente estressadas (Grupo 1) submetidas à irrigação conforme previamente descrito. A recuperação foi conduzida até que as plantas de pelo menos um dos híbridos recuperasse plenamente seu status hídrico. Para as avaliações do  $\Psi_{am}$  e das trocas gasosas e para a coleta de amostras para análises bioquímicas, foram selecionados folíolos medianos da terceira ou quarta folha madura a partir do ápice. Para as análises bioquímicas, as amostras foram coletadas imediatamente após a determinação das trocas gasosas e congeladas em nitrogênio líquido, onde permaneceram até o momento das análises.

### 2.2.2 $\Psi_{am}$ e trocas gasosas

O  $\Psi_{am}$  foi determinado por meio de uma bomba de pressão tipo Scholander (mod. Pms Instrument Co., Corvallis, USA) conforme descrito por Pinheiro et al. (2008).

A taxa de assimilação líquida do  $CO_2$  ( $A$ ), a condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ ) e a razão entre concentração intercelular e atmosférica de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ) foram determinadas por meio de um analisador de gases a infravermelho (LCpro+, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). As medições foram realizadas entre 7:40 e 8:40 h sob concentração ambiente de  $CO_2$  (média de  $450 \mu\text{mol mol } CO_2$ ) e radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de  $1,100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (SURESH et al., 2012). A RFA foi fornecida por meio de uma fonte luminosa (LCM – 014/B, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK) acoplada à câmara do analisador de gases. A partir dos dados obtidos foi calculada a eficiência instantânea do uso da água, expressa pela razão entre  $A$  e  $E$  ( $A/E$ ).

### 2.2.3 Determinação de hexoses, aminoácidos totais, malato, proteína e amido

Amostras foliares liofilizadas (25 mg) foram submetidas à extração etanólica (80%), a quente ( $80^\circ\text{C}$ ) determinando-se, na fração solúvel em etanol, as concentrações de glicose,

frutose, aminoácidos e malato (FERNIE et al., 2001). As concentrações de glicose, frutose e sacarose foram quantificadas por meio de tampão 500 mM Imidazol/25 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 6,9), acrescidos de 2 mM NAD<sup>+</sup>, 1 mM ATP e 1 Unidade (U) de Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49) por reação; com subsequentes adições de 1 U/reação de hexocinase (EXK, EC 2.7.1.1) para a quantificação dos teores de glicose, 1 U/reação de Glicose-6-fosfato isomerase (PGI, EC 5.3.1.9) para a quantificação da frutose e 1 U/reação de invertase (EC 3.2.1.26) para a quantificação da sacarose, sendo as atividades enzimáticas acompanhadas pela produção de NADPH evidenciada pelo acréscimo da absorvância (ABS) a 340 nm (TRETHERWEY et al., 1998). A quantificação de aminoácidos totais foi realizada em 50 µL de tampão [1M de NaOH/0,2% (p/v) de ácido ascórbico; pH 5,2] acrescido de 100 µL de 1% (p/v) de ninhidrina e 50 µL de amostra extraída, com determinação pontual da ABS a 595 nm (GIBON et al., 2004). A concentração de malato foi determinada em 144 µL de meio de reação composto de 200 mM de Tricina/10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0; 10 mM de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio; 20 mM etossulfato de fenazina, 30 mM NAD<sup>+</sup> e 1 U/reação de malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), 40 µL de amostra extraída e 6 µL de água, seguindo-se de leitura das amostras a 570 nm (NUNES-NESI et al., 2007). Ressalta-se que a alíquota de extrato utilizada em cada ensaio foi previamente determinada em ensaios preliminares de linearidade e o seu volume foi considerado para os cálculos.

Na fração insolúvel (resíduo da extração etanólica), determinaram-se as concentrações de proteínas totais e amido. A determinação de proteínas baseou-se na hidrólise da fração insolúvel da extração etanólica em 1000 µL de 200 mM de KOH a 90 °C (GIBON et al., 2004), seguido de reação de coloração pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a quantificação da concentração de amido adicionou-se 30 µL de Tampão Citrato (300 mM de citrato de sódio/300 mM de ácido cítrico; pH 4,6) e 3 U/reação de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) e 20 µL de amostra extraída, seguidos de hidrólise a 55 °C. Para a determinação, utilizou-se o mesmo tampão usado para a quantificação dos açúcares, com acréscimo de 1 U/reação da enzima hexocinase (EXK, EC 2.7.1.1), acompanhando-se o acréscimo da Abs a 340 nm (FERNIE et al., 2001).

As leituras das absorvâncias de todas as análises supracitadas foram realizadas em leitor de microplacas do tipo ELISA (VersaMax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, software SoftMax® Pro5).

#### 2.2.4 Atividades enzimáticas

No momento da maceração de cada amostra foi adicionado 30 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) diretamente ao almofariz de porcelana. Para as análises enzimáticas foram utilizados os sobrenadantes obtidos das centrifugações, cujas concentrações de proteínas solúveis totais foram determinadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A Ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco, EC 4.1.1.39) foi obtida em 800  $\mu$ L de tampão de extração composto de 500 mM de HEPES (pH 7,5),  $MgCl_2$  100 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, (pH 8,0), 10 mM Benzamida, 10 mM ácido e-aminocapróico, 2,5% (v/v) BSA (GEIGENBERGER; STITT, 1993). A atividade total da Rubisco foi determinada por medição do consumo de NADH a 340 nm (SULPICE et al. 2007). A oxidase do glicolato (GLOx, EC 1.1.3.15) foi extraída em 3 mL de 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM ditioneitol (DTT), 0,01 % (v/v) Triton X-100 (BOOKER et al., 1997). A atividade da GLOx foi determinada medindo-se a produção de glicolato fenil-hidrazona a 324 nm (BOOKER et al., 1997). A Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi extraída em 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), EDTA 2 mM, 0,1% (v/v) Triton X-100, 20 mM ascorbato (NAKANO; ASADA, 1981; HAVIR; MCHALE, 1987). A atividade de CAT foi determinada após oxidação de  $H_2O_2$  a 240 nm (HAVIR; MCHALE, 1987). A pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase, EC. 2.7.7.27) foi extraída em 9,8  $\mu$ L do meio contendo 50 mM de pirofosfato de Na; 300 mM de gliceraldeído-3-fosfato; 1 U/reação de quinase do glicerol (GK, EC 2.7.1.30). Para a quantificação da atividade da enzima foi utilizado 50  $\mu$ L do meio de reação contendo 1000 mM tricina/KOH (pH 9,0), 50 mM NADH, 500 mM oxidase do gliceraldeído-3-fosfato (GAPD, EC 1.9.3.1), 500 mM desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH, EC 1.2.1.12) e 1000 mM  $MgCl_2$ . O decréscimo da ABS a 340 nm foi acompanhado em função do tempo (GIBON et al., 2004). A sintase da sacarose-fosfato (SPS, EC 2.4.1.14) foi extraída em 14  $\mu$ L de meio de reação composto de 100 mM Hepes/KOH, (pH 7,4), 5 mM  $MgCl_2$ , 0,3 mM DTT, 3 mM UDP-glicose. O meio de reação utilizado foi composto de 3 Mm frutose-6-fosfato e 5 mM glicose-6-fosfato, com leitura pontual da ABS a 620 nm (JENNER et al., 2001). A sintase da sacarose (SuSy, EC 2.4.1.13) foi extraída em 1000  $\mu$ L de meio composto por 100 mM Hepes (pH 7,8), 4 mM  $MgCl_2$ , 1 mM fosfoenolpiruvato, 2 mM NADH, 4 mM UDP-glicose, 3 U/Reação de piruvato quinase (PK, EC 2.4.1.1) e 0,6 U/ reação de lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27). Para a quantificação da atividade enzimática foram utilizados 250  $\mu$ L do meio de reação 1000 mM Imidazole/50 mM  $MgCl_2$  (pH 6,9), 50 mM  $NAD^+$ , 50 mM ATP e 1 U/reação de desidrogenase da glicose-

6-fosfato (G6PD, EC 1.1.1.49), acompanhando-se o decréscimo da Abs a 340 nm (NUNES-NESI et al., 2005). A invertase alcalina (EC 3.2.1.26) foi extraída em meio de reação contendo 100 mM HEPES (pH 7,5) e 400 mM sacarose. A Invertase ácida (EC 3.2.1.26) foi extraída em 80 mM de acetato de Na (pH 4,6) e 400 mM de sacarose. Após incubação os extratos foram quantificados por meio de reação contendo 150  $\mu$ L total de 1000 mM imidazole, 50 mM  $MgCl_2$  (pH 6,9), 50 mM  $NAD^+$ , 50 mM ATP e 1 U/reação de desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PD, EC 1.1.1.49) e adição 1U/reação de hexocinase (EXK, EC 2.7.1.1) em 30  $\mu$ L de amostra, medindo-se o incremento na Abs a 340 nm (PRAXEDES et al., 2006; RONCHI et al., 2006). A desidrogenase do malato dependente de  $NAD^+$  (MDH- $NAD^+$ , EC 1.1.37) foi obtida em 800  $\mu$ L de tampão contendo 500 mM de HEPES (pH 7,5), 100 mM  $MgCl_2$ , 10 mM EDTA, 10 mM EGTA (pH 8,0), 10 mM benzamida, 10 mM ácido  $\epsilon$ -aminocapróico, 2,5 % (v/v) BSA (GEIGENBERGER; STITT, 1993). A atividade da MDH- $NAD^+$  foi determinada pela quantificação da taxa de oxidação do NADH a 340 nm (NUNES-NESI et al., 2005).

As leituras das absorvâncias de todas as análises supracitadas foram realizadas em leitor de microplacas do tipo ELISA (VersaMax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, software SoftMax® Pro5).

### 2.2.5 Variáveis de crescimento

As variáveis de crescimento relacionadas à morfologia da copa e sistema radicular determinadas foram: (i) altura relativa das plantas; medindo-se a região compreendida entre o coleto da planta e o ápice das folhas fechadas por meio de uma trena presa a uma régua de madeira; (ii) número de folhas, determinado pela contagem diária do número de folhas e folíolos existentes na planta durante o período experimental (57 dias); (iii) a área foliar total (AFT), determinada utilizando-se o programa de processamento digital de imagens Image J (Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA, 2010); (iv) as massas secas das partes da planta (folhas, bulbo e sistema radicular), as quais foram obtidas por meio de secagem das partes em estufa a 72°C até a massa constante; (v) a área foliar específica (AFE), calculada como a razão entre AFT e MS da folha, (vi) a biomassa total da plantas, calculada como a soma das massas secas das partes (folhas, bulbo e sistema radicular) e (vii) a razão raiz-parte aérea, calculada como o quociente entre massa seca de sistema radicular e massa seca das partes aéreas (bulbo e folhas).

## 2.2.6 Análises estatísticas

Os efeitos de híbridos (BRS Manicoré e BRS C 2501), regimes hídricos (controle e déficit hídrico) e possíveis interações entre eles ao longo do período experimental (efeito do tempo) sobre  $\Psi_{am}$  e trocas gasosas foram analisadas utilizando-se análise de variância com medidas repetidas no tempo, cuja significância foi averiguada pelo teste-*F* (LIMA et al., 2010) utilizando o software estatístico Systat (v. 12.0.0.1, 2012, Systat Software Inc., Paris, França). As variáveis bioquímicas e de crescimento foram submetidas à ANOVA e as comparações entre médias realizadas pelo Teste Tukey ( $P < 0,05$ ), utilizando-se o software SAS (v. 8.0, 1999, SAS Institute, Cory, EUA).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Potencial hídrico foliar e trocas gasosas durante o período de estresse e recuperação

As médias de  $\Psi_{am}$  obtidas para as plantas irrigadas de ambos os híbridos ao longo de todo o período de estresse (57 dias) foram em torno de -0,12 MPa (Figura 3a). As plantas submetidas ao déficit hídrico dos dois híbridos apresentaram um padrão similar de reduções no  $\Psi_{am}$  em função da redução da disponibilidade hídrica, sendo que em alguns dias de avaliação as plantas do BRS Manicoré mostraram-se um pouco mais hidratadas que as plantas do BRS C 2501 (Figura 3a;  $P < 0,05$ ; Tabela 1). As médias de  $\Psi_{am}$  nas plantas estressadas do BRS Manicoré foram iguais a -1,89 MPa no dia 21, -2,87 MPa no dia 34 e -4,03 MPa no dia 57, enquanto as médias de  $\Psi_{am}$  nas plantas estressadas do BRS C 2501 foram iguais a -2,09 MPa no dia 21, -2,89 MPa no dia 34 e -4,40 MPa no dia 57 (Figura 3a e Tabela 1). As reduções no  $\Psi_{am}$  registradas em ambos os híbridos nos dias 21, 34 e 57 indicam que o status hídrico das plantas foi expressivamente reduzido em relação às plantas controle, representando, para efeito de comparação, situações de deficiência hídrica progressivas e cada vez mais severas (Figura 3a;  $P < 0,001$ ; Tabela 1).

As plantas irrigadas dos dois híbridos apresentaram médias similares de  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $C_i/C_a$  e  $A/E$  ao longo dos diferentes dias de experimento (Figura 3;  $P < 0,001$ ; Tabela 1). No entanto, aumentos na  $A$  e  $A/E$  em paralelo a diminuições na  $g_s$  e  $E$  em alguns dias de experimento foram registrados e essas variações devem estar relacionadas às pequenas

variações climáticas observadas ao longo do período de 57 dias da fase de estresse (Figura 3;  $P < 0,001$ ; Tabela 1).

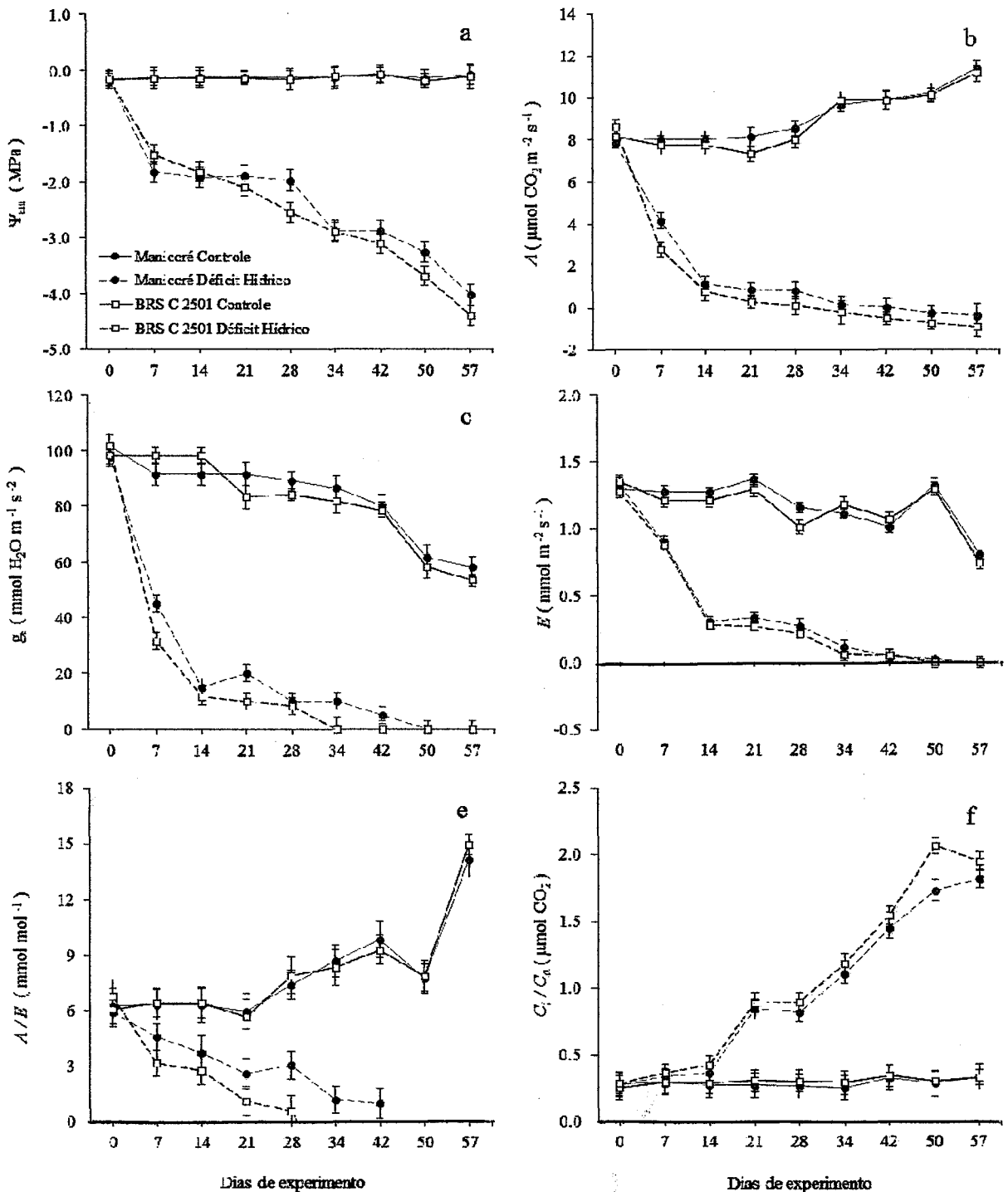
No híbrido BRS Manicoré, a redução do  $\Psi_{am}$  para um valor médio de  $-1,82$  MPa nas plantas estressadas (dia 7) foi acompanhada por reduções marcantes na  $A$  (48%), na  $g_s$  (51%) e na  $E$  (29%) (Figura 3b, 3c e 3d). No híbrido BRS C 2501, a suspensão da irrigação por sete dias causou uma redução no  $\Psi_{am}$  para um valor médio de  $-1,52$  MPa, a qual foi acompanhada por reduções de 64, 68 e 28% na  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  em relação às plantas controle (Figura 3b, 3c e 3d). No dia 14, reduções ainda mais expressivas na  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  foram observadas nas plantas estressadas de ambos os híbridos em relação às suas respectivas plantas irrigadas ( $P < 0,001$ ; Tabela 1). Essas reduções na  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  foram, respectivamente, da ordem de 86, 84 e 76% para o BRS Manicoré e de 90, 88 e 77% para o BRS C 2501 (Figura 3b, 3c e 3d).

Com o progresso do estresse, novas reduções foram observadas na  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  em ambos os híbridos (Figura 3; Tabela 1). Nas medições realizadas a partir do dia 34, as plantas estressadas do BRS C 2501 passaram a apresentar valores negativos de  $A$ , cujas médias variaram de  $-0,22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no dia 34 a  $-0,89 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no dia 57 (Figura 3b). Em contraste, as médias de  $A$  nas plantas estressadas do BRS Manicoré avaliadas aos 34 e 42 dias de experimento foram, respectivamente, iguais a  $0,14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $0,04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , enquanto valores negativos de  $A$  foram apenas observados aos 50 dias ( $-0,26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e aos 57 dias ( $-0,37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de experimento (Figura 3b). A  $g_s$  nas plantas estressadas do BRS C 2501 alcançaram valores iguais a zero a partir do dia 34, mantendo-se assim até o final do experimento; em contraste, as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram médias de  $g_s$  iguais a 10 e 5  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nos dias 34 e 42, enquanto estômatos completamente encerrados ( $g_s$  igual a zero) somente foram observados aos 50 e 57 dias de experimento (Figura 3c). A média da  $E$  nas plantas estressadas do BRS C 2501 foi de  $0,06 \text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nos dias 34 e 42, tornando-se nula nas medições realizadas nos dias 50 e 57; em contraste, as médias da  $E$  nas plantas estressadas do BRS Manicoré foram progressivamente reduzidas entre os dias 34 ( $0,11 \text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 50 ( $0,02 \text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e completamente suprimida no dia 57, com média igual a zero (Figura 3d; Tabela 1).

A razão  $C_i/C_a$  manteve-se praticamente constante (valores médios de  $0,294 \text{mol mol}^{-1}$   $\text{CO}_2$ ) nas plantas irrigadas de ambos os híbridos ao longo de todo o período experimental (Figura 3e e Tabela 1). Por outro lado, as plantas estressadas de ambos os híbridos apresentaram aumentos expressivos ( $P < 0,001$ ; Tabela 1) e de similar magnitude na razão

$C_i/C_a$  (Figura 3e). Esses aumentos na  $C_i/C_a$  ocorreram em paralelo às reduções na  $A$  e  $g_s$  para ambos os híbridos.

