

Trocas gasosas e injúrias foliares visíveis em plantas jovens de *Astronium graveolens* Jacq. fumigadas com ozônio

Jéssica Cristina Cassimiro¹, Silvia Ribeiro de Souza¹ e Regina Maria de Moraes^{1,2}

Recebido: 22.04.2015; aceito: 17.09.2015

ABSTRACT - (Gas exchange and visible leaf injuries in saplings of *Astronium graveolens* Jacq. fumigated with ozone). *Astronium graveolens* Jacq. is a tree species of large occurrence in the Atlantic and the semideciduous forests. As ozone (O₃) concentrations in São Paulo State are phytotoxic, it was decided to determine some physiological and biochemical responses of this species to O₃ due to its importance in reclamation programs. Saplings were kept in two closed chambers: filtered air (FA) and filtered air enriched with O₃ (AF + O₃, 100 ppb, 4 h day⁻¹, 7 days, n = 9). Leaf injury was assessed daily and at the end of the fumigation, carbon assimilation (A), stomatal conductance (gs), evapotranspiration (E), internal CO₂ concentration (Ci), maximum carbon assimilation (Amax), lipid peroxidation (LP), and relative permeability of electrolytes (RPE) were established. O₃ induced the appearance of leaf injuries and reduced A, gs, E, and Amax and did not change Ci, LP, and RPE. The species is moderately sensitive to O₃. Long-term experiments should be conducted to verify if gas exchange reduction may adversely affect growth and hence affecting its use in reforestation programs.

Keywords: Air pollution, tropical tree species, tropospheric ozone

RESUMO - (Trocas gasosas e injúrias foliares visíveis em plantas jovens de *Astronium graveolens* Jacq. fumigadas com ozônio). *Astronium graveolens* Jacq. é uma espécie arbórea de grande ocorrência na floresta atlântica de encosta e do interior do Estado de São Paulo. Como as concentrações de ozônio (O₃) no Estado de São Paulo são fitotóxicas, decidiu-se avaliar algumas respostas fisiológicas e bioquímicas da espécie ao O₃ devido sua importância em programas de recuperação de áreas degradadas. Plantas jovens foram mantidas em câmaras fechadas, uma com ar filtrado (AF) e outra com ar filtrado enriquecido com O₃ (AF + O₃, 100 ppb, 4 h dia⁻¹, 7 dias, n = 9). As injúrias foliares foram avaliadas diariamente e ao final da fumigação foram determinadas a assimilação de carbono (A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração interna de CO₂ (Ci), assimilação máxima de carbono (Amax), peroxidação de lipídios (PL) e permeabilidade relativa de eletrólitos (PRE). O O₃ induziu o surgimento de injúrias foliares e reduziu A, gs, E e Amax, porém não alterou Ci, PL e PRE. A espécie é medianamente sensível ao O₃. Experimentos de longa duração devem ser realizados para verificar se a redução nas trocas gasosas pode prejudicar o crescimento a ponto de reduzir sua aplicação em programas de reflorestamento.

Palavras-chave: espécies arbóreas tropicais, ozônio troposférico, poluição do ar

Introdução

A atividade antrópica introduz na atmosfera diferentes gases e partículas que modificam as proporções de seus compostos naturais, alterando suas características e comprometendo suas propriedades e funções. As concentrações de ozônio troposférico (O₃) têm aumentado globalmente numa taxa média de 1,5% ao ano e já atingem níveis capazes de afetar espécies nativas e cultivos agrícolas, além de constituir um risco às comunidades vegetais e ecossistemas (Zhang *et al.* 2012).

O O₃ é um forte agente oxidante formado a partir da interação entre óxidos de nitrogênio, compostos orgânicos voláteis e radiação UV. É um poluente de controle difícil, uma vez que seus precursores são emitidos principalmente por veículos automotores e o número destes continua a aumentar. Além disso, ao contrário das regiões setentrionais onde o problema causado pelo O₃ é restrito ao verão, no Brasil muitas regiões apresentam clima favorável à sua formação durante praticamente o ano inteiro, por isso, o O₃ é o poluente aéreo com o maior número de ultrapassagens do padrão nacional de qualidade do ar na cidade de São Paulo (CETESB 2013).

1. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ecologia, Avenida Miguel Stéfano, 3.687, 04301-902 São Paulo, SP, Brasil

2. Autor para correspondência: regmoraes@yahoo.com.br

A entrada do O_3 na planta se dá através dos estômatos, durante o processo de trocas gasosas. No interior da folha, reage com a água e desencadeia uma intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, em excesso, podem causar desequilíbrio no sistema de defesa das plantas, oxidando proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos nucléicos e levando à produção de outras ERO (Halliwell & Gutteridge 2006). A interação das ERO com os ácidos graxos presentes na membrana celular gera uma reação em cadeia conhecida como peroxidação lipídica, alterando a estrutura e funcionalidade da membrana celular (Heath *et al.* 2009).

