

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

Parâmetros hídricos em angiospermas lenhosas de clima temperado durante os estádios de repouso e crescimento

Fabiano Simões

Pelotas, 2011

FABIANO SIMÕES
Engenheiro Agrônomo, MSc

Parâmetros hídricos em angiospermas lenhosas de clima temperado
durante os estádios de repouso e crescimento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas e como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal e para a *École doctorale des Sciences de la Vie, de la Santé, Agronomie, Environnement de l'Université Blaise Pascal* como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia e Genética Molecular.

Orientador: Flavio Gilberto Herter (UFPel, Pelotas, Brasil)
Co- Orientador: Carlos Reisser Júnior (Embrapa, Pelotas, Brasil)

Orientador: Gilles Pétel (UBP, Clermont-Ferrand, França)
Co-Orientador: Hervé Cochard (INRA – PIAF, Clermont-Ferrand, França)

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S593p Simões, Fabiano

Parâmetros hídricos em angiospermas lenhosas de clima temperado durante os estádios de repouso e crescimento / Fabiano Simões; orientador Flavio Gilberto Herter e Gilles Pétel; co-orientadores Carlos Reisser Júnior e Hervé Cochard. - Pelotas, 2011. - 73f. : il.- Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1. *Juglas regia* 2. *Prunus persica* 3. *Betula pendula*
4. *Quercus robur* 5. Água 6. *Malus domestica* 7. *Pyrus* spp.
8. Embolismo 9. Dormência 10. Carboidratos I. Herter, Flavio Gilberto (orientador) II. Pétel, Gilles (orientador) III. Título.

CDD 582.13

Banca examinadora

Flavio Gilberto HERTER (Presidente)

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil

Valmor João BIANCHI

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil

Ruy Inacio Neiva de CARVALHO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais/PR, Brasil

Gilles PETEL

Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, França

Hervé COCHARD

Institut National de la Recherche Agronomique, PIAF. Clermont-Ferrand, França

Jean-Luc REGNARD

Montpellier SupAgro, Montpellier, França

Université Blaise Pascal
N° D.U.

Université d'Auvergne
Année 2011

École Doctorale
Des Sciences de la Vie et de la Santé et Environnement
N° d'ordre

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université
(Spécialité: Physiologie et Génétique Moléculaires)

soutenance le 29 Avril 2011

Fabiano SIMÕES

Paramètres de l'eau chez les angiospermes ligneuses tempérées pendant les états de repos et de la croissance

Président du Jury:

M. Ruy Inacio Neiva de **CARVALHO**, Professeur, PUCPR, São José dos
Pinhais, PR, Brésil

Rapporteurs:

M. Valmor João **BIANCHI**, Professeur, UFPel, Pelotas, RS, Brésil
M. Jean-Luc **REGNARD**, Chercheur, Montpellier SuperAgro, Montpellier

Examineurs:

M. Flavio Gilberto **HERTER**, Professeur, UFPel, Pelotas, RS, Brésil. (Directeur de
thèse)

M. Gilles **PETEL**, Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand,
France. (Directeur de thèse)

M. Hervé **COCHARD**, Directeur de Recherche INRA, UMR 547 PIAF INRA-
UBP, Clermont-Ferrand, France



Aos meus pais Lilian e Osnei,

DEDICO

à mes parents, Lilian et Osnei

Dédie

♪ Start a new chapter
Find what I'm after
It's changing every day
The change of the seasons
Is enough of a reason
To want to get away
Quiet and pensive
My thoughts apprehensive
The hours drift away
Leaving my homeland
Playing a lone hand
My life begins today ♪

Fly by Night - Rush

KEEP ON CHOUGLIN'

Agradecimentos

Aos meus pais que me apoiaram a 1.100 km distantes daqui, durante estes seis anos (mestrado e doutorado) em Pelotas/RS. Tudo foi possível com a compreensão e persistência deles.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para o doutorado sanduiche.

À Embrapa Clima Temperado pelo uso de sua infra-estrutura na condução dos trabalhos e apoio financeiro via o Projeto Pêra.

À Epagri, em específico a unidade de São Joaquim, pela disponibilidade dos pomares de pereira para condução de experimentos.

Ao INRA – PIAF – UMR 547, Clermont-Ferrand, França, pelo acolhimento e dedicação a minha formação durante o período de 2009, onde vivi um dos melhores anos de minha vida, lá fiz amigos que jamais partirão e que nem mesmo a distância irá romper estes laços.

À Universidade Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II, pela concessão e oportunidade de realizar o doutorado co-tutela.

Ao meu orientador e amigo Flavinho (Dr. Flavio Gilberto Herter), que em certos momentos, somente nós acreditávamos em nosso projeto. Obrigado por sua disposição, incentivo, compreensão, principalmente nos dois primeiros anos do meu doutorado. Sem sua presença e persistência esta etapa não teríamos vencido.

Ao Dr. Hervé Cochard, que depositou toda sua confiança em meu trabalho durante o ano de 2009. Sua orientação proporcionou uma mudança em minha vida profissional. Palavras não expressarão os meus agradecimentos. Merci Beaucoup!

À equipe do Laboratório de Agrometeorologia da Embrapa, Denise, Jaison, Seu Afonso, Matheus, Gabriel e aos pós-graduandos Fernando Hawerroth,

Anderson Marafon (hoje, ambos pesquisadores da Embrapa), Valtair Veríssimo e Viviane Terra.

Aos pesquisadores da Embrapa José Francisco M. Pereira, Luis Eduardo Corrêa Antunes, Silvio Steinmetz, Carlos Reisser Junior, Ângela Diniz, Ivan Almeida, Newton Alex Mayer, que participaram de forma indireta ou direta na construção deste trabalho.

Aos amigos do INRA-PIAF, com quem tive a felicidade de conviver, Ana, Guillaume, Mathieu, Alex, Christian, Stéphane, Norbert, Mathieu, Eric, Thierry, Gilles, Christophe, Anaïs, *la troupe* Thaï: Jate (Pump), Thitithanakul (Fai), Isarangkool (Supat) e Junya, Nicolas, Boris, Marc, André, Boutheina, Hervé, Têté, Boris Fumanal, Pierre, Rémi, Mustapha, David, Hosaw, Jean-Louis, Sylvie, Dominique, Patrice, Jun, Marine, Fanetre e muitos outros que talvez eu possa ter esquecido.

Aos meus grandes amigos conquistados ao longo dos anos, Robson, Rafael, Tobias, Michél, Fernanda, Vanessa, Selbach, Rodrigo, Marcio, Rodrigo, Renato, Leo, Andrea, Ivan, Viviane, Tiago, Yamamoto, Ana Paula, Matheus, Lu... sempre esquecemos de alguém, mil perdões.

Ao pessoal do “Boxe Marcio Neves” e do “Grupo Pedal Curticiera”. Simplesmente Fantástico.

A uma “*Picorrucha*” que apareceu direto de Pinheiro Machado/RS para completas mudanças no meu cotidiano. Obrigado ;-)

Ao Professor da PUCPR, Dr. Ruy Inacio Neiva de Carvalho, reafirmando os agradecimentos já feitos em minha dissertação, obrigado por despertar e incentivar meu interesse pela pesquisa durante minha graduação e nossa amizade.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Valmor João Bianchi, Prof. Dr. Ruy Inacio Neiva de Carvalho, Prof. Dr. Gilles Pétel, Prof. Dr. Jean-Luc Regnard, Dr. Hervé Cochard, por vossas presenças e contribuição para qualificação dos trabalhos aqui apresentados.

A todos, aqui citados ou não, que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para conclusão deste trabalho.

Remerciements

Une partie de ces travaux de recherche a été réalisé au Centre INRA de Clermont-Ferrand, au PIAF – Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Frutier et Forestier. Je vous remercie de cette occasion.

Je tiens d'abord à remercier Mr. JL Julien, directeur du PIAF et Mr H Cochard, directeur de recherche de m'y avoir accueilli et de m'avoir permis d'y poursuivre ma thèse.

Je remercie profondément:

Mes Parents, qui ont été en tout temps avec moi, même lointain.

La CAPES et L'UFPel, l'occasion de faire mon doctorat et le financement.

Je remercie le Professeur Dr. Flavio Herter pour me guider et me soutenir au cours de ma thèse.

Dr Hervé Cochard pour tous les enseignements et l'ouverture d'entrée au monde de la cavitation.

Dr Gilles Pétel la direction de ma thèse de doctorat sur le côté français.

Mes amies à Clermont-Ferrand: Ana, Guillaume, Mathieu, Alex, Christian, Stéphane, Norbert, Mathieu, Eric, Thierry, Gilles, Christophe, Anaïs, *la troupe* Thaï: Jate (Pump), Thitithanakul (Fai), Isarangkool (Supat) e Junya, Nicolas, Boris, Marc, André, Bouthaina, Hervé, Tété, Boris Fumanal, Pierre, Philippe, Rémi, Remy, Genoviève, Mustapha, David, Nicolas, Hosaw, Jean-Louis, Sylvie, Dominique, Patrice, Jun, Marine, Fanetre et beaucoup d'autres que je pourrais avoir oublié.

Les équipes au Brésil de la boxe «Marcio Neves» et groupe de la pédale «Pedal Curticeira». Tout simplement fantastique.

Le Professeur de la PUCPR, Dr. Ruy Inacio, réaffirmant mon merci beaucoup que je fis dans la gradution et remercie pour l'éveil de mon intérêt et à encourager la recherche et notre amitié.

Pour les membres du jury, le Prof. Dr. Valmor João Bianchi, le Prof. Dr. Ruy Inacio Neiva de Carvalho, le Prof. Dr. Gilles Pétel, Prof. Dr. Jean-Luc Regnard, le Dr Hervé Cochard, pour votre présence et les contributions qualifiées dans la thèse.

Merci beaucoup

Resumo

SIMÕES, Fabiano. **Parâmetros hídricos em angiospermas lenhosas de clima temperado durante os estádios de repouso e crescimento**. 2011. 80f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil e *École doctorale des Sciences de la Vie, de la Santé, Agronomie, Environnement de l'Université Blaise Pascal*, Clermont-Ferrand, França.

O conhecimento dos processos fisiológicos, tanto na fase de repouso quanto no desenvolvimento vegetativo, é importante na adaptação das angiospermas lenhosas de clima temperado, especialmente na questão da gestão da água pela planta. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o conteúdo da água e o metabolismo de carboidratos durante o progresso da dormência em pereiras, avaliar estratégias do uso da água em duas espécies lenhosas (macieira e noqueira), que foram submetidas a três níveis de déficit hídrico, e por fim, avaliar a confiabilidade da técnica de injeção de ar para indução à cavitação em três espécies de angiospermas lenhosas. No primeiro experimento, conduzido durante o outono e inverno de 2008 no Brasil, utilizou-se plantas de pereira cultivares Housui e Packham's Triumph. O segundo experimento foi desenvolvido na França durante o verão de 2009, com macieiras e noqueiras sob estresse hídrico. O terceiro experimento foi conduzido na França em 2009 com três espécies de angiospermas lenhosas com diferentes comprimentos dos vasos do xilema, *Betula pendula*, *Prunus persica* e *Quercus robur*. A partir dos resultados concluiu-se que o conteúdo de água nos tecidos pode ser um marcador do progresso da dormência para cv. Packham's Triumph. Porém os dados não foram conclusivos para cv. Housui. O fechamento estomático pode ser um importante parâmetro na prevenção à cavitação xilemática em noqueiras e macieiras submetidas a déficit hídrico no solo. Em regime de secas severas, a macieira mantém os estômatos parcialmente abertos, indicando maior tolerância desta espécie à seca quando comparado à noqueira. E por fim, a técnica de injeção de ar utilizando câmara de ar com duas saídas é fiável para espécies com xilema de porosidade difusa, utilizando câmaras curtas e amostras de ramo que tenha comprimento superior aos vasos do xilema.

Palavras-chave: *Pyrus* spp. *Malus domestica*. *Juglans regia*. *Prunus persica*. *Betula pendula*. *Quercus robur*. Água. Cavitação. Xilema. Carboidratos. Dormência. Desenvolvimento.

Abstract

SIMÕES, Fabiano. **Water parameters in temperate zone woody angiosperms during the rest and growth stages.** 2011. 80f. Thesis (Doctor of Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brazil and École doctorale des Sciences de la Vie, de la Santé, Agronomie, Environnement de l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.

ABSTRACT - The knowledge of physiological processes during both dormancy and vegetative growth is important for adaptation processes in temperate zone woody angiosperms, especially in water management by those plants. The objectives of this work were to evaluate the water content and carbohydrate metabolism during the progress of dormancy in pears, to evaluate strategies of water use in two woody species (apple and walnut), which were subjected to three different levels of water deficit, and also to evaluate reliability of air injection technique to induce cavitation in three woody angiosperms. The first experiment was conducted during autumn and winter of 2008 in Brazil, and it was used plants of pears cultivars Packham's Triumph and Housui. The second study was carried out during the summer season of 2009 in France, with apple and walnut trees under water stress. The third experiment was done in France in 2009, and three species of woody angiosperms with different lengths of xylem were used *Betula pendula*, *Prunus persica* and *Quercus robur*. From the results it was concluded that the water content in tissues might be a marker of dormancy progression for cv. Packham's Triumph. However, the data were not conclusive and clear in cv. Housui. Stomatal closure might be an important parameter for preventing xilemian cavitation in walnut and apple trees subjected to soil water deficit. Apple trees stomata grown under severe drought regime remained partially open, indicating a greater tolerance of this species to drought in comparison to walnut. Finally, the double-ended pressure sleeve technique is reliable for species with diffuse-porous xylem by using short chambers and also branches longer than the xylem vessels.

Keywords: *Pyrus* spp. *Malus domestica*. *Juglans regia*. *Prunus persica*. *Betula pendula*. *Quercus robur*. Water. Cavitation. Xylem. Carbohydrate. Dormancy. Development.

SUMARIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO 1 - Conteúdo da água e a dinâmica dos carboidratos durante a dormência em pereiras nas condições climáticas do sul do Brasil.....	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3 RESULTADOS.....	27
4 DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÃO	35
CAPÍTULO 2 - Relação entre o fechamento estomático e a indução a cavitação sob estresse hídrico em frutíferas lenhosas.....	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

4 CONCLUSÃO	57
CAPÍTULO 3 - How Reliable is the Double-Ended Pressure Sleeve Technique for Assessing Xylem Vulnerability to Cavitation in Woody Angiosperms?	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

INTRODUÇÃO GERAL

Dados recentes apresentados na reunião internacional da água no Canadá em 2010 alertam que a demanda de água doce no mundo irá exceder em 40% o seu suprimento nos próximos 20 anos em função das mudanças climáticas e o crescimento populacional. Atualmente, metade da água doce disponível no planeta é utilizada. Em duas décadas, um terço da humanidade só terá metade da quantidade de água necessária às necessidades básicas. A produção mundial de alimentos no futuro está ameaçada pela crescente competição pela água, pelas práticas de irrigação e pelas mudanças climáticas.

O uso da água pelo setor agrícola mundial representa 96% do consumo, sendo preciso, de fato, uma ótima gestão deste recurso vital. A água na agricultura é o componente chave no seu avanço, pois permite grande aumento na produtividade, em especial das angiospermas, sendo assim sua importância econômica é fundamental, uma vez que inclui a maioria das espécies utilizadas pelo homem.

As angiospermas constituem uma das duas grandes divisões das plantas superiores. Elas compreendem grande diversidade de árvores, arbustos e espécies herbáceas, rasteiras e aquáticas e se distribuem por todo o mundo. Angiospermas são plantas extremamente importantes, principais produtoras dos ecossistemas

terrestres, servindo para alimentação (frutas, grãos e vegetais), aplicações industriais (madeira), ornamentação (urbanização), fabricação de produtos farmacêuticos, e na última década tem-se discutido seu papel, como fundamental, na reciclagem do O_2 e CO_2 atmosféricos e regulação climática.

No entanto, alguns problemas ambientais são enfrentados por este grupo de plantas. Dentre os diversos fatores do ambiente, cuja disponibilidade, seja ela por excesso ou por escassez, pode caracterizar uma condição de estresse para o vegetal, destaca-se a água. A distribuição heterogênea seja espacial ou temporal deste recurso, influencia as respostas dos vegetais em diferentes níveis. A compreensão de estratégias para absorção, transporte e eficiência do uso da água em condições de déficit hídrico é fundamental, quando se busca conhecer o potencial de sobrevivência e produção dos vegetais em condições limitantes.

Algumas espécies encontradas em ambientes com diferentes disponibilidades hídricas possuem diferentes características nas rotas de fluxos de seiva, buscando a maximização do transporte de água. Plantas que se desenvolvem em ambientes com alta disponibilidade hídrica têm o xilema dominado por elementos de vaso de grandes dimensões, o que proporciona aumento na eficiência de transporte de água. Por outro lado, tais plantas apresentam maior vulnerabilidade a eventos de cavitação. Deste modo, sob condições de restrição hídrica, plantas que possuem elementos de vaso com diâmetro e comprimento reduzidos, parede celular espessa, pontuações de membrana com pequenas dimensões e mecanismos mais eficazes dos estômatos, apresentam vantagens adaptativas, tornando-as menos vulneráveis à cavitação, principalmente em cenários de mudanças climáticas.