**Figura 3** - Potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\Psi_{am}$ ; Fig. 3a), taxa de assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A$ ; Fig. 3b), condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ ; Fig. 3c), transpiração ( $E$ ; Fig. 3d), eficiência estantânea do uso da água ( $A/E$ ; Fig. 3e) e razão entre a concentração intercelular e atmosférica de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ; Fig. 3f) em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) sob plena irrigação (Controle) e déficit hídrico (Déficit Hídrico) (Dias 0, 7, 21, 28, 34, 42, 50 e 57). Os dados são a média de seis repetições  $\pm$  DP.



**Tabela 1** - Teste - *F* estatístico e níveis de significância associados aos efeitos dos híbridos (H) e regimes de hídricos (RH) com as interações entre os tempos de avaliação experimental (T) sobre as variáveis fisiológicas em dois híbridos de *E. guineensis* (BRS Manicoré e BRS C 2501) aos 57 dias de imposição do déficit hídrico.

Variáveis	Fatores					
	H	RH	H x RH	T x H	T x RH	T x H x RH
$\Psi_{am}$	7,33*	1613,14***	5,91*	4,56***	269,16***	4,34***
<i>A</i>	15,63***	1613,14***	7,30*	4,03**	224,32***	7,51***
$g_s$	18,11***	5806,21***	n.s.	3,16*	189,27***	2,21*
<i>E</i>	4,92*	2306,41***	n.s.	n.s.	50,68***	n.s.
<i>A/E</i>	178,53***	2486,85***	186,42***	95,80***	811,42***	100,81***
$C_i/C_a$	168,92***	29737,18***	88,78***	13,84***	2067,59***	12,00***

Níveis de significância: \*.  $P < 0,05$ ; \*\*.  $P < 0,01$ ; \*\*\*.  $P < 0,001$ ; n.s., não-significante.

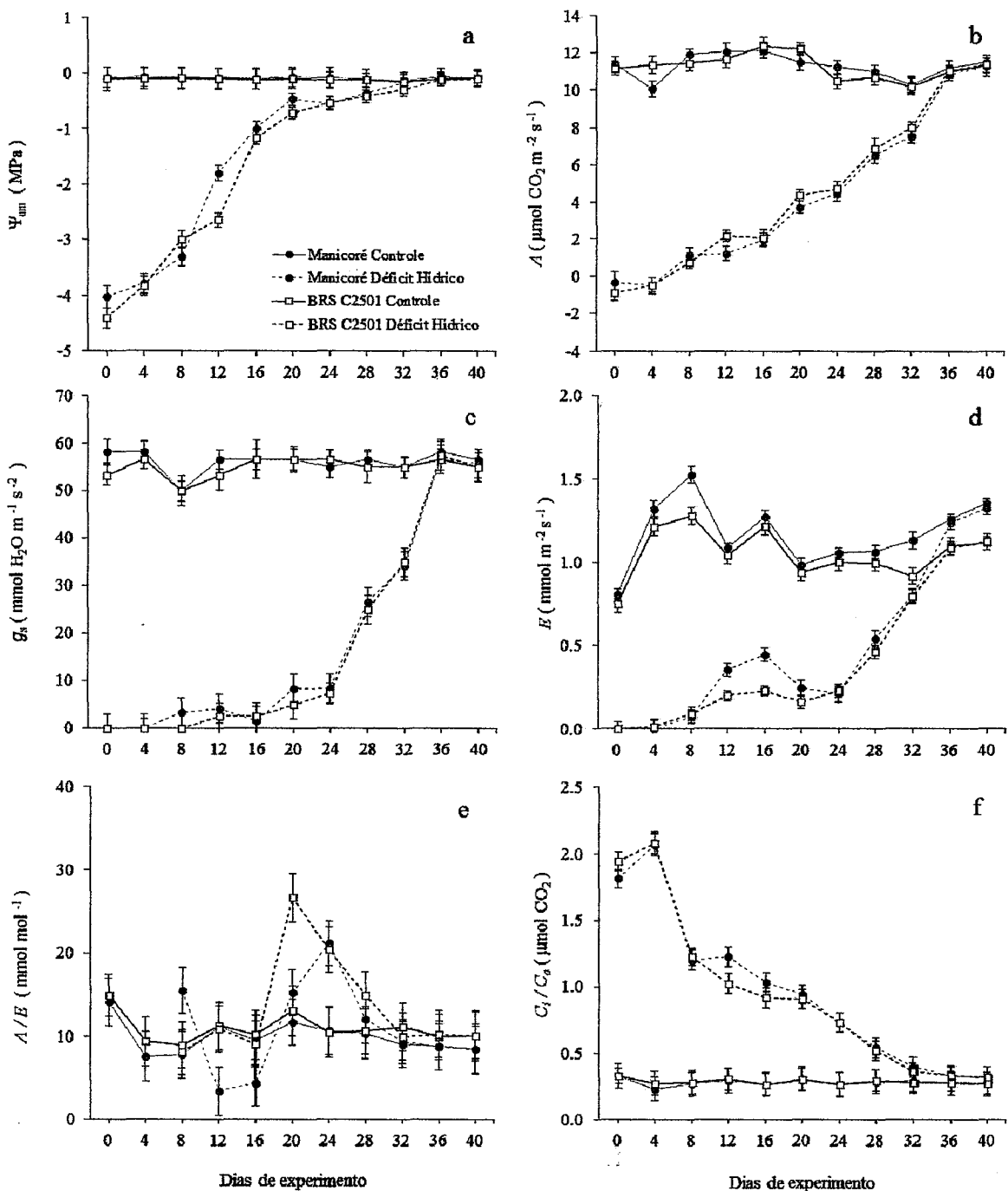
A *A/E* nas plantas irrigadas não diferiu entre híbridos, mas foi significativamente maior entre os dias 28 e 57 que entre os dias 0 e 21 (Figura 3f;  $P < 0,001$ ; Tabela 1). Nas plantas estressadas, foi observado que a *A/E* foi mais expressivamente reduzida no híbrido BRS C 2501 que no BRS Manicoré. Entre os dias 0 e 34, a *A/E* variou de 5,93 mmol mol<sup>-1</sup> a 1,22 mmol mol<sup>-1</sup> no híbrido Manicoré e de 6,77 mmol mol<sup>-1</sup> a -3,75 mmol mol<sup>-1</sup> no C 2501 (Figura 3f). A *A/E* negativa no BRS C 2501 no dia 34 ocorreu em razão dos valores negativos de *A* observados nessas plantas (Figura 3b). No dia 42, a *A/E* no híbrido BRS Manicoré foi reduzida para 1,00 mmol mol<sup>-1</sup> e nos dias seguintes (dias 50 e 57) esta variável não foi calculada em razão da *E* ter sido nula, fato este ( $E = 0$ ) que ocorreu para as plantas estressadas do BRS C 2501 do dia 42 em diante (Figura 3d e 3f;  $P < 0,001$ ; Tabela 1).

Apesar das diferenças entre os híbridos observadas durante o estresse, foi observado que ambos recuperaram seu status hídrico e trocas gasosas após a retomada da irrigação, ainda que isto tenha ocorrido de forma extremamente lenta (Figura 4). Nesse caso, a reidratação das plantas previamente estressadas promoveu uma recuperação completa do  $\Psi_{am}$ , com valores médios de -0,09 MPa para ambos os híbridos a partir de 32 dias de recuperação (Figura 4a).

As variáveis de trocas gasosas (*A*,  $g_s$ , *E*, *A/E* e  $C_i/C_a$ ) foram recuperadas plenamente para ambos os híbridos, no entanto de forma mais lenta que a recuperação do status hídrico avaliado por meio do  $\Psi_{am}$  (Figura 4a). A recuperação da *A* teve início a partir do oitavo dia da retomada da irrigação; porém, sua recuperação completa só foi obtida aos 36 dias da retomada da irrigação, quando as médias de *A* não mais diferiram entre plantas recuperadas e àquelas mantidas sob plena irrigação (Figura 4b e Tabela 2). A recuperação da  $g_s$  ocorreu mais lentamente que a recuperação da *A*, com pequenas aumentos entre o oitavo e vigésimo quarto dia de reidratação, seguindo-se de aumentos bem mais expressivos dos 36 dias em diante, até atingir recuperação completa aos 36 dias da retomada da irrigação (Figura 4c, Tabela 2). A *E* de ambos os híbridos seguiu padrão similar de recuperação àquele observado para  $g_s$ , com

recuperação completa em relação às plantas permanentemente irrigadas deu-se aos 36 dias de experimento (Figura 4d e Tabela 2).

**Figura 4** - Potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\Psi_{am}$ ; Fig. 4a), taxa de assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A$ ; Fig. 4b), condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ ; Fig. 4c), transpiração ( $E$ ; Fig. 4d), eficiência estantânea do uso da água ( $A/E$ ; Fig. 4e) e razão entre a concentração intercelular e atmosférica de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ; Fig. 4f) em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) sob plena irrigação (Controle) e déficit hídrico (Déficit Hídrico) (Dias 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40) após a retomada da irrigação. Os dados são a média de seis repetições  $\pm$  DP.



Em razão dos resultados obtidos para  $A$  e  $E$ , foi observado que a recuperação da razão  $A/E$  para os híbridos avaliados ocorreu a partir do dia 8 em diante, pois nos dias 0 e 4 esta variável não foi calculada em razão da  $E$  ter sido nula ( $E = 0$ ) (Figura 4e, Tabela 2).

Uma progressiva diminuição na  $C_i/C_a$  das plantas em recuperação de ambos os híbridos foi observada a partir do oitavo dia da retomada da irrigação, fato este concorrente aos aumentos na  $A$  e  $g_s$ . A  $C_i/C_a$  para ambos os híbridos foi igualada às suas respectivas plantas controle aos 32 dias da retomada da irrigação (Figura 4f e Tabela 2).

**Tabela 2** - Teste -  $F$  estatístico e níveis de significância associados aos efeitos dos híbridos (H) e regimes de hídricos (RH) com as interações entre os tempos de avaliação experimental (T) sobre as variáveis fisiológicas em dois híbridos de *E. guineensis* (BRS Manicoré e BRS C 2501) aos 40 dias de reidratação.

Variáveis	Fatores					
	H	RH	H x RH	T x H	T x RH	T x H x RH
$\Psi_{am}$	n.s.	190,67***	n.s.	n.s.	89,59***	n.s.
$A$	n.s.	639,98***	n.s.	n.s.	72,55***	n.s.
$g_s$	n.s.	1399,38***	n.s.	n.s.	75,75***	n.s.
$E$	n.s.	209,24***	n.s.	n.s.	14,13***	n.s.
$A/E$	n.s.	6,59*	4,40*	n.s.	10,82***	n.s.
$C_i/C_a$	n.s.	5570,91***	n.s.	10,78***	2136,75***	11,07***

Níveis de significância: \*.  $P < 0,05$ ; \*\*.  $P < 0,01$ ; \*\*\*.  $P < 0,001$ : n.s., não-significante.

### 2.3.2 Metabólitos primários

Reduções progressivas na concentração de amido foliar em ambos os híbridos comparados às suas respectivas plantas controle foram observadas em resposta ao déficit hídrico. Nesse caso, as concentrações de amido nas plantas estressadas do BRS Manicoré e BRS C 2501 foram reduzidas em 53% e 73% no dia 21 e 73% e 86% no dia 34 em relação às suas respectivas plantas controle (Figura 5a). Para o BRS Manicoré, a concentração de amido foi ainda mais reduzida no dia 57 (86% em relação ao controle), enquanto reduções adicionais na concentração de amido no BRS C 2501 não foram observadas, permanecendo, portanto, 86% menor que nas plantas irrigadas (Figura 5a). Comparando-se os híbridos em um mesmo dia de avaliação, foi observado que a capacidade de armazenamento de amido foliar foi menos afetada no BRS Manicoré que no BRS C 2501 (vide dias 21 e 34, Figura 5a), enquanto a capacidade de armazenamento de amido em ambos os híbridos foi igualmente afetada pelo déficit hídrico mais prolongado (dia 57) (Figura 5a). Quando a irrigação foi retomada (a partir dos 57 dias), as concentrações de amido foram aumentadas, alcançando recuperação de 86% para o BRS Manicoré e 68% para o BRS C 2501 ao final do período de recuperação (dia 97) (Figura 5a).

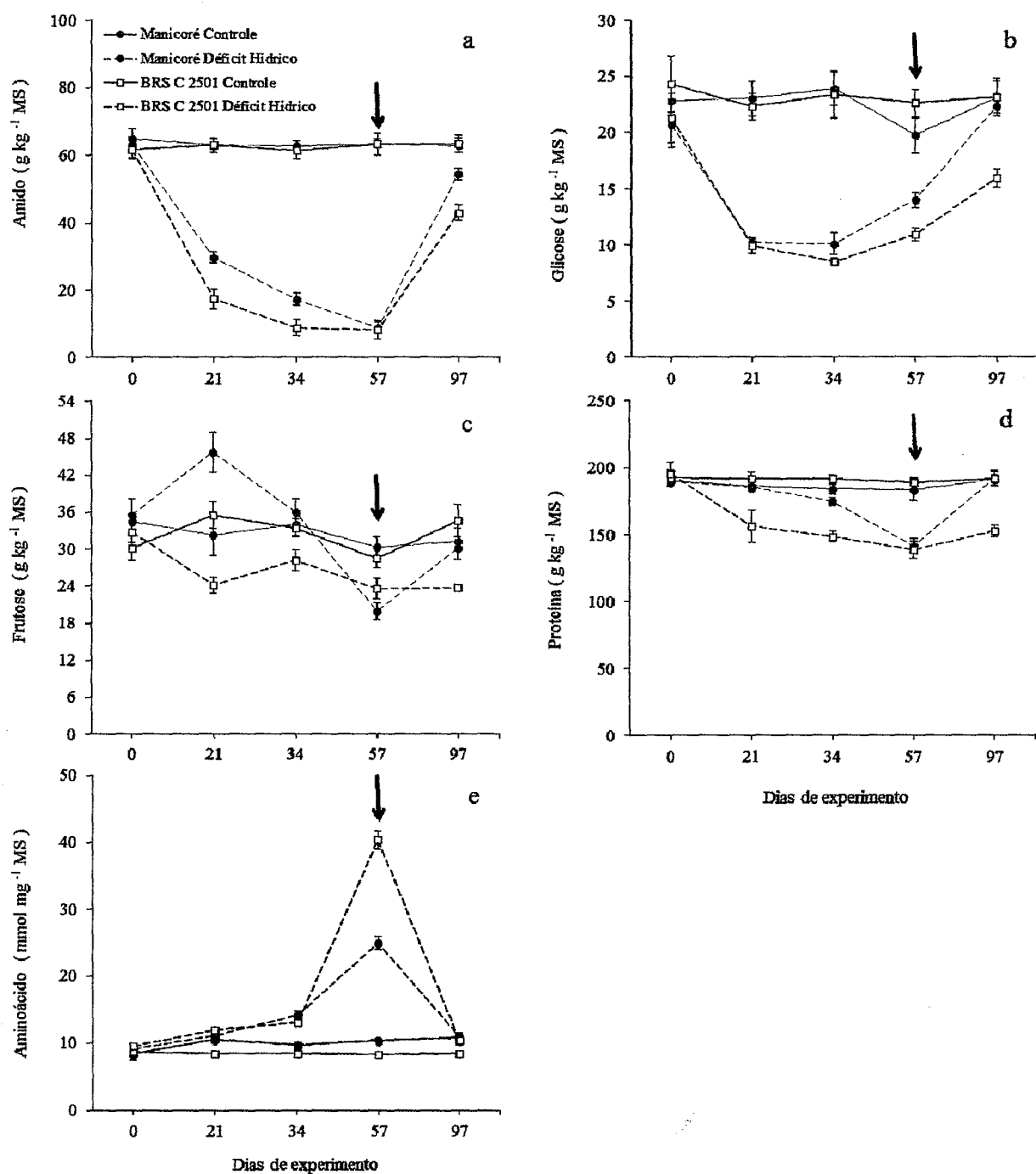
A concentração foliar de glicose foi reduzida em 55% nas plantas estressadas dos dois híbridos aos 21 dias de déficit hídrico. Aos 34 dias, as concentrações de glicose foram 58% e 64% menores nas plantas estressadas do BRS Manicoré e BRS C 2501 em relação às respectivas plantas controle (Figura 5b). A partir do dia 34, a concentração foliar de glicose foi aumentada em ambos os híbridos, diminuindo as diferenças previamente registradas entre plantas irrigadas e estressadas. Assim, no dia 57, as concentrações de glicose foram 29% e 52% menores nas plantas estressadas do BRS Manicoré e BRS C 2501 em relação aos respectivos controles (Figura 5b). Durante o estresse, diferenças genotípicas foram observadas nos dias 34 e 57, de forma que as concentrações de glicose foram 57% e 29% maiores no BRS Manicoré que no BRS C 2501 (Figura 5b). Ao final da reidratação (dia 97), as concentrações de glicose foram reestabelecidas em 96% para o BRS Manicoré e 70% para o BRS C 2501 (Figura 5b).

As concentrações de frutose nas plantas estressadas do híbrido BRS C 2501 foram reduzidas em relação às suas plantas controle. Tais reduções foram de 32%, 16% e 17% nos dias 21, 34 e 57 (Figura 5c). Por outro lado, as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram, em relação às plantas controle, um aumento de 41% na concentração de frutose aos 21 dias da suspensão da irrigação (Figura 5c). Quando o estresse foi prolongado até 34 dias, a concentração de frutose das plantas estressadas diminuiu em relação às médias obtidas para o dia 21, mas não diferiu das plantas irrigadas. No entanto, com a evolução do estresse até os 57 dias, uma redução significativa de 34% na concentração de frutose mediada pelo déficit hídrico foi observada (Figura 5c). Quando o status hídrico da planta foi reestabelecido, as concentrações de frutose avaliada ao final do período de recuperação (40 dias após a retomada da irrigação, ou seja, dia experimental 97) foram reestabelecidas em 97% para o BRS Manicoré e 69% para o BRS C 2501 em relação às respectivas plantas permanentemente irrigadas (Figura 5c).

Uma diminuição na concentração de proteínas solúveis totais (PST) foi observada para os dois híbridos em função do déficit hídrico, sendo esta resposta mais contundente para o BRS C 2501 que para o BRS Manicoré. No primeiro, o déficit hídrico promoveu reduções de 18%, 22% e 27% na concentração de PST das plantas estressadas comparadas ao controle respectivamente nos dias 21, 34 e 57 (Figura 5d). No segundo, reduções significativas na concentração de PST foram observadas aos 34 dias (5%) e 57 dias (23%) de experimento (Figura 5d). Além disso, foi observado que a concentração de PST foi totalmente

reestabelecida para as plantas recuperadas do BRS Manicoré, enquanto no BRS C 2501 a concentração de PST foi restabelecida em 80% em relação ao controle (Figura 5d).

**Figura 5** - Concentração foliar de amido (Fig. 5a), glicose (Fig. 5b), frutose (Fig. 5c), proteínas (Fig. 5d) e aminoácidos (Fig. 5e) em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) sob plena irrigação (Controle) e déficit hídrico (Déficit Hídrico) (Dias de déficit 0, 21, 34, 57 e reirrigação dia 97). A seta indica último dia de déficit hídrico e primeiro dia de reidratação. Os dados são a média de seis repetições  $\pm$  DP.



A redução na concentração de PST em ambos os híbridos foi concomitante ao aumento na concentração de aminoácidos totais ( $AA_{Tot}$ ), porém, tais aumentos foram mais contundentes no BRS C 2501 que no BRS Manicoré. Tais diferenças foram mais expressivas sob déficit hídrico mais prolongado (dia 57). Nessa ocasião, a concentração de  $AA_{Tot}$  nas plantas estressadas dos híbridos BRS C 2501 e BRS Manicoré foram respectivamente maiores em 382% e 138% que nas suas plantas controle (Figura 5e). Para ambos os híbridos, as concentrações de  $AA_{Tot}$  foram plenamente reestabelecidas ao final do período de recuperação (Figura 5e).