As trocas gasosas são bastante sensíveis ao O_3 , sendo a redução da assimilação de carbono uma das primeiras respostas induzidas pelo poluente. Ela decorre da redução da síntese e da atividade da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (Heath *et al.* 2009), responsável pela carboxilação. A diminuição da capacidade fotossintética e consequentemente de produtos fotoassimilados resulta na redução do crescimento vegetal (Cho *et al.* 2011, Guidi *et al.* 2011). Outras respostas induzidas pelo O_3 são alterações no sistema antioxidante (Heath *et al.* 2009), peroxidação de lipídios (Pellegrini *et al.* 2011), aceleração da senescência foliar e a produção de injúrias foliares visíveis em espécies sensíveis (Sanz *et al.* 2002, Novak *et al.* 2003). Após afetar o indivíduo, os efeitos induzidos pelo O_3 podem progredir até níveis mais altos da organização biológica levando à exclusão competitiva de genótipos sensíveis e alterando a estrutura e a composição específica de comunidades (Gimeno *et al.* 2004).

Vários estudos relatam danos induzidos pelo O_3 em espécies arbóreas das regiões temperadas, como os listados acima, entretanto, há poucas informações sobre as respostas de espécies nativas de regiões tropicais. Essa é uma questão urgente, pois as concentrações desse gás nos trópicos já são iguais ou superiores às verificadas nos países desenvolvidos (Moura *et al.* 2014).

Em estudos realizados com espécies nativas em condições semi-controladas, foi verificado que plantas de *Psidium guajava* L., paluma, *Tibouchina pulchra* Cogn. e *Caesalpinia echinata* Lam. expostas conjuntamente ao O_3 apresentaram diferentes graus de sensibilidade. *P. guajava* paluma apresentou sintomas foliares visíveis na primeira semana de exposição, *T. pulchra* somente após 60 dias e *C. echinata* não apresentou injúrias (Moraes *et al.* 2006, Furlan *et al.* 2007, 2008). Em experimento de duração mais longa

e em condições de campo, Bulbovas *et al.* (2010) verificaram redução do crescimento e alterações na atividade de antioxidantes em *C. echinata*. Moura *et al.* (2014), em estudo realizado em fragmentos florestais no Estado de São Paulo, observaram a presença de sintomas semelhantes aos induzidos pelo O_3 em espécimes de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. e *Astronium graveolens* Jacq., mas não em *Croton floribundus* Spreng. Cardozo *et al.* (2014) verificaram que nesta última espécie o O_3 induz a produção de compostos orgânicos voláteis que estão relacionados com a tolerância da espécie ao poluente.

O objetivo deste estudo foi avaliar respostas fisiológicas e bioquímicas induzidas pelo O_3 em *Astronium graveolens*, uma vez que a espécie é muito utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas (Hiram-Jr 2010) devido à sua grande ocorrência nas florestas paulistas, as quais, assim como muitas áreas de reflorestamento, se situam em regiões do Estado de São Paulo onde são registradas concentrações fitotóxicas de O_3 .

Material e métodos

Cultivo - *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae), o guaritá, é uma espécie secundária inicial que pode atingir de 15 a 25 m de altura e de 40 a 60 cm de diâmetro (Lorenzi 2002, Ribeiro *et al.* 2005). Tem ampla distribuição no Brasil, ocorrendo na Floresta Atlântica desde o sul do Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, principalmente na Floresta Estacional do interior do Estado de São Paulo.

Indivíduos jovens, com três meses e cerca de 30 cm de altura, foram obtidos em um viveiro de espécies nativas. As plantas foram transplantadas para vasos plásticos de 4,5 l, utilizando como substrato a mistura de casca de *Pinus* e vermiculita fina na proporção 3:1. Após o transplante, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com ar filtrado por dois meses para aclimação. Durante este período a adubação foi realizada mensalmente com 100 ml de solução hidrossolúvel de N:P:K (10:10:10) e foram tomados todos os cuidados quanto à irrigação e fitossanidade.

Exposição - As plantas de *A. graveolens* foram expostas em um sistema de câmaras fechadas de fumigação que consistem em uma estrutura de aço inoxidável com dimensão de 85 × 85 × 94 cm (largura, comprimento, altura) coberta com filmes de teflon (Souza & Pagliuso 2009). Há um suporte para vasos em sua parte inferior e, abaixo deste, um reservatório com água, sendo a

irrigação por capilaridade. Em cada câmara colocou-se nove plantas que foram expostas a dois tratamentos: ar filtrado (AF) e ar filtrado + 100 ppb de O₃ (AF + O₃), durante 4 h dia⁻¹ por sete dias. O O₃ foi gerado por meio de descargas elétricas e sua concentração nas câmaras foi medida continuamente com um monitor Ecotech 9810B. Com as concentrações médias horárias de O₃ foi calculada a AOT40, *accumulated ozone exposure over the threshold of 40 ppb.h*, ou seja, exposição acumulada de ozônio acima de 40 ppb.h, um índice para proteção à vegetação adotado pela Comunidade Européia (Fuhrer *et al.* 1997).