Basicamente estudos de resistência à cavitação utilizam curvas de vulnerabilidade obtidas principalmente de três diferentes técnicas. O **método de**

desidratação, que usa a transpiração foliar como um meio para a criação de potenciais negativos de pressão no xilema é considerado o pioneiro das técnicas e é classificado como confiável.

Outro método é a **técnica de injeção de ar**, na qual o ar comprimido (N) a partir de um reservatório, que atua no ramo por meio de uma luva de metal com duas extremidades fechadas com uma coleira de borracha em torno do mesmo. A técnica em geral tem concordância com os métodos de desidratação e centrifugação. Esta última, chamada de **técnica de centrifugação** por estática ou fluxo, consiste em gerar a cavitação por meio de forças centrífugas com tensões no interior do ramo conhecidas. No entanto, fica a pergunta: Quão confiáveis são os dados destas técnicas e qual a melhor maneira de construir curvas de vulnerabilidade à cavitação em angiospermas lenhosas?

Plantas lenhosas de clima temperado, em específico as frutíferas, enfrentam outros problemas ambientais durante sua parada de crescimento a partir do final do outono. O sucesso do cultivo de frutas de clima temperado adaptadas nas regiões de inverno ameno exige grande atenção nos tratos culturais para ótima formação da planta e o favorecimento à floração e frutificação. Dentre os principais tratos culturais, está a superação da dormência, especialmente as pomáceas, como pereiras e macieiras, cuja adaptação está mais sujeita às variações das condições de cultivo e climáticas.

A disponibilidade e o controle da distribuição de água e carboidratos nos tecidos das plantas frutíferas de clima temperado são os principais determinantes da sua produtividade. A brotação das gemas requer a importação de açúcares solúveis, provenientes da mobilização do amido dos tecidos, para sustentar a retomada do crescimento das gemas após a superação da endodormência. A dinâmica da água

nos tecidos está relacionada à dinâmica dos açúcares solúveis, embora ocorra também a sua movimentação passiva a pequenas distâncias, por meio de difusão simples ou facilitada por proteínas de transporte da membrana. O conhecimento da dinâmica da água nos tecidos das plantas frutíferas de clima temperado é muito importante para a compreensão dos processos de mobilização de reservas e de ativação do metabolismo enzimático durante a endodormência e na fase de indução à brotação.

Dada a reduzida disponibilidade de informações referentes às características hidráulicas, entendendo que há variações da arquitetura hidráulica da planta dependendo de sua necessidade fisiológica e que a água no interior da planta é um fator determinante para superação da dormência, as hipóteses deste trabalho com angiospermas lenhosas foram que o conteúdo de água nos tecidos é um marcador das fases da dormência durante seu progresso. Plantas lenhosas apresentam comportamentos contrastantes na estratégia do uso da água sob o ponto vista hidráulico em resposta à seca induzida no solo. E por fim, diferentes comprimentos dos vasos do xilema alteram resultados obtidos através da técnica de injeção de ar para determinação de curvas de vulnerabilidade à cavitação.

A tese foi estruturada em capítulos. Em primeiro lugar foi abordada a dinâmica da água perante o conteúdo de carboidratos durante o progresso da dormência em pereiras. Sob déficit hídrico induzido durante o verão do hemisfério norte, foi avaliada a estratégia de uso da água em duas frutíferas lenhosas sob o ponto de vista hidráulico das plantas, verificando-se se as mesmas adotam comportamentos contrastantes em resposta à seca no solo. E por fim, verificou-se a confiabilidade do uso da técnica de injeção de ar para determinação da vulnerabilidade à cavitação de

três espécies de angiospermas lenhosas contrastantes quanto ao comprimento dos vasos do xilema.

CAPÍTULO 1

CONTEÚDO DA ÁGUA E A DINÂMICA DOS CARBOIDRATOS DURANTE A DORMÊNCIA EM PEREIRAS NAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DO SUL DO BRASIL

RESUMO – A ecofisiologia hiberna de frutíferas de clima temperado é caracterizada pela movimentação da água, pelo metabolismo de carboidratos bem como por um estado inercial, variável, das gemas durante as fases de para-, endo- e ecodormência. O objetivo foi caracterizar a dinâmica do conteúdo de água relacionado com a mobilização dos carboidratos nas gemas e tecidos adjacentes, durante o progresso da dormência, em pereiras européia e japonesa cultivadas sob condições climáticas distintas. Ramos foram coletados de plantas cultivadas em Vacaria/RS, que acumulou 625 horas de frio (HF) $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$, e em São Joaquim, que teve 780 HF durante o ano de 2008. Os tecidos (lenho e base da gema + gema) foram separados e secos para determinação do conteúdo de água (CA), açúcares solúveis totais e amido em seis datas de coleta (23/mar; 14/abr; 05/mai; 26/mai; 16/jun e 03/jul). Durante este período foi determinado o tempo médio de brotação (TMB) das gemas apicais. A hipótese do CA nos tecidos como um marcador do progresso da dormência demonstrou ser válida para cv. Packham's Triumph, pois os resultados indicaram claramente a retomada do crescimento, através do TMB, que coincidiu com o aumento expressivo do CA em gemas para plantas cultivadas em São Joaquim/SC. No entanto, estes dados não foram expressivos e claros na cv. Housui. Altas temperaturas durante a dormência alteraram a dinâmica de água na cv. Packham's Triumph, entretanto parece não ter efeito sobre a cv. Housui quando cultivadas em locais com HF contrastantes.

Palavras-chave: *Pyrus* spp., inverno ameno, biologia hiberna, temperatura

WATER CONTENT AND CARBOHYDRATES DYNAMICS DURING DORMANCY STAGE IN PEAR TREES GROWN UNDER CLIMATIC CONDITIONS OF SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT - The winter ecophysiology in temperate zone fruit trees is characterized by the water movement, carbohydrate metabolism as well as an inertial state variable in buds, during para-, endo-, and ecodormancy stages. The objective of this study was to characterize the water dynamics and their relations with carbohydrate mobilization in buds and surrounding tissues during dormancy progression, in European and Japanese pear trees grown under different climatic conditions. Shoots were collected from plants grown in Vacaria/RS, where accumulated 625 chilling hours below 7.2 °C (CH), and in São Joaquim/SC, where accumulated 780 CH during 2008 year winter season. Tissues (stem and bud base + bud) were separated and dried to determine water content (WC), total soluble sugars and starch content, in six different dates (23/May; 14/Jun; 05/Jul; 26 /Jul; 16/Aug, and 03/Sep). During this, it was determined the mean time for bud break (MTB) of apical buds. The hypothesis of the WC in tissues as a marker of dormancy progression seems to be valid for cv. Packham's Triumph, which indicated clearly the resumption of growth. This point coincided with an expressive increase in the WC in buds of plants grown in São Joaquim/SC. However, those differences were not observed in cv. Housui. High temperatures during dormancy stage might alter the water dynamics in the cv. Packham's Triumph, but not showed similar pattern in the cv. Housui, when cultivated under contrasted conditions of CH accumulation.

Keywords: *Pyrus* spp., warm winter, winter biology, temperature.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo comercial da pereira no Brasil é pouco expressivo, abastecendo somente 10% do consumo interno (FAO, 2010), o que indica um grande potencial para expansão desta cultura. Dentre alguns fatores limitantes para maior exploração da cultura no país estão os baixos índices de floração e elevados índices de abortamento floral, os quais estão relacionados diretamente com a fase da dormência (NAKASU et al., 1995).

Para que a superação da dormência ocorra de maneira satisfatória, faz-se necessário acúmulo de determinada quantidade de horas de frio. A dormência das plantas lenhosas é um processo complexo que envolve mudanças metabólicas nos tecidos meristemáticos das gemas e regiões adjacentes (LANG et al., 1987), onde

interagem fatores como a regulação hormonal, eventos bioquímicos e a disponibilidade de água, nutrientes e carboidratos (CRABBÉ e BARNOLA, 1996).

O acúmulo de frio inadequado nestas plantas influencia os eventos bioquímicos, tal como a dinâmica dos carboidratos, principalmente durante a fase da endodormência (BONHOMME et al., 2000; CARVALHO e ZANETTE, 2004), causando respostas variadas de acordo com a espécie e local de cultivo (PETRI et al., 2002).

Para que estes eventos bioquímicos aconteçam, a dinâmica da água tem um papel importante nas plantas lenhosas de clima temperado (LANG et al., 1987), pois influencia a mobilização de carboidratos durante as fases da dormência (BUCKHOUT e TUBBE, 1996; MARAFON, 2008). Esta relação tem-se demonstrado importante na retomada do crescimento das gemas e estudos voltados a determinação do conteúdo de água nos tecidos durante a dormência em diversas espécies foram realizadas ao longo das últimas três décadas, em macieiras (YOUNG et al., 1987; CARVALHO, 2001), pessegueiros (COTTIGNIES, 1983; YOUNG et al., 1987; MARQUAT et al., 1999; LEITE, 2004; LEITE et al., 2006; BONHOMME et al., 2005), pereiras (RAKNGAN et al., 1996; MARAFON, 2008; YAMAMOTO, 2010), carvalho (MORIN et al., 2007), dentre outras espécies de interesse econômico.

O deslocamento da água dos tecidos adjacentes para a gema durante o período hibernar pode trazer consequências fisiológicas importantes, pois, juntamente com a água, reservas solúveis destes tecidos podem ser exportadas para tecidos da gema (AMÉGLIO et al., 2001; CARVALHO, 2001; MARAFON, 2008)

Existem poucos estudos em pereiras sobre a dinâmica da água e suas relações durante o progresso de dormência em condições naturais de inverno

ameno. Em face disto, o objetivo foi caracterizar o conteúdo de água relacionado com a mobilização dos carboidratos nas gemas e tecidos adjacentes, durante o progresso da dormência, em pereiras européia e japonesa cultivadas sob condições climáticas distintas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi conduzido em pomares experimentais localizados em São Joaquim/SC (28°17'S, 49°55'O, 1353 m de altitude) e Vacaria/RS (28°30'S, 50°56'O, 971 m de altitude), Brasil. Cinco plantas de pereiras de cada cultivar e local foram utilizadas, sendo, cv. Packham's Triumph (*Pyrus communis*) com exigência de frio de 1200 horas $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$ (NAKASU et al., 2007) e cv. Housui (*Pyrus pyrifolia* [Burn] Nak.) que apresenta, em média exigência em frio de aproximadamente 720 HF (FAORO, 2001).

O pomar em São Joaquim/SC foi implantado em 2000 e o de Vacaria/RS em 1993, para ambas cultivares. As pereiras foram conduzidas em forma de líder central, as quais não sofreram qualquer intervenção química ou física durante o período do experimento, de maio a setembro de 2008.

Foram retirados de cada planta aleatoriamente oito ramos de cada planta de um ano com 40 cm $\pm$ 5 cm de comprimento em seis datas distintas (23/05; 14/06; 05/07; 26/07; 16/08 e 03/09 de 2008), provenientes da parte externa da copa e da altura mediana da planta. Os ramos coletados foram acondicionados em uma caixa térmica com gelo até o processamento das amostras. Foram utilizados cinco ramos para determinação do tempo médio de brotação (TMB) e três ramos para

determinação do conteúdo de carboidratos (CC) e de água (CA). Para determinação do CC e CA as amostras foram divididas em duas partes, lenho e gema+base da gema (Fig. 1).

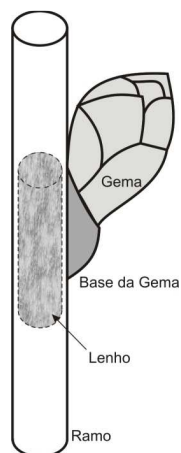


Figura 1: Tecido do lenho e base da gema + gema, utilizados para determinação do conteúdo de água e de carboidratos.

Condições climáticas

Os dois locais onde foram conduzidos o experimento possuem clima com classificação do tipo Cfa de Köppen, caracterizado como subtropical úmido. As temperaturas máximas e mínimas diárias, bem como as horas de frio de $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$ (HF) acumuladas estão representadas na Fig. 2.

Tempo médio de brotação

Para a determinação do TMB foi utilizado o teste biológico de estacas de nós isolados, conforme metodologia descrita por Rageau (1978). Cinco estacas de 7 cm do ápice dos ramos contendo somente a gema apical foram colocadas em bandejas de alumínio com esponja fenólica e água, e mantidas em câmaras de crescimento a temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas).

Os testes foram realizados com cinco repetições de cada planta, totalizando 25 estacas por cultivar de cada região e 50 estacas por época de coleta. As avaliações foram realizadas a cada dois dias até o aparecimento de pontas verdes

nas gemas. Com base neste parâmetro foi determinado o TMB, que consiste no número médio de dias passados entre a instalação do experimento em cada data de coleta e a detecção do estágio de ponta verde, podendo ser calculado pela fórmula:

$$TMB = \sum \frac{n_i \times t_i}{n} \quad (1)$$

sendo, **TMB** = Tempo médio de brotação, **n_i** = número de gemas brotadas no tempo, **t_i** = tempo decorrido após a data da colocação na câmara até a data da brotação (ponta verde), em dias, e **n** = número total de gemas brotadas para cada data de coleta.

Determinação do conteúdo de carboidratos

Foram utilizados 300 mg das amostras secas e moídas em moinho tipo Willey (TE-650, Tecnal) dos tecidos lenho e base+gema. A extração dos açúcares foi realizada de acordo com Irigoyen et al. (1992) a partir das amostras alocadas em tubos com 5 mL de etanol 80%, que foram colocados em banho-maria por 10 min e centrifugados a 6000 rpm por 10 min. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL, onde foi completado o volume com água destilada. Esta amostra líquida foi utilizada para a determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais (AST).

O precipitado foi separado e seco em estufa a 65°C por 48 h para ser utilizado na determinação do conteúdo de amido, baseado na metodologia desenvolvida por McCready et al. (1950) e readaptado por Osaki et al. (1991). O precipitado ($\pm$ 300 mg) foi ressuspenso em 5 ml de ácido perclórico (HClO₄) 30%, agitado por 15 s e adicionados 5 mL de água destilada. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 80°C por 10 min e centrifugadas a 6000 rpm por 10 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Os sobrenadantes foram

transferidos para balões volumétricos de 50 mL, onde foi completado o volume com água destilada.

As determinações do conteúdo de carboidratos foram realizadas pelo método de solução antrona 0,1%, H₂SO₄ (DISCHE, 1962). Foram utilizadas alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada amostra, além de uma replicata da mesma. As leituras de absorbância foram efetuadas através de espectrofotômetro tipo UV/VIS (modelo UV-160, Shimadzu Co, Kyoto, Japan) a 620 nm, e os resultados foram expressos em mg g⁻¹ DW.

Conteúdo de água nos tecidos

A determinação do CA nos tecidos base+gema e lenho foi realizada após secagem das amostras sob ventilação forçada, em estufa a 70°C por 72 h, de acordo com a fórmula:

$$CA = \frac{MF - MS}{MS} \quad (2)$$

sendo, **CA** = Conteúdo de água, **MF** = Matéria Fresca e **MS** = Matéria Seca.

Delineamento experimental

Para cada local, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, segundo arranjo fatorial (2x6x2), obtido da combinação dos fatores tecido (2 níveis - lenho e base+gema), data de coleta (6 níveis) e cultivares (2 níveis – Housui e Packham's Triumph). As médias foram submetidas à análise de variância (p<0,05), e as variáveis significativas foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3 RESULTADOS

Condições climáticas

Entre maio e setembro de 2008, São Joaquim/SC acumulou 780 HF, enquanto que em Vacaria/RS o valor observado foi de 625 HF para o mesmo período (Fig. 2). Diferenças foram observadas no mês de julho, onde Vacaria/RS apresentou 15 dias com temperaturas máximas acima de 20°C, enquanto São Joaquim não passou de 4 dias. Apesar de não ter sido observado diferenças no acúmulo de frio durante o mês de julho (apenas 1 HF), até 31/jul o total acumulado em São Joaquim/SC tinha sido de 439 HF, enquanto que em Vacaria/RS foi de 398 HF.

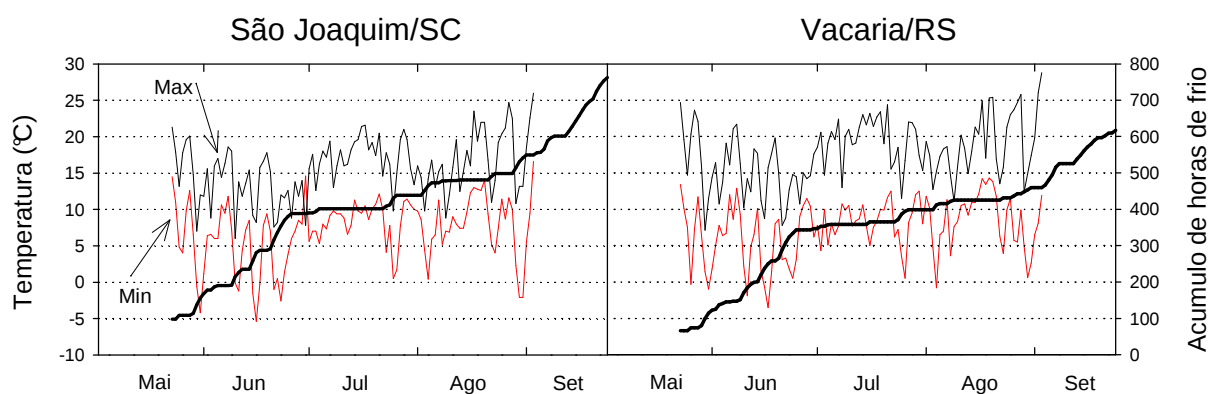


Figura 2: Temperaturas diárias máximas (—) e mínimas (—) acúmulo diário de horas de frio $> 7,2^{\circ}\text{C}$ (—) em duas regiões, São Joaquim/SC e Vacaria/RS durante o período de maio a setembro de 2008.