### 2.3.3 Atividades da Rubisco, GLOx e CAT

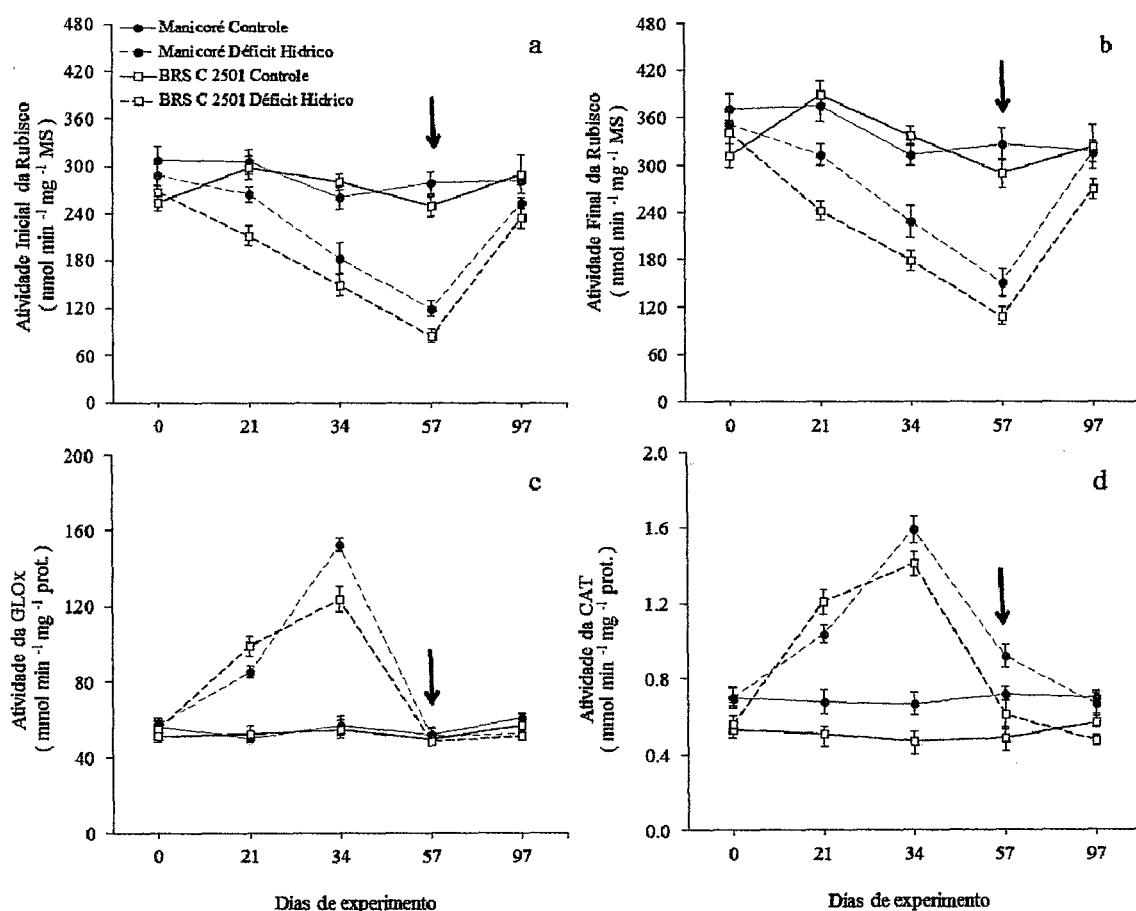
As plantas estressadas de ambos os híbridos apresentaram sucessivas reduções na atividade inicial e final da Rubisco, tendo sido mais expressivas para o BRS C 2501 que para o BRS Manicoré (Figuras 6a e 6b). Com relação à atividade inicial da Rubisco, as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram reduções de 14%, 30% e 57% aos 21, 34 e 57 dias de estresse e no BRS C 2501 essas reduções foram de 29%, 53% e 66% para esses mesmos dias de avaliação (Figura 6a). Com relação à atividade final da Rubisco, as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram reduções de 16%, 27% e 54% aos 21, 34 e 57 dias de estresse e no BRS C 2501 essas reduções foram de 38%, 47% e 63% para esses mesmos dias de avaliação (Figura 6b). Durante a recuperação, a atividade inicial da Rubisco foi restabelecida em 90% para o BRS Manicoré e em 81% para o BRS C 2501 (Figura 6a), enquanto a atividade final foi plenamente recuperada para o BRS Manicoré e em 83% para o BRS C 2501 (Figura 6b).

Com relação à atividade da GLOx as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram acréscimos de 69% e 168% aos 21 e 34 dias de estresse e no BRS C 2501 esses incrementos foram de 88% e 125% para esses mesmos dias avaliados (Figura 6c). Aos 57 dias de avaliação houve equidade na atividade da referida enzima, em relação às plantas controles de ambos os híbridos (Figura 6c). Durante a reidratação, a atividade da GLOx foi restabelecida em 87% para o BRS Manicoré e em 89% para o BRS C 2501 (Figura 6c).

A atividade da CAT apresentou comportamento semelhante à atividade da GLOx, ao longo do experimento. Logo, as plantas sob déficit hídrico de ambos os híbridos apresentaram acréscimos na atividade desta enzima. As plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram incrementos na atividade da CAT de 53%, 137% e 28% aos 21, 34 e 57 dias de estresse e no

BRS C 2501 esses acréscimos foram de 137%, 200% e 25% para esses mesmos dias avaliados (Figura 6d). Durante a reidratação, a atividade da CAT foi restabelecida em 98% para o BRS Manicoré e em 82% para o BRS C 2501 (Figura 6d).

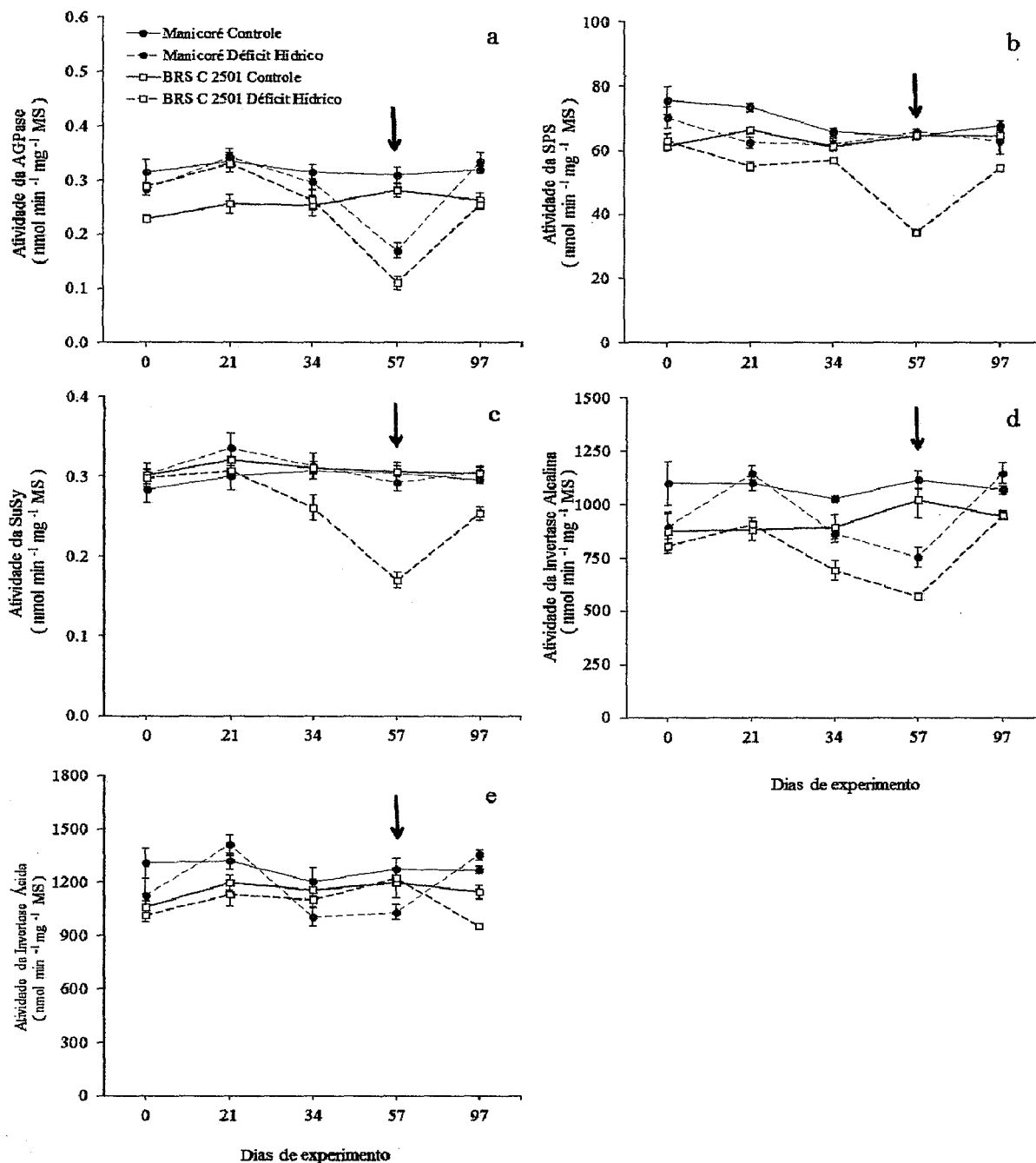
**Figura 6** - Atividades da rubisco: inicial (Fig. 6a) e total (Fig. 6b); glicolato oxidase (GLOx; Fig. 6c) e catalase (CAT; Fig. 6d) em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) sob plena irrigação (Controle) e déficit hídrico (Déficit Hídrico) (Dias de déficit 0, 21, 34, 57 e reirrigação dia 97). A seta indica último dia de déficit hídrico e primeiro dia de reidratação. Os dados são a média de seis repetições  $\pm$  DP.



#### 2.3.4 Enzimas responsáveis pela síntese de amido e sacarose

Quanto a atividade da AGPase, uma tendência de manutenção nas plantas sob déficit hídrico, em relação às plantas controles de ambos os híbridos pôde ser observada aos 21 e 34 dias de experimento (Figura 7a).

**Figura 7** - Atividade da pirofosforilase do ADP-glicose (AGPase; Fig. 7a), sintase da sacarose (SuSy; Fig. 7b), sintase da sacarose-fosfato (SPS total; Fig. 7c), invertase alcalina (Fig. 7d) e invertase ácida (Fig. 7e) em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) sob plena irrigação (Controle) e déficit hídrico (Déficit Hídrico) (Dias de déficit 0, 21, 34, 57 e reirrigação dia 97). A seta indica último dia de déficit hídrico e primeiro dia de reidratação. Os dados são a média de seis repetições  $\pm$  DP.



Aos 57 dias de avaliação, as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram reduções na atividade da AGPase de 45% e nas do BRS C 2501 essas reduções foram de 61% (Figura 7a). Após a retomada da irrigação, a atividade da AGPase foi restabelecida em 100% para o BRS Manicoré e em 96% para o BRS C 2501 (Figura 7a).

Uma tendência de decréscimo na atividade da SPS foi observada neste estudo para as plantas estressadas nos dois híbridos estudados, com ressalva para o BRS C 2501, o qual as reduções foram mais acentuadas (Figura 7b). As plantas sob déficit hídrico do BRS Manicoré apresentaram reduções de 15% e 6% aos 21 e 34 dias de estresse e no BRS C 2501 essas reduções foram de 17% e 7% para esses mesmos dias de experimento (Figura 7b). Aos 57 dias de avaliação o BRS Manicoré apresentou manutenção na atividade da SPS das plantas estressadas em relação às controles, já as plantas do BRS C 2501 apresentaram reduções de 47% para esse mesmo dia de avaliação (Figura 7b). Com a retomada da irrigação, a atividade da SPS foi reestabelecida na magnitude de 93% para o BRS Manicoré e 84% para o BRS C 2501 (Figura 7b).

Na atividade da sintase da sacarose (SuSy), houve uma manutenção nas plantas sob déficit hídrico em relação as plantas controles do BRS Manicoré em todos os dias avaliados (Figura 7c). Com relação à atividade da SuSy nas plantas estressadas do BRS C 2501 houve reduções de 4%, 16% e 44% aos 21, 34 e 57 dias de avaliação (Figura 7c). Durante a reidratação, a atividade da SuSy foi mantida para o BRS Manicoré e reestabelecida em 83% para o BRS C 2501 (Figura 7c).

A concentração de sacarose pode também ser influenciada pela atividade das invertases. Logo, durante todo o período experimental foi observada diferenças entre os híbridos em relação aos regimes hídricos para a atividade da invertase alcalina (Figura 7d). Manutenção da atividade desta enzima foi observada para as plantas sob estresse, em comparação as plantas controles, aos 21 dias para os dois híbridos (Figura 7d). As plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram reduções de 16% e 32% aos 34 e 57 dias de estresse e no BRS C 2501 essas reduções foram de 23% e 44% para esses mesmos dias de avaliação (Figura 7d). Recuperação total na atividade da invertase alcalina foi observada para ambos os híbridos após retomada da irrigação (97 dias) (Figura 7d).

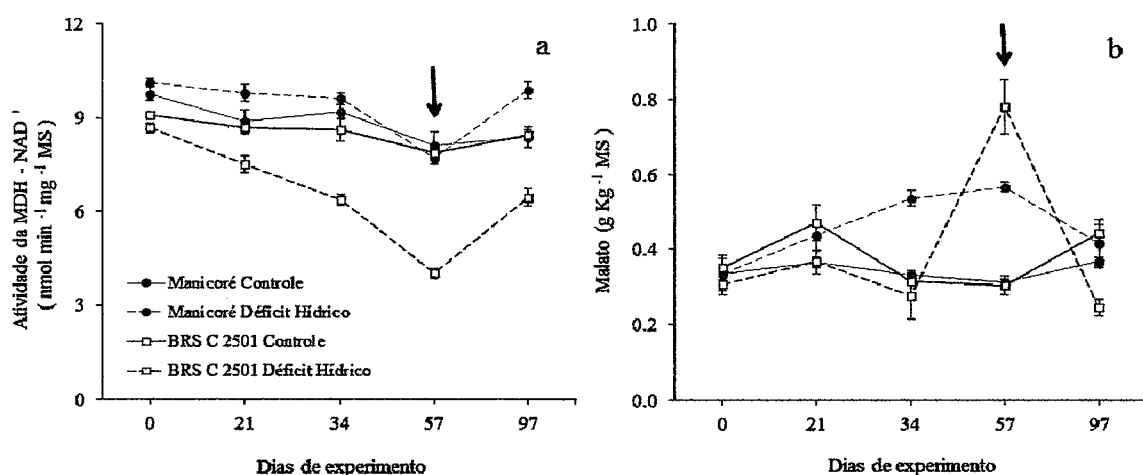
Comportamento de manutenção na atividade da invertase ácida nas plantas sob déficit hídrico, em comparação as plantas controles, foi verificado para o BRS C 2501 durante o período experimental (Figura 7e). Houve reduções na atividade da referida enzima para as plantas estressadas do BRS Manicoré na magnitude de 17% e 19% aos 34 e 57 dias de estresse (Figura 7e). Com a reirrigação (aos 97 dias), o BRS Manicoré reestabeleceu a atividade da invertase ácida, enquanto que o BRS C 2501 obteve apenas 83% da totalidade de sua atividade (Figura 7e).

### 2.3.5 Atividade da malato desidrogenase dependente de $\text{NAD}^+$ e concentração de malato

As plantas sob déficit hídrico do BRS Manicoré apresentaram comportamento semelhante às plantas controles na atividade da MDH –  $\text{NAD}^+$  em todo período experimental (Figura 8a). Por outro lado, as plantas estressadas do BRS C 2501 apresentaram reduções de 13%, 26% e 49% aos 21, 34 e 57 dias de estresse (Figura 8a). Após a reidratação, a atividade da MDH –  $\text{NAD}^+$  apresentou acréscimo de 18% nas plantas estressadas do BRS Manicoré e reestabelecimento de apenas 76% da atividade total das plantas sob déficit hídrico do BRS C 2501 (Figura 8a).

As concentrações de malato nas plantas sob déficit hídrico do BRS Manicoré apresentaram acréscimos de 20%, 63% e 81% aos 21, 34 e 57 dias de estresse e no BRS C 2501 foram verificadas reduções de 22%, 13% e acréscimo de 157% para esses mesmos dias avaliados (Figura 8b). Durante a reidratação, as concentrações de malato apresentaram acréscimo de 13% nas plantas estressadas do BRS Manicoré e reestabelecimento de apenas 45% nas concentrações deste metabólito nas plantas sob déficit hídrico do BRS C 2501 (Figura 8b).

**Figura 8** - Atividade da malato desidrogenase dependente de  $\text{NAD}^+$  (MDH –  $\text{NAD}^+$ ; Fig. 8a) e concentração de malato (Fig. 8b) em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) sob plena irrigação (Controle) e déficit hídrico (Déficit Hídrico) (Dias de déficit 0, 21, 34, 57 e reirrigação dia 97). Seta indica último dia de déficit hídrico e primeiro dia de reidratação. Os dados são a média de seis repetições  $\pm$  DP.



### 2.3.6 Variáveis de crescimento

Devido às reduções drásticas da  $g_s$  e da taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) sob condições de seca, uma desaceleração no crescimento das plantas estressadas foi evidente em

comparação às plantas mantidas sob constante irrigação ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3). As plantas estressadas de ambos os híbridos apresentaram reduções de mesma magnitude na altura da planta, número de folhas, massa seca de folhas e massa seca total. Por outro lado, as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram reduções mais expressivas no número de folíolos (52%) e massa seca de bulbo (56%) que as plantas do BRS C 2501 (redução média de 44% no número de folíolos e massa seca de bulbo) comparadas às suas respectivas plantas controle (Tabela 3). A AFT foi reduzida em 37% nas plantas estressadas do BRS Manicoré e em 48% no BRS C 2501, enquanto as médias de AFE foram respectivamente aumentadas em 19% e 5% nas plantas estressadas desses híbridos (Tabela 3). Por outro lado, as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram redução de 42% na massa seca de sistema radicular, enquanto tais reduções foram de 59% nas plantas estressadas do BRS C 2501 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Altura, número de folhas, número de folíolos e avaliação de biomassa em dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) sob plena irrigação (Irigado) e déficit hídrico (Déficit Hídrico), após 57 dias.

Variáveis	BRS Manicoré		BRS C 2501	
	Irigado	Déficit Hídrico	Irigado	Déficit Hídrico
Altura (m)	1,64 ± 0,05 <sup>B*</sup>	1,36 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,79 ± 0,03 <sup>A*</sup>	1,49 ± 0,04 <sup>a</sup>
Nº Folhas (unid.)	17,20 ± 0,69 <sup>A*</sup>	15,20 ± 0,59 <sup>a*</sup>	16,60 ± 0,41 <sup>B</sup>	14,80 ± 1,18 <sup>b</sup>
Nº Folíolos (unid.)	284 ± 19,34 <sup>B*</sup>	137 ± 13,24 <sup>b</sup>	338 ± 17,26 <sup>A*</sup>	193 ± 13,94 <sup>a</sup>
MS Bulbo (g)	220,11 ± 0,61 <sup>A*</sup>	96,45 ± 1,34 <sup>b</sup>	183,19 ± 1,42 <sup>B*</sup>	100,09 ± 1,62 <sup>a</sup>
MS Folha (g)	326,35 ± 1,92 <sup>A*</sup>	173,69 ± 1,47 <sup>a</sup>	292,81 ± 1,29 <sup>B*</sup>	145,19 ± 1,98 <sup>b</sup>
MS Raiz (g)	149,44 ± 1,16 <sup>A*</sup>	87,09 ± 1,34 <sup>a</sup>	140,97 ± 0,85 <sup>B*</sup>	58,18 ± 1,04 <sup>b</sup>
MS Total (g)	695,89 ± 1,59 <sup>A*</sup>	357,23 ± 2,59 <sup>a</sup>	616,97 ± 2,45 <sup>B*</sup>	303,46 ± 3,50 <sup>b</sup>
Raiz/Parte Aérea	0,27 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,32 ± 0,05 <sup>a*</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>A*</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>b</sup>
AFT (m <sup>2</sup> )	2,47 ± 0,37 <sup>A*</sup>	1,56 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,27 <sup>B*</sup>	1,11 ± 0,30 <sup>b</sup>
AFE (m <sup>2</sup> . kg <sup>-1</sup> )	75,69 ± 0,13 <sup>A</sup>	89,81 ± 0,17 <sup>a*</sup>	73,08 ± 0,24 <sup>B</sup>	76,45 ± 0,21 <sup>b*</sup>

Os dados são as médias de cinco repetições ± desvio padrão (DP). Letras maiúsculas e minúsculas na linha comparam os diferentes híbridos em um mesmo regime hídrico. Os asteriscos comparam plantas de um mesmo híbrido sob diferentes regimes hídricos. Letras diferentes e asterisco denotam diferenças significativas entre médias (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

Os efeitos negativos do déficit hídrico no crescimento da parte aérea foram, portanto, mais expressivos no BRS Manicoré, cujo sistema radicular foi menos afetado que no BRS C 2501. Esses resultados influenciaram diretamente na razão raiz-parte aérea (R/PA). Nesse caso, foi observado que as plantas estressadas do BRS Manicoré apresentaram um aumento de 19% na R/PA, enquanto as plantas do BRS C 2501 apresentaram uma redução de 20% nesta

variável. Isto posto, as plantas estressadas do BRS Manicoré tendem a investir no crescimento de um sistema radicular mais denso que as plantas do BRS C 2501.