A temperatura foi monitorada com termômetros comuns e a umidade relativa do ar com termohigrômetros HTR-170 (InstruTerm, São Paulo, SP). A radiação fotossinteticamente ativa foi medida descontinuamente com um quantômetro da LI-COR (Nebraska, USA).

Determinação das trocas gasosas - As medidas de trocas gasosas instantâneas foram realizadas no final do experimento, em seis plantas de cada tratamento, no período da manhã (entre 9 e 11 horas) e em folhas com o limbo totalmente expandido, pertencentes ao 3° ou 4° nó a partir do ápice. Foram medidas as taxas de assimilação líquida de CO₂ sob radiação fotossinteticamente ativa saturante (*A*, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), condutância estomática (*g_s*, mol H₂O m⁻² s⁻¹) e transpiração (*E*, mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e a concentração interna de CO₂ (*C_i*, ppm), utilizando-se um analisador portátil de gases por infravermelho com fonte opcional de luz (LCPro+, ADC®, UK). As trocas gasosas foram determinadas com concentração de CO₂, temperatura e umidade relativa do ar ambientais e densidade de fluxo de fótons saturante (500 μmol m⁻² s⁻¹) previamente determinado por meio da realização de curvas de resposta à luz. A eficiência instantânea de uso da água (EUA) foi calculada dividindo-se a taxa de assimilação pela taxa de transpiração (*A/E*, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹/mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e a eficiência instantânea de carboxilação foi obtida pela divisão da taxa de assimilação de carbono pela concentração interna de CO₂ (*A/C_i*, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹/ppm CO₂).

Curva de resposta à luz - Foram realizadas curvas de taxa de assimilação líquida de carbono em resposta à densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, com valores de 950, 700, 500, 250, 125, 75, 30 e 0 μmol fótons m⁻² s⁻¹. As curvas foram realizadas no período de manhã (entre 9 e 11 horas) em três plantas de cada tratamento, com o analisador de gases por infravermelho já descrito. As curvas foram

ajustadas com o modelo apresentado em Prado & Moraes (1997): $A = A_{max} [1 - e^{-k(RFA - I_c)}]$ onde *A* é a assimilação máxima de carbono, *e* é a constante de Euler (2,72), *k* é a inclinação da reta, RFA é a radiação fotossinteticamente ativa e *I_c* é a irradiância de compensação ou ponto de compensação à luz (corresponde ao valor de RFA em que *A* é igual a 0 μmol fótons m⁻² s⁻¹). Calculou-se a irradiância de saturação, *I_s*, substituindo na equação acima *A* por *A_{max}* multiplicado por 0,9. O rendimento quântico aparente (RQA, número de moléculas de CO₂ assimiladas por fóton recebido) foi obtido com a equação: $RQA = A_{max} \cdot k \cdot e^{k \cdot I_c}$.

Sintomas foliares visíveis - Todas as plantas foram avaliadas diariamente com uma lupa de aumento 10×, antes do início de cada novo ciclo de fumigação. As injúrias foliares em *A. graveolens* caracterizam-se como pequenas pontuações escuras intervenais rodeadas por cloroses, que surgem inicialmente em folhas mais velhas e atingem primeiramente a superfície abaxial (Moura *et al.* 2014). Com esses dados, foram calculados a porcentagem de área foliar ocupada pelos sintomas e os índices de incidência e severidade. A incidência é o número de indivíduos com sintomas foliares, resultantes da exposição ao O₃, em porcentagem do número total de indivíduos e severidade é o número de folhas com danos em porcentagem do número total de folhas das plantas que possuem danos. As porcentagens do limbo com sintomas foram agrupadas em intervalos de 1 - 5% (classe 1), 6 - 25% (classe 2), 26 - 50% (classe 3), 51 - 75% (classe 4) e 76 - 100% (classe 5) e com os dados das classes foi calculado o Índice de Injúria Foliar (IIF), segundo Furlan *et al.* (2007). O IIF consiste na média ponderada da quantidade de folhas em cada classe de injúria.

Permeabilidade Relativa de Eletrólitos - Ao final do experimento, foram extraídos 18 discos foliares de 2 cm de diâmetro de folhas do 3° nó (do ápice para a base) de cada planta para as análises da permeabilidade relativa de eletrólitos. Os discos foram lavados e incubados em água destilada por 24 horas a temperatura ambiente. Após isso, condutividade elétrica da solução foi determinada (C1). Os discos foram então congelados em nitrogênio líquido e imersos em água destilada e após 24 h a condutividade elétrica foi novamente medida (C2). A permeabilidade relativa de eletrólitos foi definida como: $PRE (\%) = C1 / (C1 + C2) * 100$ (Clebsch *et al.* 2009).