Tempo médio de brotação

Observou-se que a TMB das gemas terminais diminuiu com o aumento do acúmulo de HF (Fig. 3A e 3B). Nas duas situações de cultivo o final da endodormência ocorreu aproximadamente dia 23/mai tanto para cv. Packham's Triumph quanto para cv. Housui. A determinação do final da endodormência é

caracterizada pelo ponto de inflexão na curva do TMB. Este ponto de inflexão foi observado nos dados apresentados e será tomado como base neste estudo.

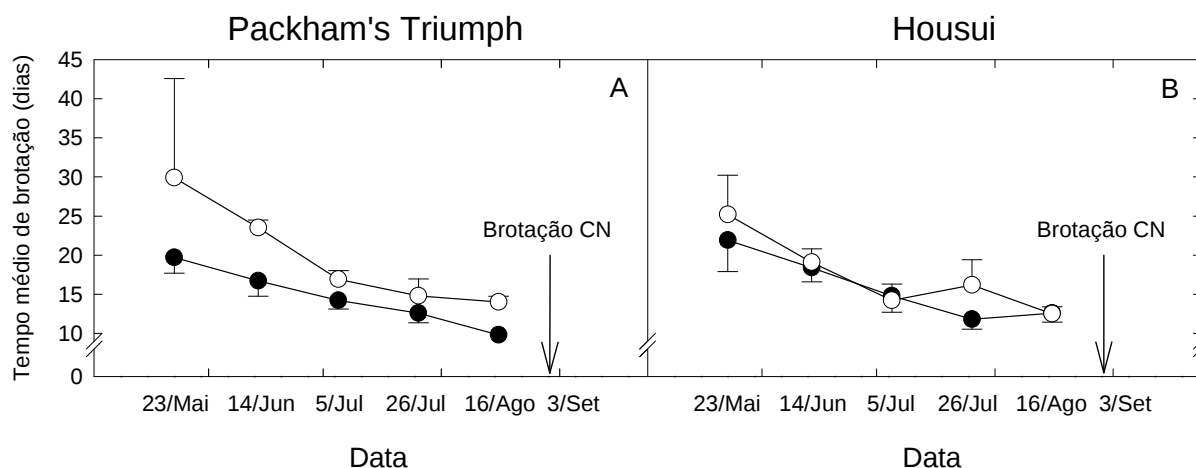


Figura 3: Tempo médio de brotação (TMB), durante o período de maio a setembro de 2008 em São Joaquim/SC (●) e Vacaria/RS (○), nas cvs. Packham's Triumph (A) e Housui (B). CN: Condições Naturais. Médias $\pm$ EP (n=5).

A cv. Packham's Triumph apresentou diferenças no TMB em relação aos locais de cultivo (Fig. 3A). Em geral, para esta cultivar, as plantas apresentaram maior profundidade de dormência em Vacaria/RS. Observou-se que o TMB no final da endodormência para as plantas cultivadas em São Joaquim/SC foi de 20 dias, enquanto que em Vacaria/RS foi de 30 dias. Para cv. Housui (Fig. 3B), o TMB demonstrou que o final da endodormência ocorreu em 23/mai para ambas regiões. No entanto, observou-se em 26/jul um aumento na TMB em Vacaria/RS, diferindo em 4,4 dias em relação a São Joaquim/SC.

Açúcares solúveis totais

Em geral a dinâmica foi semelhante entre as cultivares, locais e tecidos estudados (Fig. 4). Observou-se que houve queda nos AST da gema até 14/jun, e o ápice ocorreu em 05/jul e uma estabilização após 26/jul. Na cv. Packham's Triumph

houve aumento de 52% de AST nas gemas entre 14/jun e 05/jul, seguido de queda expressiva de 76% em 26/Jul em relação à coleta anterior (Fig. 4A). Esta variação expressiva ocorreu somente para esta cultivar em São Joaquim/SC. A dinâmica dos AST no lenho da cv. Packham's Triumph foi semelhante entre locais de cultivo, onde observou-se queda de aproximadamente 65% entre 5/Jul e 26/Jul (Fig. 4C).

Na cv. Housui os AST tiveram dinâmicas semelhantes tanto nas gemas (Fig. 4B) quanto no lenho (Fig. 4D). Nas gemas observa-se que o pico no conteúdo de AST foi de 105 mg.g⁻¹ MS em 5/jul e para o lenho o AST atingiu aproximadamente 70 mg.g⁻¹ MS para ambos locais de cultivo. Após esta data, ambos tecidos sofreram queda nos AST até a brotação.

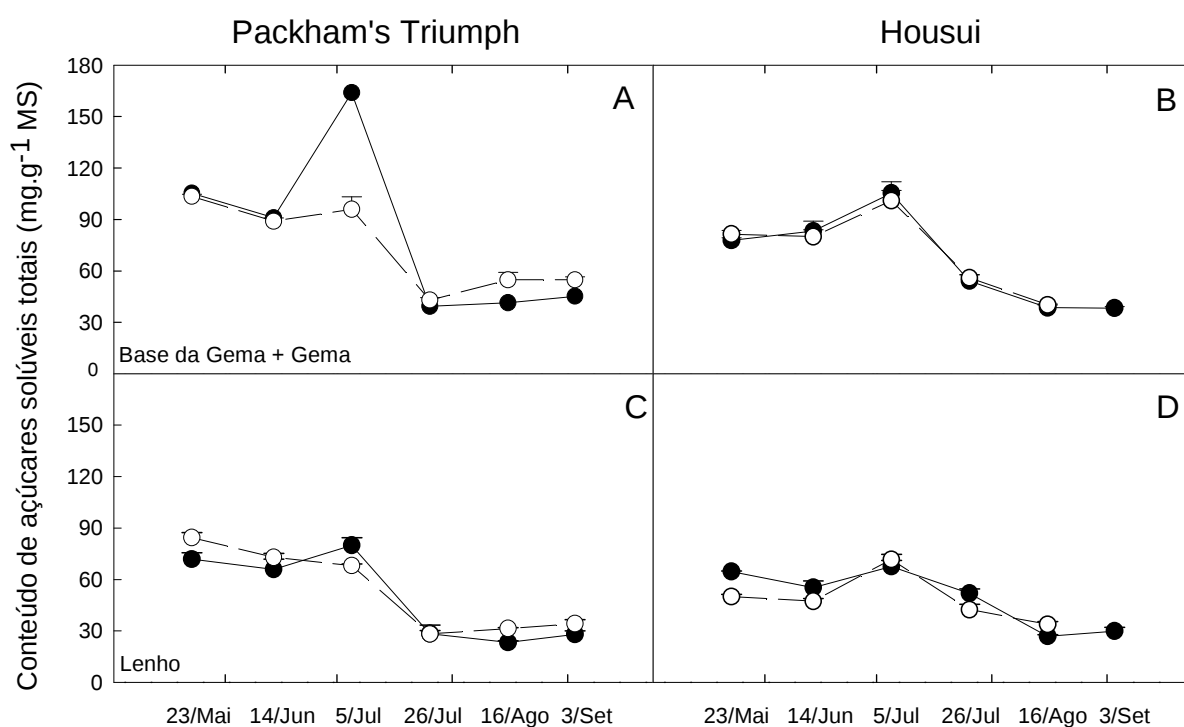


Figura 4: Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) na base+gema (A, B) e no lenho (C, D), durante o período de maio a setembro de 2008 em São Joaquim/SC (●) e Vacaria/RS (○), nas cvs. Packham's Triumph (A, C) e Housui (B, D). Médias ± EP (n=3).

Conteúdo de amido

Verificou-se que o conteúdo de amido nas gemas apresentou dinâmica semelhante, a qual consistiu em estabilização até 05/jul seguido de aumento até a última análise, correspondente a aproximadamente 45,6% para a cv. Packham's Triumph e de 53,1% para a cv. Housui em relação a 5/jul (Fig. 5A e 5B).

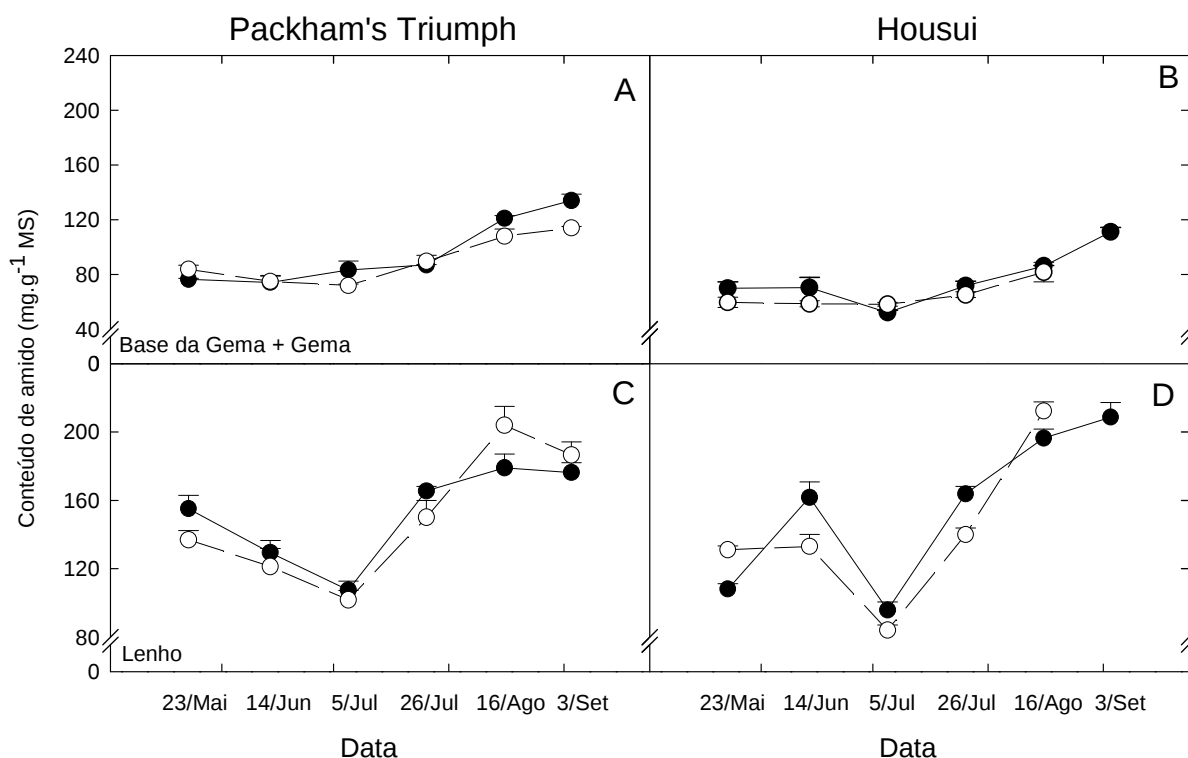


Figura 5: Conteúdo de amido na base+gema (A, B) e no lenho (C, D), durante o período de maio a setembro de 2008 em São Joaquim/SC (●) e Vacaria/RS (○), nas cvs. Packham's Triumph (A, C) e Housui (B, D). Médias $\pm$ EP (n=3).

Os teores de amido no lenho da cv. Packham's Triumph apresentaram queda de aproximadamente de 30% nos dois locais de cultivo até 05/jul, e posteriormente observou-se aumento de 45% até 16/ago (Fig. 5C). O conteúdo de amido na cv. Housui aumentou (São Joaquim/SC) ou manteve-se inalterado (Vacaria/RS) na fase inicial seguido de queda a partir de 14/Jun (Fig. 5D). Após 5/jul seu conteúdo

aumentou em aproximadamente 52% até o final do período de avaliações, atingido valores superiores à cv. Packham's Triumph em ambos locais.

Conteúdo de água

Houve aumento de 50% no CA nas gemas entre 26/jun e 03/set para cv. Packham's Triumph cultivada em São Joaquim/SC, enquanto que em Vacaria/RS as gemas apresentaram queda no CA de 30% para o mesmo período (Fig. 6A). Apesar dos valores de CA no conjunto gema+base serem semelhantes no início do experimento (23/mai), a última coleta (3/set) o WC foi de 50,8% superior em São Joaquim em relação a Vacaria/RS.

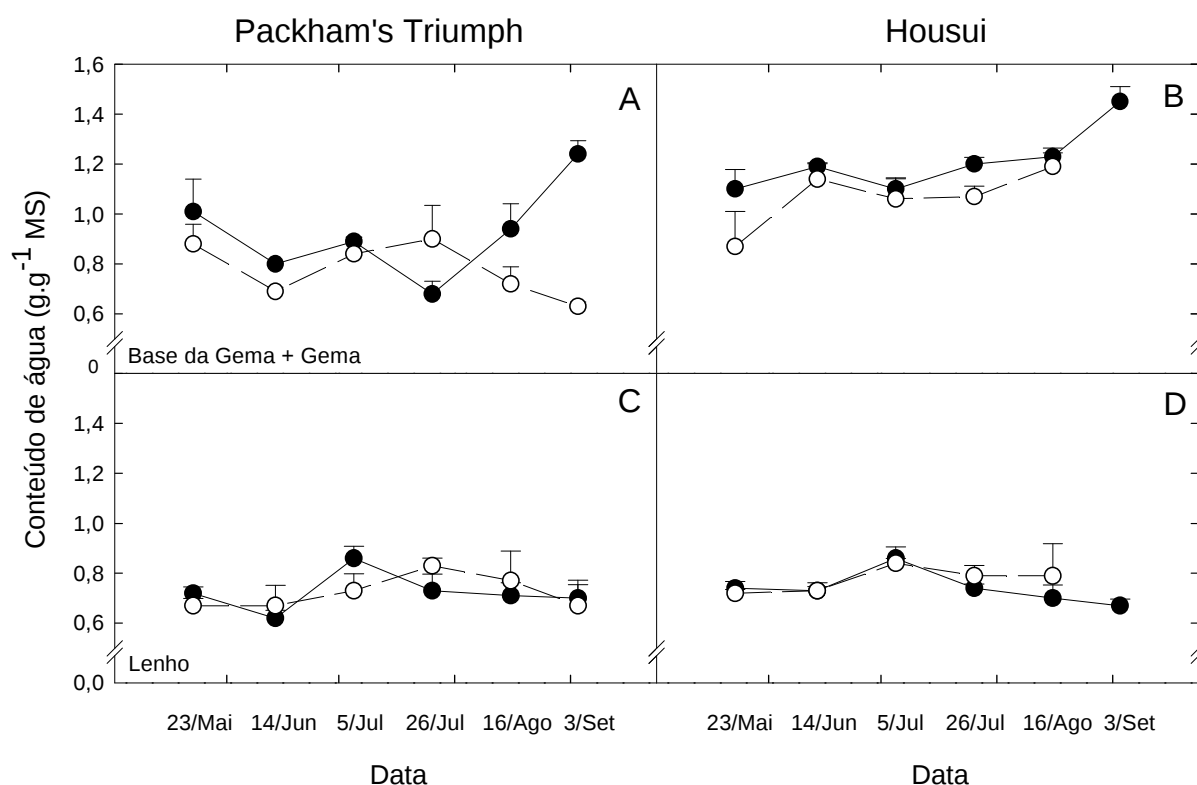


Figura 6: Conteúdo de água na base+gema (A, B) e no lenho (C, D), durante o período de maio a setembro de 2008 em São Joaquim/SC (●) e Vacaria/RS (○), nas cvs. Packham's (A, C) e Housui (B, D). Médias ± EP (n=3).

O CA nas gemas da cv. Housui apresentou uma dinâmica semelhante entre os locais de cultivos, porém apresentando CA mais elevados do que a cv. Packham's Triumph (Fig 6A e 6B). No lenho este parâmetro foi semelhante em ambos locais nas duas cultivares utilizadas. Foi observado que o WC no lenho da cv. Packham's Triumph de São Joaquim/SC atingiu o ápice de acúmulo 21 dias antes de Vacaria/RS, que ocorreu em 26/jul (Fig. 6C). Em ambas condições climáticas avaliadas, o conteúdo de água nos tecidos do lenho da cultivar Housui não apresentou diferenças expressivas ao longo do período hibernar (Fig. 6D).