## 2.4 Discussão

Sob condições de plena irrigação, os híbridos Manicoré e C 2501 apresentaram comportamento semelhante de  $\Psi_{am}$ ,  $A$ ,  $g_s$  e  $E$ . Valores semelhantes foram observados por diversos autores ao estudarem plantas plenamente irrigadas em palma de óleo (DUFRENE et al., 1992; NÍ; PALLARDY, 1992; FLEXAS et al., 2006; SURESH et al., 2010). Sob déficit hídrico o comportamento entre os dois híbridos diferiram ao longo dos 57 dias de experimento, uma vez que o BRS C 2501 apresentou reduções mais acentuadas em seu  $\Psi_{am}$  foliar, chegando aos 57 dias de imposição de estresse, com valores médios de -4,40 MPa, enquanto que o BRS Manicoré obteve valor médio de -4,03 MPa. Logo, reduções mais acentuadas para este híbrido foram observadas para as demais variáveis ( $A$  e  $g_s$ ), indicando que este híbrido possivelmente apresenta uma maior sensibilidade ao déficit hídrico que o BRS Manicoré. Comportamento este já esperado, uma vez que, Suresh et al. (2012), já havia constatado que diferentes híbridos de *E. guineenses* apresentam comportamentos diferentes na variáveis fisiológicas frente a imposição do déficit hídrico. Resultados equivalentes em palmeiras submetidas a mais de 20 dias sob DH foram observados para plantas jovens de Buriti (*Mauritia vinifera*), cujos valores médios de  $\Psi_{am}$  foram de -2,7 MPa (CALBO; MORAES, 1997). Valores próximos aqueles supracitados foram obtidos também por Calbo e Moraes (2000) (-5 MPa), ao estudarem o efeito do déficit hídrico em plantas de açaí (*Eutrepe oleraceae*).

Em termos fisiológicos, a diminuição de  $g_s$  ocorre como estratégia de economia hídrica, uma vez que quanto menor a  $g_s$  menor é a tendência de transpiração. Esta resposta foi observada em várias espécies. Dufrene et al. (2002) observaram valores próximos de zero para a  $g_s$  em plantas de palma de óleo submetidas ao déficit hídrico. Reduções expressivas em  $g_s$  em resposta à diminuição do  $\Psi_{am}$  foram também observados por Ni e Pallardy (1992) e Flexas et al. (2006) em plantas de palma de óleo, bem como em outras oleaginosas como o girassol (TEZARA et al., 2008) e a pupunheira (*Bactris gasipaes*) (OLIVEIRA et al., 2002).

Outro resultado observado foi o aumento na razão  $C_i/C_a$ , nas plantas em condições de estresse, e principalmente maiores valores médios para o BRS C 2501 (1,94  $\mu\text{mol CO}_2$ ) em relação ao BRS Manicoré (1,81  $\mu\text{mol CO}_2$ ), uma possível explicação foi proposta pelos

autores Méndez et al. (2012), ao explicarem as rotas metabólicas das plantas sob estresse hídrico, onde os mesmos afirmam que sob DH as enzimas que regulam o Ciclo de Calvin nas plantas C3, mais precisamente as que liberam CO<sub>2</sub> estejam com sua atividade muito elevada, logo liberam uma quantidade excessiva de CO<sub>2</sub> para as células (WALTER et al., 2005).

Ao estudarem híbridos de palma de óleo submetidos ao déficit hídrico, Suresh et al. (2010) verificaram que reduções no potencial hídrico ( $\Psi_{am}$ ) a partir de -2,7 MPa apresentaram reduções expressivas na  $A$  (de  $\pm 6$  para  $1,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) as quais foram acompanhadas por reduções significativas nas variáveis de fluorescência de clorofila  $a$  (eficiência quântica máxima do PSII, produção quântica efetiva do PSII e taxa aparente de transporte fotoquímico de elétrons). Logo, há um indicativo de que a partir da redução de -2,7 MPa no potencial hídrico há uma desestabilidade do aparato fotoquímico da fotossíntese nesse nível de imposição de déficit hídrico e que as reduções na  $A$  podem ser atribuídas a uma desestruturação dos fotossistemas, em especial ocasionada pela degradação das proteínas D1 e D2 e das clorofilas  $a$ ,  $b$  e carotenóides, ou à perda de funcionalidade das reações fotoquímicas envolvendo os fotossistemas. Segundo outros autores, danos fotoquímicos passam a ser significativos para  $\Psi_{am}$  inferiores a -2,7 MPa (KRAUSE; WEIS, 1991; CASPER et al., 1993).

Foi observado, sob estresse hídrico, uma redução significativa na concentração de amido, por conseguinte, tem-se descrito que, em plantas submetidas a estresse hídrico, pode ocorrer degradação de amido, como forma de manter ou aumentar os níveis de açúcares, apesar de uma redução em  $A$ , permitindo, assim, um ajustamento osmótico, o que contribuiria para evitar decréscimos adicionais em  $A$  (LAWLOR; CORNIC, 2002; STITT et al, 2010; GIBSON et al., 2011; SULPICE et al., 2014).

É comum, também, o aumento na concentração de aminoácidos em plantas sob déficit hídrico, utilizando o carbono proveniente das proteínas (LAWLOR; FOCK, 1977; HIEN et al., 2003; KOCSY et al., 2005). Foi verificado, sob déficit hídrico a partir de dia 21, um aumento significativo na concentração de aminoácidos nos híbridos estudados (Figura 5e). As correlações negativas encontradas entre os valores de  $A$  com as concentrações dos aminoácidos totais evidenciam que, sob déficit hídrico, os híbridos de *E. guineensis* podem ter utilizado esses metabólitos como mecanismos alternativos de conservação e uso de energia. Foi observado neste trabalho um decréscimo no teor de proteínas nas plantas sob déficit hídrico moderado, Castrillo et al. (2001) também verificaram reduções significativas nas concentrações de proteínas totais em plantas de milho, tomate e feijão com o decréscimo do potencial hídrico do solo.

Paralelamente ao aumento na concentração de aminoácidos, pôde-se observar a redução nos níveis de amido e a tendência de redução nos níveis de hexoses (glicose e frutose) para os dois híbridos. Tais fatos podem ser interpretados, em conjunto, como um mecanismo para a manutenção da homeostase metabólica em um processo de aclimação, alterando a partição de carbono, que tem como consequência o aumento no teor de aminoácidos, para que não haja reduções ainda maiores em *A* (STITT et al, 2010).

Aumentos nos teores de carboidratos (glicose, frutose e sacarose) aos 14 dias de déficit hídrico em trigo foram verificados por Kamel e Losel (1993). Já Saeedipour e Moradi (2011) observaram redução nos níveis de hexoses e aumento nas concentrações de amido foliar aos 21 dias de déficit hídrico em diferentes cultivares de trigo. Praxedes et al. (2006) também verificaram comportamento de aumento nos teores de amido em diferentes genótipos de café sob estresse hídrico.

O aumento no teor de aminoácidos pode indicar também um mecanismo de ajuste osmótico (TROSSAT et al., 1998; KOCSY et al., 2005), que provavelmente está ocorrendo no BRS Manicoré e BRS C 2501, através do incremento nas concentrações de prolina e glicinabetaina. Aumento nos teores de aminoácidos e prolina também foram verificados por Hummel et al. (2010) em plantas de *Arabidopsis* sob déficit hídrico.

Os resultados sugerem que um mecanismo de alteração na partição de carbono e na manutenção da homeostase metabólica é variável entre os híbridos, e que provavelmente estaria envolvido na aclimação fotossintética sob déficit hídrico. Entretanto, o aumento na concentração de aminoácidos, tanto em um híbrido susceptível à seca (BRS C 2501) como em um tolerante (BRS Manicoré), sugere que essa alteração não seria parte de um mecanismo geral de tolerância à seca em palma de óleo. Pode-se sugerir que outros mecanismos, além da alteração na partição dos fotoassimilados, também possam contribuir para a aclimação fotossintética da palma de óleo sob condições de seca (STITT et al, 2010).

Reduções nas taxas de *A* podem ser verificadas em paralelo a decréscimos na atividade da carboxilase-oxigenase da RuBP (Rubisco) (GALMÉS et al., 2013). A inibição da fotossíntese pode ser acompanhada pela redução na atividade da Rubisco nas plantas sob DH, durante o experimento (Figura 6). Logo, sua atividade reduzida, propiciou o aumento significativo da concentração subestomática de CO<sub>2</sub>, pois a mesma não está fixando-o suficientemente para o Ciclo de Calvin (Figura 2). Castrillo et al. (2001) verificaram reduções significativas na atividade da Rubisco em plantas de milho, tomate e feijão com o decréscimo do potencial hídrico do solo.

Para Peterhansel e Maurino (2011), uma maior atividade da GLOx é um indicativo de aumento na fotorrespiração e, dentro de determinados limites, quanto maior a fotorrespiração menor a *A*, uma vez que a fotorrespiração não é o único fator que concorre para a diminuição de *A*. Neste estudo, foi constatado que as plantas sob déficit hídrico dos híbridos BRS Manicoré e BRS C 2501 apresentaram um aumento considerável na atividade da GLOx sob estresse moderado e moderado a severo, com declínio em sua atividade sob déficit hídrico severo, devido a magnitude do estresse aplicado ( $\Psi_{am}$  para o BRS Manicoré de -4,03 MPa e para BRS C 2501 -4,40 MPa); assim, pode-se inferir que a fotorrespiração nas plantas de palma de óleo submetidas ao déficit hídrico é um processo que contribui significativamente para a diminuição de *A* a partir do estresse moderado, correspondente aos 21 dias de diferenciação dos tratamentos, com reduções nas taxas fotossintéticas de ambos os híbridos, porém, mais acentuadas para o BRS C 2501 (Figura 6c).

O aumento na atividade da CAT, enzima principalmente encontrada nos peroxissomos de plantas, está diretamente relacionado ao aumento na atividade da GLOx, pois esta última produz  $H_2O_2$  como subproduto da conversão de glicolato em glioxilato durante a fotorrespiração (ALLAHVERDIYEVA, 2011). Então, se a fotorrespiração aumenta, espera-se que a atividade da CAT aumente conforme ocorrido neste estudo, em que houve um incremento concomitante da ação das enzimas GLOx e CAT, a partir do estresse moderado, aos 21 dias de imposição do DH, com decréscimo da atividade de ambas sob DH severo, aos 57 dias de avaliação (Figura 6d).

Reduções significativas na atividade da AGPase pôde ser observada sob déficit hídrico severo, a partir dos 57 dias de avaliação nos dois híbridos estudados (Figura 7a). Este comportamento foi acompanhado da reduções significativa na concentração de amido nos híbridos (Figura 5a). O fato de que reduções nos teores de amido, detectadas no início do experimento, não tenha sido acompanhada por reduções na atividade da AGPase (enzima chave na síntese de amido) até os 34 dias (déficit moderado a severo), sugere que outros mecanismos possam estar envolvidos, como, por exemplo, via ação das enzimas degradadoras do amido (FOX; GEIGER, 1986; ZEEMAN et al., 2007; NUNES-NESI et al., 2012). Outra possibilidade é a de que, com a inibição da fotossíntese provocada pelo déficit hídrico, pode ocorrer uma mobilização preferencial do carbono fixado para a síntese de sacarose em detrimento da síntese de amido (CHAVES, 1991; ZHANG et al., 2005; NUNES-NESI et al., 2011). Dessa forma, os resultados aqui apresentados talvez permitam sugerir também que a redução nos teores de amido possa ser atribuída à redução em *A*. Dorion et al. (1996)

verificaram aumento na atividade da AGPase nos diferentes estágios de maturação do trigo sob déficit hídrico.

Visto que alterações na atividade total da SPS foram detectadas (Figura 7b), é importante verificar se a atividade da sintase da sacarose (SuSy), que pode tanto catalisar a síntese como a degradação da sacarose (TAIZ; ZEIGER, 2009), poderia compensar, pelo menos em parte, as alterações verificadas na SPS. Logo, foi observada alteração significativa de decréscimo na atividade da SuSy, sob déficit hídrico, a partir dos 57 dias (estresse severo), para os dois híbridos (Figura 7c). Fu et al. (2010) verificaram aumentos na atividade das enzimas SPS e Susy, aos 23 dias de restrição hídrica em *Festuca arundinacea*. Saeedipour e Moradi (2011) também observaram aumento na atividade da Susy aos 21 dias de déficit hídrico em diferentes cultivares de trigo.

É comum uma redução na atividade da SPS sob déficit hídrico (LAWLOR; CORNIC, 2002), que está relacionada à redução em  $C_i$ , em vez do conteúdo relativo de água; nesse caso, o  $CO_2$  atuaria na ativação da enzima (ZRENNER; STITT, 1991; STITT et al., 2010). Esse efeito provavelmente não ocorreu neste experimento, pois, ao mesmo tempo em que se observou aumento em  $C_i/C_a$  (Figura 3f e 7b), observou-se tendência de decréscimo na atividade da SPS nos híbridos (Figura 7b). Houve redução na atividade da SPS para os dois híbridos, com maior decréscimo na atividade do BRS C 2501 o que permite sugerir que a SPS está presente em maior quantidade no BRS Manicoré. Isso sugere, portanto, que a SPS é diferentemente regulada no BRS Manicoré, em resposta ao déficit hídrico, quando comparado em relação ao BRS C 2501. Logo, essa diferença na atividade desta enzima permite sugerir que a regulação diferencial da SPS poderia contribuir para a tolerância à seca. Alternativamente, pode-se inferir que diferentes mecanismos possam também estar envolvidos em diferentes híbridos de palma de óleo.

O teor de hexoses pode também ser influenciado pela atividade das invertases. Observou-se uma tendência de redução da atividade da invertase ácida, principalmente no híbrido BRS Manicoré sob DH (Figura 7e). Isso poderia explicar a tendência de redução nos níveis de hexoses nesse híbrido, naquela condição (Figura 5). Fu et al. (2010) verificaram aumentos na atividade da invertase ácida, aos 23 dias de restrição hídrica em *Festuca arundinacea*. Os híbridos apresentaram tendência de redução na atividade da invertase alcalina sob déficit hídrico (Figura 7d). Saeedipour e Moradi (2011) observaram redução na atividade da invertase alcalina aos 21 dias de déficit hídrico em diferentes cultivares de trigo.

Reduções na atividade da MDH – NAD<sup>+</sup> foram acompanhadas do incremento da atividade do metabolito malato a partir dos 21 dias de estresse em ambos os híbridos (Figura 8 a e 8b). Quando analisados em conjunto, os dados do presente trabalho evidenciam que a produção de compostos com propriedades osmóticas (malato) parece ter envolvido o consumo direto de carboidratos, glicose e frutose (Figura 5). Uma vez que os açúcares são reguladores osmóticos celulares. É importante ressaltar que, além da manutenção da turgescência celular, outras funções que têm sido atribuídas a esses metabólitos é a de detoxificação de espécies reativas de oxigênio e, também, a estabilização de proteínas e membranas (HOEKSTRA et al, 2001; WILLIAMSON et al., 2002). Nesse sentido, parece provável que a produção da vasta gama de osmólitos compatíveis na seca esteja relacionada, primordialmente, com mecanismo de proteção, em vez da manutenção da turgescência celular. Hummel et al. (2010) observaram aumentos significativos nas concentrações de malato em plantas de *Arabidopsis* sob diferentes magnitudes de déficit hídrico durante 24 dias de avaliação.

Devido à diminuição na taxa de assimilação líquida da fotossíntese ( $A$ ) (Figura 3b) e redução da  $g_s$  (Figura 3c) sob déficit hídrico, uma desaceleração no crescimento das plantas estressadas foi evidente em comparação às plantas mantidas sob constante irrigação aos 57 dias de avaliação (Tabela 3). Quando comparados os híbridos, o BRS C 2501 sofreu maior redução na produção vegetal em relação ao BRS Manicoré (Tabela 3). Portanto, no período de 57 dias de experimento, a altura e o número de folhas das plantas irrigadas foram superiores em relação às plantas sob déficit hídrico, indicando que sob restrição hídrica o crescimento da parte aérea foi paralisado, conforme revisado por Kramer e Boyer (1995) e Kozlowski e Pallardy (1997). Embora a redução no número de folíolos sob déficit hídrico tenha ocorrido em ambos os híbridos avaliados, ressalta-se menor redução para o BRS C 2501 (42%) em relação ao BRS Manicoré (51%). Já para o sistema radicular sob as mesmas condições experimentais, o BRS Manicoré apresentou redução de 41% e o BRS C 2501 58%, o que indica uma maior estratégia de investidura na razão raiz/parte aérea para o BRS Manicoré, resultados estes acompanhados por valores superiores de  $A$  (Figura 3b), ao longo dos 57 dias de avaliação.

Em contrapartida o híbrido BRS C 2501 investiu em parte aérea (maior número de folíolos) como estratégia de defesa sob déficit hídrico, por meio de maiores valores de área foliar, em relação ao BRS Manicoré, embora a taxa transpiratória ( $E$ ) não tenha sido diferenciada entre os híbridos durante o período de suspensão da irrigação. Logo, a redução da área foliar total torna-se uma importante estratégia à medida em que reduz a superfície de

transpiração da planta como um todo, corroborando para uma melhor manutenção do status hídrico da planta (KRAMER; BOYER, 1995; KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997). Essa redução significativa na produção de biomassa vegetal tem implicação direta na redução da produção de fotoassimilados de reserva energética (amido e carboidratos) (LAWLOR; CORNIC, 2002), fato este evidenciado neste trabalho, pela redução nas concentrações dos metabólitos primários do carbono (Figura 5). Do mesmo modo, Méndez et al. (2012) verificaram reduções significativas, na produção de biomassa, ao estudarem o comportamento de quatro híbridos (U 1273, U 1859, U 1914 e U 1937) de palma de óleo sob déficit hídrico.

A magnitude dos danos metabólicos durante o desenvolvimento do estresse responde tanto ao período e intensidade do estresse e isto deve determinar a capacidade das plantas em recuperar sua turgescência e demais processos fisiológicos após o estresse ser cessado (SGHERRI et al., 2000; KIM et al., 2010). Neste trabalho, a recuperação das plantas foi avaliada ao longo de 40 dias após a retomada da irrigação (Figura 4), uma vez que resultados prévios indicaram que diferentes híbridos de palma de óleo recuperaram seu *status* hídrico durante o período 12 dias, após imposição de apenas 24 dias de déficit hídrico (SURESH et al., 2012). Em concordância, plantas estressadas de palma de óleo, cultivada no leste da Tailândia, recuperaram sua turgescência e diminuíram a peroxidação de lipídios eficientemente 3 dias após a retomada da irrigação, após cessado déficit de apenas 16 dias (CHA-UM et al., 2013). Em comparação, os resultados obtidos para as variáveis fisiológicas e bioquímicas, os dois híbridos avaliados permitem inferir que as plantas sob déficit hídrico recuperam-se de forma bastante lenta (40 dias), uma vez que a imposição do déficit se deu por um período longo (57 dias), e o BRS Manicoré apresentou recuperação bem mais acentuada que o BRS C 2501.

## 2.5 Conclusões

As plantas estressadas do BRS Manicoré apresentam menores efeitos globais nas trocas gasosas, nas concentrações de carboidratos e proteínas solúveis totais e nas atividades de enzimas associadas à fixação do CO<sub>2</sub> e síntese de amido e sacarose que as plantas estressadas do BRS C 2501, garantido às primeiras uma maior disponibilidade de fotoassimilados os quais são preferencialmente dirigidos para o crescimento do sistema radicular em detrimento do crescimento da parte aérea e por isso as plantas do BRS Manicoré devem tolerar mais satisfatoriamente ao déficit hídrico que as plantas do BRS C 2501.