Peroxidação lipídica - A peroxidação lipídica (PL) foi determinada como descrito por Davenport *et al.* (2003) medindo-se concentração de malondialdeído (MDA). Após a fumigação, amostras de folhas frescas de todas as plantas (0,30 g) foram maceradas em solução com 1,4 ml de ácido tricloroacético (0,1%) e 20% de polivinilpirrolidona. Após a homogeneização, 1,4 ml da solução foi centrifugada a 10.000 g por 10 min. Posteriormente, 0,250 ml de sobrenadante foi adicionado a uma solução aquosa com 5% de ácido tricloroacético e 0,25% de ácido tiobarbitúrico e incubado em banho-maria a 95 °C durante 30 min. Em seguida foi resfriado e novamente centrifugado por 10 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. As determinações das concentrações de MDA foram obtidas através da fórmula: $MDA = (Abs1 - Abs2) * 1,55 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo as absorbâncias a 535 nm e 600 nm representadas respectivamente por Abs1 e Abs2.

Análise estatística - Os resultados obtidos nos dois tratamentos foram comparados com a utilização de teste *t*, com nível de significância de 5%. Foi realizada análise de regressão entre sintomas foliares visíveis e AOT40.

Resultados e Discussão

Características da exposição - Ao longo do período de exposição, a concentração horária média de O₃ variou de 69 ppb a 121 ppb e a AOT40 atingiu 2159 ppb.h. A temperatura esteve entre 26,3 e 34,2 °C, a umidade relativa média foi 79% e a radiação fotossinteticamente ativa média foi de 389 $\mu\text{mol} \cdot \text{fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Trocas gasosas - A exposição ao O₃ reduziu significativamente as trocas gasosas em *A. graveolens*. As taxas de A, gs e E nas plantas fumigadas corresponderam, respectivamente, a 55%, 53% e 49% das medidas no tratamento controle, AF (figura 1). A concentração interna de CO₂ (Ci) não diferiu significativamente entre os tratamentos e foi de 316 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em AF e 333 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em AF + O₃.

A redução da fotossíntese induzida pelo O₃ também foi observada em *Caesalpinia echinata* (Moraes *et al.* 2006), nas goiabeiras paluma e pedro-sato (Moraes *et al.* 2011), em *Croton floribundus* (Cardozo *et al.* 2014) e em um grande número de estudos com espécies de florestas temperadas (EPA 2006). A fotossíntese é fortemente relacionada à abertura estomática e governada pela concentração interna de gás carbônico (Grulke *et al.* 2007). Em *A. graveolens* a redução de A não foi acompanhada por um aumento

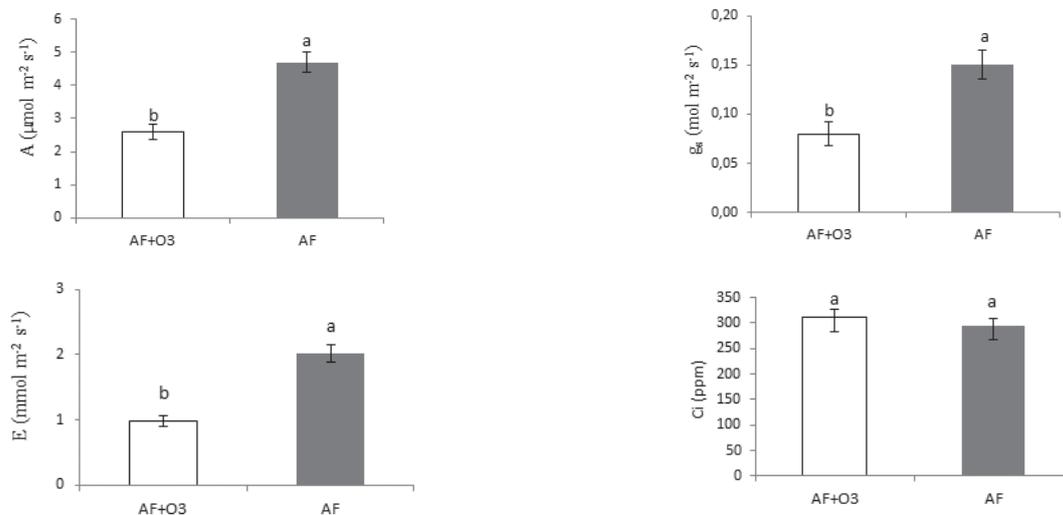


Figura 1. Taxas de assimilação líquida de CO₂ sob radiação fotossinteticamente ativa saturante (A, $\mu\text{mol} \text{CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs, $\text{mol} \text{H}_2\text{O} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiração (E, $\text{mmol} \text{H}_2\text{O} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ (Ci, ppm) em plantas jovens de *Astronium graveolens* Jacq. Médias \pm erro-padrão. AF: plantas mantidas em ar filtrado; AF + O₃: plantas fumigadas com O₃ (100 ppb/h, 4 h/dia, sete dias). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os dois tratamentos ($p < 0,05$).