4 DISCUSSÃO

Os principais eventos neste experimento ocorreram no mês de julho, período que coincidiu com a ocorrência das altas temperaturas (Fig. 2) e com o final da endodormência (Fig. 3) nas duas cultivares e em ambos locais, com exceção da cv. Housui em Vacaria/RS. O aumento no TMB observado em 26/jul em Vacaria/RS na cv. Housui estaria relacionada com as flutuações térmicas daquele período, ou seja, temperaturas máximas acima de 20°C durante o mês de julho. De acordo com Saure (1985) e Honjo et al. (2002), a ocorrência destes dias quentes durante a dormência da pereira japonesa, acima de 25°C, pode retardar a brotação mais do que as oscilações das temperaturas ao longo do inverno. Herter (1992) descreve que o retorno de frio intermitente logo após um período longo de temperaturas altas ocasiona aumento na profundidade da dormência. Baseado nesta informação observou-se que para a cv. Housui, isto procedeu de forma clara (Fig. 2B) em 26/jul para plantas cultivadas em Vacaria/RS. No caso da cv. Packham's Triumph as elevadas temperaturas ocorridas em Vacaria/RS parecem não ter influenciado o progresso da dormência. Entretanto, o menor acúmulo de frio ocorrido em

Vacaria/RS demonstrou que o TMB é superior quando comparado as plantas cultivadas em São Joaquim/SC (HERTER et al., 1992). Carvalho (2001), trabalhando com macieiras, também observou que a baixa ocorrência em frio natural contribuiu para o estabelecimento de uma dormência profunda.

Rakngan et al. (1996), descrevem que geralmente, o amido é o carboidrato de reserva mais abundante em plantas de pereira durante o período de crescimento vegetativo, que é hidrolisado a glicose após e durante o inverno, como forma de proteção ao frio (COTTIGNIES, 1983). Eles também relataram as tendências de que os AST e amido seguem um padrão inverso, sugerindo uma interconversão, ou seja, quando o crescimento é reiniciado. Esta inversão também foi observada por Sauter et al. (1988a; 1988b), que relata que a conversão do amido em AST foi induzida nas células de armazenamento do parênquima do xilema, em ramos isolados de álamo (*Populus* sp.) submetidos à baixa temperatura. No entanto, após a superação da endodormência, as gemas se tornariam drenos metabólicos preferenciais, aumentando a importação de açúcares, por meio de transporte ativo, os quais são metabolizados para o fornecimento de energia e a biossíntese de precursores carbônicos durante a fase de indução à brotação (MARQUAT et al., 1999).

A retomada do crescimento coincidiu com a queda dos AST (Fig. 4) em ambos tecidos, cultivares e locais de cultivo, indicando que houve consumo dos AST nesta fase. Em contrapartida, nesta mesma data ocorreu um aumento no acúmulo de amido no lenho, fortalecendo a hipótese de Beck e Ziegler (1989), que afirmou que as concentrações de amido e de TSS obedecem um padrão inverso durante a dormência. Esta interconversão pode ser observado neste estudo, como foi observado por Yamamoto (2010) com pereira cv. Housui e Carvalho (2001) com macieira. A não degradação do amido e o aumento nos ramos neste trabalho após

05/jul seria provocada pela falta de frio durante o inverno, a reconversão dos AST (LEITE et al., 2006) e/ou devido ao aumento na demanda de carbono para a manutenção da respiração basal e da atividade metabólica das gemas (MARAFON et al., 2011).

O aumento na concentração dos AST nas gemas pode estar associado com a diminuição dos conteúdos de açúcares e amido nos tecidos de reserva, para a sustentação dos processos de floração e brotação, conforme observado por Bonhomme et al. (2005), ocorreu neste experimento até 05/jul (Fig. 4 e 5). Leite (2004) verificaram que em ramos de pessegueiro mantidos sob condições naturais, com satisfação plena do requerimento em frio, apresentaram aumento nos conteúdos de hexoses e amido nas gemas, ocorrendo o contrário sob plantas privadas de frio hibernal.

Honjo et al. (2002), ao colocar plantas de pereiras japonesas sob condições de acúmulo de 1000 HF e seguido de 7 dias de forçagem em temperaturas superiores a 20°C, os AST (glicose e frutose) diminuíram, porém houve um aumento expressivo no conteúdo de amido. Isso também explica os aumentos expressivos de amido após 05/jul no ramos tanto da cv. Packham's Triumph como da cv. Housui.

Os eventos ocorridos a partir de 5/jul também coincidem com as principais mudanças no CA, cujas gemas apresentaram os teores mais elevados nos dias que antecederam a superação da dormência (brotação). A translocação da água das gemas para o lenho observado em 5/jul na cv. Housui pode estar associado com hipótese de que isto ocorreu com finalidade da preservação da região meristemática (EREZ et al., 1998; CARVALHO, 2001).

Na cv. Packham's Triumph, o aumento do CA ocorrido em 26/jul pode ser explicado pelo aumento do TSS no período anterior na gema e com retomada do

crescimento. Nos vasos do xilema pode ter havido aumento do potencial osmótico da seiva, gerando uma pressão interna que permite o restabelecimento da condutividade hidráulica dos vasos, conforme observado por Cottignies (1990) e Gévaudant et al. (2001).

A hipótese de que o conteúdo de água nos tecidos possa ser utilizado como um marcador do progresso da dormência parece ser válida para cv. Packham's Triumph, pois os resultados demonstraram que na retomada do crescimento observou-se aumento expressivo do CA em gemas para plantas cultivadas em São Joaquim/SC, dando-se início à brotação.

5 CONCLUSÃO

O aumento do conteúdo de água na base da gema + gema na cv. Packham's Triumph parece ser um elemento de validação da hipótese de que a água seja um marcador do progresso da dormência, sendo ela um marcador da retomada do crescimento, desde que não haja grandes flutuações térmicas (temperaturas elevadas). Entretanto, esta hipótese não pôde ser verificada na cv. Housui. A água demonstra ter uma forte ligação no progresso da dormência e na dinâmica de carboidratos mais clara para cv. Packham's Triumph do que na cv. Housui. Altas temperaturas durante a dormência alteram a dinâmica de água na cv. Packham's Triumph, quando cultivadas em locais com acúmulo de horas de frio contrastantes e a ocorrência de frio influencia o deslocamento da água na gema. Temperaturas máximas intermitentes acima de 20°C seguidas de frio intenso restabelecem a dormência e retardam a brotação na cv. Housui.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Clima Temperado pelo financiamento do projeto e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri, pela disponibilidade dos pomares em São Joaquim/SC. À Doutoranda em Agronomia da UFPel, Carine Cocco, pela colaboração nas determinações dos carboidratos.

REFERÊNCIAS

AMÉGLIO, T.; LACOINTE, A.; COCHARD, H.; ALVES, G.; BODET, C.; VANDAME, M.; VALENTIN, V.; SAINT-JOANIS, B.; PLOQUIN, S.; CRUIZIAT, P.; JULIEN, J.L.; GUILLIOT, A.; PETEL, G. Water relations in walnut during winter. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.544, p.239-246, 2001.

BALANDIER, F. Etude dynamique de la croissance et du développement des bourgeons de quelques cultivars de pecher: Cultivés à diverses altitudes sous Le climat tropical de l'Ile de la Réunion 1992. 162 p. **Thèse** (Doctorat) - Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.40, p. 95-117, 1989.

BONHOMME, M.; RAGEAU, R.; GENDRAUD, M. Influence of temperature on the dynamics of ATP, ADP and non-adenylic triphosphate nucleotides in vegetative and floral peach buds during dormancy. **Tree Physiology**, Oxford, n. 20, p.615-621, 2000.

BONHOMME, M.; RAGEAU, R.; GENDRAUD, M.; LACOINTE, A. Influences of cold deprivation during dormancy on carbohydrate contents of vegetative and floral primordia and nearby structures of peach buds (*Prunus persica* L. Batch) **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 105, p. 223-240, 2005.

BUCKHOUT, T. J.; TUBBE, A. Structure, mechanisms of catalysis, and regulation of sugar transporters in plants. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A. A. **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: Marcel Dekker, Inc., p.229-260, 1996.

CARVALHO, R.I.N. Dinâmica da dormência e do conteúdo de carboidratos e proteínas em gemas vegetativas e ramos de um e dois anos de macieira com ou sem frio suplementar. 2001. 134f. **Tese** (Doutorado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, R.I.N.; ZANETTE, F. Conteúdo de carboidratos em gemas e ramos de macieira durante o outono e inverno em região de baixa ocorrência de frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.202-205, 2004.

COTTIGNIES, A. Teneur en eau et dormance dans le bourgeon de Frêne. **Z. Pflanzenphysiol**, Paris, v.111, p.133-139, 1983.

COTTIGNIES, A. Potentiel osmotique et potentiel hydrique du bourgeon terminal de frêne, au cours du cycle annuel. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 310, p. 211-216, 1990.

CRABBÉ, J.; BARNOLA, P. A. New Conceptual Approach to Bud Dormancy in Woody Plants. In: LANG, G.A. (ed.) **Plant Dormancy: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. CAB International, USA, 1996, p.83-113.

DISCHE, Z. General colors reactions In: WHISTLER, R.L.; WOLFRAM, M.L. **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962, p. 477-520.

EREZ, A.; FAUST, M.; LINE, M. J. Changes in water status in peach buds on induction, development and release from dormancy. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.73, n.2-3, p.111-123, 1998.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Trade**. Crops Primary – Pears (2010). Disponível em <http://faostat.fao.org/>. Acessado em: 1 de fevereiro de 2011.

FAORO, I. D. Cultivares e porta-enxertos. In: EPAGRI. **Nashi, a pêra japonesa**. Florianópolis: Epagri/Jica, 2001, p. 95-103.

GEVAUDANT, F.; PETEL, G.; GUILLIOT, A. Differential expression of four members of the H⁺-ATPase gene family during dormancy of vegetative bud of peach trees **Planta**, Berkeley, v. 212, p. 619-626, 2001.

HERTER, F.G. Dormance des bourgeons et phenologie de quelques cultivars de pommier: effet de la température en interaction avec le génotype. 1992. 162 p. **Thèse** (Doctorat) - Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

HERTER, F. G.; RAGEAU, R.; BONHOMME, M.; MAUGET, J. C. Determinação do término da dormência e floração para algumas cultivares de macieira: comparação entre métodos biológico e empírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, p.77-81, 1992.

HONJO, H.; SUGIURA, T.; KOBAYASHI, Y.; WATANABE, M.; FUKUI, R. Effect of intermittent warm periods on bud break and carbohydrate contents of japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) at different endodormancy stages. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.587, p.397-403, 2002.

IRIGOYEN, J.J.; EMERICH, D.W.; SANCHEZ-DIAZ, M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. **Plant Physiology**, Oxford, v.84, p.55–60, 1992.

LANG, G.A.; EARLY, J.D.; MARTIN, G.C.; DARNELL, R.L. Endo, para and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, p. 371- 378, 1987.

LEITE, G. B. Evolution des états des bourgeons et de leur hétérogénéité le long du rameau d'un an de pêcher sous différents régimes de températures après l'installation de l'endodormance. 2004. 159 p. **Thèse** (Doctorat) - Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

LEITE, G. B.; BONHOMME, M.; PUTTI, G. L.; PÉTEL, G.; PETRI, J. L.; RAGEAU, R. Physiological and biochemical evolution of peach leaf buds during dormancy course

under two contrasted temperature patterns. **International Journal of Horticultural Science**, Böszörményi, v.12, p.15–19, 2006.

MARAFON, A. C.; CITADIN, I.; AMARANTE, L.; HERTER, F. G.; HAWERROTH, F. J. Chilling privation during endodormancy period disturbs carbohydrate mobilization in Japanese pear. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.68, n.4, p.xx-xx, in press, 2011.

MARAFON, A.C. Metabolismo de carboidratos, conteúdo de água e necrose floral em pereira (*Pyrus* sp.) em condições de falta de frio. 2008. 80f. **Tese** (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

MARQUAT, C.; VANDAMME, M.; GENDRAUD, M.; PÉTEL, G. Dormancy in vegetative buds of peach: relation between carbohydrate absorption potentials and carbohydrate concentration in the bud during dormancy and its release. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.79, p.151-162, 1999.

McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H.H. Determination of starch and amylose in vegetables **Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, p. 1156-1158, 1950.

MORIN, X.; AMÉGLIO, T.; AHAS, R.; KURZ-BESSON, C.; LANTA, V.; LEBOURGEOIS, F.; MIGLIETTA, F.; CHUINE, I. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. **Tree Physiology**, Oxford, v.27, p.817-825, 2007.

NAKASU, B.H.; HERTER, F.G.; CAMELATTO, D.; REISSER JÚNIOR, C; FORTES, J.F.; CASTRO, L.A.S.; RASEIRA, A.; FREIRE, C.J.S.; BASSO, C.; FAORO, I.; PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; PEREIRA, J.F.M.; CANTILLANO, R.F.F.; VERÍSSIMO, V.; SIMÕES, F. **A Cultura da Pêra**. Coleção Plantar. Embrapa Clima Temperado, Brasília, 2007. 58p.

NAKASU, B.H.; HERTER, F.G.; LEITE, G.L.; RASEIRA, M.C.B. Pear flower bud abortion in southern Brazil. **Acta Horticulturae**, Wellington, n. 395, p. 185-192, 1995.

OSAKI, M.; SHINANO, T.; TADANO, T. Redistribution of carbon and nitrogen compounds from the shoot to the harvesting organs during maturation in field crops. **Soil Science & Plant Nutrition**, Kyoto, v.37, p.117–128, 1991.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; YASUNOBU, Y. Studies on the causes of floral abortion on japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) in southern Brazil. Proc. IS on Asian Pears **Acta Horticulturae**, Wellington, n. 587, p. 375-380, 2002.

RAGEAU, R. Croissance et débourrement dès bourgeons végétatifs de pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) au cours d'un test classique de dormance. **CR Academy Science**, Paris, v.287, p.1119-1122, 1978.

RAKNGAN, J.; GEMMA, H.; IWAHORI, S. Phenology and carbohydrate metabolism of Japanese pear trees grown under continuously high temperatures. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v.65, p.55–65. 1996.

SAURE, M. C. Dormancy release in deciduous fruit trees. **Horticultural Reviews**, Wellington, v.7, p.239-299, 1985.

SAUTER, J.J. Seasonal changes in the efflux of sugars from parenchyma cells into the apoplast in poplar stems (*Populus x canadensis* "robusta"). **Trees**, Heidelberg, v.2, n.4, p. 242-249. 1988b.

SAUTER, J.J. Temperature-induced changes in starch and sugars in the stem of *Populus x canadensis* 'robusta'. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 132, p.608-612, 1988a.

YAMAMOTO, R. R.; HORIGANE, A.K.; YOSHIDA, M.; SEKOZAWA, Y.; SUGAYA, S.; GEMMA, H. "Floral primordia necrosis" incidence in mixed buds of japanese pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nakai var. culta) 'Housui' grown under mild winter conditions and the possible relation with water dynamics. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v.79, n.3, p.246–257. 2010.

YAMAMOTO, R.R. Study on Dormancy Progression and Floral Primordia Abortion Occurrence in 'Housui' Japanese Pear Grown under Mild Winter Conditions. 2010. 117f. **Thesis** (Doctor of Philosophy in Agricultural Science) - University of Tsukuba.

YOUNG, E.; MOTOMURA, Y.; UNRATH, R. Influence of root temperature during dormancy on respiration, carbohydrates, and growth resumption in apple and peach. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, p.514-519, 1987.

CAPÍTULO 2

RELAÇÃO ENTRE O FECHAMENTO ESTOMÁTICO E A INDUÇÃO À CAVITAÇÃO SOB ESTRESSE HÍDRICO EM FRUTÍFERAS LENHOSAS

RESUMO – As plantas lenhosas adotam diferentes estratégias do consumo da água em função do déficit hídrico. O objetivo deste trabalho foi investigar estratégias, em duas espécies (macieira e noqueira), submetidas a três níveis de déficit hídrico no solo [$\approx 0\%$ (severo), $\approx 50\%$ (moderado) e $\approx 75\%$ (fraco)] em comparação à transpiração controle. O fluxo de seiva ao nível do tronco foi monitorado diariamente através do método de balanço de calor, juntamente com a umidade do solo utilizando uma sonda TDR. Medidas diárias da condutância estomática (g_s) e potencial hídrico mínimo do xilema (Ψ_{min}) foram realizadas durante horário zenital do sol. Foram determinadas as curvas de vulnerabilidade à cavitação através da porcentagem da perda da condutividade hidráulica. O fechamento estomático demonstrou ser um importante parâmetro na prevenção à cavitação xilemiana em noqueiras e macieiras submetidas a déficit hídrico no solo, visto que coincidiu com a indução da cavitação primordial (P_{12}). Esta situação impediu o desenvolvimento de tensões abaixo do P_{12} . No entanto, sob regime de secas severas a macieira manteve os estômatos parcialmente abertos, indicando maior tolerância desta espécie à seca quando comparado à noqueira.

Palavras-chaves: *Malus domestica* Borkh. *Juglans regia* L. Embolia. Transpiração. Estômato.