## REFERÊNCIAS

ALLAHVERDIYEVA, Y.; ERMAKOVA, M.; EISENHUT, M.; ZHANG, P.; RICHAUD, P.; HAGEMANN, M.; COURNAC, L.; ARO, E. M. Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **The journal of biological chemistry**, v. 286, p. 24007–24014, 2011.

BOOKER, F. L.; REID, C. D.; BRUNSCHON-HARTI, S.; FISCUS, E. L.; MILLER, J. E. Photosynthesis and photorespiration in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] chronically exposed to elevated carbon dioxide and ozone. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p. 1843–1852, 1997.

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

CALBO, M. E. R.; MORAES, J. A. P. V. Effect of water deficit in *Euterpe oleraceae*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, p. 225-230, 2000.

CALBO, M. E. R.; MORAES, J. A. P. V. Photosynthesis, stomatal conductance, transpiration and osmotic adjustment of buriti plants subjected to water stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 9, p. 117-123, 1997.

CAO, H. X.; SUN, C. X.; SHAO, H. B.; LEI, X. T. Effects of low temperature and drought on the physiological and growth changes in oil palm seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2630-2637, 2011.

CASPER, C.; EICKMEIER, W. G.; OSMOND, C. B. Changes of fluorescence and xanthophyll pigments during dehydration in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* in low and medium light intensities. **Oecologia**, v. 94, p. 528-533, 1993.

CASTRILLO, M.; FERNANDEZ, D.; TRUJILLO, I.; GUENNI, L. Responses of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, protein content, and stomatal conductance to water deficit in maize, tomato, and bean. **Photosynthetica**, v. 39, p. 221-226, 2001.

CHA-UM, S.; YAMADA, N.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Physiological features and growth characters of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to reduced water-deficit and rewatering. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, p. 432-439, 2013.

CHA-UM, S.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Physio-biochemical responses of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings to mannitol- and polyethylene glycol-induced iso-osmotic stresses. **Plant Production Science**, v. 15, p. 65–72, 2012.

CHA-UM, S.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Osmotic potential, photosynthetic abilities and growth characters of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings in responses to polyethylene glycol-induced water deficit. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 6509–6516, 2010.

CHAVES, M. M. Effects of water déficit on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 1-16, 1991.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R. **BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o Caiaué e o Dendezeiro Africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento fatal**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 4 p., 2010. (Comunicado Técnico 85).

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; DANTAS, J. C. R.; ROCHA, R. N. C. **Procedimentos para produção de sementes comerciais de dendezeiro na Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 34 p., 2007. (Documentos; 54).

DORION, S.; LALONDE, S.; SAINI, H. S. Induction of male sterility in wheat by meiotic-stage water deficit 1s preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. **Plant Physiology**, v. 11, n. 1, p. 137-145, 1996.

DUFRENE, E.; DUBOS, B.; REY, H.; QUENCEZ, P.; SAUGIER, B. Changes in evapotranspiration from an oil palm stand (*Elaeis guineensis* Jacq.) exposed to seasonal soil water deficits. **Acta Oecologica**, v. 13, p. 299-314, 1992.

FERNIE, A. R.; ROSCHER, A.; RATCLIFFE, R. G.; KRUGER, N. J. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, v. 212, p. 250-263, 2001.

FLEXAS, J.; BARO, M.; BOTA, J.; DUCRUET, J. M.; GALLE, A.; GASMÉS, J.; JIMÉNEZ, M.; POU, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; SAJNANI, C.; TOMÀS, M.; MEDRANO, H. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 2361-2377, 2009.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMES, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Plant Physiology**, v. 127, p. 343-352, 2006.

FOYER, C. H.; LESCURE, J. C.; LEFEBVRE, C.; MOROT-GAURDRY, J. F.; VICENTZ, M.; VAUCHERET, H. Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to change in nitrate reductase activity. **Plant Physiology**, v. 104, p. 171-178, 1994.

FOX, T. C.; GEIGER, D. R. Osmotic response of sugar beet leaves at CO<sub>2</sub> compensation point. **Plant Physiology**, v. 80, p. 239-241, 1986.

FRANZINI, V. I.; SILVA, A. R. B. **Adubação fosfatada para palma de óleo**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. 43 p. il. (Documentos / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513; 388), 2012.

FU, J.; HUANG, B.; FRY, J. Osmotic potential, sucrose level, and activity of sucrose metabolic enzymes in tall fescue in response to deficit irrigation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 135, n. 6, p. 506-510, 2010.

GALLÉ, A.; FLOREZ-SARASAL, I.; AOUOUADL, H. E.; FLEXAS, J. The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semi deciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimation to repeated drought and re-watering cycles. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1-10, 2011.

GALMÉS, J.; ARNAJUELO, I.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. **Photosynthesis research**, v. 117, p. 73-90, 2013.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, v. 189, p. 329-339, 1993.

GIBSON, K.; PARKS, J. S.; NAGAIA, Y.; HWANGA, S. K.; CHOD, Y. C.; ROHC, K. H.; LEEC, S. M.; KIMC, D. H.; CHOIE, S. B.; ITO, H.; EDWARDSA, G. E.; OKITAA, T. W. Exploiting leaf starch 40 synthesis as a transient sink to elevate photosynthesis, plant productivity and yields. **Plant Science**, v. 181, p. 275-281, 2011.

GIBON, Y.; BLAESING, O. E.; HENNEMAN, J. H.; CARILLO, P.; HÖHNE, M.; HENDRICKS, J. H. M.; PALACIOS, N.; CROSS, J.; SELBIG, J.; STITT, M. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **The Plant Cell**, v. 16, p. 3304-3325, 2004.

GOLDSCHMIDT, E. E.; HUBER, S. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1443-1448, 1992.

GRIEVE, C. M.; GRATAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**, 70, 303-307, 1983.

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

HIEN, D. T.; JACOBS, M.; ANGENON, G.; HERMANS, C.; THU, T. T.; VAN SON, L.; ROSENS, N. H. Proline accumulation and 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. **Plant Science**, v. 165, p. 1059-1068, 2003.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 431-438, 2001.

HUMMEL, I.; PANTIN, F.; SULPICE, R.; PIQUES, M.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; CHRISTOPHE, A.; PERVENT, M.; BOUTEILLE, M.; STITT, M.; GIBON, Y.; MULLER, B. *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. **Plant Physiology**, v. 154, p. 357-372, 2010.

Image J - Introduction, disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>>, acessado em 21/03/2014.

- JAZAYERI, S. M.; RIVERA, Y. D.; CAMPEROS-REYES, J. E.; ROMERO, H. M. Physiological effects of water deficit on two oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genotypes. **Agronomía Colombiana**, v. 33, p. 164-173, 2015.
- JENNER, H. L.; WINNING, B. M.; MILLAR, A. H.; TOMLINSON, K. L.; LEAVER, C. J.; HILL, S. A. NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1139–1149, 2001.
- KAMEL, I. A.; LOSEL, D. M. Carbohydrates and water status in wheat plants under water stress. **New Phytology**, v. 125, p. 609-614, 1993.
- KIM, J. M.; TO, T. K.; NISHIOKA, T.; SEKI, M. Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 604-611, 2010.
- KLAR, A. E.; VILLA NOVA, N. A.; MARCOS, Z. Z.; CERVELLINI, A. Determinação da umidade do solo pelo método das pesagens. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz** [online], v. 23, p. 15-30, 1966.
- KOCSY, G.; LAURIE, R.; SZALAI, G.; SZILÁGYI, I.; SIMON-SARKADI, V.; GALIBA, G.; DeRONDE, J. Á. Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 227-235, 2005.
- KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of Woody Plants**. Academic Press, San Diego, 1997, p. 411.
- KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 495p, 1995.
- KRAUSE, G. H., WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 42, p. 313-349, 1991.
- LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell and Environment**. v. 25, p. 275-294, 2002.
- LAWLOR, D. W.; FOCK, H. Water stress induced changes in the amounts of some photosynthetic assimilation products and respiratory metabolites of sunflower leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 28, p. 329-337, 1977.
- LEGROS, S.; MIALET-SERRA, I.; CLEMENT-VIDAL, A.; CALIMAN, J. P.; SIREGAR F. A.; FABRE, D.; DINGKUHN, M. Role of transitory carbon reserves during adjustment to climate variability and source–sink imbalances in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Tree Physiology**, v. 29, p. 1199–1211, 2009.
- LI, C. R.; LIANG, Y. H.; HEW, C. S. Responses of Rubisco and sucrose-metabolizing enzymes to different CO<sup>2</sup> in a C<sub>3</sub> tropical epiphytic orchid *Oncidium goldiana*. **Plant Science**, v. 163, p. 313-320, 2002.

LIMA, T. T. S.; MIRANDA, I. S.; VASCONCELOS, S. S. Effects of water and nutrient availability on fine root growth in eastern Amazonian forest regrowth, Brazil. **New Phytology**, v. 187, p. 622–630, 2010.

MÉNDEZ, Y. D. R.; CHACÓN, L. M.; BAYONA, C. J.; ROMERO, H. M. Physiological response of oil palm interspecific hybrids (*Elaeis oleifera* H.B.K. *Cortesi* versus *Elaeis guineensis* Jacq.) to water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 273–280, 2012.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.

NI, B.; PALLARDY, S. G. Stomatal and nonstomatal limitation to net photosynthesis in seedlings of woody angiosperms. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1502–1508, 1992.

NUNES-NESE, A.; ARAÚJO, W. L.; OBATA, T.; FERNIE, A. R. Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 335–343, 2013.

NUNES-NESE, A.; ARAÚJO, W. L.; FERNIE, A. R. Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 101–107, 2011.

NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; GIBON, Y.; SULPICE, R.; LYTOVCHENKO, A.; FISAHN, J.; GRAHAM, J.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Deficiency of mitochondrial fumarate hydratase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **Plant Journal**, v. 50, p. 1093–1106, 2007.

NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; LYTOVCHENKO, A.; SMITH, A. M.; LOUREIRO, M. E.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. **Plant Physiology**, v. 137, p. 611–622, 2005.

OLIVEIRA, M. A. J.; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A.; HABERMANN, G.; RODRIGUES, J. D. Fotossíntese, Condutância estomática e Transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. **Scientia Agrícola**, v. 59, p. 59–63, 2002.

PALLESCHI, S.; ROCHER, J. P.; PRIOUL, J. L. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source-sink imbalance. **Plant, Cell and Environment**, v. 2, p. 110–116, 1997.

PETERHANSEL, C.; MAURINO, V. G. Photorespiration Redesigned. **Plant Physiology**, v. 155, p. 49–55, 2011.

PINHEIRO, H. A.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; FERREIRA, V. M.; CÂMARA, C. A.; CABRAL, F. F.; OLIVEIRA, J. F.; CARVALHO, L. W. T.; SANTOS, J. M.; SANTOS FILHO, B. G. Leaf gas exchange, chloroplastic pigments and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings subjected to salt stress conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 385–392, 2008.

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

PINHEIRO, H. A.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; FERREIRA, V. M.; CÂMARA, C. A.; CABRAL, F. F.; OLIVEIRA, J. F.; CARVALHO, L. W. T.; SANTOS, J. M.; SANTOS FILHO, B. G. Leaf gas exchange, chloroplastic pigments and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings subjected to salt stress conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 385-392, 2008.

RONCHI, C.P.; DAMATTA, F.M.; BATISTA, K.D.; MORAES, G.; LOUREIRO, M.E.; DUCATTI, C. Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 1013-1023, 2006.

SAEEDIPOUR, S.; MORADI, F. Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: impact of invertase activity on carbon metabolism during kernel development. **Journal of Agricultural Science**, v. 3, p. 2, 2011.

SCHEFFER, M.; CARPENTER, S.; FOLEY, J. A.; FOLKE, C.; WALKER, B. Catastrophic shifts in ecosystems. **Nature**, v. 413, p. 591-596, 2011.

SGHERRI, C. L. M.; SALVATECI, P.; MENCONI, M.; RASCHI, A.; NAVARI-IZZO, F. Interaction between drought and elevated CO<sub>2</sub> in the response of alfalfa plants to oxidative stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, p. 360-366, 2000.

SHEEN, J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **Plant Cell**, v. 2, p. 1027-1038, 1990.

STITT, M.; LUNN, J.; USADEL, B. Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism more than the icing on the cake. **Plant Journal**, v. 61, p. 1067-1091, 2010.

SULPICE, R.; FLIS, A.; IVAKOV, A. A.; APELT, F.; KROHN, N.; ENCKE, B.; ABEL, C.; FEIL, R.; LUNN, J. E.; STITT, M. *Arabidopsis* coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of photoperiods. **Molecular Plant**, v. 7, p. 137-155, 2014.

SULPICE, R.; TSCHOEP, H.; VON KORFF, M.; BUSSIS, D.; USADEL, B.; HOHNE, M. WITUCKA-WALL, H.; ALTMANN, T.; STITT, M.; GIBON, Y. Description and applications of a rapid and sensitive non-radioactive microplate-based assay for maximum and initial activity of Dribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 1163-1175, 2007.

SURESH, K.; NAGAMANI, C. Variations in photosynthetic rate and associated parameters with age of oil palm leaves grown under irrigation. **Photosynthetica**, v. 44, p. 309-311, 2006.

SURESH, K.; NAGAMANI C.; KANTHA, D. L.; KUMAR, M. K. Changes in photosynthetic activity in five common hybrids of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under water deficit. **Photosynthetica**, v. 50, p. 549-556, 2012.

SURESH, K.; NAGAMANI, C.; RAMACHANDURU, K.; MATHUR, R. K. Gas-exchange characteristics, leaf water potential and chlorophyll *a* fluorescence in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under water stress and recovery. **Photosynthetica**, v. 48, p. 430–436, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre. Artemed, 2009, 819p.

TEZARA, W.; DRISCOLL, S.; LAWLOR, D. W. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO<sub>2</sub> assimilation and O<sub>2</sub> reduction in sunflower plants under water deficit. **Photosynthetica**, v. 46, p. 127-134, 2008.

TRETHEWEY, R. N.; GEIGENBERGER, P.; RIEDEL, K.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U.; STITT, M.; RIESMEIER, J. W.; WILLMITZER, L. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. **Plant Journal**, v. 15, p. 109–118, 1998.

TROSSATT, C.; RATHINASABAPATHI, B.; WERETILNYK, A.; SHEN, T.; HUANG, Z.; GAGE, D. A.; HANSON, A. D. Salinity promotes accumulation of 3-dimethylsulfoniopropionate and its precursor S-Methylmethionine in chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 116, p. 165-171, 1998.

WALTER, A.; CHRIST, M. M.; BARRON-GAFFORD, A.; GRIEVE, K. A.; MURTHY, R.; RASCHER, W. The effect of elevated CO<sub>2</sub> on diel leaf growth cycle, leaf carbohydrate content and canopy growth performance of *Populus deltoids*. **Global Change Biology**, v. 11, p. 1207-1219, 2005.

WIDODO, W.; VU, J. C. V.; BOOTE, K. J.; BAKER, J. T.; ALLEN Jr, L. H. Elevated growth CO<sub>2</sub> delays drought stress and accelerates recovery of rice leaf photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 259-272, 2003.

WILLIAMSON, J. D.; JENNINGS, D. B.; GUO, W. W.; PHARR, M. P. Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols multifunctional plant protection? **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 127, n. 4, p. 467–473, 2002.

ZEEMAN, S. C.; SETEVEN, M. S.; SMITH, A. M. The diurnal metabolism of leaf starch. **Biochemical Journal**, v. 401, p. 13-28, 2007.

ZHANG, X.; MYERS, A. M.; JAMES, M. G. Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. **Plant Physiology**, v.138, p. 663-674, 2005.

ZRENNER, R.; STITT, M. Comparison of the effects of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. **Plant Cell and Environment**, v. 14, p. 939-946, 1991.

### 3 LEAF GAS EXCHANGE AND MULTIPLE ENZYMATIC AND NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANT STRATEGIES RELATED TO DROUGHT TOLERANCE IN TWO OIL PALM HYBRIDS

#### RESUMO

A seca é um fator ambiental limitante para o crescimento e rendimento da cultura da palma de óleo. Neste estudo, dois híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré e BRS C 2501) foram cultivados em vasos grandes e submetidos a um déficit hídrico durante 57 dias. Foram realizadas análises foliares das trocas gasosas em conjunto com uma avaliação detalhada do sistema antioxidante durante a imposição da seca. Sob déficit hídrico, o potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\Psi_{pd}$ ) reduziu de forma semelhante em ambos os híbridos. Em paralelo, houve quedas na taxa de assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A$ ), nas concentrações de clorofila e atividade total da Rubisco. No geral, essas reduções foram mais acentuadas no BRS C 2501 do que no BRS Manicoré. As plantas do BRS C 2501 desencadearam respostas mais acentuadas no seu sistema enzimático antioxidante ( $\Psi_{pd} = -2,1$  MPa) do que o BRS Manicoré, mas estas respostas foram acompanhadas de maiores concentrações de  $H_2O_2$  e aldeído malônico no BRS C 2501 do que no BRS Manicoré. Com o progresso do déficit hídrico ( $\Psi_{pd} = -2,9$  MPa e abaixo), o BRS Manicoré obteve melhor resposta ao estresse oxidativo através de um sistema antioxidante mais eficaz. Além disso, reduções significativas na atividade da enzima malato-desidrogenase dependente de  $NAD^+$  foram observadas nas plantas estressadas do BRS C 2501. Independentemente do regime hídrico, as concentrações totais de carotenóides, ascorbato e glutatona foram maiores no BRS Manicoré do que no BRS C 2501. Em conclusão, o BRS Manicoré é mais tolerante a seca do que o BRS C 2501, pois o mesmo desenvolve múltiplas estratégias antioxidantes envolvidos tanto em espécies reativas de oxigênio, quanto na dissipação do excesso de energia e/ou redutores equivalentes, principalmente sob estresse hídrico severo.

**Palavras-chave:** Enzimas antioxidantes. Compostos antioxidantes. *Elaeis guineensis*. *Elaeis oleifera*. Déficit hídrico

## ABSTRACT

Drought is a major environmental constraint limiting growth and yield of oil palm trees. In this study, two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) were grown in large containers and subjected to a water deficit during 57 days. Leaf gas exchange analysis was combined with an in-depth assessment of the antioxidant system over the drought imposition. Under drought, leaf water potential at predawn ( $\Psi_{pd}$ ) decreased similarly in both hybrids. In parallel, there were decreases in the net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ), chlorophyll concentrations and Rubisco total activity. Overall, these decreases were more pronounced in BRS C 2501 than in BRS Manicoré. BRS C 2501 plants triggered more markedly its enzymatic antioxidant system earlier ( $\Psi_{pd} \approx -2.1$  MPa) than did BRS Manicoré, but these responses were accompanied by higher concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and malondialdehyde in BRS C 2501 than in BRS Manicoré. With the progress of drought stress ( $\Psi_{pd} \approx -2.9$  MPa and below), BRS Manicoré was better able to cope with oxidative stress through a more robust antioxidant system. In addition, significant decreases in drought-induced NAD<sup>+</sup>-malate dehydrogenase activities were only observed in stressed BRS C 2501 plants. Regardless of watering regimes, the total carotenoid, ascorbate and glutathione concentrations were higher in BRS Manicoré than in BRS C 2501. In conclusion, BRS Manicoré is better able to tolerate drought than BRS C 2501 by triggering multiple antioxidant strategies involved both in reactive oxygen species scavenging and dissipation of excess energy and/or reducing equivalents particularly under severe drought stress.