Figure 1. Rates of net CO₂ assimilation under saturating photosynthetic active radiation (A, $\mu\text{mol} \text{CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), stomatal conductance (gs, $\text{mol} \text{H}_2\text{O} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and transpiration (E, $\text{mmol} \text{H}_2\text{O} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and internal CO₂ concentration (Ci, ppm) in saplings of *Astronium graveolens* Jacq. Means \pm standard error. AF: plants grown in filtered air; AF + O₃: plants fumigated with O₃ (100 ppb/hr, 4 hr/day, seven days). Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

proporcional em Ci, uma vez que A foi reduzida em 45% e Ci aumentou apenas 5%. Isso foi verificado por Noormets *et al.* (2001) em *Populus tremuloides*, Guidi *et al.* (2001) em *Populus × euramericana* e por Pellegrini *et al.* (2011) em *Liriodendrum tupilifera* que concluíram que a fotossíntese nessas espécies era limitada principalmente pela redução da capacidade de assimilação das células do mesofilo, com a Rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) sendo um dos primeiros alvos dos subprodutos do O₃. Segundo Heath (2008), o aumento da resistência mesofílica é causado pelas espécies ativas de oxigênio que degradam a Rubisco e reduzem sua síntese, diminuindo sua atividade e quantidade e, conseqüentemente, a assimilação do carbono. Isto deve ter ocorrido neste estudo, visto que a redução de gs não foi acompanhada da redução de Ci.

Como A foi mais baixa em AF + O₃ e Ci foi mais alta, as plantas desse tratamento apresentaram eficiência de carboxilação (A/Ci) mais baixa que as do controle. Também foram menos eficientes no uso da água (figura 2). Essas condições podem ter contribuído para a redução da vitalidade das plantas de AF + O₃, tornando-as mais suscetíveis ao surgimento de injúrias foliares.

As plantas fumigadas com O₃ tiveram sua assimilação máxima de carbono (A_{max}) reduzida em 58% (figura 3). Nas plantas do tratamento AF, A_{max} foi igual a 6,2 μmol m⁻² s⁻¹ enquanto em AF + O₃ foi 2,6 μmol m⁻² s⁻¹. O ponto de compensação à luz foi semelhante nos dois tratamentos, 30 μmol fótons m⁻² s⁻¹ em AF e 23 μmol fótons m⁻² s⁻¹ em AF + O₃. Entretanto, o ponto de saturação à luz foi reduzido nas plantas fumigadas: correspondeu a 124 μmol fótons m⁻² s⁻¹ em AF+O₃ e a 214 μmol fótons m⁻² s⁻¹ no controle. Esse resultado indica que o estresse induzido pelo O₃ torna as plantas jovens dessa espécie mais suscetíveis ao estresse luminoso como estresse secundário. O rendimento quântico aparente, dado pelo coeficiente angular da região linear da curva de resposta à luz, foi de 0,027 μmol CO₂ μmol fótons⁻¹ em AF e 0,030 em AF + O₃. Seu inverso indica que nas plantas de AF foram necessários 22 mol de fótons para fixar um mol de CO₂ enquanto as de AF + O₃ precisaram de 30 mol de fótons, sendo, portanto, menos eficientes. Todos esses aspectos contribuem para a redução da vitalidade da planta exposta ao O₃.

Injúrias Foliares Visíveis - As plantas fumigadas com O₃ apresentaram injúrias foliares semelhantes às descritas para a espécie (Moura *et al.* 2014, Cassimiro

2015, Fernandes 2015) e que consistem em pontos necróticos intervenais rodeados por cloroses. No 4º dia do experimento de fumigação, 83% das plantas submetidas ao poluente já apresentavam injúrias foliares (tabela 1). As injúrias aumentaram com o tempo de exposição ao O₃ e apresentaram forte correlação com a AOT40. A análise de regressão mostrou que a variação na concentração do poluente explicou cerca de 90% da variação na incidência e severidade de injúrias e 95% do IIF (figura 4). Isso apesar de a AOT40 não representar a dose de O₃ que efetivamente atinge a planta, mas apenas sua concentração no ar (Matyssek *et al.* 2004), uma vez que as condições ambientais muitas vezes reduzem gs em dias de altas concentrações de O₃, evitando sua entrada na folha. Além do mais, este índice de proteção à vegetação (AOT40) foi formulado para espécies de regiões temperadas, sendo que sua adequação para espécies tropicais ainda está em estudo (Cassimiro 2015).

Permeabilidade relativa de eletrólitos e peroxidação lipídica - Não houve diferença significativa entre os dois tratamentos quanto à permeabilidade relativa de eletrólitos, cujas médias foram de 19 ± 1,9% em AF e 25 ± 2,3% em AF + O₃. O mesmo ocorreu com relação à peroxidação lipídica, que foi de 2,5 ± 0,3 nmol g⁻¹MF e 3,2 ± 0,8 nmol g⁻¹MF em AF e AF+O₃, respectivamente.