RELATIONSHIP BETWEEN STOMATAL CLOSURE AND THE INDUCTION CAVITATION UNDER WATER STRESS IN FRUIT WOODY

ABSTRACT: It is suggested that woody plants adopt different strategies to use water before the drought. The aim of this study was to investigate these strategies in two species (apple and walnut), subjected to three levels of soil water deficit [$\approx 0\%$ (high), $\approx 50\%$ (mediun) and $\approx 75\%$ (low)] in comparison to control transpiration. The sap flow at the stem was monitored daily by the method of heat balance, along with soil moisture by using a TDR probe. Daily measurements of stomatal conductance (g_s)

and minimum xylem water potential ($\Psi_{\min}$) were performed during time Zenith of the sun. Vulnerability curves for cavitations by the loss of hydraulic conductivity were determined. Stomatal closure demonstrated to be an important parameter for preventing cavitations in the xylem in both walnut and apple trees subjected to soil water deficit, which coincided with induction of primary cavitation (P_{12}). This situation prevented development of xylem tensions below P_{12} . However, even under severe drought conditions, the stomata remained partially opened in apple trees, indicating a higher level of tolerance in this specie when compared to walnut trees.

KEYWORDS: *Malus domestica* Borkh. *Juglans regia* L. Embolism. Transpiration. Stomata.

1 INTRODUÇÃO

O déficit hídrico é causa freqüente de estresse nas plantas (KRAMER e BOYER, 1995). Durante a estação de crescimento, a seiva circula sob tensão nas plantas. Assim, as colunas de água formadas por este transporte podem ser interrompidas quando a tensão aumenta durante o estresse hídrico, ocorrendo então à cavitação e, conseqüentemente, a embolização, caracterizada pelos vasos completamente tomados de ar (ZIMMERMANN, 1983).

Aparentemente, plantas lenhosas são muito diferentes entre si sob o ponto de vista hidráulico e adotam ações contrastantes em resposta ao déficit hídrico e respondem a este estresse fechando os estômatos. Este fechamento reduz a transpiração das folhas e impede o desenvolvimento de déficits excessivos de água em seus tecidos (COCHARD et al., 2002) através de uma série de adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas que controlam a perda de água e melhora a absorção (ENNAJEH et al., 2008). No entanto, a desvantagem do fechamento dos estômatos para as plantas é a redução dos ganhos de carbono que prejudicam o seu crescimento (SCHULZE et al., 1987). Portanto, o conhecimento sobre as respostas das plantas à seca e à sua base de mecanismos têm relevância para os estudos de adaptação sob diferentes condições climáticas e de programas de melhoramento genético.

Zimmermann (1983) descreve que alta taxa de transpiração induz intensa abertura estomática, o que é uma consequência da necessidade da planta em manter as trocas gasosas nas folhas para a realização da fotossíntese. Entretanto, para manter um equilíbrio favorável da água na planta, um fluxo eficiente no xilema é necessário para substituir sua perda nas folhas.

A abertura estomática é regulada por repostas fisiológicas, as quais estão envolvidas na mecânica do movimento estomático (ZEIGER et al., 1987). Essas repostas podem ser vistas como uma indicação dos diferentes mecanismos de controle da respiração das plantas lenhosas. Ladjal et al. (2004) descrevem que a sincronização do fechamento estomático e perda da condutividade hidráulica durante a seca é um aspecto adicional a ser considerado em tal mecanismo.

Diversos estudos têm demonstrado que o potencial hídrico da planta induz o fechamento estomático e evita a cavitação no xilema em algumas espécies lenhosas (SPERRY e SALIENDRA, 1994; BRODRIBB e HILL, 2000; LEMOINE et al., 2002; ENNAJEH et al., 2008). Sendo assim, o fechamento dos estômatos está diretamente correlacionado à perda de condutividade hidráulica na planta (COCHARD, 2002; BRODRIBB et al., 2003; NARDINI et al., 2001).

Com base na teoria da relação entre o fechamento estomático e perda da condutividade hidráulica em função do potencial hídrico da planta, o objetivo deste estudo foi investigar a adaptação e a resistência à seca em duas espécies frutíferas de grande importância econômica, a macieira e a noqueira, sendo elas diferentes do ponto de vista hidráulico em relação à necessidade de água em face de três ciclos de déficit hídrico no solo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Local e material vegetal do experimento

A pesquisa foi realizada em Clermont-Ferrand, França (45°77'N, 3°14'E), no laboratório integrado física e fisiologia de árvores frutíferas e florestais (PIAF), durante o ciclo vegetativo de 2009 no hemisfério norte.

Seis plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.), cv. Fuji sobre porta-enxerto M9, com três anos de idade foram transplantadas para vasos de 35 L e seis plantas de noqueira (*Juglans regia* L.), cv. Franquette sobre porta-enxerto selvagem, de três anos de idade para vasos de 80 L. Os vasos foram preenchidos com uma mistura de substrato arenoso (66% de solo virgem arenoso e 34% de turfa) e protegidos com um filme plástico branco para impedir a precipitação, a evaporação e o aquecimento solar.

As plantas foram cultivadas durante os meses de julho e agosto em condições climatológicas naturais no INRA-PIAF, UMR#547 em Clermont-Ferrand na França (45°77'N, 3°14'E). Durante o experimento foi mensurada a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) usando um sensor LI-190SA (LiCor Inc., NE, USA) a 1 m de altura. Três sensores de temperatura foram instalados a sombra. As médias para ambos os parâmetros foram calculadas para um intervalo de 10 minutos.

Regime hídrico

No início do experimento todos os substratos contidos nos vasos foram colocados na capacidade de campo. Após este procedimento, as plantas foram submetidas a quatro tratamentos distintos, sendo eles: **tratamento controle**, correspondente a três plantas de cada espécie irrigadas diariamente por sistema de

gotejamento, e outro denominado de **tratamento seco**, que correspondendo a três plantas de cada espécie, que foram irrigadas sob três níveis de déficit diferentes no solo, sendo um fraco ($\approx 75\%$ transpiração controle), um moderado ($\approx 50\%$ transpiração controle) e um severo ($\approx 0\%$ da transpiração controle).

Para o tratamento seco, a irrigação era encerrada nas primeiras horas da manhã, dando-se início ao nível desejado de déficit hídrico no solo. Após as plantas atingirem $\approx 75\%$; $\approx 50\%$ ou $\approx 0\%$ da transpiração controle, reiniciava a irrigação até o momento em que estas apresentavam transpiração semelhante ao tratamento controle, monitorada pelo fluxo de seiva no tronco diariamente.

Após a instalação dos regimes hídricos as seguintes variáveis abaixo foram analisadas durante o experimento, correspondente de 27/julho a 24/agosto.

Umidade do solo

A umidade do solo foi mensurada com uma sonda TDR MiniTrase (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA) diariamente durante o experimento às 14h, numa profundidade de 15 cm, distante 25 cm do tronco e em três pontos distintos de cada vaso.

Estimativa da área foliar

Durante o experimento, semanalmente, foi realizado a contagem de número de folhas por árvore de cada espécie. Ao fim do experimento foram coletadas 50 folhas ao acaso de cada árvore e determinou-se a área foliar utilizando um medidor de área foliar de bancada modelo (Li-Cor 3100C , Lincoln, Nebraska, USA). A estimativa da área foliar de cada espécie foi realizado através do produto da média

da área foliar de uma folha e da média do número total de folhas durante o experimento.

Fluxo de seiva

Para cada planta a transpiração foi estimada a partir de medições diárias do fluxo da seiva no interior do tronco, por meio da técnica do balanço de calor de Valancogne e Nasr (1993).

Na Fig. 1 é apresentado o método indicando as medidas térmicas (watts). O princípio do método consiste na aplicação de um pequeno fluxo constante de calor (W) no segmento do tronco através de uma jaqueta térmica. Foi quantificado o calor nos fluxos condutivos axiais (Q_c e Q_b), assim como os radiais (Q_l) e na variação de armazenamento (Q_a) segundo o volume do segmento de tronco que foi aquecido. A dissipação do calor pela seiva (Q_s) é calculado como termo residual do balanço de calor com o fluxo volumétrico da seiva, (ROJAS, 2003).

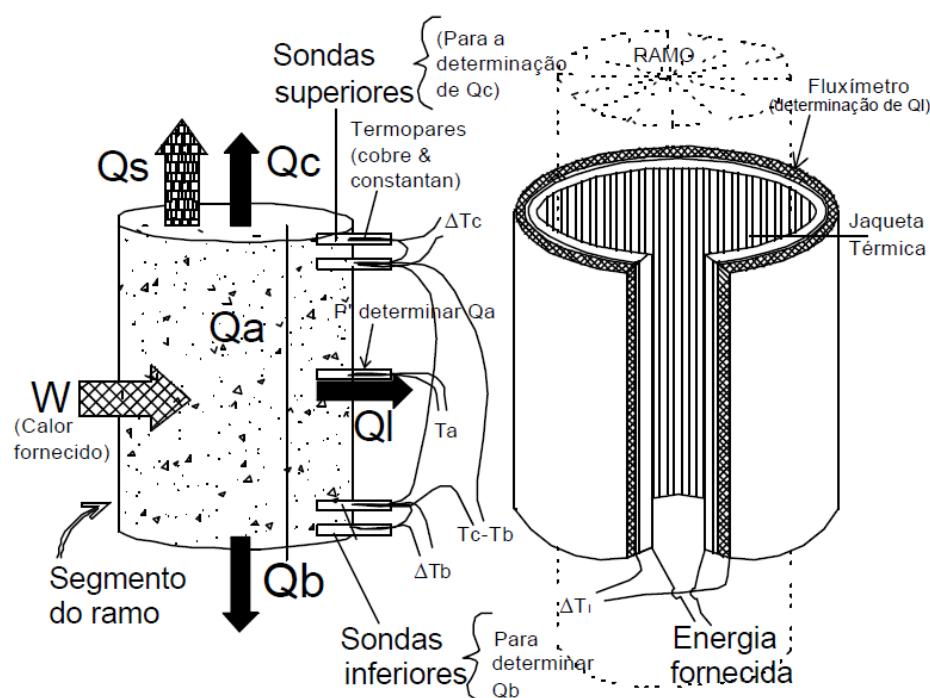


Figura 1: Esquema do princípio do método de balanço de calor e do sensor para determinação de fluxo de seiva, Q_l : Fluxo lateral, Q_a : Variação de armazenamento, Q_b e Q_c : Fluxo condutivos axiais e Q_s : Dissipação do calor pela seiva. Adaptado de Rojas (2003).

Os dados provenientes de cada planta foram coletados usando um *datalogger* (DL2 model: Deta-T Devices, Cambridge, UK), sendo que todas as medições foram feitas a cada 30 segundos e média a cada 10 minutos.

Potencial hídrico e trocas gasosas

O potencial hídrico mínimo do xilema ($\Psi_{\min}$) foi mensurado usando uma câmara de pressão tipo Scholander (SCHOLANDER et al., 1965). Três folhas por planta foram removidas para obter o $\Psi_{\min}$. Estas medidas foram obtidas entre 12h e 14:00h. As pressões do xilema foram estimadas pela medida do potencial hídrico de folhas cobertas com papel alumínio e fechadas com saco plástico 6h antes (TURNER, 1981; WEI et al., 1999).

Ao mesmo tempo, foi mensurada a condutância estomática (g_s), com um porômetro portátil (Li-Cor 1600, Lincoln, Nebraska, USA). As medidas de condutância estomática foram obtidas de três folhas expostas ao sol completamente expandidas selecionadas ao acaso.

Após, as curvas da condutância estomática das folhas vs potencial hídrico do xilema foram sobrepostas nas curvas de vulnerabilidade a cavitação, representadas pela porcentagem perda de condutividade hidráulica (PLC) das macieiras e nogueiras.

Embolia do xilema e curvas de vulnerabilidade

Cinco ramos de cada macieira expostos ao sol e na altura mediana da planta foram coletados para determinação das curvas de vulnerabilidades (CV). Os ramos foram acondicionados em sacos plásticos pretos durante o transporte até ao Laboratório de Água do INRA-PIAF (Lab'Eau). Cada ramo foi reduzido a 37 cm de comprimento e tiveram suas extremidades cortadas com lâminas de corte preciso, com objetivo de manter os vasos do xilema abertos em ambas as extremidades.

A embolia do xilema foi quantificada mesurando a porcentagem de perda de condutividade hidráulica (PLC) de cada ramo com valores do potencial hídrico do xilema (Ψ_{xil}) induzidos, a qual causa bloqueios da seiva com bolhas de ar no xilema (SPERRY et al., 1988). O valor obtido para a PLC é uma estimativa indireta do percentual da cavitação nos vasos do xilema (COCHARD et al., 2000). A vulnerabilidade à embolia do xilema das macieiras foi avaliada utilizando a técnica CAVITRON (COCHARD, 2002; COCHARD et al., 2005).

A técnica consiste em submeter os ramos com 37 cm sob diversas pressões negativas geradas gradativamente através da força centrífuga imposta no centro do

ramo com o uso de um rotor. Após a alocação do ramo no rotor, suas extremidades foram imersas em água desgaseificada durante a centrifugação gerando então, a vazão desta água de uma extremidade para outra com uma determinada velocidade, a qual depende da rotação (pressão) aplicada. A PLC foi então calculada como:

$$PLC = 100 \times \left(1 - \frac{K}{K_{\max}} \right) \quad (1)$$

onde, **PLC** = porcentagem de perda da condutividade hidráulica; **K** = condutividade hidráulica e **K_{max}** = condutividade hidráulica máxima (inicial).

As CV para macieiras foram ajustadas usando a seguinte função sigmóide (PAMMENTER e VANDER WILLIGEN, 1998):

$$PLC = \frac{100}{1 + e^{\left(\frac{s(P-P_{50})}{25} \right)}} \quad (2)$$

onde, **PLC** = porcentagem de perda da condutividade hidráulica; **e** = 0,5; **S** = inclinação da reta (*slope*); **P** = pressão do xilema; **P₅₀** = pressão que provaca 50% de PLC.

A CV para noqueira foi obtida dos dados publicados por Cochard et al. (2002), dispensando a geração de dados para realização das curvas para este experimento.

A porcentagem de perda da condutividade hidráulica em 12% foi calculada como:

$$P_{12} = P_{50} - \frac{50}{S} \quad (3)$$

onde **P₁₂** = 12% de perda condutividade hidráulica; **P₅₀** = 50% de perda de condutividade hidráulica e **S** = inclinação da curva obtida (*slope*).

Delineamento estatístico

O efeito da seca sobre as variáveis medidas foi determinado através da análise de variância (ANOVA) para blocos inteiramente casualizados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Umidade do Solo

A Fig. 2 mostra a evolução da umidade do solo durante os três ciclos de déficit hídrico aos quais as plantas foram submetidas. Observa-se que o consumo de água no solo pelas macieiras durante o período de déficit hídrico ocorreu de forma controlada e gradativa. O contrário ocorre nas nogueiras, que no terceiro dia após o início do estresse severo, revelou valores de umidade no solo próximos aos do último dia de estresse do ciclo. Isto não pode ser atribuído a diferença de área foliar das plantas, pois as macieiras apresentaram média de área foliar total de 1,72m² e as nogueiras de 4,20m². A diferença de área foliar entre as plantas de 59% foi compensada com a diferença de volume entre os vasos de cultivo de 56%. Conseqüentemente, esta diferença disponibilizou maior conteúdo de água no solo para as nogueiras, onde também pode ser observado nas Fig. 3 e 4, que os picos diários de transpiração, que ocorrem entre as 12:00 e 14:00h, são semelhantes no dia 6/ago, por exemplo, atingindo valores próximos a 4,5 cm³.mn⁻¹.

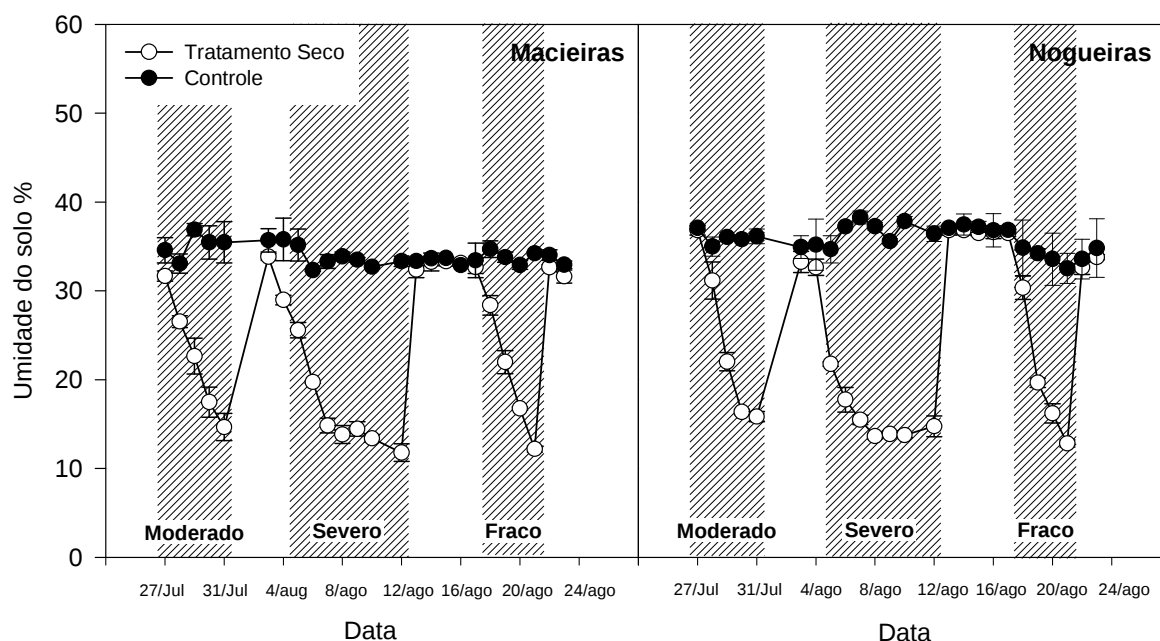


Figura 2: Evolução da umidade do solo durante os três ciclos de déficit hídrico implementados em vasos com macieiras e noqueiras.