**Keywords:** Antioxidant enzymes. Antioxidant compounds. *Elaeis guineensis*. *Elaeis oleifera*.  
Water deficit

### 3.1 Introduction

In plants growing under non-stressful conditions, the reactive oxygen species (ROS) are commonly produced at low concentrations as byproducts of normal metabolism in different cell compartments. In chloroplasts, the electron transfer from components of both photosystem (PS) II and PSI to oxygen leads to the formation of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), which triggers overproduction of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) (for a review see DEMIDCHIK, 2015). In addition, the electron transfer from excited triplet-state chlorophyll at the light-harvesting complex of PSII and from its reaction center (P680) to oxygen also leads to the formation of singlet oxygen ( $^1O_2$ ) (ASADA, 2006). In mitochondria, the electron transfer from components of the mitochondrial electron transport to oxygen leads to production of  $O_2^{\cdot-}$ , which is reduced to produce  $H_2O_2$  (RHOADS et al., 2006). Furthermore, the glycolate oxidase ( $GLO_x$ ) activity in the photorespiratory pathway generates  $H_2O_2$ , as noted in C3 plants (FOYER, 2002). Either under biotic or abiotic stresses, ROS concentration in plant cells may ultimately increase two or three times in relation to non-stressful conditions, thus potentially disrupting cellular homeostasis (POLLE et al., 2001). In drought-stressed plants, overproduction of ROS may rise from (i) an imbalance between light capture and electron transfer through photosystems due to down regulation of PSII activity – this stimulates the dissipation of excess light energy in PSII core and antenna, increasing  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$  concentrations; (ii) lower stromal NADP/NADPH ratio – this stimulates Mehler reaction, favoring electrons transfer directly to molecular oxygen rather than NADP at PS I level, increasing  $O_2^{\cdot-}$  concentration; or from (iii) increased photorespiration rate, that overproduces  $H_2O_2$  into peroxisomes (for review see Reddy et al. 2004). Under drought conditions, plants must be able to cope with ROS in order to prevent or avoid oxidative damages particularly to lipids, proteins and nucleic acids; if plants failure to cope with ROS adequately, oxidative damages may result in cell death (DEMIDCHIK, 2015).

As a defense strategy, the plants have different antioxidant enzymes and metabolites involved in the elimination of ROS. Superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase, glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and glutathione peroxidase are the most common enzymes scavenging ROS, while ascorbate, glutathione,  $\alpha$ -tocopherol and carotenoids are the most important non-enzymatic antioxidants (MITTLER, 2002; MITTLER et al., 2004; JALEEL et al., 2009). Notably, a close relationship between an efficient antioxidant defense system and plant

tolerance to biotic and abiotic stresses has been demonstrated in a range of different genotypes (cultivars or hybrids) of dicot and monocot species (LIMA et al., 2002; RAZA et al., 2007; BIAN; JIANG, 2009; CARVALHO et al., 2013).

The oil palm (*Elaeis guineensis*; Arecaceae) is a perennial palm largely cropped worldwide due to its economical potential for oil production. Both palm oil (or mesocarp oil) and kernel oil are used in the food industry, cosmetics, medicines, soap and more recently in biodiesel production (HOMMA et al., 2000; WAHID et al., 2005). This palm does not withstand severe or even moderate drought spells and therefore crop yields are severely constrained under water-limiting conditions. Nonetheless, moderate (annual water deficiency between 100 and 350 mm) and severe (annual water deficiency up to 350 mm) drought events can occur from July to November in some regions of the Amazonia; indeed soil water deficiency is considered the most important environmental factor limiting oil palm yield in north Brazil, where oil palm plantations are concentrated (BASTOS et al., 2001). Furthermore, local experience has shown that plant death, especially in young plantations, may occur in dry years if irrigation is not supplemented. Such drought sensitivity in oil palm plants is in part related to the magnitude of drought-induced effects on physiological variables, affecting the overall plant metabolism. In this context, significant decreases in leaf gas exchange parameters, especially in net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ), stomatal conductance to water vapor ( $g_s$ ), maximum PSII quantum efficiency, effective PSII quantum yield and apparent electron transport rate have been reported in oils palm plants under drought stress (CHA-UM et al., 2010; SURESH et al., 2010; CHA-UM et al., 2012; MÉNDEZ et al., 2012; SURESH et al., 2012). Moreover, the decreases in  $A$  during water deficit progress precedes any measurable changes in chlorophyll  $a$  fluorescence (SURESH et al., 2010), suggesting an imbalance between photochemical and biochemical pathways of photosynthesis, thus potentially leading to the overproduction of ROS in chloroplasts and triggering oxidative damages to cells. Given that magnitude of drought effects varies largely in oil palm hybrids (MÉNDEZ et al., 2012; SURESH et al., 2012), it can be hypothesized that tolerance of oil palm plants to water deficit could at least partially be associated with a greater ability to prevent or avoid cellular damages by activating antioxidant enzymatic and/or non-enzymatic strategies. To test this hypothesis, two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) genetically improved to achieve improved fruit productivity and improved tolerance to fatal yellowing in plantings at Brazilian Amazonia (CUNHA et al., 2007; CUNHA; LOPES, 2010) were subjected to a long-term drought (57 days) aiming to evaluate their abilities to prevent

cellular damages by the way of different antioxidant enzymes and metabolites. Therefore, the identification of antioxidant mechanisms allowing plants to successfully cope with long-term drought is an important trait for improvements on stress tolerance in this species.

## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Plant material, experimental design and sampling procedures

The experiment was setup in a greenhouse located in the Brazilian Amazonia (01°28'03"S, 48°29'18"W). Pre-germinated seeds of the interspecific oil palm BRS Manicoré hybrid (*E. guineensis* Jacq. x *E. oleifera* (Kunth) Cortés; CUNHA; LOPES, 2010) and intraspecific oil palm BRS C 2501 *tenera* hybrid (*E. guineensis* cv. *psifera* - La Mé x *E. guineensis* cv. *dura* - Deli; CUNHA et al., 2007) were planted in polyethylene trails for seedling development. Thirty days latter, uniform seedlings, in terms of plant height and leaf number, were transferred to 50 L pots filled with 40 kg of a superficial soil (0 to 20 cm) collected from a Yellow Dystrophic Latosol soil typically found in the Amazonian region. The pH of the substrate was adjusted to approx. 6.0 using 30 g dolomitic limestone per pot. Supply fertilization were provided by adding 5 g NPK 20-20-20 (w/w) per pot in intervals of 15 days and 2.5 g magnesium sulfate per pot in intervals of 30 days (FRANZINI; SILVA, 2012). All plants were cultivated under full irrigation throughout the following 12 months. The volume of irrigation water was applied to maintain the soil near to field capacity. Throughout the experiment, the climatic conditions at the experimental site were registered using a data logger (HOBO U12-012, Onset Computer Corporation, Bourne, EUA) equipped with specific sensors for air temperature ( $T_{\text{air}}$ ), relative humidity (RH), and light intensity measurements. The averages of diurnal and nocturnal temperatures were  $29.2 \pm 0.2$  and  $24.9 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  respectively; and averages of diurnal humidity, light duration and intensity were respectively of  $76.8 \pm 0.9$  %,  $12.8 \pm 0.5$  h and  $1,511.6 \pm 63.3$   $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Specifically during the morning measurements (between 6:00 to 10:00 h), the averages of  $T_{\text{air}}$  and RH (registered using a thermohygrometer m5203, Incoterm Ind., Porto Alegre, Brazil) inside greenhouse were  $28.8 \pm 0.1$  °C and  $81 \pm 0.7$  % and vapor pressure deficit (calculated according Landsberg 1986) and photosynthetically active radiation (measured with a quantum sensor attached to infrared gas analyzer chamber) were respectively of  $0.80 \pm 0.03$  kPa and  $937 \pm 39$   $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

The definitive experiment was setup as a randomized design consisting of a 2x2x4 factorial scheme formed by two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) subjected to two watering regimes (full irrigation (control) and water deficit) evaluated in four different times (0, 21, 34 and 57 days after the water deficit treatment imposition). Each treatment was formed by six replicates, and a single plant per pot was considered as an experimental plot. The irrigation was suppressed completely for water-deficit treatment and stress resulted from continued evapotranspiration of each soil plus plant system. The time points of evaluation were chosen to examine stressed plants under different soil water conditions, as characterized by predawn leaf water potentials ( $\Psi_{pd}$ ) around -0.1 MPa (Day 0), -2.0 MPa (Day 21), -3.0 MPa (Day 34) and -4.0 MPa (Day 57), which were measured between 4:30 to 5:30 h using a Scholander-type pressure chamber (m670, PMS Instrument Co., Albany, USA) as described in Pinheiro et al. (2008). These lowest  $\Psi_{pd}$  values are believed to represent a severe (non-lethal) internal water deficit and may well reflect the field situations encountered by young oil palm plants in dry years.

All physiological measurements and samplings (see below) were carried out in leaflets from the medium portion of the third leaf from the apices.

### 3.2.2 Leaf gas exchange

The net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ), stomatal conductance to water vapor ( $g_s$ ) and intercellular-to-ambient CO<sub>2</sub> concentration ratio ( $C_i/C_a$ ) were determined using an infrared gas analyzer (LCpro+, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). The measurements were performed between 7:40 to 8:40 h (solar time) under ambient CO<sub>2</sub> concentration and photosynthetically active radiation (PAR) of 1,100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (SURESH et al., 2012). The PAR was provided by a light source attached to the gas analyzer chamber (LCM – 014/B, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK).

### 3.2.3 Biochemical assays

Samplings for biochemical assays were performed between 7:40 to 8:40 h. The collected samples were flash frozen in liquid nitrogen and kept under these conditions until assays.

### 3.2.4 Chlorophylls and total carotenoids

Pigments were extracted in 80% (v/v) aqueous acetone plus 0.01 g CaCO<sub>3</sub> according to Costa et al. (2010). Chlorophyll (Chl) *a* and *b* and total carotenoid (Car) concentrations were estimated according to Lichthenthaler (1987).

### 3.2.5 Enzymatic assays

Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco, EC 4.1.1.39) and NAD<sup>+</sup>-Malate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>-MDH, EC 1.1.37) were obtained in 0.8 mL “Stitt” buffer containing 500 mM Hepes pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA pH 8.0, 10 mM Benzamide, 10 mM E-aminocaproic acid, 2.5% (w/v) BSA (GEIGENBERGER; STITT, 1993). Glycolate oxidase (GLO<sub>x</sub>, EC 1.1.3.15) was extracted in 3 mL of 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.01% (v/v) Triton X-100 (BOOKER et al., 1997). Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) was extracted in 3 mL 100 mM potassium phosphate pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% (v/v) Triton X-100; 1 mM DTT (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and catalase (CAT, EC 1.11.1.6) were extracted in 50 mM potassium phosphate pH 7.0, 2 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 20 mM ascorbate (NAKANO; ASADA, 1981; HAVIR; MCHALE, 1987). GR (EC 1.6.4.2) was obtained in 100 mM Tris-CHL pH 7.5, 50 μM EDTA, 10 mM isoascorbate, 9 mM 2-mercaptoethanol, 3 mM DTT and 0.1% (v/v) Triton X-100 (FOYER; HALLIWELL, 1976). The supernatants obtained after centrifugation were directly used for enzymatic assays and protein concentration determinations (BRADFORD, 1976).

The total activity of Rubisco was assayed by measuring NADH consumption at 340 nm (SULPICE et al., 2007). The activity of GLO<sub>x</sub> was determined by measuring glycolate phenyl hydrazone production at 324 nm (BOOKER et al., 1997). The activity of NAD<sup>+</sup>-MDH was determined by measuring the rate of NADH oxidation at 340 nm (NUNES-NESI et al., 2005). Total activity of SOD was assayed as the ability of the enzyme to inhibit photochemical reduction of nitrobluetetrazolium at 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). The activity of APX was determined by measuring ascorbate oxidation at 290 nm (NAKANO; ASADA, 1981). CAT activity was assayed following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation at 240 nm (HAVIR; MCHALE, 1987) and activity of GR was determined by assaying the rate of NADPH consumption at 340 nm (FOYER; HALLIWELL, 1976).

### 3.2.6 Ascorbate and glutathione pools

Reduced ascorbate (Asc) and dehydroascorbate (DHAsc) were assayed according Gillespie and Ainsworth (2007) and reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were assayed according to Griffith (1980). From the results, total ascorbate (Asc + DHAsc), total glutathione (GSH + GSSG) and both ascorbate and glutathione redox states (Asc/Asc+DHAsc and GSH/GSH+GSSG, respectively) were calculated (GONDIM et al., 2013).

### 3.2.7 Hydrogen peroxide

Leaf samples were grounded in 50 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 containing 1 mM NH<sub>2</sub>OH. After centrifugation, an aliquot of the supernatant was used for the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantification determined by measuring changes in absorbance at 560 nm in a reaction medium containing 100 mM sorbitol, 0.25 mM FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>), 25 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.25 mM xylenol orange (GAY; GEBICKI, 2000).

### 3.2.8 Lipid peroxidation

Leaf samples were grounded in 0.1% (v/v) trichloroacetic acid and the slurries centrifuged at 15,000 × g, for 15 min at 4°C. An aliquot (500 µL) of the supernatant was incubated at 90 °C for 20 min in 1.5 mL 0.5% (v/v) thiobarbituric acid (TBA). The reaction was stopped under ice bath and the mixture was clarified by centrifugation at 13,000 × g, for 15 min at 4°C. The specific and non-specific absorbance of the samples was determined at 532 and 600 nm, respectively. The lipid peroxidation was estimated as the content of total TBA reactive substances expressed as equivalents of malondialdehyde (MDA) (CAKMAK; HORST, 1991).

### 3.2.9 Statistical analyses

The effects of hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501), watering regimes (control and water deficit), and possible interactions between them over the experimental period (time effect) on  $\Psi_{pd}$ , leaf gas exchange and biochemical variables were analyzed using a repeated measures analysis of variance, tested for significance by *F*-test (LIMA et al., 2010). All

statistical procedures were carried out using the statistical software Systat (v. 12.0.0.1, 2012, Systat Software Inc., Paris, France).

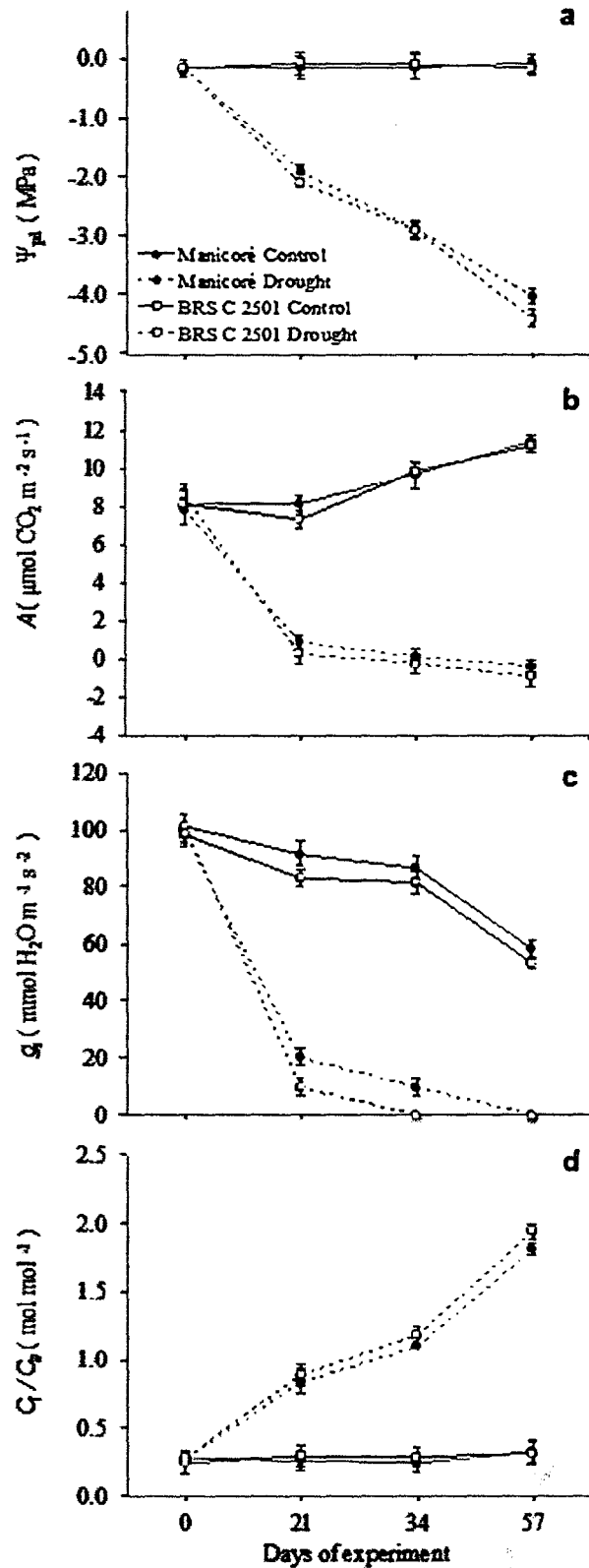
### 3.3 Results

#### 3.3.1 Leaf water potential and leaf gas exchange

Regardless of plant hybrids,  $\Psi_{pd}$  of control plants remained at high values ( $\Psi_{pd} \sim -0.13$  MPa) throughout the experimental period, while the progressive water deficit caused significant ( $P < 0.001$ , Table 4) decrease in  $\Psi_{pd}$  in both BRS hybrids (Fig. 9a). Although absolute values of  $\Psi_{pd}$  registered on day 57 tended to be higher in BRS Manicoré (Fig. 9a), the differences between hybrids were not significant ( $P > 0.05$ , Table 4), indicating that plant water status was equally affected by drought in both hybrids. Thus, the  $\Psi_{pd}$  averaged for water-stressed plants of both hybrids on -2.0 MPa (day 21), -2.9 MPa (day 34) and -4.2 MPa (day 57) (Fig. 9a).

The changes in  $A$ ,  $g_s$  and  $C_i/C_a$  over the course of the experiment were essentially similar between BRS hybrids under full irrigation (Fig. 9b to 9d). After 21 days under water deficit, the  $A$  was significantly ( $P < 0.001$ , Table 4) decreased by 90% in BRS Manicoré and by 95% in BRS C 2501 (Fig. 9b) relative to control plants. Decreases in  $A$  were accompanied by significant decreases in  $g_s$  ( $P < 0.001$ , Table 4), ranging from 78% in BRS Manicoré to 88% in BRS C 2501 (Fig. 9c). Additional decreases in  $A$  and  $g_s$  were observed in both hybrids on subsequent time points, but it is noteworthy that negative values of  $A$ , and  $g_s$  values around zero, were registered earlier in BRS C 2501 than in BRS Manicoré (day 34) (Fig. 9b and 9c). In parallel to decreases in  $A$  and  $g_s$ , remarkable ( $P < 0.001$ , Table 4) increases in  $C_i/C_a$  were observed in water-stressed plants of both hybrids, reaching the highest values at day 57 (Fig. 9d).

**Figure 9** - Changes in leaf water potential at predawn ( $\Psi_{pd}$ ; Fig. 9a), net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ; Fig. 9b), stomatal conductance to water vapor ( $g_s$ ; Fig. 9c) and intercellular to ambient CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i/C_a$ ; Fig. 9d) in two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) subjected to progressive drought. Data are the mean of six replicates  $\pm$  standard error (SE).

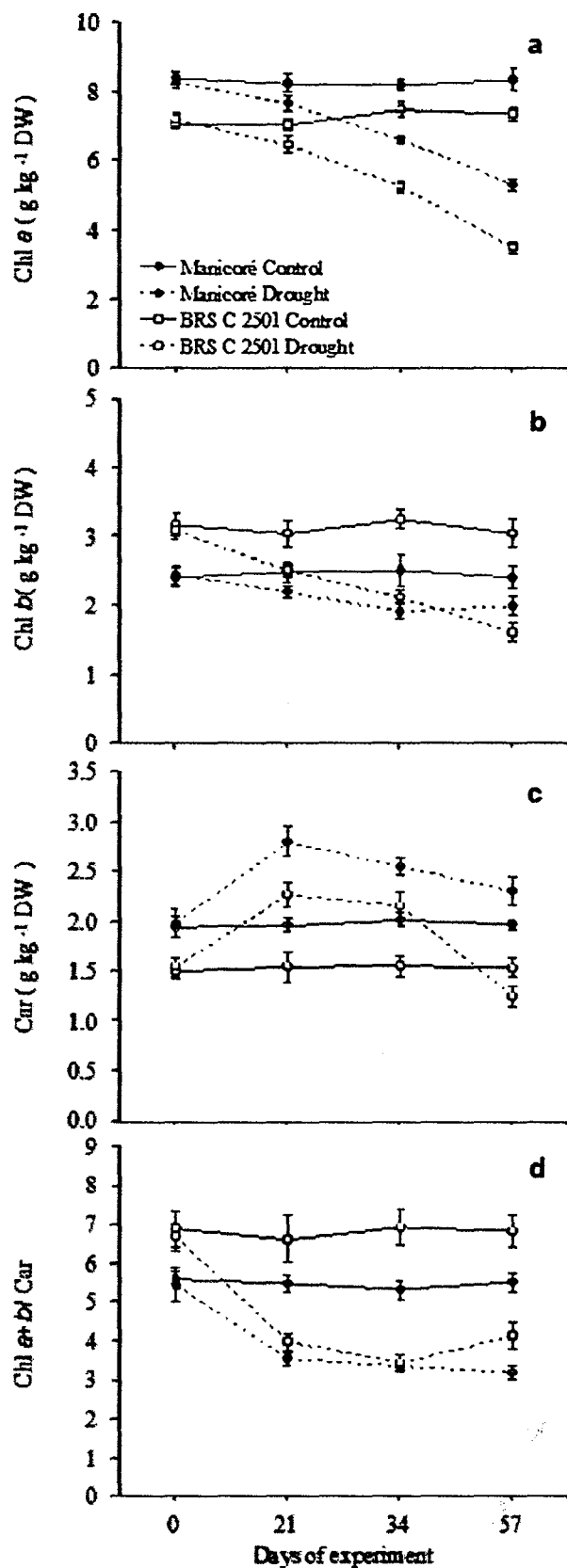


### 3.3.2 Chlorophylls and total carotenoids

Under full irrigation, the constitutive concentrations of Chl *a*, Chl *b*, Car and Chl *a+b*/Car differed significantly between hybrids with no marked changes between different experimental days (Fig. 10 and Table 4). The averages of Chl *a* and Car were 13% and 22% higher in BRS Manicoré, while Chl *b* concentration was 22% higher in BRS C 2501 (Fig. 10). The Chl *a+b*/Car ratio in well-watered plants of BRS Manicoré was 20% higher than that in BRS C 2501 (Fig. 10 and Table 4). The water deficit triggered significant ( $P < 0.001$ , Table 4) decreases in Chl *a* and Chl *b* concentrations in both hybrids and such decreases were already evident at 21 days after withholding irrigation (Fig. 10a and 10b). In water-stressed plants, the decreases in Chl *a* varied from 7% (day 21) to 37% (day 57) in BRS Manicoré, and from 8% (day 21) to 53% (day 57) in BRS C 2501 (Fig. 10a); the decreases in Chl *b* varied from 12% (day 21) to 17% (day 57) in BRS Manicoré, and from 8% (day 21) to 53% (day 57) in BRS C 2501 (Fig. 10b). Taken together, our results suggest that chlorophyll degradation was more prominent in BRS C 2501 compared to BRS Manicoré.