A peroxidação lipídica é bastante relatada como indicador de danos à membrana causados pelo estresse

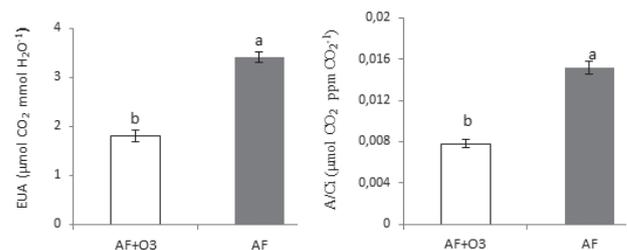


Figura 2. Eficiência instantânea de uso da água (EUA, μmol CO₂ mmol H₂O⁻¹) e eficiência instantânea de carboxilação (μmol CO₂ ppm CO₂⁻¹) em plantas jovens de *Astronium graveolens* Jacq. Médias ± erro-padrão. AF: plantas mantidas sob ar filtrado; AF + O₃: plantas fumigadas com O₃ (100 ppb/h, 4 h/dia, sete dias). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os dois tratamentos ($p < 0,05$).

Figure 2. Water use efficiency (μmol CO₂ mmol H₂O⁻¹) and carboxylative efficiency (μmol CO₂ ppm CO₂⁻¹) in saplings of *Astronium graveolens* Jacq. Means ± standard error. FA: Plants grown in filtered air; FA + O₃: plants fumigated with O₃ (100 ppb/hr, 4 hr/day, seven days). Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Tabela 1. Incidência (%), severidade (%) e índice de injúria foliar (%; IIF) em plantas jovens de *Astronium graveolens* Jacq. fumigadas com O₃ (100 ppb/h, 4h/dia, sete dias).

Table 1. Incidence (%), severity (%), and leaf injury index (%; IIF) in saplings of *Astronium graveolens* fumigated with O₃ (100 ppb/h, 4 h/day, seven days).

	Dias de exposição							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Incidência	0	33	50	50	83	83	83	83
Severidade	0	11	10	14	26	35	36	36
IIF	0	1,9	1,8	2,3	3,8	4,9	5,1	51

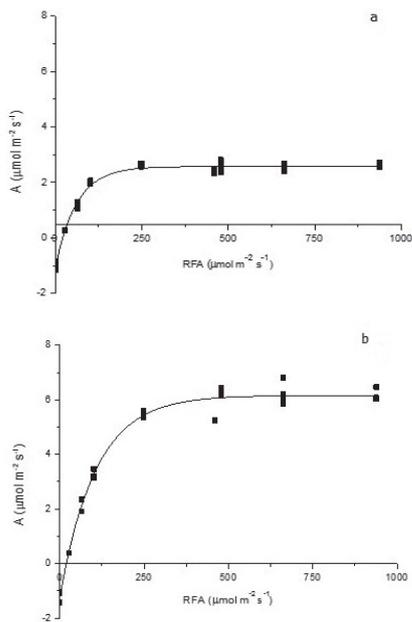


Figura 3. Taxa de assimilação líquida de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em resposta ao aumento da radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol fons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em plantas jovens de *Astronium graveolens* Jacq. A. Plantas fumigadas com O₃ (100 ppb/h, 4 h/dia, sete dias); B. plantas mantidas sob ar filtrado.

Figure 3. Net assimilation rate of CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in response to increased photosynthetic active radiation ($\mu\text{mol fons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in saplings of *Astronium graveolens* Jacq. A. Plants fumigated with O₃ (100 ppb/hr, 4 hr/day, seven days); B. plants grown in filtered air.

oxidativo em sistemas biológicos (Queiroz *et al.* 2002, Martim *et al.* 2009). O nível de peroxidação nas membranas dos tecidos foliares pode ser mensurado através do conteúdo de malondialdeído (MDA, um produto da lipoperoxidação) presente no material vegetal. Em um estudo desenvolvido por Zhang *et al.* (2012), oito espécies de clima subtropical foram fumigadas a concentração média horária de 150 ppb durante 8 h diárias no período de 47 dias. Ao final do experimento, plantas mantidas sob ar filtrado apresentaram menor teor de MDA do que aquelas