As macieiras que foram submetidas a um déficit hídrico severo no solo, consumiram água até um dia antes do retorno da irrigação. Em contrapartida, as noqueiras praticamente cessaram o consumo de água quatro dias antes do retorno da irrigação. Esta rápida absorção de água pelas noqueiras pode estar ligada com a capacidade de absorção de água pelas raízes (KRAMER e BOYER, 1995), bem como, com a abertura estomática nas folhas, visto que ambas espécies estavam nas mesmas condições de cultivo e disponibilidade de água no solo. Baseado nisto, a macieira conduziu uma estratégia mais segura de absorção da água no solo evitando sua desidratação severa.

Fluxo de seiva

As figuras 3 e 4 apresentam fluxo de seiva diário no tronco representado pela transpiração ($\text{cm}^3 \cdot \text{mn}^{-1}$) das plantas, e a taxa de radiação fotossinteticamente ativa,

durante os três ciclos de seca submetidos, baixo ($\approx 75\%$), moderado ($\approx 50\%$) e severo ($\approx 0\%$).

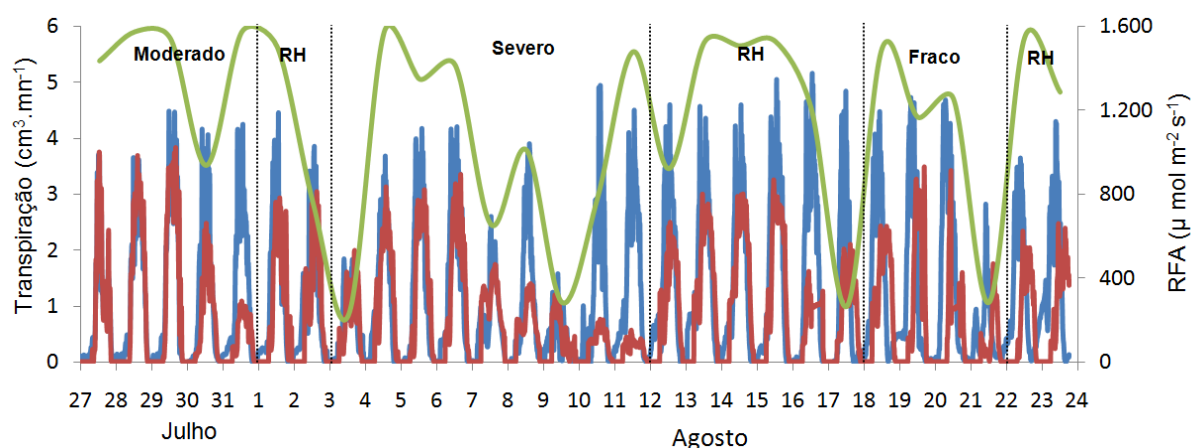


Figura 3: Fluxo de seiva diário de macieiras submetidas a três ciclos diferentes de déficit hídrico no solo (—) e sem déficit hídrico no solo (—). Radiação fotossinteticamente ativa máxima diária (—). RH: Reidratação.

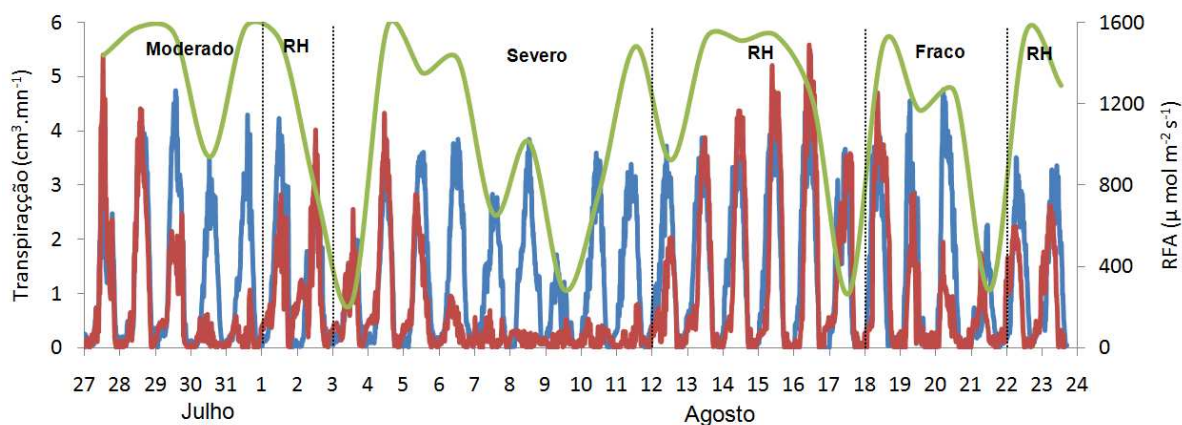


Figura 4: Fluxo de seiva diário de nogueiras submetidas a três ciclos diferentes de déficit hídrico no solo (—) e sem déficit hídrico no solo (—). Radiação fotossinteticamente ativa máxima diária (—). RH: Reidratação.

Observa-se que a transpiração do tratamento controle de ambas as espécies tiveram uma evolução muito similar a radiação fotossinteticamente ativa, que

segundo Reichardt e Timm (2004), este é o parâmetro principal da demanda de água na planta. O estresse hídrico induzido por cortes se desenvolve mais rapidamente do que em condições naturais (LEMOINE et al., 2002), portanto, esta afirmação tem que ser tomada em conta para a interpretação dos resultados.

Na Fig. 3 nota-se que as macieiras mesmo sob o ciclo de estresse severo mantêm uma taxa mínima de transpiração. Em contrapartida, as nogueiras (Fig. 4) revelam uma transpiração muito próxima ao zero. No entanto, o comportamento das plantas durante a reidratação, ou seja, após o estresse, revela que as nogueiras atingem níveis de transpiração muito semelhantes ao tratamento controle em menos de 48 horas após estresse, enquanto as macieiras parecem não obter mais os mesmos índices da transpiração do tratamento controle. Talvez isto seja um mecanismo de adaptação das macieiras durante o estresse, pois se pode observar na Fig. 5, que elas mantêm os estômatos abertos até próximo a tensões no xilema de -5 Mpa.

A transpiração das macieiras possivelmente foram menos afetadas durante um ciclo de estresse baixo, mesmo depois de um ciclo de estresse severo. Pois se observa que a transpiração nestas plantas esta próxima da transpiração controle. Logo as nogueiras apresentam uma queda abrupta da transpiração nas 48 horas precedente, bem como durante os outros dois ciclos de estresse.

A ocorrência de valores de fluxo na falta de iluminação é justificável, pois representa a fase de dinâmica hídrica diária na qual a planta se recupera da perda diurna de água (KRAMER e BOYER, 1995), em consequência da maior transpiração em relação à absorção nesse período. Desse modo, os tecidos do caule e ramos, além das folhas, recuperam sua turgescência. Essa dinâmica explica as variações

micromorfométricas em escala diária, uma das quais é o processo de contração/expansão radial dos ramos e caules (ROJAS, 2003).

Vulnerabilidade à cavitação e o fechamento estomático

Para investigar o papel que os estômatos podem ter na limitação da cavitação no xilema, foram plotados os dados de g_s e as CV em função do Ψ_{xil} (Fig. 5).

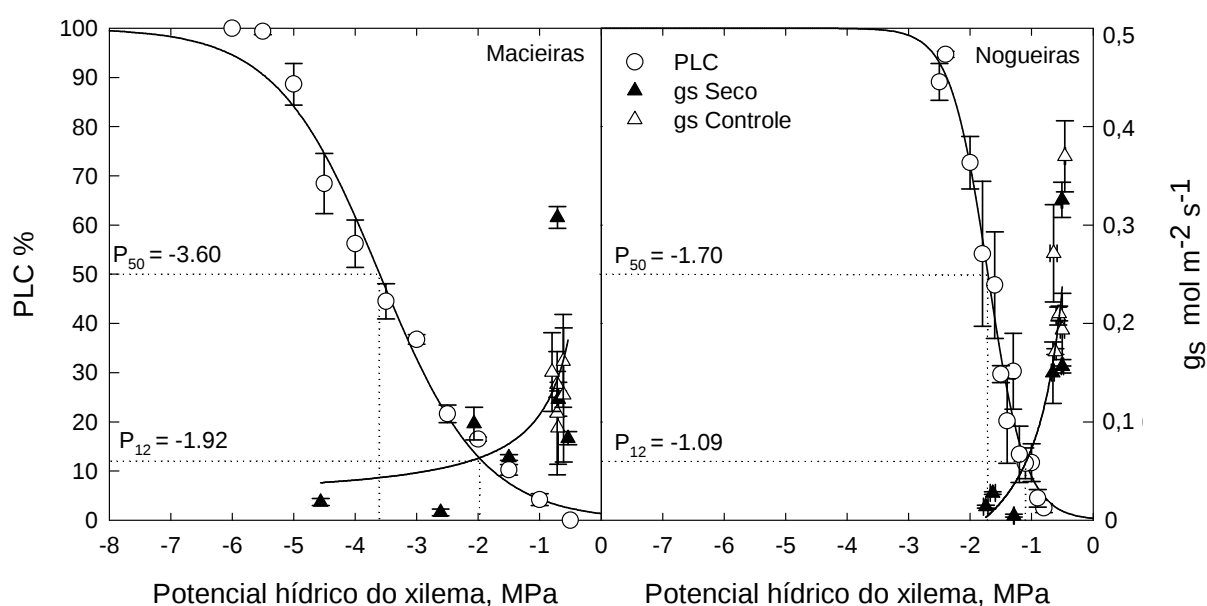


Figura 5: Condutância estomática (g_s) vs potencial hídrico do xilema sobreposta nas Curvas de vulnerabilidade representadas pela porcentagem de perda da condutividade (PLC) em macieiras e nogueiras. Os valores de PLC da noqueira são estimados dos dados publicados por Cochard et al. (2002). Barras Verticais = $\pm$ EP (n=5) para PLC e (n=3) para g_s

A vulnerabilidade dos tecidos condutores à cavitação é um dos parâmetros chaves para o funcionamento hídrico (SPERRY et al., 1988). As CV a cavitação mostram que as macieiras são menos vulneráveis à cavitação no xilema. Entretanto, as nogueiras são mais suscetíveis ao fenômeno da cavitação. Isto pode ser

constatado pelo ponto de 50% de perda de condutividade (P_{50}), que foi de -3,60 Mpa para macieiras e de -1,70 Mpa para nogueiras. As curvas mostram que com tensões próximas -3,0 Mpa, as nogueiras perdem 100% da condutância hidráulica, enquanto em macieiras se quer atingiram o P_{50} . Outra forma de avaliar o desempenho das espécies na suscetibilidade à cavitação é a determinação da inclinação das CV (*slope*), que para as macieiras foi de 29,79 e de 81,87 para nogueiras. Quanto mais próximo a zero (0) a inclinação mais resistentes à seca é a espécie e quanto mais próximo aos 100 mais suscetíveis as espécies são à cavitação.

Rood et al. (2000) descrevem que a cavitação é uma séria ameaça para as plantas, prejudicando o xilema e perdendo a capacidade condutora da seiva, podendo eventualmente levar a folha à dessecação e à morte do ramo. Normalmente, quando as funções transpiratórias estomáticas foliares excedem a absorção de água na planta pela raiz, os estômatos fecham-se para manter o equilíbrio hídrico. Este equilíbrio é essencial para o desenvolvimento da maior parte dos processos fisiológicos e metabólicos da planta, como as trocas gasosas e conseqüentemente a assimilação fotossintética do CO_2 (ZEIGER et al., 1987).

Observa-se que para ambas espécies os estômatos estavam quase fechados antes da formação de embolia danosa (PLC <10%), sugerindo que estômatos participam do controle da embolia no xilema. Resultados similar foi revelado em seringueiras (SANGSING et al., 2004). Vários mecanismos podem estar implicados para explicar este comportamento, entre os quais a função estomática. Os estômatos são os locais principais de perda d'água na planta e seu funcionamento é determinante para a gestão deste recurso (COCHARD et al., 2002) e certamente correlações entre o fechamento e a cavitação existem (CRUIZIAT et al., 2002; COCHARD et al., 2005).

Baseado nesta teoria, a cavitação do xilema que, neste estudo, foi uma característica relacionada com o fechamento dos estômatos, presume-se que seja uma característica fisiológica crucial associada a um fechamento estomático durante o estresse hídrico. Para este experimento, nas duas espécies a intensidade de déficit hídrico que induz o fechamento dos estômatos coincide com a de indução da cavitação primordial (P_{12}). Contudo, este ponto de intersecção está mais tardio na espécie menos vulnerável a embolia, sendo o P_{12} de -1,92 MPa para macieira e -1,09 MPa para noqueira. Pode-se afirmar que um severo déficit hídrico para noqueira é tolerável para macieira. Nota-se que até para um potencial hídrico no xilema de -1,92 MPa, a macieira preserva seus estômatos abertos para que haja as trocas gasosas, conseqüentemente atividade fotossintética e a manutenção do seu sistema condutor xilema funcional.

As propriedades estruturais e funcionais do sistema condutor podem ser determinantes na explicação desta relação. A contribuição deste comportamento hidráulico pode ser uma melhoria de eficiência de utilização da água em macieira, espécie mais resistente à seca e à cavitação. Ela absorve água em nível elevado de déficit hídrico. Além disso, nesta espécie os estômatos não se fecham a um potencial hídrico do xilema de -5 MPa. Na verdade, as trocas gasosas e conseqüentemente, a atividade fotossintética, mantêm-se mesmo com um sistema condutor semi-funcional.

4 CONCLUSÃO

O fechamento estomático demonstra ser importante parâmetro na prevenção a cavitação xilemiana em noqueiras e macieiras submetidas a déficit hídrico no solo, visto que coincide com a de indução da cavitação primordial (P_{12}), impedindo o

desenvolvimento de tensões abaixo do P_{12} . No entanto, mesmo em regimes de secas severas a macieira mantém os estômatos parcialmente abertos, indicando se caracterizar, comparativamente, a uma espécie tolerante.

AGRADECIMENTOS

A CAPES por conceder a bolsa de doutorado sanduiche na França. Ao INRA-PIAF UMR#547 pela disponibilização do local e material para realização deste experimento. À equipe de campo, Pierre Conchon, Christian Bodet, Patrice Chaleil e Christophe Serre.

REFERÊNCIAS

BRODRIBB, T.J.; HILL, R.S. Increases in water potential gradient reduce xylem conductivity in whole plants: evidence from a low-pressure conductivity method. **Plant Physiology**, Waterbury, v.123, p.1021–1028, 2000.

BRODRIBB, T.J.; HOLBROOK, N.M.; EDWARDS, E.J.; GUTIÉRREZ, M.V. Relations between stomatal closure, leaf turgor and xylem vulnerability in eight tropical dry forest trees. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v.26, p.443–450, 2003.

COCHARD, H. Xylem embolism and drought-induced stomatal closure in maize. **Planta**, Berkeley, v.215, p.466-471, 2002.

COCHARD, H.; BODET, C.; AMEGLIO, T.; CRUIZIAT, P. Cryo-scanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles. Facts or artifacts? **Plant Physiology**, Waterbury, v.124, p.1191-1202, 2000.

COCHARD, H.; DAMOUR, G.; BODET, C.; THARWAT, I.; POIRIER, M.; AMÉGLIO, T. Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.124, p.410-418, 2005.

COCHARD, H.; COLL, L.; Le ROUX, X.; AMÉGLIO, T. Unraveling the Effects of Plant Hydraulics on Stomatal Closure during Water Stress in Walnut. **Plant Physiology**, Waterbury, v.128, p.282-290, 2002.

CRUIZIAT, P.; COCHARD, H.; AMÉGLIO, T. The hydraulic architecture of trees: main concepts and results. **Annals of Forest Sciences**, Les Ulis, v.59, p.723-752, 2002.

ENNAJEH, M.; TOUNEKTI, T.; VADEL, A. M.; KHEMIRA, H.; COCHARD, H. Water relations and drought-induced embolism in olive (*Olea europaea*) varieties 'Meski' and 'Chemlali' during severe drought, **Tree Physiology**, Oxford, v.28, p.971-976, 2008.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995. 495p.

LADJAL, M.; ROLAND, H.; DUCREY, M. Drought effects on hydraulic conductivity and xylem vulnerability to embolism in diverse species and provenances of Mediterranean cedars. **Tree Physiology**, Oxford, v.25, p.1109-1117, 2004.

LEMOINE, D.; COCHARD, H.; GRANIER, A. Within crown variation in hydraulic architecture in beech (*Fagus sylvatica* L.): Evidence for a stomatal control of embolism. **Annals of Forest Sciences**, Les Ulis, v.59, p.19-27, 2002.