The total Car concentrations in stressed plants of BRS Manicoré were 43%, 27% and 17% higher ( $P < 0.001$ , Table 4) than in control plants assessed on days 21, 34 and 57, respectively (Fig. 10c). In stressed plants of BRS C 2501, drought brought about increases by 47% and 38% ( $P < 0.001$ , Table 4) in Car on days 21 and 34; in sharp contrast, on day 57 Car concentration was lower (19%) in drought-stressed plants than in control plants (Fig. 10c). Notably, regardless of hybrids and sampling times drought stress led to lower Chl *a+b*/Car ratios than those found in control plants (Fig. 10d). In BRS Manicoré, these ratios were 35% (day 21), 37% (day 34) and 42% (day 57) lower ( $P < 0.001$ , Table 4) in stressed plants, while in BRS C 2501, drought caused 40% (day 21), 50% (day 34) and 39% (day 57) decreases in Chl *a+b*/Car ratio ( $P < 0.001$ , Table 4).

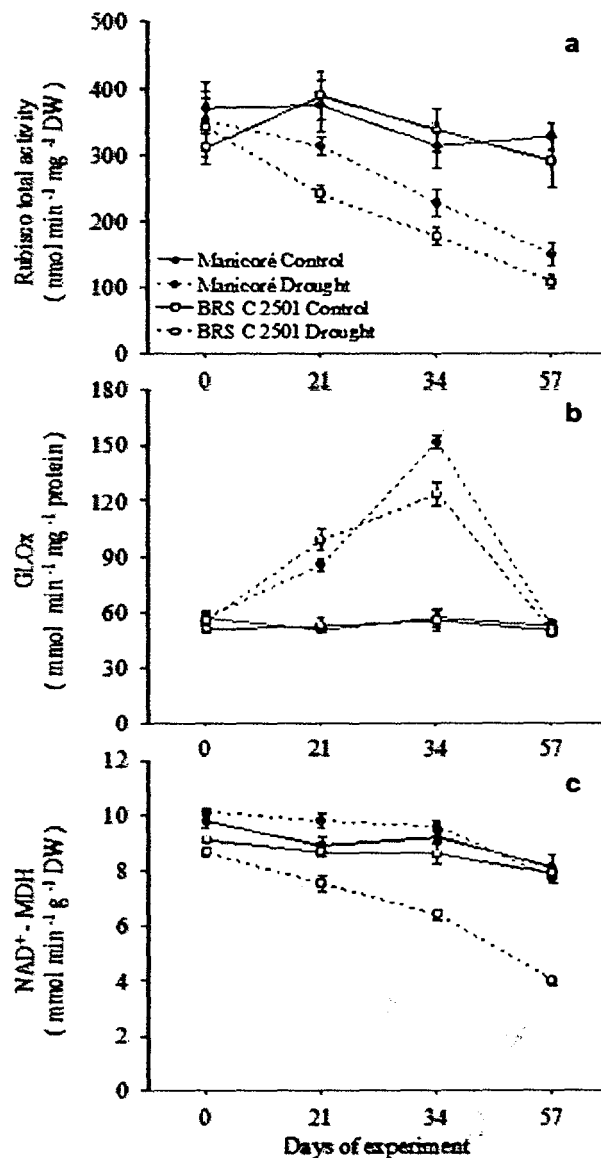
**Figure 10** - Concentrations of chlorophyll *a* (Chl *a*; Fig. 10a), chlorophyll *b* (Chl *b*; Fig. 10b), total carotenoids (Car; Fig. 10c), and total chlorophyll to total carotenoids ratio (Chl *a+b*/Car; Fig. 10d) in two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) subjected to progressive drought. Data are the mean of six replicates  $\pm$  SE.



### 3.3.3 Activities of enzymes related to carbon metabolism

Relative to control plants, water deficit led to significant ( $P < 0.001$ , Table 4) decreases in Rubisco total activity in both hybrids, varying from 16% (day 21) to 54% (day 57) in BRS Manicoré, and from 38% (day 21) to 63% (day 57) in BRS C 2501 (Fig. 11a). In contrast, water deficit triggered significant ( $P < 0.001$ , Table 4) increases in GLO<sub>x</sub> activities in both BRS Manicoré (70% and 168% on days 21 and 34, respectively) and BRS C 2501 (88% and 125% on days 21 and 34, respectively) (Fig. 11b). The GLO<sub>x</sub> activity was sharply decreased to control levels in stressed plants of both BRS hybrids on day 57 (Fig. 11b).

**Figure 11** - Activities of Rubisco (Fig. 11a), glycolate oxidase (GLO<sub>x</sub>; Fig. 11b), and NAD<sup>+</sup>-Malate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>-MDH; Fig. 11c) in two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) subjected to progressive drought. Data are the mean of six replicates  $\pm$  SE.



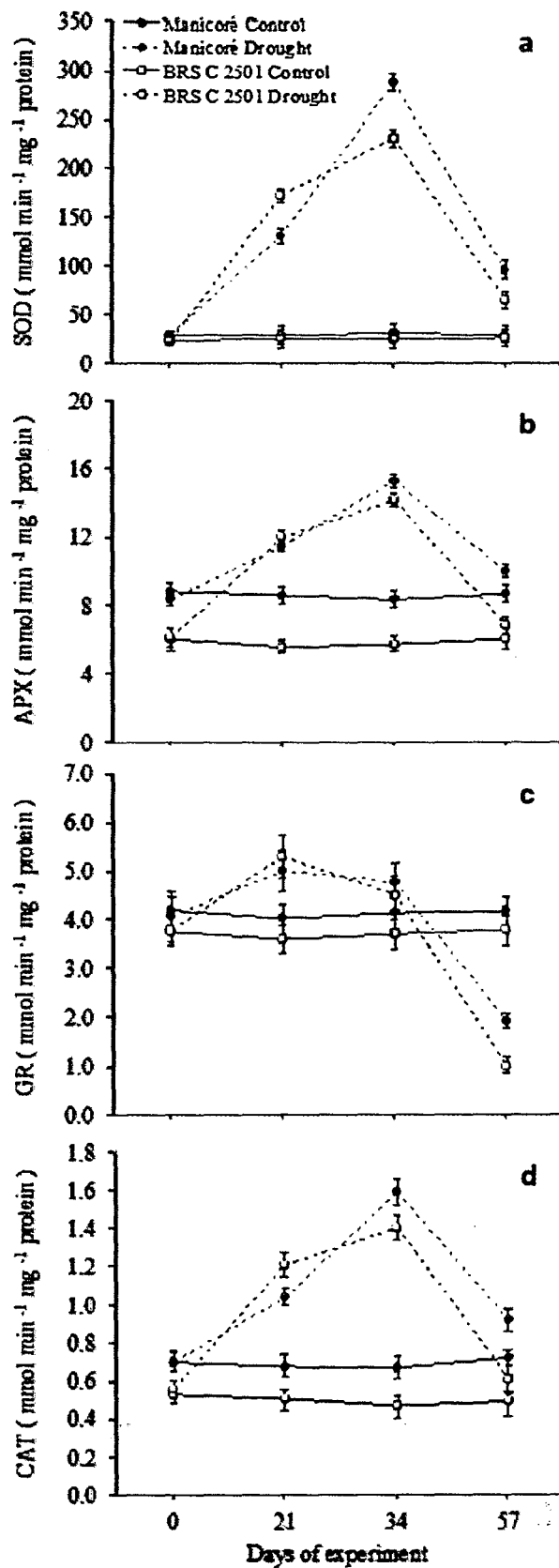
The constitutive activity of NAD<sup>+</sup>-MDH was similar between watered plants of both hybrids (around 8.78 mmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> DW) and remained nearly constant over experimental period (Fig. 11c). The progressive drought did not cause any significant ( $P > 0.05$ ) effect in NAD<sup>+</sup>-MDH activity of BRS Manicoré plants, indicating this enzyme remains operating disregarding plant water status (Fig. 11c). By contrast, the progressive drought caused 13, 26 and 49% decreases in NAD<sup>+</sup>-MDH activity of BRS C 2501 plants on days 21, 34 and 57 respectively (Fig. 11c).

### 3.3.4 Activities of antioxidant enzymes

Significantly higher activities of SOD (16%), APX (32%), GR (10%) and CAT (28%) were found in well-watered plants of BRS Manicoré than in BRS C 2501 (Fig. 12 and Table 4). These results highlight constitutive differences in the activity of antioxidant enzymes between these two genotypes and suggest a differential ability between hybrids to cope with ROS metabolism under non-stressful conditions. The drought caused remarkable ( $P < 0.001$ , Table 4) increases in the activities of SOD, APX, and CAT in both hybrids assessed on days 21 and 34, with a peak of activity on day 34 (Fig. 12). As compared with their respective control plants assessed on day 34, the enzyme activities were higher by 816% (SOD, Fig. 12a), 84% (APX, Fig. 12b) and 137% (CAT, Fig. 12d) in stressed plants of BRS Manicoré, whereas in BRS C 2501 such increases were higher by 799% (SOD, Fig. 12a), 146% (APX, Fig. 12b) and 200% (CAT, Fig. 12d). On day 57, activities of these enzymes decreased sharply in water-stressed plants of both hybrids, although remaining significantly higher than in their respective control counterparts (Fig. 12).

The stressed plants of both BRS hybrids displayed significant ( $P < 0.01$ , Table 4) increases in GR activity on days 21 and 34, with a peak of activity registered on day 21 (Fig. 12c). Overall, the highest GR activities in stressed plants of BRS Manicoré and BRS C 2501 were 25% and 46% greater than in their respective control plants. Nonetheless, on day 57, the GR activity decreased in stressed plants, ranging from 54% in BRS Manicoré to 73% in BRS C 2501 as compared with their respective control counterparts (Fig. 12c).

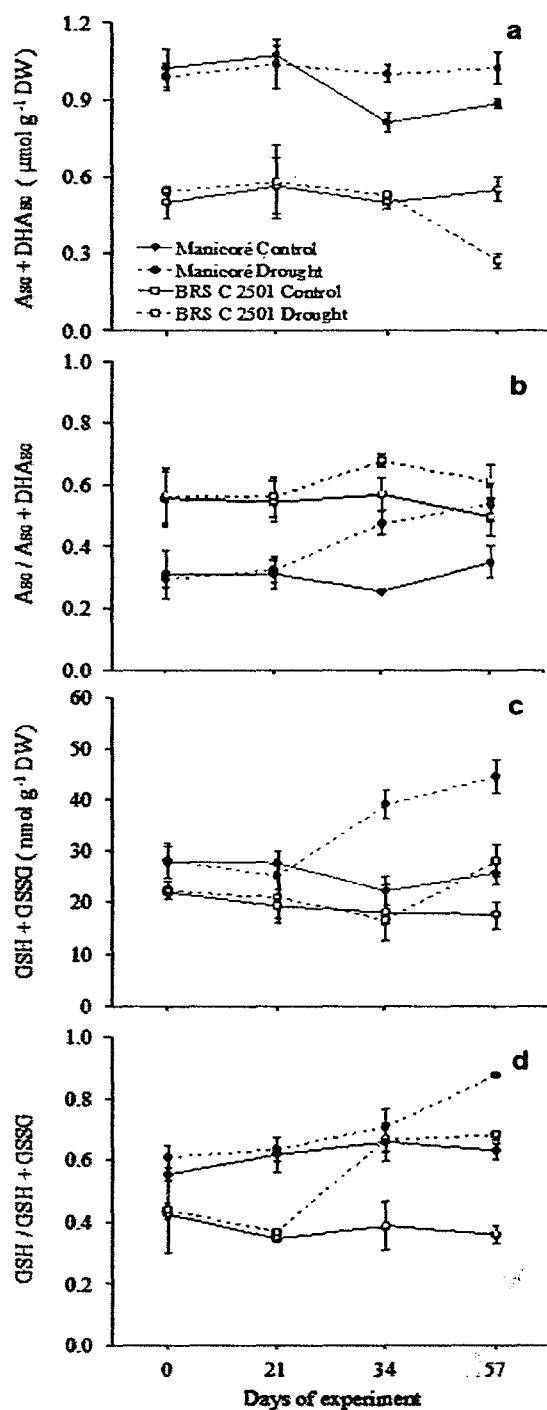
**Figure 12** - Activities of superoxide dismutase (SOD; Fig. 12a), ascorbate peroxidase (APX; Fig. 12b), glutathione reductase (GR; Fig. 12c) and catalase (CAT; Fig. 12d) in two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) subjected to progressive drought. Data are the mean of six replicates  $\pm$  SE.



### 3.3.5 Non-enzymatic antioxidant compounds

Regardless of watering regimes, ascorbate metabolism seemed to vary markedly in either hybrid (Fig. 13a).

**Figure 13** - Total ascorbate (Asc + DHAsc; Fig. 13a), ascorbate redox state (Asc/Asc + DHAsc; Fig. 13b), total glutathione (GSH + GSSG; Fig. 13c), and glutathione redox state (GSH/GSH + GSSG; Fig. 13d) in two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) subjected to progressive drought. Data are the mean of six replicates  $\pm$  SE.



Under control conditions, the total Asc (Asc + DHAsc) averaged over the course of the experiment was 44% higher in BRS Manicoré than in BRS C 2501 (Fig. 13a). In BRS Manicoré, the total Asc concentrations were 23% (day 34) and 16% (day 57) higher in stressed plants than in control plants (Fig. 13a). By contrast, the total Asc in water-stressed plants of BRS C 2501 did not differ from watered plants until day (day 34); however, total Asc in stressed plants assessed on day 57 was 30% lower in relation to control plants (Fig. 13a). The Asc redox state, represented by the Asc/Asc + DHAsc ratio, increased by 86% (day 34) and 54% (day 57) in stressed plants of BRS Manicoré relative to the control individuals (Fig. 13b). By contrast, more discrete increases (20 and 23% on days 34 and 57, respectively) in Asc redox state were observed in stressed plants of BRS C 2501 relative to their control counterparts (Fig. 13b).

Under well-watered conditions, total glutathione (GSH + GSSG) concentration, averaged over the course of the experiment, was 26% higher in BRS Manicoré than in BRS C 2501 (Fig. 13c). The total glutathione concentration in stressed BRS Manicoré plants was 75% (day 34) and 72% (day 57) higher than in control plants. By contrast, significant increase ( $P < 0.05$ ) in total glutathione (60%) in stressed BRS C 2501 plants was only at day 57 (Fig. 13c). From these results, the glutathione redox state (GSH/GSH + GSSG) in stressed plants of BRS Manicoré was 8% (day 34) and 39% (day 57) higher than in their respective control plants; and in stressed plants of BRS C 2501, it was higher by 72% (day 34) and 90% (day 57) than in their irrigated counterparts (Fig. 13d, Table 4).

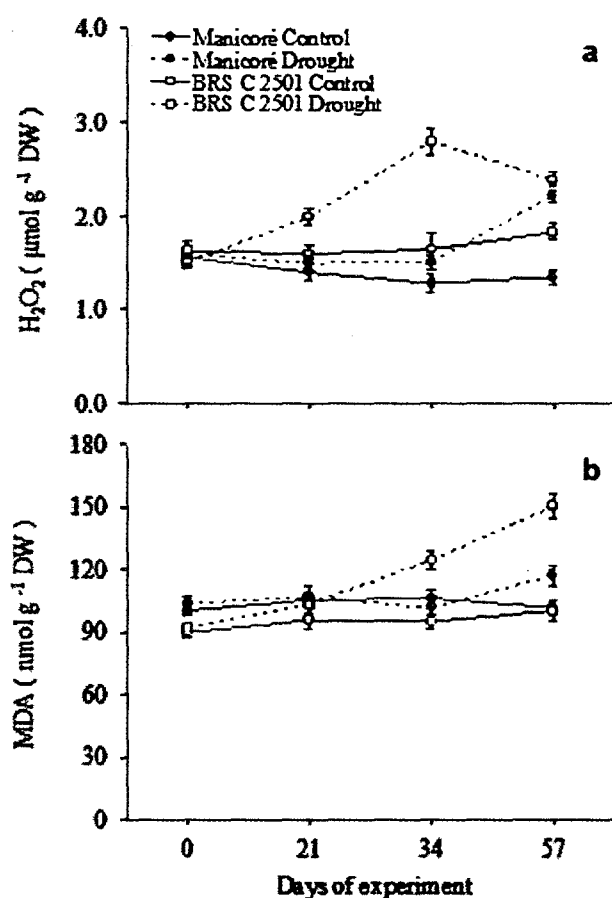
### 3.3.6 Hydrogen peroxide and lipid peroxidation

The  $H_2O_2$  concentrations in well-watered plants of BRS Manicoré were significantly lower (20%) than in BRS C 2501 over the course of the experiment. In BRS Manicoré, significant ( $P < 0.001$ , Table 4) increases in  $H_2O_2$  concentration triggered by drought were observed on days 34 (17%) and 57 (64%) (Fig. 14a). By contrast, these increases occurred earlier in BRS C 2501, as noted from day 21 (25%) onwards, with a peak of concentration at day 34 (70% higher than in control plants) (Fig. 14a).

The MDA concentrations in well-watered plants of both hybrids did not differ significantly over the experimental days (Fig. 14b and Table 4). This indicates that both materials have an intrinsic ability to control adequately ROS and prevent lipid membrane peroxidation under non-stressful conditions. There were no evident signs of lipid peroxidation

in water-stressed plants of BRS Manicoré until day 34; however, a significant ( $P < 0.001$ , Table 4) drought-induced increase (15%) in MDA concentration occurred on day 57 (Fig. 14b). In BRS C 2501, MDA accumulation due to drought stress was already noted on day 21. Overall, in this hybrid the increases in MDA in drought-stressed plants were more prominent compared to those found in BRS Manicoré, ranging from 31% on day 34 to 50% on day 57 relative to their control counterparts (Fig. 14b).

**Figure 14** - Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ; Fig. 14a) and lipid peroxidation assessed as malondialdehyde equivalents (MDA; Fig. 14b) in two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501) subjected to progressive drought. Data are the mean of six replicates  $\pm$  SE.



**Table 4.** *F* – statistics and associated significance levels for the effect of hybrids (H) and watering regimes (WR) and its interaction with times of experimental evaluation (T) on physiological variables in two oil palm hybrids (BRS Manicoré and BRS C 2501).