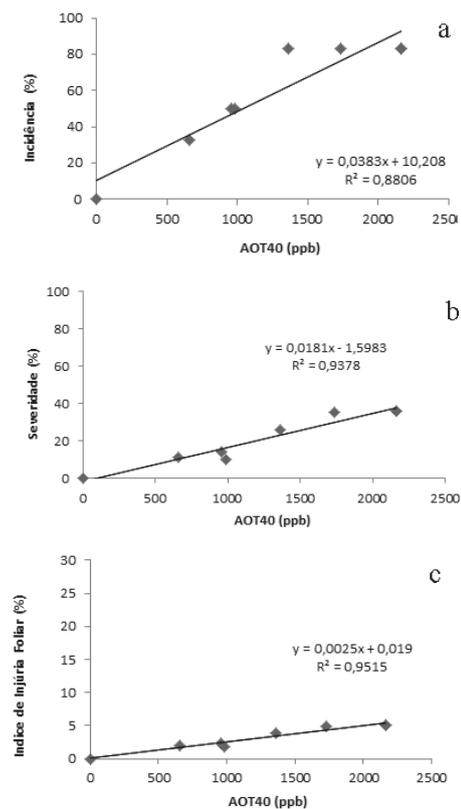


Figura 4. Análise de regressão linear entre incidência, severidade e índice de injúria foliar (%) e a concentração acumulada de ozônio acima do limite de 40 ppb (AOT40, ppb) em plantas jovens de *Astronium graveolens* Jacq. fumigadas com O₃.

Figure 4. Linear regression analysis between the incidence, severity, and leaf injury index (%) and the accumulated ozone concentration over the threshold of 40 ppb (AOT40, ppb) in saplings of *Astronium graveolens* Jacq. fumigated with O₃.

submetidas ao estresse causado pelo ozônio. O mesmo ocorreu em plantas expostas ao excesso de metais pesados (Michael *et al.* 2011) e ao estresse hídrico (Martim *et al.* 2009). Em ambos os experimentos, plantas com danos oxidativos mostraram maior teor de MDA em suas amostras. Porém, as plantas do tratamento AF + O₃ não apresentaram aumento

significativo nas concentrações de MDA, embora tenham apresentado uma tendência a aumento, o mesmo ocorrendo com relação à PRE.

Esses resultados confirmam que a espécie possui sensibilidade mediana ao O₃, pois apenas os primeiros alvos do poluente, as trocas gasosas, foram atingidos. O estresse oxidativo não foi alto o suficiente para danificar membranas e provocar o vazamento de eletrólitos. As injúrias foliares em *A. graveolens* resultam da oxidação de compostos fenólicos (Fernandes 2015) e não da morte celular, evidenciando a ativação de mecanismos endógenos de proteção.

Ressalta-se que o experimento foi de curta duração. É importante a realização de estudos mais longos para verificar se a redução das trocas gasosas terá efeitos significativos no crescimento das plantas e se ocorrerá aceleração da senescência foliar, o que pode prejudicar seu desenvolvimento e comprometer sua utilização em programas de reflorestamento.