NARDINI, A.; TYREE, M.T.; SALLEO, S. Xylem cavitation in the leaf of *Prunus laurocerasus* and its impact on leaf hydraulics. **Plant Physiology**, Waterbury, v.125, p.1700–1709, 2001.

PAMMENTER, N.W.; VANDER WILLIGEN, C. A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. **Tree Physiology**, Oxford, v.18, p.589–593, 1998.

REICHARDT, K.; TIMM, L. C. **Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações**. São Paulo: Manole, 2004. 478p.

ROJAS, J.S.D. Avaliação do uso do fluxo de seiva e da variação do diâmetro do caule e de ramos na determinação das condições hídricas de citros, como base para

o manejo de irrigação. **Tese** (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 129f, 2003.

ROOD, S.B.; PATINO, S.; COOMBS, K.; TYREE, M.T. Branch sacrifice: cavitation-associated drought adaptation of riparian cottonwoods. **Trees**, Heidelberg, v.14, p.248–257, 2000.

SANGSING, K.; KASEMSAP, P.; THANISAWANYANGKURA, S.; SANGKHASILA, K.; Gohet, E.; THALER, P.; COCHARD, H. Xylem embolism and stomatal regulation in two rubber clones (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Trees**, Heidelberg, v.18, p.109–114, 2004.

SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D.; HEMMINGSEN, E.A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, Washington, v.148, p.339–346, 1965.

SCHULZE, E.D.; TURNER, N.C.; GOLLAN, T.; SHACKEL, K.A. Stomatal responses to air humidity and to soil drought. In ZEIGER, Z.; FARQUHAR, G.D.; COWAN, I.R. **Stomatal Function**. Stanford University Press, CA, p.311–321, 1987.

SPERRY, J.S.; DONNELLY, J.R.; TYREE, M.T. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v.11, p. 35–40, 1988.

SPERRY, J.S.; SALIENDRA, N.Z. Intra and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula occidentalis*. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v17, p.1233–1241, 1994.

TURNER, N.C. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. **Plant and Soil**, Crawley, v.58, p.339-366, 1981.

VALANCOGNE, C.; NASR, Z. A heat balance method for measuring sap flow in small trees. In: BOGHETTI, M.; GRACE, J.; RASCHI, A. (Eds.). **Water transport in plants under climatic stress**. Cambridge University Press, Cambridge, p.166–173, 1993.

WEI, C.; TYREE, M.T.; STEUDLE, E. Direct measurement of xylem pressure in leaves of intact maize plants. A test of the cohesion-tension theory taking hydraulic

architecture into consideration. **Plant Physiology**, Waterbury, v.121, p.1191–1205, 1999.

ZEIGER, Z.; FARQUHAR, G.D.; COWAN, I.R. **Stomatal Function**. Stanford University Press, CA, 1987.

ZIMMERMANN, M.H. **Xylem structure and the ascent of sap**. Springer-Verlag, Berlin, New York, 1983, 143 p.

CAPÍTULO 3

HOW RELIABLE IS THE DOUBLE-ENDED PRESSURE SLEEVE TECHNIQUE FOR ASSESSING XYLEM VULNERABILITY TO CAVITATION IN WOODY ANGIOSPERMS?

Physioligia Plantarum

DOI:10.1111/j.1399-3054.2011.01470.x

Aceito para publicação online: 14.MAR.2011

TECHNICAL FOCUS

How reliable is the double-ended pressure sleeve technique for assessing xylem vulnerability to cavitation in woody angiosperms?

Mustapha Ennajeh^{a,†}, Fabiano Simões^{b,†}, Habib Khemira^a and Hervé Cochard^{c,*}

^aDépartement des Sciences de la Vie, Faculté des Sciences de Gabès, Université de Gabès, Cité Erriadh-Zrig, 6072 Gabès, Tunisia

^bFisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Campus Universitário 96010-900 - Capão do Leão, RS, Brasil

^cINRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand Cedex 01, France

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: cochard@clermont.inra.fr

Received 27 October 2010;
revised 17 January 2011

doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01470.x

The reliability of a double-ended pressure sleeve technique was evaluated on three woody angiosperm species with contrasting maximum vessel lengths. Vulnerability curves (VCs) were constructed by varying sample length and the size of the pressure sleeves. VCs were compared against curves obtained with reference techniques. For the two diffuse-porous species, *Betula pendula* and *Prunus persica*, VCs built with shoot segments shorter than maximum vessel length strongly overestimated species vulnerability. Furthermore, increasing the size of the pressure sleeve also tended to lead to overestimated VCs. For the ring-porous species *Quercus robur*, the technique strongly overestimated vulnerability to embolism, whatever the sample length or chamber tested. In conclusion, the double-ended pressure sleeve technique only gives reliable VCs on diffuse-porous angiosperms with short pressure sleeves, only when segments are longer than maximum vessel length.

Introduction

In plants, sap is transported under large negative pressures in specialized conduits that form the xylem tissue. Water is a metastable liquid when its pressure is negative but it can suddenly change to a more stable gaseous phase by cavitation. Cavitation provokes embolism, which means it breaks the integrity of the water columns in the xylem pipes and consequently impairs the mechanisms enabling sap to ascend from soil to leaves. Cavitation has major physiological consequences as it can eventually lead to shoot or tree mortality by desiccation (Brodribb and Cochard 2009), prompting a major research push over the last three decades attempting to characterize and understand xylem hydraulics in trees. These efforts have not yet turned toward herbaceous plants (Martre et al. 2000, 2001).

The very peculiar physical state of water in the xylem makes cavitation extremely difficult to observe and quantify. Many different techniques have been proposed for constructing xylem vulnerability curves (VCs). These techniques differ by the way cavitation is induced (air dehydration, air pressurization, centrifugation, etc.) and measured (direct observation, loss of conductance, acoustic emission, etc.). Some techniques are presumed reliable (e.g. the air dehydration and declining conductivity technique of Sperry et al. 1988) whereas many others have proven to be flawed. For instance, Canny (1997) observed the content of frozen xylem vessels under a cryo-SEM and suggested that xylem conduits were extremely vulnerable to cavitation. However, Cochard et al. (2000) showed that the technique was flawed by cavitation build-up during sample preparation, and that the vessels were actually far more resistant

Abbreviation – VCs, vulnerability curves.

[†]These authors have contributed equally to this work.

to cavitation. More recently, Li et al. (2008) used a centrifuge technique to measure cavitation resistance in ring-porous species and found extremely vulnerable xylem conduits, but Cochard et al. (2010) and Choat et al. (2010) have since provided experimental evidence for bias in these centrifuge techniques which greatly overestimate the vulnerability of species with long vessels.

The good agreement between the centrifuge and air-injection techniques has been used as an argument to demonstrate the reliability of both techniques (Li et al. 2008). However, it is equally possible that both techniques are vitiated by the same artefact. The objective of our study was to provide a more extensive test of the reliability of the double-ended pressure sleeve technique (Cochard et al. 1992a, Salleo et al. 1992, Sperry and Saliendra 1994). We tested the hypothesis that sample vulnerability was biased by the presence of vessels cut open inside the pressure sleeve. Therefore, we analyzed VCs obtained with pressure sleeves of different sizes on stem samples of different lengths for three tree species presenting contrasting vessel lengths.

Materials and methods

Plant material

Experiments were conducted on different tree species from the INRA-Crouël campus in Clermont-Ferrand (central France). Three species with contrasting maximum vessel lengths were selected for this study. The air infiltration technique (Ewers and Fisher 1989) was used to measure maximum vessel lengths (L , m). Oak (*Quercus robur* L.), a ring-porous species, had very long vessels ($L = 1.34$ m, $SD = 0.38$, $n = 6$), while birch (*Betula pendula* Roth), a diffuse-porous species, had very short vessels ($L = 0.16$ m, $SD = 0.04$, $n = 6$) and peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) offered vessels with intermediate length ($L = 0.42$ m, $SD = 5.8$, $n = 6$). Shoots longer than maximum vessel length were cut in the morning and brought to the laboratory where they were analyzed later the same day. Experiments were conducted on non-ramified terminal shoots less than 3 years old.

Vulnerability curves

The VCs were determined using the double-ended pressure sleeve method according to Cochard et al. (1992a) and Sperry and Saliendra (1994). The principle of the technique is to clamp a special pressure chamber on a branch segment, increase the air pressure in the chamber and measure the effect on branch conductance. Cochard et al. (1992a) demonstrated that for *Populus* and *Salix*, the dependence of xylem conductance on

positive air pressure was similar to the dependence of xylem conductance on negative sap pressure. For the purpose of this study, we constructed three pressure sleeves of different lengths. The sleeves were made with 2.5-cm diameter steel tubes. Compression fittings were placed at both tube ends and rubber corks were used to seal the sleeves. The portion of the shoot segment in contact with compressed air inside the chambers was respectively 3.5, 17 and 27.5 cm.

Following Cochard et al. (1992a), hydraulic conductance of the sample was measured by connecting one sample end to vertical plastic tubing filled with a filtered solution (0.2 μ m) of 20 mM KCl and 1 mM $CaCl_2$ in ultrapure water. The water pressure, P , in the tube was adjusted to 6 kPa. The plastic tube was large enough (2 cm diameter) to allow the air bubbles coming out of the cut end to escape freely during pressurization. This system enabled continuous measurement of water flux, F , through the branch segment while the air pressure inside the chamber was gradually increased. Water flow through the sample was measured gravimetrically by collecting the effluent from the distal end in a pre-weighed cotton collector enclosed in a plastic tube over 1-min intervals. Sample conductance, K , was calculated as: $K = F/P$. Before being inserted in the pressure chamber, samples were first flushed with the same solution for 30 min at 0.15 MPa to remove any embolism that may have formed during sample preparation. Preliminary experiments with *Betula* (see the section on Results) indicated that it was necessary to remove sample bark inside the pressure sleeve to induce embolism in the stem.

The VCs were constructed as follows. First, air pressure in the chamber was increased to 0.1 MPa and maximum sample conductance, K_{max} , was measured. Then, the pressure in the chamber was increased in 0.5 MPa steps, and sample conductance, K , was determined at steady state at each step. The loss of hydraulic conductance, PLC, at each pressure was calculated as:

$$PLC = 100(K_{max} - K)/K_{max}$$

Test experiments

To analyze the effect of sample length on VCs obtained using this double-ended pressure sleeve method, we constructed VCs with 17.5-, 27.5- and 37.5-cm long samples for each species. For *Prunus* and *Quercus*, we also ran a test with the 3.5-cm long pressure chamber using shoots longer than their maximum vessel length, i.e. 57.5 cm for *Prunus* and 150 cm for *Quercus*.

To analyze the effect of pressure chamber length, we measured 37.5-cm long shoots of all three species in all three different pressure chambers. For each experiment, we averaged the results of three to five replicates.

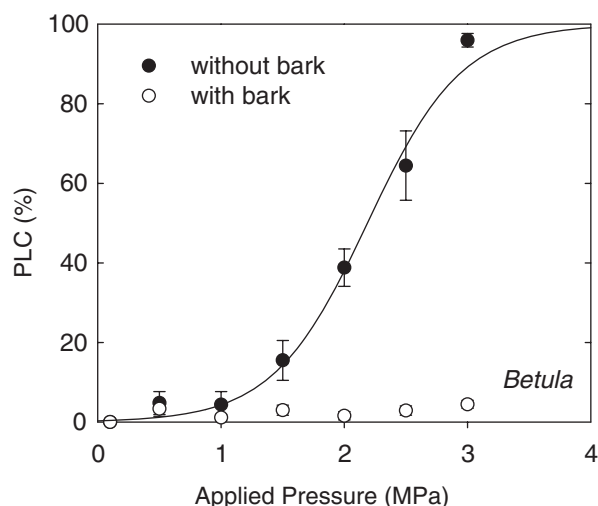


Fig. 1. Effect of bark removal on *Betula* xylem VCs obtained with the double-ended pressure sleeve technique. The wood should be in direct contact with compressed air in the chamber before embolism can be induced. Vertical bars = $\pm$ SE.

Reference VCs

Reference VCs using the bench-drying technique (Sperry et al. 1988) have previously been published for *Quercus* (Cochard et al. 1992b), *Betula* (Cochard et al. 2005) and *Prunus* (Cochard et al. 2010). The reference curves for *Betula* and *Prunus* were constructed with the same plant material as that used in this study.

Results

Increasing air pressure in the pressure sleeve decreased stem conductance in all species and all treatments. However, embolism could only be induced after previously removing bark from inside the chamber (Fig. 1).

Segment length influenced the shape of VCs, but the results contrasted strongly across species (Fig. 2). For *Betula*, a short-vessel species, the results were similar across treatments and in good agreement with the reference VC for this species. In contrast, for *Prunus* and *Quercus*, segments appeared less vulnerable at increasingly high lengths. For *Prunus*, VCs obtained with samples longer than maximum vessel length were in agreement with the reference VC, whereas for *Quercus*, the curves established with the longest segments (1.5 m) still strongly overestimated xylem vulnerability.

Length of the pressure chamber also influenced the shape of the VCs (Fig. 3). Again, the effects were small in *Betula* but more substantial in species with longer vessels, where increasing the length of the pressure chamber decreased sample vulnerability. For *Prunus*, VCs constructed with the shortest chamber were in close

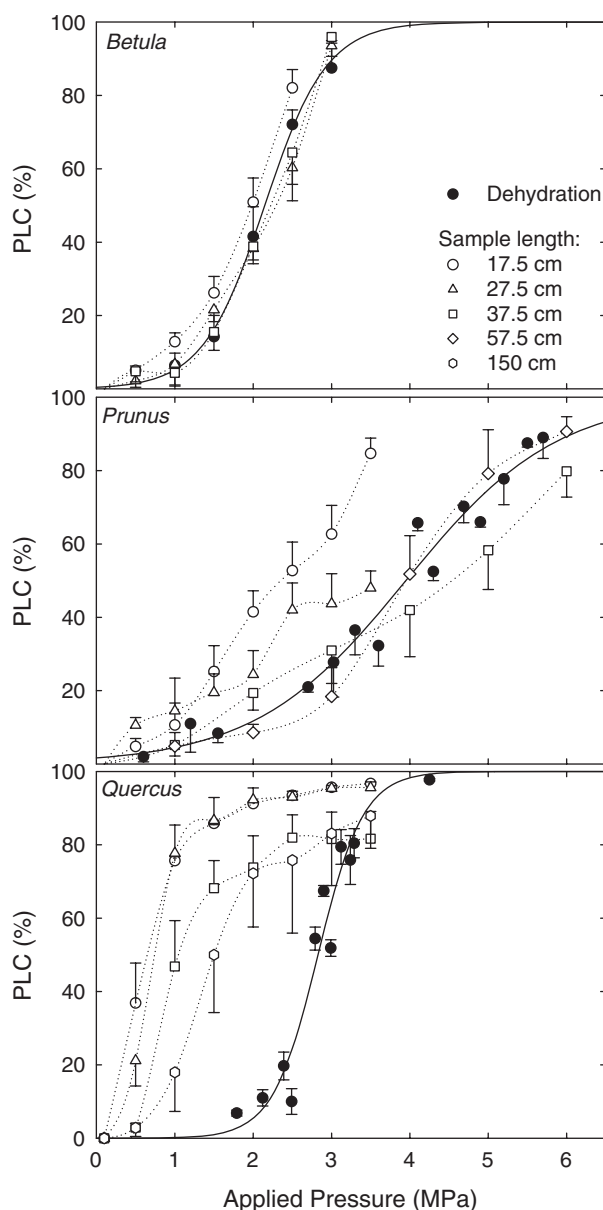


Fig. 2. Effects of sample length on xylem VCs obtained with the double-ended pressure sleeve technique (white symbols) for three woody species (different panels). The length of the pressure sleeve was constant (3.5 cm). VCs obtained with a reference technique are shown with closed symbols. Vertical bars = $\pm$ SE.

agreement with the reference VC. For *Quercus*, even the shortest chamber strongly overestimated the xylem vulnerability of this species.