Variables	Factors					
	H	WR	H x WR	T x H	T x WR	T x H x WR
$\Psi_{pd}$	n.s.	1358.3***	n.s.	n.s.	654.7***	n.s.
<i>A</i>	n.s.	4684.5***	n.s.	5.0**	619.3***	n.s.
<i>g<sub>s</sub></i>	27.8***	3262.9***	n.s.	8.3***	590.8***	3.5*
<i>C/C<sub>a</sub></i>	71.1***	27451.0***	39.0***	14.2***	5299.4***	8.8***
Chl <i>a</i>	724.5***	1090.0***	12.1**	4.3*	396.8***	10.2***
Chl <i>b</i>	183.1***	409.9***	90.3***	9.8***	35.0***	7.8***
Car	401.2***	184.7***	10.4**	12.2***	80.5***	13.8***
Chl <i>a+b</i> /Car	123.3***	475.3***	15.9**	2.8*	89.0***	5.7**
Rubisco	26.8***	317.0***	6.9*	n.s.	37.5***	6.2**
GLOx	20.6***	1786.6***	4.5*	38.8***	653.8***	29.6***
NAD <sup>+</sup> -MDH	758.8***	200.3***	400.0***	21.8***	98.9***	33.7***
SOD	83.5***	10847.9***	17.4***	145.2***	3276.2***	146.0***
APX	380.9***	916.5***	33.4***	17.1***	419.7***	23.0***
GR	n.s.	n.s.	n.s.	6.6**	32.3***	6.6**
CAT	132.1***	910.5***	8.8**	28.0***	376.6***	20.1***
Asc + DHAsc	1480.9***	n.s.	21.2***	7.5***	11.1***	25.9***
Asc/Asc+DHAsc	420.8***	61.6***	n.s.	11.9***	18.6***	n.s.
GSH + GSSG	304.4***	107.6***	26.9***	11.3***	35.9***	17.7***
GSH/GSH+GSSG	902.3***	353.5***	25.3***	16.3***	75.5***	17.0***
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	138.7***	183.2***	n.s.	90.2***	105.3***	45.9***
MDA	n.s.	230.6***	116.1***	49.0***	59.9***	28.9***

Level of significance: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; n.s., non-significant.

### 3.4 Discussion

Under full irrigation, both hybrids displayed similar photosynthetic performance as denoted by their similar values of *A* and *g<sub>s</sub>* over the course of the experiment (Fig. 9). The magnitude of these values is consistent to that previously reported for irrigated plants of other *E. guineensis* hybrids (CHA-UM et al., 2010; SURESH et al., 2010; MÉNDEZ et al., 2012; SURESH et al., 2012; MÉNDEZ et al., 2013). Under drought conditions,  $\Psi_{pd}$  decreased similarly over the course of the experiment regardless of hybrids and, therefore, the observed differences in physiological and biochemical variables between hybrids should be primarily

related to varying intrinsic abilities of each genotype to cope with progressive soil water shortage. Indeed negative values of  $A$ , and values of  $g_s$  approaching zero, were recorded earlier in BRS C 2501 than in BRS Manicoré (Fig. 9), suggesting a relatively improved physiological performance of the BRS Manicoré hybrid under long-term drought conditions.

The effects of drought reducing  $A$  have actually been explained in terms of increases in diffusive limitations (that can be further partitioned into stomatal and mesophyll restrictions) and biochemical limitations (CHAVES et al., 2009; FLEXAS et al., 2012). Given that the decreases in  $A$  were accompanied by sharp reductions in  $g_s$  coupled with remarkable increases in  $C_i/C_a$  (Fig. 9) the anticipated lower influx of  $\text{CO}_2$  into the leaves caused by stomatal closure cannot be considered as a primary factor associated with the reduction in  $A$ . In addition to stomatal constraints, mesophyll limitations might also have played a role in constraining  $\text{CO}_2$  diffusion from the intercellular air spaces to the sites of carboxylation in the chloroplasts, as might be expected from the intrinsic co-regulation of stomatal and mesophyll conductance under drought stress (FLEXAS et al., 2008; 2012). While some diffusive limitations imposed by the mesophyll could not be excluded, we contend that such limitations, if at all, had only negligible importance in determining the photosynthetic capacity of drought-stressed plants under our experimental conditions. This suggestion is circumstantially supported by the remarkable increases in  $C_i/C_a$  (which is expected to largely overcome limitations to  $\text{CO}_2$  diffusion throughout the mesophyll) and also because the carboxylation capacity of Rubisco was depressed, especially as the internal water status became less conducive to keep the metabolic activities of the plants. Therefore, the decreases in  $A$  in this current study may largely be linked to dysfunctions at the level of the biochemical reactions associated with  $\text{CO}_2$  fixation, as suggested to occur under severe drought conditions due possibly to limitations in RuBP synthesis caused by ATP deficiency (LAWLOR; CORNIC, 2002; LAWLOR; TEZARA, 2009). Under these circumstances, decreases in  $A$  could not be prevented by an external  $\text{CO}_2$  supply, thus reinforcing the role of non-diffusive factors as the prime cause of decreased photosynthetic capacity (LAWLOR; CORNIC, 2002).

In addition to likely compromising the biochemical ability for  $\text{CO}_2$  fixation, the drought stress could also have provoked a range of dysfunctions at the photochemical level, as denoted from the remarkable decreases in Chl  $a$  and Chl  $b$  pools under drought stress regardless of plant hybrids. Decreases in both Chl  $a$  and Chl  $b$  (up to 50%) were previously reported in potted *E. guineensis* plants subjected to progressive water deficit imposed by withholding irrigation (CHA-UM et al., 2013) and in seedlings subjected to water deficit

induced by mannitol or polyethylene glycol in a culture medium (CHA-UM et al., 2010; 2012); these decreases were linearly associated with reductions in both maximum and actual quantum yield of PSII which, in turn, were directly related to decreases in  $A$  (CHA-UM et al., 2010; 2012; 2013). In any case, given that  $A$  was almost suppressed in this current study due to the imposed stress, it is unlikely that photochemical disorders associated with pigment degradation have contributed significantly for impairing the  $\text{CO}_2$  fixation at the biochemical level.

Notably, the decreases in  $A$  were not accompanied by commensurate decreases in Rubisco total activity irrespective of plant hybrids. This response, altogether with the marked increases in  $\text{GLO}_x$  (Fig. 11b) and CAT (Fig. 12d) activities under drought stress, suggests that photorespiration occurred at high rates under drought conditions, particularly in BRS Manicoré. Increased photorespiration rates, impaired  $\text{CO}_2$  fixation and the likely maintenance (or even increase as in BRS Manicoré) of mitochondrial respiration (indirectly evidenced by  $\text{NAD}^+$ -MDH activity in stressed plants, Fig 11c) are expected to increase ROS production that must be detoxified to avoid oxidative stress (MITTLER, 2002; MILLER et al., 2008). Here, it is immediately evident that BRS C 2501 plants triggered more markedly its enzymatic antioxidant system (higher relative increases and higher absolute activities of SOD, APX, GR, CAT and  $\text{GLO}_x$ ) earlier (day 21) than did Manicoré. Nonetheless, such a triggering failed in order to BRS C 2510 could successfully cope with drought stress as compared to BRS Manicoré given that ROS (e.g.,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pools) and MDA (a marker for oxidative stress) pools increased earlier (with greater decreases in total Chl) in BRS C 2510 than in BRS Manicoré (Fig. 14). Given these facts, the earlier up-regulation of the enzymatic antioxidant system in BRS C 2510 should precisely represent its increased susceptibility to drought events compared with BRS Manicoré. Furthermore, with the progress of drought stress (particularly on day 34), BRS Manicoré was better able to cope with oxidative stress through a more robust antioxidant system, as denoted by its higher absolute activities of SOD, APX, GR and CAT relative to BRS C 2501. Furthermore, regardless of drought severity, this hybrid displayed increased pools of total carotenoids (that may play a key role in photoprotection by xanthophylls engaged in sustained thermal energy dissipation; LOGAN et al., 2007) coupled with lower Chl  $a + b/\text{Car}$  ratio, which suggests a more adequate balance between light capture and dissipation, a fact which might be of utmost importance to avoid the creation of an oxidizing environment within chloroplasts (POMPELLI et al., 2010). In addition, BRS Manicoré also displayed higher total Asc and GSH pools (coupled with similar Asc and

improved GSH redox states) than did BRS C 2501 (Fig. 13). As a final consequence, BRS Manicoré was better able to limit oxidative stress in its leaf tissues than did its BRS C 2501 counterpart, even on day 57 when  $\Psi_{pd}$  reached values below -4.0 MPa. Such a low  $\Psi_{pd}$  is indicative of a severe drought stress; under these circumstances the unequivocal down-regulation of the enzymatic antioxidant system in parallel to the up-regulation of non-enzymatic antioxidants might represent different strategies of oil palm plants to cope with drought-induced oxidative stress depending on the severity of drought events.

### 3.5 Conclusion

In summary, both hybrids displayed similar water statuses, and thus differences in their abilities to cope with drought stress is unlikely to have been associated with varying plant water relations, but were rather associated with biochemical traits especially those related to an improved antioxidant system under drought stress. In this context, it is tempting to conclude that BRS Manicoré is better able to tolerate drought than BRS C 2501 by triggering multiple antioxidant strategies involved both in ROS scavenging (SOD, APX, GR and CAT) and dissipation of excess energy and/or reducing equivalents (photorespiration, NAD<sup>+</sup>-MDH, Car, ascorbate and glutathione pools) particularly under severe drought stress. We believe that our data provide valuable resources for traits of physiological importance that can be used in oil palm-breeding programs to select hybrids with improved performance in drought-prone regions.

## REFERENCES

- ARAKAWA, N.; TSUTSUMI, K.; SANCEDA, N. G.; KURATA, T.; INAGAKI, C. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, p. 1289–1290, 1981.
- ARANJUELO, I.; MOLERO, G.; ERICE, G.; AVICE, J. C.; NOGUÉS, S. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfafa (*Medicago sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 111–123, 2011.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, p. 391–396, 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, p. 601–639, 1999.
- BASTOS, T. X.; MÜLLER, A. A.; PACHECO, N. A.; SAMPAIO, S. M. N.; ASSAD, E. D.; MARQUES, A. F. S. Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do dendezeiro no estado do Pará. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 9, p. 564–570, 2001.
- BHATT, D.; NEGI, M.; SHARMA, P.; SAXENA, S. C.; DOBRIYAL, A. K.; ARORA, S. Responses to drought induced oxidative stress in five finger millet varieties differing in their geographical distribution. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 347–353, 2011.
- BIAN, S.; JIANG, Y. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 264–270, 2009.
- BOOKER, F. L.; REID, C. D.; BRUNSCHON-HARTI, S.; FISCUS, E. L.; MILLER, J. E. Photosynthesis and photorespiration in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] chronically exposed to elevated carbon dioxide and ozone. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1843–185, 1997.
- 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, p. 248–254, 1976.
- CAKMAK, I.; HORST, J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiology Plant**, v. 83, p. 463–468, 1991.
- CARVALHO, K. S.; PINHEIRO, H. A.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA JÚNIOR, D. D.; CASTRO, G. L. S.; CRUZ, F. J. R.; FUJIYAMA, B. S. Diurnal changes in leaflet gas exchange, water status and antioxidant responses in *Carapa guianensis* plants under water deficit conditions. **Acta Physiology Plant**, 35:13–21, 2013.

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

CHA-UM, S.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Physio-biochemical responses of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings to mannitol- and polyethylene glycol-induced iso-osmotic stresses. **Plant Production Science**, v. 15, p. 65–72, 2012.

CHA-UM, S.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Osmotic potential, photosynthetic abilities and growth characters of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings in responses to polyethylene glycol-induced water deficit. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 6509–6516, 2010.

CHA-UM, S.; YAMADA, N.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Mannitol-induced water deficit stress in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings. **Journal of Oil Palm Research**, v. 23, p. 1193–1201, 2011.

CHA-UM, S.; YAMADA, N.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Physiological features and growth characters of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to reduced water-deficit and rewatering. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, p. 432–439, 2013.

CHAKRABORTY, U.; PRADHAN, B. Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 117–130, 2012.

CHUGH, V.; KAUR, N.; GUPTA, A. K. Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 48, p. 47–53, 2011.

COSTA, M. A.; PINHEIRO, H. A.; SHIMIZU, E. S. C.; FONSECA, F. T.; SANTOS FILHO, B. G.; MORAES, F. K. C.; FIGUEIREDO, D. M. Lipid peroxidation, chloroplastic pigments and antioxidant strategies in *Carapa guianensis* (Aubl.) subjected to water-deficit and short-term rewetting. **Trees**, v. 24, p. 275–283, 2010.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; DANTAS, J. C. R.; ROCHA, R. N. C. **Procedimentos para produção de sementes comerciais de dendezeiro na Embrapa Amazônia Ocidental** (Documentos 54). Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2007.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R. **BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal** (Comunicado técnico 85). Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2010.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212–228, 2015.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMES, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Plant Physiology**, v. 127, p. 343–352, 2006.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, v. 89, p. 183–189, 2002.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; DIAZ-ESPEJO, A.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H. Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. **Plant Cell Environmental**, v. 31, p. 602–621, 2008.

FLEXAS, J.; BARBOUR, M. M.; BRENDEL, O.; CABRERA, H. M.; CARRIQUÍ, M.; DÍAZ-ESPEJO, A. DOUTHE, C.; DREYER, E.; FERRIO, J. P.; GAGO, J.; GALLÉ, A.; GALMÉS, J.; KODAMA, N.; MEDRANO, H.; NIINEMETS, U.; PEGUERO-PINA, J. J.; POU, A.,; RIBAS-CARBÓ, M.; TOMÁS, M.; TOSENS, T.; WARREN, C. R. Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: An unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science**, v. 193-194, p. 70-84, 2012.

FOYER, C. H. The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. In: INZÉ, D.; VON MONTAGU, M. (eds) **Oxidative stress in Plants**. Taylor and Francis, London, 2002, p. 33–68.

FOYER, C. H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, v. 133, p. 21–25, 1976.

GAY, C.; GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 149–155, 2000.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, v. 189, p. 329–339, 1993.

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

GILLESPIE, K. M.; AINSWORTH, E. A. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. **Nature protocols**, v. 2, p. 871–874, 2007.

GONDIM, F. A.; MIRANDA, R. S.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, p. 251–260, 2013.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, p. 207–212, 1980.

HASHEMINASAB, H.; ASSAD, M. T.; ALIAKBARI, A.; SAHHAFI, S. R. Influence of drought stress on oxidative damage and antioxidant defense systems in tolerant and susceptible wheat genotypes. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, p. 20–30, 2012.

HAVAUX, M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends in Plant Sciences**, v. 3, p. 147–151, 1998.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.

HOMMA, A. K. O.; FURLAN JÚNIOR, J.; CARVALHO, R. A. Bases para uma política de desenvolvimento da cultura do dendezeiro na Amazônia. In: VIÉGAS I. J. M.; MÜLLER, A. A. (eds) **A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira**. Embrapa Amazônia Oriental/Ocidental, Belém/Manaus, 2000, p. 11–30.

JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INÈS, J.; AL-JUBURI, H. J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiology Plant**, v. 31, p. 427–436, 2009.

KANWISCHER, M.; PORFIROVA, S.; BERGMÜLLER, E.; DÖRMANN, P. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition and oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 137, p. 713–723, 2005.

LANDSBERG, J. J. **Physiological ecology of forest production**. Academic Press, London, 1986.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell Environmental**, v. 25, p. 275–294, 2002.

LAWLOR, D. W.; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, v. 103, p. 543–549, 2009.

LICHTHENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.

LIMA, A. L. S.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239–247, 2002.

LIMA, T. T. S.; MIRANDA, I. S.; VASCONCELOS, S. S. Effects of water and nutrient availability on fine root growth in eastern Amazonian forest regrowth, **Brazil**. **New Phytology**, v. 187, p. 622–630, 2010.

LOGAN, B. A.; ADAMS, W. W.; DEMMIG-ADAMS, B. Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. **Functional Plant Biology**, v. 34, p. 853–859, 2007.

MAURINO, V. G.; PETERHANSEL, C. Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 249–256, 2010.

MÉNDEZ, Y. D. R.; CHACÓN, A. L. M.; ROMERO, H. M. Biochemical and physiological characterization of oil palm interspecific hybrids (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) grown in hydroponics. **Acta Biológica Colombiana**, v. 18, p. 465–472, 2013.

- MÉNDEZ, Y. D. R.; CHACÓN, L. M.; BAYONA, C. J.; ROMERO, H. M. Physiological response of oil palm interspecific hybrids (*Elaeis oleifera* H.B.K. Cortes versus *Elaeis guineensis* Jacq.) to water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 273–280, 2012.
- MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiology Plant**, v. 133, p. 481–489, 2008.
- MIRZAEI, M.; MOIENI, A.; GHANATI, F. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 15:593–602, 2013.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 405–410, 2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 490–498, 2004.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.
- NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; LYTOVCHENKO, A.; SMITH, A. M.; LOUREIRO, M. E.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. **Plant Physiology**, v. 137, p. 611–622, 2005.
- PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; FONTES, E. P. B.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clone of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v. 167, p. 1307–1314, 2004.
- PINHEIRO, H. A.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; FERREIRA, V. M.; CÂMARA, C. A.; CABRAL, F. F.; OLIVEIRA, J. F.; CARVALHO, L. W. T.; SANTOS, J. M.; SANTOS FILHO, B. G. Leaf gas exchange, chloroplastic pigments and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings subjected to salt stress conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 385–392, 2008.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 869–882, 2011.
- POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v. 126, p. 445–462, 2001.
- POMPELLI, M. F.; MARTINS, S. C. V.; ANTUNES, W. C.; CHAVES, A. R. M.; DAMATTA, F. M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal Plant Physiology**, v. 167, p. 1052–1060, 2010.
- RAZA, S. H.; ATHAR, H. R.; ASHRAF, M.; HAMEED, A. Glycinebetaine-induced

modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 368–376, 2007.

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

RHOADS, D. M.; UMBACH, A. L.; SUBBAIAH, C. C.; SIEDOW, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 357–366, 2006.

SCHEIBE, R. Malate valves to balance cellular energy supply. **Plant Physiology**, v. 120, p. 21–26, 2004.

SULPICE, R.; TSCHOEP, H.; VON KORFF, M.; BUSSIS, D.; USADEL, B.; HOHNE, M.; WITUCKA-WALL, H.; ALTMANN, T.; STITT, M.; GIBON, Y. Description and applications of a rapid and sensitive non-radioactive microplate-based assay for maximum and initial activity of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. **Plant Cell Environmental**, v. 30, p. 1163–1175, 2007.

SURESH, K.; NAGAMANI, C.; KANTHA, D. L.; KUMAR, M. K. Changes in photosynthetic activity in five common hybrids of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under water deficit. **Photosynthetica**, v. 50, p. 549–556, 2012.

SURESH, K.; NAGAMANI, C.; RAMACHANDURU, K.; MATHUR, R. K. Gas-exchange characteristics, leaf water potential and chlorophyll *a* fluorescence in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under water stress and recovery. **Photosynthetica**, v. 48, p. 430–436, 2010.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends Plant Science**, v. 13, p. 178–182, 2008.

WAHID, M. B.; ABDULLAH, S. N. A.; HENSON, I. E. Oil palm – Achievements and potential. **Plant Production Science**, v. 8, p. 288–297, 2005.

XIAO, X.; XU, X.; YANG, F. Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. **Silva Fenn**, v. 42, p. 705–719, 2008.

ZLATEV, Z. S.; LIDON, F. C.; RAMALHO, J. C.; YORDANOV, I. T. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. **Plant Biology**, v. 50, p. 389–394, 2006.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

As plantas estressadas do BRS Manicoré apresentam menores efeitos globais nas trocas gasosas, nas concentrações de carboidratos, de proteínas solúveis totais e atividades de enzimas associadas à fixação do CO<sub>2</sub>, síntese de amido e sacarose que as plantas estressadas do BRS C 2501. As plantas do BRS Manicoré também apresentaram um sistema de defesa antioxidante mais eficiente que as plantas do BRS C 2501. Embora os efeitos do déficit hídrico no crescimento global das plantas tenha sido similar dentre os híbridos, é notável o fato de que as plantas do BRS Manicoré invistam preferencialmente os fotoassimilados produzidos durante o estresse no crescimento de um sistema radicular mais denso. Isto posto, conclui-se que as plantas do BRS Manicoré reúnem um conjunto de respostas morfofisiológicas e bioquímicas que devem lhe permitir tolerar mais satisfatoriamente ao déficit hídrico que as plantas do BRS C 2501.