Literatura citada

- Bulbovas, P., Moraes, R.M., Rinaldi, M.C.S., Cunha, A., Delitti, W.B.C. & Domingos, M.** 2010. Leaf antioxidant fluctuations and growth responses in saplings of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) under an urban stressing environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 664-670.
- Cardozo, P., Aidar, M.P.M., Gromboni-Guaratini, M.T., Bolsoni, V.P., Oliveira, D.P., Segala, E.A. & Souza, S.R.** 2014. Ozone-induced responses in *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae): metabolic cross-talk between volatile organic compounds and calcium oxalate crystal formation. *Plos One* 9: 1-10.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2013. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2012. Governo de Estado de São Paulo, SP. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp> (acesso em 12-II-2015).
- Cassimiro, J.C.** 2015. Avaliação de índice de proteção à vegetação baseado na dose fitotóxica de ozônio. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Cho, K., Tiwari, S., Agrawal, S.B., Torres, N.L., Agrawal, M., Sarkar, A., Shibato, J., Agrawal, G.K., Kubo, A. & Rakwal, R.** 2011. Tropospheric ozone and plants: absorption, responses, and consequences. *Review of Environmental and Contaminants Toxicology*: 61-111.
- Clebsch, C.C., Junior, A.M.D., Oliveira, P.L. & Nicolau, M.** 2009. Physiological disturbances promoted by ozone in five cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 21: 319- 329.
- Davenport, S.B., Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L.** 2003. Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. *Cell, Plant and Growth Regulation* 40: 81-88.
- EPA, Environmental Protection Agency.** 2006. Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidants (2006 Final). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-05/004aF-cF.
- Fernandes, F.F.** 2015. Marcadores microscópicos para a validação de sintomas em espécie nativa a ser empregada no biomonitoramento do ozônio. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Fuhrer, J., Skärby, L. & Ashmore, M.R.** 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution* 97: 91-106.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Salatino, A. & Sanz, M.J.** 2007. *Psidium guajava* ‘Paluma’ (the guava plant) as new bio-indicator of ozone in the tropics. *Environmental Pollution* 147: 361-365.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Salatino, A. & Sanz, M.J.** 2008. *Tibouchina pulchra* (Cogn.) Cham. a native Atlantic Forest species as a bioindicator of ozone: visible injury. *Environmental Pollution* 152: 361-365.
- Gimeno, B.S., Bermejo, V., Sanz, J., de la Torre, D., Gil, J.M. & Elvira, S.** 2004. Assessment of the effects of ozone exposure and plant competition on the reproductive ability of three therophytic clover species from Iberian pastures. *Atmospheric Environment* 38: 2295-2303.
- Grulke, N.E., Neufeld, H.S., Davison, A.W., Roberts, M. & Chapelka, A.H.** 2007. Stomatal behavior of ozone-sensitive and -insensitive coneflowers (*Rudbeckia laciniata* var. *digitata*) in Great Smoky Mountains Park. *New Phytologist* 173: 100-109.
- Guidi, L., Nali, C., Lorenzini, G., Filippi, F. & Soldatini, G.F.** 2001. Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. *Environmental Pollution* 113: 245-254.
- Halliwell, B. & Gutteridge, C.** 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Heath, R.L.** 2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change? *Environmental Pollution* 155: 453-463.
- Heath, R.L., Lefohn, A.S. & Musselman, R.C.** 2009. Temporal processes that contribute to nonlinearity in vegetation responses to ozone exposure and dose. *Atmospheric Environment* 43: 2919-2928.
- Hiram-Jr, H.F.B.** 2010. Espécies com vocação para facilitar processos de restauração espontânea de ecossistemas perturbados na vertente atlântica da Serra do Mar, Pirai – RJ. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- Lorenzi, H.** 2002. Árvores brasileiras. Ed. Plantarum, Nova Odessa.
- Martim, S.A., Santos, M.P., Peçanha, A.L., Pommer, C., Campostrini, E., Viana, A.P., Façanha, A.R. & Bressan-Smith, R.** 2009. Photosynthesis and cell respiration modulated by water deficit in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon. Brazilian Journal of Plant Physiology 21: 95-102.
- Matyssek, R., Wieser, G., Nunn, A.J., Kozovits, A., Reiter, I., Heerd, C., Winkler, J.B., Baumgarten, M., Haberle, K-H., Grams, T., Werner, H., Fabian, P. & Havranek, W.M.** 2004. Comparison between AOT40 and ozone uptake in forest trees of different species, age and size conditions. Atmospheric Environment 38: 2271-2281.
- Michael, P.I. & Krishnaswamy, M.** 2011. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. Environmental and Experimental Botany 74: 171-177.
- Moraes, R.M., Bulbovas, P., Furlan, C.M., Domingos, M., Meirelles, S.T., Delitti, W.B.C. & Sanz, M.J.** 2006. Physiological responses of saplings of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, under ozone fumigation. Ecotoxicology and Environmental Safety 63: 306-312.
- Moraes, R.M., Furlan, C.M., Meirelles, S.T., Santos, D.Y.A.C., Souza, S.R., Viola, S.R.A.S., Rezende, F.M., Domingos, R.L. & Barbosa, J.** 2011. Avaliação da sensibilidade ao ozônio da goiabeira 'Pedro Sato'. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46: 971-978.
- Moura, B.B., Souza, S.R. & Alves, E.S.** 2014. Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. Environmental Science and Pollution Research 21: 4220-4227.
- Noormets, A., Sober, A., Pell, E.J., Dickson, R.E., Podila, G.K., Sober, J., Isebrands, J.G. & Karnosky, D.F.** 2001. Stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis in two trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones exposed to elevated CO₂ and/or O₃. Plant, Cell and Environment 24: 327-336.
- Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Kräuchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P.** 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. Environmental Pollution 125: 41-52.
- Prado, C.H.B.A. & Moraes, J.A.P.V.** 1997. Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of cerrado vegetation under field conditions. Photosynthetica 33:103-112.
- Pellegrini, E., Francini, A., Lorenzini, G. & Nali, C.** 2011. PSII photochemistry and carboxylation efficiency in *Liriodendron tulipifera* under ozone exposure. Environmental and Experimental Botany 70: 217-226.
- Queiroz, C.G.S, Garcia, Q.S. & Filho J.P.L.** 2002. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. Brazilian Journal of Plant Physiology 14: 59-63.
- Ribeiro, R.V., Souza, G.M., Oliveira, R.F. & Machado, E.C.** 2005. Photosynthetic responses of tropical tree species from different successional groups under contrasting irradiance conditions. Revista Brasileira de Botânica 28: 149-161.
- Sanz, M.J. Sanchez, G., Calatayud, V., Gallego, M.T. & Cervero, J.** 2002. La contaminación atmosférica de los bosques: Guia para la identificación de los daños visibles causados por ozono. 1 ed. Ministerio del Medio Ambiente, Madrid.
- Souza, S.R. & Pagliuso, J.D.** 2009. Design and assembly of an experimental laboratory for the study of atmosphere plant interactions in the system of fumigation chambers. Environmental Monitoring and Assessment 158: 243-249.
- Zhang, W., Feng, Z., Wang, X. & Niu, J.** 2012. Responses of native broadleaved woody species to elevated ozone in subtropical China. Environmental Pollution 163: 149-157.