Discussion

The reliability of the techniques for measuring xylem vulnerability to cavitation has been the subject of much

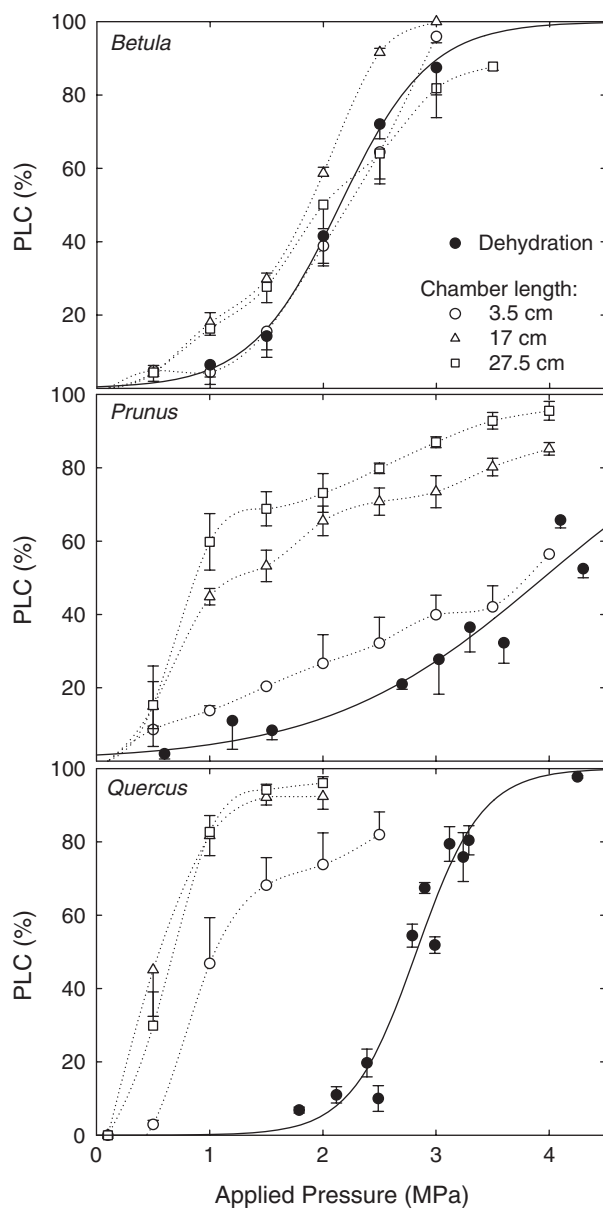


Fig. 3. Effects of pressure sleeve length on xylem VCs obtained with the double-ended pressure sleeve technique (white symbols) for three woody species (different panels). Sample length was constant across species and treatments (37.5 cm). VCs obtained with a reference technique are shown with closed symbols. Vertical bars = $\pm$ SE.

debate. A critical aspect in this discussion is to identify a reference methodology, i.e. a method capable of producing VCs similar to the dependence of xylem embolism on xylem pressure measured in situ and in planta. Such 'native' curves have been obtained rarely (Bréda et al. 1993, Cochard et al. 1996, Tyree et al. 1992) because of obvious experimental constraints. Dehydrating cut branches on a bench instead of working with whole

plants in situ considerably speeds up the construction of VCs. It has been experimentally demonstrated that this procedure does not alter the reliability of the curves (Bréda et al. 1993, Cochard et al. 1996, Tyree et al. 1992), which also suggests that the faster rate at which plants are dehydrated ex situ has little impact on the cavitation process. Therefore, we can assume the bench-drying method to be reliable. However, this technique remains laborious and time consuming, which explains why other methodologies have been developed.

The double-ended pressure sleeve technique offers an attractive alternative as it enables VCs to be constructed quickly and with limited plant material, and has consequently become a routine technique for cavitation studies in many laboratories worldwide. In a recent literature survey, we estimated that one in four of all the VCs published to date were constructed based on this technique (Choat et al., unpublished data). Our study suggests that this technique has strong limitations and should probably be used more cautiously.

Methodological difficulties associated with air-injection techniques have already been reported in the past. For instance, Sperry and Saliendra (1994) recommended notching the xylem inside the chamber to provoke embolism in *Betula*. Our results on *Betula* confirm that the xylem has to be directly exposed to the pressurized air inside the chamber before cavitation can be induced. We did not test here whether different ways of exposing xylem conduits had an impact on VCs. This finding suggests that bark can form a relatively air-tight barrier isolating xylem conduits from air in the pressure chamber. In this situation, the air pressure at the contact with the xylem vessels equilibrates with the pressure in the chamber, with the result that the VCs are biased. The bark isolation problem appears to be specific to this pressure sleeve technique. Indeed, with bench dehydration or centrifugation techniques, the air pressure inside the xylem is at equilibrium with the atmospheric pressure, whatever the negative pressure in the xylem lumens. We do not know whether bark removal is an appropriate procedure for other species. This is a first point of concern that should be more carefully evaluated whenever this technique is employed.

The second point highlighted in this study is the strong influence of sample length and chamber length on VCs. As a rule, the longer the sample and the shorter the chamber, the closer the curves fit the reference VCs. However, the patterns differed strongly across species, and a dependence on xylem anatomy can be hypothesized. Choat et al. (2010) recently reported that in *Vitis*, a long-vessel species, VCs established on short segments greatly overestimated xylem vulnerability. However, working with segments as long as vessel length gave

more reliable curves. Our data confirm this result, and further demonstrate that maximum vessel length is a key parameter for the reliability of the double-ended pressure sleeve technique. For species having very short vessels, like *Betula*, our curves were always in good agreement with the reference VCs, whatever the chamber or sample length. In contrast, all the VCs obtained on *Quercus* strongly overestimated the cavitation resistance of this ring-porous species. For *Prunus*, which has intermediate vessel length, the curves were only in agreement with the reference VC when segments were longer than vessel length, and only with the smallest chamber.

To account for the different effects of sample, chamber and vessel lengths on VCs, we computed the following index I:

$$I = (\text{sample length} - \text{chamber length}) / (\text{vessel length})$$

Figure 4 shows how the ratios between sample P50 and reference P50 vary with I. The result of this very simple computation suggests that when (sample length – chamber length) is higher than maximum vessel length, the P50 converges toward the reference P50 value. This condition was sufficient for *Betula*, *Prunus* and *Vitis*, the species studied by Choat et al. (2010). However, for *Quercus*, this condition was not satisfactory as the P50 were still overestimated. This is possibly because of an underestimation of vessel length for this species, as the pressure chamber was mounted in the

middle of the branch where vessels are probably much longer than in the terminal part of the shoot (Cochard and Tyree 1990). Clearly, VCs constructed with this technique using samples shorter than maximum vessel length can greatly overestimate species vulnerability to cavitation. The same conclusion was recently reached with an independent method base on centrifugal forces (Cochard et al. 2010). Therefore, a good agreement between the centrifugation and air-injection techniques does not provide a sound cross-validation of each of the two techniques. Further investigations are required in order to understand why vessels cut open are also experimentally more vulnerable to cavitation with the double-ended pressure sleeve technique.

In conclusion, VCs constructed with the double-ended pressure sleeve method can strongly overestimate xylem cavitation when samples are shorter than the species' maximum vessel length. The overestimation is further exacerbated with long pressure sleeves. Within these methodological restrictions, the double-ended pressure sleeve technique can give reliable results for conifers and diffuse-porous angiosperms but probably not with most of the ring-porous angiosperms. The apparent very high vulnerability of ring-porous species reported in recent publications based on these techniques should be reconsidered in light of the findings presented here and in Cochard et al. (2010).

Acknowledgement – This work was funded in part by the PibBulles project (ANR No. 2010 Blan 1710 01).

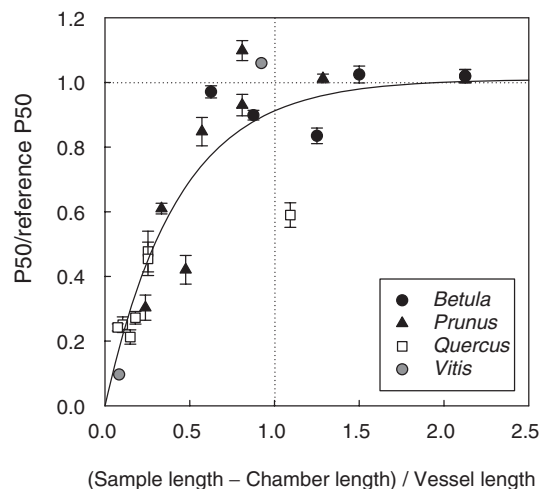


Fig. 4. Combined effect of sample length and pressure sleeve length on xylem pressure provoking a 50% loss of conductance (P50). The x-axis represents the ratio between sample length minus pressure sleeve length and the maximum vessel length of the species. The y-axis is the ratio between P50 and the P50 value of the reference curve for each species. The values for *Vitis* are estimated from the data presented in Choat et al. 2010. Vertical bars = $\pm$ SE.

References

- Bréda N, Cochard H, Dreyer E, Granier A (1993) Field comparison of transpiration, stomatal conductance and vulnerability to cavitation of *Quercus petraea* and *Quercus robur* under water stress. *Ann Sci For* 50: 571–582
- Brodribb TJ, Cochard H (2009) Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiol* 149: 575–584
- Canny MJ (1997) Vessel contents during transpiration: embolisms and refilling. *Am J Bot* 84: 1223–1230
- Choat B, Drayton WD, Brodersen C, Matthews MA, Shackel KA, Wada H, McElrone AJ (2010) Measurement of vulnerability to water stress-induced cavitation in grapevine: a comparison of four techniques applied to a long-vessel species. *Plant Cell Environ* 33: 1502–1512
- Cochard H, Tyree MT (1990) Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. *Tree Physiol* 6: 393–407
- Cochard H, Cruiziat P, Tyree MT (1992a) Use of positive pressures to establish vulnerability curves. Further

- support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis. *Plant Physiol* 100: 205–209
- Cochard H, Bréda N, Granier A, Aussenac G (1992b) Vulnerability to air embolism of three European oak species (*Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Q. pubescens* Willd, *Q. robur* L). *Ann Sci For* 49: 225–233
- Cochard H, Ridolfi M, Dreyer E (1996) Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana* x *trichocarpa* cv. Peace) II. Hydraulic properties and xylem embolism. *New Phytol* 134: 455–461
- Cochard H, Bodet C, Améglio T, Cruiziat P (2000) Cryo-scanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles. Facts or artifacts? *Plant Physiol* 124: 1191–1202
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiol Plant* 124: 410–418
- Cochard H, Herbette S, Barigah T, Badel E, Ennajeh M, Vilagrosa A (2010) Does sample length influence the shape of xylem embolism vulnerability curves? A test with the Cavitron spinning technique. *Plant Cell Environ* 33: 1543–1552
- Ewers FW, Fisher JB (1989) Techniques for measuring vessel lengths and diameters in stems of woody plants. *Am J Bot* 86: 1077–1081
- Li Y, Sperry JS, Taneda H, Bush SE, Hacke UG (2008) Evaluation of centrifugal methods for measuring xylem cavitation in conifers, diffuse- and ring-porous angiosperms. *New Phytol* 177: 558–568
- Martre P, Durand JL, Cochard H (2000) Changes in axial hydraulic conductivity along elongating leaf blades in relation to xylem maturation in tall fescue. *New Phytol* 146: 235–247
- Martre P, Cochard H, Durand JL (2001) Hydraulic architecture and water flows in a growing grass till (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Cell Environ* 24: 65–76
- Salleo S, Hinckley TM, Kikuta SB, Lo Gullo MA, Weilgony P, Yoon TM, Richter H (1992) A method for inducing xylem emboli *in situ*: experiments with a field-grown tree. *Plant Cell Environ* 15: 491–497
- Sperry JS, Saliendra NZ (1994) Intra-plant and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula occidentalis*. *Plant Cell Environ* 17: 1233–1241
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ* 11: 35–40
- Tyree MT, Alexander J, Machado JL (1992) Loss of hydraulic conductivity due to water stress in intact juveniles of *Quercus rubra* and *Populus deltoides*. *Tree Physiol* 10: 411–415

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A água demonstrou ter um papel fundamental durante a dormência, principalmente no período que antecede a brotação. As conclusões realizadas para cv. Packham's pode ser estendida, talvez, para um comportamento generalizado das pereiras européias. Dados (não publicados) para cv. Williams cultivadas nos mesmos locais foram muito similares à cv. Packham's.

Durante o experimento relacionado ao conteúdo de água nos tecidos em pereiras durante o ano 2008, observamos que apesar de funcional, a técnica utilizada para determinação do conteúdo de água pode sofrer alterações que comprometeram a fidelidade dos dados, caso precauções não sejam tomadas. Ao longo do ano de 2007 efetuamos diversos testes para determinação deste parâmetro. Verificamos que o material vegetal deve ser coletado sempre no mesmo horário e de ramos protegidos do sol, ou seja, ramos localizados mais internamente na copa. Ramos expostos ao sol podem ter desidratações severas que não condizem com o estado real da planta.

Outro fator a ser considerado, são as precipitações que ocorrem horas antes ou durante a coleta. As determinações são alteradas, invalidando os dados coletados. A solução para este problema utilizando esta metodologia está em não

coletar o material e aguardar o tempo apropriado para coleta. Outra questão está na distância do local do experimento até o local de processamento das amostras. Em nosso caso verificamos que os ramos acondicionados em sacos plásticos pretos imediatamente após coleta e colocados em caixas de térmicas com gelo não alteram os valores originais após 11h de viagem.

O número de amostras para determinações de açúcares através da metodologia da utilização da antrona deve ser bem elaborado, visto que a demanda de material laboratorial e do tempo relativamente é grande. Apesar do custo baixo das determinações, a utilização do ácido perclórico é regulamentado pelo exército brasileiro, sendo que o laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado tem autorização de compra de somente 3 litros anuais. Caso o delineamento do experimento não prever esta situação e as amostras demandarem um total superior a 3 litros, os dados não poderão ser determinados com esta metodologia.

Estudos com o conteúdo de água nos tecidos de angiospermas plantas lenhosas durante a dormência iniciaram desde 1983, no entanto somente em 2007 foram publicados resultados através de tecnologias de ponta, através do uso da ressonância magnética. Tal tecnologia ainda determina a região do tecido de maior concentração de água. Perspectivas para estes estudos poderão serem feitas com uso de metodologias mais precisas para determinação da conteúdo de água nos tecidos.

O método de balanço de calor para determinação do fluxo de seiva é simples, porém necessita de medidas de técnicas complexas. Se algum problema acontecer em uma delas, a estimativa é invalidada. Dois problemas ocorreram durante o período que antecedeu o experimento, o qual chamamos de período de adaptação

das plantas e equipamentos. O primeiro diz respeito à 'poluição eletromagnética' proveniente da rodovia localizada a 100 m do experimento, onde solucionamos com a instalação de resistores de 0,5 ohm em cada cabo de dados antes da entrada no *datalogger*. Neste experimento foram instalados sensores de determinação da variação do diâmetro do caule, os quais os dados não puderam ser aproveitados devido a tal poluição.

A queda de energia na unidade também afetou a aparelhagem usada para determinação. Problemas de aterramento de cabos de energia ocorreram quando a energia foi restabelecida. Estes problemas foram os grandes contratempos para se pudesse iniciar o experimento, visto que, levou um determinado tempo para localizar a razão dos problemas. Outro fator a ser considerado é o volume de dados que serão gerados. Neste experimento utilizamos 12 plantas, o que nos demandou um *datalogger* com 64 canais. A coleta de dados realizadas a cada 24 horas gerava 1440 linhas x 64 colunas de dados no software utilizado. Durante o período do experimento (27 julho a 24 agosto) gerou um total de 40320 linhas x 1792 colunas. Apesar de a técnica ser eficiente, existem dados diários que devem ser filtrados manualmente. Devido ao volume de dados gerados, esta filtragem tornou-se muito trabalhosa e difícil. Sendo assim, deixa-se a sugestão de ao delinear o experimento, deve determinar o mínimo de plantas a serem utilizadas na utilização desta técnica.

No caso deste experimento em que utilizamos a determinação do fluxo de seiva pelo método de balanço de calor, o qual foi conduzido ao nível de campo, sem proteções contra adversidades do tempo, sugerimos que as plantas alocadas em vasos sejam fortemente fixadas em arames para que não ocorra o tombamento através do vento ou tempestades ou mesmo de animais silvestres ou domésticos. Animais silvestres, como os roedores, entre eles coelhos e ratos, podem roer os

cabos de leitura, ocasionando perda de dados, porém facilmente perceptíveis. Em nosso experimento, após detectarmos este problema, utilizamos uma cerca elétrica de 0,5 m de altura em torno de todo o experimento.

No experimento que verificamos utilizamos a técnica de injeção de ar em ramos para determinação da vulnerabilidade à cavitação observamos que o uso desta técnica, apesar de gerar dados lentamente, mostra-se segura e confiável. O equipamento relativamente é básico e de baixo custo, diferente das outras metodologias. No entanto, é preciso vários ensaios e se utilizar de dados de outras metodologias para determinar as curvas de vulnerabilidades.

Nesta técnica, é preciso aferir a massa de um tubo com algodão a cada um minuto da água coletada na extremidade do ramo. Logo, para espécies em que os vasos do xilema são largos, (ex. pessegueiro), esta aferição pode ser substituída por outras metodologias, como recuperar o ar que sai de umas das extremidades do ramo, e direcioná-lo para um tubo de vidro milimetrado em forma de 'U' semi cheio com solução colorida (ex. azul, vermelho ou verde). Este direcionamento do ar irá fazer com que a coluna de solução no interior do tubo se desloque, tendo assim uma medida de deslocamento a cada pressão em que o ramo foi submetido, podendo substituir os dados gerados pela massa do tubo.

A seguir listamos os principais pontos que merecem ser pesquisados para esclarecer algumas das interrogações provenientes deste trabalho:

- Metodologias mais avançadas para estudos da dinâmica da água em plantas lenhosas durante a dormência;
- Estudar a variabilidade genética intra e inter específicas das plantas lenhosas referente à resistência à cavitação;

- Identificar genótipos de maior desempenho em face às restrições hídricas;
- Aprimorar o uso das técnicas para determinação de curvas de vulnerabilidade à cavitação para diversas espécies de plantas lenhosas, tanto angiospermas quanto gimnospermas.